

**UNIVERSITE DE RENNES I**

**FACULTE DE PHARMACIE**

Année 1995

N° 36

**THESE**

en vue du

**DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE RENNES I**

Mention :

**SCIENCES BIOLOGIQUES ET SANTE**

Conformément aux dispositions de l'arrêté du 30 mars 1992

**CONTAMINATION DE L'ENVIRONNEMENT LITTORAL  
PAR LES ROTAVIRUS DU GROUPE A**

Détection par amplification enzymatique en chaîne  
et analyse du polymorphisme de restriction de séquences virales  
dans les eaux de surfaces et les coquillages

par

**Eric DUBOIS**

Présentée et soutenue publiquement le 19 décembre 1995

**JURY**

**Président :**

**Rapporteurs :**

**Invités :**

Professeur M. CORMIER

Docteur H. KOPECKA

Docteur J. COHEN

Professeur M.K. ESTES

Professeur M. POMMEPUY

Professeur L. SCHWARTZBROD

Docteur F. LE GUYADER

Université de Rennes I

Institut Pasteur, Paris

INRA, Jouy-en-Josas

BCM, Houston

Université de Rennes I

Université de Nancy I

IFREMER, Nantes

*A Corinne et Emma.*

# **AVANT-PROPOS**

Ce travail a été réalisé grâce à la collaboration, à l'aide et au soutien de nombreuses personnes qui l'ont toujours fait avec beaucoup de bienveillance et d'amitié. Je tiens à les en remercier.

Je remercie M. Pommepeuy, F. Le Guyader et M. Cormier, sans qui ce projet de recherche n'aurait pas été initié. Je les remercie également, ainsi que C. Alzieu (Direction de l'Environnement Littoral, IFREMER Issy-les-Moulineaux), pour m'avoir permis de mener ces recherches au sein du Laboratoire de Microbiologie à l'IFREMER de Nantes.

Je remercie et je suis profondément reconnaissant envers F. Le Guyader, mon responsable scientifique, pour la collaboration, les conseils et le soutien quasi quotidien qu'elle m'a apporté lors de mes travaux expérimentaux, lors de la rédaction de la thèse, et aussi pour avoir accepté de faire partie du jury.

Je remercie également M. Cormier, mon directeur de thèse qui me fait également l'honneur de présider le jury de thèse, pour sa clairvoyance dont il a su me faire profiter et pour la relecture du manuscrit.

Je remercie chaleureusement H. Kopecka qui a guidé mes travaux, m'a apporté l'aide et les conseils techniques pour le clonage et l'usage des techniques de biologie moléculaire, pour ses encouragements lors de ces trois années et pour avoir accepté de juger ces travaux en tant que rapporteur.

J'adresse mes remerciements à J. Cohen pour sa disponibilité, pour sa spontanéité à me donner des conseils avisés, pour m'avoir accepté dans son laboratoire afin de m'initier à la culture cellulaire et aussi pour avoir bien voulu juger ce travail en tant que rapporteur.

J'exprime mes remerciements à M. K. Estes pour l'intérêt qu'elle a bien voulu porter à ces travaux, plus particulièrement lors de ses séjours en France, et de me faire l'honneur de faire partie du jury.

Tous mes remerciements à L. Schwartzbrod pour ses encouragements et ses remarques qu'il m'a adressés lors de chacune de nos rencontres et pour avoir bien voulu être présent dans le jury.

Je remercie vivement un fois de plus M. Pommepeuy pour m'avoir compté parmi son équipe, pour avoir mis à disposition les moyens de réaliser ces travaux, pour m'avoir fait profiter de ses compétences et de son dynamisme, ainsi que pour avoir accepté d'être présent dans le jury.

Mes remerciements s'adressent aussi à :

- M. Leberre (hôpital de Saint-Nazaire) pour avoir régulièrement recueilli les selles des enfants infectés par les rotavirus hospitalisés et pour son enthousiasme vis-à-vis de la virologie appliquée à l'étude de l'environnement,

- L. Haugarreau (Laboratoire de Microbiologie, IFREMER de Nantes) pour la collecte, l'extraction et l'analyse d'échantillons et plus particulièrement pour l'analyse des selles,

- D. Ménard (Laboratoire de Microbiologie, IFREMER de Nantes) pour avoir collaboré également aux collectes et aux analyses,

- L. Miossec (Laboratoire de Microbiologie, IFREMER de Nantes) et B. Beliaeff (Service Qualité du Milieu, IFREMER de Nantes) pour leur conseils dans les domaines de l'épidémiologie ou de la stratégie d'échantillonnage et pour la relecture du manuscrit,

- B. Minier (Laboratoire de Microbiologie, IFREMER de Nantes) pour avoir fait en sorte que le matériel et les milieux soient toujours à disposition,

- F. Dumont, C. Menanteau et A. Pezeron (Laboratoire côtier IFREMER de Nantes) pour avoir réalisé les analyses bactériologiques des coquillages prélevés en Loire-Atlantique,

- M. Catherine (Service Qualité du Milieu, IFREMER de Nantes) pour ses conseils dans le choix des sites d'étude et sa connaissance sur la qualité microbiologique du littoral de Loire-Atlantique dont il a su me faire profiter,

- P. Camus, C. Treguier et F. D'Amico (Laboratoire côtier IFREMER de La Trinité sur Mer) pour avoir réalisé les prélèvements des coquillages dans le Morbihan et accompli les analyses bactériologiques,

- F. Sauvager (Laboratoire de Microbiologie et Immunologie Pharmaceutique, Faculté de Pharmacie de Rennes) et A. Charpilienne (Laboratoire de Virologie et Immunologie Moléculaire, INRA de Jouy-en-Josas) pour m'avoir initié, aidé et conseillé pour la culture cellulaire,

- F. Galgani, F. Vincent et C. Minier (Laboratoire d'Ecotoxicologie, IFREMER de Nantes) pour leurs conseils dans l'usage des techniques de biologie moléculaire et leur aide dans l'utilisation des banques de données,

- M. Jérôme (Laboratoire Qualité et Physico-Chimie, IFREMER de Nantes) pour m'avoir enseigné le fonctionnement et permis d'utiliser le densitomètre,

- J. Tronczynski (Laboratoire Chimie des Contaminants et Modélisation, IFREMER de Nantes), pour son aide dans l'analyse statistique et graphique des données,

- J. Guillard, B. Le Pape, M-J. Thébaud (Laboratoire de Microbiologie, IFREMER de Nantes) et J. Gueguen (Direction Scientifique, IFREMER de Nantes) pour leur contribution dans la simplification des démarches administratives,

- M. L'Excellent et A. Radenac (Service de la Documentation et des Publications, IFREMER de Nantes) pour leur aide dans la recherche de références bibliographiques,

- R. Poggi (Service Qualité du Milieu, IFREMER de Nantes) pour ses informations sur les réglementations dans le domaine de l'environnement,

- Le Conseil Régional des Pays de la Loire et l'IFREMER pour m'avoir accordé une bourse de recherche pendant trois années.

Je remercie les personnes qui m'ont très souvent apporté beaucoup plus qu'une aide technique ou intellectuelle :

- C. Hervé, J. Dupont, A. Grouhel, M. Gourmelon, M-P. Caprais, E. Dupray, A. Derrien, D. Guillerm (Laboratoire de Microbiologie, l'IFREMER de Nantes et Brest),

- M. Schaan, C Desmots, C Mamez, et J. Minet (Laboratoire de Microbiologie et Immunologie Pharmaceutique, Faculté de Pharmacie de Rennes),

- T. Burgeot, J. Cachot et G. Bocquene (Laboratoire d'Ecotoxicologie, IFREMER Nantes),

- M. Chatellier, M. Bardouil, P. Masselin et P. Truquet (Laboratoire Phycotoxines et Nuisances, IFREMER de Nantes),

- C. Munschy et K. Moisan (Laboratoire Chimie des Contaminants et Modélisation, IFREMER de Nantes),

Mes derniers remerciements sont destinés à mes parents, mes beaux parents et à mes amis pour leur soutien continu.

## **SOMMAIRE**

<b>INTRODUCTION</b>	<b>1</b>
<b>ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE</b>	<b>4</b>
<b>I. CARACTERISTIQUES GENERALES DES ROTAVIRUS</b>	<b>5</b>
I.1. Historique et classification	5
I.2. Structure du virion	6
I.3. Structure du génome	7
I.4. Classification antigénique	8
I.5. Evolution du génome viral	9
<b>II. LES INFECTIONS A ROTAVIRUS</b>	<b>10</b>
II.1. Signes cliniques	10
II.2. Données épidémiologiques	11
II.3. Transmission des infections	13
II.4. Résistance aux traitements physico-chimiques	14
<b>III. CONTAMINATION DU MILIEU HYDRIQUE PAR LES ROTAVIRUS</b>	<b>17</b>
III.1. Cycle de contamination du milieu hydrique	18
III.2. Epuration des eaux usées	19
III.3. Contamination du milieu hydrique	20
III.4. Transmission d'infections à rotavirus par le milieu hydrique	22
<b>IV. METHODES DE RECHERCHE DES ROTAVIRUS DANS L'ENVIRONNEMENT</b>	<b>23</b>
IV.1. Détection par inoculation sur cultures cellulaires	23
IV.2. Détection par les techniques de biologie moléculaire	26



<b>MATERIELS ET METHODES</b>	<b>31</b>
<b>I. VIRUS ET MULTIPLICATION VIRALE</b>	<b>32</b>
<b>I.1. Souche virale</b>	<b>32</b>
<b>I.2. Réplication virale sur cultures cellulaires</b>	<b>32</b>
I.2.1. Entretien de la lignée cellulaire	32
I.2.2. Conservation de la lignée cellulaire	33
I.2.3. Préparation d'une suspension virale	33
I.2.4. Concentration des particules virales complètes	33
<b>II. QUANTIFICATION DES VIRUS SUR CULTURES CELLULAIRES</b>	<b>34</b>
<b>II.1. Cultures cellulaires en microplaques de titration</b>	<b>34</b>
<b>II.2. Inoculation sur cultures cellulaires</b>	<b>35</b>
<b>II.3. Titrage du pouvoir infectieux par immunorévélation</b>	<b>35</b>
<b>II.4. Détermination de la dose infectante 50 %</b>	<b>35</b>
<b>III. LES EAUX DE MER</b>	<b>36</b>
<b>III.1. Eaux naturelles</b>	<b>36</b>
<b>III.2. Eau de mer artificielle</b>	<b>37</b>
<b>III.3. Contamination artificielle des eaux de mer</b>	<b>37</b>
III.3.1. Contamination par le virus SA11	37
III.3.2. Contamination par de l'ARN viral nu et encapsidé	38
<b>IV. SITES D'ETUDES ET PRELEVEMENTS</b>	<b>38</b>
<b>IV.1. Le littoral du Morbihan</b>	<b>38</b>
IV.1.1. Le golfe du Morbihan	38
IV.1.2. Points de prélèvement des coquillages	39
<b>IV.2. Le littoral de la Martinique</b>	<b>40</b>
IV.2.1. La baie de Fort de France	40
IV.2.2. Points de prélèvements d'eaux	40
IV.2.3. Echantillons cliniques	41

<b>IV.3. Le littoral de la Loire-Atlantique</b>	<b>42</b>
IV.3.1. La presqu'île Guérandaise	42
IV.3.2. Points de prélèvements de coquillages	42
IV.3.3. Points de prélèvements d'eaux	44
IV.3.4. Echantillons cliniques	45
<b>V. EXTRACTION DES ARN A PARTIR DES ECHANTILLONS</b>	<b>46</b>
V.1. Elution et concentration des virus à partir des coquillages entiers	46
V.2. Extraction des acides nucléiques en présence de mélange détergent	46
V.3. Extraction des ARN en présence de thiocyanate de guanidium	48
V.4. Purification des acides nucléiques	48
V.4.1. Purification par adsorption des acides nucléiques	48
V.4.2. Purification par filtration	49
<b>VI. RECHERCHE D'ARN VIRAUX DANS LES EXTRAITS</b>	<b>49</b>
VI.1. Choix des amorces et de la sonde	49
VI.2. Rétro-transcription	50
VI.2.1. Utilisation du diméthylsulfoxyde	50
VI.2.2. Utilisation de l'hydroxy-méthylmercure	50
VI.2.3. Réaction enzymatique	50
VI.3. Réactions d'amplification enzymatique en chaîne	50
VI.4. Réaction d'hybridation (Southern blot)	51
VI.4.1. Marquage de la sonde	51
VI.4.2. Electrotransfert	52
VI.4.3. Hybridation	52
VI.4.4. Révélation	52
<b>VII. ANALYSE DU POLYMORPHISME DE RESTRICTION DES SEQUENCES VIRALES AMPLIFIEES</b>	<b>53</b>
VII.1. Analyse de séquences pures	53
VII.2. Purification de séquences en faible concentration ou mélangées à des séquences différentes sur le critère de la taille	54
VII.3. Purification de séquences mélangées à des séquences différentes sur le critère du polymorphisme de restriction	54

<b>VIII. ELECTROPHORESE DES ACIDES NUCLEIQUES</b>	<b>55</b>
<b>VIII.1. Electrophorèse en gel d'agarose à bas point de fusion</b>	<b>55</b>
<b>VIII.2. Electrophorèse en gel de polyacrylamide</b>	<b>55</b>
<b>VIII.3. Coloration des gels d'électrophorèse au bromure d'éthidium</b>	<b>56</b>
<b>VIII.4. Coloration des gels de polyacrylamide au nitrate d'argent</b>	<b>56</b>
<b>VIII.5. Estimation de la taille d'une séquence d'acides nucléiques</b>	<b>56</b>
<b>VIII.6. Analyse densitométrique des gels colorés au nitrate d'argent</b>	<b>57</b>
<b>IX. SYNTHÈSE DU CONTRÔLE INTERNE</b>	<b>57</b>
<b>IX.1. Construction de l'insert</b>	<b>57</b>
IX.1.1. Amplification du gène de la protéine VP7	57
IX.1.2. Modification de la séquence virale	58
<b>IX.2. Clonage de l'insert dans un vecteur de transcription</b>	<b>60</b>
IX.2.1. Insertion dans le plasmide	60
IX.2.2. Transformation de bactéries compétentes	60
IX.2.3. Extraction des plasmides recombinants (Mini-Prep)	62
IX.2.4. Orientation de l'insert dans le vecteur	63
<b>IX.3. Synthèse d'ARN bicaténaire</b>	<b>64</b>
IX.3.1. Isolement du fragment plasmidique à transcrire	64
IX.3.2. Transcription en ARN monocaténaire	64
IX.3.3. Hybridation des deux transcrits	66
IX.3.4. Quantification du contrôle interne	66
<b>X. ANALYSE DES RESULTATS DE BANQUES DE DONNEES</b>	<b>67</b>
<b>RESULTATS</b>	<b>69</b>
<b>I. MISES AU POINT METHODOLOGIQUES</b>	<b>70</b>
<b>I.1. Optimisation de la RT-semi-nested PCR</b>	<b>70</b>
I.1.1. Taille des séquences amplifiées en fonction du choix des amorces	70
I.1.2. Sensibilité de la RT-semi-nested PCR	72
I.1.2.1. Etude de sensibilité en fonction du choix des amorces	72
I.1.2.2. Effets de la dénaturation sur la sensibilité de la RT PCR	72

I.1.2.3. Expression de la sensibilité en nombre de copies d'ARNdb	72
I.1.2.4. Effet de la purification des acides nucléiques sur la sensibilité	74
I.1.2.5. Sensibilité de la RT-semi-nested PCR sur des prélèvements de coquillages	75
<b>I.2. Développement de la RT-PCR semi-quantitative</b>	<b>75</b>
I.2.1. Amplification du contrôle interne	75
I.2.2. Amplification concomitante du contrôle interne et de l'ARN viral	77
I.2.3. Quantification densitométrique des produits d'amplification	79
I.2.4. RT-PCR compétitive entre le génome viral et le contrôle interne	79
 <b>II. ETUDE <i>IN VITRO</i> SUR LA STABILITE DES ROTAVIRUS DANS L'EAU DE MER</b>	 <b>81</b>
<b>II.1. Stabilité du génome viral et du pouvoir infectieux</b>	<b>81</b>
II.1.1. Suivi en eau de mer artificielle	81
II.1.2. Suivi en eau de mer naturelle	84
<b>II.2. Stabilité de l'acide nucléique viral nu par rapport au génome encapsidé</b>	<b>84</b>
 <b>III. ETUDES <i>IN SITU</i> SUR LA CONTAMINATION DU LITTORAL PAR LES ROTAVIRUS</b>	 <b>85</b>
<b>III.1. Contamination des coquillages de la région du golfe du Morbihan</b>	<b>86</b>
<b>III.2. Contamination des eaux de la baie de Fort de France (Martinique)</b>	<b>87</b>
III.2.1. Contamination virale des eaux de rivières et des effluents de station d'épuration.	87
III.2.2. Caractérisation des séquences virales	88
III.2.3. Etude des souches humaines	89
III.2.4. Homologies entre les profils de restriction isolés de l'environnement et ceux obtenus à partir de prélèvements humains ou de banques de données	89
<b>III.3. Suivi de la contamination par les rotavirus de la baie de La Baule (Loire-Atlantique)</b>	<b>92</b>
III.3.1. Contamination virale des coquillages	92
III.3.2. Contamination virale des eaux de station d'épuration	92
III.3.3. Recherche dans les extraits d'inhibiteurs de la RT-semi-nested PCR	94
III.3.4. Analyse du RFLP des séquences virales amplifiées	95
III.3.5. Amplification des séquences virales contenues dans les selles	99
III.3.6. Analyse du RFLP des séquences de rotavirus humains	99
III.3.7. Homologies avec des séquences déposées dans des banques de données	101

<b>DISCUSSION</b>	<b>104</b>
<b>I. DEVELOPPEMENT DE LA RT-SEMINESTED PCR</b>	<b>105</b>
<b>II. RT-PCR QUANTITATIVE</b>	<b>109</b>
<b>III. STABILITE DU GENOME VIRAL ET MAINTIEN DU POUVOIR INFECTIEUX EN EAU DE MER</b>	<b>110</b>
<b>III.1. Devenir du virus SA11 en eau de mer artificielle</b>	<b>110</b>
<b>III.2. Devenir du virus SA11 en eau de mer naturelle</b>	<b>112</b>
<b>IV. CONTAMINATION DU LITTORAL MARIN PAR LES ROTAVIRUS</b>	<b>114</b>
<b>IV.1. Contamination des coquillages</b>	<b>115</b>
<b>IV.2. Contamination des eaux</b>	<b>116</b>
<b>IV.3. Contamination de l'environnement et infections humaines</b>	<b>118</b>
<b>CONCLUSION</b>	<b>122</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	<b>125</b>
<b>ANNEXES</b>	<b>144</b>
<b>PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS</b>	<b>152</b>

## **LISTE DES TABLEAUX ET DES FIGURES**

## TABLEAUX

### ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

<b>Tableau 1.</b> Fréquence des symptômes associés aux infections à rotavirus.	10
<b>Tableau 2.</b> Virus pathogènes pour l'homme susceptibles d'être rencontrés dans le milieu hydrique.	17

### MATERIELS ET METHODES

<b>Tableau 3.</b> Centrifugation différentielle des particules de rotavirus.	34
<b>Tableau 4.</b> Séquences des amorces et de la sonde utilisées dans les réactions d'amplification et d'hybridation du gène codant pour la protéine VP7.	49

### RESULTATS

<b>Tableau 5.</b> Taille des séquences amplifiées à partir du génome du virus SA11 et à partir du contrôle interne.	76
<b>Tableau 6.</b> Temps nécessaire pour voir diminuer le titre viral et la proportion d'ARN viral de 90 pour cent.	81
<b>Tableau 7.</b> Persistance de l'acide nucléique viral nu et du virus complet dans de l'eau de mer naturelle.	85
<b>Tableau 8.</b> Résultats des analyses effectuées sur les coquillages prélevés dans la région du golfe du Morbihan.	87
<b>Tableau 9.</b> Résultats de la recherche de rotavirus dans des eaux de surface de la Martinique.	88
<b>Tableau 10.</b> Homologies entre les séquences détectées à partir des prélèvements de la martinique et les séquences de rotavirus du groupe A décrites dans les banques de données.	91
<b>Tableau 11.</b> Résultats virologiques et bactériologiques sur les prélèvements de coquillages et d'eaux de station.	94
<b>Tableau 12.</b> Diversité des souches virales impliquées lors de la période de recrudescence des gastro-entérites à rotavirus.	100
<b>Tableau 13.</b> Homologies entre les séquences détectées lors de l'étude en Loire-Atlantique et les séquences de rotavirus du groupe A décrites dans les banques de données.	102

## FIGURES

### ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

<b>Figure 1.</b> Photographie en microscopie électronique de rotavirus SA11 complets.	5
<b>Figure 2.</b> Structure des rotavirus.	6
<b>Figure 3.</b> Distribution des sérotypes de rotavirus caractérisés à l'hôpital des enfants de Londres de 1986 à 1990.	12
<b>Figure 4.</b> Modes de transmission possibles des virus entériques par l'eau.	18
<b>Figure 5.</b> Rendements théoriques d'épuration virale et de désinfection lors du traitement d'eaux usées.	19

### MATERIELS ET METHODES

<b>Figure 6.</b> Contamination des eaux de mer par le rotavirus SA11.	38
<b>Figure 7.</b> Localisation des points de prélèvements de coquillages dans la région du Morbihan.	39
<b>Figure 8.</b> Localisation des prélèvements d'eaux effectués en Martinique.	41
<b>Figure 9.</b> Présentation du site d'étude en Loire-Atlantique et localisation des points de prélèvements.	43
<b>Figure 10.</b> Localisation du domicile des enfants admis à l'hôpital de St Nazaire pour une gastro-entérite à rotavirus.	45
<b>Figure 11.</b> Présentation synoptique du protocole d'analyse des prélèvements naturels et des échantillons cliniques.	47
<b>Figure 12.</b> Localisation, sur le gène de la protéine VP7, des amorces et de la sonde utilisées en RT-seminested PCR et Hybridation.	49
<b>Figure 13.</b> Présentation synoptique du protocole d'analyse RFLP.	53
<b>Figure 14.</b> Présentation synoptique des étapes de construction de l'insert.	58
<b>Figure 15.</b> Electrophorèse en gel de polyacrylamide des produits obtenus à l'issue des différentes étapes de la construction de l'insert.	59
<b>Figure 16.</b> Présentation synoptique des étapes de clonage de l'insert dans le vecteur de transcription.	61
<b>Figure 17.</b> Vérification de l'intégration et mise en évidence de l'orientation de l'insert dans le vecteur.	63
<b>Figure 18.</b> Présentation synoptique des étapes de transcription du contrôle interne en ARNdb.	65
<b>Figure 19.</b> Localisation des sites de restriction potentiellement présents sur la séquence du gène de la protéine VP7, entre les nucléotides 71 et 376.	67



## RESULTATS

<b>Figure 20.</b> Amplification du gène de la protéine VP7 du virus SA11 avec les amorces Beg9, End9 et R0.	71
<b>Figure 21.</b> Amplification du gène de la protéine VP7 du virus SA11 avec les amorces Beg9, R1 et R2.	71
<b>Figure 22.</b> Quantification des ARNdb par électrophorèse.	73
<b>Figure 23.</b> RT-semi-nested PCR sur des dilutions d'ARN viral de concentration connue.	74
<b>Figure 24.</b> Comparaison de la structure du contrôle interne avec celle du gène de la protéine VP7 (virus SA11).	76
<b>Figure 25.</b> Amplification de l'ARN viral concomitante à celle du contrôle interne dans des extraits.	77
<b>Figure 26.</b> Titrage du contrôle interne par RT-PCR de dilutions limites et analyse densitométrique.	78
<b>Figure 27.</b> RT-PCR compétitive entre le génome viral et le contrôle interne.	80
<b>Figure 28.</b> Inactivation du virus SA11 en eau de mer artificielle et naturelle.	82
<b>Figure 29.</b> RT-PCR compétitive à partir des prélèvements d'eau de mer artificielle et naturelle, incubées à 6 °C.	83
<b>Figure 30.</b> Dégradation de l'ARN viral en eau de mer artificielle et naturelle.	83
<b>Figure 31.</b> Amplification d'ARN de rotavirus à partir des prélèvements de coquillages effectués dans la région du Morbihan.	86
<b>Figure 32.</b> Profils de restriction des séquences amplifiées à partir des prélèvements d'eau.	88
<b>Figure 33.</b> Electrophorèse des génomes viraux extraits à partir des selles des enfants martiniquais.	90
<b>Figure 34.</b> Profils de restriction des séquences amplifiées à partir des selles d'enfants martiniquais.	90
<b>Figure 35.</b> Mise en évidence de la présence d'ARN de rotavirus dans les eaux épurées.	93
<b>Figure 36.</b> Mise en évidence de la présence d'inhibiteurs dans les extraits d'acides nucléiques.	95
<b>Figure 37.</b> Profil de restriction identifiés lors de l'étude réalisée en Loire-Atlantique.	96
<b>Figure 38.</b> Distribution sur l'année 1993 des profils de restrictions obtenus à partir des prélèvements de coquillages, d'eaux de station et des prélèvements cliniques.	97
<b>Figure 39.</b> Mise en évidence de la diversité des séquences virales dans les prélèvements d'eaux épurées.	98
<b>Figure 40.</b> Interprétation du polymorphisme de restriction obtenu à partir de l'eau épurée du mois de décembre.	98

## **LISTE DES ABREVIATIONS**

**A** : adénine

**ADN** : acide désoxyribonucléique

**ADNc** : acide désoxyribonucléique complémentaire

**ARN** : acide ribonucléique

**ARNdb** : acide ribonucléique bicaténaire

**ARNsb** : acide ribonucléique monocaténaire

**BET** : bromure d'éthidium

**BSA** : bovine serum albumin

**C** : cytosine

**Cat-Floc** : chlorure de polydiallyldiméthylammonium

**CFU** : colony forming unit

**CSPD** : disodium 3-(4-methoxyspiro{1,2-dioxetane-3,2'-(5'-chloro)tricyclo[3.3.1.1<sup>3,7</sup>]decan}-4-yl)phenyl phosphate

**CTAB** : cetyl-triméthylammonium bromide

**dATP** : désoxyadénosine triphosphate

**DEPC** : diethyl pyrocarbonate

**DIG** : digoxigénine

**DI50** : dose infectante 50 %

**DMSO** : diméthylsulfoxyde

**dNTP** : désoxyribonucléotides triphosphates

**DO** : densité optique

**DTT** : dithiotreitol

**dUTP** : désoxyuridine triphosphate

**ECP** : effet cytopathique

**EDTA** : ethylene-diamine-tetra-acétique acid

**ff** : foyer de fluorescence

**Freon** : trichloro-trifluoro-éthane

**G** : guanine

**HMM** : hydroxy-méthylmercure

**IPTG** : isopropylthio-β-D-galactoside

**NPP** : nombre le plus probable

**NTP** : ribonucléotides triphosphates

**NTU** : nephelometric turbidity unit

**pb** : paire de bases

**PCR** : polymerase chain réaction

**PEG** : polyéthylène glycol

**p/v** : poids à volume

**RFLP** : restriction fragment length polymorphism

**RT** : reverse transcription

**R<sup>2</sup>** : Coefficient de détermination

**SDS** : sodium dodecyle sulfate

**SVF** : sérum de veau foetal

**T** : thymine

**TEMED** : N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine

**Tris-HCl** : tris(hydroxyméthyl)-aminométhane hydrochloride

**T90** : temps nécessaire pour voir diminuer le nombre de particules infectieuses ou le nombre de copies génomiques de 90 %.

**U** : uracile

**UV** : ultra-violet

**v/v** : volume à volume

**X-gal** : 5-bromo-4-chloro-3-indol-β-D-galactoside

## **INTRODUCTION**

Plus de 5 millions de personnes, soit environ 10 % de la population française, résident en permanence sur le littoral, lequel représente seulement 4 % de la surface du territoire. La fréquentation estivale fait décupler le nombre d'habitants dans certaines petites communes littorales. Cette densité humaine n'est pas sans conséquence sur la qualité de l'environnement littoral. La pollution marine est malheureusement aujourd'hui un fait établi qui concerne l'ensemble des mers et des océans du globe. Ce phénomène est le résultat de l'introduction par l'homme, directement ou indirectement, de microorganismes, de substances ou d'énergies dans le milieu marin entraînant une altération de la qualité de l'eau. L'origine de ces pollutions n'est pas seulement locale, les fleuves en déversant les eaux continentales peuvent également contribuer à cette dégradation de la qualité des eaux littorales. Les conséquences néfastes sont nombreuses, autant sur l'exploitation des ressources vivantes, que sur les activités maritimes ou encore sur la santé humaine.

Dans le but de prévenir les risques sanitaires liés aux rejets biologiques d'origine humaine ou animale, des critères de salubrité ont été proposés pour régir l'exploitation et la vente des coquillages, ou pour contrôler la qualité des eaux de baignade. Du point de vue de la qualité microbiologique, seules les bactéries entériques (coliformes totaux et fécaux, streptocoques fécaux, ainsi que salmonelles) sont prises en compte (Directive européenne, 1991). Toutefois, les indicateurs bactériens ne suffisent pas pour apprécier les risques liés aux virus humains pathogènes, car il ne semble pas y avoir de corrélation entre la présence de certains virus et le niveau de la contamination bactérienne. Cependant, la contamination virale d'origine entérique ne fait pas l'objet d'une surveillance systématique. Seulement pour les eaux de baignades et lorsqu'une enquête effectuée dans la zone en révèle la présence possible ou indique une détérioration de la qualité des eaux, les analyses bactériologiques doivent être complétées par une vérification de l'absence d'entérovirus dans 10 litres d'eau (Directive européenne, 1975).

De nombreux virus entériques pathogènes peuvent également contaminer le littoral marin. Les plus importants sur le plan épidémiologique sont les virus responsables des gastro-entérites et les virus des hépatites (hépatites A et E). De part leurs propriétés physico-chimiques, les rotavirus (agents responsables de gastro-entérites) conservent leur pouvoir infectieux dans le milieu hydrique où ils sont rejetés. Bien que des travaux aient décrit l'origine hydrique d'infections à rotavirus, aucune étude, à notre connaissance, n'a établi clairement une relation entre la contamination de coquillages par les rotavirus et le développement d'épidémies de gastro-entérites. Pourtant, les rotavirus ont été mis en évidence dans des eaux marines et ils peuvent être accumulés par les coquillages élevés en zone contaminées.

Ce manque d'information est en partie lié aux difficultés rencontrées pour rechercher la présence des virus dans l'environnement. La technique de détection par multiplication virale sur culture cellulaire est la seule à mettre en évidence le pouvoir infectieux des virus. Toutefois, cette méthode est peu sensible, longue et ne permet pas de caractériser l'ensemble des virus. Les nouveaux outils de la biologie moléculaire permettent de détecter rapidement, avec une grande spécificité et sensibilité, la présence de contaminations virales. L'amplification enzymatique en chaîne (PCR) est de plus en plus utilisée dans le diagnostic médical et aussi pour rechercher la présence de contamination virale dans l'environnement.

L'objectif de cette étude est d'évaluer l'utilisation de la PCR pour la détection de rotavirus dans l'environnement, au travers d'études *in vitro* et *in situ*. Cet outil, couplé à l'analyse du polymorphisme de restriction des séquences amplifiées devrait permettre également d'établir des similitudes entre les rotavirus détectés dans des prélèvements d'eau ou de coquillages et les souches impliquées dans des infections humaines. Cette comparaison de souches entre population et environnement serait un moyen de vérifier que le milieu marin est un facteur de contamination pour l'homme, à travers la consommation des fruits de mer.

**ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

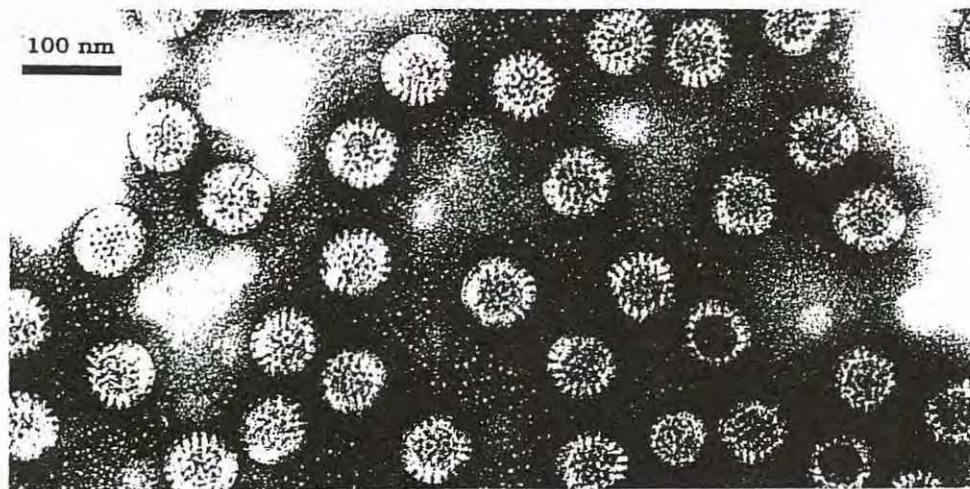




## I. CARACTERISTIQUES GENERALES DES ROTAVIRUS

### I.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 microscopie électronique leur rappelait celui d'une roue (Figure 1). Sur la base de cette caractéristique Flewett *et al.* (1974) donnèrent à ces nouveaux virus le nom de rotavirus, du latin "rota" signifiant roue.

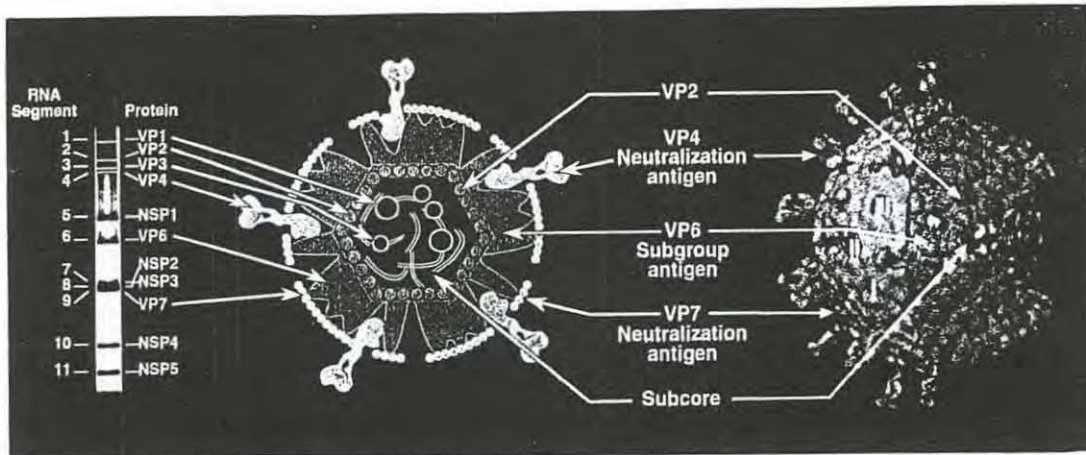


**Figure 1. Photographie en microscopie électronique de rotavirus SA11 complets** (d'après M.K. Estes, communication personnelle).

Leurs propriétés morphologiques et leurs caractéristiques biochimiques ont permis de classer les rotavirus parmi la famille des *Reoviridae* (Holmes, 1991). Ce sont des virus à ARN bicaténaire, possédant une capsidie icosaédrique et dépourvus d'enveloppe. Le genre *Rotavirus* se distinguent des autres genres (*Orthoreovirus*, *Orbivirus*, *Coltivirus*, *Aquareovirus*, *Cypovirus*, *Phytoreovirus* et *Fijivirus*), sur des caractères morphologiques et antigéniques.

## I.2. Structure du virion

Le genre Rotavirus présente des morphologies communes (Figure 2). Le virion a une taille de 76,5 nm de diamètre. La particule est formée d'une capsidie icosaédrique composée de trois couches de protéines. Six protéines structurales VP1, VP2, VP3, VP4, VP6 à VP7 (classées en fonction de leur mobilité électrophorétique) composent le virion (Estes et Cohen, 1989).



**Figure 2. Structure des rotavirus** (d'après M.K. Estes, communication personnelle).

De droite à gauche : segments génomiques, protéines structurales et non structurales codées par les segments, représentation schématique, puis tridimensionnelle de la structure du virion montrant les 3 couches protéiques.

La surface du virus est recouverte de spicules (60 spicules). Ces spicules d'une longueur de 12 nm sont formées d'un dimère de protéines VP4 (Prasad *et al.*, 1990). Les protéines VP4 et VP7 constituent la couche externe de la capsidie. Ces deux protéines sont nécessaires au maintien du pouvoir infectieux. En effet, lorsque la couche externe est déstructurée par des traitements avec des chélateurs d'ions calcium (EDTA ou EGTA), la particule perd son pouvoir infectieux (Estes *et al.*, 1979). La protéine VP4 serait responsable de l'attachement aux cellules et de la pénétration du virus dans la cellule (Crawford *et al.*, 1994). De plus, le clivage de la protéine VP4 par la trypsine en polypeptides VP5\* et VP8\* augmente le pouvoir infectieux du virus en culture de cellules, en facilitant l'internalisation du virus fixé aux cellules (Estes et Cohen, 1989). La protéine VP7 est la protéine majoritaire (780 molécules/virion) de la couche externe. Elle assurerait la cohésion de la capsidie externe ; un site de fixation de l'ion calcium, nécessaire au maintien de la structure particulière, se trouverait sur la protéine VP7 (Mattion *et al.*, 1994).

La protéine VP6 est l'unique constituant de la couche interne de la capsid (780 protéines regroupées en trimère) (Estes et Cohen, 1989). En plus de son rôle structural, cette protéine serait nécessaire à l'expression de l'activité de l'ARN polymérase ARN dépendante virale. La dernière couche protéique est formée par la protéine VP2. Les protéines VP2, VP4, VP6 et VP7 interagissent entre elles pour former la structure du virion (Crawford *et al.* 1994). Deux protéines minoritaires VP1 et VP3 sont enfermées dans la capsid. Ces protéines interagissent comme la protéine VP2 avec le génome viral (Labbé *et al.*, 1994 ; Mattion *et al.*, 1994).

### **I.3. Structure du génome**

Les rotavirus sont les seuls virus de mammifères et d'oiseaux à posséder un génome à ARN bicaténaire (ARNdb) fractionné en 11 segments (Estes et Cohen, 1989) (Figure 2). Le génome des rotavirus code pour 11 protéines. Six d'entre elles constituent les protéines structurales, les cinq autres sont nécessaires à la réplication du virus (protéines non structurales) (Figure 2). Ce génome n'est pas infectieux par lui-même car il nécessite la présence d'une activité ARN polymérase ARN dépendante d'origine virale pour pouvoir transcrire chaque segment en ARN messagers (Cohen, 1977). Plusieurs protéines virales pourraient être impliquées dans l'expression de cette activité : la protéine VP1, VP3 et VP6 (Mattion *et al.*, 1994).

Le génome fragmenté des rotavirus représente au total approximativement 18 522 paires de bases (pb), pour une masse totale de  $11 \cdot 10^6$  à  $14 \cdot 10^6$  daltons (Estes et Cohen, 1989 ; Kapikian et Chanock, 1990). La longueur des segments varie de 667 pb (segment 11) à 3 302 pb (segment 1). De façon générale, tous les segments sont riches en base A et U (A + U représentent de 58 à 67 %). Chaque segment possède une coiffe à l'extrémité 5' du brin codant. Le cadre ouvert de lecture est précédé et suivi de séquences non codantes. La plupart des segments portent un seul cadre de lecture excepté les gènes 7, 9 et 11. Pour ces derniers, un seul cadre de lecture serait utilisé. On ne retrouve pas de signal de polyadénylation à l'extrémité 3' des gènes (Estes et Cohen, 1989). La taille des séquences non codantes en 3' et 5' varie en fonction des différents gènes. Cependant, pour un segment donné, ces tailles sont constantes d'un isolat à l'autre, à l'exception de l'extrémité 3' des segments 7 et 10. Les extrémités des segments ont également des séquences conservées d'une souche à une autre ; ces régions comporteraient des signaux nécessaires à la transcription, à la réplication et probablement à l'encapsulation du génome (Estes et Cohen, 1989). La partie codante des gènes comportent des séquences conservées, mais aussi des séquences qui codent pour des régions variables des protéines. Plus particulièrement pour les protéines VP4, VP6 et VP7, certaines de ces régions sont impliquées dans l'antigénicité des protéines (Estes et Cohen, 1989 ; Mattion *et al.*, 1994).

#### I.4. Classification antigénique

Le genre *Rotavirus* possède une grande diversité antigénique de virus. Les rotavirus sont classés en groupes (ou sérogroupes) principalement à partir de l'antigénicité de la protéine VP6 (Kohli *et al.*, 1992 ; Mattion *et al.*, 1994). Sept groupes différents de A à G ont été décrits à ce jour. Les virus du groupe A, B ou C infectent l'homme ou les animaux, alors que les virus du groupe D, E, F ou G seraient retrouvés uniquement chez les animaux (Estes, 1990 ; Hoshino et Kapikian, 1994). Les rotavirus du groupe A sont ceux le plus fréquemment associés aux gastro-entérites infantiles (Kapikian et Chanock, 1990). Ces rotavirus du groupe A peuvent être classés en fonction de la spécificité antigénique des protéines VP6, VP7 et VP4 en sous-groupe et sérotypes.

Les virus du groupe A appartiennent généralement au sous-groupes I ou II (Kapikian et Chanock, 1990). La spécificité du sous-groupe est également déterminée par la structure antigénique de la protéine VP6 (Estes et Cohen, 1989 ; Mattion *et al.*, 1994). A l'intérieur de ces sous-groupes sont classés des rotavirus d'origine humaine ou animale (Hoshino et Kapikian, 1994).

Les rotavirus du groupe A peuvent être également différenciés en sérotypes, en fonction de la réactivité antigénique des deux protéines de la capsid externe. La protéine VP4 définit les types P, la protéine VP7 définit les types G (Estes et Cohen, 1989). L'appartenance à l'un des sérotypes P et G se fait de façon indépendante (Hoshino et Kapikian, 1994).

Le nombre de ces sérotypes (G ou P types) est en constante évolution et au moins 14 sérotypes G ont été identifiés. La majorité des sérotypes ne sont pas spécifiques de rotavirus humains ou animaux. Cependant, le sérotype G12 n'appartiendrait qu'à des virus de l'espèce humaine, d'autres seraient uniquement d'origine animale (G11, G7, G13, G14) (Hoshino et Kapikian, 1994). Les rotavirus humains de sérotype G1 à G4 sont les plus importants sur le plan épidémiologique, car ce sont les sérotypes les plus fréquemment identifiés à partir des prélèvements cliniques (Kapikian et Chanock, 1990).

La diversité des sérotypes P est également importante. Au moins 11 sérotypes P ont été identifiés et des sous-types au sérotype P sont décrits. Toutefois, le sérotype P reste inconnu pour beaucoup de rotavirus. En effet, le sérotype P est défini avec plus de difficultés que le sérotype G. Ceci est lié au fait que les anticorps dirigés contre la protéine VP4 sont difficiles à obtenir et moins spécifiques que ceux dirigés contre la protéine VP7 (Coulson, 1993 ; Estes et Cohen, 1989 ; Gorziglia *et al.*, 1990). La détermination du type P d'une souche s'effectue donc plus fréquemment par l'étude de la séquence du gène de la protéine VP4 (alignement de séquences ou hybridation moléculaire), ce qui permet d'obtenir le génotype P (Gentsch *et al.*,

1992 ; Green *et al.*, 1988 ; Larralde et Flores, 1990 ; Parwani *et al.*, 1992 ; Sethabutr *et al.*, 1990). Au moins 19 génotypes P sont décrits et le classement des rotavirus en fonction de leur génotype est différent de celui réalisé à partir de leur sérotype (Hoshino et Kapikian, 1994). En revanche, le classement en fonction du type G est inchangé par les deux approches, génotypique ou phénotypique (Hoshino et Kapikian, 1994).

#### **I.4. Evolution du génome viral**

Les modifications génétiques peuvent s'effectuer selon trois mécanismes : le réassortiment de gènes, la modification de séquences sans échange de gènes et le réarrangement d'un segment (Estes et Cohen, 1989).

Les réassortiments sont issus de la coinfection d'une cellule par au moins deux souches virales différentes. Au cours de la réplication des virus, les segments de génome peuvent être encapsidés de façon plus ou moins aléatoire et ainsi conduire à l'introduction d'un fragment d'origine différente dans le virion (Kobayashi *et al.*, 1993 et 1994 ; Kool *et al.*, 1992). Cette modification peut entraîner rapidement l'apparition d'une nouvelle souche. L'évolution du génome viral peut également s'effectuer sans échange de segments avec un autre virus. Lors de la réplication, des mutations peuvent s'accumuler et modifier la séquence. Les mécanismes de ces modifications seraient comparables à ceux décrits pour le virus influenza (Estes et Cohen, 1989).

Les modifications peuvent être mises en évidence par l'analyse des séquences nucléotidiques, mais aussi de façon plus simple par l'observation de modification de la mobilité des segments du génome viral en électrophorèse de polyacrylamide. En effet, une modification de la séquence peut conduire à une structure secondaire différente de l'ARNdb, retardant ou accélérant sa mobilité au travers du gel de polyacrylamide (Estes, 1984). Des modifications moins importantes (mutations) peuvent être caractérisées par hybridation moléculaire avec des conditions de forte stringence (Street *et al.*, 1982).

Le réarrangement du génome a été décrit chez de nombreux virus animaux et humains. Cette modification génomique est caractérisée par une augmentation de la taille d'un fragment (caractérisable par électrophorèse). La plupart des réarrangements concernent le segment 11, mais des modifications dans les segments 5, 6, 8, 10 ont également été rapportées (Estes, 1990). Les mécanismes moléculaires de ces réarrangements impliqueraient l'ARN polymérase, ARN dépendante. Lors de la réplication, cette enzyme ferait des retours en arrière dupliquant ainsi une partie de la séquence (Estes, 1990). A quelques exceptions près, les cadres de lecture sont conservés et ce serait préférentiellement les séquences non codantes en 3' des gènes qui

présenteraient une duplication. 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 3' favorisant un retour en arrière de l'enzyme lors de la transcription (Ballard *et al.*, 1992). Comme pour le réassortiment ou la mutation d'un gène, le réarrangement d'un segment pourrait modifier l'immunogénicité ou la pathogénicité des rotavirus. En particulier lorsqu'elles affecteraient la séquence codante et qu'elles seraient accompagnées d'une délétion, ces modifications génétiques pourraient aboutir à une nouvelle protéine fonctionnelle (Tian *et al.*, 1993).

## II. LES INFECTIONS A ROTAVIRUS

### II.1. Signes cliniques

Depuis leur découverte, les rotavirus ont été associés à la plupart des gastro-entérites infantiles. Ces virus sont responsables de 35 à 50 % des hospitalisations de jeunes enfants présentant une diarrhée sévère (Kapikian et Chanock, 1990). Le temps d'incubation avant l'apparition des premiers symptômes est de 1 à 4 jours. Les virus infectent principalement les cellules épithéliales de l'intestin grêle. Les principaux symptômes associés à cette infection virale et leur fréquence sont présentés dans le Tableau 1. Les rotavirus pourraient également avoir une pathologie associée extra-intestinale faite d'atteintes respiratoires (Christensen, 1989). Les signes cliniques persistent généralement de 4 à 7 jours. Durant cette période, la quantité de virus rejetée dans les selles est très importante et de  $10^9$  à  $10^{11}$  particules virales ont été identifiées par gramme de selles (Flewett et Woode, 1978).

**Tableau 1. Fréquence des symptômes associés aux infections à rotavirus** (données citées par Uhnoo *et al.*, 1986).

Symptômes	Fréquence en %
Diarrhée	98
Diarrhées > 10 fois par jours	28
Vomissement	87
Vomissements > 5 fois par jour	51
Fièvre	84
Douleur abdominale	18
Sang dans les selles	1

A travers le monde les rotavirus seraient responsables de 18 millions de cas de diarrhées sévères, entraînant la mort de 870 000 enfants par an (Institute of Medicine, 1986). Les décès observés sont en rapport avec l'importance de la déshydratation initiale, le retard à y porter remède et la malnutrition, ceci principalement dans les pays en voie de développement (Bern *et al.* 1992).

## II.2. Données épidémiologiques

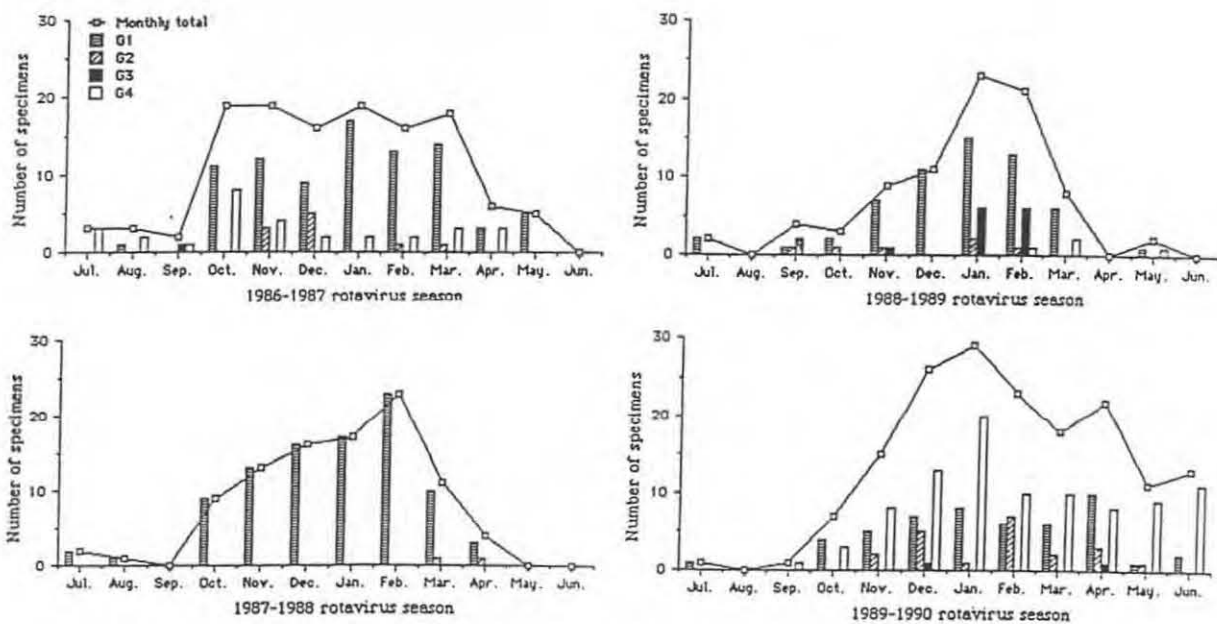
Plus de 90 % des enfants entre 0 et 3 ans acquièrent une immunité contre les rotavirus (Kapikian et Chanock, 1990). Les gastro-entérites à rotavirus sont principalement mises en évidence chez les enfants âgés de 6 mois à 2 ans. Lors des 6 premiers mois, les anticorps maternels protégeraient l'enfant, alors que les enfants plus âgés développeraient dans 88 % des cas une infection symptomatique (Kapikian et Chanock, 1990). Au delà de 3 ans, les cas d'infection symptomatique sont de moins en moins fréquents. En principe, l'immunité acquise dès le plus jeune âge réduit le risque de développer une nouvelle fois la maladie. Toutefois, des cas de réinfection chez l'enfant ont été décrits avec des souches de sérotypes différents mais aussi de même sérotype (Bern *et al.*, 1992 ; De Champs *et al.*, 1991).

De même, le maintien d'un fort taux d'anticorps tout au long de la vie suggère que des réinfestations se produisent régulièrement (Kapikian et Chanock, 1990). Seulement 45 % des adultes développeraient une infection symptomatique. De plus, celle-ci nécessiterait que rarement une hospitalisation (Christensen, 1989). Mais, les rotavirus peuvent provoquer des troubles plus importants chez des personnes âgées. Dans des services de gériatrie les épidémies entraînent parfois la mort de personnes aux défenses immunitaires affaiblies (Christensen, 1989). Des gastro-entérites symptomatiques ou sévères peuvent également survenir lorsque des individus sont atteints par une nouvelle souche contre laquelle ils ne possèdent pas ou peu d'anticorps protecteurs (Murphy, 1981 ; Ward *et al.*, 1986a). Ainsi en Chine, l'apparition d'une souche du groupe B a provoqué des diarrhées importantes chez des enfants mais aussi des adultes (Fang *et al.*, 1989).

Il existe une très grande diversité des souches impliquées dans les infections à rotavirus. Cette diversité était initialement étudiée en comparant les électrophérotypes des rotavirus présents dans les selles des malades (Estes *et al.*, 1984), mais de plus en plus, la recherche du type G ou P des isolats à remplacer cette méthode de caractérisation. Lors d'une recrudescence des gastro-entérites, plusieurs souches peuvent être ainsi identifiées (Estes *et al.*, 1984 ; Noel *et al.*, 1991 ; Tabassum *et al.*, 1994). Les souches impliquées sont différentes d'une région à l'autre (Noel *et al.*, 1991). De plus, elles évoluent constamment dans le temps (Estes *et al.*, 1984 ; Sreet *et al.*, 1982). Un suivi sur 6 années des infections apparues à Londres n'a pas



permis d'identifier une souche devenant endémique au sein de la population (Noel *et al.*, 1991). De même, lorsqu'une souche caractérisée par son électrophérotipe disparaît de la population, elle n'est plus jamais retrouvée (Noel *et al.*, 1991). Cette évolution génotypique peut être associée à la diversité des sérotypes régulièrement impliqués dans des gastro-entérites. Ainsi, à chaque électrophérotipe correspondrait un seul sérotype. En revanche plusieurs électrophérotypes peuvent être associés à un sérotype (Gouvea *et al.*, 1990b ; Tabassum *et al.*, 1993). La diversité des sérotypes est généralement moins importante. Les sérotypes G1 à G4 sont les plus fréquemment identifiés dans le monde entier (Bern *et al.*, 1992 ; Rasool *et al.*, 1993 ; Tabassum *et al.*, 1993). Des sérotypes peuvent devenir dominants, mais la dominance d'un sérotype varie dans l'espace (d'une région à une autre) mais aussi dans le temps (d'une année à une autre) (Gouvea *et al.*, 1990b ; Noel *et al.*, 1991 ; Zheng *et al.*, 1989) (Figure 3). Des infections mixtes impliquant deux sérotypes différents ont également été montrées (Masendycz *et al.* 1994 ; Tabassum *et al.* 1994).



**Figure 3. Distribution des sérotypes de rotavirus caractérisés à l'hôpital des enfants de Londres de 1986 à 1990 (d'après Noel *et al.*, 1991).**

La gravité de la maladie pourrait dépendre de la souche infectante. Une étude sur plusieurs milliers d'enfants infectés par des rotavirus au Bangladesh montre, après typage des différentes souches, que les sérotypes G2 et G3 étaient responsables de déshydratations plus importantes que d'autres (Bern *et al.*, 1992). Mais les complications les plus importantes étaient principalement dépendantes des soins prodigués aux enfants et d'une malnutrition parfois associée.

Les rotavirus sont présents dans le monde entier, par contre le caractère épidémique des gastro-entérites à rotavirus est étroitement lié aux conditions climatiques des régions étudiées. Dans les pays tempérés, les infections à rotavirus se développent principalement lors des mois les plus froids de novembre à avril (Ansari *et al.*, 1991 ; Cook *et al.*, 1990) (Figure 3). Pendant cette période, les infections à rotavirus sont responsables de plus de 50 % des hospitalisations d'enfants pour une gastro-entérite, alors qu'en juillet ou août ce taux tombe entre 0 et 5 % (Gouvea *et al.*, 1989b ; Kapikian et Chanock, 1990 ; Noel *et al.*, 1991). Dans les pays tropicaux la saisonnalité est moins marquée, les infections pouvant survenir à tout moment de l'année (Cook *et al.*, 1990). Dans les pays tempérés, l'absence de cas cliniques durant les mois d'été ne doit pas être associée à celle de virus dans la population. En effet, des rotavirus sont détectés dans les eaux usées tout au long de l'année (Hejkal *et al.*, 1984). La concentration virale est toutefois moins importante en période estivale par rapport aux mois d'hiver. Les infections à rotavirus seraient épidémiques dans les zones rurales alors qu'elles pourraient devenir endémiques dans des villes d'environ 5 000 personnes (Estes *et al.* 1984). La recrudescence des infections sur les mois d'hiver pourrait être liée à une sensibilité accrue des individus ou également à des conditions plus favorables de transmission des virus (Ansari *et al.* 1991).

### **II.3. Transmission des infections**

Le mode de transmission le plus important est la transmission oro-fécale (Ansari *et al.*, 1991 ; 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 (Fang *et al.*, 1989 ; Gaggero *et al.*, 1992). Cette transmission entre adulte et enfant n'a pas été clairement établie car le plus souvent les infections chez les adultes sont asymptomatiques. Toutefois, la séroconversion récente d'adultes ayant cotoyés des enfants malades étaye cette hypothèse (Kapikian et Chanock, 1990).

Une seconde voie de transmission par le tractus respiratoire est également envisagée. La présence de virus dans les voies aériennes a été montrée et des troubles respiratoires ont été associés aux infections à rotavirus (Christensen *et al.*, 1989). De plus les rotavirus sont stables sous la forme d'aérosol (Ansari *et al.*, 1991). L'épidémiologie des infections à rotavirus avec son pic saisonnier lors des mois frais et son expansion générale ferait également davantage penser aux maladies virales transmises par voie respiratoire (comme la rougeole) qu'à celles surtout transmises par voie fécale-orale (comme la poliomyélite) (Cook *et al.*, 1990).

Un certain nombre de travaux ont montré qu'il serait possible que les barrières de spécificité d'espèce initialement admises pour les rotavirus puissent être franchies. Ainsi, des homologues ont été recherchés entre une souche ayant infecté un enfant fréquemment au contact

de chats et des virus d'origine humaine ou animale (Nakagomi *et al.*, 1990). Les auteurs montrent, en utilisant l'hybridation, une étroite similitude entre le génome du virus de l'enfant et celui d'une souche d'origine féline. Cette ressemblance était bien plus importante que celle qui existait avec d'autres souches d'origine humaine. 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). L'origine des virus a été également étudiée par l'analyse du polymorphisme de restriction des séquences virales (Gouvea *et al.*, 1993 ; Vonsover *et al.*, 1993). Les rotavirus animaux seraient en général moins virulents chez l'homme, induisant une séroconversion mais pas ou peu de troubles gastriques (Kapikian et Chanock, 1990 ; Silberstein *et al.*, 1995). Ces propriétés ont suggéré que les virus animaux pouvaient être utilisés comme un moyen de vaccination (Kapikian et Chanock, 1990 ; Hoshino et Kapikian, 1994).

La dose minimale infectieuse par voie orale est très faible. Ward *et al.* (1986a) font adsorber à des volontaires (sujets dont l'acidité gastrique a été réduite avec 50 ml de bicarbonate de soude à 4 %) des quantités de virus humain variant de 0 à  $9 \cdot 10^4$  virus infectieux par dose (50 ml solution saline). Dans ces conditions, une particule virale, infectieuse en culture de cellule (correspondant à environ  $1,56 \cdot 10^4$  particules virales) est suffisante pour déclencher une multiplication virale *in vivo* et/ou une séroconversion. Ces résultats ont été confirmés par Graham *et al.* (1987) sur un modèle animal (porcelets). Toutefois, une quantité importante de rotavirus inactivés pourraient également provoquer des diarrhées par un mécanisme comparable à celui d'une toxine (Shaw *et al.*, 1995). En effet, de fortes concentrations de virus ( $3 \cdot 10^8$  particules par dose de 50  $\mu$ l), ayant perdu leur pouvoir infectieux en culture cellulaire par traitement au psoralène et aux UV, produisent des diarrhées chez de jeunes souris. Dans ce cas, les diarrhées seraient induites par l'attachement et/ou l'entrée des virus dans les cellules.

#### **II.4. Résistance aux traitements physico-chimiques**

Les rotavirus sont sensibles aux températures élevées. En 15 min à 56 °C, le pouvoir infectieux diminue de 99 % et l'inactivation est totale en 1 min à 80 °C (Meng *et al.*, 1987). Toutefois, le rotavirus SA11 présente une certaine thermo-stabilité en présence de 2 M de  $MgSO_4$ , mais pas avec d'autres sels comme le  $MgCl_2$ , le  $CaCl_2$  ou le  $NaCl$  (Estes *et al.*, 1979). La stabilité du virus augmente au fur et à mesure que la température d'incubation diminue (Meng *et al.*, 1987). A température ambiante ils peuvent persister plusieurs jours sur des surfaces poreuses ou non (Ansari *et al.*, 1991). Leur stabilité est alors comparable à celle du virus de l'hépatite A, et apparaît supérieure à celle des poliovirus ou des adénovirus (Abad *et al.*, 1994a).

Les rotavirus peuvent être conservés à -20 °C et leur pouvoir infectieux ne semble pas altéré par la congélation et la décongélation (Estes *et al.*, 1979 ; Meng *et al.*, 1987). Par ailleurs, les rotavirus sont résistants à la dessiccation, à la lyophilisation et aux ultra-sons, mais ils sont sensibles aux rayons ultra-violet (UV) (Estes *et al.*, 1979 ; Meng *et al.*, 1987 ; Smirnov *et al.*, 1991) Les UV seraient efficaces dans la désinfection virale de l'eau : une dose de 25 mW.s/cm<sup>2</sup> réduit de 99,9 % le titre infectieux d'une suspension de virus SA11 dans du tampon phosphate (Chang *et al.*, 1985). Cette dose est comparable à celle nécessaire pour inactiver poliovirus 1 dans les mêmes conditions (21 mW.s/cm<sup>2</sup>), mais elle est très supérieure à celle requise pour détruire des bactéries (5 à 15 mW.s/cm<sup>2</sup>). L'effet virucide dépend également de la charge en particule et matière organique de l'eau (Sobsey, 1989). La photo-inactivation a été également proposée pour la désinfection de l'eau. L'effet virucide de la lumière naturelle est accentué par la présence de bleu de méthylène ou de dioxyde de titane dans les eaux à traiter (Melnick, 1978 ; Watts *et al.*, 1995). La photo-inactivation en présence de dioxyde de titane (250 mg/l) est plus active sur le poliovirus 1 que sur les bactéries coliformes. Toutefois les temps nécessaires pour diminuer de 99 % le nombre de virus ou de bactéries sont longs (30 min pour les virus, 150 min pour les bactéries). Cette méthode, moins onéreuse que les précédents traitements cités, serait adaptée à l'épuration des eaux dans les pays en voie de développement qui ont un ensoleillement important et qui peuvent tolérer des temps d'épuration relativement longs (Watts *et al.*, 1995).

Les rotavirus perdent de façon importante leur pouvoir infectieux dans l'eau distillée. Comme cela a été précédemment décrit, l'absence de sels en particulier d'ions calcium déstabilise la couche externe de la capsid (Estes *et al.*, 1979). Le pouvoir infectieux est stabilisé par l'apport de 1,5 à 10 mM de CaCl<sub>2</sub> (Shirley *et al.*, 1981). Il n'est pas modifié à des pH variant de 11 à 3,5 (Estes *et al.*, 1979 ; Meng *et al.*, 1987). Par contre, les virus sont sensibles à pH supérieur ou égal à 11,5 et inférieur ou égal à 3. Cette propriété explique la nécessité de faire absorber au préalable du bicarbonate à des volontaires ou à des animaux, quand les virus sont administrés par voie orale notamment pour des études sur la dose minimale infectieuse (Graham *et al.*, 1987 ; Ward *et al.*, 1986a). Dans les conditions naturelles, le pH gastrique serait diminué par les aliments ingérés (Ward *et al.*, 1986a).

Tous les désinfectants ne sont pas efficaces sur les rotavirus (Pirtle *et al.*, 1991). Ils présentent une résistance à un grand nombre de procédés chimiques comme les traitements à l'éther ou au chloroforme, ce qui est expliqué par l'absence d'enveloppe autour de la particule mûre (Estes, 1990 ; Estes *et al.*, 1979 ; Meng *et al.*, 1987). En revanche, les rotavirus perdent leur pouvoir infectieux en présence de chélateurs d'ions calcium (Estes *et al.*, 1979). Ces virus sont efficacement inactivés en présence d'éthanol à 70 %, de phénol à 2 % et de formaldéhyde à 8 %. Ces composés peuvent être utilisés comme désinfectants de contact (Meng *et al.*, 1987).

Les traitements à base de chlore sont les plus fréquemment utilisés pour purifier les eaux. Le temps d'inactivation de 99 % des virus SA11 purifiés en présence de 0,5 mg/l de chlore est de 1,4 min à pH 10 contre moins de 0,25 min à pH 6. Inversement le dioxyde de chlore est plus efficace à pH basique qu'à pH acide, 0,5 mg/l de dioxyde de chlore inactive 99 % des virus en 0,56 min à pH 6 et en moins de 0,25 min à pH 10 (Berman et Hoff, 1984). Les monochloramines en revanche sont totalement inefficaces sur les rotavirus, le temps nécessaire pour obtenir le même effet se compte en heures avec des concentrations élevées de 10 mg/l (Berman et Hoff, 1984). Cependant, les virus entériques sont excrétés sous la forme de particules adsorbées à des membranes cellulaires ou agglomérées entre elles (Williams, 1985), autant de facteurs qui réduisent l'action du chlore (Hejkal *et al.*, 1979; Berman et Hoff, 1984). Dans les mêmes conditions que celles précédemment décrites, le temps de contact doit être de 2 à 7 fois plus long pour inactiver le virus SA11 associé à des débris cellulaires (Berman et Hoff, 1984). La sensibilité du virus SA11 au traitement chloré est comparable à celle du rotavirus humain Wa (Vaughn *et al.*, 1986). En revanche, les rotavirus apparaissent plus résistants à la désinfection que le poliovirus et leur stabilité serait comparable à celle du virus de l'hépatite A (Abad *et al.*, 1994b).

Ces données permettent d'expliquer l'inefficacité de la chloration sur les effluents de station d'épuration à des concentrations de chlore de 1 à 3 mg/l, car bien souvent les eaux épurées sont riches en matières organiques, les modifications des composés chlorés y sont importantes et les temps de contact trop brefs (Berman et Hoff, 1984 ; Sobsey 1989). De plus, lors des traitements des sous-produits peuvent se former. Ces sous-produits moins germicides sont en revanche toxiques pour la santé humaine, ou pour les organismes vivants aquatiques (Paillard et Sibony, 1986).

Des traitements moins toxiques pourraient se substituer à la désinfection des eaux par le chlore. L'ozone a une efficacité de désinfection supérieure à celle du chlore et il ne formerait pas de sous-produits toxiques (Vaughn *et al.*, 1987). Des études *in vitro* montrent une inactivation de 99,9 % des virus en 6 sec avec 0,25 mg/l. L'efficacité de désinfection serait supérieure sur les rotavirus humains (Wa) par rapport aux rotavirus animaux (SA11) (Vaughn *et al.*, 1987). Mais les traitements par ozone seraient également moins performants avec des effluents d'épuration riches en matières organiques (Sobsey, 1989). L'acide peracétique est également virucide, mais il serait plus actif sur les bactéries que sur les virus. A doses et temps de contact comparables (5,3 à 5,6 mg/l pendant 20 min, en eau de station), l'inactivation de poliovirus 2, pris comme modèle pour les virus entériques, est de 62 % avec l'acide peracétique contre 93 % d'hypochlorite de sodium (Morris, 1993).

### III. CONTAMINATION DU MILIEU HYDRIQUE PAR LES ROTAVIRUS

Les virus, excrétés dans les selles ou les urines, sont regroupés sous le nom de virus entériques. Ces virus infectent les cellules du tube digestif, mais ils peuvent également présenter un tropisme pour les cellules d'autres organes, ils provoquent parfois des troubles très variés. Plus de 140 types de virus entériques humains, susceptibles d'être rencontrés dans l'environnement, appartenant à plusieurs familles et genres sont répertoriés (Tableau 2). Les rotavirus font partie des virus les plus importants sur le plan épidémiologique, ceux-ci étant responsables d'hépatites ou de gastro-entérites (Gerba *et al.* 1985).

**Tableau 2. Virus pathogènes pour l'homme susceptibles d'être rencontrés dans le milieu hydrique (d'après Schwartzbrod 1991).**

Famille	Genre	Espèce	Maladie provoquée
<i>Picornaviridae</i>	Entérovirus	Virus Poliomyélique	Paralyse, méningite, fièvre, poliomyélite.
		Virus Coxsackie A	Méningite, infection respiratoire, herpangine, conjonctivite hémorragique.
		Virus Coxsackie B	Myocardite, éruption cutanée, fièvre, méningite, infection respiratoire, pleurodynie.
		Echovirus	Méningite, éruption cutanée, fièvre, infection respiratoire, diarrhée.
		Entérovirus 68 à 71	Méningite, encéphalite, atteinte des voies respiratoires, conjonctivite hémorragique.
<i>Reoviridae</i>	Hépatovirus	Virus de l'hépatite A	Hépatite infectieuse.
	Réovirus	Réovirus humains	Non établie.
	Rotavirus	Rotavirus humains	Gastro-entérite.
<i>Caliciviridae</i>	Calicivirus	Calicivirus humains	Gastro-entérite.
		Virus de Norwalk	Gastro-entérite.
		Small round virus	Gastro-entérite.
		Virus de l'hépatite E	Hépatite infectieuse.
Non précisée	Astrovirus	Astrovirus humains	Gastro-entérite.
Non précisée	Non précisée	Parvovirus-like virus	Gastro-entérite.
<i>Coronaviridae</i>	Coronavirus	Coronavirus humains	Entérocolite.
<i>Toroviridae</i>		Coronavirus-like	Gastro-entérite.
<i>Adenoviridae</i>	Mastadénovirus	Adénovirus humains	Infection respiratoire, conjonctivite et gastro-entérite.

### III.1. Cycle de contamination du milieu hydrique

Comme il a été précédemment présenté, la concentration virale dans les selles peut être très importante et les infections asymptomatiques également nombreuses lors d'épidémies. Ceci se traduit principalement par une libération massive de virus dans les eaux usées (Hejkal *et al.*, 1984 ; Mehnert et Stewien, 1993 ; Rao *et al.*, 1987). Des concentrations de  $1,4 \cdot 10^4$  rotavirus infectieux par litre ont été mesurées dans les eaux usées de la ville de Barcelone (Bosch *et al.*, 1988). Selon Hejkal (1984), chaque virus infectieux isolé à partir de selles correspondrait à  $3,8 \cdot 10^5$  particules virales. Par conséquent, le nombre de particules virales dans les eaux est en réalité beaucoup plus important et il a été estimé, par le même auteur, à  $10^7$  particules par litre. La charge virale dans les eaux usées d'origine domestique est fonction du contexte épidémiologique et sanitaire de la population (Melnik *et al.*, 1978). Pour les rotavirus, les variations de concentration correspondraient aux variations saisonnières de gastro-entérites (Mehnert et Stewien, 1993). La présence de rotavirus dans les eaux brutes a également été montrée pendant les mois d'été, hors des périodes de recrudescence des infections à rotavirus. Cependant, les concentrations en rotavirus sont de 10 à 100 fois moins importantes que celles mesurées en hiver et au printemps (Hejkal *et al.*, 1982 et 1984 ; Mehnert et Stewien, 1993 ; Rao *et al.*, 1987). Ces eaux usées constituent le premier maillon du cycle de contamination de l'eau (Figure 4).

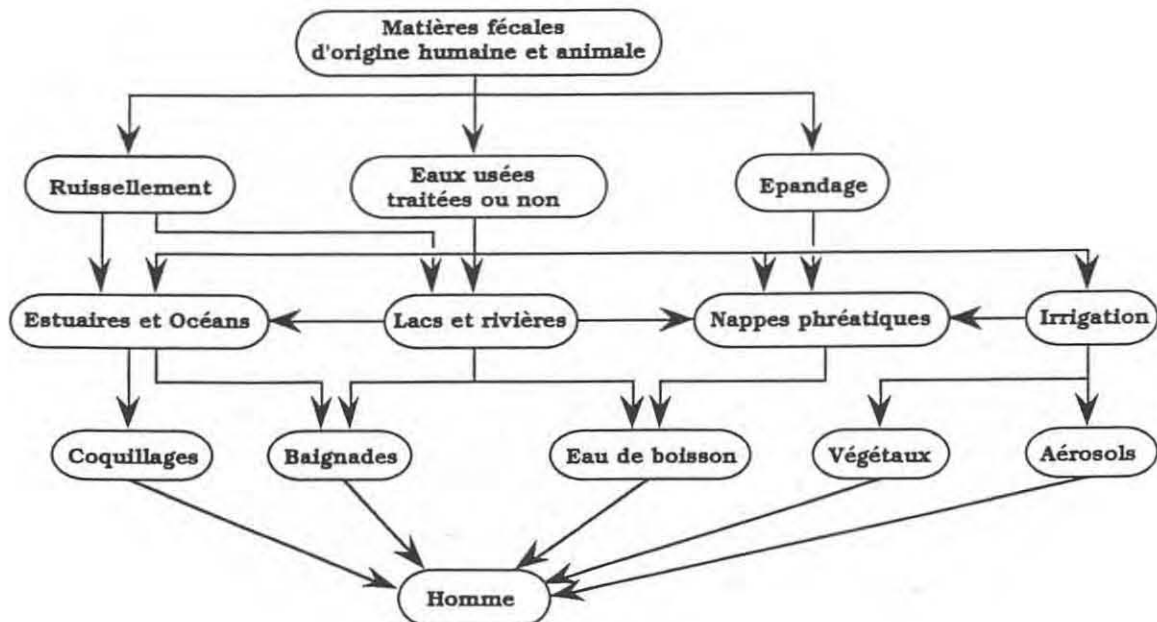
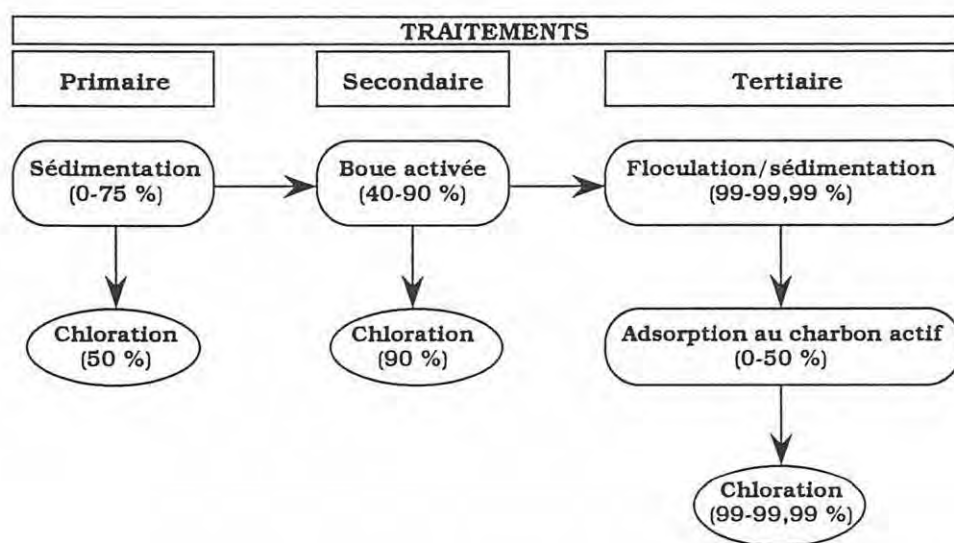


Figure 4. Modes de transmission possibles des virus entériques par l'eau (D'après Melnick *et al.*, 1978).

### III.2. Epuration des eaux usées

Le traitement des eaux usées, avant rejet en mer ou dans les rivières se généralise. Selon Lewis et Metcalf (1988b), dans des conditions idéales de fonctionnement, une station d'épuration pourrait diminuer de 8 unités logarithmiques la charge virale d'une eau brute (Figure 5). Le traitement primaire (dégrillage, dessablage, décantation) éliminerait 10 % des virus entériques. Un traitement secondaire par boues activées réduirait de plus de 95 % la charge virale. Cette diminution serait due pour moitié à l'adsorption des virus aux boues et à l'action d'origine microbienne inactivatrice. Les traitements tertiaires par coagulation, floculation, et sédimentation, élimineraient 99,99 % de virus, en éliminant les particules fines en suspension sur lesquelles sont adsorbés les virus. La désinfection finale (20 mg/l de chlore pendant 60 min) pourrait inactiver jusqu'à 99,99 % des virus restants (Lewis et Metcalf, 1988b). La chloration finale est d'autant plus efficace que l'épuration de l'eau est importante (Gerba *et al.*, 1975) (Figure 5). Mais comme cité précédemment, en pratique les concentrations de chlore et les temps de contacts sont moins importants.



**Figure 5. Rendements théoriques d'épuration virale et de désinfection lors du traitement d'eaux usées** (d'après Gerba *et al.* 1975).

Les procédés d'épuration en réalité ne sont pas aussi efficaces. Ils ne réduisent que partiellement les concentrations virales dans les eaux. Des études *in situ* sur l'élimination de rotavirus naturellement présents dans les eaux usées rapportent une réduction de la charge virale de 44 à 55 % par ces boues activées. Une épuration complète allant jusqu'à la désinfection finale (boues activées et chloration) permet d'éliminer 93 à 99 % des rotavirus (Rao *et al.*, 1988). Les rendements peuvent varier en fonction des saisons. Selon Keswick *et al.* (1984) en période de



sécheresse de 25 à 93 % des virus sont éliminés (station d'épuration de conception physico-chimique) alors qu'en période de pluies la charge virale est réduite de 0 à 43 %. De plus, lors de ces études la qualité chimique et bactériologique des effluents ne reflète pas la qualité virologique. L'absence d'une corrélation entre la contamination virale et bactérienne serait en partie due à la résistance généralement supérieure des virus par rapport aux bactéries vis-à-vis des traitements des eaux usées (Sobsey, 1989). De même les rendements d'épuration des virus entériques sont différents d'une espèce à l'autre (Sobsey, 1989). Les rotavirus seraient moins facilement éliminés que les entérovirus lors des traitements (Farrah *et al.*, 1978 ; Goyal *et al.*, 1979).

### III.3. Contamination du milieu hydrique

Malgré ces abattements, les eaux épurées contiennent des particules virales. La charge virale en moyenne serait de  $10^1$  à  $10^2$  virus entériques par litre (Schwartzbrod, 1992). La concentration en rotavirus peut atteindre  $10^3$  particules infectieuses par litre (Smith et Gerba, 1982). Des billions de litres d'eaux usées traitées ou non sont directement déversées par jour dans les rivières, les fleuves, les mers ou les océans du globe. Selon Schwartzbrod *et al.* (1979) une agglomération de 300 000 habitants traitant ses eaux usées déverserait plus de  $10^9$  virus entériques infectieux par 24 h. Des rotavirus infectieux ont été également détectés dans de l'eau de distribution, dans des eaux de rivières, dans les estuaires à des concentrations parfois voisines de  $10^2$  virus par litre (Deetz *et al.*, 1984 ; Genthe *et al.*, 1991 ; Rao *et al.*, 1986 ; Rose *et al.*, 1987).

Les virus entériques peuvent persister dans les eaux continentales ou marines, la salinité des eaux n'étant pas un facteur d'inactivation pour les rotavirus (Hurst et Gerba, 1980). La stabilité des virus dans le milieu hydrique dépend de nombreux facteurs, dont la prédation exercée par les microorganismes autochtones (Enriquez *et al.*, 1993 ; Girones *et al.*, 1989 ; Ward *et al.*, 1986b). Mais le principal facteur semble être la température (Girones *et al.*, 1989 ; Melnick et Gerba, 1980 ; Yates *et al.*, 1985). La stabilité du pouvoir infectieux est inversement proportionnelle à la température. Par contamination *in vitro* d'eau de mer naturelle avec le virus SA11, Chung et Sobsey (1993) décrivent des temps d'inactivation (diminution de 99,99 % du titre viral) de 22 jours à 25 °C contre 871 jours à 5 °C. Cette étude indique également, que le rotavirus est plus résistant que poliovirus 1 en eau de mer, mais plus sensible que le virus de

l'hépatite A. Cette différence dans la stabilité des virus confirme de précédentes observations (Girones *et al.*, 1989 ; Hurst et Gerba, 1980). Les coliphages F+ seraient également plus rapidement inactivés que les virus humains, alors que la stabilité du phage de *Bacteroides fragilis* serait comparable à celle des virus entériques (Chung et Sobsey, 1993). Ce phage pourrait être utilisé comme indicateur de contamination virale car il n'existe pas de relation entre la contamination en bactéries fécales d'une eau et sa teneur en virus (Goyal, 1983). 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 (Gerba *et al.*, 1979 ; LaBelle *et al.*, 1980).

Les virus dans le milieu hydrique sont adsorbés principalement aux particules sédimentaires fines (argile ou vase de taille inférieure ou égale à 0,3  $\mu\text{m}$ ) en suspension dans l'eau (Melnick et Gerba, 1980 ; Metcalf *et al.*, 1984 ; Rao *et al.*, 1986). Lors d'études *in vitro*, les rotavirus s'adsorbent spontanément aux sédiments plus facilement dans des conditions de faible salinité (Metcalf *et al.*, 1984). Par contre l'adsorption est durable et cet état est stable dans différentes conditions de salinité et de pH (LaBelle et Gerba, 1979). La stabilité des rotavirus dans l'eau de mer est généralement augmentée par l'apport de sédiments. Le rotavirus SA11 en eau de mer conserve son pouvoir infectieux pendant 9 jours. En revanche en présence de particules sédimentaires, il est infectieux pendant au moins 19 jours (Rao *et al.*, 1984 et 1986). Ces particules peuvent se déposer, la concentration virale est parfois plus importante dans les sédiments que dans l'eau sus-jacente (Metcalf *et al.*, 1984 ; LaBelle *et al.*, 1980 ; Rao *et al.*, 1986). Les sédiments agiraient en stabilisant la structure des capsides, notamment les particules seraient moins thermolabiles (Liew et Gerba, 1980). Les virus adsorbés aux sédiments pourraient également être protégés contre les actions microbiennes (LaBelle et Gerba, 1982). Inversement, le sédiment peut parfois être défavorable à la stabilité des rotavirus (Chung et Sobsey, 1993). L'inactivation virale ou la protection apportée par le sédiment pourrait dépendre de la nature minéralogique des sédiments et de la présence ou non de composés virucides associés aux particules sédimentaires (Melnick et Gerba, 1980).

Le plus souvent, l'adsorption des rotavirus aux sédiments fins en suspension dans l'eau leur permet d'être transportés sur de longues distances (Metcalf *et al.*, 1984 ; Rao *et al.*, 1984). Les virus adsorbés aux particules sédimentaires sont retenus plus facilement par des organismes filtreurs marins comme les coquillages (Landry *et al.*, 1983). Ces coquillages concentrent les virus dans leur tractus digestif (Romalde *et al.*, 1994). La concentration virale dans ces animaux peut-être alors supérieure à celle de l'eau (Gerba et Goyal, 1978 ; Goyal *et al.*, 1979). Boher (1991) a détecté jusqu'à  $10^3$  virus pour 100 g de chair d'huîtres. Ces coquillages contaminés peuvent être épurés des virus qu'ils contiennent. Dans des conditions expérimentales, Boher et

Schwartzbrod (1993) montrent que des coquillages faiblement contaminés (moins de 30 virus par gramme) peuvent être complètement épurés en 72 h. Si la concentration virale est plus importante l'épuration ne serait que partielle dans 23 % des cas. Pour ces coquillages encore contaminés, la diminution de la concentration virale est de 82 % à 99,7 %. La qualité de l'épuration dépend aussi du coquillage étudié (la vitesse de filtration est différente d'une espèce à l'autre), de la qualité de l'eau (salubrité de l'eau, salinité) et de sa température (les coquillages filtrent moins à basse température qu'à température plus élevée) (Gerba et Goyal, 1978). De façon générale, les coquillages s'épurent plus facilement des bactéries entériques que des virus et les bactéries ne représentent pas de bons indicateurs de la contamination virale (Gerba et Goyal, 1978 ; Gerba *et al.*, 1980). Les coquillages ne sont pas les seuls animaux aquatiques à contenir des virus entériques, les crabes peuvent également accumuler les virus principalement dans leurs tractus digestif et dans l'hémolymphe (Hejkal et Gerba, 1981 ; Seidel *et al.*, 1983).

#### **III.4. Transmission des rotavirus par le milieu hydrique**

Bon nombre d'épidémies de gastro-entérites ont été associées à l'eau de boisson contaminée par des germes entériques. Le virus de Norwalk ou les virus apparentés sont plus fréquemment impliqués (Gerba *et al.*, 1985 ; Hedberg et Osterholm, 1993 ; Hunter, 1994). Toutefois, les rotavirus ont été également associés à des épidémies d'origine hydrique (Ansari *et al.*, 1991 ; Gerba *et al.*, 1985). Peu d'études précisent le groupe auquel appartiennent les virus. Selon Kapikian et Chanock (1990), il serait peu probable que les rotavirus du groupe A soient responsables d'épidémies d'origine hydrique. La plus importante épidémie d'origine hydrique à rotavirus décrite à ce jour a eu lieu en Chine, avec plus d'un million de personnes contaminées (enfants et adultes) (Hung, 1988). Cette épidémie a débuté par la consommation d'eau contaminée, puis les infections se sont transmises d'individu à individu. Toutefois, le virus responsable de ces gastro-entérites était un rotavirus du groupe B. Seul, Cubitt (1991) cite une épidémie d'origine hydrique (1 750 cas) aux Etats Unis qui a été attribuée aux rotavirus du groupe A.

A notre connaissance aucune épidémie à rotavirus n'a été associée à la présence de rotavirus dans des coquillages. Les coquillages crus sont rarement consommés par les jeunes enfants et chez les adultes les infections sont le plus souvent asymptomatiques (Ansari *et al.*, 1991). L'absence de relations établies entre les infections et la contamination des coquillages serait également dûe aux difficultés à multiplier en culture cellulaire certaines souches sauvages (Richard, 1985).

## IV. METHODES DE RECHERCHE DES ROTAVIRUS DANS L'ENVIRONNEMENT

### IV.1. Détection par inoculation sur cultures cellulaires

La multiplication en culture cellulaire (lignée cellulaire MA104) des rotavirus est la principale méthode employée pour détecter la présence de contaminations dans les eaux usées, les eaux de surfaces, les sédiments et les coquillages. Cette méthode permet de quantifier les virus contenus dans une suspension virale soit par numération des plages de lyse ou par détection immunologique des foyers de multiplication virale, le plus fréquemment par immunofluorescence indirecte (Bryden *et al.*, 1977). Pour des échantillons extrêmement riches en particules virales, comme les eaux usées, les virus peuvent être détectés par inoculation des échantillons (préalablement détoxifiés par traitement au chloroforme et décontaminés par addition d'antibiotiques) sur les tapis cellulaires (Lucena *et al.*, 1991). Pour des prélèvements d'eaux moins riches, il est nécessaire de concentrer les virus. Les virus ont les propriétés d'un colloïde hydrophile à caractère amphotère dont la charge électrique varie en fonction du pH et de la force ionique du milieu environnant. La plupart des méthodes de concentration et d'extraction des virus mettent à profit ces propriétés.

Pour la concentration des virus contenus dans des eaux, généralement 3 étapes se succèdent : l'adsorption des virus à des filtres ou membranes, l'élution des virus retenus dans un volume réduit de tampon et la concentration secondaire des éluats. Smith et Gerba (1982) décrivent la concentration de rotavirus introduits dans 20 litres d'eau par différents procédés de filtration. Les virus SA11 en présence de chlorure d'aluminium et à pH de 3,5 s'adsorbent au filtre en fibre de verre, ou d'esters de cellulose. A pH neutre et sans sel, les virus sont retenus par des filtres électropositifs en cellulose. En fonction de la turbidité des eaux des filtres de différentes porosités peuvent être utilisés comme préfiltres pour réduire le colmatage (Lucena *et al.*, 1991). Cependant, la filtration des eaux usées est souvent difficile en raison du colmatage important des membranes. L'élution des virus adsorbés aux filtres et au préfiltre s'effectue généralement dans une solution de faible volume (de 50 à 150 ml) à pH voisin de 10 en tampon glycine ou en solution d'extrait de boeuf (Lucena *et al.*, 1991). Le pH alcalin produit l'inversion du potentiel de charge des particules virales et ainsi permet leur libération dans la phase liquide, les protéines favorisent la compétition virus-protéines pour les sites d'adsorption et les sels minéraux évitent l'inactivation des virus et favorisent la dispersion moléculaire.

L'efficacité de la concentration varie principalement en fonction de la nature de l'eau. Par filtration sur fibre de verre les rendements de concentration du virus SA11 sont de 80 % en eau distillée, 55 % en eau d'adduction, 48 % en eau épurée et 29 % en eau usée (Smith et Gerba, 1982). Bosh *et al.* (1988) trouvent des rendements de récupération comparables, par filtration

sur poudre de verre des eaux contenant des concentrations connues de virus. Dans l'eau distillée 54 % des virus sont récupérés, 46 % en eau d'adduction et dans l'eau usée seulement 5 % des virus sont récupérés. L'efficacité de rétention des virus sur les filtres est diminuée par la présence de matières organiques qui entre en compétition avec les virus pour les sites d'adsorption (Bosh *et al.*, 1988). L'efficacité de concentration des rotavirus par filtration sur fibre ou poudre de verre, mais aussi sur d'autres filtres nécessitant un abaissement du pH, est inférieur à celle des entérovirus (Lucena *et al.*, 1991 ; Smith et Gerba, 1982). Cette différence est expliquée par la sensibilité des rotavirus aux pH acides, comme cela a été précédemment montré. Pour cette raison les filtres électropositifs permettant de retenir les virus à des pH proches de la neutralité sont choisis préférentiellement pour la concentration des rotavirus (Dahling, *et al.*, 1989 ; Keswick *et al.*, 1984 ; Rose *et al.*, 1987). Après élution en tampon 3 % extrait de boeuf et 10 % de bouillon tryptone phosphate pH 10, la totalité des virus SA11 introduits dans l'échantillon (eau d'adduction) a été récupérée (Toranzos et Gerba, 1989).

D'autres méthodes de concentration peuvent être utilisées. Selon Bosh *et al.* (1988), la floculation des virus contenus dans les eaux usées grâce au sulfate d'ammonium permet de concentrer 67 % des virus SA11 sans étape de filtration. Ce rendement est comparable à ceux obtenus à partir d'eaux sans matière organique (70 à 73 %). Toutefois, cette méthode est plus adaptée à la concentration de petits volumes d'eau (environ 600 ml) alors que la filtration permet de concentrer les virus à partir de volumes beaucoup plus importants (de plusieurs centaines de litres).

L'analyse virologique des sédiments reprend généralement le même principe de concentration. Les particules sédimentaires en suspension dans l'eau sont retenues par des filtres, puis les virus adsorbés aux particules sont extraits dans 3 volumes de tampon glycine 0,05 M, 10 % de bouillon tryptone phosphate et à pH 9,5 (Metcalf *et al.*, 1984 ; Rao *et al.*, 1986).

Pour les coquillages, différentes méthodes ont été utilisées. Le plus fréquemment, les virus sont élués, de la chair dilacérée, en tampon glycine à un pH généralement compris entre 9 et 10 (Bénil et Schwartzbrod, 1989 ; Lewis et Metcalf, 1988a). L'éluat obtenu est fortement chargé en matière en suspension. La clarification est principalement obtenue soit par centrifugation ou floculation. La centrifugation est la méthode la plus rapide et la plus simple ; elle s'effectue à 10 000 g pendant 30 à 45 min à 4 °C (Boher et Schwartzbrod, 1993 ; Lewis et Metcalf, 1988a). Les méthodes par floculation visent non seulement à éliminer les matières en suspension, mais aussi à supprimer ou à réduire la toxicité des éluats de coquillages, sans entraîner la perte de virus. Deux techniques sont plus fréquemment utilisées : l'une utilise le Fréon et la seconde utilise un flocculant cationique. Le Fréon est utilisé comme solvant des lipides et agent de rupture des liaisons entre les virus et leur support. Le Fréon est mélangé au

liquide d'élution (1 à 3 volumes de Fréon), puis après centrifugation les débris forment un culot alors que les virus restent dans la phase aqueuse (Bemiss *et al.*, 1989). L'utilisation d'un polyélectrolyte cationique comme le Cat-Floc est le plus employé (Williams et Fout, 1992). La proportion de Cat-Floc dans l'éluat varie de 0,01 à 0,5 %. Après homogénéisation le floc est éliminé par centrifugation, les virus restent dans le surnageant.

Après filtration et élution des eaux, ou élution à partir des sédiments et des coquillages, les éluats sont une fois de plus concentrés par différentes méthodes. Rao *et al.* (1986) concentrent les éluats de sédiments par une nouvelle adsorption des virus à l'oxyde de fer magnétique à pH 3,5, suivi d'une élution des virus en tampon glycine 0,5 M, 2 % caséine à pH 8,5. Les rendements de récupération par cette méthode varient de 50 à 61 %. Toranzos et Gerba (1989) ont comparé divers méthodes de concentration des rotavirus. La floculation inorganique, qui nécessite un pH acide, permet de récupérer dans le meilleur des cas 15 % des virus (souche SA11) contenus dans un éluat (de filtres électropositifs). La floculation inorganique au chlorure d'aluminium est plus performante avec 40 % de récupération. A la différence des résultats obtenus par Bosh *et al.* (1988) précédemment cités, Toranzos et Gerba (1989) indiquent que les rotavirus ne sont pas efficacement récupérés par floculation inorganique au sulfate d'ammonium (13 % des virus récupérés). Ces variations pourraient être dues à la différence en composition et en teneur en matière organique entre les échantillons traités dans ces deux études. Car les rendements peuvent varier en fonction de la qualité des extraits de boeuf utilisés (comme apport de matière organique) (Toranzos et Gerba, 1989). En revanche l'hydroextraction à l'aide du polyéthylèneglycol (PEG) est la méthode de concentration la plus performante avec un rendement maximum de 59 %.

Le PEG agit probablement en piégeant l'eau autour des virus provoquant ainsi leur précipitation. Il est mélangé à la suspension virale (pH 7,5) et homogénéisé pendant au moins 2 h à 4 °C. Le précipité formé est récupéré par centrifugation et resuspendu dans du tampon phosphate pH 7,5 (Boher et Schwartzbrod, 1993 ; Lewis et Metcalf, 1988a). Lewis et Metcalf (1988a) généralisent l'emploi de l'hydroextraction à la concentration secondaire des virus. Pour les eaux, les éluats sont précipités avec 8 % de PEG 6 000. De 77 % (souche Wa) à 87 % (souche SA11) des rotavirus sont ainsi récupérés. Avec les éluats clarifiés (par centrifugation) de coquillages la même concentration de PEG permet de récupérer 40 % (Wa) à 97 % (SA11) des virus. Pour les éluats obtenus à partir de sédiments, la concentration en PEG doit être élevée à 15 %. Dans ces conditions, 78 % des virus (Wa) sont récupérés. Lors de ces études le rendement de purification de la souche Wa est inférieur à celui de la souche SA11. De même, le rendement de concentration de poliovirus à partir des coquillages est légèrement plus important que ceux des rotavirus.

La multiplication des virus en culture cellulaire nécessite parfois de détoxifier les concentrats. Béril *et al.*, (1991) filtrent sur colonne de gel Séfadex LH20 des concentrats de coquillages à pH 9, les substances cytotoxiques sont retenus par le gel, le filtrat contenant les virus est neutralisé. L'extraction au chloroforme permet également de réduire la toxicité et de décontaminer les échantillons en détruisant les bactéries et les champignons (Beril et Schwartzbrod, 1989). Cette extraction ne peut être employée que sur les virus dépourvus de lipides. La contamination bactérienne et fongique des échantillons à inoculer est également éliminée par addition d'antibiotiques.

#### **IV.2. Détection par les techniques de biologie moléculaire**

Les techniques de biologie moléculaire ajoutent à leur spécificité et sensibilité, la rapidité de mise en oeuvre par rapport à la culture cellulaire. De plus elles permettent de détecter des virus qui sont difficiles ou même impossibles à multiplier en culture cellulaire. La première méthode utilisée pour détecter la présence de génomes viraux dans les prélèvements de l'environnement a été l'hybridation moléculaire. De Leon et Gerba (1991) ont utilisé une sonde ADNc correspondant au segment 4 du rotavirus humain (souche Wa), pour caractériser la présence de rotavirus dans des eaux usées, des eaux de surface et dans l'eau d'adduction. Zhou *et al.* (1991) utilisent une sonde différente, produite à partir du gène 3 et gène 6 du virus SA11 pour rechercher et détecter la présence de rotavirus dans des coquillages. Les virus sont concentrés à partir des échantillons, comme pour la multiplication en culture cellulaire, soit par filtration soit par élution et hydroextraction. Les ARN viraux sont ensuite libérés par digestion enzymatique avec la protéinase K puis extraits au phénol-chloroforme. Les acides nucléiques sont enfin purifiés par précipitation au CTAB (Zhou *et al.*, 1991) ou par filtration sur Séphadex G200 (De Leon et Gerba, 1991). Ces purifications augmentent la sensibilité de détection des séquences virales (séquences dénaturées et adsorbées sur des membranes) par les sondes en réduisant les signaux non spécifiques. La sensibilité de détection est de  $10^4$  virus SA11 infectieux dans 20 g de chair de coquillages (Zhou *et al.*, 1991).

L'usage des techniques d'amplification enzymatique en chaîne (PCR) se développe de plus en plus, pour rechercher les principaux virus entériques humains dans des extraits d'acides nucléiques obtenus à partir de prélèvements de l'environnement. Le virus de l'hépatite A, le virus de Norwalk, les entérovirus, et l'adénovirus ont été recherchés par cette méthode dans l'eau et les coquillages (Atmar *et al.*, 1993 et 1995 ; Deng *et al.*, 1994 ; Divizia *et al.*, 1993 ; Jaykus *et al.*, 1993 ; Kopecka *et al.*, 1993 ; Lees *et al.*, 1994 ; Le Guyader *et al.*, 1995a ; Puig *et al.*, 1994 ; Schwab *et al.*, 1993). Le principal avantage de cette méthode est sa sensibilité, de 1 000 à 10 000 fois supérieure à celle de l'hybridation moléculaire (Alvarez *et al.*, 1993 ;

Kopecka *et al.*, 1993). Cependant, les principaux inconvénients de la PCR sont de ne détecter que des contaminations virales sans préciser si les virus sont infectieux et de ne donner que des résultats qualitatifs et non quantitatifs (Alvarez *et al.*, 1993). De récents travaux montrent que l'ARN non encapsidé de poliovirus est plus rapidement dégradé en eau de mer que le génome encapsidé. Les auteurs concluent à la présence dans l'environnement principalement de particules virales et non d'ARN nu (en revanche le pouvoir infectieux des particules reste inconnu) (Tsai *et al.*, 1995). De plus, Atmar *et al.* (1995) ont montré que l'emploi d'un contrôle interne d'amplification permet de quantifier les particules virales détectées dans des coquillages, en comparant les rendements d'amplification du contrôle interne et de la séquence virale.

Cette technique est également sensible aux inhibiteurs de réaction enzymatique contenus dans les prélèvements de l'environnement. La nature de ces inhibiteurs est certainement très variée. Le glycogène des coquillages ou l'acide humique dans les sédiments font partie de ces inhibiteurs (Atmar *et al.*, 1993 ; Jaykus *et al.*, 1993 ; Tsai et Olson, 1992). Les inhibiteurs peuvent être co-purifiés avec les virus lors de phase de concentration des prélèvements et il est parfois préférable d'analyser les prélèvements bruts à la place des concentrats (Kopecka *et al.*, 1993). Les principaux efforts méthodologiques se portent sur la recherche d'amorces spécifiques des virus recherchés, ainsi que pour les échantillons contenant peu de virus, sur le développement de procédés d'extraction ayant des rendements importants tout en réduisant la co-purification d'inhibiteurs.

Comme pour l'analyse par hybridation moléculaire des prélèvements de l'environnement, les méthodes de concentration sont inspirées de celles utilisées pour la détection des virus par multiplication en culture cellulaire. En revanche, l'extraction des ARN s'effectue de différentes façons selon les auteurs. Atmar *et al.* (1993) réalisent une digestion avec la protéinase K, puis une extraction au phénol-chloroforme et une précipitation éthanolique, les acides nucléiques sont ensuite purifiés au CTAB. Les colonnes de Séphadex (G-200) peuvent également être utilisées pour éliminer les inhibiteurs des extraits (Tsai et Olson, 1992). La seconde méthode d'extraction la plus couramment utilisée est celle initialement décrite par Chomczynski et Sacchi (1987). Les acides nucléiques sont extraits au thiocyanate de guanidium qui sont précipités en présence d'éthanol ou purifiés par adsorption sur des particules de silice (Lee *et al.*, 1994 ; Puig *et al.*, 1994). Selon Gajardo *et al.* (1995), cette dernière méthode suivie par une purification est la plus performante pour l'analyse des eaux usées. La présence dans les extraits d'inhibiteurs peut être mise en évidence en introduisant de l'ARN viral dans les extraits négatifs par PCR et en les analysant de nouveau (Le Guyader *et al.*, 1994b), ou directement lors de la réaction d'amplification en utilisant un contrôle interne d'amplification, qui est amplifié en l'absence d'inhibiteur (Cone *et al.*, 1992 ; Atmar *et al.*, 1995).



Peu de travaux ont décrit l'utilisation de la RT-PCR pour détecter la présence de rotavirus dans l'environnement. Les premières applications de cette technique sont décrites dans le domaine médical afin de réaliser le suivi épidémiologique. Différentes approches ont été développées, elles diffèrent principalement par la séquence des amorces utilisées pour mettre en évidence les rotavirus et caractériser le sérotype 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 (Dessen *et al.*, 1990). La comparaison de ces séquences permet de définir des régions conservées à l'intérieur d'un groupe ou d'un sérotype et de synthétiser les amorces correspondantes.

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.*, 1990a ; 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 elles sont également conservées au sein du groupe A de rotavirus (Gentsch *et al.*, 1992).

Les gènes ou portions de gènes amplifiés servent au typage des souches grâce à la présence de régions hypervariables dont certaines sont impliquées dans l'antigénicité des protéines. Pour préciser le type des particules virales, Gouvea *et al.* (1990a) 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 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). Cette méthode permet de classer des souches sans sérotype identifiable par réaction immunologique et elle est de plus en plus utilisée pour réaliser des études épidémiologiques (Gouvea *et al.*, 1990a ; Gentsch *et al.*, 1992).

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 correspond au gène de la protéine VP6. 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). Mais ce gène présente moins d'intérêt pour des études épidémiologiques, car il semble relativement conservé d'une souche à une autre, ce qui se traduit par une faible diversité antigénique des protéines VP6 (Mattion *et al.*, 1994).

Le développement des connaissances sur les rotavirus n'appartenant pas au groupe A a permis de mettre au point la technique d'amplification de séquences génomiques des 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 en évidence différentes souches du groupe B et d'établir des diagnostics (Eiden *et al.*, 1991). Toutefois, les souches humaines analysées sont reconnues spécifiquement par des amorces déduites de la séquence 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 probablement 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. En revanche le gène 8 peut être également utilisé pour permettre la recherche de souches animales et humaines, grâce à des amorces choisies dans une région conservée à l'intérieur du groupe B (Gouvea *et al.*, 1991). Les difficultés rencontrées pour trouver des séquences conservées sont certainement liées à l'importance de l'hétérogénéité génétique des souches du groupe B (Petric *et al.*, 1991). Pour la recherche des virus du groupe C, l'amplification enzymatique de séquences a été réalisée grâce à la sélection d'amorces spécifiques de la séquence du gène 6 de virus du groupe C (Gouvea *et al.*, 1991).

La sensibilité de cette technique de détection des rotavirus est très importante, elle permet d'identifier selon les protocoles choisis par les auteurs, de 10 à 4 000 virus présents dans le mélange réactionnel (Eiden *et al.*, 1991 ; Gentsch *et al.*, 1992 ; Gouvea *et al.*, 1990 et 1991 ; Wilde *et al.*, 1990 ; Xu *et al.*, 1990). 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). Lors de ces études sur des prélèvements cliniques, les inhibiteurs ont été éliminés en purifiant les acides nucléiques sur poudre de verre (Gentsch *et al.*, 1992 ; Xu *et al.*, 1990) ou en purifiant les ARNdb par adsorption sur cellulose ou hydroxyapatite (Eiden *et al.*, 1991 ; Gouvea *et al.*, 1990 et 1991 ; Wilde *et al.*, 1990). Les conditions d'extraction peuvent améliorer le rendement. La rétrotranscription est une étape limitante non absolument résolue. En particulier, cette étape pourrait conduire à une diminution de la sensibilité d'un facteur dix (Xu *et al.*, 1990). Toutefois comme pour les méthodes de détection d'autres virus entériques, la technique d'amplification des rotavirus est 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 viral (Eiden *et al.*, 1992 ; Gentsch *et al.*, 1992 ; Xu *et al.*, 1990).

L'amplification génique trouve des applications, dans la synthèse de sondes (Flores *et al.*, 1990 ; Larralde *et al.*, 1992 ; Parwani *et al.*, 1992 et 1993 ; Rosen *et al.*, 1992), dans le clonage et le séquençage de gènes (Ballard *et al.*, 1992 ; Petric *et al.*, 1991 ; Tosser *et al.*, 1992), ou encore dans l'expression de gènes (Eiden *et al.*, 1992).

Tsai *et al.* (1994) sont les premiers à utiliser la RT-PCR pour rechercher des rotavirus dans des prélèvements d'eaux. L'amorce End9 décrite par Gouvea *et al.* (1990a) est employée en combinaison avec une nouvelle amorce et les produits d'amplification sont hybridés avec une amorce interne. Bien que cette technique ait une sensibilité de détection estimée à 3 virus infectieux dans 2  $\mu$ l de concentrat, elle n'a pas permis aux auteurs de mettre en évidence la présence de rotavirus dans des prélèvements d'eau de mer concentrés par filtration. Plus récemment, Gajardo *et al.* (1995) réussissent à détecter et à typer les rotavirus présents dans des eaux usées par RT-PCR selon le principe décrit par Gouvea *et al.* (1990a) pour l'analyse d'eaux usées. Différentes méthodes d'extraction des ARN viraux ont été également évaluées. Selon ces auteurs, la plus appropriée est la lyophilisation de 1 ml d'échantillon brut, remis en suspension dans de l'eau, suivie comme nous l'avons indiqué, d'une extraction de la suspension au thiocyanate de guanidium et purification des ARN sur des particules de silice. Cette extraction permet de détecter en RT-PCR  $2 \cdot 10^4$  virus infectieux par ml et 20 virus/ml en seminested PCR. Compte tenu de sa sensibilité et de la rapidité des analyses, la RT-PCR est l'outil de choix pour la recherche de virus dans l'environnement.

## **MATERIELS ET METHODES**

## **I. VIRUS ET MULTIPLICATION VIRALE**

### **I.1. Souche virale**

Les mises au point méthodologiques et les études *in vitro* sont réalisées avec la souche de rotavirus simien SA11 (ATCC VR 899). Cette souche nous a été fournie par le Professeur L. Schwartzbrod (faculté de pharmacie de Nancy).

### **I.2. Réplication virale sur cultures cellulaires**

La lignée cellulaire MA104 constituée à partir de cellules de rein embryonnaire de singe (African green monkey) est utilisée pour la réplication de la souche SA11. Cette lignée cellulaire nous a été donnée par le Docteur J. Cohen (INRA de Jouy-en-Josas).

#### **I.2.1. Entretien de la lignée cellulaire**

Les cellules sont cultivées à 37 °C en atmosphère humide enrichie en CO<sub>2</sub> (5 %), dans des flacons de 150 cm<sup>2</sup> (Greiner) contenant 50 ml de milieu de croissance constitué à partir du milieu minimum d'Eagle (MEM) avec sels de Earle (Gibco) complété par 10 % (v/v) de sérum de veau foetal (SVF) (Laboratoire J. Bio), 0,03 % (p/v) de glutamine (Seromed), 0,075 % (p/v) de bicarbonate de soude, 160 U/ml de pénicilline (Specia/Rhône-Poulenc) et 0,008 % (p/v) de gentamycine (Unicet) (densité cellulaireensemencée égale à 1,5 10<sup>5</sup> cellules/ml). Les cellules forment un tapis continu en 1 semaine.

Des sous-cultures sont effectuées par dissociation du tapis cellulaire en présence de trypsine. Le milieu de croissance est éliminé du flacon puis 6 ml de trypsine (2 ml trypsine à 2,5 % [Flow] dans 100 ml d'EDTA 1/5000 [Sigma]) sont additionnés. Après quelques minutes à 37°C, l'action de la trypsine est stoppée en ajoutant 2 ml de MEM + 10 % SVF. Les cellules sont centrifugées (5 min à 900 g), puis le culot est remis en suspension avec 3 ml de MEM + 10 % SVF. Trois nouveaux flacons de 150 cm<sup>2</sup> sontensemencés avec 1 ml de suspension (2 10<sup>5</sup> cellules) puis complétés de 50 ml de milieu de croissance et incubés à 37 °C dans les conditions précédemment décrites.

### I.2.2. Conservation de la lignée cellulaire

La lignée cellulaire est conservée par congélation. Les cellules sont mises en suspension dans du MEM contenant 20 % de SVF et 10 % de diméthylsulfoxyde (DMSO) à une concentration cellulaire de  $2 \cdot 10^6$  cellules/ml. Cette suspension est ensuite répartie dans des cryotubes (2 ml/tubes) et congelée à  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  (congélation lente). La décongélation des cellules avant remise en culture doit être rapide. Le cryotube est placé dans un bain-marie à  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  et utilisé pour ensemercer un flacon de  $75\text{ cm}^2$  contenant 20 ml de milieu de croissance. Le milieu est renouvelé après 24 heures d'incubation à  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , pour éliminer les cellules mortes non adhérentes.

### I.2.3. Préparation d'une suspension virale

Le stock de rotavirus SA-11 est préparé par inoculation sur une culture de cellules MA 104 en flacon de  $150\text{ cm}^2$ .

Lorsque le tapis cellulaire est continu, il est rincé avec du MEM sans SVF. Le virus est inoculé sur le tapis cellulaire (5 ml d'une suspension virale titrant environ  $10^5$  particules infectieuses/ml), puis mis à incuber à  $37^{\circ}\text{C}$  pendant 1 h 30 min. Après adsorption du virus, 80 à 100 ml de milieu de survie (même composition que le milieu de croissance mais sans SVF) contenant  $0,5\text{ }\mu\text{g/ml}$  de trypsine (fraction IX, Sigma) sont ajoutés. La trypsine favorise dans ce cas l'internalisation du virus dans la cellule.

Après 48 h à 72 h, un effet cytopathique (ECP) apparaît, caractérisé par un arrondissement des cellules et un détachement du support. Lorsqu'il est total, la culture est congelée à  $-75\text{ }^{\circ}\text{C}$  puis décongelée 3 fois de façon à faire éclater les cellules et permettre la libération des particules virales intracellulaires. La suspension est vigoureusement mélangée à un volume de fréon (Sigma) puis centrifugée à  $3\ 000\text{ g}$  pendant 10 min pour isoler les virions des débris cellulaires. La phase aqueuse contenant les virus est collectée et conservée à  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### I.2.4. Concentration des particules virales complètes

Les particules double capsid du virus SA11 sont concentrées par ultracentrifugation différentielle d'une suspension virale obtenue en culture cellulaire. Les particules double capsid possèdent un coefficient de sédimentation supérieur à celui des particules incomplètes (Tableau 3).

**Tableau 3. Centrifugation différentielle des particules de rotavirus.**

Particule	Coefficient de sédimentation en Sweiberg (S) <sup>a</sup>	Temps de centrifugation <sup>b</sup>
Core viral	280 S	33 min
simple capsid	380-400 S	24,6 à 23,4min
double capsid	520-530 S	18 à 17,6 min

<sup>a</sup> D'après Estes 1990.

<sup>b</sup> Temps nécessaire pour que toutes les particules forment un culot à 40 000 tours par minute avec un rotor TLA-100.4 (Bekman) dans des tubes de 5,1 ml ( $k$  à 40 000 tours par min = 156); le temps exprimé en minute est estimé à partir de l'équation  $t_{max} = k/S \times 60$  (Fritsch, 1975).

Trois tubes de 5,1 ml de suspension virale sont ultracentrifugés pendant 20 min à 86 900 g (40 000 tours par min) et à 4 °C. Les surnageants sont éliminés et les culots sont conservés dans la glace.

## II. QUANTIFICATION DES VIRUS SUR CULTURES CELLULAIRES

La numération des particules virales infectieuses dans les échantillons est réalisée par inoculation sur cultures cellulaires développées en plaques de microtitration (96 puits). La multiplication virale est détectée soit par immunofluorescence indirecte, soit par l'observation de l'apparition d'un ECP.

### II.1. Cultures cellulaires en microplaques de titration

Le tapis cellulaire continu d'un flacon de 150 cm<sup>2</sup> est dissocié dans les conditions précédemment décrites. Le culot de cellules isolées obtenu après centrifugation est remis en suspension dans 3 ml de MEM+ 10 % de SFV. Pour 1 ml de cette suspension est ajouté 24 ml de milieu de croissance. Le mélange est utilisé pour ensemercer une plaque de microtitration, à raison de 250 µl/puits (1,5 10<sup>5</sup> cellules/ml). Après 3 jours d'incubation à 37 °C, les tapis cellulaires sont rincés 2 fois avec 250 µl/puits de MEM sans SVF. Les plaques sont ensuite incubées 2 h à 37 °C avec le même volume de MEM sans SVF, pour éliminer les traces de sérum inhibitrices de l'adsorption virale.

## **II.2. Inoculation sur cultures cellulaires**

Les échantillons sont dilués en progression logarithmique dans du milieu MEM de survie (sans sérum) additionné d'un antifongique (fongizone [Squibb], 2  $\mu\text{g/ml}$ ). Chaque dilution est inoculée en 4 répliquats à raison de 200  $\mu\text{l}$  par puits. Des puits témoins ne sont pas inoculés, mais recouverts de milieu utilisé pour les dilutions. Après inoculation les plaques sont incubées 48 h (pour quantification par immunofluorescence) ou au moins 72 h (pour quantification par détermination de la dose infectante 50 % [DI50]) à 37 °C avant l'observation de la multiplication virale.

## **II.3. Titrage du pouvoir infectieux par immunorévélation**

La révélation de la multiplication virale ainsi que la détermination du titre viral par immunofluorescence indirecte est effectuée selon le protocole décrit par Schwartzbrod (1991).

Après incubation pendant 48 h, les tapis cellulaires sont fixés par addition d'un mélange d'acétone (2 volumes) et d'éthanol (8 volumes), puis séchés à l'air. Les cellules sont réhydratées puis incubées avec 50  $\mu\text{l}$  de sérum de lapin anti rotavirus dilué au 1/2000 pendant 1 h à 37 °C (le sérum nous a été fournis par le Docteur J. Cohen). Après trois lavages, 50  $\mu\text{l}$  de sérum de chèvre couplé à l'isothiocyanate de fluorescéine (Sigma) dilué au 1/400 sont ajoutés et laissés en contact pendant 1 h à 37 °C à l'abri de la lumière. Les cupules sont rincées trois fois et séchées avant l'observation au microscope à fluorescence (longueur d'onde d'excitation 450 à 490 nm). La quantification est réalisée par comptage des foyers de fluorescence (ff) (émission d'une fluorescence de 520 nm). Le titre est exprimé en rapportant le nombre de foyers observés par rapport au volume et à la dilution inoculée (ff/ml).

## **II.4. Détermination de la dose infectante 50 %.**

Le calcul de la DI50 est effectuée selon la méthode de Kärber (cité dans Huraux *et al.*, 1985) dont la formule est la suivante :



$$\text{Log (DI50)} = 1 + d (S - 0,5)$$

avec pour paramètres : l = logarithme décimal de la première dilution (concentration la plus forte en virus),  
d = logarithme décimal du facteur de dilution,  
S = somme des pourcentages des cupules de cellules infectées à chaque dilution,  
0,5 = facteur constant à retrancher.

Le résultat est exprimé en DI50/ml en rapportant la valeur par rapport au volume de l'inoculum.

### III. LES EAUX DE MER

#### III.1. Eaux naturelles

L'eau de mer naturelle est prélevée en bidon plastique (récipients à usage unique) de 5 litres et transportée jusqu'au laboratoire où elle est conservée à 4 °C. Les mesures de salinité, de pH, de turbidité et la concentration en coliformes fécaux et totaux ont été effectuées par différents laboratoires IFREMER. Après analyses, l'eau est directement utilisée pour les études *in vitro*.

Deux eaux de mer de différentes origines ont été utilisées :

- de l'eau de mer prélevée dans la baie d'Argenton (Finistère) le 31 janvier 1994. La qualité chimique et microbiologique a été analysée par le Laboratoire de microbiologie (Centre IFREMER de Brest). Les caractéristiques de cette eau sont une salinité de 34 ‰, une turbidité de 3,5 NTU, un pH = 8,2, une flore bactérienne hétérotrophe de  $2,8 \cdot 10^4$  CFU/ml (numération sur gélose Trypticase Soja [AES], incubation à 20 °C pendant 4 jours) et une flore fécale (coliformes fécaux) inférieure à 1 CFU/100 ml (numération par filtration de 100 ml d'eau sur filtre GA 0,22 µm [Millipore] et dépôt du filtre sur gélose Mac Conkey [Difco] incubé à 44,5 °C pendant 24 h).

- de l'eau de mer prélevée à Port Navalo (Morbihan) le 14 juin 1993. La qualité chimique et microbiologique a été analysée par le Laboratoire IFREMER de Nantes. Les caractéristiques de cette eau sont une salinité de 36 ‰, une turbidité de 1,7 NTU, un pH = 8,1,

un nombre de coliformes totaux égal à 8 CFU/100 ml (numération par la méthode du nombre le plus probable [NPP] sur bouillon lactosé bilié au vert brillant [Difco] incubé à 37 °C pendant 48 h [Hervé, 1993]) et un nombre d'*Escherichia coli*. inférieur à 8 CFU/100 ml (méthode du NPP sur bouillon lactosé bilié au vert brillant [Difco] et sur eau peptonée exempte d'indol [Difco] incubés à 44 °C pendant 24 h [Hervé, 1993]).

### **III.2. Eau de mer artificielle**

L'eau de mer artificielle de salinité 35 ‰ et de pH = 8,2 est constituée par dissolution de 43 g de sel Instant Océan dans 1 litre d'eau distillée. La salinité est ajustée au réfractomètre. La solution est filtrée sur 0,22 µm, puis stérilisée en flacon de verre (1 litre) par autoclavage 20 min à 120 °C. Le flacon est conservé à 4 °C.

### **III.3. Contamination artificielle des eaux de mer.**

#### **III.3.1. Contamination par le virus SA11.**

Le virus SA11 multiplié en culture cellulaire puis purifié par ultracentrifugation différentielle est utilisé pour contaminer de l'eau de mer artificielle et de l'eau de mer d'Argenton (Figure 6). Les virus purifiés à partir de 15 ml d'une solution stock contenant 8 10<sup>6</sup> DI50/ml sont remis en suspension dans 2 litres d'eau de mer artificielle. L'eau de mer naturelle est contaminée de la même façon. Les eaux sont ensuite réparties dans des fioles coniques de verre contenant chacune 1 litre. Les fioles sont bouchées avec du coton cardé puis enveloppées dans du papier d'aluminium. Les eaux sont incubées sans agitation à 20 °C +/- 1 °C (étuve réfrigérée) et à 6 °C +/- 2 °C (chambre froide).

Ainsi, quatre conditions d'incubation sont suivies sur 100 jours :

- SA11 en eau de mer artificielle à 6 °C,
- SA11 en eau de mer artificielle à 20 °C,
- SA11 en eau de mer naturelle à 6 °C,
- SA11 en eau de mer naturelle à 20 °C.

Des prélèvements de 40 ml d'eau (en tube de polypropylène) sont effectués entre le temps initial et après 100 jours d'incubation, à partir de chacune des fioles vigoureusement agitées. Tous les échantillons correspondant aux 4 conditions d'incubation sont conservés à -20 °C avant d'être analysés simultanément.

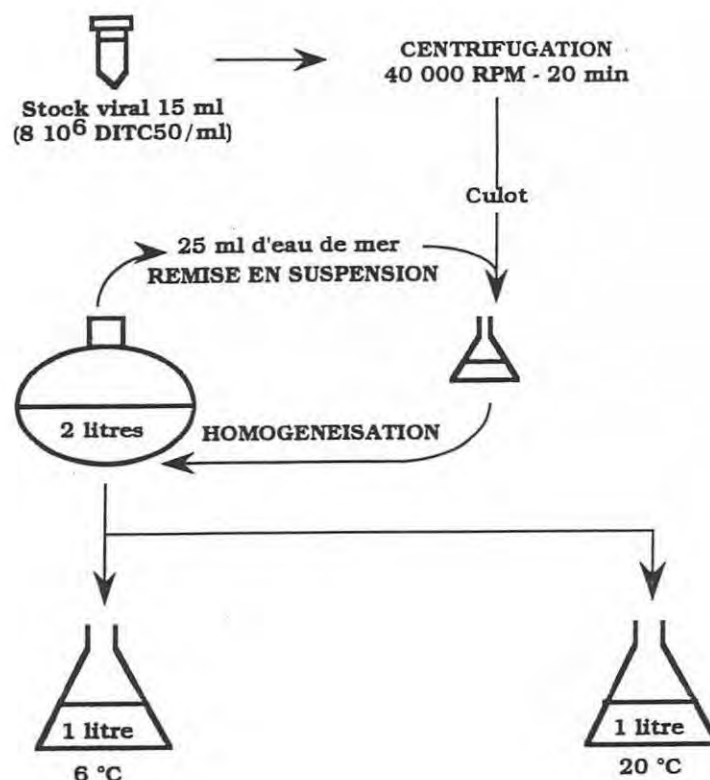


Figure 6. Contamination des eaux de mer par le rotavirus SA11.

### III.3.2. Contamination par de l'ARN viral nu et encapsidé

Les acides nucléiques extraits à partir de 1 g de selle (voir paragraphe V.2.) contenant des rotavirus sont dilués dans de l'eau de mer de Port Navalo. En parallèle, 1 g des mêmes selles était dilué dans l'eau de mer sans avoir subi de traitement déprotéinisant. Les deux mélanges ont été incubés séparément à 10 °C sous agitation et à l'obscurité dans des tubes fermés en polypropylène.

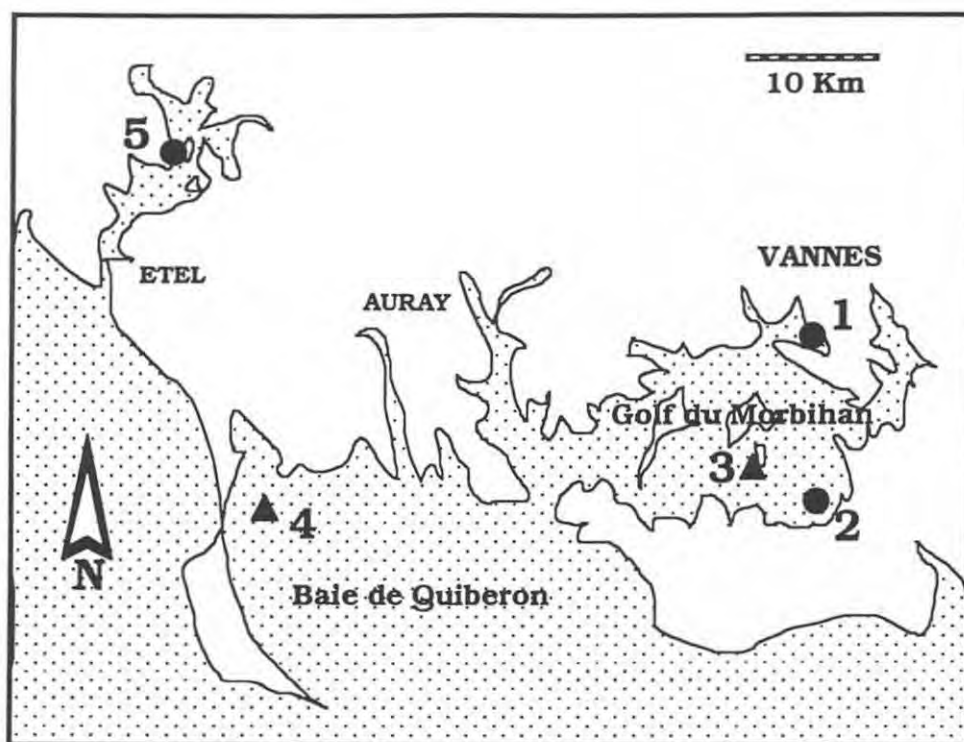
## IV. SITES D'ETUDES ET PRELEVEMENTS

### IV.1. Le littoral du Morbihan

#### IV.1.1. Le golfe du Morbihan

Le Morbihan est un département maritime français qui présente 513 km de côtes. L'étendue du littoral est en partie due au golfe du Morbihan dans lequel se répartissent 70 îles. Le département est une importante région conchylicole française. Essentiellement ostréicole, elle produit environ 19 000 tonnes d'huîtres par an. D'autres coquillages sont également exploités

comme les moules (4 000 tonnes par an). D'une manière globale, les élevages de coquillages sont effectués dans des conditions de salubrité bactériologiquement correctes, avec parfois quelques dépassements du seuil de salubrité de 300 coliformes fécaux/100ml de chair de coquillages (Belin *et al.*, 1993). Le réseau d'assainissement est prévu pour 908 000 équivalents habitants, alors que la population est de 479 000 habitants. Toutefois, un certain nombre d'élevage de bovins (5<sup>ème</sup> département français producteur de lait), de porcins (4<sup>ème</sup> au rang national) et de volailles (1<sup>er</sup> producteur de dindes), ainsi que l'exploitation de zones maraîchères pourraient, en se surajoutant à la fréquentation estivale (capacité d'accueil totale de 616 000 personnes), être responsable de dégradation de la qualité des eaux littorales.



**Figure 7. Localisation des points de prélèvements de coquillages dans la région du Morbihan.**

Des palourdes (●) ont été prélevées à Rosvellec (point 1), Truscat (point 2) et Moulin Verdon (Point 5). Des huîtres (▲) ont été ramassées à Illuric (point 3) et Men er Roue (point 4).

#### IV.1.2. Points de prélèvement des coquillages

Des coquillages ont été prélevés par le Laboratoire IFREMER de la Trinité sur mer, lors de quatre campagnes : le 15 juin 1992, le 12 Octobre 1992, le 21 juin 1993 et le 14 Octobre 1993. Ces dates précédaient et suivaient les périodes estivales fortement touristiques. Les 5 points de prélèvement sont répartis dans 3 zones conchylicoles du département (Figure 7). La

première est le golfe du Morbihan, où 3 points ont été suivis. Aux points 1 et 2 ont été prélevés des palourdes (*Ruditapes philippinarum*), au point 3 des huîtres (*Crassostrea gigas*). Les sites de Truscat (point 2) et d'Illuric (point 3) sont salubres alors que Rosvellec (point 1) est un site toujours contaminé bactériologiquement (>300 coliformes fécaux/100ml de coquillages) et donc classé insalubre. Le quatrième point (Men er Roue) situé au nord de la baie de Quiberon est une zone salubre où ont été prélevées des huîtres. La dernière zone conchylicole est située sur la rivière d'Étel au Moulin Verdon (point 5), là ont été prélevées des palourdes. Ce site est considéré comme occasionnellement contaminé.

Une partie des prélèvements a été utilisée pour la recherche d'*Escherichia coli*. Les analyses bactériologiques ont été effectuées par conductancemétrie (Dupont *et al.*, 1994 et 1996), par le laboratoire IFREMER de la Trinité sur mer. Pour les analyses virologiques, les coquillages restants étaient écoquillés puis conservés à -20 °C dans des flacons (25 g/flacon) avant traitement.

## **IV.2. Le littoral de la Martinique**

### **IV.2.1. La baie de Fort de France**

La Martinique est une île des Antilles de 65 km de long sur 12 à 30 km de large, elle possède 300 km de côtes. L'île héberge une population d'environ 330 000 habitants et accueille environ 153 000 touristes. Les deux plus importantes villes de l'île, Fort de France (chef-lieu, avec 100 000 habitants) et Lamentin (27 000 habitants) bordent la baie de Fort de France. Les eaux usées de ces agglomérations sont drainées par de nombreux cours d'eau et rivières dont la Lézarde (33 km) qui se déverse dans la baie. L'agriculture est surtout orientée vers la production de cannes à sucre, de bananes et d'ananas. Les martiniquais pratiquent également l'élevage de bovins (52 000 têtes), de porc (42 000 têtes) et de moutons (73 000 têtes). Toutefois, le tourisme joue un rôle de plus en plus important sur le plan économique.

### **IV.2.2. Points de prélèvements d'eaux**

Les travaux sur les eaux superficielles de la Martinique ont été réalisés dans le cadre d'un programme intitulé "Etude de la qualité du milieu marin littoral en Martinique", cofinancé par l'IFREMER et le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. Une partie des travaux avaient pour objectif de définir l'impact des activités sur la qualité microbiologique (bactériologique et virologique) des eaux de la baie.

Les eaux issues des principaux apports situés autour de la baie ont été choisies en accord avec les autorités sanitaires locales (DDASS et DDAF). Nous nous sommes intéressés, au cours d'une campagne en mars 1993, à la qualité virologique de 19 rivières et rejets issus des stations d'épuration (Figure 8). Des flacons de 40 ml en polypropylène ont été utilisés pour réaliser les prélèvements.

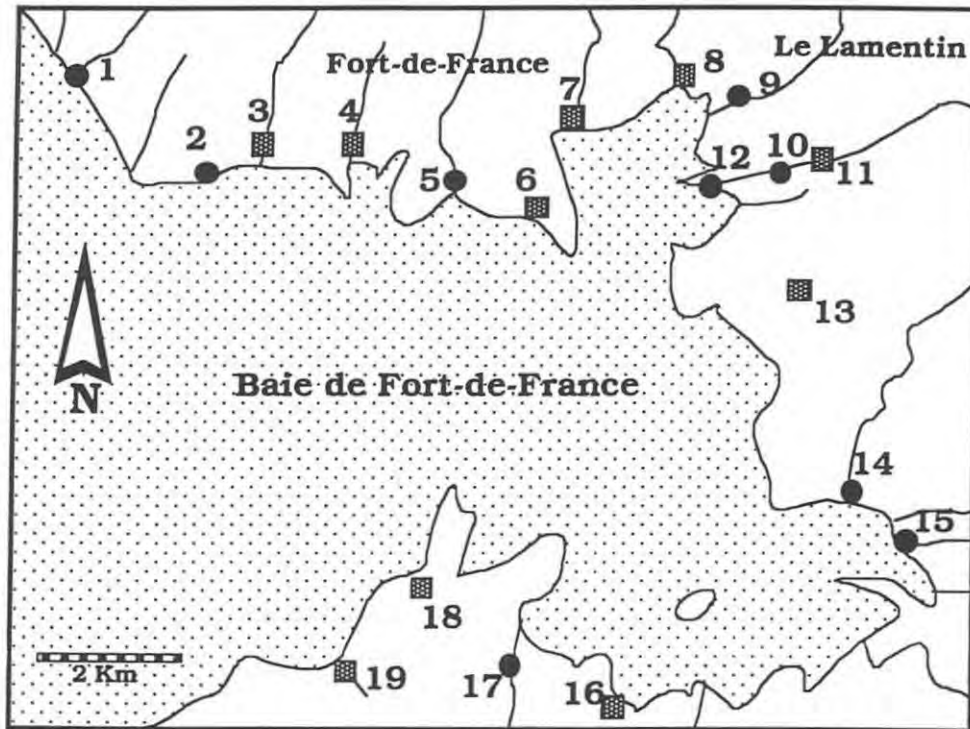


Figure 8. Localisation des prélèvements d'eaux effectués en Martinique.

● : eaux de rivières.    ■ : eaux d'effluents de stations d'épuration.

#### IV.2.3. Echantillons cliniques

Dix selles d'enfant présentant une gastro-entérite à rotavirus du groupe A nous ont été confiées par le Laboratoire de l'hôpital de Fort de France. Le laboratoire recherchait la présence de virus par test d'agglutination au latex (Slidex Rota-Kit 2 de Bio Mérieux).

L'ensemble des prélèvements (eaux de rivières ou effluents et selles) a été congelé à -20°C puis transporté dans des boîtes réfrigérées jusqu'au laboratoire (en France).

### IV.3. Le littoral de la Loire-Atlantique

#### IV.3.1. La presqu'île Guérandaise

La presqu'île Guérandaise est une région riche en zones maraîchageuses à vocation touristique et économique (marais salants de Guérande et marais de la Grande Brière) et en zones de culture de coquillages dont la plus importante est au Croisic. A cela s'ajoute une multitude de gisements naturels coquillers de la Loire à la Vilaine faisant l'objet d'une pêche professionnelle et récréative intense. L'agriculture est encore présente, mais peu développée.

#### IV.3.2. Points de prélèvements de coquillages

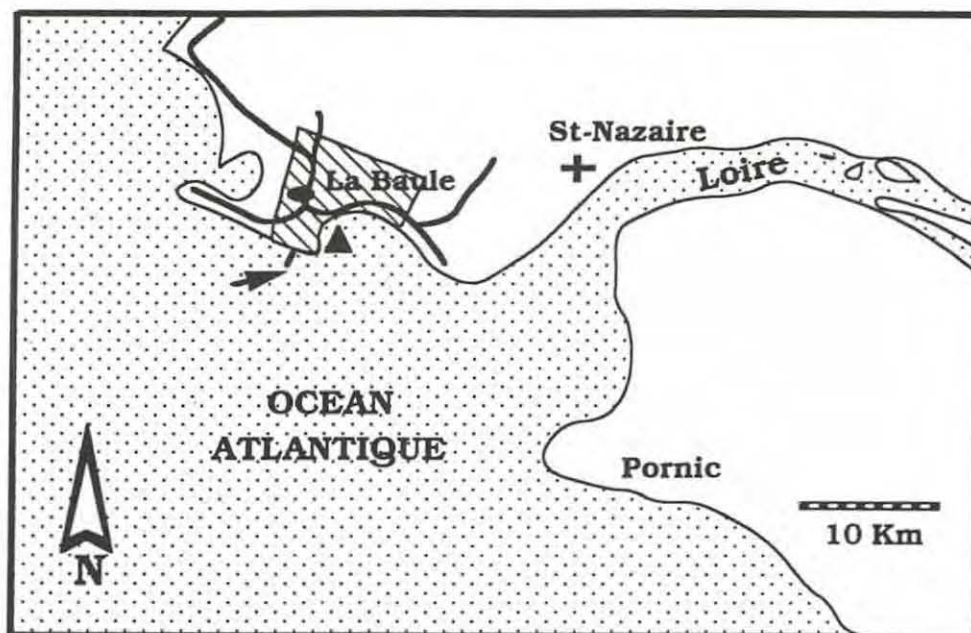
La plage Benoît est située sur la commune du Pouliguen à l'extrémité ouest de la baie de La Baule (Figure 9). Le gisement naturel de coques (*Cerastoderma edule*) situé sur cette plage a été classé en zone insalubre. La pêche des coques a été réglementée en 1983, en raison de dépassements des normes de salubrité en période estivale. La délivrance d'une autorisation de pêche est effectuée sur présentation d'un contrat passé par le pêcheur avec un concessionnaire du Croisic prévoyant le reparcage des coquillages pour une durée minimale de 30 jours, ou le passage en station de purification. Environ 128 à 268 tonnes de coques sont récoltées par an. La pêche professionnelle se pratique essentiellement lors des marées de coefficient supérieur à 80, soit au maximum 10 jours par mois. En période estivale, la pêche est totalement interdite.

A l'extrémité de l'estran se trouve un gisement naturel de moules (*Mytilus edulis*) fixées sur les rochers des Impairs. Ce gisement n'a pas été encore classé, mais les analyses effectuées sur des échantillons prélevés tout au long de l'année amènent à le considérer comme un gisement également insalubre. Malgré les interdictions et les recommandations, ces gisements de coques et de moules font l'objet d'une pêche récréative.

L'insalubrité générale de la plage Benoît serait associée à une pollution essentiellement d'origine domestique (Catherine *et al.* 1991). Les plus importants flux de pollution seraient apportés :

- par l'étier du Pouliguen dans lequel se déversent les eaux pluviales de la quasi-totalité du bassin versant d'une superficie de 2 800 hectares et hébergeant une population de 15 000 à 110 000 habitants, ainsi que les eaux usées des habitations non raccordées au réseau d'assainissement. A cela, il faut ajouter certaines pollutions qui peuvent être apportées par le port de plaisance situé dans l'étier (900 emplacements).

- par l'émissaire de la station d'épuration de Livery situé à proximité sur la côte rocheuse du Pouliguen en baie du Scal.



**Figure 9. Présentation du site d'étude en Loire-Atlantique et localisation des points de prélèvements.**

Des prélèvements d'eaux brutes et d'eaux épurées ont été effectués à la station d'épuration de Livery (●). Les traits noirs convergeant vers la station d'épuration représentent le réseau du collecteur principal d'eaux usées. La flèche indique l'émissaire de rejet en mer.

La plage Benoît est située sur le bassin versant de la partie ouest de la baie de La Baule (zone en grisée). Sur cette plage, des moules et des coques ont été ramassées (▲).

L'hôpital de St-Nazaire (+) a collecté les selles d'enfants présentant une gastro-entérite sévère nécessitant une hospitalisation. Les infections à rotavirus ont été diagnostiquées par le laboratoire hospitalier.

Au jusant les eaux polluées de l'étier du Pouliguen s'évacuent très largement mais après dilution en mer et éventuellement mélange avec les eaux polluées de la baie du Scal lors des vents d'ouest persistant, elles reviennent au flot en partie et inondent alors la totalité des gisements. Egalement, en période de crue les mouvements de marée associés au débit fluvial entraînent le panache de la Loire dans la baie de La Baule. Compte tenu de la faiblesse des courants résiduels à cet endroit (1cm/sec), les éléments polluants en suspension dans l'eau peuvent séjourner pendant quelques jours dans la baie du Pouliguen lors des marées moyennes et à plus forte raison, lors des mortes-eaux.



Des coques et des moules provenant des gisements naturels de la plage Benoît ont été collectés mensuellement (Figure 9). La zone de prélèvement située à proximité de l'étier du Pouliguen est restée inchangée tout au long de l'étude. Les coques ont été ramassées autour des premiers rochers du grand Impair, où les moules ont été également pêchées. Les coquillages étaient acheminés vers le laboratoire dans les mêmes conditions que celles décrites pour les coquillages du Morbihan. Les analyses bactériologiques (recherche d'*Escherichia coli* par conductance métrie) ont été réalisées par le laboratoire IFREMER de Nantes.

#### IV.3.3. Points de prélèvements d'eaux

La presqu'île Guérandaise est dotée d'un réseau d'assainissement centralisant les effluents des communes avoisinantes sur le site de Livery (Figure 9). Le réseau d'une taille de 472 km (en 1994) concerne les bourgs, l'assainissement des autres habitations est laissé à l'initiative individuelle. La capacité de traitement de la station est de 60 000 (en hiver) à 218 000 équivalents habitants (en été). La population permanente concernée est d'environ 55 000 habitants, la population moyenne estivale est d'environ 345 000 habitants. En période estivale, la station traite un volume d'eaux usées qui correspond pratiquement à sa capacité maximale. Le fonctionnement du réseau et de la station est perturbé principalement en hiver par des intrusions d'eaux pluviales et d'eaux parasites en provenance de la nappe phréatique. En moyenne annuelle, 58,3 % des effluents ne seraient pas des eaux usées domestiques. Lors de fortes précipitations, la saturation des collecteurs ou des postes de relevage met en oeuvre des trop-pleins.

La station d'épuration est de conception physico-chimique. Son mode de fonctionnement est le suivant :

- en haute saison (juin à septembre) se succèdent les étapes de floculation au chlorure ou sulfate d'alumine auquel est ajouté un polymère organique cationique, suivi d'une chloration à l'hypochlorite de sodium, puis par une décantation.

- en moyenne saison (mi-avril à mai) les traitements de floculation et chloration sont réduits avant décantation.

- en basse saison (octobre à mi-avril) seule la décantation est employée.

Un traitement supplémentaire contre les mauvaises odeurs est effectué à certains postes de prélèvements par adjonction de sulfate ferreux afin de bloquer la formation de sulfure d'hydrogène.

Après épuration, les effluents sont rejetés en mer lors du jusant par un émissaire de 6 km de long, dont l'exutoire se situe en baie du Scal à environ 330 m du rivage par 6 m de profondeur (Figure 9).

Les échantillons d'eaux de station (eau brutes et eaux épurées) ont été collectés en bouteilles plastiques de 1,5 litre, le même jour que les coquillages. Ces prélèvements étaient effectués simultanément entre 11 heure et 13 heure pour minimiser les variations journalières de la qualité des eaux. Les prélèvements sont transportés dans une glacière réfrigérée jusqu'au laboratoire, où ils sont homogénéisés, par retournement plusieurs fois, puis répartis dans des sachets alvéolés (24 x 15 ml) et conservés à -20 °C.

#### IV.3.4. Echantillons clinique

Les selles d'enfants présentant une gastro-entérite nécessitant un suivi médical ont été prélevées et analysées par le laboratoire du centre hospitalier de Saint Nazaire dont les eaux usées ne sont pas traitées par la station de Livery (Figure 9). Les échantillons positifs, pour la recherche de rotavirus par agglutination au latex (Slidex Rota-Kit 2 de Bio Mérieux), ont été conservés en flacon de coproculture à -20 °C. Mensuellement, les prélèvements étaient transférés de l'hôpital au laboratoire.

Sur l'année 1993, 43 prélèvements de selles d'enfants positifs ont été identifiés. Le domicile de ces enfants était, pour la majorité d'entre eux, situé dans l'agglomération nazairienne, avec cependant quelques cas issus de la presqu'île Guérandaise (Figure 10).

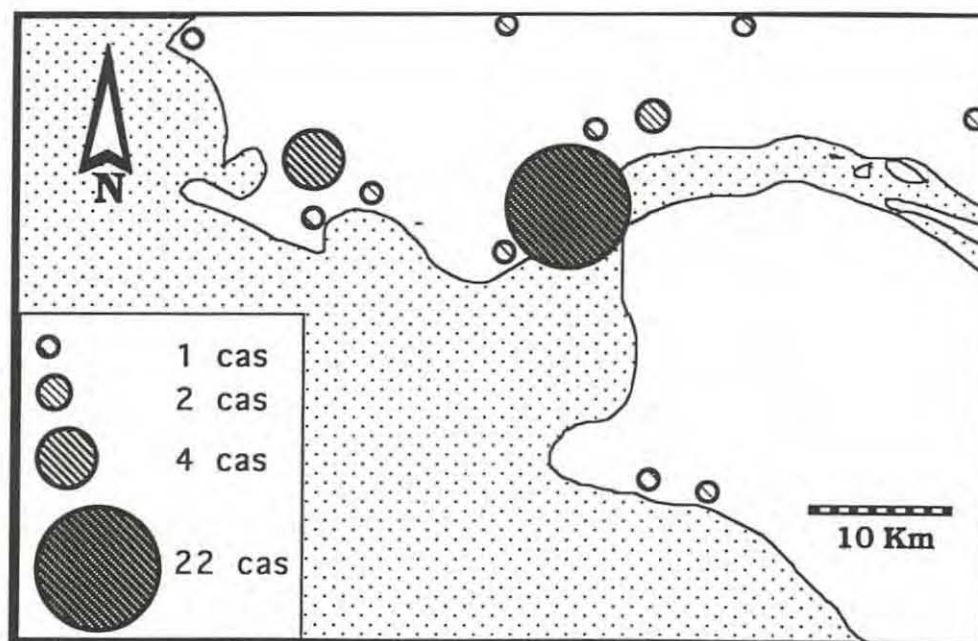


Figure 10. Localisation du domicile des enfants admis à l'hôpital de St Nazaire pour une gastro-entérite à rotavirus.

Cinq cas ne sont pas représentés sur la Figure 10. L'un des enfants était sans domicile fixe, le second était domicilié à Sarzeau (Morbihan), le troisième avait un lieu de résidence principal à Guémené Penfao situé à l'extrémité nord du département, le domicile des deux derniers n'est pas connu. Les 5 échantillons ont été néanmoins inclus dans l'étude, car leur hospitalisation à Saint-Nazaire laisse supposer qu'ils étaient en résidence provisoire dans la région.

## **V. EXTRACTION DES ARN A PARTIR DES ECHANTILLONS**

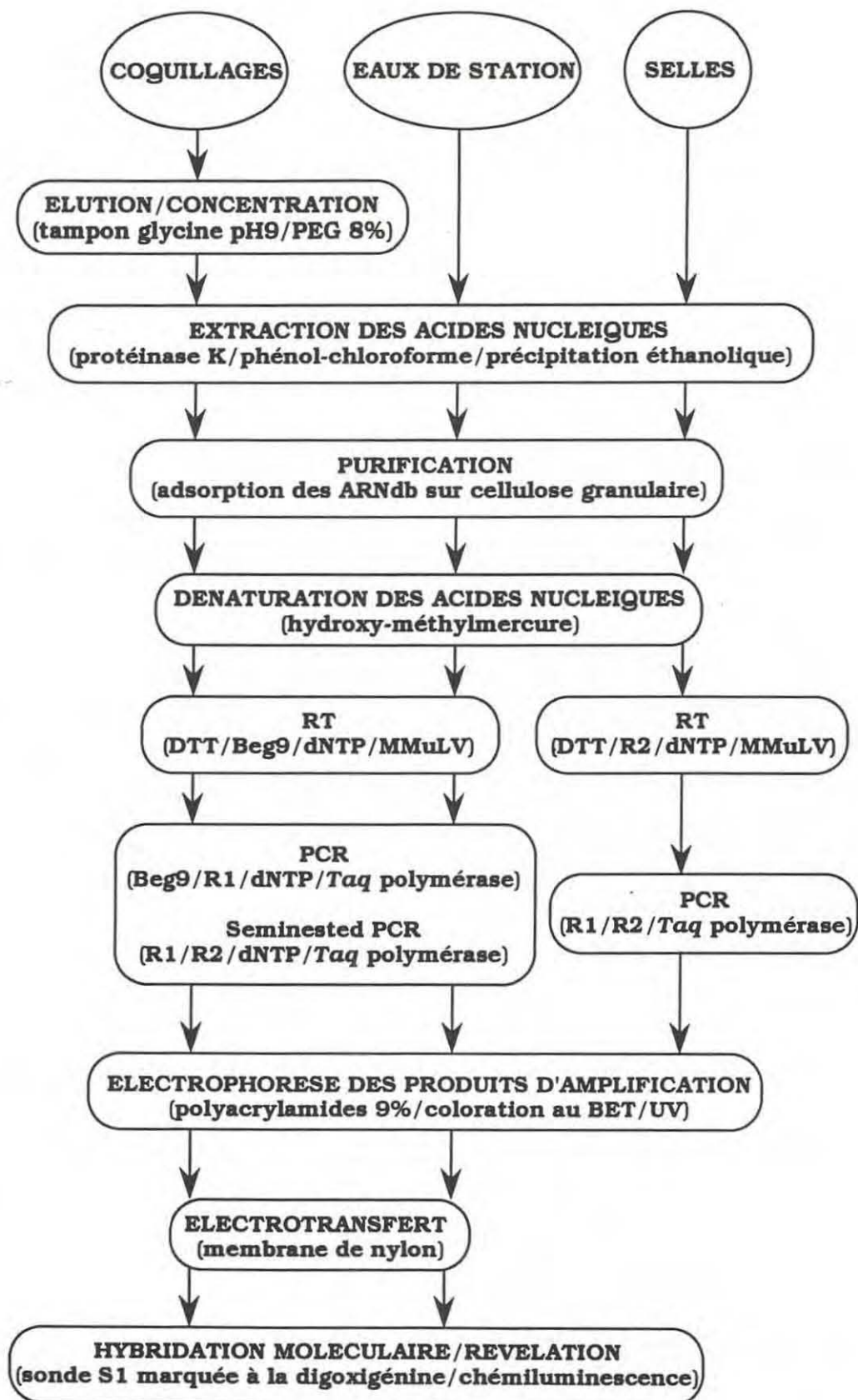
### **V.1. Elution et concentration des virus à partir des coquillages entiers**

Le protocole est adapté de la méthode proposée par Lewis et Metcalf (1988a) (Figure 11). Les virus sont extraits à partir de 25 g de chair de coquillages et d'eau intervalvaire mélangés à 5 volumes de tampon glycine 0,1 M, NaCl 9 % et NaOH pH 9. L'ensemble est homogénéisé à l'aide d'un broyeur (Waring Blendor) pendant 5 min par fractions de 30 sec. Les virus sont élués sous agitation magnétique durant 15 min. La solution est ensuite centrifugée à 10 000 g pendant 10 min à 4 °C. Le surnageant est alors ajusté à pH 7 en présence de 8 % de PEG 8 000 (Sigma), puis mis sous agitation 2 h à 4 °C. Après centrifugation à 4 °C pendant 30 min à 10 000 g, le culot est repris dans 5 ml d'eau DEPC et utilisé pour les extractions des acides nucléiques.

### **V.2. Extraction des acides nucléiques en présence de mélange détergent.**

Les extractions sont réalisées à partir de 410  $\mu$ l de concentrat de coquillages, ou de prélèvement d'eau, ou de suspension de selles (les selles sont diluées dans de l'eau traitée au DEPC pour obtenir une suspension à 50% [p/v]), ou encore de suspension de virus SA11, selon le même protocole (Figure 11).

La digestion enzymatique des protéines de capsid est réalisée en présence d'un mélange détergent de la façon suivante : l'échantillon est incubé en présence de 100 mM Tris-HCl pH 7,5, 5 mM EDTA, 1 % SDS et 200  $\mu$ g/ml Protéinase K (volume final 500  $\mu$ l) pendant 1 h à 56 °C.



**Figure 11. Présentation synoptique du protocole d'analyse des prélèvements naturels et des échantillons cliniques.**

Les acides nucléiques sont extraits avec 1 volume de phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25:24:1, v/v), puis 1 volume de chloroforme/alcool isoamylique et précipités en présence de 2 volumes d'éthanol absolu et 300 mM d'acétate de sodium (Sambrook *et al.*, 1989). Après une centrifugation pendant 30 min à 12 000 g et à 4°C, le culot d'acides nucléiques est lavé avec de l'éthanol à 70 % puis séché. Les acides nucléiques sont remis en suspension dans 50  $\mu$ l d'eau traitée au DEPC.

### **V.3. Extraction des ARN en présence de thiocyanate de guanidium**

Un volume de 100  $\mu$ l d'échantillon d'eau de mer est prélevé et 800  $\mu$ l d'un mélange commercial de thiocyanate de guanidium et de phénol (Bioprobe) sont ajoutés. Après homogénéisation, 80  $\mu$ l de chloroforme sont ajoutés et le mélange est de nouveau agité vigoureusement pendant 15 sec. Après 5 min d'incubation dans la glace, la solution est centrifugée à 12 000 g pendant 15 min. La phase aqueuse ainsi débarassée des protéines et de l'ADN (dans un volume égal à environ 600  $\mu$ l) est mélangée à 1 volume d'isopropanol, puis incubée pendant 15 min dans la glace. Les ARN sont culotés par une centrifugation pendant 15 min à 12 000 g et à 4 °C. Le culot est lavé à l'éthanol à 75 % puis récupéré par une centrifugation de 8 min à 7 500 g et à 4 °C. Le culot est séché puis remis en suspension dans 10  $\mu$ l d'eau traité au DEPC.

### **V.4. Purification des acides nucléiques**

#### **V.4.1. Purification par adsorption des acides nucléiques**

Nous avons suivi le protocole préconisé par le Docteur M. Brémont (INRA de Jouy-en-Josas) (communication personnelle) qui utilise de la cellulose granulaire (CC41, Waktman) (Figure 11). Ainsi, 100  $\mu$ l d'acides nucléiques extraits d'échantillons sont mélangés à 100  $\mu$ l de tampon d'adsorption (20 mM Tris-HCl pH 6,8, 200 mM NaCl, 2 mM EDTA, 66 % d'éthanol) et 10  $\mu$ l d'une solution de CC41 (10 g de CC41 pour 10 ml de tampon d'adsorption). Le mélange est agité pendant 45 min à température ambiante et centrifugé pendant 3 min à 4 000 g et à 20 °C. Le culot est lavé 3 fois avec le tampon de lavage (10 mM Tris-HCl pH 6,8, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA et 70 % éthanol), puis séché rapidement avant d'être resuspendu dans 50  $\mu$ l d'eau traitée au DEPC. Les ARNdb sont récupérés dans le surnageant après une incubation de 10 min à 56 °C puis une centrifugation de 3 min à 4 000 g et à 20 °C.

## V.4.2. Purification par filtration

Des micro-colonnes sont préparées avec 900  $\mu$ l de gel de Sephadex G 150 (Pharmacia) à 2 % dans de l'eau traitée au DEPC. L'excès d'eau est éliminé par centrifugation à 300 g pendant 4 min. L'extrait d'acides nucléiques (20  $\mu$ l) est alors déposé à la surface du gel et l'ensemble est de nouveau centrifugé à 300 g pendant 3 min à 4°C. Les acides nucléiques purifiés sont récupérés sous le même volume (20  $\mu$ l).

## VI. RECHERCHE D'ARN VIRAUX DANS LES EXTRAITS

### VI.1. Choix des amorces et de la sonde

Cinq amorces et une sonde sont sélectionnées à partir de la séquence du gène de la protéine VP7 des rotavirus du groupe A (Figure 12). Leur séquence est donnée dans le Tableau 4.

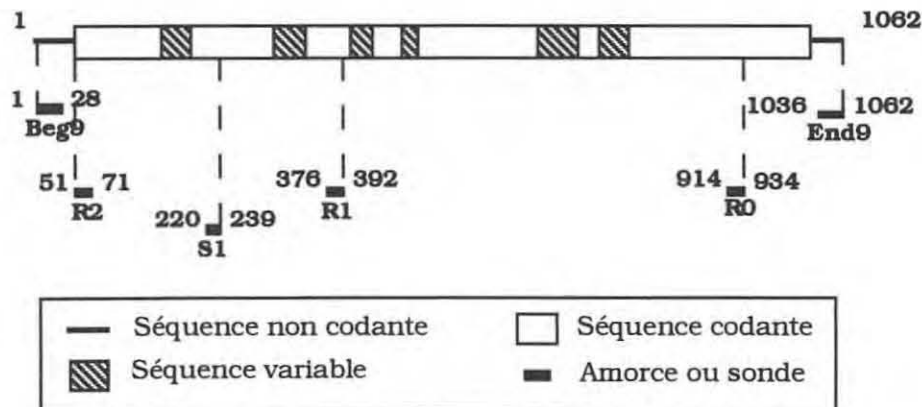


Figure 12. Localisation, sur le gène de la protéine VP7, des amorces et de la sonde utilisées en RT-semi-nested PCR et Hybridation.

Tableau 4 : Séquences des amorces et de la sonde utilisées dans les réactions d'amplification et d'hybridation du gène codant pour la protéine VP7.

Oligonucléotide	Séquence 5'-3'	Localisation	Référence
Beg9	GGCTTTAAAAGAGAGAATTTCCGTGTGG	1-28	(Gouvea <i>et al.</i> , 1990a)
End9	GGTCACATCATAACAATTCTAATCTAAG	1036-1062 (-)	(Gouvea <i>et al.</i> , 1990a)
R0	ATACTTGCCACCACTTTTC	914-934 (-)	(Wa)
R1	GATCCTGTTGGCCATCC	376-392 (-)	(Flores <i>et al.</i> , 1990)
R2	GTATGGTATTGAATATACCAC	51-71	(Flores <i>et al.</i> , 1990)
S1	TCCATTGATCCTGTTATTGG	220-239 (-)	(Wa)

(-) séquence complémentaire au brin codant pour la protéine.

(Wa) séquence déduite à partir du gène de la protéine VP7 de la souche de rotavirus humain Wa (numéro d'accèsion: M21843, K02033) (Dessen *et al.*, 1990).

## **VI.2. Rétro-transcription**

Deux techniques de dissociation des segments d'ARNdb en ARN simple brin (ARNsb) peuvent être utilisées avant de réaliser la réaction enzymatique de transcription de l'ARNsb en ADN complémentaire (ADNc).

### **VI.2.1. Utilisation du diméthylsulfoxyde**

L'extrait d'acide nucléique est mis en présence de 10% de DMSO et de 10  $\mu$ M de Beg9. Après dénaturation à 95 °C pendant 5 min le mélange est refroidi dans un bain de glace.

### **VI.2.2. Utilisation de l'hydroxy-méthylmercure**

L'extrait d'acide nucléique est mis en présence de 25 mM d'hydroxy-méthylmercure (HMM)(Strem chemicals) et de 10  $\mu$ M de Beg9. La dénaturation est réalisée pendant 5 min à température ambiante (Figure 11).

### **VI.2.3. Réaction enzymatique**

Dans les 2 cas de dénaturation au DMSO ou à l'HMM, la réaction enzymatique de transcription est réalisée dans les conditions suivantes (Figure 11). Le mélange réactionnel est composé de 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 MgCl<sub>2</sub>, 400  $\mu$ M de chaque désoxyribonucléotides (dNTP), 5  $\mu$ M d'amorce (Beg 9), 10 unités d'inhibiteur des ribonucléases (Rnase Block I, Stratagène) et 10 unités de reverse transcriptase de Moloney-Murine Leukemia Virus (Stratagène). Le mélange d'un volume final de 10  $\mu$ l est recouvert d'une goutte d'huile minérale (Sigma) pour prévenir l'évaporation d'eau. L'incubation est réalisée pendant 45 min à 37 °C.

## **VI.3. Réactions d'amplification enzymatique en chaîne**

Deux réactions d'amplification successives sont accomplies pour permettre d'augmenter la sensibilité de détection (Figure 11).

La première amplification se fait en complétant la totalité du produit de rétrotranscription par 4 volumes de mélange réactionnel (volume final 50 µl), de façon à obtenir une concentration finale de 10 mM Tris HCl pH 8,3, 50 mM KCl, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,001 % gélatine, 200 µM dNTP, 1 µM de chaque amorce (Beg9/End9 ou Beg9/R1) et de 1 unité de *Taq* ADN polymérase (Ampli*Taq*, Perkin-Elmer Cetus).

La seconde amplification ou seminested PCR s'effectue en ajoutant 2 µl de produit de PCR dans 25 µl d'un mélange de même composition que pour la PCR, à l'exception du couple d'amorces, qui est soit R0 associé à End9, soit R1 associé à R2.

Les amplifications de l'ARN viral transcrit en ARNc s'effectuent de la manière suivante :

- dénaturation à 95 °C pendant 1 min ;
- 30 cycles (40 cycles en présence du contrôle interne) comprenant 3 températures : 94°C pendant 30 sec, 50 °C pendant 30 sec et 72 °C pendant 30 sec ;
- élongation finale pendant 3 min à 72 °C.

Le thermocycleur utilisé est soit le Perkin Elmer 9600 (Perkin-Elmer Cetus), soit le Mini Cycler (MJ Research).

#### **VI.4. Réaction d'hybridation (Southern blot)**

##### **VI.4.1. Marquage de la sonde**

L'oligonucléotide (S1) (Figure 12) est marqué à l'extrémité 3' par adjonction enzymatique de bases couplées à la digoxigénine (DIG-11-dUTP). La réaction s'effectue dans les conditions décrites par le fabricant (DIG Oligonucleotide tailing Kit de Boehringer Mannheim Biochemica).

L'oligonucléotide (5 µM) est mélangé à 200 mM cacodylate de potassium, 25 mM Tris-HCl pH 6,6, 250 µg/ml BSA, 5 mM CoCl<sub>2</sub>, 0,5 mM dATP et 2,5 unités/µl de terminal transférase. Le tout est incubé 45 min à 37 °C, puis les oligonucléotides sont précipités en présence de 0,3 M d'acétate de sodium et 3 volumes d'éthanol absolu. Après centrifugation à 12 000 g pendant 30 min à 4 °C, le culot est lavé à l'éthanol à 70 %, puis séché et repris dans 50 µl d'eau traité au DEPC.



#### VI.4.2. Electrotransfert

Les produits de PCR ou de seminested PCR séparés par électrophorèse en gel de polyacrylamide sont transférés sur une membrane de nylon chargée positivement (Boehringer Mannheim) (voir paragraphe VIII.) (Figure 11). La migration se produit dans un appareil à électrotransfert semi-sec (Fast-Blot B33 de Biometra). Le pack de transfert (gel placé contre une membrane de nylon et entouré de feuilles de papier Whatman 3MM) est constitué, puis soumis à un courant de 25 v pendant 6 min en tampon TBE (5X TBE : 450 mM Tris-HCl pH 8, 450 mM acide borique et 10 mM EDTA).

#### VI.4.3. Hybridation

La membrane est préhybridée pendant 1 heure à 42 °C dans 5 ml de tampon 5X SSC (20x SSC : 3 M NaCl, 0,3 M tri-sodium citrate, pH 7,5), 0,2 % SDS, 5X Denhart (50X Denhart : 0,02 % ficoll 400, 0,02 % polyvinylpyrrolidone, 0,02 % albumine sérique de bovin) et 1 % agent bloquant (Boehringer Mannheim). Cette membrane est ensuite hybridée pendant 5 h à 42 °C en présence du même tampon complété de 10 pmoles de sonde. La membrane est ensuite lavée à la température d'hybridation 2 fois 5 min dans une solution de 2X SSC et 0,1 % SDS et 2 fois 5 min dans une solution de 0,1X SSC et 0,1 % SDS. La sonde fixée de façon spécifique est révélée par chimioluminescence (DIG Luminescent Detection Kit de Boehringer Mannheim).

#### VI.4.4. Révélation

La membrane de nylon est équilibrée pendant 1 min dans du tampon maléate (100 mM acide maléique, 150 mM NaCl, pH 7,5). Sa surface est ensuite saturée par de l'agent bloquant à 1 % (p/v) en tampon maléate pendant 30 min. Les molécules de digoxigénine sont reconnues par des anticorps (fragment Fab) couplés à la phosphatase alcaline (dilution du conjugué au 1/10 000 en tampon maléate + agent bloquant 1 %) pendant 30 min à 37 °C. Après 2 lavages en tampon maléate + 0,3 % de Tween 20 (v/v) pendant 15 min, la membrane est équilibrée pendant 1 min dans du tampon de révélation (100 mM Tris-HCl pH 9,5, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub>), puis incubée pendant 5 min avec 250 µM CSPD (Boehringer Mannheim) en tampon de révélation. La déphosphorylation du substrat s'accompagne d'une émission de lumière, la membrane est alors placée sous un film plastique transparent, puis mise au contact d'un film photo (Hyperfilm-MP, Amersham). Après 1 heure d'incubation à 37°C dans une chambre noire (hypercassette, Amersham), la révélation du film photo a lieu à l'obscurité par passage dans un bain de solution révélatrice (1 à 5 min), puis dans un bain fixateur (10 min).

## VII. ANALYSE DU POLYMORPHISME DE RESTRICTION DES SEQUENCES VIRALES AMPLIFIEES

### VII.1. Analyse de séquences pures

Dans le cas où une seule séquence est fortement amplifiée, son profil de restriction est analysé par quatre enzymes de restriction : *AluI*, *RsaI*, *Sau3AI* et *TaqI* (Eurogentec) (Figure 13). Chaque enzyme agit de la façon suivante : 18  $\mu$ l d'acides nucléiques amplifiés sont mélangés à 2  $\mu$ l de tampons 10X (tampon correspondant à l'enzyme de restriction, Eurogentec) et 10 U d'une des enzymes. Le mélange est incubé au moins 2 h à 65 °C pour *TaqI* ou à 37 °C pour les trois autres enzymes. Les produits de la digestion sont directement séparés par électrophorèse en gel de polyacrylamide à 9 % ou en gel à 2,5 % d'agarose à bas point de fusion (voir paragraphe VIII.).

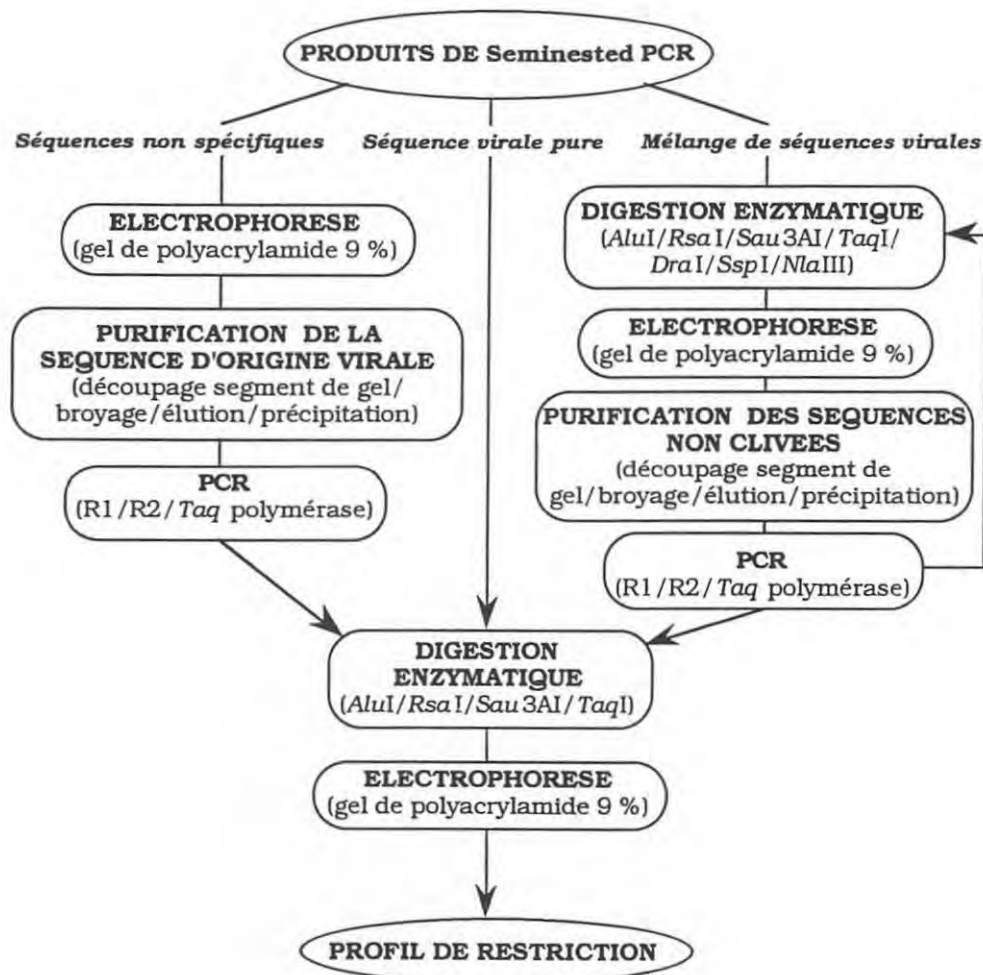


Figure 13. Présentation synoptique du protocole d'analyse du RFLP.

## **VII.2. Purification de séquences en faible concentration ou mélangées à des séquences différentes sur le critère de la taille**

Si l'amplification de la séquence virale est insuffisante, ou si elle est accompagnée de séquences non spécifiques après électrophorèse, la bande d'ADN correspondant à la séquence virale est découpée puis broyée avec un micropoter dans 500  $\mu$ l d'une solution d'élution (500 mM acétate de sodium, 100 mM Tris-Hcl pH 7,5 et 5 mM EDTA). L'élution des acides nucléiques s'effectue pendant au moins 2 h à 65 °C. Les fragments de gel de polyacrylamide sont séparés du tampon d'élution par centrifugation (4 000 g pendant 2 min). Les acides nucléiques dissouts sont précipités par 2 volumes d'éthanol absolu à -80 °C pendant 30 min. Après 30 min de centrifugation à 12 000 g à 4 °C, le culot est lavé à l'éthanol à 70 % puis repris dans 20  $\mu$ l d'eau traitée au DEPC. L'ADN purifié est alors utilisé pour une nouvelle amplification correspondant aux conditions décrites pour la seminested PCR (voir paragraphe VII.3.). Un témoin négatif (segment d'acrylamide ne contenant pas d'ADN) est simultanément traité pour contrôler l'absence de contamination lors de la purification. Le produit d'amplification est alors traité dans les conditions décrites au paragraphe VII.1. (Figure 13).

## **VII.3. Purification de séquences mélangées à des séquences différentes sur le critère du polymorphisme de restriction**

Le mélange de séquences virales dans un même produit d'amplification est constaté, lorsque après digestion par au moins l'une des enzymes, la somme des tailles des fragments obtenus est supérieure à la taille de la séquence avant digestion enzymatique.

Dans ce cas, l'ADN amplifié est clivé par les enzymes de restriction précédemment décrites (*AluI*, *RsaI*, *Sau3AI*, *TaqI*) ainsi que *DraI*, *SspI* (Eurogenetec) et *NlaIII* (Sigma). Les séquences, non clivées par chacune de ces enzymes, sont purifiées par électrophorèse en gel de polyacrylamide et réamplifiées si nécessaire. L'analyse RFLP de ces séquences est de nouveau effectuée (voir paragraphe VII.1.) (Figure 13).

Si des problèmes d'interprétation persistent, caractérisant une co-purification de différentes séquences, cette méthode de purification est une fois de plus utilisée en faisant agir une enzyme différente de la précédente. Mais une même séquence n'a pas été réamplifiée plus de deux fois pour réduire les risques d'erreur (incorporation d'un nucléotide non complémentaire au brin copié) lors de la synthèse avec la *Taq* ADN polymérase qui est dépourvue d'activité 3'→5' exonucléasique correctrice (selon Tindall et Kunkel [1988], le taux d'erreur pour cette polymérase serait de 285 erreurs par million de bases incorporées).

## VIII. ELECTROPHORESE DES ACIDES NUCLEIQUES

Deux types d'électrophorèses sont utilisés pour séparer les acides nucléiques : l'électrophorèse en gel d'agarose à bas point de fusion et l'électrophorèse en gel de polyacrylamide.

### VIII.1. Electrophorèse en gel d'agarose à bas point de fusion

Les produits d'amplification ou de digestion enzymatique (10  $\mu$ l) sont mélangés à 2,5  $\mu$ l de tampon SBS 5X (0,25 % bleu de bromophénol, 40 % sucrose, 1 % SDS) puis déposés dans les puits d'un gel d'agarose Nu Sieve à 2,5 % en tampon 1X TBE. Le gel avant dépôt doit être prè-refroidi à 4 °C pendant au moins 30 min. Une tension de 100 volts est appliquée pendant environ 2 heures (cuve d'électrophorèse Sub-Cell, Bio-Rad), pour séparer les acides nucléiques en fonction de leur taille.

### VIII.2. Electrophorèse en gel de polyacrylamide

Comme pour l'électrophorèse en gel d'agarose, les produits d'amplification ou de digestion enzymatique sont mélangés au tampon SBS 5X puis déposés sur un gel de polyacrylamide. Le gel est composé de 9 % de polyacrylamide (rapport acrylamide/bis-acrylamide = 39/1), 0,1 % (p/v) d'ammonium persulfate, de 0,1 % TEMED (v/v) en tampon TBE. Les gels sont soumis à un champ électrique: 5 min à 60 volts puis 45 min à 120 volts (Cuve d'électrophorèse Mini-Protean II dual slab cell, Bio-Rad). Les acides nucléiques migrent de l'anode vers la cathode et se séparent en fonction principalement du paramètre de taille mais aussi de la conformation spatiale des molécules (Lane *et al.*, 1992).

Les ARNdb viraux purifiés à partir des prélèvements de selles (10  $\mu$ l) sont également analysés par électrophorèse en gel d'acrylamide à 9 %. Les acides nucléiques se séparent sous l'effet d'un courant à voltage constant de 60 volts pendant 5 min puis de 3 heures à 120 volts.

### **VIII.3. Coloration des gels d'électrophorèse au bromure d'éthidium**

Après électrophorèse, les gels d'agarose ou de polyacrylamide sont plongés pendant 15 min dans une solution de coloration contenant 0,01% de bromure d'éthidium (BET) (p/v). Le BET s'intercale entre les bases des acides nucléiques et a la propriété d'émettre une lumière fluorescente lorsqu'il est exposé aux UV (table TFX-35M 6 x 15 W, longueur d'onde 312 nm). Dans ces conditions, les ADN ou ARN sont visibles et le gel peut alors être photographié (f/11, 2 s avec films instantanés Polaroid 667 iso 3000).

### **VIII.4. Coloration des gels de polyacrylamide au nitrate d'argent**

Cette coloration argentique, plus sensible et moins toxique que la coloration au BET (Herring *et al.*, 1982), s'effectue en plongeant pendant 1 heure le gel dans une solution fixatrice à 10% d'éthanol et 0,5% d'acide acétique. Cette étape stoppe la diffusion de l'ADN dans le gel. Puis le gel est transféré dans une solution à 0,011 M de nitrate d'argent pendant 30 min, les ions argent se fixent alors de façon électrostatique sur les acides nucléiques. Après deux brefs rinçages à l'eau distillée, les ions argent sont réduits par incubation du gel dans une solution fraîche à 0,75 M d'hydroxyde de sodium et 0,085 M de formaldéhyde. La réaction est stoppée (après environ 30 min) en transférant le gel dans un bain de carbonate de sodium 0,07 M pendant 30 min. Les acides nucléiques apparaissent colorés en noir sur fond clair (jaunâtre). Les gels ainsi colorés peuvent être photographiés (f/22, 1/15 s avec films instantanés Polaroid 667 iso 3000) en les plaçant sur un écran lumineux blanc de 32 W. Ils peuvent être également conservés plusieurs semaines à 4 °C enveloppés dans un film plastique type Sarran.

### **VIII.5. Estimation de la taille d'une séquence d'acides nucléiques.**

L'électrophorèse en gel d'agarose est utilisée pour déterminer la taille des séquences amplifiées ou des fragments de digestion. A la différence des gels de polyacrylamide, les acides nucléiques se séparent uniquement en fonction de leur taille et non également en fonction de leur structure (Lane *et al.*, 1992).

La position des séquences amplifiées est comparée avec celle des fragments du marqueur de taille VI de Boehringer Mannheim. Alors que la taille des fragments de digestion est comparée avec celle des fragments du marqueur de taille V de Boehringer Mannheim.

A partir de la photographie d'un gel, la distance séparant les bandes du marqueur de taille du puits de dépôt est mesurée. La droite de régression de la distance mesurée en fonction du logarithme décimal de la taille en paire de bases, pour les fragments de 587 à 64 pb, est calculée. Cette droite étalon doit être calculée pour chaque gel et elle n'est valable que pour les séquences séparées sur le même gel. De même, la distance séparant chaque séquence amplifiée ou des fragments de restriction du puits de dépôt est calculée. Cette mesure est reportée sur la droite étalon pour estimer la taille de l'ADN. Expérimentalement, une erreur correspondant à environ 10 % de la taille est observée.

#### **VIII.6. Analyse densitométrique des gels colorés au nitrate d'argent**

Les gels sont analysés avec un densitomètre (CAMAG SCANNER II V3.14) qui balayent les pistes du point de dépôt jusqu'à la fin du gel avec un faisceau lumineux de 585 nm produit par une lampe au tungstène. Une partie de la lumière est absorbée par les acides nucléiques colorés à l'argent, la lumière transmise est analysée par une cellule qui convertit le signal lumineux en variations électriques. Ces variations électriques sont enregistrées en continu puis interprétées avec le logiciel CATS version 3.15 qui permet d'obtenir des courbes en fonction de la tension électrique et de la distance par rapport au point de dépôt. La surface des pics de tension électrique correspondant aux séquences amplifiées à partir de l'ARN viral et du contrôle interne sont également calculés par ce logiciel. Les analyses statistiques et graphiques sont effectuées avec l'aide du logiciel Excel 4 (Microsoft).

### **IX. SYNTHÈSE DU CONTRÔLE INTERNE**

#### **IX.1. Construction de l'insert**

Le gène de la protéine VP7 du rotavirus SA11 est utilisé comme base pour la construction du contrôle interne. La séquence de ce gène est parfaitement connue et décrite dans les bases de données (numéro d'accès : J02354, K02028, V01546) (Dessen *et al.*, 1990).

##### **IX.1.1. Amplification du gène de la protéine VP7**

L'ARNdb du virus SA11 est extrait par action de la protéinase K, extraction au phénol/chloroforme et précipitation éthanolique (voir paragraphe V.2).

Le début de la séquence (392 premières paires de bases) du gène de la protéine VP7 est amplifié par RT-PCR avec la Vent ADN polymerase (BioLabs). Après rétro-transcription de l'ARNdb viral (dénaturé par l'HMM) (voir paragraphe VI.2), l'ADNc est amplifié en mélangeant les 10  $\mu$ l de produit de la RT aux réactifs de PCR (90  $\mu$ l). Le mélange final est composé de tampon 1X Vent ADN polymétase (Bio Labs), 200  $\mu$ M dNTP, 1  $\mu$ M de chaque amorce (Beg9/R1) et 1 unité de Vent ADN polymérase (Bio Labs). Les cycles d'incubation sont identiques à ceux décrits dans le paragraphe VI.3.

#### IX.1.2. Modification de la séquence virale.

La séquence virale ainsi obtenue (Figure 14 et Figure 15, colonne 1) est digérée par l'enzyme de restriction *Nla*III : 100  $\mu$ l de produit de PCR sont mélangés à 1  $\mu$ l de BSA et 5  $\mu$ l d'enzymes de restriction (50 unités). Après 1 h à 37 °C, 5  $\mu$ l d'enzymes sont à nouveau ajoutés, le mélange est de nouveau incubé pendant 2 heures à 37 °C. Les produits de la digestion sont séparés en gel d'agarose bas point de fusion NuSieve 2,5 % (voir paragraphe VIII.).

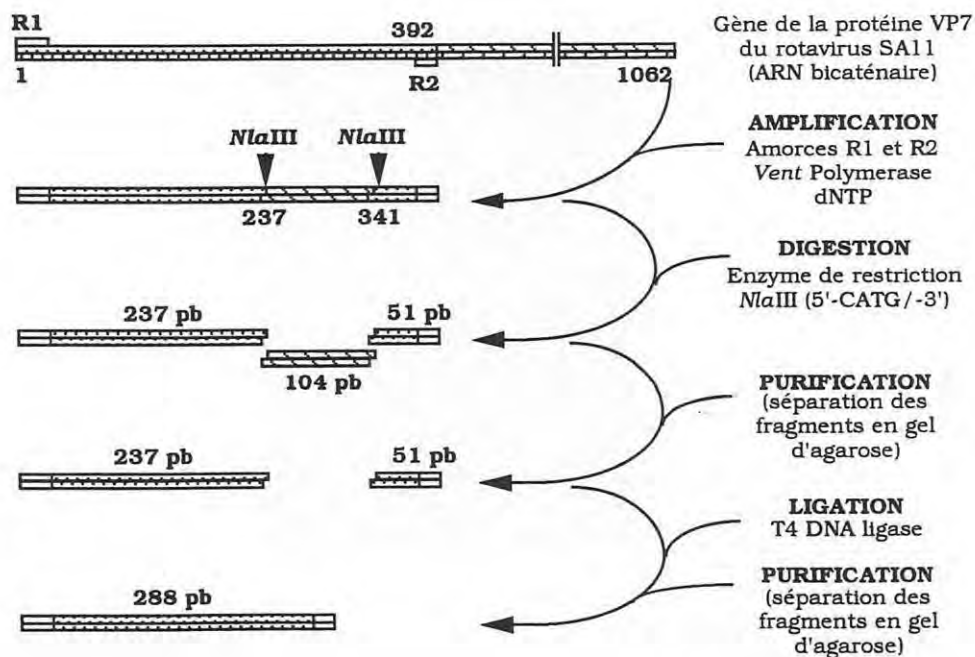


Figure 14. Présentation synoptique des étapes de construction de l'insert.

La séquence initiale de 392 pb est coupée en trois fragments (Figure 14 et Figure 15, colonne 2). La taille des fragments est en accord avec celle calculée à partir de la position des sites de restriction sur la séquence du gène de la protéine VP7 de la souche de rotavirus SA11

décrite dans GenBank (51 pb, 104 pb et 237 pb). Les fragments de 237 pb et de 51 pb sont isolés du gel d'agarose par excision. Après un rinçage à l'eau traitée au diéthyl pyrocarbonate (DEPC) (Sambrook *et al.* 1989), les deux segments d'agarose sont regroupés et mélangés à 3 ml de tampon 100 mM Tris-HCl pH 7,5 et 5 mM EDTA (tampon TE pH 7,5). L'agarose est fondue par incubation du mélange dans un bain marie à 65 °C. L'agarose liquéfiée est extraite en ajoutant 2 ml de phénol, puis en homogénéisant vigoureusement pendant 15 s et en centrifugeant pendant 3 min à 4 000 g et à 20 °C. La phase aqueuse est débarrassée des traces d'agarose par une extraction avec 2 ml de phénol, puis par une extraction avec 2 ml de phénol/chloroforme. Les traces de phénol sont éliminées par une dernière extraction avec 2 ml de chloroforme. La solution aqueuse (d'un volume final d'environ 2 ml) est mélangée à 4 ml d'éthanol absolu et 200  $\mu$ l d'acétate de sodium 3 M pH 5,2, puis incubée pendant une nuit à -20 °C. Après une centrifugation pendant 30 min à 10 000 g et à 4 °C, le culot d'acides nucléiques est lavé à l'éthanol à 70 % puis repris dans 100  $\mu$ l de tampon TE pH 7,5 (Figure 14 et Figure 15, colonne 3). La quantité d'ADN obtenue en fin de purification est estimée par mesure spectrophotométrique à 260 nm (1 unité de  $DO_{260}$  = 50  $\mu$ g/ml d'ADN).



**Figure 15. Electrophorèse en gel de polyacrylamide des produits obtenus à l'issue des différentes étapes de la construction de l'insert.**

Le génome du virus SA11 est amplifié à partir des amorces Beg9 et End9 (colonne 1). Le produit de la RT-PCR d'une taille de 392 pb est clivé par l'enzyme de restriction *NlaIII* (colonne 2). Trois fragments sont obtenus d'une taille de 237 pb, 104 pb et 51 pb. Les fragments de 237 pb et 51 pb sont purifiés (colonne 3), puis reliés entre eux. Les produits de la ligation, d'une taille de 288 pb, sont purifiés et amplifiés avec les amorces précédemment citées (colonne 5). Colonne MT : marqueur de taille VI.



Les deux fragments (337 pb et 51 pb) sont ligaturés entre eux par action enzymatique. Environ 4,1  $\mu\text{g}$  d'ADN (0,5  $\mu\text{M}$  de chaque séquence) sont mélangés à 2 000 unités de T4 ADN Ligase (Bio Labs) en tampon 1X T4 ADN Ligase (Bio Labs). La réaction de ligation est réalisée à 16 °C pendant une nuit. Le produit correspondant à la ligation des fragments (237 pb + 51pb = 288 pb) est purifié en gel d'agarose bas point de fusion et repris dans 25  $\mu\text{l}$  d'eau traitée au DEPC, comme il a été précédemment décrit. La séquence de 288 pb est de nouveau amplifiée avec la Vent ADN polymérase et les amorces Beg9 et R1 à partir de 4  $\mu\text{l}$  d'ADN purifiés dans un mélange réactionnel final de 100  $\mu\text{l}$  (Figure 14 et Figure 15, colonne 5).

La quantité d'ADN obtenue après amplification est estimée en comparant l'intensité de la fluorescence de la séquence de 288 pb avec celle d'une séquence de taille voisine en quantité connue (fragment de 298 pb du marqueur de taille VI, Boehringer Mannheim) après électrophorèse en gel de polyacrylamide et coloration au BET (Sambrook *et al.* 1989).

## **IX.2. Clonage de l'insert dans un vecteur de transcription**

### **IX.2.1. Insertion dans le plasmide**

La séquence de 288 pb obtenue après amplification est une molécule sous la forme ADN bicaténaire aux extrémités 5'OH et 3'OH (les amorces Beg9 et R1 n'ayant pas d'extrémité phosphorylée). Le clonage de cette séquence, s'est donc effectué dans un plasmide linéarisé aux extrémités phosphorylées (PCR-Script SK(+) Cloning Kit, Stratagene) (Figure 16).

Les conditions d'incubation sont les suivantes : tampon 1X PCR-Script SK(+) Cloning Kit (Stratagene), 0,5 mM ATP, 50 ng (0,002 pM) pCR-Script Amp SK (+), 34 ng (0,2 pM) d'insert, 5 unités de *SrfI* (Stratagene), 400 unités de T4 ADN Ligase (Bio Labs), volume final 10  $\mu\text{l}$ . Le mélange est incubé pendant 2 h à température ambiante puis conservé dans la glace jusqu'à son utilisation pour l'étape de transformation.

### **IX.2.2. Transformation de bactéries compétentes**

La construction plasmidique est utilisée pour transformer des bactéries (*E. coli* JM109, Promega) (Figure 16). Les bactéries compétentes conservées à -80 °C sont décongelées dans un bain de glace (5 min). La suspension bactérienne (100  $\mu\text{l}$ ) est mélangée au produit de la ligation (10  $\mu\text{l}$ ) dans un tube Falcon 2059 puis incubée 10 min dans la glace. Le tube est ensuite incubé pendant 45 sec dans un bain-marie à 42 °C puis 2 min dans la glace. Les bactéries subissent

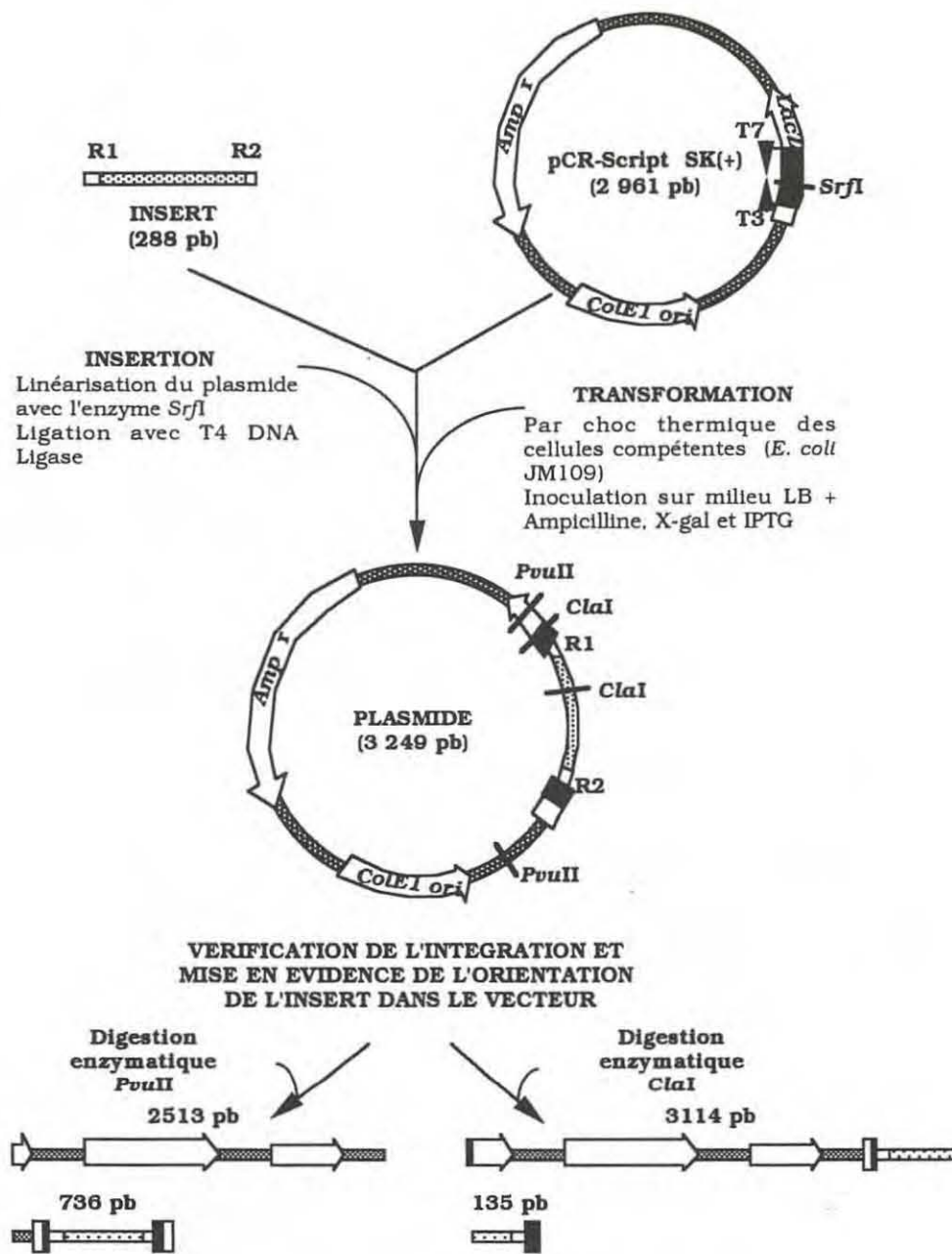


Figure 16. Présentation synoptique des étapes de clonage de l'insert dans le vecteur de transcription.

ainsi un choc thermique qui favorise la pénétration de l'ADN libre dans la bactérie. Puis les bactéries se régénèrent dans 900  $\mu$ l de milieu liquide SOC (2 % [p/v] peptone de caseine, 0,5 % [p/v] extrait de levure, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MgSO<sub>4</sub> et 20 mM glucose) sous agitation (225 tours par minute) pendant 1 h à 37 °C.

Les bactéries transformées par un plasmide sont sélectionnées sur milieu solide LB (1 % peptone de caséines, 0,5 % extrait de levure, 0,5 % NaCl, 1,5 % d'agar, pH ajusté à 7,5 avec NaOH) complété de 100  $\mu$ g/ml d'ampicilline (Sigma), 40 mg/ml d'X-Gal (Sigma), 0,5 mM IPTG (Sigma). Les boîtes sont incubées pendant 24 à 48 h à 37 °C.

Dans ces conditions, les bactéries non transformées (dépourvus du gène de résistance à l'ampicilline, Amp-) ne se multiplient pas, alors que les bactéries possédant un plasmide (Amp+) forment des colonies. Les bactéries transformées avec un plasmide recombinant ou non sont sélectionnées sur un critère de couleur de la colonie : les colonies bleues (X-Gal hydrolysé par la bêta-lactamase) correspondent à des bactéries possédant le plasmide d'origine (LacZ+), alors que les colonies blanches (X-Gal non hydrolysé, absence de la bêta-lactamase) correspondent à des bactéries transformées par le vecteur recombinant contenant l'insert (LacZ).

### IX.2.3. Extraction des plasmides recombinants (Mini-Prep)

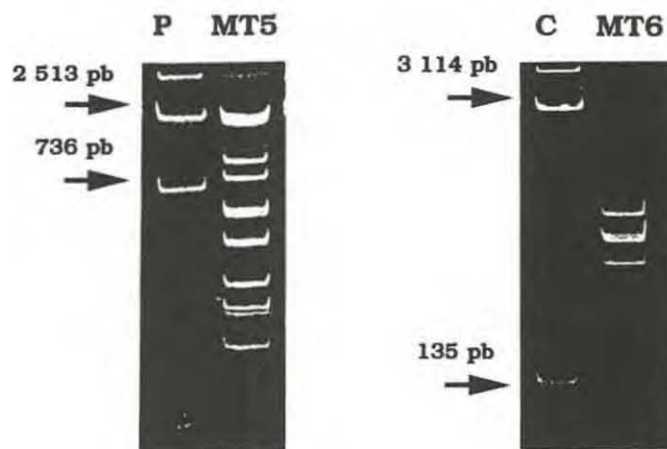
Les bactéries transformées par le vecteur recombinant sont réisolées sur milieu solide LB plus 100  $\mu$ g/ml d'ampicilline et incubées à 37 °C pour conserver la lignée bactérienne puis elles sont mises en culture dans 2 ml de milieu liquide LB contenant 100  $\mu$ g/ml d'ampicilline en tube de verre de 20 ml fermés et incubés pendant 18 h à 37 °C sous agitation vive (250 tours par minute).

Après incubation, les bactéries sont culottées dans un tube de 1,5 ml par centrifugation à 10 000 g pendant 30 sec. Le culot est remis en suspension dans 200  $\mu$ l d'une solution hypertonique (50 mM glucose, 25 mM Tris-HCl pH 8 et 10 mM EDTA), puis incubé 5 min dans la glace. Quatre cent micro-litres d'une solution de lyse (0,2 N NaOH et 1 % SDS) sont ajoutés. Le mélange est homogénéisé par retournement lent du tube puis incubé 5 min dans la glace. Les macromolécules sont précipitées par addition de 300  $\mu$ l d'acétate d'ammonium 7,5 M

et homogénéisation lente. Après 10 min dans la glace et centrifugation à 10 000 g pendant 15 min, le surnageant est récupéré dans un nouveau tube. Un volume de phénol/chloroforme est ajouté à la suspension et le mélange est centrifugé pendant 3 min à 4 000 g. Les acides nucléiques contenus dans la phase aqueuse sont précipités par 0,6 volumes d'isopropanol 2 et pendant 10 min à température ambiante. Après centrifugation à 13 000 g pendant 30 min le culot d'acide nucléique est lavé à l'éthanol à 70 %, séché, puis repris dans 50  $\mu$ l d'eau traité au DEPC.

#### IX.2.4. Orientation de l'insert dans le vecteur.

La présence de l'insert et son orientation dans le vecteur est contrôlé par digestion enzymatique du plasmide recombinant extrait par Mini-Prep. Deux enzymes de restriction ont été utilisées (Figures 16 et 17).



**Figure 17. Vérification de l'intégration et mise en évidence de l'orientation de l'insert dans le vecteur.**

Electrophorèse en gel de polyacrylamide de l'ADN plasmidique, extrait à partir d'une monoculture de cellules transformées, clivé par l'enzyme *PvuII* (colonne P), pour vérifier la présence de l'insert dans le vecteur et par l'enzyme *ClaI*, pour connaître son orientation (colonne C). Colonnes MT6 et MT5 : marqueur de taille VI et V.

L'enzyme *PvuII* (Sigma) coupe le plasmide dans 2 sites de restriction situés de part et d'autre du point d'insertion (site *SrfI*) libérant un fragment de 448 pb en l'absence d'insert ou bien un fragment de 736 pb en présence de l'insert de 288 pb. L'enzyme *ClaI* (Sigma) est utilisé pour préciser l'orientation de l'insert dans le vecteur, car un site *ClaI* est présent dans le plasmide et un dans l'insert. En fonction de l'orientation, soit un fragment de 135 pb est libéré, dans ce cas le début de l'insert complémentaire de Beg9 est proche du promoteur T7, ou bien un fragment de 241 pb est produit, si le début de l'insert est situé à proximité du promoteur T3.

Les conditions d'incubation avec les deux enzymes sont comparables : 10  $\mu$ l d'extrait plasmidique sont en tampon 1X *PvuII* ou *ClaI* (Sigma), 10 unités d'enzyme de restriction et 0,05  $\mu$ g RNase DNase free (Boeringer Mannheim) ; le volume final est de 20  $\mu$ l. Après 2 heures d'incubation à 37 °C les produits de digestion sont séparés par électrophorèse en gel de polyacrylamide, puis colorés au BET et visualisés sous lumière UV (voir paragraphe VIII).

### **IX.3. Synthèse d'ARN bicatenaire**

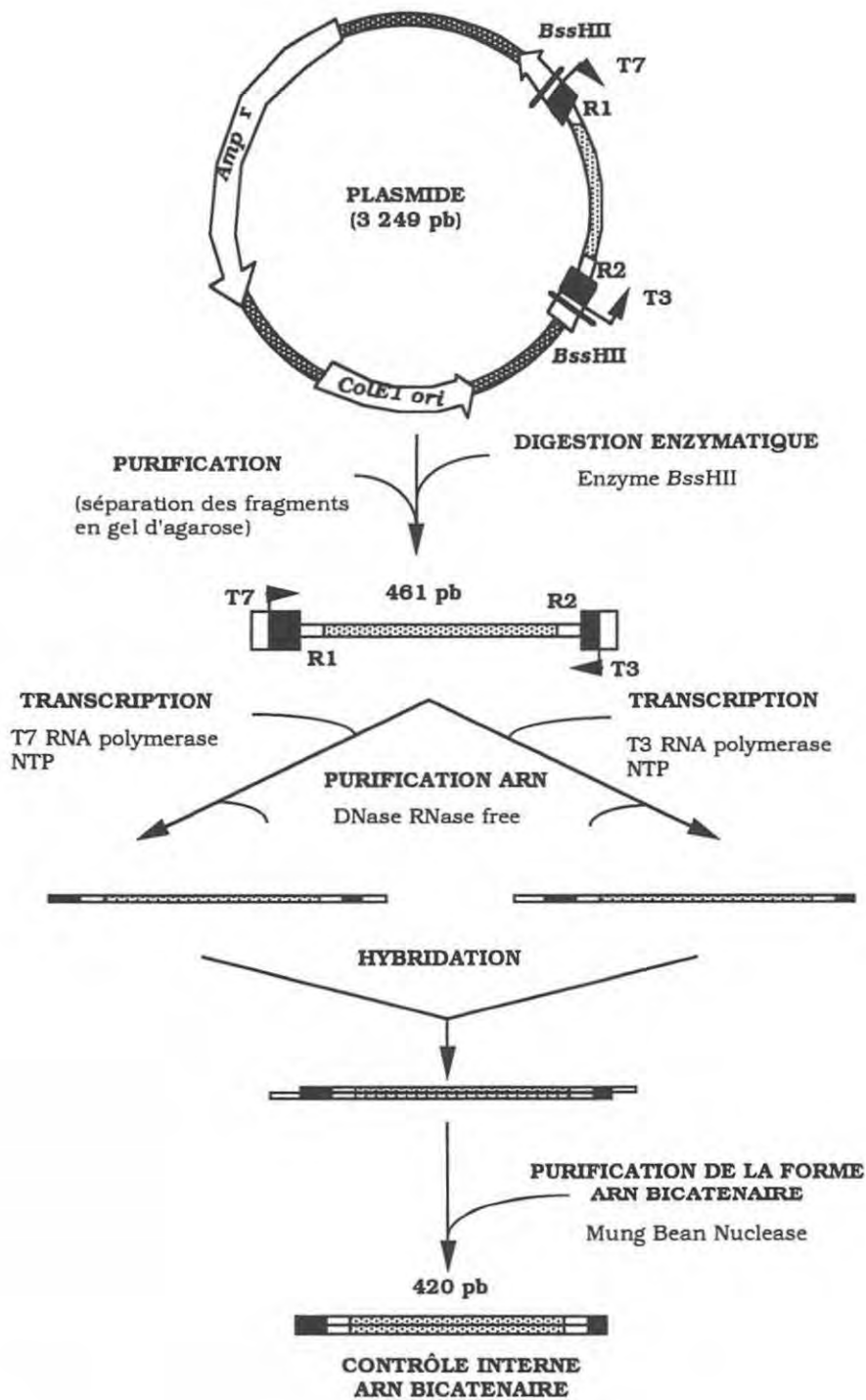
#### **IX.3.1. Isolement du fragment plasmidique à transcrire**

Le plasmide recombinant contenant l'insert est coupé par l'enzyme de restriction *BssHII* (Bio Labs) (Figure 10) : 25  $\mu$ l d'extraits plasmidiques sont incubés en tampon 1X *BssHII* (Bio Labs) et avec 8 unités d'enzymes de restriction ; le volume final est de 30  $\mu$ l. Le mélange est incubé pendant 4 h à 50 °C. Les produits de digestion sont séparés par électrophorèse en gel d'agarose à bas point de fusion (voir paragraphe VIII.). Le fragment de 461 pb correspondant à l'insert est purifié à partir du fragment d'agarose. L'ADN purifié est repris dans 25  $\mu$ l de tampon TE pH 7,5.

La quantité d'ADN obtenue après purification est estimée par électrophorèse en gel de polyacrylamide et coloration au BET en comparant l'intensité de la fluorescence de la séquence de 461 pb avec celle d'une séquence de taille voisine en quantité connue (fragment de 653 pb du marqueur de taille VI, Boehringer Mannheim).

#### **IX.3.2. Transcription en ARN monocaténaire**

Le fragment plasmidique est transcrit en ARN simple brin à partir des promoteurs de la T7 et T3 RNA polymérase qui flanque l'insert (Figure 18).



**Figure 18. Présentation synoptique des étapes de transcription du contrôle interne en ARNdb.**

Les deux réactions sont réalisées séparément dans les mêmes conditions : 0,2  $\mu\text{g}$  d'ADN sont mélangés en tampon 1X T3 (Stratagène) ou en tampon 1X T7 (Pharmacia), avec 500  $\mu\text{M}$  de chaque rNTP et 50 unités de T3 (Stratagène) ou T7 RNA polymérase (Pharmacia), puis incubés pendant 4 h à 37 °C. L'ADN plasmidique est ensuite éliminé en présence de 25 unités de DNase I RNase free (Pharmacia), pendant 1 h à 37 °C.

### IX.3.3. Hybridation des deux transcrits

Les produits des deux transcriptions sont mélangés, puis précipités en présence de 3 M d'acétate d'ammonium et de 2,5 volumes d'éthanol absolu et pendant 30 min à -80 °C. Après centrifugation à 13 000 g pendant 30 min, le culot d'ARN est lavé à l'éthanol à 70 % puis repris dans 100  $\mu$ l d'eau DEPC.

Les acides nucléiques sont dénaturés en chauffant le mélange 5 min à 95 °C puis en plongeant le tube dans un bain de glace. L'hybridation des ARN complémentaires s'effectue dans les conditions décrites par Labbé *et al.* (1994). Après addition de NaCl pour obtenir une concentration de 200 mM, le tube est incubé à 70 °C pendant 10 min puis la température est baissée lentement jusqu'à 20 °C, à raison de -1 °C toutes les 10 min à l'aide d'un incubateur programmable (thermocycleur Perkin Elmer, Cetus 6 000).

Les ARN sont de nouveau précipités en présence d'acétate d'ammonium et d'éthanol, puis repris dans 75  $\mu$ l d'eau traitée au DEPC. Les ARN simple brin et les extrémités non cohésives sont éliminés par action de la Mung Bean nucléase (BioLabs) en tampon 1X Mung Bean nucléase (BioLabs) et avec 10 unités de nucléase. Le mélange est incubé pendant 4 h à 30 °C. L'enzyme est inactivée par une extraction au phénol chloroforme et précipitation éthanolique des acides nucléiques. Le culot d'ARN bicaténaire est repris dans 100  $\mu$ l d'eau traité au DEPC.

### IX.3.4. Quantification du contrôle interne

La concentration de contrôle interne obtenu en fin de synthèse est estimée par amplification de dilutions de l'échantillon. Chacune des dilutions est analysée par RT-PCR (amorces Beg9 et R1) à 40 cycles de température (voir paragraphe VI.). Les produits d'amplification sont séparés par électrophorèse en gel de polyacrylamide puis colorés au nitrate d'argent (voir paragraphe VIII.). Le résultat, exprimé en nombre de copies amplifiables par  $\mu$ l, correspond à l'inverse de la valeur de la dernière dilution dans laquelle est détectée la séquence, par unité de volume analysé.

## X. ANALYSE DES RESULTATS DE BANQUES DE DONNEES

Les profils de restriction de 93 souches ou isolats de rotavirus du groupe A d'origine humaine ou animale sont calculés. La séquence du gène de la protéine VP7 de ces souches est décrite dans 2 banques de données (EMBL et GenBank). Seules sont retenues les séquences présentant au moins 80 % d'homologie avec les amorces Beg9, R1 et R2 utilisées pour l'amplification. Les sites de restriction sont localisés sur les différentes séquences à l'aide du serveur informatique Bisançe (Dessen *et al.*, 1990). La taille théorique des fragments, générés par les enzymes *AluI*, *RsaI*, *Sau3AI* et *TaqI* est calculée à partir de l'emplacement des sites de coupure sur la séquence (entre les nucléotides 51 et 392).

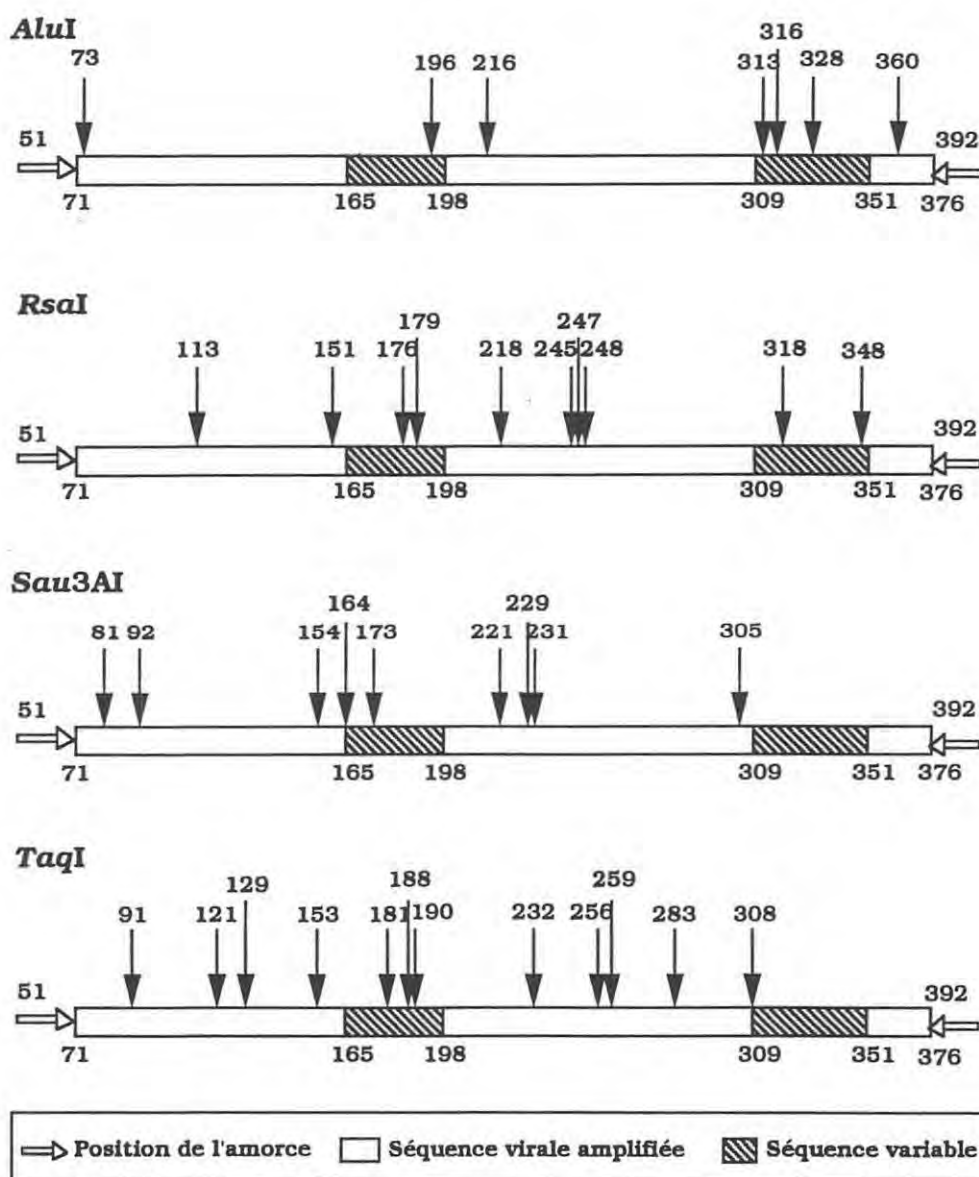


Figure 19. Localisation des sites de restriction potentiellement présents sur la séquence du gène de la protéine VP7, entre les nucléotides 71 et 376.



Quarante neuf profils différents sont identifiés à partir des 93 séquences de rotavirus décrites dans les banques de données (voir Annexe 1). Chaque enzyme de restriction peut cliver le gène de la protéine VP7 en 7 à 8 sites de restriction potentiellement présents entre les amorces utilisées pour l'amplification (Figure 19). Certains de ces sites de restriction sont situés dans des régions hypervariables, dont l'une d'elles (nucléotide 309 à 351) code pour des acides aminés impliqués dans le sérotype du virus (G type). A l'exception de 2 profils qui sont communs à la fois à des virus humains et simiens pour l'un ou bovin, porcine et simienne pour l'autre ; chacun des profils obtenus correspond à un ou plusieurs rotavirus ayant pour origine une seule espèce soit humaine, bovine, porcine, ovine, équine, murine, ou encore simienne (voir Annexe 1).

Les profils de restriction ainsi obtenus sont comparés à ceux trouvés dans les échantillons d'eaux de station ou bien dans les selles, en tenant compte de l'imprécision des mesures expérimentales. Lorsqu'une homologie complète n'est pas trouvée, le plus fort degré de similitude est recherché. Ce degré de similitude (exprimé en pourcentage) entre deux profils de restriction est calculé selon la formule suivante décrite par Kristiansen *et al.* (1984) :

$$\text{Degré de similitude} = 100 \% - (N_d \times 100) / N_s$$

avec pour paramètres:  $N_d$  = nombre de fragments différents entre les deux profils comparés,  
 $N_s$  = nombre total de fragments obtenus à partir des deux profils.

## **RESULTATS**

## **I. MISES AU POINT METHODOLOGIQUES**

Différents protocoles d'amplification du génome des rotavirus sont comparés, pour définir les conditions d'analyse les plus favorables pour la recherche de contamination dans l'environnement. L'usage d'un contrôle interne d'amplification est également étudié pour mesurer le nombre de séquences détectées dans des échantillons.

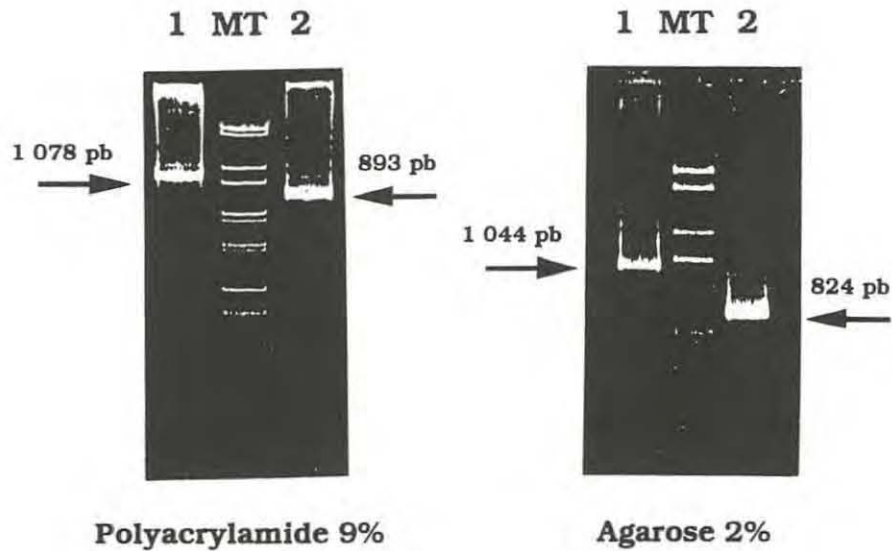
### **I.1. Optimisation de la RT-seminested PCR**

#### **I.1.1. Taille des séquences amplifiées en fonction du choix des amorces**

Les extraits d'acides nucléiques, réalisés à partir d'une suspension du virus SA11 et de selles d'enfants présentant une gastro-entérite à rotavirus, sont analysés par RT-seminested PCR. Différents couples d'amorces sont utilisés pour amplifier le gène de la protéine VP7.

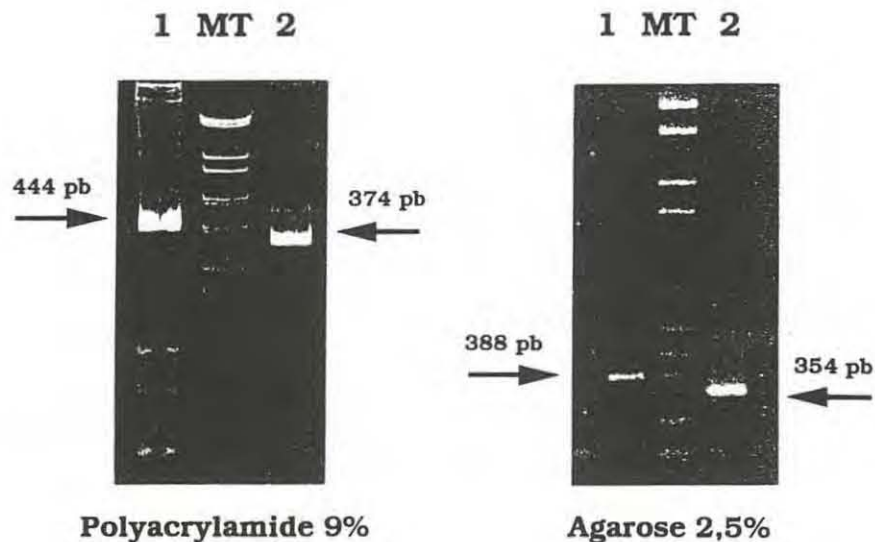
Le couple d'amorce Beg9/End9 permet d'amplifier en RT-PCR une séquence d'une taille voisine de 1062 pb (Figure 20). Un fragment d'ADN d'une taille légèrement inférieure à la longueur théorique de 934 pb est obtenu par seminested PCR avec le couple d'amorces Beg/R0 (Figure 20). Lorsque l'amorce R1 est utilisée avec l'amorce Beg9, une séquence est amplifiée d'une taille voisine de la longueur théorique de 392 pb (Figure 21). La seminested PCR effectuée avec R1 et R2 permet d'amplifier une séquence d'environ 342 pb (Figure 21).

La mobilité de l'ADN amplifié par rapport à celle des fragments du marqueur de taille est moins importante en gel de polyacrylamide que celle en gel d'agarose. La taille des molécules d'ADN amplifiées est généralement surestimée en gel de polyacrylamide, par rapport à la longueur théorique (calculée à partir de l'alignement des séquences des amorces avec la séquence du gène de la protéine VP7 du virus SA11). Les longueurs estimées à partir des gels d'agarose sont plus proches de la longueur théorique. De plus, la longueur des séquences amplifiées calculée par électrophorèse en gel de polyacrylamide varie parfois en fonction de la souche virale à l'origine des extraits d'acides nucléiques. Par contre en gel d'agarose, la mobilité des séquences amplifiées à partir des extraits de différentes origines est identique.



**Figure 20. Amplification du gène de la protéine VP7 du virus SA11 avec les amorces Beg9, End9 et R0.**

Les ARN sont extraits à partir d'une suspension de virus SA11 puis soumis à amplification. Les produits de la réaction sont analysés par électrophorèse en gel de polyacrylamide et d'agarose. Colonnes 1 : Produits de la RT-PCR utilisant les amorces Beg9 et End9. Colonnes 2 : Produits de seminested PCR utilisant les amorces Beg9 et R0. Colonnes MT : marqueur de taille VI. Les tailles des séquences sont calculées à partir de leur mobilité, dans le gel correspondant, par rapport aux fragments du marqueur de taille.



**Figure 21. Amplification du gène de la protéine VP7 du virus SA11 avec les amorces Beg9, R1 et R2.**

Les produits de RT-PCR et Seminested PCR sont analysés par électrophorèse en gels de polyacrylamide et d'agarose. Colonnes 1 : Produits de la RT-PCR utilisant les amorces Beg9 et R1. Colonnes 2 : Produits de seminested PCR utilisant les amorces R1 et R2. Colonnes MT : marqueur de taille VI. Les tailles des séquences sont calculées à partir de leur mobilité, dans le gel correspondant, par rapport aux fragments du marqueur de taille.

## I.1.2. Sensibilité de la RT-seminested PCR

### I.1.2.1. Etude de sensibilité en fonction du choix des amorces

La sensibilité des deux méthodes d'amplification est comparée. Une série de dilutions de la souche de rotavirus simien SA11 est réalisée de  $1,8 \cdot 10^6$  ff/ml à 1,8 ff/ml. Les acides nucléiques sont extraits pour chaque dilution, puis analysés par RT-seminested PCR (le DMSO est utilisé comme agent dénaturant).

Après coloration au BET, l'amplification d'une séquence par Beg9 et End9 n'est décelable qu'à partir de l'extrait obtenu avec la dilution  $1,8 \cdot 10^6$  ff/ml. En seminested PCR, le couple d'amorce Beg9 et R0 n'améliore pas ce résultat. En revanche, l'amplification effectuée avec Beg9 et R1 permet d'obtenir une réaction positive avec l'extrait correspondant à la dilution  $1,8 \cdot 10^5$  ff/ml. La seminested PCR accomplie avec R1 et R2 augmente la sensibilité de détection qui atteint  $1,8 \cdot 10^4$  ff/ml. Les amorces Beg9, R1 et R2 sont retenues pour effectuer la recherche d'ARN viraux par RT-seminested PCR.

### I.1.2.2. Effets de la dénaturation sur la sensibilité de la RT PCR

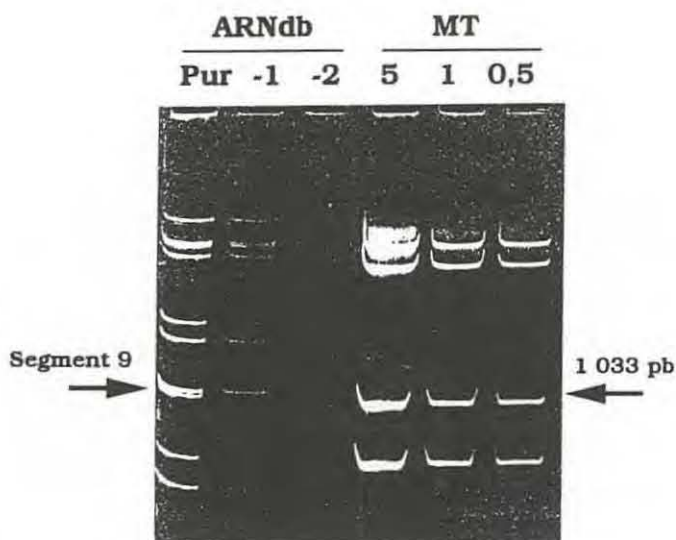
Deux techniques de dénaturation des ARNdb au moment de la rétrotranscription sont utilisées. Leurs effets sur la sensibilité de la RT-PCR sont comparés.

La sensibilité de l'analyse est 10 fois supérieure lorsque l'HMM est utilisé par rapport à l'emploi du DMSO. Ce résultat est confirmé lorsque la concentration en DTT est uniformisée à 60 mM pour les deux réactions. La sensibilité est alors de  $1,8 \cdot 10^4$  ff/ml en RT-PCR et elle est accrue à  $1,8 \cdot 10^3$  ff/ml avec la seminested PCR. L'HMM est donc retenu pour les expériences qui sont décrites.

### I.1.2.3. Expression de la sensibilité en nombre de copies d'ARNdb

Une seconde étude de sensibilité est effectuée à partir d'une quantité d'ARNdb connue. Les ARNdb présents dans des selles contenant des rotavirus sont extraits puis purifiés sur cellulose granulaire. La quantité d'ARNdb présente dans l'extrait est estimée par électrophorèse en gel de polyacrylamide et coloration au BET, en comparant l'intensité des bandes à celles

d'un marqueur de taille dont la concentration en acides nucléiques est connue (DNA molecular-weight marker VI, Boehringer Mannheim) (Figure 22). La concentration d'ARN dans l'extrait est estimée à environ  $4,5 \mu\text{g/ml}$  d'ARNdb, ce qui correspond à  $2,3 \cdot 10^{11}$  copies de génome/ml. Cet extrait est dilué dans de l'eau DEPC et chaque dilution est analysée par RT-seminested PCR.



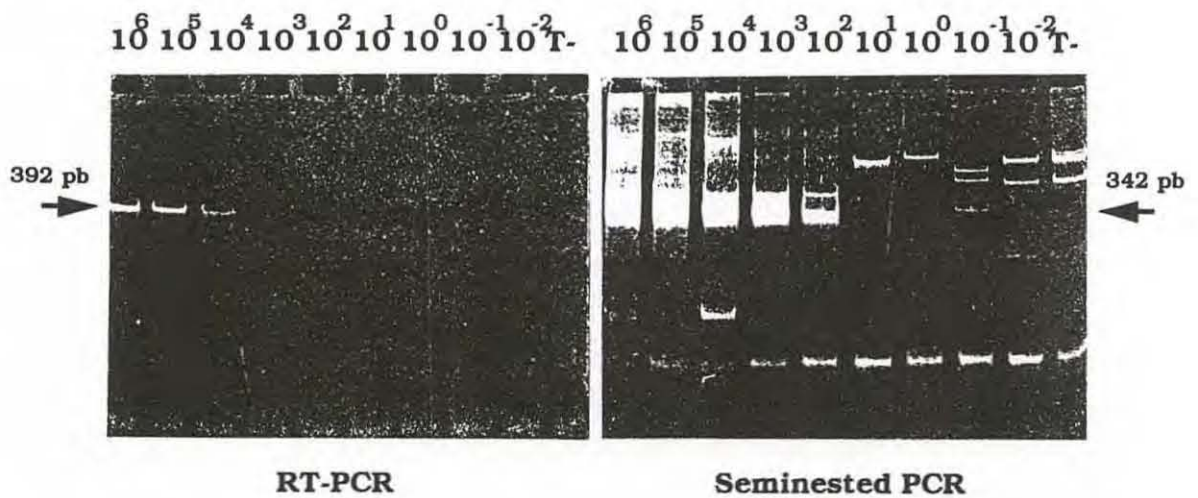
**Figure 22. Quantification des ARNdb par électrophorèse.**

L'ARN viral est extrait à partir des selles d'un enfant, puis purifiés sur cellulose. L'extrait pur et des dilutions au 1/10 et 1/100 sont analysés (dépôt de  $10 \mu\text{l}$ ) par électrophorèse en gel de polyacrylamide et coloration au BET (respectivement colonnes Pur à -2). L'intensité de la coloration du segment 9 est comparée à celle du fragment de 1 033 pb du marqueur de taille VI. Colonnes 5 à 0,5 : dépôts de respectivement 5 à 0,5 fois  $0,25 \mu\text{g}$  d'ADN.

Dans l'extrait pur, le segment 9 a une intensité 5 fois moins importante que la séquence de 1 033 pb dans le dépôt de  $0,125 \mu\text{g}$  d'ADN total. Cette séquence représente 10,52% de la masse totale, soit  $0,013 \mu\text{g}$  d'ADN ou encore à  $1,2 \cdot 10^{10}$  copies. Le segment 9 correspond donc à environ 1/5 du nombre de copies soit  $2,3 \cdot 10^9$  copies pour  $10 \mu\text{l}$ , ou à environ  $2,6 \text{ ng}/10\mu\text{l}$ . Extrapolé à l'extrait total, cela représente  $4,5 \mu\text{g}$  d'ARN/ml.

La réaction est positive en RT-PCR jusqu'à la dilution qui contient environ  $45 \text{ pg/ml}$  d'ARNdb ou encore à environ  $2 \cdot 10^6$  copies/ml (Figure 23). En seminested PCR, un signal d'amplification est décelable jusqu'à la dilution  $10^{-6}$  contenant environ  $4,5 \text{ pg/ml}$  d'ARNdb, ce qui équivaut à  $2 \cdot 10^5$  copies/ml (Figure 23).

La sensibilité de la RT-PCR et de la seminested est respectivement 5 000 et 50 000 fois supérieure à celle de la détection des ARN viraux (11 segments ARNbd de rotavirus) en gel de polyacrylamide coloré au BET (Figures 22 et 23).



**Figure 23. RT-seminested PCR sur des dilutions d'ARN viral de concentration connue.**

Les dilutions logarithmiques de l'extrait précédemment décrit (Figure 4) sont analysées ( $2\mu\text{l}$  d'échantillon) par RT-seminested PCR. Les produits d'amplification sont analysés par électrophorèse en gel de polyacrylamide et coloration au BET. Colonnes  $10^6$  à  $10^{-2}$ : produits des réactions d'amplifications réalisées à partir des dilutions, contenant respectivement de  $4,6 \cdot 10^6$  à  $4,6 \cdot 10^2$  copies/ $2\mu\text{l}$ . Colonnes T- : témoin négatif (de l'eau est analysée par RT-seminested PCR).

En RT-PCR, jusqu'à  $4,6 \cdot 10^3$  copies initiales permettent d'obtenir une réaction positive. La seminested PCR augmente la sensibilité et permet d'observer une séquence amplifiée à partir de  $4,6 \cdot 10^0$  copies.

#### I.1.2.4. Effet de la purification des acides nucléiques sur la sensibilité

L'effet sur la sensibilité de détection de deux méthodes de purification est évalué. Des extraits d'acides nucléiques, réalisés à partir de dilutions contenant de  $1,8 \cdot 10^4$  à  $1,8 \cdot 10^2$  ff/ml sont purifiés par adsorption sur cellulose granulaire (CC41) et filtration sur gel (Sephadex G150), puis analysés par RT-seminested PCR. A l'issue de la première amplification enzymatique, une séquence de 392 pb est visible pour l'extrait purifié sur CC41 qui correspond à la dilution  $1,8 \cdot 10^4$  ff/ml, alors que la séquence virale est faiblement amplifiée à partir du même extrait purifié sur Sephadex G150. En seminested PCR, la sensibilité est accrue d'un facteur 10 dans les deux cas et correspond à celle mesurée avant purification (sensibilité  $1,8 \cdot 10^3$  ff/ml). Il y a peu de différence dans l'intensité de l'amplification des deux produits de purification. Toutefois, la purification sur cellulose fournit des résultats plus réguliers que celle effectuée sur gel filtration.

#### I.1.2.5. Sensibilité de la RT-seminested PCR sur des prélèvements de coquillages

Un lot de coques ne donnant pas de réaction positive par RT-seminested PCR est contaminé artificiellement (injection de la dilution virale dans l'hépatopancréas) par du rotavirus simien SA11 de titre connu. La concentration virale dans les coquillages varie de  $1,3 \cdot 10^7$  à  $1,3 \text{ ff}/25 \text{ g}$  de chair. Après 2 h d'incubation à  $4 \text{ °C}$ , les virus sont élués puis précipités et les acides nucléiques sont extraits. Aucun échantillon ne donne de réaction positive par RT-seminested PCR. La RT-PCR réalisée à partir des acides nucléiques purifiés sur cellulose granulaire ne permet pas de distinguer de produits d'amplification. En revanche, la seminested PCR est positive avec les extraits qui correspondent aux dilutions contenant au moins  $1,3 \cdot 10^4 \text{ ff}/25 \text{ g}$  de chair.

### **I.2. Développement de la RT-PCR semi-quantitative**

La recherche de contaminations par amplification génique telle que nous l'avons décrite ne procure que des résultats qualitatifs : absence ou présence d'ARN viral. Ce paragraphe présente les développements méthodologiques pour permettre la quantification des ARNdb viraux par RT-PCR.

#### I.2.1. Amplification du contrôle interne

Lorsque le contrôle interne obtenu en fin de synthèse est analysé par RT-PCR, une séquence est très fortement amplifiée. Les couples d'amorces Beg9/R1 et R1/R2, permettent d'obtenir des séquences plus courtes que celles synthétisées à partir du gène viral (Figure 24, Tableau 5).

En revanche en l'absence de rétrotranscription ou bien sans étape de dénaturation à l'HMM, aucune séquence amplifiée avec les amorces Beg9 et R1 n'est visible après électrophorèse en gel de polyacrylamide et coloration au BET. Une séquence est très faiblement amplifiée dans les deux cas après une seconde réaction d'amplification (seminested PCR) avec les amorces R1 et R2.



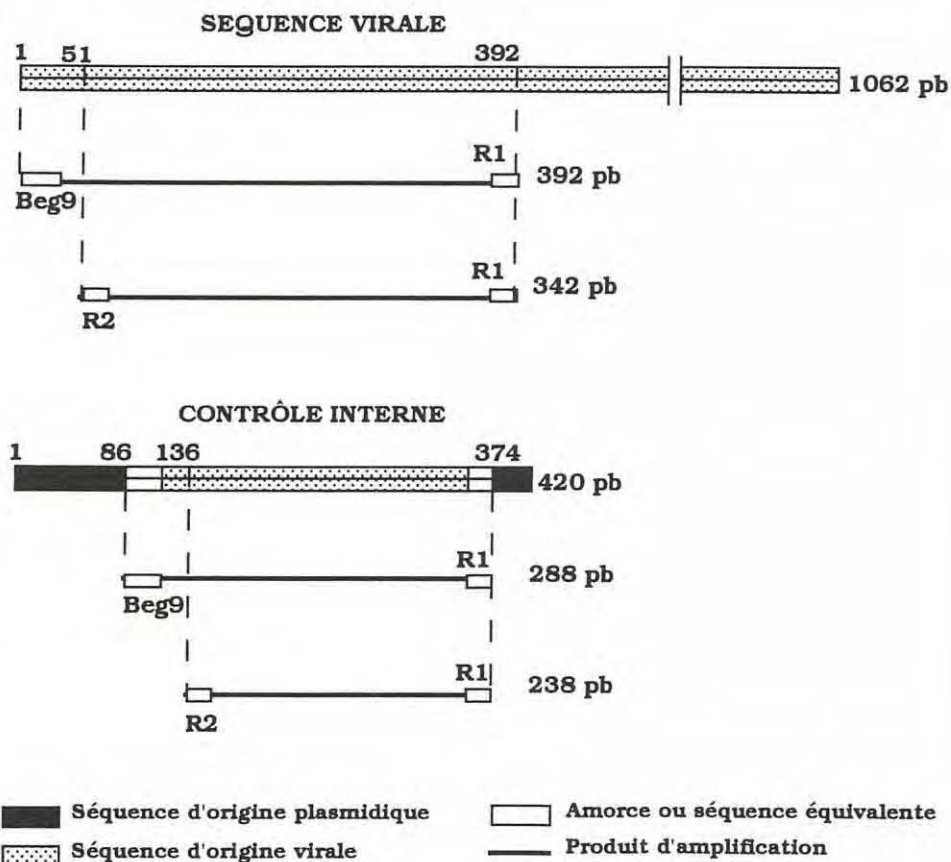
**Tableau 5. Taille des séquences amplifiées à partir du génome du virus SA11 et à partir du contrôle interne.**

Séquence amplifiée	RT-PCR			Seminested PCR		
	Taille attendue	Taille estimée <sup>a</sup>		Taille attendue	Taille estimée <sup>a</sup>	
		Agarose	Polyacrylamide		Agarose	Polyacrylamide
SA11	392 <sup>b</sup>	388	444	342 <sup>b</sup>	354	374
Contrôle Interne	288 <sup>c</sup>	279	396	238 <sup>c</sup>	241	218

<sup>a</sup> Les tailles (en paires de bases) des séquences amplifiées sont calculées à partir de leur mobilité, lors d'électrophorèses en gel d'agarose à 2,5 % ou de polyacrylamide à 9 %, comparée à la mobilité des fragments du marqueur de taille.

<sup>b</sup> La longueur théorique (en paires de bases) du fragment amplifié est obtenue à partir de la séquence du virus SA11 décrite dans les banques de données (numéro d'accès : V01546)

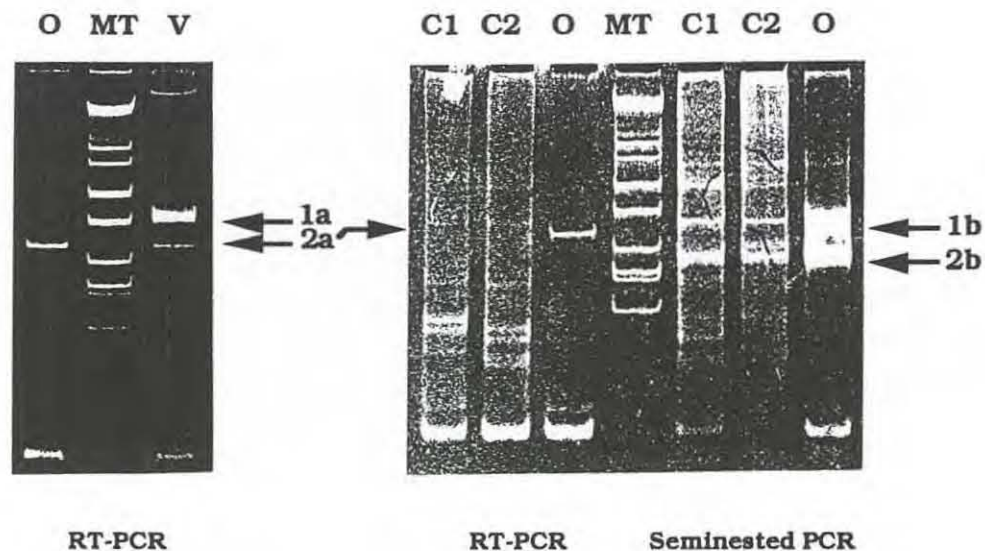
<sup>c</sup> La longueur théorique (en paires de bases) est calculée en tenant compte des étapes de délétion et de ligation de la séquence du virus SA11 employées lors de la construction du contrôle interne.



**Figure 24. Comparaison de la structure du contrôle interne avec celle du gène de la protéine VP7 (virus SA11).**

### 1.2.2. Amplification concomitante du contrôle interne et de l'ARN viral

Le contrôle interne est mélangé à des extraits d'acides nucléiques contenant des séquences virales, puis le mélange est analysé par RT-semi-nested PCR (Figure 25). Les amorces Beg9 et R1 permettent l'amplification simultanément des deux séquences. Après électrophorèse les deux produits d'amplification sont distincts (Figure 25).

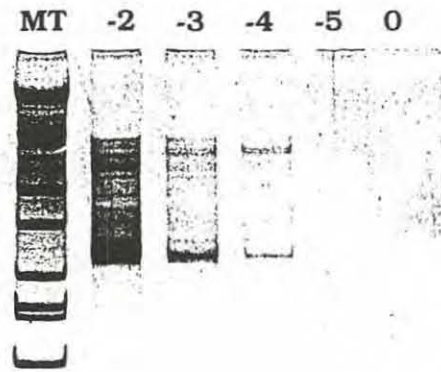


**Figure 25** Amplification de l'ARN viral concomitante à celle du contrôle interne dans des extraits.

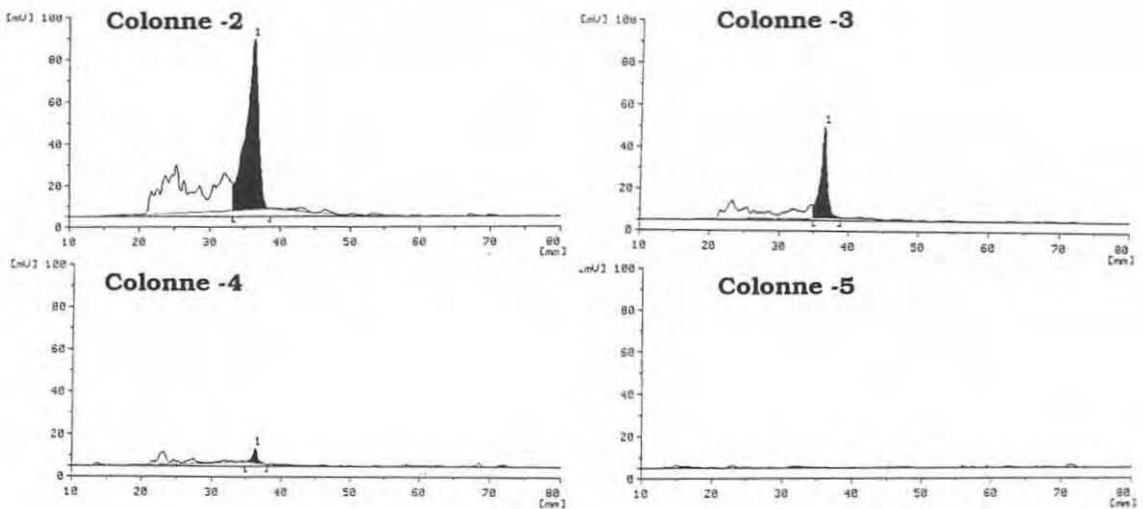
Le contrôle interne est dilué (concentration finale d'environ 5 copies/ $\mu$ l) dans des extraits d'acides nucléiques obtenus à partir d'une suspension de virus SA11 (colonne V) et de coquillages (colonnes C1 et C2). Les extraits sont analysés par RT-PCR et RT-semi-nested PCR pour les extraits de coquillages. Colonnes O : contrôle interne dilué dans l'eau. Colonne MT : marqueur de taille VI. Les flèches 1a et 1b indiquent respectivement la position des séquences amplifiées en RT-PCR et semi-nested PCR à partir de l'ARN viral ; les flèches 2a et 2b celles amplifiées à partir du contrôle interne.

En semi-nested PCR (amorces R1 et R2), les deux séquences sont également amplifiées. Toutefois, l'excès de matrices (ADN de première PCR) conduit à l'apparition de séquences de tailles plus importantes. Dans le cas d'un excès d'ADNc de contrôle interne, il apparaît des séquences surnuméraires dont la taille est proche de la séquence d'origine virale obtenue en semi-nested PCR (Figure 25). Cette situation peut conduire à la confusion des séquences synthétisées à partir du contrôle interne avec celles qui ont pour origine le génome viral.

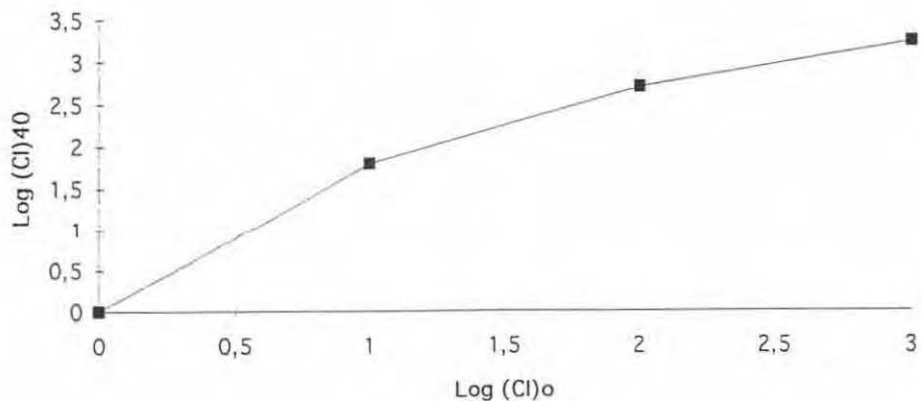
A.



B.



C.



**Figure 26. Titrage du contrôle interne par RT-PCR de dilutions limites et analyse densitométrique.**

A : Des dilutions logarithmiques du contrôle interne sont réalisées. Les dilutions de  $10^{-2}$  à  $10^{-5}$  (respectivement colonnes -2 à -5) sont analysées par RT-PCR, puis les produits d'amplification sont séparés par électrophorèse en gel de polyacrylamide et colorés au nitrate d'argent. Colonne 0 : témoin négatif d'amplification. Colonne MT marqueur de taille VI.

B : Chaque colonne du gel est analysée par un densitomètre qui convertit l'intensité des signaux lumineux qui traversent le gel, en variation électrique. Les courbes sont obtenues en continu et indiquent le niveau de tension électrique en fonction de la distance par rapport au point de dépôt.

C : La surface des pics, correspondant aux séquences amplifiées de 288 pb, est calculée. La valeur est reportée en fonction du nombre de copies amplifiables. En considérant que la dernière dilution positive ( $10^{-5}$ ) est à la concentration de 1 séquence amplifiable en RT-PCR/ $2\mu\text{l}$ .

### I.2.3. Quantification densitométrique des produits d'amplification

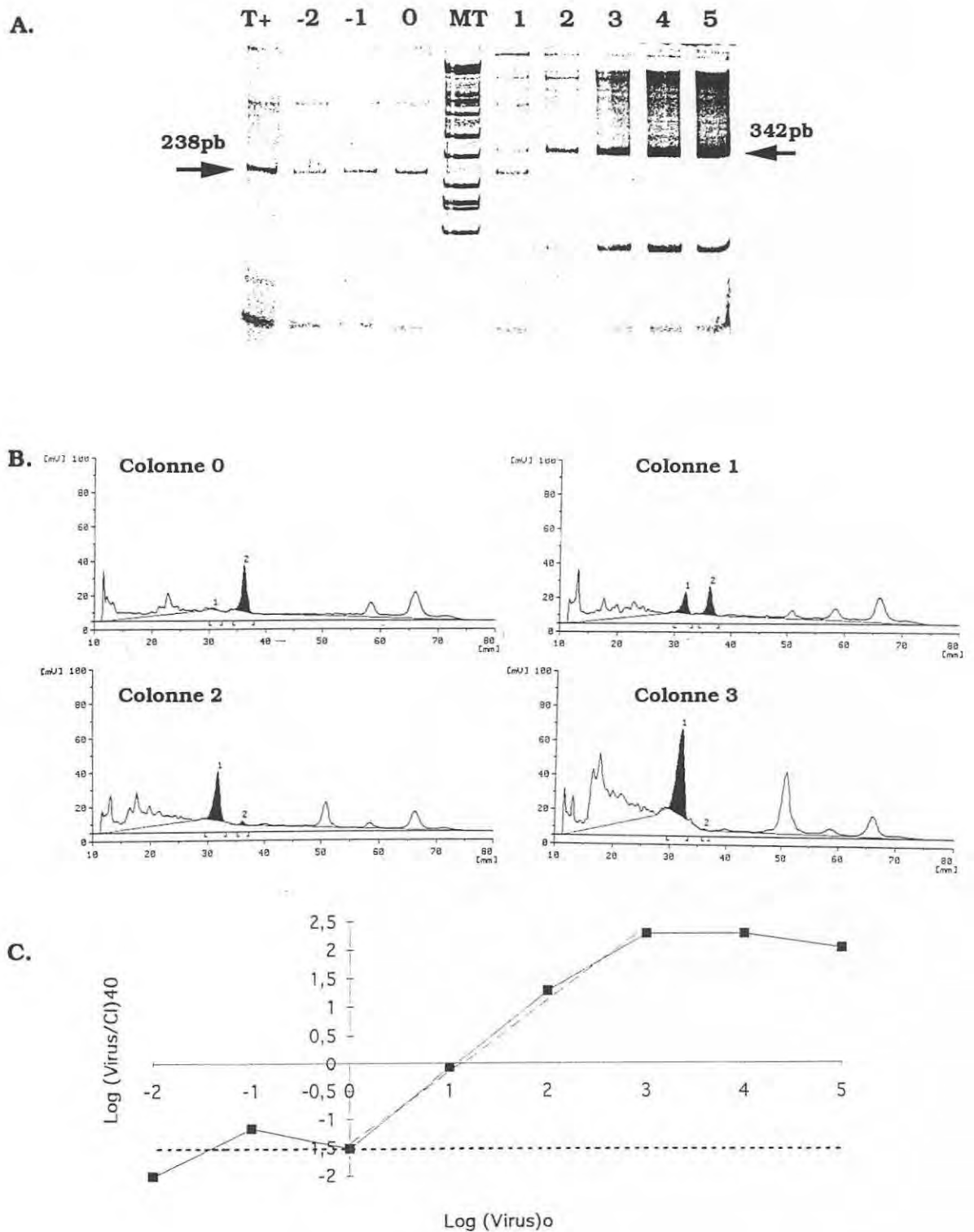
Des dilutions logarithmiques du contrôle interne sont analysées par RT-PCR. A la dernière dilution positive en RT-PCR ( $10^{-4}$ ) est attribuée la concentration minimale de 1 copie amplifiable par  $\mu\text{l}$  (Figure 26 A). Les gels de polyacrylamide colorés au nitrate d'argent sont analysés par densitométrie. Pour chaque échantillon, la courbe obtenue présente un pic de polarisation correspondant au produit d'amplification (Figure 26 B). La surface du pic est calculée par intégration entre le point d'inflexion qui le précède et celui qui le suit.

Le logarithme décimal de la surface varie en fonction de la quantité de contrôle interne analysée (Figure 26 C). Lorsque plus de 10 000 copies sont amplifiées, la courbe s'infléchit jusqu'à atteindre un seuil maximal. La principale limite de cette analyse est l'erreur d'interprétation des résultats obtenus avec une trop forte concentration d'ADN due à une saturation de la coloration au nitrate d'argent.

### I.2.4. RT-PCR compétitive entre le génome viral et le contrôle interne

Le contrôle interne est utilisé lors de réactions compétitives d'amplification avec le génome du rotavirus SA11 (Figure 27 A). Pour une quantité constante de contrôle interne (10 copies/ $\mu\text{l}$ ) mélangée à des quantités croissantes de virus (de 1 à 1 000 000 copies/ $\mu\text{l}$ , concentration calculée par analyse en RT-PCR de dilutions logarithmiques), le seuil de détection en RT-PCR du virus est diminué d'un facteur 10 à 100. Réciproquement, le contrôle interne n'est plus amplifié lorsque la concentration en séquence virale est 100 fois supérieure.

L'analyse densitométrique fait apparaître deux pics dont les surfaces évoluent inversement en fonction de la quantité d'ARN viral initiale (Figure 27 B). Le rapport entre les deux surfaces est calculé, puis il est comparé au nombre de copies d'ARN viral initial. Pour des quantités d'ARN viral variant de 1 à 1 000 copies, le rapport est proportionnel au nombre de copies virales (Figure 27 C). Dans ces conditions, la comparaison des rapports d'amplification du génome viral et du contrôle interne est suffisante pour comparer le nombre de copies d'ARN viral présentes dans des échantillons.



**Figure 27. RT-PCR compétitive entre le génome viral et le contrôle interne.**

A: Une quantité constante de contrôle interne (concentration finale 10 copies amplifiables dans 2  $\mu$ l) est introduite dans des dilutions d'ARN de virus SA11. Colonnes -2 à 5 correspondent respectivement aux dilutions contenant de  $10^2$  à  $10^5$  copies virales dans 2  $\mu$ l. Les produits d'amplification obtenus à partir des mélanges sont analysés en électrophorèse et coloration au nitrate d'argent. Colonne T+: contrôle interne sans ARN viral. Colonne MT: marqueur de taille VI.

B. Analyse densitométrique des colonnes 0 à 3. Le pic 1 correspond au produit d'amplification d'origine viral (342 pb); le pic 2 à celui du contrôle interne (238 pb).

C. L'interprétation graphique indique la valeur du rapport, entre la surface du pic 1 et celle du pic 2, en fonction du nombre de copies d'ARN viral analysées (le coefficient de détermination [r<sup>2</sup>] de la droite de régression est égale à 0,994). La droite en pointillé, parallèle à l'axe des abscisses, représente la valeur minimale du rapport, obtenue à partir de la colonne T+.

## II. ETUDE *IN VITRO* SUR LA STABILITE DES ROTAVIRUS DANS L'EAU DE MER

la relation entre la détection du génome viral par RT-PCR et la mise en évidence du pouvoir infectieux sur cultures de cellules est étudiée, ainsi que les risques d'identification d'ARN viraux nus par rapport à la détection de virions. L'objectif de ces travaux est d'apporter des éléments permettant l'interprétation, sur le plan du risque sanitaire, de la détection par RT-PCR de contamination dans l'environnement.

### II.1. Stabilité du génome viral et du pouvoir infectieux

L'évolution du pouvoir infectieux du rotavirus SA-11 complet ainsi que la stabilité de son génome sont suivis en eau de mer naturelle et artificielle, à 20 °C et 6 °C.

#### II.1.1. Suivi en eau de mer artificielle

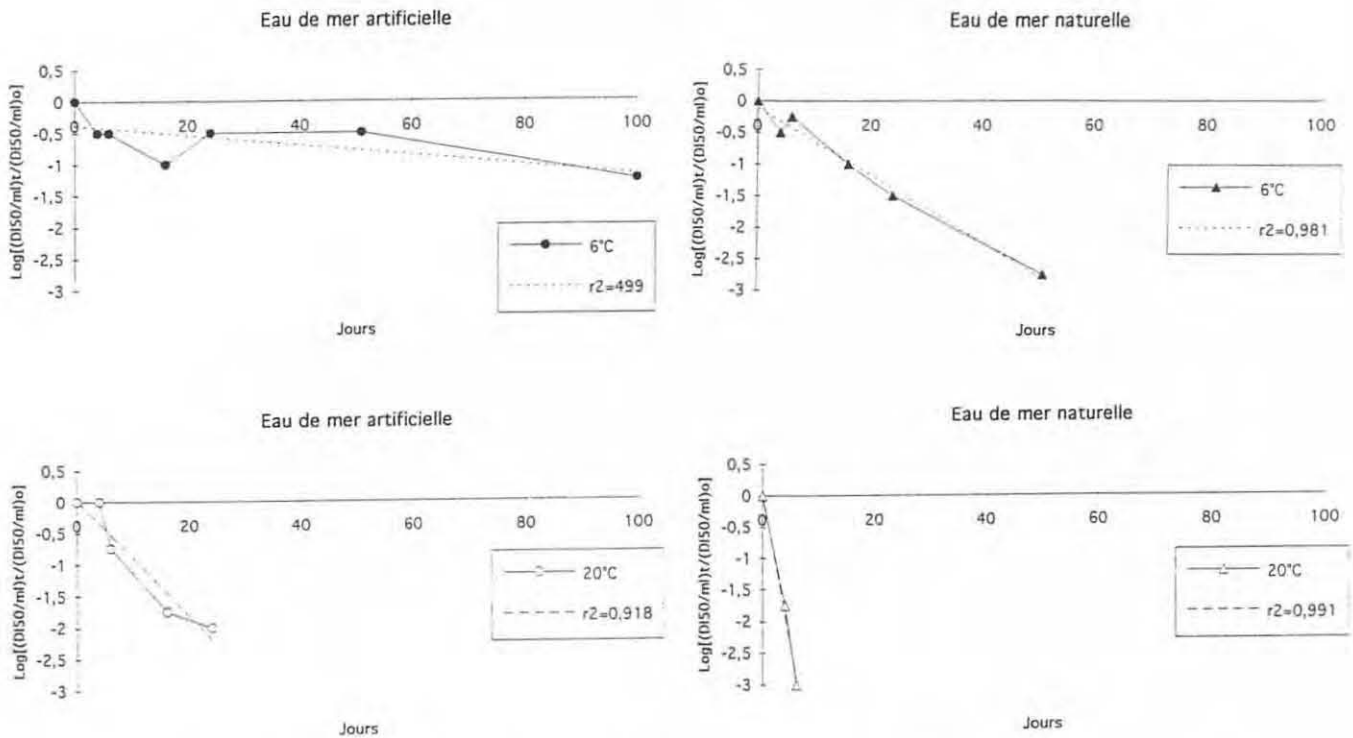
Les eaux de mer artificielles stériles incubées aux deux températures contiennent au début de l'expérience un nombre de virus égal à  $5 \cdot 10^4$  DI50/ml. A 6 °C, le nombre de virus infectieux varie peu en fonction du temps (Figure 28, Annexe 2). Après 100 jours le titre infectieux est de  $2,8 \cdot 10^3$  DI50/ml. Le temps nécessaire pour inactiver 90 % des virus (T90) est estimé à partir de la droite de régression. La valeur du T90 obtenue est de 126 jours avec une incertitude de plus ou moins 39 jours (Tableau 6).

**Tableau 6. Temps nécessaire pour voir diminuer le titre viral et la proportion d'ARN viral de 90 pour cent.**

Conditions d'incubation	Eau artificielle		Eau naturelle	
	6 °C	20 °C	6 °C	20 °C
T90 (titre viral) <sup>a</sup>	126+/- 39	11+/-2	19+/-1	2+/-0,2
T90 (ARNdb) <sup>a</sup>	N.C.	N.C.	57+/-10	16+/-2

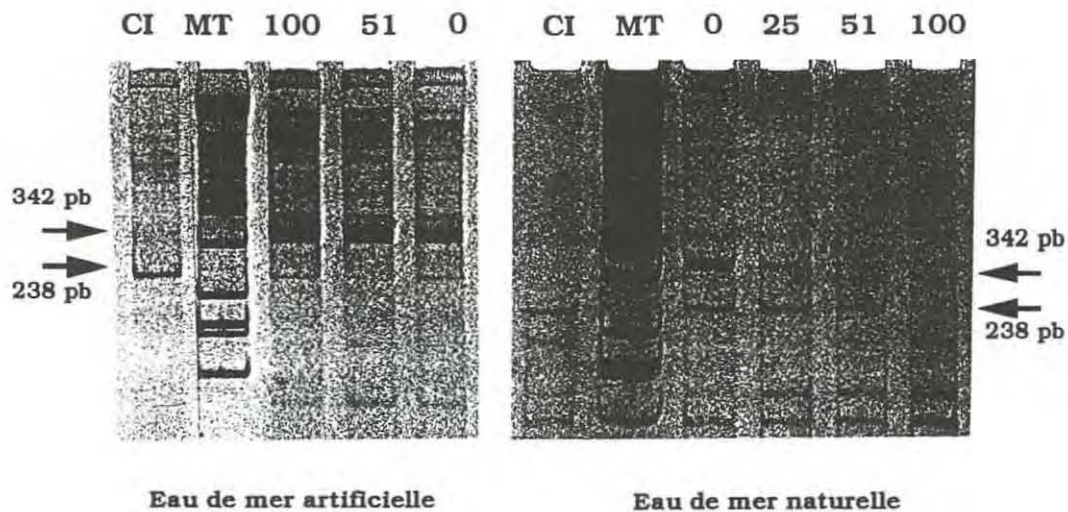
<sup>a</sup> Le temps nécessaire pour voir diminuer de 90 % les différentes mesures en fonction du temps est estimé à partir de la pente des droites de régressions ( $y = Ax + B$ ), pour lesquelles il est également précisé l'erreur sur la pente ( $a'$ ). La valeur est égale à :  $T90 = -1/A$  (résultats exprimés en jours). L'incertitude sur cette valeur du T90 ( $t'$ ) est égale à :  $t' = 1/(A + a') - 1/A$ .

En revanche le virus est plus rapidement inactivé lorsqu'il est incubé à 20 °C (Figure 28, Annexe 2). Après 100 jours d'incubation à cette température, le nombre de virus infectieux atteint le seuil de sensibilité. Le calcul du T90 de 11 jours révèle que l'inactivation du virus est environ 10 fois plus rapide à 20 °C qu'à 6 °C (Tableau 6).



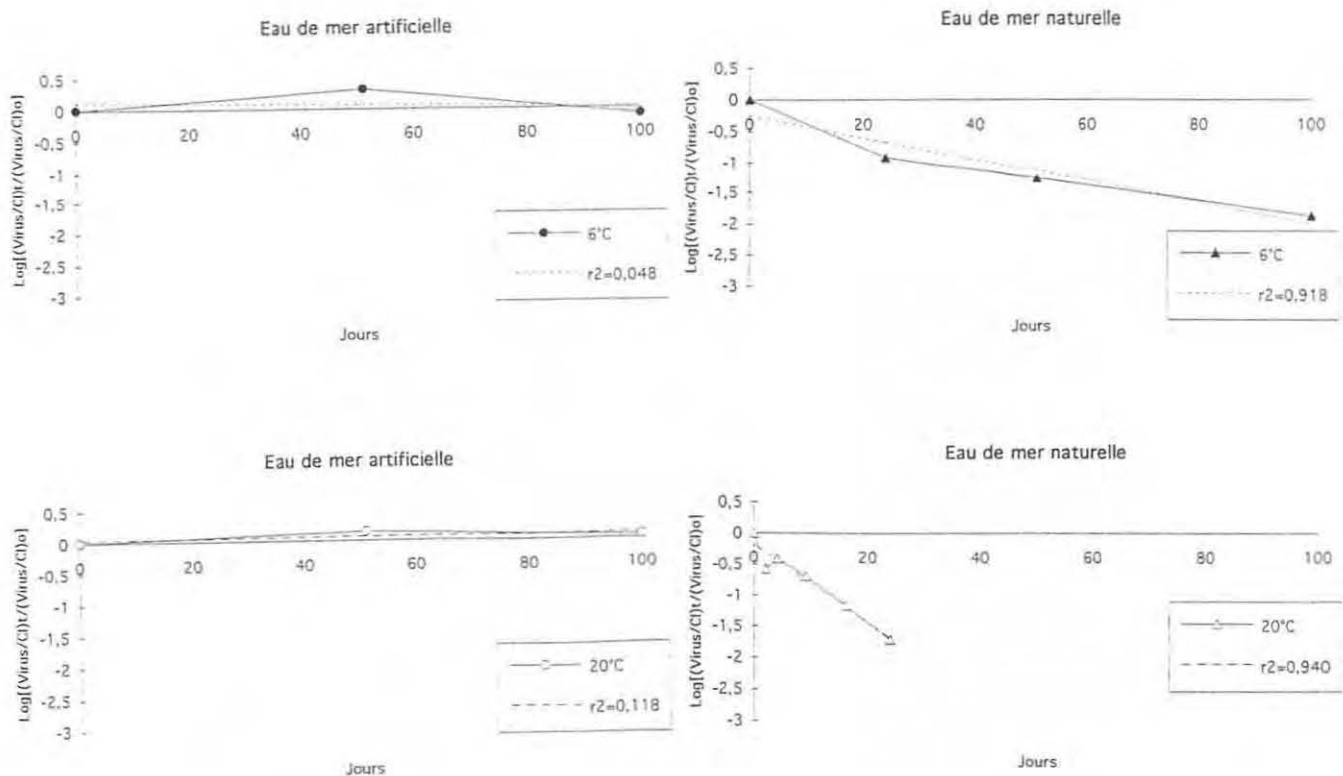
**Figure 28. Inactivation du virus SA11 en eau de mer artificielle et naturelle.**

La recherche et la quantification des ARN viraux effectuée à partir de trois prélèvements (prélèvement initial, après 51 et 100 jours d'incubation) d'eau à 6°C comme à 20 °C montre que le génome viral est présent pendant toute l'expérience (Figures 29 et 30, Annexe 3). Le rapport entre le nombre de copies amplifiées à partir de l'ARN viral et du contrôle interne reste relativement constant dans le temps (Figures 29 et 30, Annexe 3). La pente des droites de régression est trop faible pour tirer de ces analyses des valeurs précises de T90 (temps nécessaire pour réduire de 90 % la valeur du rapport d'amplification entre l'ARN viral et le contrôle interne). Toutefois, ces droites montrent une stabilité du nombre de copies d'ARN viraux, au moins pendant 100 jours d'incubation dans l'eau de mer artificielle à 6 ou 20 °C.



**Figure 29. RT-PCR compétitive à partir des prélèvements d'eau de mer artificielle et naturelle, incubées à 6 °C.**

Deux cents copies de contrôle interne sont ajoutées aux 100  $\mu$ l de prélèvements d'eau de mer. Les ARN sont extraits au thiocyanate de guanidium, puis les extraits sont analysés par RT-PCR. Les produits d'amplification sont séparés par électrophorèse en gel de polyacrylamide et colorés au nitrate d'argent. Les chiffres indiqués au dessus des colonnes correspondent au temps de séjour dans l'eau de mer. Colonnes CI : analyse de dilution du contrôle interne dans de l'eau traitée au DEPC en l'absence de d'ARN viral. Colonne MT : marqueur de taille VI.



**Figure 30. Dégradation de l'ARN viral en eau de mer artificielle et naturelle.**



## II.2.2. Suivi en eau de mer naturelle

La recherche de virus infectieux en culture cellulaire dans les prélèvements d'eau de mer naturelle à 6 et 20 °C indique une différence dans le titre initial entre les deux conditions d'incubation. La concentration virale est 5,6 fois plus abondante dans l'eau à 20 °C que dans celle à 6 °C. Ces concentrations initiales en virus restent cependant comparables à celle mesurées en eau de mer artificielle, de l'ordre de  $10^4$  virus infectieux par ml. A basse température le titre en virus infectieux passait de  $1,6 \cdot 10^4$  DI50/ml à 28 DI50/ml en 51 jours. A 20 °C l'inactivation du virus est plus rapide (Figure 28, Annexe 4), le seuil de détection est atteint en 16 jours maximum. D'après le calcul des droites de régression (inactivation du virus en fonction du temps) et des valeurs du T90, l'instabilité du virus SA11 est environ 10 fois plus élevée à 20 °C par rapport à 6 °C (Tableau 6).

Ces valeurs de T90 lorsqu'elles sont comparées avec celles obtenues en eau de mer artificielle stérile (dans les mêmes conditions de température d'incubation) montrent que le virus SA11 est environ 6 à 7 fois plus rapidement inactivé en eau naturelle qu'en eau de mer artificielle stérile (Tableau 6).

L'analyse par RT-PCR semi-quantitative de prélèvements montre la diminution progressive du signal d'amplification du génome viral par rapport au contrôle interne (Figures 29 et 30, Annexe 5). A 6 °C, cette diminution du rapport entre les deux produits d'amplification est moins rapide qu'à 20 °C. Après 100 jours d'incubation à 6 °C, la séquence virale est très faiblement amplifiée alors qu'après 37 jours d'incubation à 20 °C le génome viral n'est plus détecté par RT-PCR. Les cinétiques de dégradation de l'ARN viral semblent suivre des droites. L'effet de la température est moins important sur la cinétique de dégradation de l'ARN viral que sur la diminution du pouvoir infectieux. Ainsi, le T90 (instabilité ARN viral) à 6 °C est environ 4 fois supérieur à la valeur du T90 obtenu à 20 °C (Tableau 6). En revanche la nature de l'eau de mer (soit naturelle ou synthétique) influe sur la stabilité du génome viral, qui se dégraderait plus rapidement en eau naturelle par rapport à l'eau artificielle et stérile (Figures 29 et 30).

## II.1. Stabilité de l'acide nucléique viral nu par rapport au génome encapsidé

De l'ARN viral nu et des virus complets sont mis en suspension dans de l'eau de mer naturelle à 10 °C. L'ARN viral nu est détecté par RT-PCR pendant les 24 premières heures d'incubation (Tableau 7). Après 48 heures, aucune bande amplifiée n'est visible par électrophorèse en gel de polyacrylamide et coloration au BET. Pour le virus complet incubé dans l'eau de mer, la réaction de RT-PCR est toujours positive après 6 jours (Tableau 7).

Dans ces conditions d'étude, la cinétique de dégradation de l'ARN viral nu est au moins 6 fois supérieure à celle de l'ARN encapsidé.

**Tableau 7: Persistance de l'acide nucléique viral nu et du virus complet dans de l'eau de mer naturelle.**

Temps d'incubation dans l'eau de mer <sup>a</sup>	2h	6h	12h	1j	2j	3j	6j
Acide nucléique viral <sup>b</sup>	+	+	+	+	-	-	-
Virus complet <sup>b</sup>	+	+	+	+	+	+	+

<sup>a</sup> Le temps d'incubation est exprimé en heures (h) ou en jours (j).

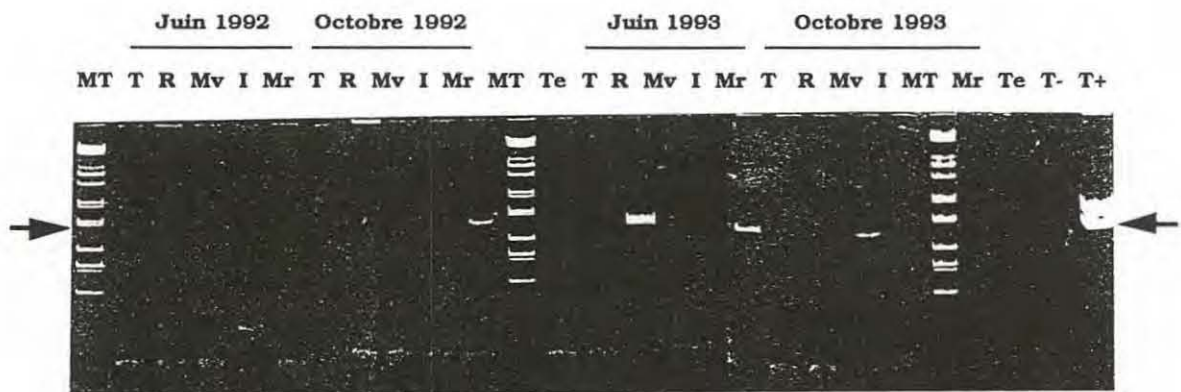
<sup>b</sup> Résultat positif (+) ou négatif (-) pour la recherche de l'acide nucléique viral par RT-PCR.

### III. ETUDES *IN SITU* SUR LA CONTAMINATION DU LITTORAL PAR LES ROTAVIRUS

La RT-semi-nested PCR a été mise au point pour mettre en évidence la présence de rotavirus dans des prélèvements de l'environnement. Comme les études de sensibilité l'ont montré, il est possible de détecter environ 10 000 virus infectieux par 25 g de chair de coquillages, ou 2 000 virus infectieux par ml d'eau. Cependant, il est nécessaire de valider cette technique par l'analyse d'échantillons de coquillages et d'eaux naturellement contaminés. Dans un premier temps, des prélèvements de coquillages (Morbihan) sont analysés. Puis des analyses de prélèvement d'eau (Martinique) sont réalisées et complétées par la caractérisation des souches virales détectées et la recherche d'homologies avec des souches humaines. L'étude des prélèvements, effectués en Loire-Atlantique, regroupe sur un seul site l'ensemble des données sur la contamination des coquillages de l'eau et sur la relation avec les infections humaines.

### III.1. Contamination des coquillages de la région du golfe du Morbihan

Sur 20 prélèvements de coquillages (8 lots d'huîtres et 12 lots de palourdes) analysés par RT-seminested PCR et hybridation, 2 lots d'huîtres sont positifs ainsi que 2 lots de palourdes (Figure 31, Tableau 8). Les 2 prélèvements de palourdes ont également une concentration en bactéries entériques élevée. En revanche, les 2 prélèvements d'huîtres sont considérés comme des lots de coquillages salubres sur le plan bactériologique (<300 *Escherichia coli* dans 100 g de chair de coquillage).



**Figure 31. Amplification d'ARN de rotavirus à partir des prélèvements de coquillages effectués dans la région du Morbihan.**

Les particules virales susceptibles d'être présentes dans les coquillages sont éluées de la chair des mollusques, puis précipitées. Les acides nucléiques sont extraits, à partir de ces concentrats de virus, puis purifiés sur cellulose granulaire. La présence d'ARN viraux est recherchée par RT-seminested PCR.

Les produits de la seminested PCR (repérés par les flèches) obtenus à partir des coquillages prélevés aux stations de Truscat (colonnes T), Rosvellec (colonnes R), Iluric (colonnes I), Men er Roue (colonnes Mr) et Moulin Verdon (Mv), sont analysés par électrophorèse en gel de polyacrylamide, puis colorés au BET. Les colonnes Te, T-, T+ correspondent respectivement aux témoins négatifs d'extraction (2 témoins), au témoin négatif d'amplification et au témoin positif d'amplification. Colonnes MT : marqueur de taille VI.

Réciproquement, 5 lots de coquillages insalubres du point de vue de leur qualité bactériologique sont négatifs pour la recherche de rotavirus par RT-seminested PCR, de même que 11 lots de coquillages salubres.

**Tableau 8 : Résultats des analyses effectuées sur les coquillages prélevés dans la région du golfe du Morbihan.**

Lieu et nature du prélèvement <sup>a</sup>		Date et résultat des analyses							
		06/92		10/92		06/93		10/93	
		RV <sup>b</sup>	CF <sup>c</sup>	RV	CF	RV	CF	RV	CF
Rosvellec	P	-	<b>7,2 10<sup>6</sup></b>	-	<b>3,8 10<sup>6</sup></b>	+	<b>1,1 10<sup>5</sup></b>	-	<b>2,5 10<sup>5</sup></b>
Truscat	P	-	<3 10 <sup>1</sup>	-	1,3 10 <sup>2</sup>	-	<3 10 <sup>1</sup>	-	2,7 10 <sup>2</sup>
Iluric	H	-	<b>5,5 10<sup>2</sup></b>	-	<3 10 <sup>1</sup>	-	<3 10 <sup>1</sup>	-	5 10 <sup>1</sup>
Men Er Roue	H	-	9 10 <sup>1</sup>	+	<3 10 <sup>1</sup>	+	<3 10 <sup>1</sup>	-	<3 10 <sup>1</sup>
Moulin Verdon	P	-	<b>6,0 10<sup>2</sup></b>	-	1,3 10 <sup>3</sup>	-	<3 10 <sup>1</sup>	+	<b>4,9 10<sup>2</sup></b>

<sup>a</sup> Les lieux de prélèvements sont localisés dans la Figure 7. Les prélèvements de palourdes sont indiqués par la lettre P, d'huîtres par la lettre H.

<sup>b</sup> RV pour recherche d'ARN viral par RT-seminested PCR et hybridation, les résultats positifs ou négatifs sont respectivement exprimés par les signes + et -.

<sup>c</sup> CF pour contamination fécale : les valeurs correspondent au nombre de *Escherichia coli* pour 100 g de chair de coquillages. En gras apparaissent les valeurs supérieures au seuil de salubrité de 300 *Escherichia coli* / 100 ml.

### III.2. Contamination des eaux de la baie de Fort de France (Martinique)

#### III.2.1. Contamination virale des eaux de rivières et des effluents de station d'épuration

L'analyse des extraits bruts obtenus à partir des 19 prélèvements d'eau indique la présence de contamination virale dans 8 échantillons (Tableau 9). La moitié correspond à des prélèvements de rejets de stations. Mais, tous les effluents de stations d'épuration analysés ne sont pas positifs par RT-seminested PCR et hybridation, 6 prélèvements sont négatifs. Sur les 9 prélèvements d'eau de rivière, 4 sont contaminés par les rotavirus.

Du point de vue de la répartition géographique des prélèvements, 7 échantillons positifs sur 8 correspondaient à la zone nord de la baie de Fort de France, un prélèvement effectué au sud de la baie est contaminé (Tableau 9, Figure 8).

**Tableau 9 : Résultats de la recherche de rotavirus dans des eaux de surface de la Martinique.**

Prélèvements <sup>a</sup>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
Nature de l'eau <sup>b</sup>	r	r	S	S	r	S	S	S	r	r	S	r	S	r	r	S	r	S	S
Résultats <sup>c</sup>	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+

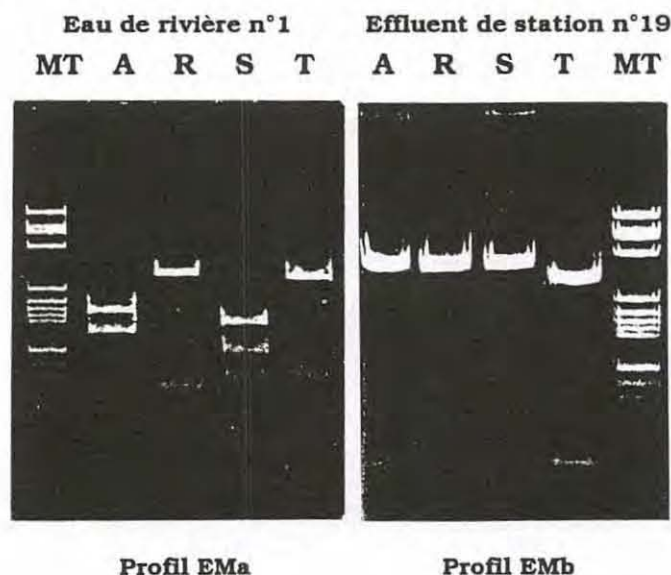
<sup>a</sup> Le numéro correspond à la description des points de prélèvements faite dans la Figure 8.

<sup>b</sup> La lettre r indique les prélèvements d'eau de rivière, la lettre S correspond aux prélèvements d'effluents de stations d'épuration.

<sup>c</sup> Résultat positif (+) ou négatif (-) pour la recherche de l'acide nucléique viral par RT-seminested PCR et hybridation.

### III.2.2. Caractérisation des séquences virales

L'analyse du RFLP a été réalisée pour six des huit séquences amplifiées à partir des eaux de rivière et des effluents de station d'épuration. Deux séquences n'ont pas été caractérisées (sites 6 et 10), les produits d'amplification étaient en quantité trop faible pour être purifiables puis analysables. Pour les autres, la comparaison des profils de restriction montre des homologies complètes entre les séquences amplifiées à partir des sites 1, 2, 5, 7, et 8 ; toutes présentent le même profil EMa (Figure 32). Seule la séquence amplifiée à partir du site 19 est différente des cinq autres par son profil de restriction EMb (Figure 32).



**Figure 32. Profils de restriction des séquences amplifiées à partir des prélèvements d'eau.**

Les séquences amplifiées à partir des prélèvements n°1 et 19 sont purifiées puis à nouveau amplifiées avant d'être incubées avec les enzymes *AluI* (colonnes A), *RsaI* (colonnes R), *Sau3AI* (colonnes S) et *TaqI* (colonnes T). Les produits des réactions de digestion sont séparés par électrophorèse en gel de polyacrylamide. Colonne MT : marqueur de taille V.

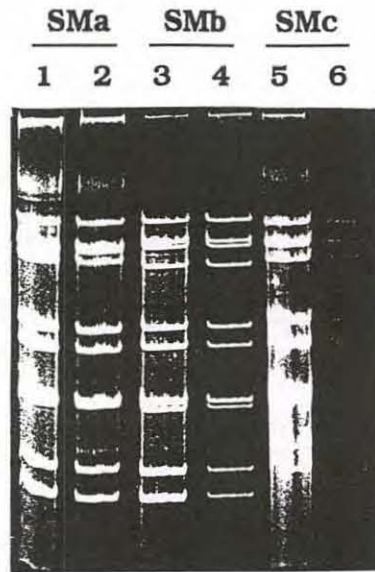
### III.2.3. Etude des souches humaines

Avec les extraits d'ARNdb obtenus à partir des selles de 10 enfants Martiniquais présentant une gastro-entérite à rotavirus, 3 électrophérotypes différents sont observés en gel de polyacrylamide (Figure 33). Quatre selles présentent l'électrophérotipe SMa, l'électrophérotipe SMb correspond à 2 selles, et les 4 autres selles permettent d'obtenir l'électrophérotipe SMc. Chacun des extraits est amplifié en RT-PCR avec le couple d'amorce R1/R2, puis les séquences virales amplifiées sont analysées par du RFLP, puis les profils de restriction sont comparés (Figure 34). Trois différents types de profil sont observés. Les distinctions faites entre les séquences virales trouvées dans les selles par l'analyse du RFLP correspondent à celles obtenues par comparaison des électrophérotypes (Figures 33 et 34).

### III.2.4. Homologies entre les profils de restriction isolés de l'environnement et ceux obtenus à partir de prélèvements humains ou de banques de données

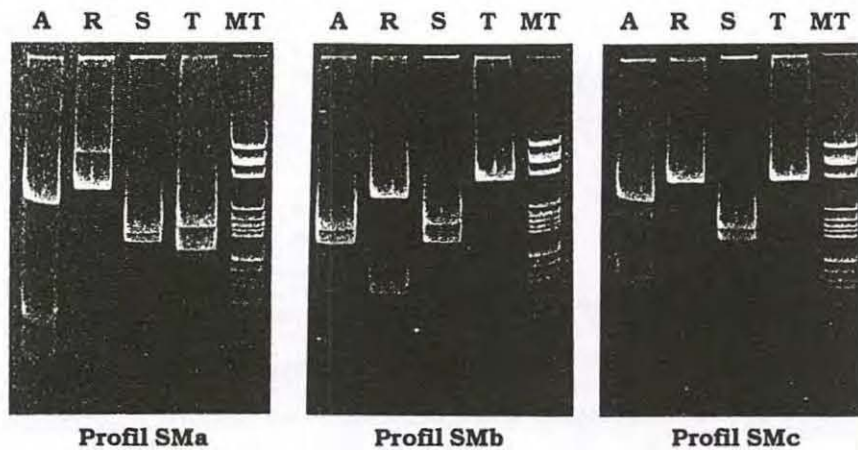
Aucune similitude n'est observée entre les profils de restriction des séquences amplifiées à partir des selles et ceux obtenus avec les prélèvements d'eaux (Figures 32 et 34). Les profils de restriction des ARN viraux contaminant les eaux de la Martinique sont comparés aux profils de séquences de rotavirus du groupe A, humains et animaux connus (Tableau 10). Sur 49 profils de restriction différents caractérisés à partir des séquences de rotavirus décrites dans deux banques de données (EMBL et GeneBank), un profil de restriction est comparable au profil EMa commun aux séquences détectées dans 5 prélèvements du nord de la baie. Les séquences ayant un tel profil sont toutes d'origine humaine et de sérotype G1. Le profil de restriction (EMb) de la séquence amplifiée à partir du site 19 est semblable aux profils de 3 séquences de rotavirus animaux de différentes espèces, d'origine bovine ou porcine ou encore simienne et de sérotype différent.

Les profils des séquences obtenus à partir des prélèvements de selles sont également comparés avec ceux des séquences de rotavirus animaux ou humains, afin d'établir si cette comparaison attribue à ces rotavirus une origine non humaine. Les trois profils caractérisés à partir des rotavirus présents dans les selles sont semblables à ceux obtenus à partir de séquences de rotavirus humain. Le profil SMa est identique au profil de restriction obtenu avec des séquences de rotavirus humains de sérotype G4. Le profil SMb est comparable au profil de restriction obtenu à partir de séquences de rotavirus également humains mais de sérotype G1. Le profil SMc présente une homologie complète avec un profil correspondant à des séquences de rotavirus humains de sérotype G2. En tenant compte de l'imprécision des mesures des tailles des fragments de restriction, le profil SMc est également comparable à un second profil caractérisé à partir de séquences de virus d'origine porcine (l'une étant de sérotype G2).



**Figure 33. Electrophérotypes des génomes viraux extraits à partir des selles des enfants martiniquais.**

Les ARNdb sont extraits à partir de selles, purifiés sur CC41 et analysés par électrophorèse en gel de polyacrylamide. Colonnes 1 à 6 : selles d'enfants. SMA, SMB, et SMC regroupent les électrophorétypes identiques.



**Figure 34. Profils de restriction des séquences amplifiées à partir des selles d'enfants martiniquais.**

Les extraits d'acides nucléiques obtenus à partir des selles sont amplifiés avec les amorces (R1 et R2), puis les produits d'amplification sont incubés avec les enzymes *AluI* (colonnes A), *RsaI* (colonnes R), *Sau3AI* (colonnes S) et *TaqI* (colonnes T). Les produits des réactions de digestion sont analysés par électrophorèse en gel de polyacrylamide. Colonne MT : marqueur de taille V.

**Tableau 10. Homologies entre les séquences détectées à partir des prélèvements de la Martinique et les séquences de rotavirus du groupe A décrites dans les banques de données.**

Données expérimentales					Bases de données <sup>a</sup>							
Profils	Taille des fragments <sup>b</sup>				Taille des fragments <sup>c</sup>				souche (s) ou isolat (i)	VP7 (G) sérotipe	Origine	Numéro d'accession
	<i>AluI</i>	<i>RsaI</i>	<i>Sau3AI</i>	<i>TaqI</i>	<i>AluI</i>	<i>RsaI</i>	<i>Sau3AI</i>	<i>TaqI</i>				
EMa	180	255	148	255	196	268	163	263	i: 421	G1	humaine	D16326
	141	77	104	85	146	74	104	79	i: 80	G1	humaine	D16325
			80				75		s: A91A	G1	humaine	M93006
EMb	342	342	342	298	342	342	342	301	i: C60	G1	pocine	L24164
				50				41	n.p. <sup>d</sup>	G6	bovine	M63266
									s: SA11	G3	simienne	J02354 K02028 V01546
SMa	255	344	180	199	263	342	179	202	n.p.	G4	humaine	A01321
	57		155	141	43		163	140	s: St Thomas 3	G4	humaine	X13603
	<50				32				s: PV5249	G4	humaine	M86490
SMb	200	256	180	346	196	268	179	342	i: K3	G1	humaine	D16317
	144	75	150		146	74	163		i: K17	G1	humaine	D16320
									i: K18	G1	humaine	D16319
									s: C1	G1	humaine	D17717
									s: C2	G1	humaine	D17718
									s: C4	G1	humaine	D17720
									s: TE1	G1	humaine	D17721
									s: TE2	G1	humaine	D17722
									s: TE3	G1	humaine	D17723
SMc	262	350	178	350	263	342	179	342	n.p.	G2	humaine	M11164
	80		162		79		163		s: M48	G2	humaine	L11605
					266	342	179	342	s: CC117	n.p.	porcine	L35056
					76		163		s: C134	G2	porcine	L35058

<sup>a</sup> Les séquences de rotavirus du groupe A sont décrites dans les banques de données EMBL et GenBank sous le numéro d'accession décrit.

<sup>b</sup> La taille des fragments de restriction est calculée à partir des électrophorèses en gel d'agarose. Le résultat est exprimé en paires de bases.

<sup>c</sup> Les profils des séquences de rotavirus sont calculés à partir de la position des sites de restriction sur le gène de la protéine VP7. La taille des fragments est exprimée en paires de bases.

<sup>d</sup> n.p. = non précisé.



### **III.3. Suivi de la contamination par les rotavirus de la baie de La Baule (Loire-Atlantique)**

#### III.3.1. Contamination virale des coquillages

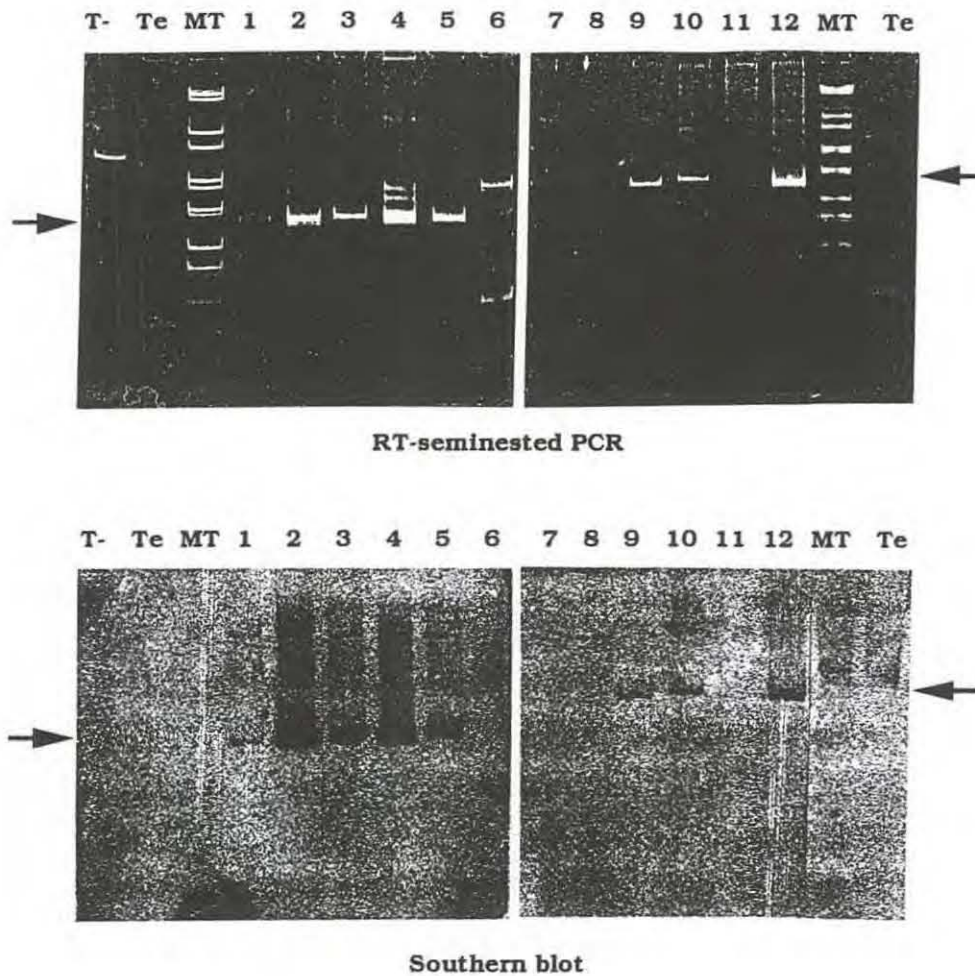
La recherche de séquences virales est effectuée simultanément sur les 12 prélèvements obtenus à partir des coques puis des moules de la baie de La Baule (Tableau 11). Aucune séquence n'est amplifiée avec les extraits d'acides nucléiques obtenus à partir des coques. En revanche, 9 lots de coques sur 12 sont insalubres d'un point de vue bactériologique (> 300 *Escherichia coli* dans 100 g de chair de coquillage).

Bien que la concentration bactérienne dans les moules prélevées soit souvent inférieure à celle mesurée dans les coques, les moules sont classées insalubres 8 fois sur 12 (Tableau 11). Sur l'année 1993, seulement 2 prélèvements, l'un en mars le second en septembre, sont exempts de contamination bactérienne et virale. La présence de séquences virales est mise en évidence dans 8 prélèvements par RT-semi-nested PCR puis confirmée par hybridation. Trois de ces prélèvements (février, juin et novembre) correspondent à des moules salubres sur des critères bactériologiques (Tableau 11).

#### III.3.2. Contamination virale des eaux de station d'épuration

En l'absence de purification supplémentaire des extraits d'acides nucléiques aucune séquence d'ARNdb de rotavirus n'est détectée dans les eaux brutes et seulement un prélèvement d'eaux épurées (décembre) est très faiblement positif après RT-semi-nested PCR.

En revanche, la purification des extraits sur cellulose granulaire permet de déceler par RT-semi-nested PCR la présence du génome viral dans 4 prélèvements d'eau brute et 8 prélèvements d'eau épurée (Tableau 11, Figure 35). Ces résultats sont confirmés par Southern blot (Figure 35), qui révèle également la présence d'une très faible quantité d'ADN amplifiée à partir de l'extrait d'eau brute du mois de mars, non visible après coloration au BET. Les eaux brutes et épurées sont simultanément contaminées lors des prélèvements de janvier, mars et décembre. En juin et novembre aucune séquence virale n'est identifiée dans les eaux de station brutes ou épurées. Pour les autres mois, soit les eaux brutes soit les eaux épurées contiennent de l'ARN viral.



**Figure 35. Mise en évidence de la présence d'ARN de rotavirus dans les eaux épurées.**

Les extraits d'acides nucléiques obtenus à partir des prélèvements d'eaux épurées des mois de janvier à décembre 1993 (respectivement colonnes 1 à 12) sont analysés par RT-seminested PCR et hybridation moléculaire. Colonnes Te et T- correspondent respectivement aux témoins négatifs d'extraction et d'amplification. Colonnes MT : marqueur de taille VI. Les flèches situent les séquences d'une taille de 342 pb.

L'ARN viral dans les eaux de stations et les moules est simultanément identifié pour les prélèvements des mois de janvier et décembre (Tableau 11). En février, mai et octobre seuls les prélèvements de moules et d'eaux épurées sont contaminés. Le génome viral est détecté seulement dans les prélèvements de moules des mois de juin et novembre. En mars, avril et septembre, les prélèvements d'eaux épurées sont contaminés mais pas ceux de moules. Lors des mois d'été de juillet et août, uniquement les prélèvements d'eau brute sont positifs par RT-seminested PCR et hybridation. A aucune date, les prélèvements de moules et d'eaux de station ne sont simultanément trouvés exempts d'ARN viral.

**Tableau 11. Résultats virologiques et bactériologiques sur les prélèvements de coquillages et d'eaux de station.**

Date (jour/mois/année)	Moules		Coques		Eaux épurées	Eaux brutes
	rota <sup>a</sup>	coliformes <sup>b</sup>	rota <sup>a</sup>	coliformes <sup>b</sup>	rota <sup>a</sup>	rota <sup>a</sup>
24/01/93	+	<b>1 400</b>	- i	<b>1 800</b>	+	+
09/02/93	+	260	-	<b>2 760</b>	+	- i
09/03/93	-	170	-	270	+	+
07/04/93	-	<b>7 600</b>	-	<b>4 200</b>	+	-
24/05/93	+	<b>440</b>	-	<b>1 000</b>	+	-
21/06/93	+	< 30	- i	32	-	- i
19/07/93	-	<b>710</b>	-	<b>8 600</b>	-	+
17/08/93	- i	<b>440</b>	-	<b>4 200</b>	-	+
16/09/93	-	40	-	240	+	-
14/10/93	+	<b>4 800</b>	- i	<b>20 000</b>	+	-
15/11/93	+	270	- i	<b>1 600</b>	-	-
13/12/93	+	<b>710</b>	- i	<b>390</b>	+	+

<sup>a</sup> La présence d'ARNdb de rotavirus dans les prélèvements est mise en évidence par RT-seminested PCR et hybridation (Southern blot). Les signes + et - correspondent respectivement aux échantillons positifs et négatifs après analyse. La présence d'inhibiteurs dans les extraits négatifs est indiquée par la lettre i.

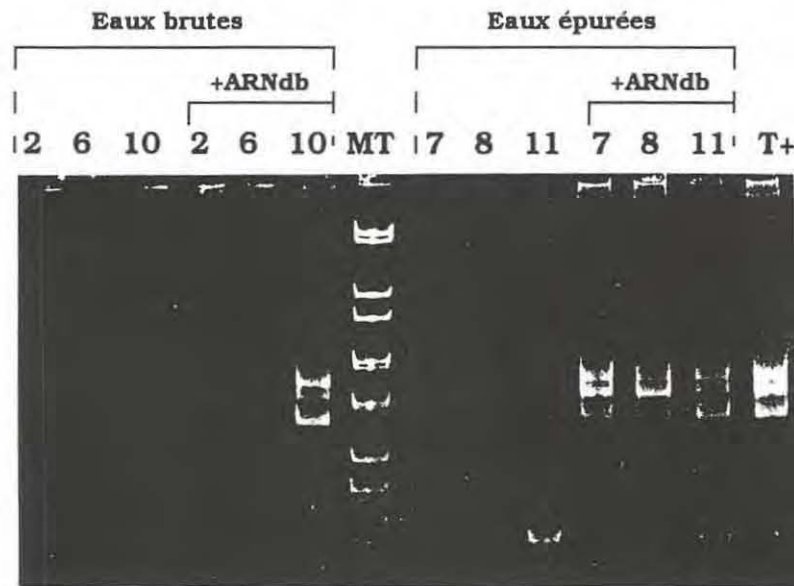
<sup>b</sup> La contamination fécale des coquillages est évaluée par numération des *Escherichia coli*. Les résultats sont exprimés en nombre de germes pour 100 ml de Chair de coquillage. En gras apparaissent les valeurs supérieures au seuil de salubrité de 300 *Escherichia coli*/100 g de chair de coquillage.

### III.3.3. Recherche dans les extraits d'inhibiteurs de la RT-seminested PCR

Une quantité connue d'ARNdb de rotavirus SA11 est introduite dans les extraits d'acide nucléique (extraits purifiés et négatifs après analyse virologique) avant une nouvelle RT-seminested PCR. La concentration finale d'ARN exogène est telle qu'un signal d'amplification doit seulement apparaître en seminested PCR. L'absence de signal d'amplification témoigne de la présence d'inhibiteurs dans les extraits (Tableau 11).

Les 12 extraits d'acides nucléiques obtenus à partir des prélèvements de coques sont ainsi testés. Sept extraits permettent l'amplification de l'ARN exogène, aucun produit d'amplification n'est visible après coloration au BET à partir de 5 extraits. Sur les 5 extraits de moules négatifs en RT-seminested PCR, un seul est inhibiteur de la réaction d'amplification.

Tous les extraits d'eaux de station négatifs par RT-seminested PCR et hybridation sont testés de la même façon. Sur les 7 extraits d'eau brute, 2 contiennent des substances inhibitrices qui ne permettent pas l'amplification de l'ARN exogène. Les 5 autres extraits ainsi que l'ensemble des extraits obtenus à partir des eaux épurées n'entravent pas la réaction d'amplification (Figure 36 et Tableau 11).



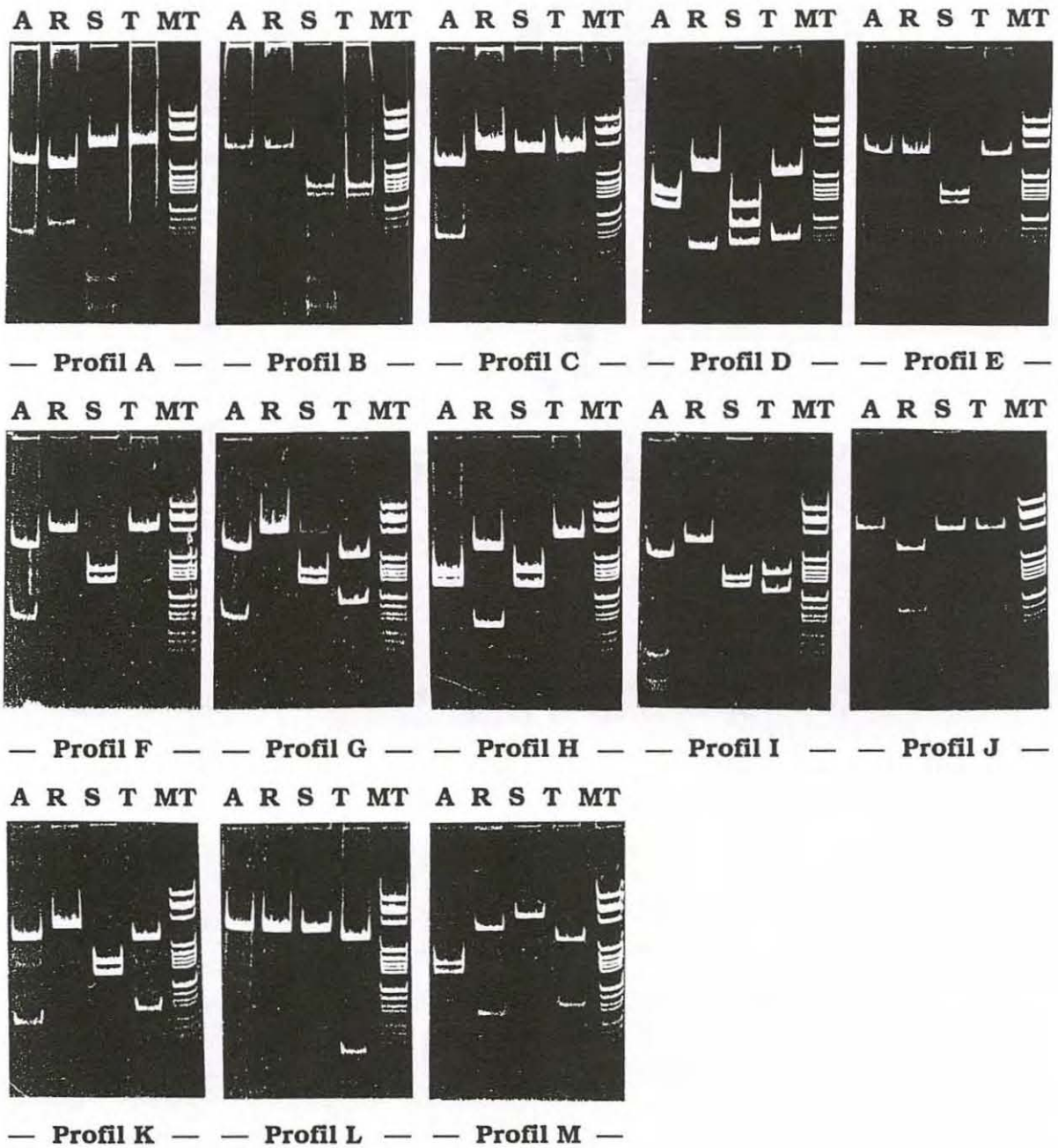
**Figure 36. Mise en évidence de la présence d'inhibiteurs dans les extraits d'acides nucléiques.**

Des extraits d'acides nucléiques négatifs en RT-nested PCR sont complétés avec de l'ARNdb du virus SA11. La quantité d'ARN est ajustée pour conduire à l'amplification de séquences visibles seulement en nested PCR. Les produits de la nouvelle amplification réalisée à partir de ces extraits sont analysés par électrophorèse puis colorés au BET. Les chiffres correspondent aux mois de l'année, au cours desquels ont été réalisés les prélèvements. Colonnes T+ : produit d'amplification obtenu à partir de l'ARN du virus SA11 mélangé à de l'eau distillée. Colonne MT : marqueur de taille VI.

### III.3.4. Analyse du RFLP des séquences virales amplifiées

Les différents profils de restriction des séquences virales amplifiées à partir des extraits de moules et des eaux de station (brutes et épurées) sont présentés dans la Figure 37. Le profil de la séquence virale détectée dans le prélèvement d'eau brute du mois de mars n'est pas connu car la quantité d'ADN obtenue après RT-nested PCR est trop faible pour être analysée.

Trois profils de restriction distincts (profils A à C) sont identifiés à partir des 7 extraits de moules (Figures 37 et 38). Le profil C, le plus fréquemment caractérisé, est obtenu à partir des séquences détectées dans 6 extraits. Les extraits de moules du mois de janvier contiennent au moins 2 séquences virales différenciées par leur profil de restriction. Les 2 séquences sont isolées par une succession de réactions de purification, permettant d'obtenir les profils A et B.



**Figure 37. Profils de restriction identifiés lors de l'étude réalisée en Loire-Atlantique.**

Les profils de restriction présentés correspondent aux profils isolés à partir des prélèvements de coquillages (profils A et B), ou d'eaux épurées (profils C, E et J), ou bien d'eaux brutes (profils K et L), ou encore des prélèvements cliniques (profils D, F, G, H, I et M). Colonnes A, R, S, et T correspondent respectivement aux électrophorèses des produits de digestion des enzymes *AluI*, *RsaI*, *Sau3AI* et *TaqI*. Colonnes MT : marqueurs de taille VI.

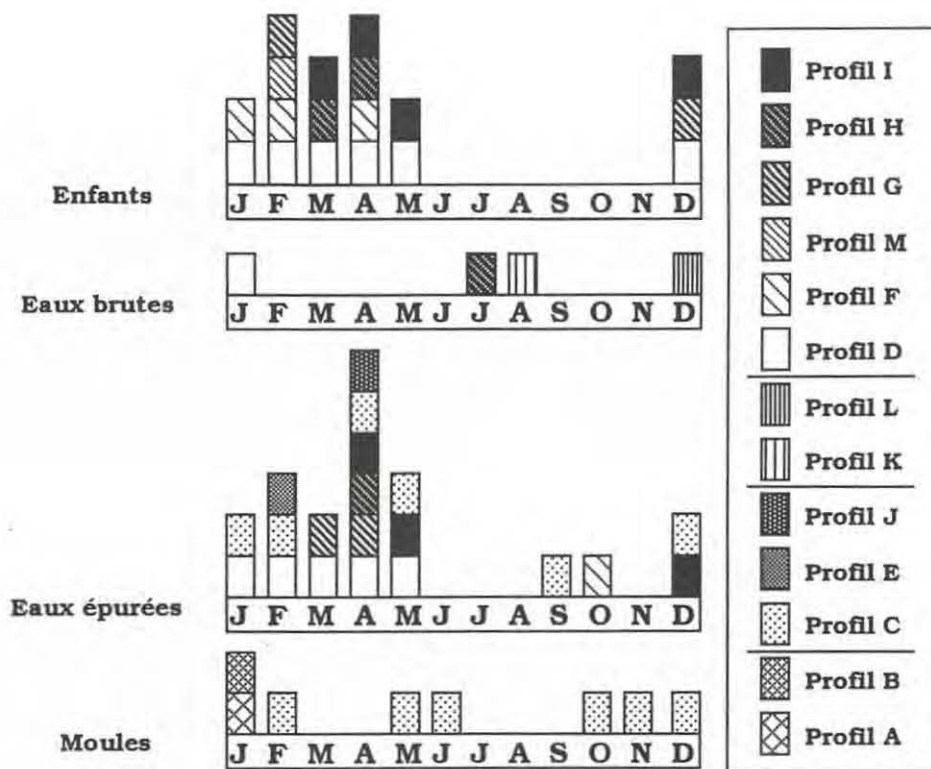
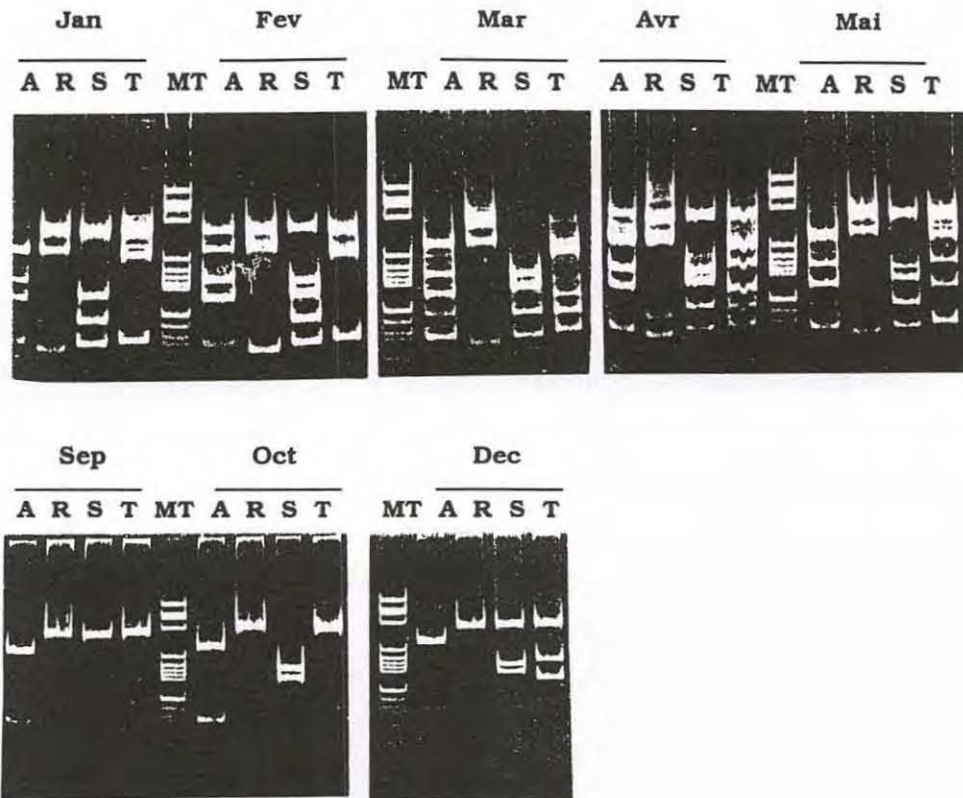


Figure 38. Distribution sur l'année 1993 des profils de restrictions obtenus à partir des prélèvements de coquillages, d'eaux de station et des prélèvements cliniques.

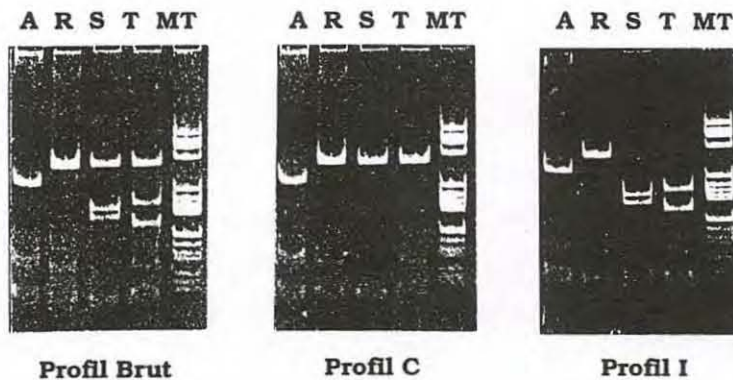
Avec les extraits d'eaux épurées, 8 profils de restriction sont mis en évidence (profils C à J) (Figures 37 et 38). Six de ces extraits (eaux épurées des mois de janvier à mai et de décembre) contiennent un mélange de séquences (Figure 39). De 2 à 6 séquences par extraits sont isolées et caractérisées par leur profil de restriction (Figures 38 et 40). Le profil C est identique au profil identifié à partir des extraits de moules (Figure 38). Ce profil est également fréquemment caractérisé (profil C isolé dans 6 extraits sur 8), ainsi que le profil D identifié à 5 reprises (Figure 38). Le profil I est obtenu à partir des séquences détectées dans 3 extraits et le profil G dans 2 extraits, alors que les profils E, F, H et J n'ont été caractérisés qu'une fois à partir de séquences virales présentes dans des prélèvements d'eaux épurées.

Dans les eaux brutes, il n'est pas détecté de mélanges de séquences virales (Figure 38). Quatre profils (profils D, H, K, L) sont caractérisés à partir de 4 extraits différents. Les profils D et H sont identiques à ceux de séquences amplifiées à partir des eaux épurées. Aucun de ces profils n'est comparable à ceux caractérisés à partir des séquences virales détectées dans les extraits de moules.



**Figure 39. Mise en évidence de la diversité des séquences virales dans les prélèvements d'eaux épurées.**

Les produits d'amplification directement obtenus à partir des prélèvements d'eaux épurées sont purifiés et réamplifiés avec les amorces utilisées en seminested PCR (R1 et R2). Les produits d'amplification sont digérés avec les enzymes de restriction *AluI* (colonnes A), *RsaI* (colonnes R), *Sau3AI* (colonnes S) et *TaqI* (colonnes T). Les produits des réactions de digestion sont séparés par électrophorèse en gel de polyacrylamide puis colorés au BET. Colonnes MT : marqueur de taille V.



**Figure 40. Interprétation du polymorphisme de restriction obtenu à partir de l'eau épurée du mois de décembre.**

L'analyse RFLP des séquences amplifiées à partir de l'extrait brut met en évidence un mélange de profils (profil Brut). Le produit de la première amplification est traité par deux enzymes de restriction. Les produits d'amplification non clivés par l'enzyme *Sau3AI* sont purifiés puis de nouveau analysés (profil C). De même les produits non clivés par l'enzyme *DraI* permettent d'obtenir le profil I. Le profil brut correspond au mélange des profils C et I. Colonnes MT : marqueur de taille VI.

### III.3.5. Amplification des séquences virales contenues dans les selles

Les extraits obtenus à partir des 43 prélèvements cliniques sont analysés par électrophorèse en gel de polyacrylamide. L'électrophérotipe des souches de rotavirus est clairement identifié à partir de 36 échantillons. Pour les autres, soit les 11 segments du génome viral ne sont pas visibles (4 échantillons), soit certains segments apparaissent très faiblement colorés par le BET (3 échantillons). Aucun électrophérotipe ne possède de segments surnuméraires pouvant caractériser une co-infection par deux souches de rotavirus.

Tous les extraits sont analysés par RT-PCR (avec les amorces R1 et R2), une séquence est amplifiée à partir des 36 extraits positifs en électrophorèse, ainsi que les 3 extraits partiellement identifiables. Sur les 4 extraits ne présentant pas d'électrophérotipe, un seul conduit à l'amplification d'une séquence. Les trois autres extraits négatifs en RT-PCR sont également négatifs en seminested PCR.

### III.3.6. Analyse du RFLP des séquences de rotavirus humains

Six profils distincts sont identifiés (profils D, F à I, et M) à partir des 40 produits d'amplification (Figure 37). Aucune des selles ne contient des séquences différentes du point de vue de leur profil de restriction. La répartition mensuelle du nombre de selles permettant d'obtenir chacun des profils est présentée dans le Tableau 12. Entre les mois de janvier à mai et lors du mois de décembre, de 2 à 4 profils distincts sont caractérisés mensuellement. La plus grande diversité de souches virales est observée lors des mois de février et avril, alors que le plus grand nombre de cas cliniques est recensé lors du mois de mars.

Deux périodes de recrudescence sont observées. La première est de janvier 1993 à mai 1993 avec 35 cas cliniques recensés (aucun cas clinique n'a été diagnostiqué par l'hôpital sur la fin de l'année 1992). La seconde période débute en décembre 1993 avec 5 cas, elle se prolonge jusqu'au mois d'avril 1994 avec au total 29 cas centrés sur le mois de janvier (résultats non présentés). La diversité des profils de restriction identifiés lors de l'hiver 1994 est moins importante, avec seulement 3 profils distincts : 14 cas permettent de détecter des séquences avec le profil D, 13 cas avec le profil I et 2 cas avec le profil G.



**Tableau 12. Diversité des souches virales impliquées lors de la période de recrudescence des gastro-entérites à rotavirus.**

Mois	Nombre de selles permettant d'obtenir le profil :						Nombre total de selles
	D	F	G	H	I	M	
Janvier	4	1	0	0	0	0	5
Février	3	1	1	0	0	3	8
Mars	4	0	0	7	2	0	13
Avril	2	1	0	1	2	0	6
Mai	2	0	0	0	1	0	3
Juin à novembre	0	0	0	0	0	0	0
Décembre	3	0	1	0	1	0	5
<b>Nombre total de selles</b>	<b>18</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>8</b>	<b>6</b>	<b>3</b>	<b>40</b>

Sur les 6 profils obtenus à partir des séquences de virus humains, 5 sont identiques à ceux caractérisés à partir de séquences de rotavirus détectées dans les eaux de station d'épuration (Figure 38).

Lors de la période de recrudescence, le profil D est fréquemment caractérisé à partir des prélèvements cliniques. Les rotavirus responsables d'hospitalisation qui présentent ce profil sont majoritaires en début et fin des périodes de recrudescence. Ce profil est identique à ceux de séquences trouvées dans les eaux brutes du mois de janvier et dans les eaux épurées des mois de janvier à mars.

Le profil H moins fréquemment identifié, est cependant caractérisé à partir de plus d'une selle positive sur deux au cours du mois de mars, puis avec une selle en avril. Ce profil est identique aux profils de séquences identifiées dans les prélèvements d'eaux épurées du mois d'avril et d'eau brute du mois de juillet.

Le profil I est apparu au milieu de la période de recrudescence, puis dans les mois suivants (mars à mai et décembre) avec une faible fréquence de cas cliniques. Cependant il est également caractérisé à partir de séquences virales détectées dans les eaux épurées lors des mois d'avril, mai et décembre.

Les profils F et G sont caractérisés sporadiquement à partir des prélèvements cliniques. Ces deux profils sont identiques à ceux identifiés à partir des eaux épurées des mois de mars, avril (profil G) et octobre (profil F).

Le profil M n'est identifié que lors du mois de février à partir d'un peu plus d'un tiers des cas cliniques. Aucune similitude n'est observée avec les profils caractérisés à partir des séquences détectées dans les prélèvements d'eau de station.

Sur les 12 profils de séquences amplifiées à partir des extraits de coquillages et d'eau de station, seulement 5 sont communs à des profils provenant de séquences de virus humains identifiés dans les prélèvements cliniques (Figure 38). Pourtant, ces séquences correspondent à des séquences de rotavirus, car elles hybrident toutes avec la sonde.

### III.3.7. Homologies avec des séquences déposées dans des banques de données

Les profils des séquences virales détectées dans l'environnement, sans homologie avec ceux de séquences de souches humaines provenant de l'hôpital, sont comparés aux profils de restriction de séquences de rotavirus du groupe A décrites dans des banques de données. Des homologies complètes ou partielles sont observées (Tableau 13).

Parmi les 3 profils de restriction identifiés dans les coquillages, seul le profil C est identique à un profil de restriction commun à 2 séquences de rotavirus, l'un d'origine simienne, l'autre humaine. Les deux profils A et B ne présentent pas de similitudes complètes avec des profils de séquences de rotavirus. Toutefois, le profil A a des homologies partielles avec des séquences de rotavirus humains et animaux. Le plus fort pourcentage de similitudes est obtenu avec les deux profils des séquences de rotavirus simiens et humains précédemment rapprochés du profil C. Le profil A se différencie par l'absence de site *RsaI*. Bien que le degré de similitude du profil A avec celui d'une séquence de souche bovine (souche A5 de sérotype G3 [numéro d'accès : D01054]) soit plus faible (50 % d'homologie), cette souche animale est la seule sur 93 à posséder une séquence dont les fragments de restriction pour l'enzyme *RsaI* sont parfaitement identiques à ceux du profil A. Le profil B présente des homologies partielles également avec des profils de séquences de rotavirus de différentes origines aussi bien humaine qu'animales. Le maximum de similitude est obtenu avec un rotavirus humain souche B37, cette souche ne possède pas, sur la partie du gène étudié, de site *TaqI*.

**Tableau 13. Homologies entre les séquences détectées lors de l'étude en Loire-Atlantique et les séquences de rotavirus du groupe A décrites dans les banques de données.**

Profils	Données expérimentales				Pourcentage de similitude	Bases de données <sup>a</sup>				souche (s) ou isolat (i)	VP7 (G) sérotype	Origine	Numéro d'accèsion
	Taille des fragments <sup>b</sup>					Taille des fragments <sup>c</sup>							
	AluI	RsaI	Sau3AI	TaqI	AluI	RsaI	Sau3AI	TaqI					
A	263 80	241 102	345 158	345 161	73%	263 79	342	342	342	s: HCR3 n.p. <sup>d</sup>	G3 n.p.	humaine simienne	L21666 M21650
B	339	339	177 158	185 161	73%	342	342	179 163	342	s: B37	G8	humaine	J04334
C	266 80	342	342	342	100%	263 79	342	342	342	s:HCR3 n.p.	G3 n.p.	humaine simienne	L21666 M21650
D	180 141	255 77	148 104 80	255 85	100%	196 146	268 74	163 104 75	263 79	i: 421 i: 80 s : A91A	G1 G1 G1	humaine humaine humaine	D16326 D16325 M93006
E	339	339	180 161	339	100%	342	342	179 163	342	s: B37	G8	humaine	J04334
F	262 80	350	178 162	350	100%	263 79	342	179 163	342	n.p. s: M48	G2 G2	humaine humaine	M11164 L11605
					100%	266 76	342	179 163	342	s: CC117 s: C134	n.p. G2	porcine porcine	L35056 L35058
G	265 80	342	176 159	228 117	100%	263 79	342	181 161	233 109	s: Australia/5/77	G2	humaine	X00572
H	200 144	256 75	180 150	346	100%	196 146	268 74	179 163	342	i: K3 i: K17 i: K18 s: C1 s: C2 s: C4 s: TE1 s: TE2 s: TE3	G1 G1 G1 G1 G1 G1 G1 G1 G1	humaine humaine humaine humaine humaine humaine humaine humaine humaine	D16317 D16320 D16319 D17717 D17718 D17720 D17721 D17722 D17723
I	255 57 <50	344	180 155	199 141	100%	263 43 32	342	179 163 140	202 140	n.p. s: St Thomas 3 s: PV5249	G4 G4 G4	humaine humaine humaine	A01321 X13603 M86490
J	347	241 107	347	347	73%	342	241 101	342	209 133	s: A5	G8	bovine	D01054
K	281 70	344	184 162	268 75	77%	342	342	179 163	271 71	i: A253	G11	porcine	L24163
					77%	263 79	342	179 163	342	n.p. s: M48	G2 G2	humaine humaine	M11164 L11605
					77%	266 76	342	179 163	342	s: CC117 s: C134	n.p. G2	porcine porcine	L35056 L35058
L	342	342	342	298 50	100%	342	342	342	301 41	i: C60 n.p. s: SA11	G1 G6 G3	porcine bovine simienne	L24164 M63266 J02354 K02028 V01546
M	187 147	275 80	350 90	250	80%	196 146	268 74	179 163	263 79	s: Wa  s: KU s: K1 s: K2 s: K8 s: RV-4	G1  G1 G1 G1 G1	humaine  humaine humaine humaine humaine	M21843 K02033 D16343 D16324 D16323 D16344 M64666

<sup>a</sup> Les séquences de rotavirus du groupe A sont décrites dans les banques de données EMBL et GenBank sous le numéro d'accèsion décrit.

<sup>b</sup> La taille des fragments de restriction est calculée à partir des électrophorèses en gel d'agarose. Le résultat est exprimé en paires de bases.

<sup>c</sup> Les profils des séquences de rotavirus sont calculés à partir de la position des sites de restriction sur le gène de la protéine VP7. La taille des fragments est exprimée en paires de bases.

<sup>d</sup> n.p. = non précisé.

Dans les eaux de station, 2 profils de séquences virales obtenus à partir des eaux brutes (profils K et L) et 3 profils à partir des eaux épurées (profils C, E et J) n'ont pas d'homologie avec des séquences de souches humaines issues de la population infantine locale. Les profils K et J ne possèdent pas d'homologies complètes avec des profils de restriction de séquences virales connues. Les degrés de similitudes les plus importants pour ces deux profils sont obtenus avec des séquences de souches humaines et animales. Ainsi le profil K est proche (compte tenu de l'imprécision des mesures expérimentales des tailles des fragments de restriction) de 3 profils différents avec un degrés de similitude de 77 % pour chacun. Les séquences qui possèdent ces profils appartiennent à des souches virales d'origine humaine et porcine. Le profil J, comme le profil A isolé à partir des coquillages, possède un site de restriction seulement commun avec la souche bovine A5 précédemment décrite. Ces deux séquences issues de l'environnement (profils J et A) ont autant de degré de similitude entre elles, que pour la souche bovine A5. Les profils C, E et L ont des homologies complètes avec celles de séquences de rotavirus humains et animaux. Le profil C, obtenu à partir des prélèvements de moules et d'eaux épurées, a des homologies avec le profil de séquences de virus simien et humain précédemment comparé avec le profil A. Le profil A présente également avec le profil C un degré de similitude comparable à celui qu'il a avec le profil J. Le profil E est identique à celui d'une séquence d'une souche humaine B37 précédemment comparée au profil B. Par conséquent, le profil B possède un degré de similitude avec le profil E identique à celui qu'il a avec la séquence de la souche humaine B37. Enfin, Le profil L est le seul profil parfaitement comparable avec celui de séquences de virus exclusivement d'origines animale, bovine ou porcine ou encore simienne.

Les profils des séquences, détectées dans les prélèvements d'eaux de station communs aux profils obtenus à partir des prélèvements cliniques (profils D, F, G, H et I), sont comparés avec les résultats des banques de données. Sur ces 5 profils, tous sont identiques à ceux de séquences de rotavirus décrits dans les banques de données. Ces virus sont généralement des virus d'origine humaine, à l'exception des séquences virales qui présentent le profil F. Ce profil F est comparable à 2 profils, l'un correspond à une séquence de rotavirus humain le second à des séquences de souches porcines. Ces profils de séquences de souches humaines et porcines ont été précédemment rapprochés du profil K (profil caractérisé à partir de séquences détectées dans un prélèvement d'eau brute). Ce profil K par conséquent présente des homologies avec le profil F avec un degré de similitude de 77 %.

Le profil M de séquences de rotavirus uniquement caractérisé à partir des prélèvements cliniques ne possède pas d'homologie complète avec des séquences de rotavirus décrites dans les banques de données. Toutefois, un fort pourcentage de similitude (80 %) est obtenu avec des souches de rotavirus humain de sérotype G1.

## **DISCUSSION**

## I. DEVELOPPEMENT DE LA RT-SEMINESTED PCR

La contamination de l'environnement hydrique et des coquillages par les virus entériques est de plus en plus fréquemment rapportée. L'essor de ces données est en partie due au développement des méthodes de biologie moléculaire. Si certains virus se multiplient sur culture cellulaire de manière relativement facile comme les rotavirus ou les entérovirus, la multiplication en cultures cellulaires d'autres virus, comme le virus de l'hépatite A ou le virus de Norwalk, est encore aujourd'hui difficiles voire impossibles. Avec ces derniers, l'amplification enzymatique en chaîne est le moyen le plus adapté pour mettre en évidence leur présence dans des échantillons de l'environnement (Atmar *et al.*, 1993). Avec les virus qui se multiplient *in vitro*, ces nouvelles méthodes permettent d'augmenter la sensibilité et la rapidité de détection par rapport aux techniques de culture cellulaire (Kopecka *et al.*, 1993 ; Puig *et al.*, 1994).

Bien que la PCR était utilisée pour la recherche des principaux virus entériques dans l'eau et les coquillages, lorsque ces travaux ont été entrepris aucune application de cette méthode n'était décrite pour la recherche des rotavirus dans l'environnement. La raison de ce retard était liée au développement encore récent des premières applications dans le diagnostic médical (Gouvea *et al.* 1990a ; Xu *et al.* 1990). Les conditions d'analyses décrites dans ces travaux ont été modifiées afin d'accroître la sensibilité de détection du génome viral dans des prélèvements d'eaux ou de coquillages.

La séquence du gène de la protéine VP7 est choisie comme la séquence cible de l'amplification. En effet, ce gène est parfaitement connu et plusieurs amorces sont décrites permettant l'amplification des rotavirus. Ce gène comporte également des séquences différentes entre les virus du même groupe, ce qui permet de distinguer les souches sur la base de l'analyse du RFLP des produits d'amplification (Gouvea *et al.*, 1993 ; Vonsover *et al.*, 1993).

Les amorces Beg9 et End9 décrites par Gouvea *et al.* (1990a) sont complémentaires de séquences situées aux extrémités non codantes 5' et 3' du gène, ubiquitaires à l'ensemble des rotavirus du groupe A (Figure 12). Les amorces R1 et R2 sont décrites par Flores *et al.* (1990) comme étant complémentaires de séquences situées dans la partie codante du gène et également communes aux rotavirus du groupe A (Figure 12). L'amorce R1 est située entre deux régions du gène qui codent pour des domaines variables de la protéine et qui avec une troisième région variable forment le site antigénique reconnu par les anticorps neutralisants (Mattion *et al.*,

1994). L'amorce R2 est complémentaire des premiers nucléotides codant pour le peptide signal de la protéine (domaine hydrophobe H1) non retrouvé dans la protéine VP7 mature (Mattion *et al.*, 1994). L'amorce R0 est complémentaire d'une séquence codante pour un domaine conservé de la protéine VP7 des rotavirus du groupe A. Le rôle de ce domaine est imprécis, il a été considéré comme responsable de l'attachement des virus aux cellules lors de l'infection. En fait, il pourrait interagir avec la protéine VP4 auquel est attribué ce rôle dans la fixation des virus aux cellules (Crawford *et al.*, 1994 ; Mattion *et al.* 1994).

Dans un premier temps, les amorces Beg9 et End9 sont utilisées pour amplifier la séquence entière du gène de la protéine VP7 dont la longueur est de 1 062 pb (Figure 20). La sensibilité insuffisante de la RT-PCR n'est pas compatible avec les niveaux de contaminations virales dans l'environnement. L'amorce interne R0 est utilisée pour réaliser une seconde amplification enzymatique à partir des produits de la première réaction, mais l'étude de la sensibilité ne montre pas d'amélioration. Malgré la recherche d'une séquence la plus ubiquitaire, il est possible qu'un appariement imparfait de l'amorce R0 avec la séquence diminue l'efficacité de l'amplification et explique ce résultat (Eiden *et al.* 1991 ; Gouvea *et al.* 1991).

La RT-PCR réalisée avec Beg9 et R1 permet d'amplifier une séquence correspondant aux 392 premiers nucléotides du gène (Figure 21). Dans les mêmes conditions d'analyse, la sensibilité est 10 fois supérieure à celle obtenue avec le couple Beg9 et End9. En seminested PCR, le couple R1 et R2 permet d'augmenter encore de 10 fois la sensibilité de détection. Le rendement de la réaction pourrait être supérieur lors de l'amplification de fragments courts. Des structures secondaires dans l'ARN viral pourraient rendre difficile l'obtention d'ADNc entiers lors de réactions de rétro-transcription (Estes et Cohen, 1989). Mais aussi, comme l'indique Gouvea *et al.*. (1991), l'amorce End9 n'a pas une séquence parfaitement complémentaire avec le gène de la protéine VP7 pour l'ensemble des souches virales, ce qui une fois de plus pourrait diminuer la sensibilité de la RT-PCR. La sensibilité de la RT-PCR est encore améliorée d'un facteur 10, par l'utilisation de l'HMM comme agent de dénaturation de la structure bicaténaire du génome des rotavirus.

La sensibilité de la RT-seminested PCR est évaluée par deux méthodes différentes. La première est basée sur l'analyse de dilutions d'une souche virale de titre connu (Figure 23). Elle fournit un résultat exprimé en nombre de particules infectieuses en culture cellulaire par unité de volume. Cette sensibilité de  $2 \cdot 10^3$  ff/ml est en valeur relative 100 fois inférieure à celle obtenue lors de la seconde étude effectuée par les analyses de dilutions d'un extrait d'ARNdb de concentration connue. Bien que les souches utilisées pour nos deux expériences soient différentes, l'une animale (virus SA11), l'autre humaine (virus contenus dans une selle) et que l'amplification puisse avoir une sensibilité différente selon les souches étudiées, ce résultat

pourrait exprimer le rapport existant entre le nombre de virus infectieux et le nombre de particules obtenues par culture cellulaire. En effet, une quantité non négligeable de particules incomplètes sont produites lors de la réplication du virus en culture cellulaire ou bien dans les entérocytes d'un malade (Estes, 1990). Ces particules non infectieuses pourraient néanmoins contenir l'ARN viral cible de l'amplification. Hejkal *et al.* (1984) estiment qu'à une particule virale, détectée par culture cellulaire à partir de selles, correspond environ  $3,8 \cdot 10^5$  particules virales non infectieuses. Cette importance du nombre de particule non infectieuses est confirmé par Ward *et al.*, (1986) qui mesure un rapport de  $1,56 \cdot 10^4$  virions pour un virus infectieux à partir de filtrat des selles d'un enfant infecté. En culture cellulaire, ce rapport pourrait être moins important et il serait estimé à un virus infectieux pour 100 particules (Estes, communication personnelle), une estimation qui est confirmée par nos résultats.

Compte tenu du volume de coquillages analysés (25 g de chair de coquillages correspondent à un volume d'environ 20 ml), la sensibilité de détection des virus dans les coques de  $1,3 \cdot 10^4$  ff/25 g est environ 3,5 fois supérieure à celle mesurée avec l'eau distillée. Cette différence est soit liée à des erreurs dans les dilutions, soit réelle. Dans ce dernier cas, la concentration des particules virales lors de la précipitation par le PEG des éluats de coquillages (la méthode en théorie concentre environ 5 fois les virus) pourrait expliquer ce résultat.

La sensibilité de la RT-semi-nested PCR est de 0,07 pg d'ARN introduit dans le mélange réactionnel, ce qui équivaut à 3 500 copies d'ARN, ou encore à 30 virus infectieux. Cette sensibilité est légèrement supérieure à celle mesurée par Gouvea *et al.* (1990a) avec 0,2 à 1 pg d'ARN ou par Xu *et al.* (1990) avec 8 000 particules, à partir du même gène. Mais elle est moins bonne que celle décrite par d'autres auteurs qui ciblaient un gène différent et obtenaient une sensibilité de 500 copies d'ARN par RT-PCR du gène de la protéine VP6 (Wilde *et al.*, 1990) ou de 10 à 1 000 particules virales par RT-semi-nested PCR du gène de la protéine VP4 (Gentsch *et al.*, 1992). La sensibilité de détection des rotavirus est généralement inférieure (de 10 à 1 000 fois) à celle mesurée avec d'autres virus entériques à ARN monocaténares (entérovirus, virus de l'hépatite A), pour lesquels il est parfois détecté moins d'une particule infectieuse (Atmar *et al.*, 1993 ; Le Guyader *et al.*, 1994b ; Kopecka *et al.* 1993). La dénaturation préalable à la rétro-transcription, diminue probablement la sensibilité par rapport aux résultats obtenus avec les virus à ARNs (Wilde *et al.*, 1990).

La mobilité des séquences amplifiées est différente selon la nature du gel d'électrophorèse. En gel de polyacrylamide, la taille des fragments apparaît plus importante qu'en gel d'agarose (Figures 20 et 21). Ceci pourrait être dû à des structures secondaires, de l'ADN amplifié, différentes selon les souches analysées. Selon Lane *et al.* (1992), des torsions de la double hélice d'ADN seraient produites par la succession d'adénine qui crée une courbure de  $20^\circ$ /base (Lane *et al.* 1992). Or, dans le gène de la protéine VP7, il existe des enchaînements



de six bases adénine (Dessen *et al.*, 1990), entraînant la formation de courbures avec un angle de 120° de la molécule d'ADN. En gel de polyacrylamide, ces déformations retardent la migration du fragment par rapport à un fragment linéaire, par contre en gel d'agarose la migration n'est pas altérée (Lane *et al.* 1992). Ce phénomène observé lors des électrophorèses en gel de polyacrylamide pourrait expliquer les différences de tailles apparentes des fragments amplifiés à partir de différents extraits.

Des séquences amplifiées non spécifiques de tailles variables (non expliquées par des différences de mobilité en fonction des séquences virales) sont observées (Figure 23). Il est alors nécessaire d'augmenter la spécificité par hybridation moléculaire des produits d'amplification avec une sonde homologue de séquences de rotavirus.

L'alignement des séquences de différents gènes viraux ne permet pas d'identifier une région hautement conservée entre les amorces R1 et R2 de seminested PCR, il est donc difficile d'identifier une séquence commune à l'ensemble des rotavirus du groupe A (Dessen *et al.*, 1991). En revanche un domaine de la protéine VP7 a une séquence en acides aminés conservée d'une souche à une autre (acides aminés 51 à 63) (Estes, 1990 ; Mattion *et al.*, 1994). Cette région serait indispensable à la rétention de la protéine au réticulum endoplasmique lors de la réplication virale. La séquence de la sonde est celle de la séquence nucléotidique de la souche de rotavirus humain Wa qui code pour ces acides aminés (Figure 12, Tableau 4).

L'alignement de la séquence de la sonde avec celle de gènes de virus décrits dans GenBank, indique des homologies complètes avec 26 séquences, toutes de rotavirus d'origine humaine. Des homologies partielles (95 à 90 %) sont trouvées avec 3 séquences de rotavirus humains, 5 de rotavirus bovins et une séquence de rotavirus ovin (Dessen *et al.*, 1990). Environ 44 % (35/79) des séquences de rotavirus humains et animaux ont un fort pourcentage d'homologie avec la sonde. Mais la sonde semble plus spécifique des virus d'origine humaine, avec 85 % (29/34) des séquences humaines qui sont très homologues, contre seulement 17 % (6/35) des séquences de virus animaux. La sonde présente des pourcentages d'homologie plus faibles (inférieur ou égale à 85 %) avec les autres séquences de rotavirus dont le rotavirus SA11 (85 % d'homologie), mais aussi avec des séquences d'autres virus non entériques. La spécificité d'hybridation est obtenue par la température d'hybridation de 42 °C. A cette température la sonde ne devrait pas hybrider avec des séquences qui ne sont pas des séquences de rotavirus. En effet dans ces conditions, la sonde n'hybride pas avec la séquence du virus SA11 (résultats non présentés) qui présente 85 % d'homologie. Il est également probable, que d'autres séquences de rotavirus principalement d'origines animales présentant un pourcentage d'homologie inférieur ou égal à 85 % ne sont pas reconnues. Malgré cela, les conditions d'hybridation n'ont pas été changées car il n'a pas été identifié de séquences plus ubiquitaires entre les amorces de seminested PCR.

## II. RT-PCR QUANTITATIVE

L'emploi d'un contrôle interne compétitif est de plus en plus utilisé pour estimer le nombre de copies de génomes de virus à ARN et ADN dans des prélèvements cliniques ou de l'environnement par RT-PCR ou PCR (Atmar *et al.*, 1995 ; Clossais Besnard et Andre, 1994 ; Ravaggi *et al.*, 1995 ; Secchiero *et al.* 1995 ; Steffan et Atlas, 1991). Cette méthode ne nécessite pas l'analyse de séries de dilutions de l'échantillon à titrer, ni d'interrompre l'amplification avant que la phase plateau de la réaction d'amplification soit atteinte (Morrisson et Gannon, 1994 ; Siebert, 1993). Le rapport entre la quantité de séquences amplifiées à partir de l'ARN viral et du contrôle interne est directement proportionnel à la quantité d'ARN viral introduite dans la réaction et le résultat est indépendant des variations dans les conditions d'amplification (concentration d'un des composants plus ou moins importante pouvant interférer sur le rendement de la réaction) (Siebert, 1993). Toutefois, cette technique n'a pas été appliquée au dénombrement de séquences d'ARNdb.

Le contrôle interne réalisé dans le but de la quantification des rotavirus est compétitif, la séquence du contrôle interne, comme celle du virus, est reconnue par les amorces Beg9, R1 et R2 (Figure 24). Mais aussi par sa structure ARNdb, le contrôle interne permet de tenir compte des rendements des étapes de dénaturation et de transcription précédant la réaction d'amplification. Le rapport entre la quantité d'ADN obtenue à partir de la séquence virale et celle obtenue avec le contrôle interne est mesuré par analyse densitométrique des gels colorés au nitrate d'argent. Cette méthode simple et rapide a également l'avantage d'être automatisée. L'intensité de la coloration est fonction du nombre de copies soumises à amplification, ceci dans une certaine limite (environ de 1 à 1 000 copies d'ARNdb analysées) (Figure 26). Cependant, il est toujours possible de diluer les échantillon riches en ARN viral avant l'analyse, pour se retrouver avec des résultats interprétables.

Les résultats de l'amplification d'une quantité croissante d'ARN viral en présence d'une quantité constante de contrôle interne montrent l'existence d'une relation linéaire entre le rapport des produits d'amplification et le nombre de copies d'ARN viral initial (Figure 27). La RT-PCR réalisée avec le contrôle interne permet donc de comparer la quantité d'ARNdb viral dans des échantillons, sans réaliser de séries de dilutions, en comparant les rapports entre la quantité d'ADN amplifiés de virus et celle de contrôle interne. Toutefois, la relation est valable pour des différences de concentration en d'ARN viral et de contrôle interne variant de 0,1 à 100 fois. En présence d'un déséquilibre important entre le nombre de copies d'ARNdb des deux molécules, l'amplification de la molécule majoritaire se fait aux dépens de l'amplification de la molécule minoritaire. Ce rapport de molarité entre les deux molécules d'ARN est pris en compte pour l'analyse par RT-PCR quantitative, pour diminuer le risque d'amplifier une unique séquence.

Le contrôle interne peut-être également utilisé lors de réactions d'amplification, pour révéler la présence d'inhibiteurs (Cone *et al.*, 1992). Mais l'usage du contrôle interne que nous avons réalisé n'est pas adapté à la RT-seminested PCR. Une confusion risque d'être faite entre les séquences amplifiées à partir du virus et des séquences non spécifiques (Figure 25). La formation d'hétéroduplex entre la séquence virale et le contrôle interne pourrait être responsable de ces séquences non spécifiques. Mais de façon plus général, ce phénomène est observé pour toutes les réaction de RT-seminested PCR réalisées avec un excès de séquences.

### **III. STABILITE DU GENOME VIRAL ET MAINTIEN DU POUVOIR INFECTIEUX EN EAU DE MER**

Le principal inconvénient de la RT-PCR est de détecter des génomes de microorganismes (virus ou bactéries), sans donner d'information sur l'intégrité structurale ou fonctionnelle de ces microorganismes et éventuellement sur le maintien de leur pouvoir pathogène (Alvarez *et al.*, 1993 ; Bej et Mahbubani, 1992 ; Steffan et Atlas, 1991). Des études *in vitro* sont réalisées, pour suivre les cinétiques d'altération du pouvoir infectieux et le devenir de l'ARN des rotavirus en eau mer. L'objectif est d'évaluer les risques de détection par RT-PCR de contamination en l'absence de virus infectieux.

#### **III.1. Devenir du virus SA11 en eau de mer artificielle**

La stabilité du pouvoir infectieux du virus SA11 en eau de mer est comparée à celle du génome viral. L'extraction au thiocyanate de guanidium permet d'obtenir le génome des rotavirus de manière simple, rapide et sa détection par RT-PCR ne nécessite pas de phase de purification des extraits. Les risques de variation dans les rendements d'extraction entre le contrôle interne et la séquence virale, ou de contamination entre les échantillons riches en ARN viraux sont ainsi réduits.

La stabilité du génome viral dans l'eau de mer artificielle stérile est importante. Sur les 100 premiers jours d'incubation, le rapport entre l'amplification de l'ARN viral et celle du contrôle interne ne varie pas de façon significative (Figure 30). L'ARN subit peut-être des altérations mais elles ne sont pas détectées par RT-PCR. En revanche, le titre infectieux des prélèvements décline régulièrement en fonction du temps (Figure 28). L'inactivation du virus

est environ 10 fois plus rapide à 20 °C qu'à basse température (Tableau 6). Des phénomènes d'adsorption des virus aux parois des flacons ne peuvent pas expliquer ces résultats, car l'adsorption au verre est rapide (1 jour) et limitée par l'absence d'agitation (Ward et Winston, 1985). L'agrégation des virus entre eux pourrait également diminuer le titre en virus infectieux, mais cette agrégation n'est significative qu'en présence de fortes concentrations de virus comme dans les selles (Melnick et Gerba, 1980 ; Williams, 1985), ce qui n'est pas le cas dans l'eau de mer étudiée.

L'absence de microorganismes (tout du moins au début de l'expérimentation) et l'identité chimique des eaux de mer artificielles incubées à 6 °C et 20 °C permet de supposer que la température est le facteur déterminant. Cette relation avec la température a déjà été montrée pour les rotavirus ou pour d'autres virus entériques (Estes *et al.*, 1979 ; Meng *et al.*, 1987). Selon ces auteurs, l'élévation de température favorise la destabilisation de la capsid virale, ce qui conduirait à une inactivation du virus. A l'opposé, les acides nucléiques n'étant pas détruits par une élévation de température, les ARN seraient toujours détectables en RT-PCR (Sambrook *et al.* 1989).

Des résultats comparables ont été acquis lors d'une étude sur la stabilité de poliovirus en eau de mer synthétique stérile (Le Guyader *et al.*, 1994a). Ces auteurs montrent que 118 jours sont nécessaires pour ne plus identifier en culture cellulaire de virus infectieux (titre initial de  $7,6 \cdot 10^4$  virus infectieux par ml), alors que les ARN viraux sont détectés par RT-PCR après au moins 272 jours d'incubation. Il semble toutefois, que l'ARN monocaténaire de poliovirus subisse des altérations (Enriquez *et al.*, 1993). L'évolution du génome de poliovirus suivi par hybridation moléculaire met en évidence une diminution de 1,5 unité logarithmique à 37 °C en 75 jours dans un tampon salin (PBS) stérile. Là encore, ce déclin est moins important que celui du pouvoir infectieux qui diminue dans le même temps de 4 unités logarithmiques à 37 °C. En revanche à 15 °C, l'évolution des résultats de la culture cellulaire et de l'hybridation moléculaire est comparable. La contamination des milieux stériles par des nucléases ne peut pas être exclue, en particulier les RNases sont des enzymes très résistantes pouvant être actives même après stérilisation par autoclavage (Sambrook *et al.*, 1989). Ces enzymes introduites ou présentes dans les milieux stériles pourraient être responsables de la dégradation du génome de poliovirus. Le génome du virus SA11 est peut être moins sensible aux RNases, ou alors l'eau de mer constitue un milieu défavorable à l'activité des nucléases, ou encore la capsid des entérovirus est plus rapidement dégradée que la triple capsid des rotavirus qui pourrait exercer une action protectrice plus durable sur le génome.

### III.2. Devenir du virus SA11 en eau de mer naturelle

En eau de mer naturelle le titre infectieux diminue plus rapidement qu'en eau artificielle (Figure 28). Cette diminution est également accentuée par l'élévation de la température d'incubation qui comme en eau de mer synthétique est environ 10 fois plus rapide à 20 °C qu'à 6 °C (Tableau 6). La valeur du T90 de 2 jours à 20°C, obtenue avec le virus SA11 dans l'eau d'Argenton, est comparable à celle décrite pour d'autres rotavirus (humain ou animaux), ou d'autres virus entériques dans des eaux de mer naturelles (Fujioka *et al.*, 1980). Cependant, dans certaines études le poliovirus est plus rapidement inactivé que le virus SA11, lui même plus sensible que le virus de l'hépatite A (Chung et Sobsey, 1993 ; Girones *et al.*, 1989 ; Hurst et Gerba, 1980 ; Ward *et al.*, 1986b).

Les microorganismes ou les composants solubles d'origine microbienne comme les enzymes protéolitiques et nucléasiques, contenus dans les eaux naturelles, seraient responsables de la dégradation active des particules virales. De précédentes études montrent une diminution du pouvoir antiviral d'une eau naturelle lorsqu'elle est stérilisée par filtration, ou quand l'eau est autoclavée (Enriquez *et al.*, 1993 ; Girones *et al.*, 1989), ou subit encore d'autres traitements antimicrobiens comme une irradiation aux UV (Ward *et al.* 1986b). L'origine microbienne est encore avancée lorsque l'emploi d'antibiotiques (ampicilline et streptomycine) permet de préserver le pouvoir infectieux de poliovirus en eau de mer naturelle par rapport à l'eau non traitée (Fujioka *et al.*, 1980 ; Girones *et al.*, 1989) ; c'est également le cas quand des bactéries à Gram positif ou négatif, isolées à partir des eaux naturelles, suffisent pour restituer le pouvoir antiviral d'une eau autoclavée dans laquelle elles étaient introduites (Ward *et al.*, 1986b). Cependant, la température d'incubation serait le facteur déterminant, qui conditionne la stabilité du pouvoir infectieux de façon plus significative que la nature de l'eau (Girones *et al.*, 1989 ; Melnick et Gerba, 1980). Comme cela a été précédemment cité, la température agit en déstabilisant les capsides et en augmentant l'activité microbienne contenue dans l'eau naturelle (Fujioka *et al.*, 1980 ; Ward *et al.*, 1986b).

Les activités microbiennes seraient également à l'origine de l'instabilité du génome viral en eau de mer naturelle (Enriquez *et al.*, 1993 ; Tsai et Palmer, 1994 ; Ward *et al.*, 1986b). Les résultats de nos travaux montrent une dégradation de l'ARN viral plus rapide à une température d'incubation de 20 °C qu'à 6 °C. Cependant, la différence entre les cinétiques de dégradation des ARN à 20 °C et 6 °C est moins importante que celle du pouvoir infectieux dans les mêmes conditions (Figures 28 et 30). L'effet température pourrait agir également en augmentant l'activité d'organismes ou d'enzymes nucléasiques. L'instabilité de l'ARNdb du virus SA11 est 3,6 fois plus importante à 20 °C qu'à 6 °C (Tableau 6). Mais la température a un effet plus important sur la diminution du pouvoir infectieux que sur celle du nombre de copies d'ARN

viraux. La comparaison des T90 indique que la perte du pouvoir infectieux est de 2 à 4 fois plus rapide que la dégradation de l'ARN à 6 °C, contre de 7 à 9 fois à 20 °C. Ward *et al.* (1986b) suggèrent que la capsidie joue un rôle protecteur contre l'action des nucléases, et que l'altération préalable des capsides est nécessaire pour permettre la dégradation des ARN. Selon Pancorbo *et al.* (1987), la perte du pouvoir infectieux, en eau douce naturelle, est plus rapide que la diminution de l'antigénicité, ce qui traduirait un maintien des structures de la capsidie après l'inactivation virale.

Le rôle protecteur de la capsidie est confirmé par l'interprétation des résultats obtenus en comparant la stabilité du génome nu et celle du génome encapsidé, dans l'eau de mer naturelle. L'ARN nu n'est plus détecté par RT-PCR après 2 jours d'incubation à 10 °C, alors que l'ARN encapsidé est toujours présent après 6 jours (Tableau 7). Ces résultats sont comparables à ceux obtenus avec le poliovirus dans l'eau de mer naturelle (Tsai *et al.*, 1993 et 1995). Ces auteurs montrent également, qu'en 2 jours à 4 °C, le génome nu de poliovirus n'est plus détecté par RT-PCR. Cette dégradation de l'ARN viral nu est beaucoup plus importante que celle du génome encapsidé qui est toujours détecté par RT-PCR après 21 jours d'incubation dans les mêmes conditions. Tsai *et al.* (1995) révèlent également que la stérilisation de l'eau favorise la stabilité du génome nu, confirmant ainsi l'hypothèse précédemment décrite de l'origine microbienne des activités nucléasiques.

La stabilité des rotavirus mesurée dans les conditions précédemment décrites ne reflète pas dans l'absolu le devenir des rotavirus naturellement rejetés dans l'environnement. Le virus SA11 est choisi comme modèle des rotavirus Certaines souches animales pourraient présenter une stabilité de la capsidie supérieure à celles d'origine humaine (Estes, 1990). Vaughn *et al.* (1987) montrent que le virus simien SA11 est moins sensible à l'ozone que le virus humain Wa ; bien que pour d'autres traitements (physiques ou chimiques), la sensibilité ou la résistance du rotavirus virus SA11 soit peu différente de celle du rotavirus Wa (Meng *et al.*, 1987 ; Vaughn *et al.*, 1986). Egalement, dans les conditions naturelles, les rotavirus ne sont pas sous la forme de particules libres. Dans le milieu hydrique ils ont la propriété de s'adsorber rapidement aux sédiments, ce qui généralement favorise le maintien de leur pouvoir infectieux (Berman et Hoff, 1984 ; Hejkal *et al.*, 1979 ; LaBelle et Gerba, 1979, 1980 et 1982 ; Williams, 1985). L'étude que nous avons réalisée ne prend pas non plus en compte, l'effet d'apports de matières organiques comme source de nutriments pour les microorganismes. Ce facteur pourrait en augmentant l'activité microbienne, réduire le temps de survie des virus entériques, ou bien protéger les virus en leur permettant de s'adsorber sur les microorganismes (Fujioka *et al.*, 1980 ; LaBelle et Gerba, 1982 ; Melnick et Gerba, 1980). Enfin, l'absence de lumière tout au long de cette expérience pourrait favoriser la stabilité des rotavirus, qui comme les autres virus entériques sont sensibles aux UV (Chang *et al.*, 1985 ; Melnick et Gerba, 1980 ; Meng *et al.*, 1987 ; Smirnov *et al.*, 1991 ; Sobsey, 1989).

Ainsi, les études *in vitro* réalisées au cours de ce travail ne reflètent que partiellement la réalité, sur le devenir des rotavirus en eau de mer. Cependant, les résultats pourraient indiquer que les rotavirus rejetés dans le milieu marin perdent leur pouvoir infectieux plus rapidement que leur génome ne subit des altérations ne permettant ainsi plus de l'amplifier. De plus, l'eau de mer contaminée véhiculerait essentiellement des particules virales et la détection d'ARN nus par RT-PCR serait moins fréquente, en raison de l'instabilité de l'ARNdb une fois libéré. Les rotavirus, dans le milieu marin, seraient donc majoritairement sous forme de particules non infectieuses. Après un rejet en mer de virus infectieux, la proportion entre le nombre de particules infectieuses et le nombre total de virions est fonction du temps de séjour, des caractéristiques biologiques de l'eau et de sa température. La température est le principal facteur influençant le devenir des virus, par son action physique mais indirectement en activant les enzymes microbiennes présentes dans le milieu. En hiver et au début du printemps, quand la température de l'eau est basse, le risque de détection de rotavirus infectieux par RT-PCR est plus importante, qu'en été dans des eaux plus chaudes ; néanmoins, le risque n'est pas totalement absent dans le cas d'une contamination récente.

#### **IV. CONTAMINATION DU LITTORAL MARIN PAR LES ROTAVIRUS**

##### **IV.1. Contamination des coquillages**

Peu de travaux décrivent la détection de rotavirus dans des coquillages naturellement contaminés. Comme nous l'avons précédemment montré, Boher (1991) détecte la présence de rotavirus par culture cellulaire dans des huîtres. La concentration virale atteint  $10^3$  ff/100ml de chair de coquillages. Or la sensibilité de la RT-seminested PCR est 10 fois supérieure à ce niveau de contamination, néanmoins seules les particules infectieuses sont détectées par culture cellulaire. Il est donc nécessaire de savoir si la RT-seminested PCR est adaptée pour déceler la présence de contaminations virales dans des coquillages naturellement contaminés.

Au cours des études *in situ* (Morbihan et Loire-Atlantique), 44 prélèvements de coquillages ont été analysés. Différentes espèces ont été collectées : des coquillages fouisseurs tels que les palourdes et les coques, ainsi que des coquillages non fouisseurs comme les huîtres et les moules. La présence de rotavirus est mise en évidence dans 25 % (11/44) des prélèvements de coquillages.

Comme de précédentes études sur les rotavirus et sur d'autres virus entériques l'ont montré (Boher 1991 ; Goyal *et al.*, 1983), il n'existe pas de relation entre le niveau de contamination en coliformes fécaux et la présence d'ARN viral dans les coquillages analysés. Les prélèvements de coquillages positifs par RT-seminested PCR ont dans 45 % (5/11) des cas, un niveau acceptable de coliformes fécaux (< 300 coliformes pour 100 g de chair de coquillages). Inversement, sur les 52 % (23/44) des prélèvements contaminés par les bactéries entériques (concentration supérieure au seuil de salubrité) 26 % (6/23) sont également trouvés contaminés par les rotavirus.

Pour un même site d'étude, des différences importantes dans la contamination virale sont trouvées en fonction des coquillages analysés. Pour la baie de La Baule, 58 % (7/12) des prélèvements de moules sont positifs par RT-seminested PCR, alors qu'aucun prélèvement de coques ne permet de déceler la présence de contamination par les rotavirus (Tableau 11). Deux hypothèses peuvent expliquer l'absence de contamination d'un point de vue virologique des coques. Soit les coques analysées ne sont pas contaminées du fait par exemple de leur mode de vie (organismes fouisseurs). Cette hypothèse est en contradiction avec les résultats rapportant la présence de rotavirus en concentration plus abondante dans les sédiments que dans l'eau sus-jacente (Rao *et al.*, 1984) et sur le rôle des particules sédimentaires dans la contamination des coquillages (Landry *et al.*, 1983). Toutefois, nous avons cité une étude montrant l'altération du pouvoir infectieux de rotavirus au contact de sédiments (Chung et Sobsey, 1993). Cette diminution du pouvoir infectieux, comme nous l'avons précédemment montré, peut s'accompagner d'une dégradation de l'ARN viral.

Mais l'hypothèse la plus probable est celle d'une contamination des coques non mise en évidence par la technique employée. En effet, 41 % (5/12) des extraits d'acides nucléiques purifiés obtenus à partir des prélèvements de coques contiennent des inhibiteurs de la RT-seminested PCR, contre 8 % (1/12) seulement des extraits obtenus à partir des moules. La copurification d'inhibiteurs comme les acides humiques dans les coquillages peut entraver la détection des virus (Atmar *et al.*, 1993). La mise en évidence des inhibiteurs peut s'effectuer en introduisant directement dans les échantillons le contrôle interne d'amplification précédemment décrit, pour témoigner du bon déroulement des réactions enzymatiques d'amplification (Cone *et al.*, 1992). Mais comme les essais réalisés sur le contrôle interne le montrent, l'interprétation de la RT-seminested PCR est gênée par la formation d'hétéroduplex.



En raison des risques de contamination (obtention de faux positifs) ou de perte de matériel génétique (faux négatifs), des purifications supplémentaires ne sont pas effectuées sur les extraits contenant des inhibiteurs. En revanche, de récents travaux sur la contamination virale des coquillages montrent que les virus se concentrent essentiellement dans les organes digestifs de l'animal (Romalde *et al.*, 1993). Des extractions réalisées uniquement à partir de l'hépatopancréas et du tube digestif augmentent la sensibilité et diminuent également les risques d'inhibitions apportées par les autres tissus (Atmar *et al.*, 1995).

Les coquillages prélevés dans la région du Morbihan ont également été utilisés pour rechercher la présence d'ARN du virus de l'hépatite A et d'entérovirus (Annexe 6). Lorsque ces résultats sont comparés à ceux obtenus sur la détection des rotavirus, dans un cas l'ARN de rotavirus est le seul à être mis en évidence, à deux reprises, l'ARN du virus de l'hépatite A est détecté en même temps que l'ARN de rotavirus et un cas de triple contamination est observé. Des prélèvements de coquillages étaient également contaminés par de l'ARN du virus de l'hépatite A ou/et d'entérovirus, mais sans trace de séquences de rotavirus. Ces données confirment de précédentes observations sur l'absence de relation entre les contaminations par les différents virus dans l'environnement comme les eaux marines ou les coquillages (Boher, 1991 ; Gerba *et al.*, 1979 ; LaBelle *et al.*, 1980).

#### **IV.2. Contamination des eaux**

La RT-semi-nestée PCR a été également utilisée pour rechercher des contaminations virales dans des eaux de rivière des effluents de station et des eaux usées naturellement contaminées. En Martinique, l'aspect lié à l'assainissement des zones rurales, urbaines et touristiques est actuellement considéré comme une préoccupation majeure pour les prochaines années. Lors des différentes campagnes de prélèvements, il a été constaté que de nombreux rejets urbains échappent encore aux procédés d'épuration et les stations présentent souvent des capacités de traitement insuffisantes (Pommepuy et Le Guyader, communication personnelle). L'analyse des prélèvements d'eaux de surface du littoral de la baie de Fort de France met en évidence la contamination des eaux par les rotavirus, en particulier à partir des prélèvements effectués dans la région nord de la baie de Fort de France, où se concentre essentiellement la population et également à la pointe sud de la baie qui est en voie d'urbanisation (Figure 13, Tableau 9). En revanche, il n'est pas détecté de rotavirus dans les prélèvements effectués à l'est, surtout industriel.

Ces données sur la présence de rotavirus dans les prélèvements d'eaux ont pu être comparées avec les résultats d'analyses menées en parallèle sur la contamination virale (virus de l'hépatite A et entérovirus) et sur la charge bactérienne (coliformes fécaux) (Annexe 7). Lors de l'étude sur la qualité microbiologique des eaux, tous les prélèvements analysés qui sont contaminés par les rotavirus, contiennent également des séquences du virus de l'hépatite A et/ou d'entérovirus. Jamais de séquences de rotavirus ne sont trouvées seules, alors que les entérovirus et le virus de l'hépatite A sont détectés en l'absence de rotavirus. De plus, les résultats de ces études ne montrent pas de corrélation significative entre la présence de bactéries et de virus entériques. En effet, si certains prélèvements, très contaminés bactériologiquement, sont contaminés par les virus, la présence de virus est également détecté dans les prélèvements d'eaux de rivières peu ou faiblement contaminées en coliformes fécaux (Annexe 7).

Comme pour les prélèvements de coquillages, il n'y a pas de corrélation significative entre la contamination virale et bactérienne. La détection de différentes espèces virales dans les eaux de surface, ainsi que l'absence de relations entre les contaminations virales et bactériennes, est fréquemment décrite (Deetz *et al.*, 1984 ; Gerba *et al.*, 1984b ; Keswick *et al.*, 1984 ; Rose *et al.*, 1987 ; Smith et Gerba, 1982). Des observations comparables sont faites à partir de prélèvements d'eaux estuariennes et marines (Gerba *et al.*, 1979 ; LaBelle *et al.*, 1980).

Ces résultats sur la qualité des eaux de rivière sont certainement liés au manque de structure d'assainissement dans la ville de Fort de France ou au dimensionnement insuffisant des structures existantes par exemple au sud de la baie (Pommepuy et Le Guyader, communication personnelle). La dissémination de ces virus dans les eaux de baignades et dans les zones de production coquillaires (les coquillages "soudons" consommés par les touristes en Martinique) pourrait poser des problèmes de santé publique.

Les eaux de la station d'épuration de Livery en Loire-Atlantique ont été également analysées par RT-semi-nested PCR (Tableau 11). Au niveau de la station, les prélèvements d'eaux épurées sont plus fréquemment contaminés que ceux d'eaux brutes. La présence d'inhibiteurs dans deux extraits d'eaux brutes peut expliquer les résultats négatifs de la RT-semi-nested PCR. Pour les mêmes raisons précédemment citées, une purification supplémentaire n'a pas été entreprise pour ces extraits (Figure 36). La différence de contamination est également expliquée par des origines différentes des eaux brutes et des eaux épurées. En effet, le prélèvement d'eau épurée ne correspond pas à la même masse d'eau brute qui a subi

l'ensemble du traitement d'épuration. Les deux prélèvements sont effectués presque simultanément alors que le traitement prend plusieurs heures, la durée étant fonction des flux d'eaux usées entrant dans la station (M. Guerin, responsable de la station de Livery, communication personnelle). De plus, les eaux épurées correspondent à des eaux homogénéisées par le procédé d'épuration, alors que les prélèvements d'eaux brutes sont des eaux d'une qualité plus hétérogène dans le temps qui est le reflet de l'activité dans les foyers raccordés au réseau.

Ces résultats comme ceux obtenus à partir des prélèvements de la Martinique montrent que les traitements de décantation et de floculation ne débarrassent pas les eaux de la contamination virale. Plus de 50 % (16/31) des prélèvements d'effluents et des eaux de rivières rejetées ou destinées à être rejetés en mer sont contaminés.

#### **IV.3. Relation épidémiologique entre la contamination du littoral et l'état sanitaire de la population**

Peu de travaux ont mis en relation la présence des virus entériques dans les coquillages avec la contamination des eaux de station ou avec les souches infectant la population. Pourtant, une telle relation épidémiologique entre les virus présents dans les selles, leur dissémination dans l'environnement et une possibilité de réinfection de la population via les coquillages contaminés, a été proposée par Gerba *et al.* dès 1975. Ce cycle a été argumenté par la caractérisation de virus dans différents échantillons naturels ou par la capacité des virus à persister dans les différents milieux. L'une des difficultés rencontrées dans de telles études épidémiologiques réside dans la caractérisation des souches identifiées pour pouvoir les comparer entre elles.

L'amplification enzymatique procure à partir des échantillons contaminés une partie du matériel génomique viral. L'analyse de la séquence complète, ou du RFLP du fragment amplifié permet de caractériser les virus (Gouvea *et al.*, 1993 ; Ushijima *et al.* 1994 ; Vonsover *et al.*, 1993). Une telle approche a été récemment employée pour comparer les séquences génomiques de virus de l'hépatite A ou de virus de Norwalk impliqués dans des épidémies et des séquences virales amplifiées à partir de coquillages contaminés (Apaire-Marchais *et al.*, 1995 ; Le Guyader *et al.*, 1995b). Mais la comparaison des séquences n'a pas permis d'assimiler les deux évènements, contaminations des coquillages et infections humaines à la même souche.

L'analyse du RFLP des séquences amplifiées a été utilisée pour établir des relations entre la contamination de l'environnement littoral et le contexte épidémiologique des infections à rotavirus. Les relations épidémiologiques présentées dans cette étude s'appuient sur l'identité des profils de restriction des séquences amplifiées. Mais l'analyse du RFLP ne permet pas d'affirmer l'identité des souches virales. Une partie seulement du gène de la protéine VP7 est analysée (303 pb sur 1 062 pb) et ce gène représente seulement 6 % du génome total (la taille du génome est d'environ 18 522 pb). C'est donc sur moins de 2 % du génome que sont recherchées les similitudes.

Lors de la période d'échantillonnage effectuée en Martinique, une recrudescence des infections à rotavirus semblait atteindre les enfants martiniquais. De telles recrudescences sont observées tout au long de l'année dans l'île (Laboratoire d'analyse de l'hôpital de Fort de France, communication personnelle). Au moins deux souches sont à l'origine de la contamination des eaux de surfaces prélevées autour de la baie de Fort de France, mais ces souches sont différentes de celles caractérisées à partir de selles d'enfants malades pendant la même période (Figures 32 et 34). Ces selles prélevées à l'hôpital n'étaient peut-être pas représentatives de toutes les infections survenues dans la population. Les profils de restriction des séquences amplifiées à partir des prélèvements ont donc été comparés aux résultats de banques de données. L'une des séquences virales trouvée dans les eaux au nord de la baie est très certainement d'origine humaine. L'origine de la seconde est moins précise mais probablement animale (Tableau 10).

La relation entre la contamination des coquillages par les rotavirus, la contamination des eaux de station d'épuration et les infections survenant dans la population, a été étudiée à partir des résultats des analyses effectuées sur les prélèvements de coquillages et d'eaux de station effectués en Loire-Atlantique. La comparaison des fréquences de contamination des coquillages et des eaux de station montre que la contamination des moules de la plage Benoît pourrait être liée à la contamination virale des rejets de la station de Livery lors des mois d'hiver, de printemps et d'automne (Tableau 11).

La caractérisation des séquences virales obtenues à partir des extraits d'eau de station et de moules, ne permet pas d'établir clairement une relation entre les deux contaminations (Figure 38). La diversité des séquences virales, révélée par la diversité des profils de restriction, est plus importante dans les eaux épurées que celle observée dans les moules. Seul un profil de restriction est commun aux deux types de prélèvements et des homologies partielles (pouvant correspondre à une origine commune) rapprochent les autres séquences. Cette diversité moins importante dans les coquillages est comparable à celle détectée dans les eaux de surface de la Martinique. Comme l'indiquent les résultats de l'étude *in vitro* sur l'amplification compétitive, la diminution du nombre de séquences différentes, détectées par RT-semi-nested PCR, peut être

due à la détection seulement des génomes viraux les plus abondants ; ou bien, les séquences isolées dans l'environnement correspondent à des particules virales plus résistantes que d'autres aux conditions physico-chimiques rencontrées dans le milieu extérieur. Par exemple les rotavirus animaux perdraient moins facilement leur capsid externe que les virus humains (Estes, 1990).

L'origine de ces séquences virales trouvées dans les prélèvements de moules est imprécise (Tableau 13). Elle est parfois attribuée à des virus humains, mais aussi rapprochée de virus bovin (l'hypothèse de rencontrer des virus simiens étant peu probable). Cette disparité dans l'origine des virus est également retrouvée dans les eaux de station (Tableau 13). Certaines séquences virales ont des profils comparables à ceux de séquences de rotavirus animaux, bovins, ou porcins, mais la majorité correspond à des séquences de virus d'origine humaine.

Cette dominance ne semble pas liée à un déséquilibre entre le nombre de rotavirus humains et animaux décrits dans les banques de données, car il y a presque autant de virus des deux origines décrits dans GeneBank et EMBL (47 rotavirus humains contre 46 virus animaux, mais par espèce l'origine humaine est majoritaire [Annexe 1]) (Dessen *et al.*, 1990). La prépondérance de virus humains est expliquée par le fonctionnement du collecteur de la station de Livery, qui véhicule les eaux provenant d'équipements sanitaires et non d'exploitations agricoles, mais ceci n'explique pas la présence de rotavirus animaux. En effet, les excréments animaux sont soit stockés dans des fosses ou sur des lisiers puis utilisés pour amender les terres cultivées, ou bien laissés sur les lieux de pâturages. Cependant la station traite fréquemment des eaux de vidanges apportées par camion dont l'origine est parfois imprécise et la décharge illicite d'eaux usées provenant d'abattoirs a été constatée (M. Guerin, responsable de la station de Livery, communication personnelle). Il est également envisageable que des rotavirus animaux puissent infecter l'homme, généralement en provoquant des infections bénignes ou asymptomatiques (Hoshino et Kapikian, 1994).

A la différence de l'étude réalisée en Martinique, des similitudes entre les séquences virales détectées dans les eaux épurées et dans les selles d'enfants sont observées (Figure 38). La relation entre la recrudescence des infections à rotavirus et la contamination des eaux épurées est accentuée par l'augmentation simultanée de la diversité des souches en circulation dans la population et l'augmentation de la diversité des séquences virales dans les eaux épurées. Une quasi simultanéité (au mois près) d'apparition de certains profils obtenus à partir des selles d'enfants et des eaux de station est observée et conforte l'hypothèse que l'apparition des cas cliniques à l'hôpital de Saint-Nazaire reflète l'augmentation des infections à rotavirus au niveau de la population (les eaux usées de l'hôpital n'étant pas traitées par la station de Livery).

Ce décalage dans l'apparition des souches peut être une explication de l'absence de corrélation trouvée en Martinique, où les échantillons cliniques ont été prélevés sur un jour. Malgré le suivi régulier des infections cliniques lors de l'étude en France métropolitaine, la relation n'est pas absolument fidèle. Certaines souches dont l'origine est humaine étaient identifiées à partir de la contamination des eaux de station et non à partir des selles. Comme nous l'avons précédemment cité, ces souches de rotavirus ont provoqué des infections asymptomatiques, ou des troubles ne nécessitant pas une hospitalisation (Kapikian et Chanoc, 1990 ; Christensen, 1989). Toutefois, ces sujets seraient capables d'excréter dans leurs selles des particules virales (Ward *et al.*, 1986b).

Lors de cette étude sur le littoral Loire-Atlantique, la diversité des contaminations et des infections se restreint au mois d'hiver et du printemps, ce qui souligne le caractère saisonnier de ce phénomène qui correspond aux recrudescences hivernales et printanières généralement décrites pour les pays tempérés (Figure 3) (Cook *et al.* 1990). Une telle diversité des virus à l'origine de la contamination des eaux ne semble pas avoir été décrite auparavant. Des études épidémiologiques sur des infections à rotavirus montrent l'identification de différents sérotypes et électrophérotypes de souches de rotavirus lors d'un même mois ou lors d'une même période de recrudescence (Noel *et al.*, 1991 ; Tabassum *et al.*, 1994). La majorité (33 %) des profils de restriction, caractérisés à partir des séquences virales détectées lors des études *in situ*, correspond à des séquences de rotavirus de sérotype G1. Ce sérotype serait le plus fréquemment caractérisé à partir des souches virales humaines (Woods *et al.*, 1992). Mais il est également montré qu'une telle dominance de sérotypes peut changer d'une année à l'autre (Noel *et al.*, 1991).

L'analyse du RFLP montre des similitudes entre les séquences virales détectées en Martinique et en France métropolitaine (Figures 32, 34 et 37). Le profil de restriction caractérisé à partir des séquences détectées dans les prélèvements d'eau au nord de la baie de Fort de France (profil EMa) est identique au profil D obtenu à partir des eaux de station d'épuration Livery et des selles d'enfants hospitalisés à Saint Nazaire. La séquence détectée dans l'eau prélevée au sud de la baie (profil EMb) est comparable à une séquence détectée dans les eaux brutes de la station d'épuration (profil L). Les selles d'enfants Martiniquais contiennent également des séquences virales aux profils comparables à ceux caractérisés à partir de souches humaines et d'eaux de station d'épuration (SMa = Profil I; SMb = Profil H et SMc = Profil F). L'origine humaine commune à tous ces virus, détectés dans l'environnement et dans les prélèvements cliniques, explique certainement ces similitudes.

## **CONCLUSION**

La RT-semi-nested PCR associée à l'analyse du RFLP est une technique sensible et spécifique permettant d'obtenir des informations sur la présence d'une contamination virale et sur son origine. Ces données sont importantes pour mesurer l'impact de la dissémination des particules virales sur la qualité de l'environnement et pour établir des relations avec le développement d'infections dans la population humaine.

Le principal avantage de l'analyse du RFLP par rapport au séquençage réside dans la facilité de mise en évidence de la diversité des séquences virales détectées dans les prélèvements. Inversement l'analyse de cette diversité, telle que nous l'avons exécutée, est fastidieuse. Le clonage de séquences amplifiées et l'analyse du RFLP des différents clones pourraient être envisagés pour simplifier l'identification des différentes souches à l'origine de la contamination d'un échantillon.

La méthodologie présentée dans ce travail, bien qu'ayant donné des résultats satisfaisants pourrait être améliorée. La concentration des virus à partir de l'hépto-pancréas des coquillages est actuellement évaluée au laboratoire ainsi que l'extraction des ARN au thiocyanate de guanidium ou la purification par le CTAB afin de réduire la présence d'inhibiteurs. Les premiers résultats révèlent la présence de rotavirus dans des prélèvements de coques, résultats qui auparavant n'avaient pas été obtenus lors d'analyses de coquillages naturellement contaminés. Ce nouveau protocole de préparation des échantillons semble donc mieux adapté à l'analyse de différentes espèces de coquillages.

Une des améliorations majeures apportée à la technique de détection par RT-PCR est la possibilité d'obtenir une estimation quantitative du résultat. Le contrôle interne tel que nous l'avons développé nous a permis d'évaluer le nombre de particules virales présentes lors d'essais *in vitro* réalisés pour évaluer la persistance du virus dans diverses conditions. Cette technique réalisée en parallèle avec la culture cellulaire a montré qu'il pouvait exister, en eau naturelle et à basse température, une corrélation entre la présence de particules virales infectieuses et la détection du génome viral par RT-PCR. Cette méthode, bien que nécessitant encore des améliorations techniques, pourrait trouver son application dans de nombreuses expérimentations comme par exemple le suivi de l'épuration de coquillages contaminés.



Le travail expérimental réalisé a permis de montrer la présence de souches de rotavirus dans l'environnement. Si les risques d'une contamination bactérienne et virale sont connus pour les gisements de coquillages situés à proximité de rejets d'eaux polluées, en revanche, cette étude révèle que lors de périodes de recrudescence des infections à rotavirus, les stations d'épuration disséminent dans l'environnement un grand nombre de souches d'origine humaine ou animale. Il semble donc que la diversité des souches d'origine humaine détectées dans l'environnement soit liée au contexte épidémiologique des infections à rotavirus dans la population. Cette relation doit être confirmée par de nouvelles études *in situ* sur au moins une année supplémentaire, car la diversité des souches dans une population évolue. Ainsi, sur l'année 1994 dans la population infantile du littoral Loire-Atlantique, la diversité des souches était moins importante. Cette diminution de la diversité est-elle accompagnée d'une diminution de la diversité des souches dans les eaux usées ?

La détection de contaminations virales par RT-PCR dans l'environnement, pendant les mois d'hiver, est importante sur le plan du risque sanitaire. En effet, les études *in vitro* montrent une relation plus étroite entre la détection de l'ARN viral et la présence de rotavirus infectieux à basse température. Des études complémentaires, en présence de sédiments, d'une agitation, de lumière, de matière organique ou après action de désinfectants, permettraient d'évaluer précisément leur devenir dans l'environnement. D'autre part, il serait intéressant d'étudier grâce à des méthodes biochimiques l'effet de différents désinfectants (UV, ozone, acide peracétique) sur les constituants du virion (structure de la capsid, protéines, acides nucléiques). La connaissance des mécanismes et des cinétiques d'action des désinfectants est fondamentale pour utiliser un traitement à bon escient et réduire de façon importante le rejet de virus infectieux dans l'environnement.

Parallèlement aux altérations importantes des virus dans l'environnement entraînant leur inactivation, n'y aurait-il pas des modifications des acides nucléiques, ou des protéines de structures ? Ces composants impliqués dans l'attachement aux cellules et/ou dans la transcription pourraient alors peut-être modifier les possibilités de réplication virale. Dans l'éventualité de telles modifications, il est important de développer des techniques sensibles et fiables qui peuvent apporter des réponses sur l'état des différents composants du virion.

## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

**Abad, F.X., R.M. Pinto, and A. Bosch.** 1994a. Survival of enteric viruses on environmental fomites. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:3704-3710.

**Abad, F.X., R.M. Pinto, J.M. Diez, and A. Bosch.** 1994b. Disinfection of human enteric viruses in water by copper and silver in combination with low levels of chlorine. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:2377-2383.

**Alvarez, A., E.A. Hernandez-Delgado, and G.A. Toranzos.** 1993. Advantages and disadvantages of traditional and molecular techniques applied to the detection of pathogens in waters. *Wat. Sci. Tech.* **27**:253-256.

**Ansari, S.A., V.S. Springthorpe, and S.A. Sattar.** 1991. Survival and vehicular spread of human rotaviruses: possible relation to seasonality of outbreaks. *Rev. Infect. Dis.* **13**:448-461.

**Apaire-Marchais, V.** 1994. Le genome du virus de l'hépatite A. Mise au point de techniques de détection chez l'homme et dans l'environnement. Etude de souches d'une épidémie. Thèse de doctorat. Sciences de la vie et de la santé. Université de Nantes, Faculté de pharmacie.

**Atmar, R.L., F.H. Neill, J.L. Romalde, F. Le Guyader, C.M. Woodley, T.G. Metcalf, and M.K. Estes.** 1995. Detection of Norwalk virus and hepatitis A virus in shellfish tissues with PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:3014-3018.

**Atmar, R.L., T.G. Metcalf, F.H. Neill, and M.K. Estes.** 1993. Detection of enteric virus in oysters by using the polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:631-635.

**Ballard, A., M.A. McCrae, and U. Desselberger.** 1992. Nucleotide sequences of normal and rearranged RNA segments 10 of human rotaviruses. *J. Gen. Virol.* **73**:633-638.

**Bej, A.K. and M.H. Mahbubani.** 1992. Application of the polymerase chain reaction in environmental microbiology. *PCR Methods Applic.* **1**:151-159.

- Belin, C., D. Claisse, L. Miossec, J.P. Berthome, A. Grouhel, B. Raffin et M. Joanny.** 1993. Qualité du milieu marin littoral. IFREMER DEL. La contemporaine, Nantes.
- Bemiss.J.A., M.M. Logan, J.D. Sample, and G.P. Richards.** 1989. A method for the enumeration of poliovirus in selected molluscan shellfish. *J. Virol. Methods.* **26**:209-218.
- Beril, C., S. Boher, and L. Schwartzbrod.** 1991. Detoxification by sephadex LH20 of seafood concentrates for rotavirus assay. *Wat. Sci. Tech.* **24**:417-421.
- Beril, C. et L. Schwartzbrod.** 1989. Détection des rotavirus dans les moules. *Microbiol. Alim. Nut.* **7**:175-182.
- Berman D. and 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, and 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, and B.J. Ruck.** 1973. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with viral gastroenteritis. *Lancet.* **2**:1281-1283.
- Boher, S. and L. Schwartzbrod.** 1993. Study of viral purification of oysters. *Wat. Sci. Tech.* **27**:55-60.
- Boher, S.** 1991. Analyse virologique des huitres et étude des cinétiques d'accumulation et de décontamination virale. Thèse. Université de Nancy I.
- Bosch, A., R.M. Pinto, A.R. Blanch, and J.T. Jofre.** 1988. Detection of human rotavirus in sewage through two concentration procedures. *Wat. Res.* **22**:343-348.
- Brüssow, H., O. Nakagomi, G. Gerna, and W. Eichhorn.** 1992. Isolation of an avianlike group A rotavirus from a calf with diarrhea. *J. Clin. Microbiol.* **30**:67-73.
- Bryden, A.S., H.A. Davies, M.E. Thouless, and T.H. Flewett.** 1977. Diagnosis of rotavirus infection by cell culture. *J. Med. Microbiol.* **10**:121-125.

**Catherine, M., B. Beliaeff, et A. Pezeron.** 1991. Etude de salubrité du gisement naturel de coques (*Cerastoderma edule*) de la plage Benoît en baie du Pouliguen, Loire-Atlantique (1989-1990). IFREMER DEL, Rapport Interne, Nantes.

**Chang, J.C.H., S.F. Ossof, D.C. Lobe, M.H. Dorfman, C.M. Dumais, R.G. Quall, and J.D. Johnson.** 1985. UV inactivation of pathogenic and indicator microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**:1361-1365.

**Chomczynski, P. and N. Sacchi.** 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**:156-159.

**Christensen, M.L.** 1989. Human viral gastroenteritis. *Clin. Microbiol. Rev.* **2**:51-89.

**Chung, H., and M.D. Sobsey.** 1993. Comparative survival of indicator viruses and enteric viruses in seawater and sediment. *Wat. Sci. Tech.* **27**:425-428.

**Clossais Besnard, N. and P.M. Andre.** 1994. Automated quantitative determination of hepatitis C virus viremia by reverse transcription-PCR. *J. Clin. Microbiol.* **32**:1887-1893.

**Cohen, J.** 1977. Ribonucleic acid polymerase activity associated with purified calf rotavirus. *J. Gen. Virol.* **36**:395-402.

**Cone, R.W., A.C. Hobson, and M.-L.W. Huang.** 1992. Coamplified positive control detects inhibition of polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* **30**:3185-3189.

**Cook, S.M., R.I. Glass, C.W. LeBaron, and M.-S. Ho.** 1990. Global seasonality of rotavirus infections. *Bull. WHO.* **68**:171-177.

**Coulson, B.S.** 1993. Typing of human rotavirus VP4 by an enzyme immunoassay using monoclonal antibodies. *J. Clin. Microbiol.* **31**:1-8.

**Crawford, S.E., M. Labbé, J.C. Cohen, M.H. Burroughs, Y.J. Zou, and M.K. Estes.** 1994. Characterization of virus-like particules produced by the expression of rotavirus capsid proteins insect cells. *J. Virol.* **68**:5945-5952.

**Cubitt, W.D.** 1991. A review of the epidemiology and diagnosis of waterborne viral infections. *Wat. Sci. Tech.* **24**:197-203.

**Dahling, D.R., R.S. Safferman, and B.A. Wright.** 1989. Isolation of enterovirus and reovirus from sewage and treated effluents in selected puerto rican communities. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**:503-506.

**De Champs, C., H. Laveran, H. Peigue-Lafeuille, M. Chambon, F. Demeocq, J. Gaulme, and D. Beytout.** 1991. Sequential rotavirus infections: characterization of serotypes and electrophoretotypes. *Res. Virol.* **142**:39-45.

**Deetz, T.R., E.M. Smith, S.M. Goyal, C.P. Gerba, J.J. Vollet III, L. Tsai, H.L. Dupont, and B.H. Keswick.** 1984. Occurrence of rota- and enteroviruses in drinking and environmental water in a developing nation. *Water Res.* **18**:567-571.

**De Leon, R. and C.P. Gerba.** 1991. Detection of rotaviruses in water by gene probes. *Wat. Sci. Tech.* **44**:281-284.

**Deng, M.Y., S.P. Day, and D.O. Cliver.** 1994. Detection of hepatitis A virus in environmental samples by antigen-capture PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:1927-1933.

**Dessen, P., C. Fondrat, C. Alencien, C. Mugnier.** 1990. Bisanse: a french service for access to molecular sequences databases. *Comp. Appl. in Biosci.* **6**:355-356.

**Directive européenne.** 1991. Directive du Conseil du 15 juillet 1991 fixant les règles sanitaires régissant la production et la mise sur le marché de mollusques bivalves vivants. 91/492/CEE. p. 1-13. J.O. n° L268 du 24.9.91.

**Directive européenne.** 1975. Directive du conseil du 8 décembre 1975 concernant la qualité des eaux de baignade. 76/160/CEE. p. 1-7. J.O. n° L31 du 5.2.76.

**Divizia, M., G. Morace, R. Gabrieli, G. Pisani, and A. Panà.** 1993. Application of the PCR technique to the detection of hepatitis A virus in the environment. *Wat. Sci. Tech.* **27**:223-225.

**Dupont, J., D. Ménard, C. Hervé, F. Chevalier, B. Bélieff, and B. Minier.** 1996. Rapid estimation of *Escherichia coli* in live marine bivalve shellfish using automated conductance measurement. *J. Appl. Bacteriol.* in press.

**Dupont, J., D. Ménard, C. Hervé, and B. Minier.** 1994. Analytical procedure for use of conductance measurement to estimate *Escherichia coli* in shellfish. *J. Appl. Bacteriol.* **77**:296-302.

**Eiden, J.J., S.-B. Wee, and 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.

**Eiden, J.J., J. Wilde, F. Firoozmand, and R. Yolken.** 1991. Detection of animal and human group B rotaviruses in fecal specimens by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* **29**:539-543.

**Enriquez, C.E., M. Abbaszadegan, I.L. Pepper, K.J. Richardson, and C.P. Gerba.** 1993. Poliovirus detection in water by cell culture and nucleic acid hybridization. *Wat. Res.* **27**:1113-1118.

**Estes, M.K.** 1990. Rotaviruses and their replication, p. 1329-1352. In B.N. Fields, D.N. Knipe, R.M. Chanock, J.L. Melnick, B. Roizman, and R.E. Shope (eds.), *Virology*, vol.2, 2nd ed. Raven Press, New York.

**Estes, M.K., and J. Cohen.** 1989. Rotavirus gene Structure and function. *Microbiol. Rev.* **53**:410-449.

**Estes, M.K., D.Y. Graham, and D.H. Dimitrov.** 1984. The molecular epidemiology of rotavirus gastroenteritis. *Prog. Med. Virol.* **29**:1-22.

**Estes, M.K., D.Y. Graham, E.M. Smith, and C.P. Gerba.** 1979. Rotavirus stability and Inactivation. *J. Gen. Virol.* **49**:403-409.

**Fang, Z.-Y., Q. Ye, M.-S. Ho, H. Dong, S. Qing, M.E. Penaranda, T. Hung, L. Wen, and R.I. Glass.** 1989. Investigation of an outbreak of adult diarrheas rotavirus in China. *J. Infect. Dis.* **160**:948-953.

**Farrah, S.R., S.M. Goyal, C.P. Gerba, R.H. Conklin, E.M. Smith.** 1978. Comparison between adsorption of poliovirus and rotavirus by aluminum hydroxide and activated sludge flocs. *Appl. Environ. Microbiol.* **35**:360-363.

**Flewett, T.H., and G.N. Woode.** 1978. The rotaviruses. Brief review. *Arch. Virol.* **57**:1-23.

**Flewette, T.H., A.S. Bryden, H. Davies, G.N. Woode, J.C. Bridger, and J.M. Derrick.** 1974. Relation between viruses from acute gastroenteritis of children and newborn calves. *Lancet* **ii**:61-63.

**Flores, J., J. Sears, I. Perez Schael, L. White, D. Garcia, C. Lanata, and 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.

**Fritsch, A.** 1975. *Les centrifugations préparatives en gradient de densité.* 2ème édition. Beckman Instruments France, Paris.

**Fujioka, R.S., P.C. Loh, and L.S. Lau.** 1980. Survival of human enteroviruses in the Hawaiian ocean environment: evidence for virus-inactivating microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* **39**:1105-1110.

**Gaggero, A., L.F. Avendano, J. Fernandez, and E. Spencer.** 1992. Nosocomial transmission of rotavirus from patients admitted with diarrhea. *J. Clin. Microbiol.* **30**:3294-3297.

**Gajardo, R., N. Bouchriti, R.M. Pinto, and A. Bosch.** 1995. Genotyping of rotaviruses isolated from sewage. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:3460-3462.

**Genthe, B., G.K. Idema, R. Kfir, and W.O.K. Grabow.** 1991. Detection of rotavirus in south african waters: a comparison of a cytoimmunolabelling technique with commercially available immunoassays. *Wat. Sci. Tech.* **24**:241-244.

**Gentsch, J.R., R.I. Glass, P. Woods, V. Gouvea, M. Gorziglia, J. Flores, B.K. Das, and M.K. Bhan.** 1992. Identification of group A rotavirus gene 4 types by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* **30**:1365-1373.

**Gerba, C.P., J.B. Rose, and S.N. Singh.** 1985. Waterborne gastroenteritis and viral hepatitis. *Crit. Rev. Environ. Control* **15**:213-236.

**Gerba, C.P., B.H. Keswick, H.L. DuPont, and H.A. Fields.** 1984. Isolation of rotavirus and hepatitis A virus from drinking water. *Monogr. Virol.* **15**:119-125.

**Gerba, C.P., S.M. Goyal, I. Cech, And G.F. Bogdan.** 1980. Bacterial indicators and environmental factors as related to contamination of oysters by enteroviruses. *J. Food. Prot.* **43**:99-101.

**Gerba, C.P., S.M. Goyal, R.L. Labelle, I. Cech, G.F. Bodgan.** 1979. Failure of indicator bacteria to reflect the occurrence of enteroviruses in marine waters. **69**:1116-1119.



**Gerba, C.P., and S.M. Goyal.** 1978. Detection and occurrence of enteric viruses in shellfish: a review. *J. Food. Protect.* **41**:743-754.

**Gerba, C.P., C. Wallis, and J.L. Melnick.** 1975. Viruses in water: the problem, some solutions. *Environ. Sci. Technol.* **9**:1122-1126.

**Gerna, G., A. Sarasini, M. Parca, S. Arista, P. Miranda, H. Brüssow, Y. Hoshino, and J. Flores.** 1992. Isolation and characterization of two distinct human rotavirus strains with G6 specificity. *J. Clin. Microbiol.* **30**:9-16.

**Girones, R., J. Jofre, and A. Bosch.** 1989. Natural inactivation of enteric viruses in seawater. *J. Environ. Qual.* **18**:34-39.

**Gorziglia, M., G. Larralde, A.Z. Kapikian, and R.M. Chanock.** 1990. Antigenic relation among human rotaviruses as determined by outer capsid protein VP4. *Proc. natl. Acad. Sci. USA.* **87**:7155-7159.

**Gouvea, V., C. Ramirez, B. Li, N. Santos, L. Saif, H.F. Clark, and Y. Hoshino.** 1993. Restriction endonuclease analysis of the VP7 gene of human and animal rotaviruses. *J. Clin. Microbiol.* **31**:917-923.

**Gouvea, V., J.R. Allen, R.I. Glass, Z.-Y. Fang, M. Bremont, J. Cohen, M.A. McCrae, L.J. Saif, P. Sinarachatanant, and 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, and Z.-Y. Fang.** 1990a. Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. *J. Clin. Microbiol.* **28**:276-282.

**Gouvea, V., M.-S. Ho, R. Glass, P. Woods, B. Forrester, C. Robinson, R. Ashley, M. Riepenhoff-Talty, H.F. Clark, K. Taniguchi, E. Meddix, B. McKellar and L. Pickering.** 1990b. Serotypes and electropherotypes of human rotavirus in the USA: 1987-1989. *J. Infect. Dis.* **162**:362-367.

**Goyal, S.M.** 1983. Indicators of viruses. p. 211-230. In *Viral Pollution of the Environment*. G. Berg (ed.). CRC Press, Boca Raton.

**Goyal, S.M., C.P. Gerba, and J.L. Melnick.** 1979. Human enteroviruses in oysters and their overlying waters. *Appl. Environ. Microbiol.* **37**:572-581.

**Graham, D.Y., G.R. Dufour, and M.K. Estes.** 1987. Minimal infective dose of rotavirus. *Arch. Virol.* **92**:261-271.

**Green, K.Y., J.F. Sears, K. Taniguchi, K. Midthun, Y. Hoshino, M. Gorziglia, K. Nishikawa, S. Urasawa, A.Z. Kapikian, R.M. Chanock, and J. Flores.** 1988. Prediction of human rotavirus serotype by nucleotide sequence analysis of the VP7 protein gene. *J. Virol.* **62**:1819-1823.

**Hedberg, C.W., and M.T. Osterholm.** 1993. Outbreaks of food-borne and waterborne viral gastroenteritis. *Clin. Microbiol. Rev.* **6**:199-210.

**Hejkal, T.W., E.M. Smith, and C.P. Gerba.** 1984. Seasonal occurrence of rotavirus in sewage. *Appl. Environ. Microbiol.* **47**:588-590.

**Hejkal, T.W., B. Keswick, R.L. Labelle, C.P. Gerba, Y. Sanchez, G. Dreesman, B. Hafkin, and J.L. Melnick.** 1982. Viruses in a community water supply associated with an outbreak of gastroenteritis and infectious hepatitis. *J. Am. Water Works Assoc.* **74**:318-321.

**Hejkal, T.W. and C.P. Gerba.** 1981. Uptake and survival of enteric viruses in the blue crab, *Callinectes sapidus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **41**:207-211.

**Hejkal, T.W., F.M. Wellings, P.A. Larock, and A.L. Lewis.** 1979. Survival of poliovirus within solids during chlorination. *Appl. Environ. Microbiol.* **38**:114-118.

**Herring, A.J., N.F. Inglis, C.K. Ojeh, D.R. Snodgrass, and J.D. Menzies.** 1982. Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral Nucleic acid in silver-stained polyacrylamide gels. *J. Clin. Microbiol.* **16**:473-477.

**Hervé, C.** 1993. Méthodes usuelles d'analyse bactériologique des coquillages. Rapport Interne DEL. IFREMER. Nantes.

**Holmes, I.H.** 1991. *Reoviridae*. p. 186-191. In *Classification and Nomenclature of viruses*. R.I.B. Francki, C.M. Fauquet, D.L. Knudson, and F. Brown (eds.), *Arch. Virol.* 2. (Supp.). Springer-Verlag Wien. New York.

**Hoshino, Y. And A.K. Kapikian.** 1994. Rotavirus vaccine development for the prevention of severe diarrhea in infant and young children. *Trends in Microbiol.* **7**:242-249.

**Hung, T.** 1988. Rotavirus and adult diarrhea. *Adv. Virus Res.* **35**:193-218.

**Hunter, P.R.** 1994. Drinking-water-associated disease outbreaks. *Microbiol. Europe.* **2**:8-12.

**Huraux, J.M., J.C. Nicolas et H. Agut.** 1985. *Virologie.* Flammarion Médecine-science. Paris.

**Hurst, C.J. and 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.

**Jiang, X., M.K. Estes, T.G. Metcalf, and J.L. Melnick.** 1986. Detection of hepatitis A virus in seeded estuarine samples by hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* **52**:711-717.

**Jaykus, L.A., R. de Leon, and M.D. Sobsey.** 1993. Application of RT-PCR for the detection of enteric viruses in oysters. *Wat. Sci. Tech.* **27**:49-53.

**Kapikian, A.Z., and R.M. Chanock.** 1990. Rotaviruses, p.1353-1404. In B.N. Fields, D.N. Knipe, R.M. Chanock, J.L. Melnick, B. Roizman, and R.E. Shope (eds.), *Virology*, vol.2, 2nd ed. Raven Press, New York.

**Keswick, B.H., C.P. Gerba, H.L. Dupont, and J.B. Rose.** 1984. Detection of enteric viruses in treated drinking water. *Appl. Environ. Microbiol.* **47**:1290-1294.

**Kobayashi, N., K. Kojima, K. Taniguchi, T. Urasawa, and S. Urasawa.** 1994. genotypic diversity of reassortants between simian rotavirus SA11 and human rotaviruses having different antigenic specificities and RNA patterns. *Res. Virol.* **145**:303-311.

**Kobayashi, N., K. Taniguchi, T. Urasawa, and S. Urasawa.** 1993. Analysis of gene selection in reassortant formation between canine rotavirus K9 and human rotaviruses with different antigenic specificities. *Res. Virol.* **144**:361-370.

**Kohli, E., L. Maurice, J.F. Vautherot, C. Bourgeois, J.B. Bour, J. Cohen, and 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, and 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, and J.M. Lopez-Pila.** 1993. Detection of naturally occurring enteroviruses in waters by reverse transcription, polymérase chain reaction, and hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:1213-1219.

**Kristiansen, B. -E., B. Sørensen, T. Simonsen, O. Spanne, V. Lund, and B. Bjorvatn.** Isolates of *Neisseria meningitidis* from different sites in the same patient: phenotypic and benomic studies, with special reference to adherence, piliation, and DNA restriction endonuclease pattern. *J. Infect. Dis.* **150**:389-396.

**Labbé, M., P. Baudoux, A. Charpilienne, D. Poncet, and J. Cohen.** 1994. Identification of the nucleic acid binding domain of the rotavirus VP2 protein. *J. Gene. Virol.* **75**:3423-3430.

**Labelle, R.L., and C.P. Gerba.** 1982. Investigations into the protective effect of estuarine sediment on virus survival. *Wat. Res.* **16**:469-478.

**Labelle, R.L., and C.P. Gerba.** 1980. Influence of estuarine sediment on virus survival under field conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **39**:749-755.

**Labelle, R.L., C.P. Gerba, S.M. Goyal, J.L. Melnick, I. Cech, And G.F. Bogdan.** 1980. Relationships between environmental factors, bacterial indicators, and the occurrence of enteric viruses in estuarine sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **39**:588-596.

**Labelle, R.L., and C.P. Gerba.** 1979. Influence of pH, salinity, and organic matter on the adsorption of enteric viruses to estuarine sediment. *Appl. Environ. Microbiol.* **38**:93-101.

**Larralde, G. and M. Gorziglia.** 1992. Distribution of conserved and specific epitopes on the VP8 subunit of rotavirus VP4. *J. Virol.* **66**:7438-7443.

**Larralde, G., and J. Flores.** 1990. Identification of gene 4 alleles among human rotaviruses by polymerase chain reaction-derived probes. *Virology.* **179**:469-473.

**Landry, E.F., J.M. Vaughn, T.J. Vicale, and R. Mann.** 1983. Accumulation of sediment-associated viruses in shellfish. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**:238-247.

**Lane, D., P. Prentki, and M. Chandler.** 1992. Use of gel retardation to analyse protein-nucleic acid interaction. *Microbiol. Rev.* **56**:509-528.

**Lees, D.N., K. Henshilwood, and W.J. Doré.** 1994. Development of a method for detection of enteroviruses in shellfish by PCR with poliovirus as a model. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:2999-3005.

**Lewis, G.D. and T.G. Metcalf.** 1988a. Polyethylene glycol precipitation for recovery of pathogenic viruses, including hepatitis A virus and human rotavirus from oyster, water and sediment samples. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**:1983-1988.

**Lewis, D., And TG. Metcalf.** 1988b. Removal of viruses in sewage treatment: assessment of feasibility. *Microbiol. Sci.* **5**:260-264.

**Le Guyader, F., D. Ménard, M. Pommepuy and H. Kopecka.** 1995a. Use of RT seminested PCR to assess viral contamination in caribbean rivers (Martinique). *Wat. Sci. Tech.* **31**:391-394.

**Le Guyader, F., R.L. Atmar, F.H. Neill, S.S. Monroe, T. Ando, and M.K. Estes.** 1995b. Detection of Norwalk virus sequence in shellfish implicated in an gastroenteritis outbreak. Abstract from 14th annual meeting. American Society for Virology.

**Le Guyader, F., M.L. Dincher, D. Ménard, L. Schwartzbrod, and M. Pommepuy.** 1994a. Comparative study of the behaviour of poliovirus in sterile seawater using RT-PCR and cell culture. *Mar. Pollut. Bull.* **28**:723-726.

**Le Guyader, F., E. Dubois, D. Ménard, and M. Pommepuy.** 1994b. Detection of hepatitis A virus, rotavirus, and enterovirus in naturally contaminated shellfish and sediment by reverse transcription-seminested PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:3665-3671.

**Liew, PF., and C.P. Gerba.** 1980. Thermostabilization of enteroviruses by estuarine sediment. *Appl. Environ. Microbiol.* **40**:305-308.

**Lucena, F., M. Divizia, E. Biziagos, J.-M. Crance et R. Deloince.** 1991. Extraction et concentration des virus des milieux hydriques. p. 71-106. Dans *Virologie des milieux hydriques*, L. Schwartzbrod (Coord.). Tec. et Doc. Lavoisier, Edit. Paris.

**Masendycz, P.J. L.E. Unicomb, C.D. Kirkwood, and R.F. Bishop.** 1994. Rotavirus serotypes causing severe acute diarrhea in young children in six australian cities, 1989 to 1992. *J. Clin. Microbiol.* **32**:2315-2317.

**Mattion, N., J. Cohen and M.K. Estes.** 1994. The rotavirus proteins. p. 169-247. *Virus Infections of the gastrointestinal track*, 2nd ed. Marcel Dekker, New York.

**McDaniels, A.E., K.W. Cochran, J.J. Gannon, and G.W. Williams.** 1983. Rotavirus and reovirus stability in microorganism-free distilled and wastewaters. *Wat. Res.* **17**:1349-1353.

**Mehnert, D.U. and K.E. Stewien.** 1993. Detection and distribution of rotavirus in raw sewage and creeks in Sao Paulo, Brazil. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:140-143.

**Melnick, J.L. and C.P. Gerba.** 1980. The ecology of enteroviruses in natural waters. *CCR Crit. Rev. Environ. Cont.* **10**:65-93.

**Melnick, J.L.** 1978. Water as a reservoir of virus in nature and means for control. p. 203-226. In *Viruses and Environment*. Academic Press, Inc.

**Meng, Z.D., C. Birch, R. Heath, and I. Gust.** 1987. Physicochemical stability and inactivation of human and simian rotaviruses. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**:727-730.

**Metcalf, T.G., V.C. Rao, J.L. Melnick.** 1984. Solid-associated viruses in a polluted estuary. *Monogr. Virol.* **15**:97-110.

**Minamoto, N., O. Nakagomi, M. Sugiyama, and T. Kinjo.** 1991. Characterization of an avian rotavirus strain by neutralization and molecular hybridization assays. *Res. Virol.* **142**:271-275.

**Morris, R.** 1993. Reduction of microbial levels in sewage effluents using chlorine and peracetic acid disinfectants. *Wat. Sci. Tech.* **27**:387-393.

**Morrison, C. and F. Gannon.** 1994. The impact of the PCR plateau phase on quantitative PCR. *Biochem. Biophys. Acta.* **1219**:493-498.

- Murphy, A.** 1981. Aetiology of viral gastroenteritis. A review. *Med. J. Aust.* **2**:177-182.
- Nakagomi, O., H. Oyamada, and 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.
- Nakagomi, O. and 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, and 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.
- 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.
- Paillard, H. and J. Sibony.** 1986. Désinfection des eaux résiduaires. *Océanis*, **12**:491-509.
- Pancorbo, O.C., B.G. Evanshen, W.F. Campbell, S. Lambert, S.K. Curtis, and 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., H.A. Hussein, B.I. Rosen, A. Lucchelli, L. Navarro, and L.J. Saif.** 1993. Characterization of field strains of group A bovine rotaviruses by using polymerase chain reaction-generated G and P type specific cDNA probes. *J. Clin. Microbiol.* **31**:2010-2015.
- Parwani, A.V., B.I. Rosen, M.A. McCrae, and L.J. Saif.** 1992. Development of cDNA probe for typing group A bovine rotaviruses of VP4 specificity. *J. Clin. Microbiol.* **30**:2717-2721.
- Prasad B.V.V., J.W. Burns, E. Marietta, M.K. Estes, W. Chiu.** 1990. Localization of the VP4 neutralization sites in rotavirus by tree-dimensional cryo-electron. *Nature.* **343**:476-479.
- Petric, M., K. Mayur, S. Vonderfecht, and J.J. Eiden.** 1991. Comparison of group B rotavirus genes 9 and 11. *J. Gen. Virol.* **72**:2801-2804.
- Pirtle, E.C. and G.W. Beran.** 1991. Virus survival in the environment. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.* **10**:733-748.

**Puig, M., J. Joffre, F. Lucena, A. Allard, G. Wadell, and R. Girones.** Detection of adenoviruses and enteroviruses in polluted waters by Nested PCR Amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:2963-2970.

**Pommepeuy, M., A. Derrien, F. Le Guyader, D. Menard, M.P. Caprais, E. Dubois, E. Dupray, and M. Gourmelon.** 1996. Microbial water quality on a caribbean Island (Martinique). *Coastal and Estuarine Studies*, in press.

**Rao, V.C., T.G. Metcalf, and J.L. Melnick.** 1988. Recovery of naturally occurring rotaviruses during sewage treatment. *Virology* **164**:435-442.

**Rao, V.C., T.G. Metcalf, and J.L. Melnick.** 1987. Removal of indigenous rotaviruses during primary settling and activated-sludge treatment of raw sewage. *Wat. Res.* **21**:171-177.

**Rao, V.C., T.G. Metcalf, and J.L. Melnick.** 1986. Development of a method for concentration of rotavirus and its application to recovery of rotaviruses from estuarine waters. *Appl. Environ. Microbiol.* **52**:484-488.

**Rao, V.C., K.M. Seidel, S.M. Goyal, T.G. Metcalf, and 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.

**Rasool, N.B.G., K.Y. Green, and A.Z. Kapikian.** 1993. Serotype analysis of rotaviruses from different locations in Malaysia. *J. Clin. Microbiol.* **31**:1815-1819.

**Ravaggi, A., A. Zonaro, C. Mazza, A. Albertini, and E. Cariani.** 1995. Quantification of hepatitis C virus RNA by competitive amplification of RNA from denatured serum and hybridization on microtiter plates. *J. Clin. Microbiol.* **33**:265-269.

**Richard, G.P.** 1985. Outbreaks of shellfish-associated enteric virus illness in the united states: requisite for development of viral guidelines. *J. Food Protect.* **48**:815-823.

**Romalde, J.L., M.K. Estes, G. Szücs, R.L. Atmar, C.M. Woodley, and T.G. Metcalf.** 1994. In situ detection of hepatitis A virus in cell cultures and shellfish tissues. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:1921-1926.



**Rose, J.B., R.L. Mullinax, S.N. Singh, M.V. Yates and C.P. Gerba.** 1987. Occurrence of rotaviruses and enteroviruses in recreational waters of Oak Creek, Arizona. *Wat. Res.* **21**:1375-1381.

**Rosen, B.I., A.V. Parwani, M. Gorziglia, G. Larralde, and 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.

**Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis.** 1989. *molecular cloning: a laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory, 2nd ed., Cold Spring Harbor, New York.

**Schwab, K.J., R. De Leon, and M.D. Sobsey.** 1993. Development of PCR methods for enteric virus detection in water. *Wat. Sci. Tech.* **27**:211-218.

**Schwartzbrod, L.** 1992. Virus, eaux et coquillages. p. 35-49. Dans *Coquillages et santé publique du risque à la prevention.* J. Lesne (Coord.). ENSP Editeur, Rennes.

**Schwartzbrod, L.** 1991. Virus et milieu hydrique. p. 1-33. Dans *Virologie des milieux hydriques.* L. Schwartzbrod (Coord.). Tec. et Doc. Lavoisier, Edit. Paris.

**Schwartzbrod, L., F. Lucena et C. Finance.** 1979. Etude quantitative de la pollution virale dans l'affluent et l'effluent d'une station d'épuration d'eaux résiduaires. *J. Fr. Hydrol.* **10**:7-20.

**Secchiero, P., D. Zella, R.W. Crowley, R.C. Gallo, and P. Lusso.** 1995. Quantitative PCR for human herpesviruses 6 and 7. *J. Clin. Microbiol.* **33**:2124-2130.

**Seidel, K.M., S.M. Goyal, V.C. Rao, and J.L. Melnick.** 1983. Concentration of rotavirus and enteroviruses from blue crabs (*Callinectes sapidus*). *Appl. Environ. Microbiol.* **46**:1293-1296.

**Sethabutr, O., L.E. Unicomb, I.H. Holmes, D.N. Taylor, R.F. Bishop, and P. Echeverria.** 1990. Serotyping of human group A rotavirus with oligonucleotide probes. *J. Infect. Dis.* **162**:368-372.

**Shaw, R.D., S.J. Hempson, and E.R. Mackrow.** 1995. Rotavirus diarrhea is caused by nonreplicating viral particles. *J. Clin. Microbiol.* **69**:5946-5950.

**Shirley, J.A., G.M. Beards, M.E. Thouless, and T.H. Flewett.** 1981. The influence of divalent cations on the stability of human rotavirus. *Arch. Virol.* **67**:1-9.

**Siebert, P.D.** 1993. Quantitative RT-PCR. Y. Munch, K. Mayo, and A. Miller (eds.). Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto.

**Silberstein, I., L.M. Shuman, E. Mendenson, and I. Shif.** 1995. Distribution of both rotavirus VP4 genotypes and VP7 serotypes among hospitalized Israeli Children. *J. Clin. Microbiol.* **33**:1421-1422.

**Smirnov, Y.A., S.P. Kapituets, N.N. Amitina, V.A. Ginevskaya, and N.V. Kaverin.** 1991. Effect of UV-irradiation on rotavirus. *Acta. Virol.* **35**:1-6.

**Smith, E.M. and C.P. Gerba.** 1982. Development of a method for detection of human rotavirus in water and sewage. *Appl. Environ. Microbiol.* **43**:1440-1450.

**Sobsey, M.D.** 1989. Inactivation of health-related microorganisms in water by disinfection processes. *Wat. Sci. Tech.* **21**:179-195.

**Steffan, R.J. and R.M. Atlas.** 1991. Polymerase chain reaction: applications in environmental microbiology. *Annu. Rev. Microbiol.* **45**:137-61.

**Strappe, P.** 1991. Rotavirus detection-a problem that needs concentration. *Wat. Sci. Tech.* **24**:221-223.

**Tabassum, S., P. Shears, and C.A. Hart.** 1994. Genomic characterization of rotavirus strains obtained from hospitalized children with diarrhea in Bangladesh. *J. Med. Virol.* **43**:50-56.

**Tian, Y., O. Tarlow, A. Ballard, U. Desselberger, and M.A. McCrae.** 1993. Genomic concatemerization/deletion in rotaviruses: a new mechanism for generating rapid genetic change of potential epidemiological importance. *J. Virol.* **67**:6625-6632.

**Tindall, K.R. and T.A. Kunkel.** 1988. Fidelity of DNA synthesis by the thermus aquaticus DNA polymerase. *Biochemistry.* **27**:6008-6013.

**Toranzos, G.A. and C.P. Gerba.** 1989. An improved method for the concentration of rotaviruses from large volumes of water. *J. Virol. Methods.* **24**:131-140.

**Tosser, G., M. Labbé, M. Brémont, and 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., B. Tran, and C.J. Palmer.** 1995. Analysis of viral RNA persistence in seawater by reverse transcriptase-PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:363-366.

**Tsai, Y.-L., M.D. Sobsey, L.R. Sangermano, and C.J. Palmer.** 1993. Simple method of concentrating enteroviruses and hepatitis A virus from sewage and seawater for rapid detection by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:3488-3491.

**Tsai, Y.-L., B. Tran, L.R. Sangermano, and C.J. Palmer.** 1994. Detection of poliovirus, hepatitis A virus, and rotavirus from sewage and ocean water by triples reverse transcriptase PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:2400-2407.

**Tsai, Y.-L. and B.H. Olson.** 1992. Rapid method for separation of bacterial DNA from humic substances in sediments for polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:2292-2295.

**Uhnnoo, I., E. Olding-Stenkvis, and A. Kreuger.** 1986. Clinical features of acute gastroenteritis associated with rotavirus, enteric adenoviruses, and bacteria. *Arch. Dis. Child.* **61**:732-738.

**Ushijima, H., K.-Q. Xin, S. Nishimura, S. Morikawa, and T. Abe.** 1994. Detection and sequencing of rotavirus VP7 gene from human materials (stools, sera, cerebrospinal fluids, and throat swabs) by reverse transcription and PCR. *J. Clin. Microbiol.* **32**:2863-2897.

**Vaughn, J.M., Y.S. Chen, K. Lindburg, and D. Morales.** 1987. Inactivation of human and simian rotaviruses by ozone. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**:2218-2221.

**Vaughn, J.M., Y.-S. Chen, and McH.Z. Thomas.** 1986. Inactivation of human and simian rotaviruses by chlorine. *Appl. Environ. Microbiol.* **51**:391-394.

**Vonsover, A., I. Shif, I. Silberstein, H. Rudich, Y. Aboudy, E. Mendelson, L. Shulman, T. Nakagomi, and O. Nakagomi.** 1993. Identification of feline- and canine-like rotaviruses isolated from humans by restriction fragment length polymorphism assay. *J. Clin. Microbiol.* **31**:1783-1787.

**Ward, R.L., D.I. Bernstein, E.C. Young, J.R. Sherwood, D.R. Knowlton, and G.M. Schiff.** 1986a. Human rotavirus studies in volunteers: determination of infectious dose and serological response to infection. *J. Infect. Dis.* **154**:871-880.

**Ward, R.L., D.R. Knowlton, and P.E. Winston.** 1986b. Mechanism of inactivation of enteric viruses in fresh water. *Appl. Environ. Microbiol.* **52**:450-459.

**Ward, R.L. and P.E. Winston.** 1985. Development of methods to measure virus inactivation in fresh waters. *Appl. Environ. Microbiol.* **50**:1144-1148.

**Watts, R.J., S. Kong, M.P. Orr, G.C. Miller, and B.E. Henry.** 1995. Photocatalytic inactivation of coliform bacteria and viruses in secondary wastewater effluent. *Wat. Res.* **29**:95-100.

**Wilde, J., J. Eiden, and 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.

**Williams Jr., F.P., and G.S. Fout.** 1992. Contamination of shellfish by stool-shed viruses: methods of detection. *Environ. Sci. Technol.* **26**:689-696.

**Williams Jr., F.P.** 1985. Membrane-associated viral complexes observed in stools and cell culture. *Appl. Environ. Microbiol.* **50**:523-526.

**Woods, P.A., J. Gentsch, V. Gouvea, L. Mata, A. Sinhon, M. Santosham, Z. Bai, S. Urasawa, and R.I. Glass.** 1992. Distribution of serotypes of human rotavirus in different population. *J. Clin. Microbiol.* **59**:1972-1974.

**Xu, L., D. Harbour, and M.A. McCrae.** 1990. The application of polymerase chain reaction to the detection of rotaviruses in faeces. *J. Virol. Methods.* **27**:29-38.

**Yates, M.V., C.P. Gerba, and L.M. Kelley.** 1985. Virus persistence in groundwater. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**:778-781.

**Zheng, B.J., W.P. Lam, Y.K. Yan, S.K.F. Lo, M.L. Lung, and 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.

**Zhou, Y.-J., M.K. Estes, X. Jiang, and T.G. Metcalf.** 1991. Concentration and detection of hepatitis A virus and rotavirus from shellfish by hybridization tests. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**:2963-2968.

## **ANNEXES**

**Annexe 1**

**Profils de restrictions calculés à partir des séquences  
décrites dans les banques de données GeneBank et EMBL**

<b>Taille des fragments de restriction (en pb)</b>				<b>Rotavirus du groupe A</b>	
<b>AluI</b> 5'AG/CT3' 3'TC\GA5'	<b>RsaI</b> 5'GT/AC3' 3'CA\TG5'	<b>Sau3AI</b> 5'/GATC3' 3'CTAG\5'	<b>TaqI</b> 5'T/CG A3' 3'A GC\T5'	Nom de la séquence	Origine
342	342	342	342	D13549 ROTVP7	Equine
342	342	342	301 41	ROBVP7G PRVVP7Y ROSVP7 RO1G9 ROS11 REVP7	Bovine Porcine Simienne
342	342	300 42	342	ROBVP7A	Bovine
342	342	179 163	342	ROHVP7B37	Humaine
263 79	342	342	342	ROHVP7X RORVP7	Humaine Simienne
146 117 79	342	342	342	RO1G14	Equine
146 120 76 23	342	342	342	MR08430	Murine
342	342	300 42	301 41	PRVC95X	Porcine
342	342	179 163	271 71	PRVVP7X	Porcine
342	342	255 87	233 84 25	ROBVP7	Bovine
342	342	163 123 56	131 109 95 7	HRA64SP8	Humaine
342	241 101	342	209 133	ROB5VP7	Bovine
263 79	342	342	206 109 27	ROHCAPSPRO	Humaine
123 120 44 32 23	342	342	182 160	MR08420	Murine
278 64	342	342	160 141 41	ROBVP7B60	Bovine
342	298 44	179 163	342	ROTVP7X	Ovine
342	216 126	179 163	342	REOPR9 ROBA44VP7	Porcine

**Annexe 1 (suite)**

<b>Taille des fragments de restriction (en pb)</b>				<b>Rotavirus du groupe A</b>	
<b>AluI</b> 5'AG/CT3' 3'TC\GA5'	<b>RsaI</b> 5'GT/AC3' 3'CA\TG5'	<b>Sau3AI</b> 5'/GATC3' 3'CTAG\5'	<b>TaqI</b> 5'T/CG A3' 3'A GC\T5'	Nom de la séquence	Origine
342	144 129 69	171 171	342	ROTOUCAP	Humaine
266 76	342	179 163	342	PRVOCPVB PRVOCPVD	Porcine
263 79	342	179 163	342	RO2VP7S2 RO1VP7C	Humaine
263 43 32	342	179 163	342	ROBKK3VP7	Bovine
263 43 32	342	171 163 8	342	PRVOCPVC	Porcine
263 43 32	342	163 114 65	342	PRVVP7	Porcine
263 43 32	298 44	342	342	ROHVP7P	Humaine
342	145 135 62	179 163	206 136	ROTVP7B ROTVP7C ROTVP7D	Humaine
278 64	342	219 109	301 41	ROBVP7NCD	Bovine
263 79	342	181 161	233 109	REROHU5G	Humaine
263 79	342	179 163	206 136	PRVOCPVA	Porcine
263 79	342	163 114 65	206 136	PRVOCPVF	Porcine
263 43 32	342	179 163	202 140	ROTVP7A A01321 ROT359	Humaine
123 120 76 23	342	219 123	182 160	MR08422 MR08425 MR08427	Murine
266 76	342	179 163	130 109 103	PRVOCPVE	Porcine
278 64	197 145	342	301 41	ROBG REROTRUK	Bovine
196 146	313 129	342	271 71	ROHVP7	Humaine
310 32	279 63	342	233 109	HRVO4350	Humaine
263 79	298 44	342	182 160	RO1VP7B	Humaine
263 79	216 126	179 163	342	PRVP7G	Porcine
263 43 32	298 44	179 163	342	REBRVP7 BRRVP7A ROBVP7B11	Bovine

**Annexe 1 (suite)**

<b>Taille des fragments de restriction (en pb)</b>				<b>Rotavirus du groupe A</b>	
<b>AfuI</b> 5'AG/CT3' 3'TC\GA5'	<b>RsaI</b> 5'GT/AC3' 3'CA\TG5'	<b>Sau3AI</b> 5'/GATC3' 3'CTAG\5'	<b>TaqI</b> 5'T/CG A3' 3'A GC\T5'	Nom de la séquence	Origine
196 146	278 74	179 163	342	ROHVP7AA ROHVP7C ROHVP7AB ROHVP7BA ROHVP7D0 ROHVP7G0 ROHVP7E0 ROHVP7F0 ROHVP7A1 ROHVP7A2 ROHVP7B1	Humaine
196 146	268 74	163 104 75	342	ROHVP713B	Humaine
196 146	195 74 73	179 163	342	ROHVP7E	Humaine
176 166	268 74	179 163	342	ROHVP7K ROHVP7CO ROHVP7L ROHVP7F	Humaine
196 146	268 74	179 163	263 79	ROHVP7A ROHVP71 ROHVP72 ROHVP7H ROHVP7G RE9 RO4UP7	Humaine
176 166	268 74	179 163	263 79	ROHVP7B RO29	Humaine
196 146	268 74	163 104 75	263 79	ROHVP7J ROHVP7I ROIVP7AA	Humaine
146 120 76	216 126	179 163	233 109	ROOSUVP7	Bovine
306 32	216 126	319 23	206 136	PRVVP7PIG	Porcine
263 43 32	197 145	179 163	206 136	PRVVAR4FB PRVVAR4SC PRVVAR4SB	Porcine
263 43 32	298 44	179 163	182 160	REBRVP7G ROBA44VP7	Bovine



## Annexe 2

### Titre en virus infectieux dans les prélèvements d'eau de mer artificielle.

Jours d'incubation	Eau de mer artificielle DI50/ml <sup>a</sup>	
	6 °C	20 °C
0	5,0 10 <sup>4</sup>	5,0 10 <sup>4</sup>
4	1,6 10 <sup>4</sup>	5,0 10 <sup>4</sup>
6	1,6 10 <sup>4</sup>	8,9 10 <sup>3</sup>
16	5,0 10 <sup>3</sup>	8,9 10 <sup>2</sup>
24	1,6 10 <sup>4</sup>	5,0 10 <sup>2</sup>
51	1,6 10 <sup>4</sup>	≤ 1,6 10 <sup>1</sup>
100	2,8 10 <sup>3</sup>	≤ 1,6 10 <sup>1</sup>

<sup>a</sup> Le titre en virus infectieux était déterminé par mesure de la dose infectante 50% par unité de volume (DI50/ml).

## Annexe 3

### Stabilité du génome viral en eau de mer artificielle.

Jours d'incubation	Log(Avirus / Aci) <sup>a</sup>	
	6 °C	20 °C
0	1,636	1,243
51	1,950	1,394
100	1,537	1,294
CI	-0,594	-0,960

<sup>a</sup> Le rapport entre le nombre de copies d'ARN viral (Avirus) et de contrôle interne (Aci) est calculé par mesure densitométrique des gels d'électrophorèse. CI correspond à l'analyse du contrôle interne en l'absence de séquence virale.

## Annexe 4

### Titre en virus infectieux dans les prélèvements d'eau de mer naturelle.

Jours d'incubation	Eau de mer artificielle	
	DI50/ml <sup>a</sup>	
	6 °C	20 °C
0	$1,6 \cdot 10^4$	$8,9 \cdot 10^4$
4	$5,0 \cdot 10^3$	$1,6 \cdot 10^3$
6	$8,9 \cdot 10^3$	$8,9 \cdot 10^1$
16	$1,6 \cdot 10^3$	$\leq 1,6 \cdot 10^1$
24	$5,0 \cdot 10^2$	$\leq 1,6 \cdot 10^1$
51	$2,8 \cdot 10^4$	$\leq 1,6 \cdot 10^1$

<sup>a</sup> voir Annexe 2.

## Annexe 5

### Stabilité du génome viral en eau de mer naturelle.

Jours d'incubation	Log(Avirus / Aci) <sup>a</sup>	
	6 °C	20 °C
	0	0,815
2	-	-0,572
4	-	-0,391
9	-	-0,672
16	-	-1,152
24	-0,093	-1,697
51	-0,456	-
100	-1,059	-
CI	-0,817	-1,770

<sup>a</sup> voir annexe 3.

## Annexe 6

### **Recherche de la présence d'ARN du virus de l'hépatite A et d'entérovirus dans les coquillages de la région du Morbihan (d'après F. Le Guyader, 1994b).**

Lieu et nature du prélèvement <sup>a</sup>		Date et résultat des analyses <sup>b</sup>											
		06/92			10/92			06/93			10/93		
		RV	HV	EV	RV	HV	EV	RV	HV	EV	RV	HV	EV
Rosvellec	P	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-
Truscat	P	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
Iluric	H	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
Men Er Roue	H	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Moulin Verdon	P	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-

<sup>a</sup> Les lieux de prélèvements sont localisés dans la Figure 7, la nature des coquillages prélevés est indiquée par la lettre P pour palourdes ou H pour huîtres.

<sup>b</sup> Les analyses sont effectuées par RT-seminested PCR pour déceler la présence de séquences virales du virus de l'hépatite A (HV) et d'entérovirus (EV), les résultats positifs ou négatifs sont respectivement exprimés par les signes (+) et (-).

## Annexe 7

### Résultats microbiologiques sur les rivières de Fort de France

(d'après Pommeputy *et al.*, 1995 ; Le Guyader *et al.* 1995a).

Echantillons <sup>a</sup>	RT-seminested PCR <sup>b</sup>			Coliformes fécaux (/ 100 ml)
	Rotavirus	Virus de l'hépatiteA	Entérovirus	
1	+	+	+	3,5 10 <sup>3</sup>
2	+	+	+	7,0 10 <sup>4</sup>
3	-	-	-	6,0 10 <sup>4</sup>
4	-	-	+	3,0 10 <sup>7</sup>
5	+	+	+	3,0 10 <sup>5</sup>
6	+	+	+	2,6 10 <sup>6</sup>
7	+	+	-	4,8 10 <sup>5</sup>
8	+	+	-	8,0 10 <sup>5</sup>
9	-	+	-	1,0 10 <sup>5</sup>
10	+	-	-	1,0 10 <sup>4</sup>
11	-	-	+	1,8 10 <sup>6</sup>
12	-	-	-	6,0 10 <sup>2</sup>
13	-	-	-	6,7 10 <sup>7</sup>
14	-	-	-	5,0 10 <sup>4</sup>
15	-	-	-	4,4 10 <sup>4</sup>
16	-	-	-	1,8 10 <sup>6</sup>
17	-	-	-	5,0 10 <sup>2</sup>
18	-	-	-	3,0 10 <sup>6</sup>
19	+	+	+	2,0 10 <sup>5</sup>

<sup>a</sup> La numérotation des échantillons correspond à celle décrite dans la Figure 8

<sup>b</sup> Les résultats positifs ou négatifs pour la recherche des ARN viraux sont exprimés par les signes respectifs (+) et (-).

**PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS**

#### **Publications :**

**Le Guyader, F., E. Dubois, D. Ménard, and M. Pommepuy.** 1994. Detection of hepatitis A virus, rotavirus, and Enterovirus in naturally contaminated shellfish and sediment by reverse transcription-semi-nested PCR. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 60, p. 3665-3671.

**Pommepuy, M., A. Derrien, F. Le Guyader, D. Ménard, M.P. Caprais, E. Dubois, E. Dupray, and M. Gourmelon.** 1995. Microbial water quality on a Caribbean island (Martinique). *Coastal and Estuarine Studies*, *sous presse*.

**Dubois, E., F. Le Guyader, L. Haugarreau, H. Kopecka, M. Cormier, and M. Pommepuy.** Molecular Epidemiological Survey of rotavirus in sewage by reverse transcription, polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism assay. *En préparation*.

#### **Communications :**

**Le Guyader, F., E. Dubois, L. Haugarreau, D. Ménard, H. Kopecka et M. Pommepuy.** 1995. Détection moléculaire des virus entériques humains dans l'environnement. Communication orale. Colloque Pluridisciplinaire La Qualité de l'Eau. Nantes.

**Le Guyader, F., E. Dubois, L. Haugarreau, H. Kopecka, D. Ménard, and M. Pommepuy.** 1995. Detection of hepatitis A and other enteric viruses in the coastal environment. Communication affichée. International Symposium on Enterically-Transmitted Hepatitis Viruses. Paris.

**Le Guyader, F., E. Dubois, H. Kopecka, D. Ménard, L. Haugarreau et M. Pommepuy.** 1995. Détection des virus entériques humains dans l'environnement par RT-semi-nested-PCR. Communication orale. 54<sup>ème</sup> assemblée annuelle de la Société Suisse de Microbiologie. Lugano.

**Le Guyader, F., E. Dubois, D. Ménard, H. Kopecka, and M. Pommepuy.** 1995. Detection of enteric viruses and hepatitis A virus in sewage. Communication affichée. IV<sup>th</sup> International Positive Strand RNA Virus Symposium, Utrecht.

**Dubois, E., F. Le Guyader, L. Haugarreau, H. Kopecka, and M. Pommepuy.** 1995. A new approach to determine the origin of rotavirus contamination in environmental samples. Communication affichée. 5<sup>th</sup> International Symposium on Double-Stranded RNA Viruses. Djerba.

**Dubois, E., F. Le Guyader, H. Kopecka et M. Pommepuy.** 1994. Amplification du génome des rotavirus: intérêt d'un contrôle interne ARN bicaténaire. Communication affichée. 4<sup>ème</sup> Congrès de la Société Française de Microbiologie. Tours.

**Kopecka, H., F. Le Guyader, Dubois, E., D. Ménard et M. Pommepuy.** 1994. Détection des virus entériques dans l'environnement par des techniques de biologie moléculaire. Communication orale. 4ème Congrès de la Société Française de Microbiologie. Tours.

**Le Guyader, F., D. Ménard, Dubois, E. et H. Kopecka.** 1994. Adaptation de la RT-seminested-PCR pour la détection de virus entériques humains dans les rejets de station d'épuration. Communication orale. 4ème Congrès de la Société Française de Microbiologie. Tours.

**Dubois, E., F. Le Guyader, L. Haugarreau, H. Kopecka et M. Pommepuy.** 1994. Recherche de l'origine de la contamination de l'environnement par les rotavirus. Communication affichée. 4ème Congrès de la Société Française de Microbiologie. Tours.

**Le Guyader, F., Dubois, E., H. Kopecka, D. Ménard, P. Camus et M. Pommepuy.** 1994. Détection des virus entériques humains dans l'environnement par RT-seminested-PCR et hybridation. Communication orale. Le Point sur la Microbiologie de l'Environnement, Colloque organisé par la Société Française de Microbiologie. Paris.

**Le Guyader, F., Dubois, E., D. Ménard and H. Kopecka.** 1994. Detection of human enteric viruses by PCR in shellfish. Communication affichée. 93rd General Meeting, Las Vegas.