UNIVERSITÉ PARIS XI

FACULTÉ DE PHARMACIE DE CHÂTENAY-MALABRY

ÉCOLE DOCTORALE : INNOVATION THÉRAPEUTIQUE : DU FONDAMENTAL À L'APPLIQUÉ PÔLE : MICROBIOLOGIE / PARASITOLOGIE

ANNÉE 2003-2004

SÉRIE DOCTORALE N° 823

THÈSE

présentée À L'UNITÉ DE FORMATION ET DE RECHERCHE FACULTÉ DE PHARMACIE DE CHÂTENAY-MALABRY UNIVERSITÉ PARIS XI

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ PARIS XI

par

Fabienne LOISY

Titre de la thèse :

DEVENIR DES VIRUS ENTÉRIQUES HUMAINS EN MILIEU MARIN : Apport des VLPs (Virus Like Particles) pour la purification des coquillages

Soutenue le : 5 novembre 2004

JURY : Pr M. K. Estes Dr J.Cohen Pr A. Bosch Pr J. Le Pendu Pr A. M. Quero Dr S. Le Guyader

Rapporteur Rapporteur

A Olivier

A mes parents

A ma sœur et sa famille

Remerciements

L'exposé de ce travail, m'offre l'occasion de remercier tous ceux qui m'ont encouragée et aidée dans la réalisation de cette thèse.

Je suis très sensible à l'honneur que me fait le professeur Mary K. Estes en acceptant d'être membre de ce jury. Merci également pour votre aide et pour les corrections d'articles. Thanks for your precious contribution.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude au docteur Jean Cohen pour avoir accepté la direction de cette thèse, pour avoir suivi mon travail malgré l'éloignement géographique et parfois scientifique.

J'adresse mes sincères remerciements aux professeurs Albert Bosch et Jacques Le Pendu pour avoir accepté de juger cette thèse et pour l'intérêt qu'ils portent à ce travail. La Virologie se décline ainsi des hommes aux huîtres.

Je remercie le Professeur Anne marie Quero pour avoir accepté d'être membre de ce jury.

Je tiens tout particulièrement à adresser mes remerciements chaleureux à Soizick Le Guyader, responsable scientifique de ce travail et membre du jury. Soizick, merci pour ton encadrement exceptionnel, ta disponibilité, tes précieux conseils, tes encouragements et ton soutien quasi quotidien pendant toutes ces années. Sans toi, je n'en serais pas là. Merci de m'avoir ouvert la voie de la Recherche.

Je remercie vivement Monique Pommepuy pour m'avoir accueillie dans son équipe depuis le début de l'histoire, pour avoir mis à ma disposition tous les moyens de réaliser ce travail, pour son dynamisme, sa franchise et ses compétences.

C'est à toutes les personnes de l'équipe du laboratoire de Microbiologie que je m'adresse pour leur dire combien j'ai été sensible à leur disponibilité, leur compétence, leur soutien, leur aide. J'ai eu plaisir à travailler avec vous.

Tout d'abord merci aux Nantais : Pierre, Sylvain, Larissa, Estelle mais aussi à ceux qui n'ont été que de passage, Alexandre, Annaïg et Audrey. Je remercie aussi, Patrice, qui a contribué à ce travail ; je lui souhaite bon vent pour sa thèse.

Merci à toute l'équipe brestoise : Dominique, Michèle, Marie-Paule, Jean-Claude, Cécile, Solen, François. Un merci particulier à Marie-Paule pour son aide dans la réalisation de ce manuscrit. François, bon courage pour la suite de ta thèse.

Je remercie sincèrement Annie Charpilienne pour la précieuse production de VLPs rotavirus. Merci aussi pour votre aide et vos conseils, notamment lors de mes premiers pas dans cette thèse.

Un merci particulier, aussi, à Jézabel Rocher, pour toutes les coupes de tissus réalisées. Merci aussi à Anne-Laure, Béatrice et Nathalie pour votre accueil chaleureux à l'Inserm.

J'adresse mes très sincères remerciements à tous ceux de l'équipe « Thé & Café » et leur moitié, qui aujourd'hui, sont devenus des amis. Merci à Ju et Jérôme, Chrystèle, Sylvie, Elo, Sophie, Flo, Jérôme, Sylvain et Emilie, Olivier et Séverine.

Je remercie aussi tous mes amis nantais, de Bourgogne et d'ailleurs, les amis du club de plongée « Rêve Bleu », pour les moments de défoulement, la joie partagée à plonger ensemble, leurs encouragements, leur présence et leur précieuse amitié.

Un très grand merci à mes parents et à Céline, Olivier, Emeline et Pauline pour leur confiance, leur soutien, leur aide et tout le reste.

Enfin et encore...il est une personne qui bien que n'apparaissant jamais dans ce manuscrit, y a pourtant longuement et patiemment contribué. Pour cette raison et bien d'autres encore, Olivier, merci pour tout ce que tu m'as apporté...

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN	acide désoxyribonucléique
AEC	3-amino-9,6-éthylcarbazole
ARN	acide ribonucléique
AV	astrovirus
BEC	bovine enteric calicivirus
Cat-floc	chlorure de polydiallyldiméthylammonium
CFU	colony forming unit
CI	contrôle interne
CsCl	chlorure de césium
Ct	cycling threshold
CTAB	céthyl-triméthyl ammonium bromide
Dig	digoxygénine
dNTP	désoxynucléotide triphosphate
EDTA	éthylène-diamine-tétra acétique acide
Elisa	Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
EV	entérovirus
FAHRP	Food Animal Health Research Program
FCV	feline calicivirus
GI	Norovirus génogroupe I
GII	Norovirus génogroupe II
GFP	Green Fluorescent Protein
HRV	human rotavirus
Ig	immunoglobuline
NoV	norovirus
NTU	nephelometric turbidity unit
NV	Norwalk virus
OPD	o-phénylènediamine dihydrochloride
ORF	open reading frame
PEC	porcine enteric calicivirus
PEG	polyéthylène glycol
PFU	plaque forming unit
PNPP	para-nitro-phényl phosphate
PS	pseudovirus
PVDF	polyvinyldiène fluoride
RT-PCR	reverse transcription- polymerase chain reaction
RV	rotavirus
SN PCR	semi nichée PCR
SoV	sapovirus
TIAC	toxi-infection alimentaire collective
TMB	tetraméthyl benzidine
Tris-HCl	tris(hydroxyméthyl)-aminométhane hydrochloride
UV	ultra-violet
VHA	virus de l'hépatite A
VLP	Virus Like Particle
WB	western blot

SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
GENERALITES NOROVRUS ET ROTAVIRUS	5
A- Caractéristiques générales des norovirus et des rotavirus	5
I. Historique	5
1. Les norovirus	5
2. Les rotavirus	6
II. Les VLPs de norovirus et de rotavirus	6
1. Construction des VLPs	6
2. VLPs norovirus	7
3. VLPs rotavirus	7
III. Morphologie de l'agent viral	8
1. Les norovirus	8
2. Les rotavirus	9
IV. Organisation génomique et classification	11
1. Les norovirus	11
2. Les rotavirus	12
V. diversité génétique	14
1. Les norovirus	14
2. Les rotavirus	16
VI. Immunité	17
1. Les norovirus	17
2. Les rotavirus	18
VII. Pathologie et épidémiologie des infections	19
1. Les norovirus	19
2. Les rotavirus	19
VIII. Potentiel zoonotique	20
1. Les norovirus	20
2. Les rotavirus	20
IX. Développement de vaccins	21
1. Les norovirus	21
2. Les rotavirus	22
X. Voies de transmission	23
1. Les norovirus	23
2. Les rotavirus	23
B- Contamination de l'environnement par les norovirus et les rotavirus	25
I. Taux d'excrétion dans les selles	26
1. Les norovirus	26
2. Les rotavirus	26
II. Propriétés de persistance	26
III. Contamination et transmission par le milieu hydrique	29
1. Les norovirus	29
2. Les rotavirus	30

IV. Contamination et transmission par les coquillages	31
V. Etudes en milieu naturel	32
VI. Purification des coquillages	33
VII. Difficulté de détection des virus dans les coquillages :	35
exemple des norovirus	
1. Extraction	36
2. RT-PCR	37
MATERIELS ET METHODES	39
A- Détection des norovirus et des rotavirus	39
I. Echantillons de coquillages	39
1. Comparaison de méthode d'extraction	39
2. Etude de la contamination au FAHRP	39
3. ARN de coquillages naturellement contaminés	39
4. Huîtres achetées	39
II. Selles	39
III. Dissection	40
IV. Contamination artificielle	40
V. Concentration des virus	40
1. Dans les tissus d'huîtres	40
a. Technique Baylor	40
b. Technique FAHRP	41
2. Dans les eaux de station d'épuration	41
VI. Extraction des acides nucléiques	41
1. Selles	41
2. Huîtres	42
a. Technique Baylor	42
b. Kit Qiagen RNEasy Plant	42
c. Technique FAHRP	43
3. Eaux de station d'épuration	43
VII. Amorces et sondes	44
VIII. RT-PCR	46
1. RT-PCR classique	46
2. RT-PCR FAHRP	47
3. RT-PCR en une étape adaptée du kit Invitrogen	48
4. PCR semi-nichée	48
5. Séquençage	49
IX. Hybridation sur membrane	49
X. RT-PCR en temps réel pour la détection des NoV	50
1. Alignement des séquences	50
2. Définition des amorces et sondes	50
3. Comparaison de kits de RT-PCR en temps réel en une étape	51
4. Optimisation du kit de RT-PCR en temps réel	52
en une étape Invitrogen	
5. Validation des méthodes de RT-PCR en temps réel NoV GI et GII	52
a. Validation sur selles	52
b. Validation sur des eaux de station d'épuration	52
b. Validation sur des huîtres artificiellement contaminées	53
c. Validation sur des ARN viraux de coquillages	53
naturellement contaminés	

XI. Contrôles et interprétation	53
1. RT-PCR classique	53
2. RT-PCR en temps réel	54
XII. Analyse statistique	54
B- Apport des Virus Like Particles	55
I. Souches virales et VLPs	55
1. Souches virales	55
2. VLPs rotavirus	55
3. Pseudovirus	55
4. NLPs du virus de Norwalk	56
II. contaminations artificielles	56
1. Contamination de l'eau de mer	56
2. Bio-accumulation au laboratoire	56
3. Bio-accumulation dans le pilote de purification	56
a. Contamination avec du RV	57
b. Contamination avec des VLPs	57
c. Bi-contamination phages/ VLPS 2/6	57
III. Méthodes de détection	57
1. Western-blot	57
a. SDS-PAGE	58
b. Transfert sur membranes	58
c. Révélation immunohistochimique	58
2. ELISA RV, VLPs RV, et PS	59
a. Elisa direct	59
b. Elisa sandwich simple	60
c. elisa double sandwich	61
3. Elisa NV et VLPs NV	61
4. quantification des PS par RT-PCR en temps réel	62
IV. Comparaison de la stabilité des souches virales et des VLPs	62
en eau de mer naturelle	
1. Méthodes de concentration de l'eau de mer	62
2. Etude de comparaison de stabilité	63
V. Etude de la purification des huîtres dans le pilote	63
1. pilote de purification	63
2. Expériences de purification	64
3. Analyse	65
VI. Analyse statistique	65
VII. Analyse immunohistochimique	65
1. Fixation des tissus	65
2. Inclusion	65
3. Coupes de tissus	66
4. Immunohistochimie	66
VIII. Test d'inhibition de la fixation des VLPs sur coupes	67
de glandes digestives	
1. Inhibition par le périodate	67
2. Inhibition par le lait maternel	67
3. Inhibition par la salive	68
IA. Comparaison de la fixation du virus de Norwalk et des VLPs NV	68
sur les glandes digestives d'nuitres	

X. Test d'inhibition de la bio-accumulation des VLPs NV	68
sur les glandes digestives d'huîtres	
RESULTATS	69
A- Détection des norovirus et des rotavirus	69
I. Comparaison des 2 méthodes d'extraction	69
1. Elimination des inhibiteurs	69
2. Comparaison de la pertinence	70
II. Etude au FAHRP de la contamination en NoV des huîtres	71
1. Transfert de la méthode d'analyse des huîtres	71
2. Analyse de la contamination en NoV des huîtres	71
III. Développement de la RT-PCR en temps réel pour les NoV	73
1. Définition des amorces et sonde NoV génogroupe I	73
2. Définition des amorces et sonde NoV génogroupe II	74
3. Comparaison de kits de RT-PCR en temps réel une étape	76
4. Optimisation du kit Invitrogen	76
5. Comparaison de la sensibilité des amorces	77
6. Linéarité, efficacité d'amplification et spécificité de l'essai de RT-PCR en temps réel	78
7. Validation des méthodes de RT-PCR en temps réel	80
NoV GI et GII sur des huîtres artificiellement contaminées	
8. Validation des méthodes de RT-PCR en temps réel	80
NoV GI et GII sur des eaux de station d'épuration	
9. Efficacité de la RT-PCR en temps réel sur des coquillages	81
naturellement contaminés	
B- Apport des VLPs	84
I. Mises au point méthodologiques	84
1. Western-blot	84
2. Elisa RV et VLPs 2/6	85
3. Concentration des échantillons d'eau de mer	86
II. Etudes de la stabilité des VLPs en eau de mer naturelle	86
1. comparaison de la stabilité du RV et des VLPs 2/6	86
a. stabilité du RV et des VLPs 2/6 mesurée par Elisa	86
b. analyse des protéines	87
2. Comparaison de la stabilité du RV, des VLPs 2/6 et	88
des pseudovirus	
a. stabilité des particules mesurée par Elisa	88
b. analyse des protéines	90
c. analyse des PS par RT-PCR en temps réel	90
3. Comparaison de la stabilité du NV et des et des VLPs NV	92
a. stabilité du NN et des VLPs NV mesurée par Elisa	92
b. analyse des protéines	93
III. Etude de la purification des huîtres	94
1. Purification des huîtres artificiellement contaminées avec du RV bovin	94
2. Purification des huîtres après bio-accumulation des VLPs2/6	94
3. Purification naturelle des huîtres sur l'estran sous influence des marées	95
4. Purification des huîtres après bi-contamination phages/ VLPs2/6	96

5. Purification des huîtres artificiellement contaminées	97
IV Fude de la fivation des VI Ps NV et du NV sur les tissus d'huîtres	98
1 Fixation des VI Ps NV sur courses de glandes digestives	98
2 Identification de la structure de fixation du VI Ps NV	99
sur coupes de glandes digestives	,,
a inhibition par le périodate de sodium	99
h inhibition par le lait maternel	99
c inhibition par la salive	100
3. Comparaison de la fixation du NV et des VLPs NV après	101
bio-accumulation dans les huîtres	101
4. Inhibition de la bio-accumulation du NV et des VLPs NV dans	104
les huîtres	101
DISCUSSION	105
A- Détection des norovirus et des rotavirus	105
I. Comparaison des deux méthodes d'extraction	105
II. Contamination en norovirus dans les huîtres	
III. Développement de la RT-PCR en temps réel pour les norovirus	111
B- Apport des Virus Like Particles (VLPs)	116
I. Etude de la stabilité des VLPs en eau de mer naturelle	116
II. Etude de la purification des huîtres	118
III. Etude de la fixation des VLPs NV et du NV sur les tissus d'huîtres	120
CONCLUSION/PERSPECTIVES	123
PUBLICATIONS – COMMUNICATIONS	128
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	211
ANNEXES	223
Annexe 1 : séjour doctoral	223
Annexe 2 : extraction des ARN viraux à partir de selles	225
« kit Qiamp Viral RNA Qiagen	
Annexe 3 : extraction des ARN viraux à partir	226
de coquillages « Méthode Baylor »	
Annexe 4 : extraction des ARN viraux à partir	228
de coquillages « kit Qiagen RNEasy Plant »	
Annexe 5 : extraction des ARN viraux à partir d'eaux de station d'épuration	229
Annexe 6 · hybridation	230

TABLEAUX

GENERALITES NOROVIRUS ET ROTAVIRUS

Tableau 1 : Principales propriétés des protéines du rotavirus (souche SA11)	13
Tableau 2 : Souches de référence des norovirus humains	15
Tableau 3 : Résistance des NoVs et RV aux traitements physiques	27
Tableau 4 : Résistance des RV et NoV aux paramètres chimiques	28
Tableau 5 : Principales méthodes de concentration et d'extraction des ARNs à partird'échantillons de coquillages	36
MATERIELS ET METHODES	
Tableau 6 : Amorces et sondes utilisées pour la détection des NoV amorces localiséesdans les régions codant pour la protéine de capside (A) et pour la polymérase (B)	44
Tableau 7 : Amorces et sondes rotavirus	45
RESULTATS	
Tableau 8 : Comparaison de l'élimination des inhibiteurs par les 2 méthodes d'extraction	69
Tableau 9 : Comparaison de la pertinence des 2 méthodes pour la détection des NoV	70
Tableau 10 : Comparaison de la pertinence des 2 méthodes pour la détection des RV	70
Tableau 11 : Résultats de l'analyse des huîtres	72
Tableau 12 : Comparaison de l'efficacité d'amplification de kits de RT-PCR une étape en temps réel	76
Tableau 13 : Effet de la concentration en amorces COG2R et QNIF2	77
Tableau 14 : Validation de la RT-PCR en temps réel sur des extraits de selles	78
Tableau 15 : Sensibilité de la RT-PCR en deux étapes, RT-PCR une étape plus hybridation et de la RT-PCR en temps réel pour détecter les huîtres artificiellement contaminées	80
Tableau 16 : Validation de la RT-PCR en temps réel sur des eaux de station d'épurationprélevées d'avril 2002 à avril 2003	81
Tableau 17 : Coquillages naturellement contaminés analysés par RT-PCR deux étapeset hybridation et par RT-PCR en temps réel pour les NoVs génogroupes I et génogroupes II	83
Tableau 18 : Comparaison des 3 techniques Elisa testées	85
Tableau 19 : Analyse des régressions linéaires de la décroissance du RV, des VLPs 2/6 et des PS à 25°C en eau de mer.	89

FIGURES

GENERALITES NOROVIRUS ET ROTAVIRUS

Figure 1 : Structure de particules recombinantes du virus de Norwalk en cryo-microscopie électronique et cristallographie aux rayons X	9
Figure 2 : Caractéristiques architecturales du rotavirus.	10
Figure 3 : Arbre phylogénétique représentant la classification actuelle des Caliciviridae	11
Figure 4 : Organisation génomique des Norovirus	12
Figure 5 : Cycle de transmission viral des Norovirus et des Rotavirus	25
MATERIELS ET METHODES	
Figure 6 : Description du pilote de purification	64
RESULTATS	
Figure 7 : Alignement des 7 séquences de NoV GI.	74
Figure 8: Alignement des 54 séquences de NoV GII	75
Figure 9 : Analyse de l'efficacité et de la linéarité des essais de RT-PCR en temps réel	79
Figure 10 : Migration des produits d'amplification par RT-PCR en temps réel d'une gamme de dilution au dixième d'ARN extrait de S35	79
Figure 11 : Courbes d'amplification de 15 échantillons d'huîtres naturellement contaminées amplifiées par RT-PCR en temps réel NoVs GII	82
Figure 12 : Evaluation de la sensibilité de détection par Western-blot	85
Figure 13 : Comparaison de la survie des particules de rotavirus et de VLPs 2/6 en eau de mer à 25°C pendant 6 jours	87
Figure 14 : Analyse des protéines de rotavirus infectieux et des VLPs 2/6 par western-blot	88
Figure 15 : Comparaison des décroissances des particules RV, VLPs 2/6 et PS incubées à 25°C pendant 6 jours	89
Figure 16 : Analyse des protéines des pseudovirus par western-blot	90
Figure 17 : Analyse par RT-PCR en temps réel de la décroissance des PS en eau de mer à 25°C.	91
Figure 18 : Comparaison de la décroissance des PS (RT-PCR en temps réel et Elisa) et de l'ARN libre (RT-PCR en temps réel) en eau de mer à 25°C.	92
Figure 19 : Comparaison de la stabilité des particules de rotavirus et de VLPs 2/6 en eau de mer à 25°C pendant 6 jours	93

Figure 20 : Analyse des protéines de NV (A) et des VLPs NV (B) par western-blot	93
Figure 21 : Cinétiques de purification des huîtres contaminées avec les VLP2/6 dans le pilote à 22°C pendant 7 jours	95
Figure 22 : Cinétiques de purification naturelle des huîtres artificiellement contaminées.	96
Figure 23 : Cinétiques de purification des huîtres contaminées en phages MS2 et VLPs 2/6 dans le pilote à 22°C pendant 7 jours.	97
Figure 24 : Fixation des VLPs NV sur les glandes digestives d'huîtres	98
Figure 25 : Effet du traitement au périodate de sodium sur la fixation des VLPs NV sur coupes de glandes digestives.	99
Figure 26 : Effet de lait maternel de mère non sécrétrice (A, C) et de mère sécrétrice (B, D) sur la fixation des VLPs NV sur les glandes digestives	100
Figure 27 : Effet de salives d'individu de phénotype non sécréteur et sécréteur sur la fixation des VLPs NV sur les glandes digestives	101
Figure 28 : Fixation des NV après bio-accumulation pendant 12 (A) ou 24 h (B)	102
Figure 29 : Fixation des VLPs NV après bio-accumulation dans les huîtres de 10^9 particules pendant 12 h (A) ou de 10^{12} pendant 12 h (B) ou 24 h (C).	103

L'importante population et le développement des activités humaines dans les régions littorales entraînent le rejet de nombreux germes pathogènes d'origine fécale dans l'environnement estuarien et marin. Il y a encore 50 ans, la majorité des épidémies de gastroentérites liées à la consommation des coquillages était attribuée à des bactéries. Des normes basées sur des dénombrements bactériens ont alors été établies pour assurer la salubrité de ces produits mis sur le marché. Associées à l'amélioration des traitements d'épuration, ces normes ont entraîné une diminution des épidémies d'origine bactérienne mais la consommation de coquillages peut encore constituer un risque pour la santé humaine. A l'heure actuelle, même si l'origine de ces gastro-entérites n'est pas élucidée dans sa totalité (rôle probable des vibrios et d'autres bactéries), les virus semblent jouer un rôle important et leur implication a été clairement établie dans des phénomènes épidémiques.

En France, entre 3 et 4 millions de consultations médicales pour diarrhées aiguës sont recensées chaque année, la majorité survenant lors d'un pic hivernal. Pour une ville de 15 000 équivalents-habitants, le rejet d'une station d'épuration, en période épidémique, a été estimé à 60 000 virus par minute. Les possibilités de rejet de ces virus dans l'environnement sont hautement probables et le risque lié à la consommation de coquillage est présent, si on considère l'importance de la production moyenne française de coquillages d'élevage (205 000 tonnes environ en 2003). La protection efficace du consommateur doit prendre en compte la contamination virale des parcs d'élevage conchylicole en incluant l'impact des eaux usées et la qualité des eaux de production, et l'élimination des virus pendant les procédés de purification.

Les principaux virus humains susceptibles d'être détectés dans l'environnement sont les virus présentant un cycle de multiplication entérique. Parmi les nombreux types (au moins 120 types différents) de virus excrétés dans les fèces de malades ou de porteurs asymptomatiques, les virus les plus fréquemment impliqués dans des pathologies, toutes causes confondues, sont les calicivirus humains (norovirus), les rotavirus, les hépatovirus (virus de l'hépatite A), le rôle des astrovirus, entérovirus et adénovirus étant moins clairement établi. Les propriétés fondamentales de ces virus conditionnent leur devenir en milieu marin. Après rejet dans le milieu extérieur, ces virus ne se développent pas du fait de leur parasitisme intracellulaire obligatoire, dépendant de cellules hôtes spécifiques. Leur concentration n'augmentera pas même s'ils peuvent persister durant plusieurs semaines en milieu hostile dans des conditions différentes de celles du tube digestif. Adsorbés sur des particules

concentrées par les mollusques filtreurs, les virus pourront ainsi contaminer les gisements de coquillages.

Les rotavirus et les norovirus ont été choisis comme modèles d'études puisque ces deux virus constituent les causes majeures de gastro-entérites d'origine non bactérienne en France mais également au niveau mondial (Chikki-Brachet et al., 2002 ; Anderson et Weber, 2004 ; Lopman et al., 2004). L'étude des norovirus, en pleine évolution sur le plan génomique et immunologique, souligne leur implication dans les phénomènes épidémiques toutes classes d'âge confondues (**publication N**° **3**). La présence dans le règne animal de norovirus et de rotavirus, notamment chez les porcs et les bovins dont l'élevage est fréquent en zones côtières, soulève la question du potentiel zoonotique.

La principale difficulté dans la détection de ces virus est l'absence de méthode simple de routine. L'isolement par culture cellulaire est inexistant pour les norovirus et difficile pour les rotavirus, et il n'existe pas de modèle animal permettant leur multiplication. Grâce aux progrès de la biologie moléculaire, l'amplification génique, méthode sensible et spécifique a été développée, après transcription de l'ARN viral.

La méthode de RT-PCR ne présentant pas toujours des critères de sensibilité et spécificité suffisant pour la détection de ces virus dans l'environnement, des méthodes complémentaires telle que la PCR nichée, l'hybridation ont été développées. Ces paramètres, sensibilité et spécificité, dépendent de différents facteurs :

- la qualité des acides nucléiques extraits : les enzymes utilisées sont très sensibles aux inhibiteurs présents dans l'extrait, ce qui justifie une étape de purification des ARN viraux lors de l'extraction.
- la quantité d'acides nucléiques extraits : en raison de la faible dose infectieuse pressentie pour ces virus, la détection de trace est importante, une étape de concentration des ARN viraux est alors nécessaire.
- des amorces choisies : la diversité génomique observée pour ces virus limite les possibilité de sélection d'amorces consensus.

La méthode d'extraction, utilisée au laboratoire depuis de nombreuses années, et validée sur de nombreuses études (Atmar et al., 1995 ; Le Guyader et al., 1996, 2000, 2003) comporte ces deux étapes clés de concentration et purification. Cette méthode a été transférée au laboratoire « Food Animal Health Research Program » aux USA afin d'étudier la contamination en norovirus des huîtres.

Cette méthode étant relativement longue et compliquée, l'un des objectifs de ce travail a été d'évaluer la pertinence d'un kit commercial pour l'extraction d'ARN dans des coquillages potentiellement contaminés, permettant de simplifier cette méthode (valorisé dans le Rapport final du projet Virus Safe Seafood, Pommepuy et al., 2003a)

Au cours de cette thèse, l'essor considérable de la RT-PCR en temps réel nous a donné l'opportunité d'adapter cette technique pour la détection des norovirus. L'intérêt majeur de cette technique pour la détection des virus dans les coquillages réside dans la rapidité et la spécificité (hybridation concomitante à l'amplification). Malgré l'importante diversité génétique, la sélection d'amorces consensus nous a permis de **valider cette méthode pour la détection des norovirus du génogroupe II, des mises au point étant encore nécessaires pour augmenter la sensibilité pour la détection des génogroupes I (publication N° 4).**

Si la virologie de l'environnement a connu un développement important grâce à l'essor des techniques de biologie moléculaire, les études *in situ* sont toujours difficiles en raison du caractère pathogène des virus entériques mais aussi de la difficulté de les multiplier en grande quantité. Les options pour pallier à cet inconvénient sont:

- les études in vitro mais l'extrapolation des résultats est parfois délicate

- l'utilisation de bactériophages, virus présentant des caractéristiques physicochimiques proches mais non identiques avec, là aussi, des questions concernant l'interprétation et l'extrapolation des résultats

- la modélisation mathématique, très utile pour prédire ou analyser des phénomènes observés mais nécessitant une définition précise des paramètres intrinsèques inhérents au contaminant.

Ce travail propose une alternative nouvelle inspirée de l'utilisation des particules recombinantes de rotavirus et de norovirus en recherche fondamentale. Ces particules, non infectieuses possédant des caractéristiques identiques aux virus natifs, produites en grande quantité, semblent constituer une alternative séduisante pour étudier le comportement des virus dans l'environnement. La spécificité du milieu marin, nécessitant des ajustements méthodologiques, des méthodes de détection des VLPs ont été développées pour l'eau de mer ou des matrices complexes tels que le coquillage. La pertinence des VLPs rotavirus et des VLPs du virus de Norwalk en tant que substitut des virus en eau de mer à 25°C a été démontrée (publications N° 1 et 2). Cet outil novateur nous a permis de travailler sur la

purification, à échelle professionnelle, d'huîtres artificiellement contaminées avec des VLPs, et d'étudier la persistance des VLPs dans les coquillages en milieu naturel pendant environ trois mois (publication N° 5). L'efficacité de cet outil a également été démontrée pour étudier le processus de contamination de l'huître au niveau des différents organes et de confirmer des hypothèses émises depuis plusieurs années. La démonstration d'une fixation spécifique des VLPs du virus de Norwalk sur les tissus d'huîtres constitue un résultat majeur pour la compréhension du devenir de ces pathogènes en milieu marin.

Après une revue bibliographique sur les rotavirus et les norovirus, nous développerons successivement nos avancées concernant la détection de ces virus dans l'environnement puis l'étude de leur devenir en milieu marin grâce à l'utilisation des VLPs.

Dans cette synthèse bibliographique, nous nous sommes attachés à comparer les deux virus étudiés au cours de notre travail, à savoir les norovirus et les rotavirus. Certaines remarques ou questions concernant l'étude de ces virus dans l'environnement ont été soulevées. Dans chaque partie, nous avons souligné également les connaissances obtenues grâce à l'utilisation des Virus-like Particles (VLPs).

A- Caractéristiques générales des norovirus et des rotavirus

I. Historique

1. Les norovirus

L'histoire des norovirus, cause majeure de gastro-entérites humaines d'origine non bactérienne et premier agent pathogène viral responsable d'épidémies liées aux aliments et à l'eau, a commencé en 1968 dans une école primaire de la ville de Norwalk (Ohio, USA) (Kapikian et al., 1972 ; Atmar et al., 2001 ; Green et al., 2001). Cette épidémie atteignit 50 % des élèves et des professeurs et 32 % des familles en contact, sans qu'aucun agent bactérien ne puisse être identifié dans les différents prélèvements collectés. Quelques années plus tard, une étude sur volontaires humains a permis de montrer que l'agent responsable était une petite particule (< 36 nm) résistante à l'éther, à l'acide et à une chaleur modérée (Dolin et al., 1971). En 1972, le micro-organisme responsable de cette épidémie fut observé par immuno-microscopie électronique dans les selles provenant des malades, démontrant ainsi l'étiologie virale de l'épidémie (Kapikian et al., 1972). Ce virus fut nommé virus de Norwalk. Depuis la découverte de ce premier virus, d'autres souches ont été identifiées par microscopie électronique et désignées selon la localisation de leur détection (e. g., Southampton, Hawaï, Lordsdale) (Atmar et al., 2001 ; Green et al., 2001).

Successivement appelés « petits virus ronds non structurés » (SRSV), virus de type Norwalk (Norwalk-like virus ou NLV), le comité international de classification les a récemment nommés Norovirus (NoV) (Van Regenmortel, 2000).

2. Les rotavirus

En 1973, l'observation en microscopie électronique de biopsies d'épithélium duodénal d'enfants présentant une gastro-entérite a permis de retrouver des particules virales similaires à celles identifiées chez les animaux (Bishop et al., 1973). Sur la base de leur caractéristique en forme de roue (du latin rota), le nom de rotavirus leur a été donné (Flewett et al., 1974). Leurs propriétés morphologiques et biochimiques ont permis de les classer dans la famille des *Reoviridae* (Holmes, 1991). Le genre rotavirus est créé en 1979, il se distingue des autres genres sur des caractères morphologiques et antigéniques.

Ces deux virus ont donc été découverts dans les années 70, leur connaissance, encore partielle sur certains points, est donc récente et a suivi l'évolution des technologies telle que la biologie moléculaire.

II. Les Virus-Like Particles (VLPs) de rotavirus et de norovirus

Bien que le nom exact en français soit particules recombinantes, le terme VLP est généralement utilisé dans la communauté scientifique. Ces particules ont la particularité d'être non pathogènes, puisqu'elles ne contiennent pas d'ARN viral nécessaire à la réplication, de pouvoir être produites en grande quantité (> 10^{12} particules/ml) et d'être morphologiquement et antigéniquement identiques aux virus dont elles sont issues (Crawford et al., 1994 ; Jiang et al., 1992). Ces VLPs ont été particulièrement utiles pour l'étude fondamentale des deux virus qui nous concernent.

1. Construction des VLPs

Le principe de la production des VLPs est basé sur le fait que la co-expression des protéines virales de capside, dans le système baculovirus, induit l'auto-assemblage de VLPs (Labbé et al., 1991 ; Jiang et al., 1992). La production comprend plusieurs étapes. La première consiste à produire des plasmides recombinants contenant le ou les différents gènes codant pour les protéines de capside virale. Une étape de transformation dans des cellules compétentes de type *Escherischia coli* permet la recombinaison entre l'ADN de la cellule et le plasmide recombinant. Après sélection des cellules, l'ADN recombinant est purifié. Il est

ensuite co-transfecté avec l'ADN du baculovirus dans des cellules d'insectes afin de permettre l'expression de particules de baculovirus recombinantes. Après multiplication, les VLPs sont libérées dans le surnageant cellulaire puis purifiées.

2. VLPs norovirus

En 1992, l'expression des protéines de capside VP1 et VP2 codée par l'ORF2 et l'ORF3 du virus de Norwalk (NV) dans le système baculovirus, a permis la production de VLPs de NV recombinant VLPs NV (Jiang et al., 1992). Depuis des VLPs ont été produites à partir de l'expression dans le système baculovirus de protéines de capside d'autres souches de NoVs GI (Chiba virus et Seto virus, Kitamoto et al., 2002) et de NoVs GII: virus de Lordsdale (Dingle et al., 1995), Snow Mountain virus (Jiang et al., 1995a ; Lochridge et Hardy, 2003), virus Hawaï (Green et al., 1997), virus Mexico (Jiang et al., 1995b), virus Toronto (Leite et al., 1996), virus Grimsby (Hale et al., 1999 ; Nicollier-Jamot et al., 2003). A noter que des VLPs ont également été produites pour les Sapovirus (Jiang et al., 1999 ; Chen et al., 2004) et les Calicivirus porcins (Guo et al., 1999).

Des VLPs NV ont également été produites à partir du système d'expression du virus de l'encéphalite équine, permettant ainsi une production dans des cellules de mammifères (Baric et al., 2002). Ces VLPs NV sont identiques à celles produites dans le vecteur d'expression baculovirus.

3. VLPs rotavirus

En 1991, Labbé et al. ont montré que l'expression de VP2 dans le vecteur de transfert baculovirus, puis transfection dans les cellules d'insecte *Spodoptera frugiperda* Sf9 permettait la production de cores de rotavirus. Par la suite, de nombreux autres types de VLPs ont été produits : des VLPs double couches contenant les protéines VLP2/6 ou VP2/4/6 , des VLPs triple couches contenant les protéines VLP2/6/7 et éventuellement VP4 (Crawford et al., 1994). Des VLPs 2/6 hétérologues comprenant une protéine VP2 issue de la souche de RV bovine RF et une protéine VP6 issue de la souche simian SA11, et des VLPs 2/6 homologues produites uniquement à partir de protéines de souche RV SA11 ont été produites (Bertolotti-Ciarlet et al., 2003a). Par délétion de 120 pb dans VP2, 120 molécules de protéines GFP (Green Fluorescent Protein) ou de protéines DsRed ont pu être insérées dans les VLP2/6 et VLP2/6/7/4 permettant ainsi l'obtention de particules fluorescentes (Charpilienne et al.,

2001). Récemment des VLP2/6 contenant un ARN chimérique, appelées pseudovirus, ont également été produites (Caballero et al., 2004).

Les VLPs ont essentiellement été utilisées dans le domaine de la recherche fondamentale et clinique.

Question 1 : Ces VLPs permettent-ils d'étudier le comportement de virus dans le milieu marin ?

III. Morphologie de l'agent viral

1. Les norovirus

D'un point de vue structural, les NoV sont des virus non enveloppés d'un diamètre allant de 27 à 40 nm présentant en microscopie électronique un aspect plumeux. Grâce au développement des pseudo particules virales (VLPs), la structure a été résolue par cryomicroscopie électronique et cristallographie aux rayons X (Prasad et al., 1999). La capside, composée de 180 copies d'une seule protéine, montre une symétrie icosahédrique d'ordre 3. D'un point de vue architectural, 90 dimères forment une coque surmontée de protubérances en forme d'arches et de 32 dépressions en forme de coupe (figure 1). Il a été montré que chaque monomère de protéine de capside des VLPs NV comportait deux domaines, le domaine S de la coque et le domaine P des protubérances, connectés entre eux par une charnière flexible (Prasad et al., 1999, 2000). Bertolotti-Ciarlet et al. (2002) et Baric et al., (2002) ont montré que des mutations dans la partie N-terminale du domaine S empêche l'assemblage des VLPs NV. Des résultats similaires ont été trouvés par Lochridge et Hardy (2003) concernant les VLPs du virus Snow Mountain (GII) démontrant que l'histidine en position 91 est importante pour les interactions entre les domaines P1 et P2 et le bon assemblage des VLPs. Une étude récente a montré par comparaison des VLPs NV, Grimsby (GII), Parkville (Sapovirus) et SMSV4 (San Miguel Sea lion virus) que la seule protéine de capside intégrait les fonctions suivantes : assemblage correct de la capside, reconnaissance du récepteur, spécificité d'hôte, diversité de souches et immunogénicité (Chen et al., 2004). Chaque domaine semble donc avoir un rôle précis : le domaine conservé S permettrait l'échafaudage icosahédrique, le domaine P1 servirait de plate-forme pour positionner le domaine P2 qui conférerait les fonctions d'antigénicité, de spécificité d'hôte et de diversité de souche (Nilsson et al., 2003; Chen et al., 2004).



Figure 1 : Structure de particules recombinantes du virus de Norwalk en cryo-microscopie électronique et cristallographie aux rayons X (Prasad et al., 1999 ; Bertolotti-Ciarlet et al., 2002).

2. Les rotavirus

Les rotavirus sont des virus non enveloppés d'un diamètre de 70 nm à symétrie icosaédrique. La capside est composée de 3 couches protéiques concentriques entourant les 11 segments d'ARN génomiques double brin associés aux enzymes nécessaires à la synthèse d'ARNm (figure 2). La couche protéique la plus externe est constituée des protéines VP7 et VP4 ; la protéine VP6 forme la couche intermédiaire et la protéine VP2 la couche interne renfermant le génome et les protéines VP1 et VP3 (Jayaram et al., 2004). Il existe trois types de particules discernables en microscopie électronique :

- les particules entières, TLPs (Triple Layered Particles) qui constitue le virion complet d'un diamètre d'environ 75 nm
- les particules double couches, DLPs (Double Layered Particles) dépourvues de leur couche externe VP7 et VP4, ces particules sont non infectieuses et d'un diamètre d'environ 70 nm
- les particules simple couche (ou cores) formées uniquement de la protéine VP2 entourant le génome et les enzymes associées (Estes et al., 2001).



Figure 2: Caractéristiques architecturales du rotavirus. (A) les 11 segments génomiques d'ARN double brin séparés en fonction de leur poids moléculaire, de B à F, reconstitution schématique des observations en microscopie électronique, (B) TLPs, (C) vue en coupe des TLPs, (D) organisation schématique du génome, (E et F) modèle des DLPs pendant la transcription avec relargage des ARNm par les canaux (d'après Jayaram et al., 2004).

Les deux virus ont une morphologie différente avec une capside constituée d'une seule protéine pour les norovirus et un ARN génomique protégé par une triple couche capsidique pour les rotavirus.

Question 2 : Ces différences structurales influencent-elles leur comportement en milieu marin ?

IV. Organisation génomique et classification

1. Les norovirus

Depuis l'obtention de la séquence du génome complet du virus de Norwalk, l'analyse phylogénique de différentes souches a permis de préciser leur taxonomie et de créer quatre genres dans la famille des *Caliciviridae*: les Lagovirus, les Vesivirus, les NoV et les Sapovirus, présentant une organisation génomique différente (figure 3) (Green et al., 2001).



Figure 3 : Arbre phylogénétique représentant la classification actuelle des Caliciviridae (d'après Green et al., 2001).

Les NoVs possèdent un ARN simple brin positif polyadénylé d'environ 7.6 kb. Le génome est organisé en 3 cadres ouverts de lecture (Open Reading Frame, ORF) (figure 4).



Figure 4 : Organisation génomique des Norovirus (d'après Green et al., 2001)

L'ORF1, à l'extrémité 5', code pour une polyprotéine de 1738 acides aminés (poids moléculaire de 193,5 kDa) contenant des motifs similaires de la 2C hélicase, la 3C cystéine protéase et la 3D RNA dépendante RNA polymérase (protéines non structurales caractérisées également chez les Picornavirus). L'ORF2 code pour une protéine de 530 acides aminés (56,6 kDa) correspondant à la protéine de capside VP1. L'utilisation des VLPs NV a également permis de démontrer le rôle de l'ORF3 en tant que protéine structurale mineure appelée VP2, de 212 acides aminés (22,5 kDa), jouant un rôle sur l'expression et la stabilité de la protéine de capside VP1 (Bertolotti-Ciarlet et al., 2003b ; Glass et al., 2003).

2. Les rotavirus

Le génome viral d'environ 18,5 kb est composé de 11 segments d'ARN double brins numérotés de 1 à 11 par ordre de taille croissante (figure 2). Chaque segment code pour une seule protéine virale à l'exception du gène 11 codant pour les protéines NSP5 et NSP6 (Mattion et al., 1991). Le rôle de ces protéines virales, connu grâce à l'utilisation des VLPs est présenté dans le tableau 1 (Jayaram et al., 2004). On distingue 6 protéines structurales (VP) et 6 non structurales (NSP). L'intervention des protéines VP2, VP6, VP4 et VP7 dans la fusion avec les cellules a été examinée (Gilbert et al., 1997). La partie N-terminale de VP2 a été montrée comme indispensable à l'encapsidation des protéines VP1 et VP3 (Zeng et al., 1998). Le clivage de l'arginine en position 247 de VP4 a été montré comme étant nécessaire pour la fusion des VLPs avec les cellules (Gilbert et al., 1998). Grâce aux GFP-VLPs 2/6/7/4, l'entrée dans la cellule a pu être suivie confirmant que la trypsination est indispensable et que certaines VLPs sont rapidement internalisées alors que d'autres roulent à la surface des cellules dendritiques et MA104 (Charpilienne et al., 2001). Par analyse mutationelle, Charpilienne et al., (2002) ont également démontré que certains déterminants sur VP6 étaient

nécessaires pour un assemblage correct avec VP2 et que la transcription dépendait de changements conformationnels de VP6.

Nom	Segment	Taille (kDA)	Propriétés
VP1	1	125	ARN polymérase virale, complexe avec VP3
VP2	2	102	Fixe les acides nucléiques, interagit avec VP1 et VP3, rôle structural dans la transcription, la réplication et l'assemblage des protéines. Auto-assemblage dans les cellules d'insectes
VP3	3	98	Guanyltransférase, méthyltransférase, complexe avec VP1
VP4	4	86,5	Protéine de spicule dimérisée, oligomérisée avec VP7 et NSP5, liée à la virulence, induit des anticorps neutralisants, clivée en VP5* et VP8* (protéine d'hémagglutination), impliquée dans l'attachement du virus aux cellules, induit la perméabilisation membranaire après trypsination, présente dans la membrane plasmique et associée aux microtubules
VP6	6	44,8	Protéine majoritaire, antigénique, n'induit pas d'anticorps neutralisants, trimérise, interaction absolue avec VP2 pour la transcription, possède les canaux pour sortie des ARNm
VP7	9	37,3	Antigénique, induit des anticorps neutralisants, induit la perméabilisation membranaire après clivage, glycosylée, insérée dans la membrane du réticulum plasmique, intégrité structurale calcium dépendante (\downarrow Ca ²⁺ \rightarrow formation de DLPs)
NSP1	5	58,6	Motif en doigt de zinc N-terminal, fixe le zinc, lie les ARNm viraux
NSP2	8	36,7	Fixe les ARN double brins viraux, multimérise, intervient dans la réplication, impliquée dans la formation des viroplasmes, activité NTPase
NSP3	7	34,6	Fixe les ARNm viraux sur la séquence consensus 3', dimérise, non viroplasmique, interagit avec le facteur de transcription eIFG4 et la protéine RoXaN
NSP4	10	28	Glycoprotéine, ancrée dans la membrane du réticulum endoplasmique, récepteur intracellulaire des particules immatures, tétramérise, déstabilise la membrane plasmique, entérotoxine virale
NSP5	11	21,7	Impliquée dans la formation des viroplasmes, interagit avec NSP2, O-glycosylée, auto-phosphorylée
NSP6	11	12	Viroplasmique, interagit avec NSP5

Tableau 1 : Principales propriétés des protéines du rotavirus (souche SA11)

D'un point de vue classification, les rotavirus sont répertoriés en 7 groupes désignés par les lettres A à G, les rotavirus d'un même génogroupe partageant le même antigène majoritairement porté par la protéine VP6. Les RV des groupes A, B et C infectent habituellement les hommes et les animaux, les autres sérogroupes n'ont été observés que chez les animaux. Les RV du groupe A sont les plus nombreux et les plus étudiés, ils sont divisés en sérotypes identifiés à partir d'antigènes induisant des anticorps neutralisants. La protéine VP7 définit le sérotype G et la protéine VP4, le sérotype P (Anderson et Weber., 2004).

La structure génomique des norovirus, avec un ARN simple brin organisé en 3 ORF, apparaît plus simple que celle des rotavirus.

Question 3 : Les différences observées dans les structures génomiques ont-elles une influence sur la détection des virus ?

V. Diversité génétique

1. Les norovirus

Les séquences obtenues à partir des différentes souches ont rapidement mis en évidence la diversité génétique des NoV. La plupart des comparaisons se sont focalisées sur la région du génome codant pour l'ARN polymérase ARN dépendante ou pour la protéine de capside, base de la classification (Berke et al., 1997 ; Hardy et al., 1999). L'analyse moléculaire a permis d'établir une sous division des Norovirus en 5 génogroupes parmi lesquels les génogroupes (G) I et II représentent les Norovirus humains, le génogroupe III les Norovirus bovins (Smiley et al., 2002), le génogroupe IV les Norovirus porcins (Guo et al., 1999) et le génogroupe V une nouvelle souche de Norovirus murin (Karst et al., 2003). Le pourcentage d'identité en acides aminés entre souches, dans un génogroupe est > 60% dans la région de la capside (VP1) ; les souches du GI partageant moins de 50 % d'identité en acides aminés avec celles du GII (Green et al., 2001).

Parmi les souches de référence humaine, 7 génotypes pour le GI et 12 pour le GII ont été discriminés par analyse des séquences complètes de l'ORF2 (tableau 2) (Vinje at al., 2004).

Génogroupe	Virus référence	Genbank no.	Génotype
GI	Hu/NLV/Norwalk/8FIIa/1968/US	M87661	GI.1
	Hu/NLV/Southampton/1991/UK	L07418	GI.2
	Hu/NLV/Desert Shield 395/1990/SR	U04469	GI.3
	Hu/NLV/Chiba 407/1987/JP	AB022679	GI.4
	Hu/NLV/Musgrove/1989/UK	AJ277614	GI.5
	Hu/NLV/Hesse/1997/DE	AF093797	GI.6
	Hu/NLV/Winchester/1994/UK	AJ277609	GI.7
GII	Hu/NLV/Hawaii/1971/US	U07611	GII.1
	Hu/NLV/Melksham /1984/UK	X81879	GII.2
	Hu/NLV/Toronto 24/1991/CA	U02030	GII.3
	Hu/NLV/Bristol/1993/UK	X76716	GII.4
	Hu/NLV/Hillington/1990/UK	AJ277607	GII.5
	Hu/NLV/Seacroft/1990/UK	AJ277620	GII.6
	Hu/NLV/Leeds/1990/UK	AJ277608	GII.7
	Hu/NLV/Amsterdam/1998/NL	AF195848	GII.8
	Hu/NLV/Idaho Falls/378/1996/US	AY054299	GII.9
	Hu/NLV/Erfurt/546/2000/DE	AF427118	GII.10
	Hu/NLV/Aichi 76-96/Chitta/1996/JP	AB032758	GII.12

 Tableau 2 : Souches de référence des norovirus humains

Récemment, l'étude de la variabilité des souches de NoVs dans le domaine de la jonction ORF1-ORF2 a démontré une division des GI et GII respectivement en 14 et 17 génotypes (Kageyama et al., 2004). Les souches NoVs dans un même génotype possèdent au moins une identité en acides aminés de 80 % avec la souche de référence du génotype (Green et al., 2001). Les structures des génomes complets, des arbres phylogéniques et des recombinaisons génétiques parmi les différents génogroupes, ont été étudiées en détails (Katayama et al., 2002).

L'une des principales causes de la variabilité génétique des virus réside dans le taux d'erreur attribué à leurs enzymes de réplication. Pour les NoV, comme pour la majorité des autres virus à ARN, ce taux d'erreur est très élevé induisant des mutations la plupart du temps muettes.

La recombinaison intramoléculaire, bien que plus rare, peut avoir lieu et a été suggérée très récemment (Katayama et al., 2002 ; Lopman et al., 2004). Un domaine hautement conservé, comprenant une séquence consensus de 18 nucléotides indispensable au devenir du virus, s'étend pour les deux génogroupes des NoVs de la région codant la partie C terminale de la polymérase à la région codant la partie N terminale de la capside. Cette séquence serait un signal d'encapsidation ou un site d'initiation de la transcription et correspondrait à un site potentiel de recombinaison (Katayama et al., 2002).

2. Les rotavirus

L'évolution du génome viral peut se faire par mutations résultant de variations de séquences (Bok et al., 2002), par réarrangements génétiques ou réassortiments (Gault et al., 2001). Ce dernier cas semble contribuer majoritairement à la diversité génétique des RV (Palombo, 2002). Du fait de la segmentation du génome en 11 fragments, des réassortiments par échange de segments peuvent se produire lors d'infections à multiples souches. Ces phénomènes favorisent ainsi des combinaisons P/G inhabituelles et l'apparition de nouvelles souches de rotavirus (Gouvea et Brandtly, 1995 ; Iturriza-Gomara et al., 1999). De plus, comme les RV sont très présents chez les animaux, l'échange de matériel génétique entre souches animales et humaines peut conduire à l'émergence de nouvelles souches de RV de signification épidémiologique (Iturriza-Gomara et al., 2001).

Les deux virus ont en commun une importante variabilité génomique favorisant l'émergence de nouvelles souches.

Question 4 : Quelle est l'influence de cette diversité génomique sur leur détection ? Quel est le rôle de l'environnement dans cette émergence?

VI. Immunité

1. Les norovirus

Les études d'immunité sur ces virus peuvent être divisées en 3 périodes : l'époque ancienne (1972-1978) avec la dominance des études chez le volontaire humain, l'époque intermédiaire (1978-1990) avec le développement des « méthodes immunologiques en phase solide » et l'époque moderne (1990 à nos jours) coïncidant avec la possibilité de produire des VLPs et par conséquent des antisérums hyper immuns (Matsui et al., 2000).

De l'époque ancienne, 3 principaux points ressortent :

- une immunité à court terme semble être conférée dans les 6 à 14 semaines suivant l'exposition initiale au virus de Norwalk
- les relations immunologiques sont complexes entre les différentes souches
- une immunité à long terme ne semble pas être conférée après une seule exposition à la souche prototype, virus de Norwalk.

Durant l'époque intermédaire, le développement de tests plus sensibles a confirmé les résultats de l'époque ancienne. Ces études ont démontré que le taux d'anticorps dans le sérum ne corrélait pas nécessairement avec la résistance aux infections, en particulier chez les enfants (Green et al., 2001).

Les études de l'époque moderne montrent que la résistance aux infections à NoV est multifactorielle impliquant des facteurs génétiques particuliers (Lindesmith et al., 2003). L'attachement des VLPs du virus de Norwalk à la surface des cellules épithéliales de la jonction gastroduodénale et dans la salive se produit uniquement chez les individus sécréteurs (exprimant des antigènes de groupes sanguins dans leur salive et leur épithélium de surface intestinal) (Marionneau et al., 2002). La relation entre le groupe sanguin ABO d'une personne dite sécrétrice et la possibilité de développer une infection à NoV a été démontrée (Lindesmith et al., 2003). Le risque d'être infecté par le virus de Norwalk pour les personnes sécrétrices présentant le phénotype O est largement supérieur à celui des personnes sécrétrices de phénotype B (Hutson et al., 2002). Les antigènes de groupe sanguin ABH de l'intestin constitueraient donc un facteur important dans la pathologie due au virus de Norwalk, les VLPs utilisant les antigènes H type 1 et/ou 3/4 comme ligands sur les cellules épithéliales gastro-intestinales des individus sécréteurs (Marionneau et al., 2002). De plus, les différentes souches de NoV pourraient reconnaître des groupes d'antigènes ABH différents sur les récepteurs épithéliaux de l'intestin (Hutson et al., 2004 ; Lindesmith et al., 2003) Ces

résultats, obtenus avec des VLPs, ont été complétés par une étude récente démontrant les différences de propriétés d'attachement aux antigènes ABH des diverses souches de NoV provenant de selles de malades (Harrington et al., 2004). Cette étude a prouvé pour la première fois qu'un ou plusieurs composants des fèces humains pouvaient promouvoir et augmenter l'attachement des NoV aux antigènes ABH. Des études récentes ont montré qu'une poche de fixation dans le sous-domaine P2 est responsable de l'attachement aux antigènes de groupes sanguins ABH (Tan et al., 2003). Par mutagenèse dirigée, certains acides aminés essentiels dans la reconnaissance de ces antigènes ont été identifiés (Tan et al. 2004).

2. Les rotavirus

Les études d'immunité après infection naturelle chez des malades ont montré une production d'anticorps neutralisants de réactivité croisée dirigés contre de multiples sérotypes, une production d'IgA spécifique du virus à la surface des muqueuses intestinales et une production d'IgA et d'IgG spécifique du virus dans le sérum (Velazquez et al., 2000; Anderson et Weber, 2004). Les études sur volontaires ont confirmé ces observations. Elles ont également démontré la production d'anticorps intestinaux neutralisants et l'augmentation des titres des anticorps spécifiques de VP7 préexistants (Green et al., 1992). Dans le cas d'une infection à RV, il y aurait donc une réponse anticorps initiale avec production d'anticorps sérotype spécifique et une production limitée d'anticorps à réactivité croisée. Lors des infections suivantes, le taux d'anticorps à réactivité multiple augmenterait produisant une immunité à long terme (Jiang et al., 2002). La présence d'anticorps spécifiques des RV dans le sérum constitue une marque de protection contre de futures infections sévères sans induire nécessairement d'immunité à long terme (Jiang et al., 2002).

De nombreuses études sont en cours pour mieux comprendre l'immunité des NoV et les variations de sensibilité aux infections observées dans la population.

Questions 5 : La présence de récepteurs spécifiques pour les norovirus existe-t-elle dans l'environnement ?

VII. Pathologie et épidémiologie des infections

1. Les norovirus

Les infections à NoV sont caractérisées par l'apparition brutale de vomissements souvent associés à des diarrhées. Les symptômes, généralement peu sévères, sont des nausées, des vomissements, des diarrhées, des crampes abdominales, des maux de tête et de la fièvre (Green et al., 2001). L'excrétion virale varie de 2 jours à 3 semaines mais peut persister plusieurs mois chez des patients immunodéprimés (Nilsson et al., 2003). L'infectiosité des NoV apparaît comme très élevée (Lopman et al., 2004 ; Fankhauser et al., 2002) avec une dose infectieuse estimée inférieure à 10 particules virales, mais sans preuve établie (Green et al., 2001 ; Hutson et al., 2004 ; Lindesmith et al., 2003 ; Lopman et al., 2004).

Ces infections à NoV peuvent se produire à tous les âges, avec une forte incidence chez les enfants de moins de 5 ans. Au niveau mondial, les taux de prévalence dans la population générale varient de 11 % (Pays bas) à environ 20 % (France, Finlande, Japon, USA) (Green et al., 2001; Koopmans et al., 2002). Les infections sont marquées par une saisonnalité hivernale mais des pics épidémiques ponctuels sont observés au printemps et en été (Green et al. 2001; Lopman et al., 2004).

Les données d'épidémiologie moléculaire montrent qu'à l'heure actuelle les souches appartenant au génogroupe II prédominent avec alternance de différentes souches selon les pays ou les années (Lopman et al., 2004 ; Vinje et al., 2003 ; Fankhauser et al., 2002).

2. Les rotavirus

Les rotavirus constituent la cause majeure de gastro-entérites aiguë infantile à travers le monde, les infections étant associées à plus de 600 000 morts d'enfant âgés de moins de 5 ans, en particulier dans les pays en voie de développement (Parashar et al., 2003). Cependant il est reconnu que le rôle des RV dans les infections chez les adultes est sous-estimé, la grande majorité des infections étant asymptomatique (Anderson et Weber, 2004).

Le temps d'incubation est de 1 à 4 jours. Les virus infectent principalement les cellules épithéliales de l'intestin grêle. Les signes cliniques habituels sont des diarrhées, des vomissements et une déshydratation pouvant durer de 4 à 7 jours (Kapikian et al., 2001). D'un point de vue saisonnalité, les RV apparaissent toute l'année avec un pic plus marqué en hiver jusqu'à mi-printemps (Marshall et al., 2003). La durée moyenne d'excrétion dans les selles est

de 10 jours, chez les immunodéprimés elle peut durer de 6 semaines à 2 ans associée à un tableau de diarrhée intermittente (Nicand et al., Virologie, 1998). Leur pouvoir infectieux est élevé avec une dose infectieuse probablement proche de 10 à 100 particules (Nicand et al., Virologie, 1998).

Les données d'épidémiologie moléculaire ont permis la détection de nouveaux types de rotavirus non rencontrés auparavant dans les infections humaines (Desselberger et al., 2001 ; Iturriza-Gomara et al., 2004). L'apparition de ces nouvelles souches semble liée à la transmission inter espèces entre humains et animaux (Palombo, 2002 ; Cook et al., 2004).

Les deux virus présentent des signes cliniques relativement similaires, cependant les rotavirus semblent affecter davantage les enfants. La saisonnalité des infections apparaît moins marquée chez les norovirus.

VIII. Potentiel zoonotic

1. Les norovirus

La détection de NoV dans des fèces de veau ou de porc présentant ou non des symptômes de gastro-entérites est fréquente (Wise et al., 2004). L'analyse moléculaire montre une similitude relativement importante avec les souches du génogroupe I. Cette similitude constitue selon certains auteurs un risque potentiel de zoonose, tandis que d'autres excluent cette possibilité, soit par une différence trop importante des génomes, soit par une différence de récepteur qui pourrait constituer un marqueur d'espèce (Oliver et al., 2003 ; Koopmans et al., 2004 ; Harrington et al., 2004 ; Wise et al., 2004).

2. Les rotavirus

Les RV sont généralement spécifiques d'espèces, mais la transmission inter-espèce a été démontrée et certains cas d'infection humaine par des souches animales ont été décrits (Palombo et al., 2002 ; Cook et al., 2004). Des cas de co-infection par des souches humaines et animales ont également été prouvés facilitant ainsi le réassortiment et l'apparition de nouvelles souches (Nakagomi et al., 1994 ; Holmes et al., 1999). Un cas d'infection d'enfant avec une souche de rotavirus lapine a été récemment relaté (De Leener et al., 2004). La

transmission inter-espèce, favorisant l'émergence de nouvelles souches, doit être prise en compte pour le développement de vaccin (Palombo et al., 2002).

Si le potentiel zoonotic semble prouvé pour les rotavirus, des doutes persistent quant aux norovirus avec des données parfois contradictoires.

Questions 6 : *Ces doutes proviennent-ils d'un manque de données des norovirus animaux* ? L'étude des souches circulant dans l'environnement peut-elle apporter des réponses ?

IX. Développement de vaccins

1. Les norovirus

La variabilité de ces virus est telle, que seules actuellement les VLPs peuvent apporter des réponses au développement de vaccins. En effet, les VLPs possèdent toutes les propriétés nécessaires pour constituer un bon candidat vaccinal (Estes et al., 2000). Plus particulièrement ces VLPs NV sont :

- stables après lyophilisation et une exposition à pH 2,5, pH intestinal (Estes et al., 2000)
- fortement immunogéniques après injection par voie parentérale chez les animaux (Estes et al., 2000)
- immunogéniques après administration orale ou intra nasale chez la souris (Ball et al., 1998; Guerrero et al., 2001)
- sans danger et immunogéniques après administration orale chez des volontaires testés positivement pour des anticorps anti-NoVs (Ball et al., 1999).

Ces résultats ont été confirmés avec des VLPs proches de la source de Grimsby (GII), démontrant également la présence de lymphocytes T dans l'intestin après immunisation intranasale chez la souris (Nicollier-Jamot et al., 2004).

Les études préliminaires chez la souris ont montré une réponse immunitaire mucosale et sérique après administration orale de tabac ou de pomme de terre exprimant des VLPs (Mason et al., 1996 ; Tacket et al., 2000). La possibilité d'un vaccin comestible a été confirmée chez des volontaires humains (Tacket et al., 2003). Une protection croisée étendue aux deux génogroupes a été observée (Kitamoto et al., 2002). Tacket et al. (2003) ont observé une réponse immunitaire humorale et mucosale dose indépendante et pour la première fois d'une réponse cellulaire mèdiée incluant une réponse interféron γ et lymphoproliférative de type 2 chez les volontaires humains. Ces résultats sont encourageants pour l'utilisation des VLPs en tant que candidat vaccinal.

2. Les rotavirus

La première stratégie vaccinale pour les RV a été basée sur le développement de vaccins tétravalents ciblant les souches G1 à G4 prédominantes. Par culture *in vitro* de RV de singe rhésus (RRV) non virulent avec la souche humaine virulente (HRV), des réassortants immunogènes et non virulents rhésus portant la spécificité de type G humaine ont pu être obtenus. Ce vaccin Rotashiel^R a été mis au point par le Center of Disease Control (CDC) en collaboration avec une firme pharmaceutique aux USA et commercialisé en août 1998. La campagne de vaccination a été suspendue après observation de l'augmentation de l'incidence des invaginations intestinales chez les enfants vaccinés (Parashar et al., 2003 ; Glass et al., 2004). Basé sur le même principe, un vaccin RotaTeq^R est en cours d'évaluation par le laboratoire pharmaceutique Aventis Pasteur-Merck.

Les VLPs constituent une bonne alternative aux vaccins viraux. L'immunogénicité et l'efficacité protectrice des VLPs 2/6, 2/67 et 2/6/7/4 ont été évaluées chez la souris (Coste et al., 2000), le lapin (Crawford et al., 1999), les bovins (Kim et al., 2002) et les porcs (Iosef et al., 2002). Chez la souris, l'immunogénicité obtenue après administration par voie parentérale de VLPs 2/6/7 s'est révélée comparable à celle obtenue après administration de virus SA11 atténué (Madore et al., 1999). Des VLPs 2/6 hétérologues (VP2 RV RF, VP6 RV SA11) administrées chez la souris adulte par voie intra-nasale avec la toxine du choléra, l'entérotoxine thermolabile d'Escherichia coli LT sauvage ou mutante ont induit une forte protection (91-100 %) chez la souris après exposition au virus murin ECwt (sérotype G3) (Bertolotti-Ciarlet et al., 2003). La présence de lymphocytes T spécifiques dans l'intestin de souris après immunisation intra-nasale avec des VLPs 2/6 plus adjuvant LT a été démontrée (Fromentin et al., 2001). L'administration par voie parentérale, intra-nasale ou orale de VLPs 2/6 homologues ou hétérologues a permis d'amorcer, chez la souris, une réponse anticorps neutralisants hétérotypiques, leur production étant ensuite induite par une exposition au virus (Bertolotti-Ciarlet et al., 2003). Chez le porc gnobiotique, une vaccination orale avec la souche atténuée humaine HRV, accompagnée d'une stimulation intra-nasale avec des VLPs 2/6 et du complexe immunostimulant ISCOM, est apparue comme une bonne alternative aux vaccins oraux-doses multiples utilisés chez l'homme (Azevedo et al., 2004 ; Gonzalez et al., 2004). Le vaccin rotavirus VLP offrirait donc plusieurs avantages : sécurité, haute immunogénicité, possibilité de créer des VLPs avec des sérotypes G et P différents amorçant une production d'anticorps neutralisants contre différents sérotypes et la potentialité de constituer des transporteurs de molécules d'intérêts dans le tractus digestifs (Bertolotti-Ciarlet et al., 2003).

Pour les deux types de virus, les VLPs apparaissent comme une voie de vaccination intéressante.

X. Voies de transmission

1. Les norovirus

La transmission des NoV, pathogènes très infectieux à transmission féco-orale, implique en général plusieurs voies telles que la contamination inter humaine, les aérosols, la nourriture et l'eau (Koopmans et al., 2004). La fréquence des vomissements et de l'aérosolisation des particules favorisent la transmission de personne à personne (Lopman et al., 2003, 2004). Des épidémies sont souvent décrites dans des familles ou pour des personnes dans des restaurants, des bateaux de croisières, des crèches, des institutions, des écoles, des centres de soins, des hôpitaux, des maisons de retraites ou des camps militaires (Koopmans et al., 2004 ; Lopman et al., 2003 ; Hutson et al., 2004). La transmission de NoV par les aliments semble jouer un rôle majeur dans les épidémies (Koopmans et al., 2004). Le rôle de mollusques filtreurs, de l'eau et de l'environnement a une importance secondaire. Ce sujet est abordé dans la partie B au chapitre III et IV.

2. Les rotavirus

La principale voie de transmission des RV se fait par voie féco-orale La transmission peut également se faire par contact avec des sécrétions de voies aériennes, l'eau, les aliments ou les surfaces contaminées (Kapikian et al., 2001). La voie de transmission par l'eau sera détaillée dans la partie B au chapitre III. Des épidémies sont souvent décrites dans des familles ou dans des crèches, des institutions, des écoles, des centres de soins, des hôpitaux ou des camps militaires (Kapikian et al., 2001 ; Anderson et Weber, 2004)

Un mode de transmission similaire apparaît pour les deux virus avec une influence importante de l'environnement.
Question 7 : Comment étudier plus précisément le rôle de l'environnement ? De quels outils dispose-t-on ?

B- Contamination de l'environnement par les norovirus et les rotavirus

Comme nous l'avons vu au chapitre précédent, ces virus sont excrétés dans les selles de malades pendant une durée variant de quelques jours à plusieurs semaines. Après rejet dans le milieu extérieur, ils ne se multiplient pas, mais vont s'agréger entre eux ou sur des particules. Cette adsorption va leur permettre de persister dans les rejets et de résister aux différents traitements d'épuration. Des quantités encore importantes de particules virales peuvent donc être déversées dans l'environnement après rejet des stations d'épuration et transportées à des distances importantes. Les mollusques filtreurs vont alors pouvoir les concentrer. Ces coquillages étant consommés crus ou peu cuits, ils peuvent constituer un risque sanitaire pour l'homme et entraîner un nouveau cycle viral (figure 5).





I. Taux d'excrétion dans les selles

1. Les norovirus

Les premières données obtenues par microscopie électronique donnaient des concentrations variant de 10^5 à 10^6 particules / g de selles (Kapikian et al., 2000). Par RT-PCR, ces valeurs ont été revues à la hausse avec des concentrations de l'ordre de 10^5 à 10^9 particules /g de fèces (Atmar et al. 1995 ; Yuen et al., 2001 ; Koopmans et al., 2003). Les données plus précises obtenues par le développement de la RT-PCR quantitative ont permis de montrer une variabilité d'excrétion selon le génogroupe avec des concentrations variants de 10^4 à 10^{10} particules /g de selles et de 10^7 à 10^{10} particules /g de selles respectivement pour les NoV GI et GII (Kageyama et al., 2003 ; Höhne et Schreier, 2004 ; Richards et al., 2004).

2. Les rotavirus

Concernant les rotavirus, la quantité de virus rejetée dans les selles est estimée de 10^{10} à 10^{12} particules /g de selles (Gerba et al., 2000 ; Nicand et al., 1998). Les quantités excrétées dans les selles d'adultes malades semblent 10 à 100 fois plus faibles (Anderson et Weber, 2004). A noter également que pour les RV animaux, le taux d'excrétion est estimé supérieur à 10^6 particules infectieuses /ml de fèces (Cook et al., 2004)

Les taux d'excrétion dans les selles apparaissent plus importants pour les rotavirus et par conséquent des charges virales supérieures sont rejetées dans l'environnement.

II. Propriétés de persistance

Les RV et les NoV, en dehors de leur hôte, possèdent un degré de robustesse qui leur permet de persister face aux conditions qu'ils rencontrent dans l'environnement (Rzezutka et Cook, 2004). Ces virus, selon leurs propriétés physico-chimiques, peuvent persister pendant des périodes plus ou moins longues. Les tableaux 3 et 4 résument les principales données de résistance des RV et des NoV en milieu aqueux respectivement en fonction de différents paramètres physiques et chimiques. La majorité des expériences sont réalisées à l'échelle du laboratoire.

Paramètres	Virus	Souche	Traitement	Effet	Références
Température	NoV	NV	60°C, 30 min	persistance	Dolin et al., 1972
		FCV	1 h, 60°C 5 min,70°C 1 min, ébullition 60 j, 4°C 21 j, T° ambiante	- 7,5 log - 7,5 log - 7,5 log - 4 log - 9 log 3 log	Doultree et al., 1999 Slomka et al., 1998 Duizer et al., 2004
		GII.4	3 min, 100°C	< 2 log	Duizer et al., 2004
	RV	SA11	50°C +/- MgCl ₂ , 25 ou 1 h / 37°C	persistance	Estes et al., 1979
			20 j, 25°C ou 15 j, 5°C	- 4 log	Chung et sobsey, 1993
			20°C	- 1 log = 2,7 j - 2 log = 4,3 j - 3 log= 5,8 j	Girones et al., 1989
		Wa	10 j, 20°C- 32 j, 4°C- 64 j sans bactérie ni microorganisme	- 2 log	Rzezutka et al., 2004
		Ito ^r P13	1 mois, 20 °C	- 2 log	Caballero et al., 2004
UV	NoV	FCV	47,85 mWs/cm ² 34 mJ/ cm ² , 0°C	- 1 log - 3 log	Nuanalsuwan et al., 2002 Duizer et al., 2004
		GII.4	206 mJ/cm ² , 0°C	< 1 log	Duizer et al., 2004
	RV	SA11	94 mWs/cm ² , 5 min ou 46,5 mWs/cm ² , 15 min	- 2 log	BoheretSchwartzbrod,1993
		Wa	16 000 μmWs/cm ² , 5°C	- 2 log	Gerba et al., 1996
		Ito ^r P13	15 W, 20 s 200 mJ / cm ²	- 3 log - 4 log	Caballero et al., 2004
Ozone	NoV	NV	0,37 ml/l, pH 7,5°C	- 4 log	Shin et Sobsey, 2003
	RV	SA11, Wa	≥ 0,25 mg/l, 4°C, pH 6, 7 et 8	$\geq 10^5 \text{ PFU}$ persistance Wa > SA11	Vaughn et al., 1987
		Wa	0,1 à 0,2 mg/l, pH 6, 5°C	- 2 log	Gerba et al., 1996

Tableau 3 : Résistance des NoVs et RV aux traitements physiques (FCV : Calicivirus Félin)

Paramètres	Virus	Souche	Traitement	Effet	Références	
Composés chlorés	NoV	NoV NV		chlore 3,75 mg/l, 30 min, volontaires humains 10 mg/l	Résistant, 5/8 malades 1 malade	Keswick et al., 1985
			monochloramine 2 mg/l, pH 8, 5°C, 3 h 775 mg-min/l	- 1 log - 2 log	Shin et Sobsey, 1993	
		GII.4	6 000 ppm, 10 min, 20°C	> 2 log	Duizer et al., 2004	
		FCV	Eau de javel, 1 000 ppm ou 5 000 ppm	- 5 log	Doultree et al., 1999	
			Chlore 1 mg/l, 60 à 237 min	- 2 log	Thurston- Enriquez et al., 2003	
	RV	SA11/ Wa	Chlore 3,75 mg/l, 30 min	- 2 log	Keswick et al., 1985	
		Wa	Chlore 0,01 à 0,5 mg/l, pH 6, 5°C	- 2 log	Gerba et al., 1996	
		Ito ^r P13	Chlore 1 mg/l, 20 min 0,2 mg/l, 120 min 4,5 mg/l-min	- 4 log - 1,5 log - 4 log	Caballero et al., 2004	
			Chlore 0,2 à 4,5 mg/l + ions Cu/Ag	- 2log	Bosch et al., 1993 ; Abad et al., 1994	
рН	NoV	NV	pH 3, 3 h	persistance	Dolin et al. 1972	
		FCV	pH <2 ou > 10	- 5 log	Duizer et	
		GII.4	pH 12, 30 min, 37°C	< 2 log	al., 2004	
	RV	SA11	pH > 10	- 2 log	Estes et al., 1979	
Ether	NoV	NV	éther 20 %, 18 h, 4°C	persistance	Dolin et al., 1972	
	RV	SA11	traitement éther	persistance	Estes et al., 1979	

Tableau 4 : Résistance des RV et NoV aux paramètres chimiques

Très peu de données sont disponibles concernant les NoV. Le Calicivirus félin (FCV), multipliable en culture cellulaire, a été utilisé comme substitut (Doultree et al., 1999; Thurston-Enriquez et al., 2003). Même si le FCV partage des propriétés biochimiques, des séquences et une organisation génomique similaires avec les NoV, il entraîne cependant des symptômes (respiratoires) différents des NoV. Le FCV semble également plus sensible aux variations de pH que les NoV (Hewitt et Greening, 2004). Une étude récente a démontré que le FCV constitue un meilleur indicateur des NoV que le calicivirus canin, car sa multiplication en culture de cellule est plus aisée, et sa résistance au pH acide importante (Duizer et al., 2004). La présence d'ARN suite à un traitement ne corrèle pas nécessairement (sur ou sous estimation) avec la présence de virus infectieux soulignant le besoin d'un système de culture pour les NoV (Duizer et al., 2004).

De nombreuses données sont disponibles pour différentes souches de RV multipliables en culture cellulaire. De manière générale, les souches humaines semblent plus résistantes aux traitements que les souches animales.

La survie des RV et des NoV dans l'environnement marin est fonction de la température. Leur transport dans les zones côtières dépend des pluies, du type de station d'épuration, des marées et des courants (Griffin et al., 2003). D'après Rzezutka et Cook (2004), plus un virus pourra persister dans l'environnement plus la transmission indirecte, contrairement à la voie de personne à personne, prendra de l'importance.

La persistance des norovirus à la température et aux UV semble plus élevée que celle des rotavirus. Il semble également exister une variabilité de résistance d'une souche à l'autre. Les effets de l'ozone, des composés chlorés, du pH et de l'éther apparaissent comme identiques pour les deux virus.

Questions 8 : Comment étudier dans le milieu marin, les propriétés de résistance des norovirus sans introduire de virus infectieux? A-t-on des substituts de virus, non infectieux, permettant de faire des études de persistance à l'échelle autre que celle du laboratoire ?

III- Contamination et transmission par le milieu hydrique

1. Les norovirus

Grâce au développement de la RT-PCR quantitative, une étude récente (Laverick et al., 2004) a permis de quantifier les NoVs dans les eaux brutes et épurées de station d'épuration. Ainsi, des valeurs moyennes de 1,8 10^7 copies/l d'eau brute et de 1,7 10^5 copies/l d'eau épurée ont été trouvées, soit un abattement de la charge virale d'environ 2 log par les traitements des stations d'épuration.

L'eau a été prouvée à l'origine de nombreuses épidémies (Schaub et al., 2000 ; Hoebe et al., 2004). Des NoV ont été retrouvés dans l'eau de boisson (Beuret et al., 2000 ; Lamothe et al.,

2003 ; Haramoto et al., 2004), les eaux usées (Brugha et al., 1999 ; Lodder et al., 1999 ; Loisy et al., 2000 ; Nygard, 2003), les eaux de surface (Borchardt et al., 2003 ; Fout et al., 2003) et les eaux de loisirs (Schvoerer et al 2000 ; Hoebe, 2004). De manière intéressante, les souches détectées dans ces études appartenaient le plus souvent au GII reflétant les données cliniques. En France, lors d'une enquête sur une épidémie survenue dans un hôpital, une séquence identique a été détectée dans l'eau du robinet et les selles de malades (Schvoerer et al., 1999). Les eaux contaminées peuvent être responsables d'épidémies observées après consommation de légumes, de fruits, de salades préparées, de sandwichs, de glace (Hardy et al., 1999 ; Hedlund et al., 2000 ; Schwab et al., 2000).

2. Les rotavirus

Malgré les abattements obtenus par les traitements des stations d'épuration, les eaux épurées peuvent contenir des concentrations en RV de l'ordre de 10^2 à 10^4 particules/litre (Gerba et al., 1996 ; Lodder et al., 1999). Baggi et al., (2001) ont montré par RT-PCR un pourcentage de positivité en RV de 41 à 44 % pour les eaux brutes et de 37 à 56 % pour les eaux épurées avec un abattement maximum de 22 % obtenu pour les stations utilisant 4 traitements (mécanique, biologique, chimique puis une filtration sur sable). Dans cette même étude, la présence de RV dans les rivières sous influence d'une station d'épuration pouvait varier de 0 à 25 %. D'après Gerba et al. (1996), un abattement de 5 à 6 log serait nécessaire pour atteindre une qualité d'eau acceptable par rapport au risque que constituent les RV (risque annuel d'infection de 10^{-4}) soit des concentrations, en culture cellulaire, inférieures à 0,02 RV/litre d'eau de surface et 2,2 10^{-7} RV/litre d'eau potable.

Les RV ont été détectés dans les eaux de rivière (Hot et al., 2003), les eaux usées (Dubois et al., 1997 ; Lodder et al., 1999 ; Villena et al., 2003), les fosses de rejets individuels (Borchard et al., 2003) et lors d'épidémies de gastro-entérites causées par l'eau de distribution (Villena et al., 2003) et l'eau de boisson (Kukkula et al., 1999). L'implication des RV via la transmission par les aliments, n'a été décrite, à notre connaissance, que dans deux études impliquant la consommation de sandwichs et de salade (Fletcher et al., 2001 ; Hernandez et al., 1997). Une étude menée dans l'Isère en France a démontré la présence de souches animales (porcines et bovines) et humaines dans les eaux de boissons, la présence des souches animales étant probablement due à l'épandage sur les terres agricoles (Gratacap-Cavallier et al., 2000). Cette contamination multiple pourrait ainsi favoriser l'apparition de réassortants.

La contamination et la transmission par le milieu hydrique semble plus importante pour les norovirus.

Question 9 : Cette différence est-elle due à un biais méthodologique (signification d'un résultat de RT-PCR) ou à une résistance plus marquée de la population aux rotavirus ?

IV- Contamination et transmission par les coquillages

L'accumulation des virus dans les mollusques filtreurs dépend des caractéristiques hydrauliques du système d'exposition, du type de virus et de sa concentration dans l'eau, de la température, du pH, de la salinité et de la présence de particules en suspension dans l'eau (Sobsey et Jaykus, 1991). Les coquillages ne constituent pas un hôte de réplication pour les virus entériques humains, mais un simple transporteur passif permettant de les concentrer. Un modèle mathématique permettant de simuler la contamination en NoV des huîtres sous influence de 3 stations d'épurations pendant une épidémie dans la population a été récemment décrit (Pommepuy et al., 2004).

Si les rotavirus ont été détectés dans les coquillages (Hafliger et al., 1997 ; Le Guyader et al., 2000 ; Lees et al., 2000), leur implication dans des TIAC n'a jamais été démontrée. Cette observation peut être due au fait que les adultes sont moins sensibles aux RV et que la consommation de fruits de mer est plus rare chez les enfants (Lees et al., 2000). Metcalf et al., (1995) ont également émis l'hypothèse que les RV accumulés dans les coquillages pouvaient avoir perdu leurs spicules et ainsi ne plus être infectieux.

De nombreuses épidémies et TIAC de gastro-entérites liées aux NoV ont été répertoriées. Les premiers soupçons de leur présence dans les coquillages sont rapportés en Grande-Bretagne dans les années 1976-77 (800 personnes atteintes dans 33 foyers épidémiques). Le virus de Norwalk a ensuite été mis en évidence dans les broyats d'huîtres impliquées dans deux épidémies en Australie (Murphy et al., 1979 ; Grohman et al., 1980). La consommation d'une seule huître contaminée a suffi à déclencher la maladie chez certains consommateurs (Gill et al., 1993). Dans cette TIAC, les huîtres consommées avaient été purifiées pendant 72 h en bassin de purification. Lors d'une importante épidémie en Louisiane, certains patients ont rapporté n'avoir mangé qu'une seule huître ou des huîtres frites, soulignant l'importante résistance des NoV à ce mode de cuisson (Dowell et al., 1995). L'analyse des séquences virales amplifiées dans les selles de malades et les huîtres incriminées a montré une différence de 7 bases par mutations silencieuses (Le Guyader et al., 1996). La première démonstration précise d'épidémiologie moléculaire a été faite par Shieh et al. (2000).

Comme les coquillages sont généralement contaminés par des eaux usées (Miossec et al., 2000), ils peuvent contenir des mélanges de souches GI et GII (Sugieda et al., 1996) et ainsi refléter les souches circulant dans la communauté (Lees, 2000). La présence simultanée de plusieurs souches peut favoriser les recombinaisons génétiques (Vinje et al., 2000 ; Lopman et al., 2002). Une étude récente a démontré une contamination multiple GI et GII presque systématique des selles de malades impliqués dans des TIAC liées à la consommation de coquillages (Kageyama et al., 2004). Une diversité a été observée entre les souches détectées chez les malades et celles trouvées dans les coquillages incriminés (Sugieda et al., 1996 ; Miossec et al., 1998 ; Le Guyader et al., 2003). Dans une épidémie, une semi-quantification par la technique MPN (Most Probable Number) a permis d'évaluer la concentration des NoV dans les huîtres incriminées variant de 85 à 237 unités RT-PCR par huître, soit environ plus de 1000 virions par coquillage (Le Guyader et al., 2003). Par RT-PCR en temps réel, Nishida et al. (2003) ont détecté des concentrations en NoVs dans les huîtres variant de 1,4 10^2 à 7,5 10^3 copies de génome/huître.

Les rotavirus, bien que présents dans les coquillages, ne sont pas à l'origine de gastroentérites contrairement aux norovirus. Ceci est également observé pour les autres aliments. Question 10 : Cette différence est-elle due à un biais méthodologique, à une résistance plus marquée de la population aux rotavirus, à une diminution de la capacité d'infection des rotavirus ou à une persistance et une infectiosité plus importante des norovirus dans les coquillages ?

V- Etudes en milieu naturel

A l'heure actuelle, peu d'études s'intéressent à la détection des virus dans les coquillages contaminés naturellement. Les norovirus, bien que responsables de la majorité des épidémies, ont rarement été recherchés dans les coquillages. En Angleterre, 21 % des échantillons prélevés en zones insalubres, 8 % des coquillages prélevés sur les étals et 56 % des coquillages prélevés chez un producteur étaient contaminés en NoV (Lees et al., 1995; Henshilwood et al., 1998). Le séquençage de ces virus a montré une grande diversité de souches avec parfois des contaminations multiples (Henshilwood et al., 1998). En France, une étude réalisée sur 3 ans a également mis en évidence la présence de NoV dans 35 % d'échantillons de moules et 23 % d'échantillons d'huîtres prélevées en zones insalubres essentiellement pendant les mois d'hiver (Le Guyader et al., 2000). Le séquençage

a également démontré une grande diversité de souches et la présence de 2 souches simultanément dans certains échantillons. L'analyse d'huîtres importées en Suisse a montré la présence de différentes souches de NoV avec une prédominance des souches GII (Beuret et al., 2003). Des études réalisées dans des zones présentant de faibles contaminations en *E. coli* ont montré une très faible contamination en NoV (Pommepuy et al., 2002). Au Japon, 9 % des huîtres prélevées en Janvier et Février 2002 et destinées à la consommation ont été trouvés contaminées en NoV, les GI et GII étant détectés respectivement dans 17 et 83 % avec une importante diversité génétique (Nishida et al., 2003). Dans cette étude, 65 % des huîtres contaminées contenaient plus de 10^2 copies d'ARN/huître, soit une quantité suffisante pour provoquer une gastro-entérite, si les particules détectées étaient infectieuses. Une prédominance de souches NoV GII a été décrite par Myrmel et al. (2004) en Norvège où 6,8 % des moules collectées chez des producteurs ont été trouvés contaminées.

Concernant les rotavirus, 27 % des huîtres et 52 % des moules prélevées en France en zones insalubres ont été trouvés contaminées pendant toute l'année. Cette détection tout au long de l'année a également été démontrée en Nouvelle-Zélande (Green et al., 1999). Ces résultats ne sont pas tout à fait en accord avec les données épidémiologiques. L'excrétion régulière de rotavirus par la population à des doses suffisantes pour contaminer les coquillages étant peu probable, ces résultats suggèrent une amplification de souches animales (Le Guyader et al., 2000). Cette possibilité a été confirmée par la détection de RV bovin dans des huîtres importées de Bretagne en Suisse (Hafliger et al., 1997). Compte tenu des possibilités de réassortiments des RV, l'éventuelle contamination des coquillages par des souches animales soulève la question de leur prise en considération.

Ces différentes données démontrent la fréquence de la contamination naturelle et la possibilité d'appliquer les méthodes de détection développées à des études autres qu'épidémiologiques.

Question 11 : Quelle est la signification de cette contamination naturelle ? Les virus détectés sont-ils toujours infectieux ?

VI- Purification des coquillages

Les norovirus peuvent persister dans les coquillages pendant plusieurs semaines, il apparaît donc nécessaire de les purifier avant leur commercialisation (Le Guyader et al., 2003). Ces traitements impliquent généralement une purification en bassins contenant de l'eau

de mer propre (< 15 *E. coli*/100 ml et 0 salmonelle/5 l) ou plus rarement une purification par immersion directe en eau de mer propre pendant de longues périodes (Richards et al., 1988). La purification est un processus biologique complexe et individuellement chaque espèce répond différemment en fonction d'une combinaison de critères variés incluant la turbidité de l'eau, la salinité, la température, la profondeur d'immersion des coquillages et l'oxygénation (Roderick et Schneider, 1994). En plus de ces facteurs, le stress de l'animal peut influencer la purification en modifiant les taux de filtration (Richards et al., 1988). Dans la majorité des établissements ostréicoles, la purification se fait par immersion des huîtres pendant 48 heures dans des bassins contenant de l'eau de mer aérée et éventuellement traitée par les UV, par ozone ou chloration. L'efficacité est basée sur le fait que l'eau ne contenant pas ou peu de nourriture, après 2 jours, les huîtres se sont purgées de leur contenu intestinal rejetant ainsi les pathogènes (Sobsey et Jaykus, 1993).

Très peu d'études concernent la purification virale des coquillages et la plupart sont réalisées à l'échelle du laboratoire ou du moins dans des bassins de taille inférieure à ceux utilisés par les professionnels. L'inefficacité de la purification a été démontrée pour les norovirus, les rotavirus, mais plus fréquemment pour l'hépatite A (Boher et Schwartzbrod, 1993 ; Abad et al., 1997; Schwab et al., 1998; Muniain-Mujika et al., 2002; Kingsley et Richards, 2003; Lees et al., 2004). Il a été mis en évidence que la température était le facteur plus important dans la purification (Sobsey et Jaykus, 1991 ; Lees et al., 2000 ; Doré et al., 2000). Une étude récente de purification à échelle semi-professionnelle utilisant le bactériophage F-ARN comme indicateur de contamination virale a également démontré l'intérêt de la nourriture en plus de la température (Pommepuy et al., 2003b). Schwab et al. (1998) ont montré qu'après 48 h de purification, seulement 7 % des NV avaient été éliminés contre 95 % des bactéries, résultats en accord avec Lees et al., (2004). Après 96 h de purification dans des conditions commerciales sous un flux continu d'eau de mer traitée à l'ozone, une élimination de $1,5 \log_{10}$ du nombre de particules de rotavirus humains a été observée dans les moules (Abad et al., 1997). Une hypothèse avancée pour expliquer l'inefficacité des procédés serait la fixation des particules virales par liaison ionique sur les polysaccharides du mucus des coquillages (Di Girolamo et al., 1977; Burkhardt et al., 2000; Lees et al., 2000; Muniain-Mujika et al., 2002).

Compte tenu du caractère pathogène des rotavirus et des norovirus, les études de purification ne sont pas sans risque. Néanmoins, les quelques données démontrent une difficulté de purification pour ces deux virus. Question 12 : Comment expliquer une telle persistance dans les coquillages ? Existe-t-il un substitut viral non pathogène permettant d'étudier le comportement de ces virus ? Existe-t- il un biais à travailler dans des modèles in vitro plutôt que in situ ?

VII- Difficulté de détection des virus dans les coquillages : exemple des Norovirus

Les données précédentes (adsorption des virus sur des particules ou en agrégats, faible charge virale des coquillages, contamination par de multiples souches...) soulignent la complexité de la détection des NoVs dans les coquillages. A l'heure actuelle, et malgré les nombreuses recherches entreprises, aucun système cellulaire n'a encore permis de multiplier les NoVs *in vitro* (Duizer et al., 2004). Les VLPs NV ont été utilisées pour rechercher des lignées permettant la culture cellulaire ; les cellules Caco-2 sont ainsi apparues intéressantes mais elles n'ont permis l'internalisation que d'une très faible quantité de VLPs (White et al., 1996 ; Duizer et al ; 2004). Le domaine de liaison des capsides aux cellules a été localisé dans la région C-terminale avec une fixation des VLPs NV médiée par une protéine de 105 kDA nommée NORVA, ubiquitaire dans toutes les cellules (Tamura et al., 2000). Tamura et al., (2003, 2004) ont émis l'hypothèse que les protéoglycanes héparan sulfate sont nécessaires à la fixation des VLPs GI et GII sur différents types de cellules mammifères, cette fixation étant inhibée par l'histone H1.

Les techniques d'amplification génomique constituent le seul outil d'analyse possédant une sensibilité suffisante pour détecter les faibles niveaux de contamination en NoV dans les coquillages (Metcalf et al., 1995). Se pose alors le problème de l'interprétation des résultats : la présence d'ARN par RT-PCR n'indique pas nécessairement la présence de virus infectieux. La fragilité de l'ARN en milieu extérieur suggère que celui-ci est toujours encapsidé (Tsai et al., 1995) D'après les études réalisées avec des entérovirus ou du VHA (virus multipliables en culture cellulaire), la perte de pouvoir infectieux n'est pas toujours accompagnée de la perte du signal de RT-PCR mais la perte du signal d'amplification correspond à une perte d'infectiosité (Metcalf et al., 1995; Kingsley et Richards, 2003). Une étude récente a démontré que le signal généré par RT-PCR pour le HAV était bien corrélé à la présence de virus infectieux (Bhattacharya et al., 2004).

L'efficacité de l'amplification par RT-PCR dépend de deux facteurs : l'efficacité de l'extraction des acides nucléiques et de la pureté de ces derniers.

1. Extraction

L'extraction doit comporter les étapes suivantes : élution, concentration virale, extraction des ARN puis purification. L'étape de purification des ARN est nécessaire pour éliminer les inhibiteurs des enzymes de RT-PCR présents dans les coquillages (acide humique, polysaccharide, glycogène). Les principales méthodes utilisées sont décrites dans le tableau 5.

Tableau 5: Principales méthodes de concentration et d'extraction des ARNs à partird'échantillons de coquillages

Coquillage	Elution	Concentration	Extraction ARN	Références
Huîtres	Tp glycine pH 9,	Ultracentrifugation	TRIzol	Myrmel et al., 2004
digestifs	chloroforme/butanol, cat-floc	Ultracentrifugation, sucrose 30 %	QIAamp viral RNA mini kit (Qiagen)	Nishida et al., 2003
	Tp glycine pH 10	Ultracentrifugation	GITC et silice	Formiga-Cruz et al., 2002
	Tp Glycine pH 7,5	Double PEG 6 000, 12 %	QIAamp viral RNA mini kit	Beuret et al., 2003
	Tp Glycine pH 9, cat- floc	PEG 6 000, 8 %	Prot. K, CTAB et precipit. éthanol	Le Guyader et al., 2000
	PBS, cat-floc	PEG 6 000, 8 %	Prot. K, CTAB et precipit. éthanol	Atmar et al. 1995
coquillage entier	Adsorption acide, élution Tp glycine pH 7,6	Double PEG 8 000, 8 %	QIAamp RNeasy kit	Shieh et al., 2003
	Tp glycine pH 9,5	PEG 8 000, 16 %	Tri-Reagent (Sigma), + oligo dT15	Kingsley et al., 2002
	Adsorption acide, élution Tp Glycine	Double PEG 8 000, 8 %	GITC+ RNEasy mini kit	Mullendore et al., 2001
Moules	Tp glycine pH 9	PEG 16 %	Fast-Track kit (Invitrogen)	Di Pinto et al., 2003
	Extrait de Bœuf pH 5,5 sonication	PEG 6 000	GITC	Casas et al., 2001
	Tp glycine, pH 9,.5	Double PEG 8 000	Ultracentrifugation chlorure Césium	Croci et al., 2000
	Tp glycine pH 10	Ultracentrifugation	GITC	Munian-Mujika et al., 2003
Coques	Adsorption acide, Tp glycine pH 9	Double PEG 8 000	Nucleospin RNA kit	Sunen et al., 2004

Tp: tampon

Ces données font apparaître un consensus quant à l'efficacité de l'élution par le tampon glycine et de la concentration des virus par le PEG. Concernant l'extraction des acides nucléiques, l'utilisation de kits commerciaux semble de plus en plus fréquente.

Question 13 : Existe-t-il une méthode d'extraction efficace et standardisable pour les échantillons de coquillages ?

2. RT-PCR

La diversité génétique des NoV rend difficile la sélection d'amorces consensus permettant de détecter l'ensemble de ces virus. La première région cible sélectionnée a été le gène codant pour la 3D RNA polymérase. Ainsi entre 1994 et 2003, environ 60 couples d'amorces ont été publiés dans cette région, essentiellement entre les nucléotides 4850 et 4500 (Atmar et Estes, 2001, données personnelles). Ces différentes amorces présentent des efficacités diverses pour l'amplification des différentes souches circulantes.

De nouvelles amorces ciblant des régions de l'ORF2 ont été publiées (Green et al., 1995 ; Hafliger et al., 1997 ; Vinje et al., 2000 ; Kojima et al., 2002). Ces amorces définies dans le gène de la capside sont également d'un grand intérêt pour les études de diversité génétique (Green et al., 2000 ; Vinje et al., 2004 ; Wise et al., 2004).

Une comparaison de 5 couples d'amorces les plus couramment utilisés en diagnostic clinique a montré qu'aucun couple ne permettait de détecter tous les variants (Vinje et al., 2003). Compte de tenu de la forte probabilité de contamination multiple dans les coquillages (Sugieda et al., 1996 ; Le Guyader et al., 2003), les critères de spécificité et de sensibilité sont indispensables. L'utilisation de plusieurs couples d'amorces définies dans la région de la polymérase et de la capside est alors nécessaire (Atmar et al., 2001 ; Le Guyader et al., 2003). Le séquençage de génomes complets augmentant, de nouvelles données sont disponibles (Katayama et al., 2002). Ainsi une région hautement conservée dans la région 3' de l'ORF1 a

permis de désigner 2 couples d'amorces a priori consensus pour la RT-PCR en temps réel (Kageyama et al., 2003).

Des techniques de RT-PCR en temps réel ont été développées (Nishida, 2003 ; Loisy et al., 2004). Cependant afin de préciser le typage des souches de NoV, une amplification par RT-PCR « classique» est nécessaire pour identifier le pathogène, surtout dans le cas d'échantillons impliqués dans des épidémies.

Une région du génome, la jonction ORF1-ORF2, apparaît comme très conservée, permettant le développement d'outils tel que la RT-PCR en temps réel.

Questions 14 : L'amplification des norovirus dans cette région du génome permet-elle d'obtenir les mêmes informations que l'amplification de la polymérase et de la capside ? La sensibilité de la RT-PCR en temps réel est-elle comparable à celle des techniques classiques de détection par RT-PCR et hybridation ?

A-Détection des norovirus et des rotavirus

I. Echantillons de coquillages

1. Comparaison de méthode d'extraction

Cinquante lots d'huîtres ou de moules ont été prélevés en mars 2001 par les différents laboratoires côtiers Ifremer dans des zones classées B et C (classification sur la base d'*Escherichia coli*, norme CEE 91/492) réparties le long du littoral français. Les prélèvements ont été transmis au laboratoire puis conservés à 4°C.

2. Etude de la contamination au FAHRP

Des échantillons d'huîtres commercialisées ont été prélevés le long des côtes atlantiques et pacifiques des Etats Unis ainsi que dans le golfe du Mexique. Les points de prélèvement ont été choisis de manière aléatoire. Deux campagnes de prélèvement ont été réalisées : entre juin et septembre 2002 puis entre novembre 2002 et janvier 2003. Les huîtres ont été envoyées en express à l'université d'Arizona, puis expédiées congelées en express au laboratoire Food Animal Health Research Program (FAHRP) de Wooster (annexe 1).

3. ARN de coquillages naturellement contaminés

Les extraits d'ARN de 150 coquillages collectés le long des côtes françaises de janvier 1995 à octobre 2003 et conservés à -80°C ont été utilisés (Le Guyader et al., 2000, 2003 et données personnelles) pour la validation de la RT-PCR en temps réel.

4. Huîtres achetées

Des huîtres ont été achetées sur le marché en gros (Ets Madec) pour les expériences de purification ou au détail (Marché de Talensac) pour les études de fixation.

II. Selles

Différents échantillons de selles collectées lors d'épidémies de gastro-entérites et conservées à -20°C ont été utilisés. Ces échantillons sont :

- pour le GI : la souche de référence du virus de Norwalk NV, virus purifié titré à 10⁶ unités RT-PCR/ml (aimablement fournie par M.K. Estes, Baylor College of Medicine, Houston)
- pour le GII, les selles : S35, titrée à 10⁵ unités RT-PCR/ml
 SJV, titrée à 10³ unités RT-PCR/ml
 SG2US, (utilisée au FAHRP), titrée à 10⁵ unités RT-PCR/ml

III. Dissection

A leur arrivée au laboratoire, les coquillages sont lavés à l'eau stérile, comptés puis ouverts. Les glandes digestives sont ensuite prélevées par dissection puis aliquotées (1.5 g). Les aliquots sont conservés à –20°C jusqu'à leur analyse. Un aliquot représente en moyenne 4 huîtres et 8 moules.

IV. Contamination artificielle

Des glandes digestives disséquées (1,5 g), préalablement testées négatives pour les NoVs GI et GII, sont utilisées pour être contaminées artificiellement avec 200 µl de suspension de selle NV ou S35 ou SJV ou SG2US. Le mélange est vortexé pendant une minute, puis incubé 10 min sur glace avant extraction.

V. Concentration des virus

- 1- Dans les tissus d'huîtres
 - a- Technique Baylor

Un aliquot de 1,5 g est broyé au poter dans 2 ml de tampon glycine 0,05 M pH 9,5 pendant 1 min. Le broyat est versé dans un tube à usage unique de 50 ml. Le poter est rincé par 3 ml de tampon glycine pH 9,5 puis 3 ml de chloroforme-butanol (50 % volume à volume). A ce mélange, 0,5 ml de Cat-Floc (chlorure de polydiallyléthylammonium) sont ajoutés, vortexés, puis agités à température ambiante pendant 5 min. Après 15 min de décantation sur la paillasse, le mélange est centrifugé 15 min à 13 500 g à 4°C. Le surnageant

est versé dans un tube contenant 3 ml de polyéthylène glycol PEG/NaCl. Après 1 heure d'agitation à 4°C suivie d'une centrifugation à 11 000 g pendant 20 min, le surnageant est éliminé.

b- Technique FAHRP

Le matériel de laboratoire (centrifugeuses, tubes...) étant différent, la méthode d'extraction utilisée au laboratoire de Microbiologie de l'Ifremer a dû être adaptée, avec notamment des modifications des temps et des vitesses de centrifugation.

Basée sur la technique Baylor, les modifications suivantes ont été apportées :

Etape de centrifugation	Méthode « Baylor »	Méthode « USA »
Cat-floc	15 min / 13 500 g	30 min / 6 000 g
PEG	20 min / 11 000 g	30 min / 6 000 g

2- Dans les eaux de station d'épuration

Des eaux brutes (100 ml) ont été prélevées à la station d'épuration de Nantes d'avril 2002 à avril 2003. Pour concentrer les virus, 5 ml d'échantillon ont été ultracentrifugés à 160 000 g pendant 1 h à 4°C (Beckman TL 100). Après élimination des surnageants, le culot a été repris dans 200 µl d'eau stérile.

VI. Extraction des acides nucléiques

1- Selles

Les échantillons de selles sont extraits en utilisant le kit QIAamp Viral RNA de Qiagen selon le protocole adapté par le CHU de Dijon (Bon et al., 2004) [annexe 2].

2- Huîtres

a- Technique Baylor

Le culot obtenu par concentration virale est dissout dans 3 ml d'eau stérile. La lyse des virus est réalisée par ajout de 40 µl de protéinase K, 1 ml de tampon protéinase K (0,04 M Tris-HCl pH 7,5 ; 0,02 M Na₂-EDTA 2 % SDS) puis incubation 30 min à 56°C. Après ajout de 4 ml de phénol-chloroforme-alcool isoamylique, le mélange est vortexé 1 min, puis centrifugé 5 min à 10 000 g à 4°C. Un volume de 4 ml de chloroforme-alcool isoamylique est ajouté à la phase aqueuse, vortexé 1 min, puis centrifugé pendant 5 min à 10 000 g à 4°C. La phase supérieure est ensuite décantée dans 400 µl d'acétate de sodium 3 M et 8 ml d'éthanol absolu froid. Après 30 min de précipitation à -80°C, le mélange est centrifugé pendant 30 min à 13 000 g à 4°C. Le culot est dissout dans 4,5 ml d'eau stérile et 1,8 ml de cétyltriméthylammonium bromide CTAB/NaCl (5 % CTAB/ 0,4 M NaCl). Après 15 min d'incubation à température ambiante, le mélange est centrifugé pendant 30 min à 15 000 g à 4°C. Le culot est repris dans 150 µl, puis transvasé dans un mélange constitué de NaCl 1 M, 30 µl d'acétate de sodium 3 M, 900 µl d'éthanol absolu froid et 150 µl d'eau stérile. Après 30 min de précipitation à -80°C le mélange est centrifugé pendant 30 min à 13 000 g à 4°C. Le culot est alors rincé par 500 µl d'éthanol à 70°C, puis centrifugé pendant 10 min à 13 000 g à 4°C. Le culot est ensuite séché 5 min par centrifugation sous vide à 45°C et repris dans 100 µl d'eau stérile contenant 400 U de RNAse OUT (Ribonuclease Inhibitor, Invitrogen) [annexe 3].

b- Kit Qiagen RNEasy plant

Le culot obtenu par concentration virale est dissout dans 450 μ l de tampon RLT puis incubé pendant 3 min à 56°C. Après transfert sur colonne Qiashredder Homogenizer, le mélange est centrifugé 2 min à 10 000 g à 4°C. Le filtrat est mélangé avec 225 μ l d'éthanol absolu puis transféré sur une colonne rose. Après 15 sec de centrifugation à 10 000 g, le tube collecteur est vidé et la colonne rincée avec 700 μ l de tampon RW1 puis centrifugée 15 sec 10 000 g. La colonne est ensuite rincée avec 500 μ l de tampon RPE, centrifugée 15 sec à 10 000 g, puis rincée une seconde fois par 500 μ l de tampon RPE suivie d'une centrifugation de 2 min à 10 000 g. La colonne est alors placée sur un tube de 1,5 ml, puis éluée avec 50 μ l d'eau stérile contenant 200 U de RNAse OUT (Ribonuclease Inhibitor, Invitrogen), suivie d'une centrifugation à 10 000 g pendant 1 min. L'étape d'élution est répétée une seconde fois pour obtenir 100 µl d'éluat (annexe 4).

L'efficacité d'extraction du kit a été comparée avec celle de la technique Baylor sur les 50 lots de coquillages prélevés à cet effet en recherchant les NoV et les RV.

c- Technique FAHRP

Basée sur la technique Baylor, les modifications suivantes ont été apportées :

Etape de centrifugation	Méthode « Baylor »	Méthode « USA »
Phénol-chloroforme- alcool isoamylique	5 min / 10 000 g	10 min / 6 000 g
Chloroforme-alcool isoamylique	5 min / 10 000 g	10 min / 6 000 g

Afin de vérifier si les changements apportés à la concentration virale et à l'extraction ne modifiaient pas l'efficacité de l'extraction, des aliquots de 1,5 g de glandes digestives ont été artificiellement contaminés avec la selle SG2US. Deux niveaux de contamination artificielle ont été testés : une forte contamination avec 200 μ l d'extrait de selle pure et une faible contamination avec 200 μ l d'extrait de selle à la dilution 10⁻² ajoutés à l'aliquot. Les ARN ont été extraits puis amplifiés par RT-PCR, en utilisant le couple d'amorces P110 / NI.

3- Eaux de station d'épuration

Après concentration par ultracentrifugation, les acides nucléiques viraux sont extraits en utilisant le kit High Pure Viral RNA Kit (Boehringer). Brièvement, les particules virales sont lysées en présence de guanidium. Les acides nucléiques sont ensuite adsorbés sélectivement sur une colonne. Après lavages, les acides nucléiques sont élués dans de l'eau stérile exempte d'activité nucléasique. Afin d'éliminer les inhibiteurs, 5 % p/v de cétyl triméthyl ammonium bromide (CTAB) / NaCl 0,4 M sont ajoutés. Après incubation 15 minutes à température ambiante, le mélange est centrifugé 30 min à 15 000 g à 25°C. Le culot résultant est suspendu

dans 50 µl de NaCl 0,5 M et précipité à l'éthanol. Le culot final est repris dans 50 µl d'eau stérile (annexe 5).

VII. Amorces et sondes

Les différentes amorces et sondes utilisées dans cette étude sont celles décrites dans les tableaux 6A, 6B et 7.

Tableau 6 : Amorces et sondes utilisées pour la détection des NoV amorces localisées dansles régions codant pour la protéine de capside (A) et pour la polymérase (B)

A

Nom	Séquence ^a (5'-3')	Localisation ^b	Cible	Tm	Références
(polarité)			potentielle		
P155 (-)	ccaacccarccattatacatttg	5649-5671	GI	53	Le Guyader et al.,
P156 (+)	atgatgatggcgtctaaggacgc	5358-5380	GI	59	2003
SRI-3 (+)	aaaayrtcaccgggkgtat	5557-5576	GI	50	Hafliger et al., 1997
COGIF (+)	cgytggatgcgnttycatga	5291-5311	GI	61	Kageyama et al.,
COG1R (-)	cttagacgccatcatcattyac	5375- 5399	GI	56	2003
RING1 (-)	agatygcgatcycctgtcca	5340-5360	GI	62	
COG2R (-)	cgacgccatcttcattcaca	5100-5121	GII	59	Kageyama et al.,
QNIF2 (+)	atgttcagrtggatgagrttctcwga	5012- 5038	GII	58	2003 ; Loisy et al.,
QNIFS (+)	agcacgtgggagggcgatcg	5042-5062	GII	68	2004a
COG2F (+)	cargarbcnatgttyagrtggatgag	5003- 5029	GII	65	
RING2 (+)	tgggagggcgatcgcaatct	5048-5068	GII	66	
G1SKR	ccaacccarccattrtaca	5653-5671	GI	56	Kojima et al., 2002
G1SKF	ctgcccgaattygtaaatga	5342-5364	GI	57	
G2SKR	ccrccngcatrhccrttrtacat	5367-5389	GII	53	
G2SKF	cntgggaggggggatcgcaa	5046-5064	GII	63	

Nom	Séquence ^a (5'-3')	Localisation ^b	Cible potentielle	Tm	Références
(polarité)				(°C)	
P110 (-)*	acdatytcatcatcaccata	4865-4884	GI, GII, SoV,	54	Le Guyader et
			BEC, BEC		al., 1996
P36 (+)*	ataaaagttggcatgaaca	4487-4501	GI, GII	50	
P69 (+)	ggcctgccatctggattgcc	4733-4752	GI	66	
NI (+)*	gaattccatcgcccactggct	4768-4788	GII	60	
P116 (+)*	atggatgtaggtgaytaygt	4796-4815	GII	58	
SR48(+)	gtgaacagcataaatcactgg	4766-4786	GI, GII	47	Ando et al., 1995
SR50 (+)	gtgaacagtataaaccactgg	4766-4786	GI, GII	44	
SR52 (+)	gtgaacagtataaaccattgg	4766-4786	GI, GII	44	
P290 (+)*	gattactccaatgggactccac	4568-4590	GI, GII, PEC, BEC	53	Jiang et al., 1999
JV12 (+)*	ataccactatgatgcagatta	4567-4587	GI, GII, SoV,PEC,	42	Vinje et al., 1996
			BEC		
JV13 (-)*	tcatcatcaccatagaaagag	4874-4896	GI, GII, SoV,PEC,	49	
			BEC		
JV12Y (+)	ataccactatgatgcagayta	4552-4572	GI, GII, PEC, BEC		Vennema et al.,
JV13I (-)	gagiaagataccactactact	4858-4878	GI, GII, PEC, BEC		2002
GGIa (+)*	atggatgtaggtgaytaygt	4685-4704	GI	45	Vinje et al., 2000
GGIb (+)*	atggaygttggygaytatgt	4685-4704	GI	50	
GGII (+)*	gaaytccatcrcccaytg	4494-4512	GII	53	
UK3 (+)	gtcccctgacatcatacaggct	4685-4704	GI, GII	59	
JV5 (+)	ctcaccagaggttgtccaagc	4685-4704	GI, GII	58	
Mon431 (+)*	tggaciagrggiccyaayca	5093-5112	GI	64	Green et al.,
Mon432 (+)*	tggacicgyggiccyaayca	5093-5112	GII	68	2002
Mon433 (-)*	gaayctcatccayctgaacat	5285-5305	GI	61	
Mon434 (-)*	gaascgcatccarcggaacat	5285-5305	GII	69	
NV4562 (+)	gatgcdgattacacagchtggg	4562-4585	GI	54	Yuen et al., 2001
NV4611 (+)*	cwgcagcmctdgaatcatggg	4611-4633	GII	53	
NV4692 (+)	gtgtgrtkgatgtgggttgactt	4692-4714	GII	53	
SR80 (+)	tgggattctacacaaaaccc	4226-4246	SoV	58	Noel et al., 1997
PEC65 (-)*	atacacacaatcatccccgta	4636-4656	PEC	55	Guo et al., 2001
PEC66 (+)*	gactacagcaagtgggattcc	4327-4347	PEC	56	
CBEC-URP*	agtgtctctgtcagtcatcttcat	5051-5074	BEC	53	Smiley et al.,
(-)					2002
CBEC-UFP	agttayttttccttytayggbga	4543-4565	BEC	54	
(+)*					

B

bleu : amorces, rouge : sonde

NoV norovirus, SoV Sapovirus, BEC norovirus bovin, PEC norovirus porcin

* amorces et sondes utilisées au FAHRP

^a Les dégénérescences sont les suivantes : d : a/g/t; y : c/t; i: inosine ; k : g/t; n : a/t/g/c; r: a/g; w : a/t; m : a/c; s : g/c; h : a/c/t; b : c/g/t

^b La position des nucléotides fait référence à la souche du virus de Norwalk (M87661) pour les NoV GI, à la souche Lordsdale (X86557) pour les NoV GII , à la souche du virus Camberwell (AF145896) pour les amorces décrites par Kageyama et al., (2003) et Loisy et al., (2004), à la souche PEC/Cowden (QF182760) pour les PEC et à la souche BEC Jena/80 (QJ011099) pour les PEC.

Nom (polarité)	Séquence	Localisation ^a	Gène cible	Tm	Références
Con1 (-)	ttgccaccaattcagaatac	676-695	gène	52	Abbaszadegan et al.,
Con2 (+)	atttcggaccatttataacc	868-887	4	50	1999
Con3 (-)	tggcttcgccattttatagaca	811-832		58	
Beg 9	ggctttaaaagagagaatttccgtctgg	1-28	gène	64	Gouvea et al., 1990
End 9	ggtcacatcatacaattctaatctaag	1036-1062	9	54	
R4	gatcctgttggccatcc	376-392		53	Flores et al., 1990
VP6 3	gcttttaaacgaagtcttcaac	2-23	gène	52	Villena et al., 2003
VP6 4	ggtaaattaccaattcctccag	166-187	6	53	
SAVP6	caaatgatagttactatgaatgg	129-151		48	

Tableau 7 : Amorces et sondes rotavirus

bleu : amorces, rouge : sonde

^a La position des nucléotides fait référence à la souche rotavirus humaine WA (M21843)

VIII. RT-PCR

1- RT-PCR classique

Le mélange de RT est composé de 10 mM de Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM de KCl, 5 mM de MgCl₂, 1,5 mM de chaque désoxynucléotide triphosphate (dNTP), 2,5 μ M de P110, 4 unités de RNAse-inhibitor (Perkin Elmer), 10 unités de Moloney murine leukemia virus (MuLV) reverse transcriptase (Perkin Elmer), 2 μ l d'acides nucléiques et le volume d'eau nécessaire pour obtenir un volume total de 20 μ l. Le mélange est incubé pendant 15 minutes à 42°C puis dénaturé 5 min à 95°C.

Dans le cas des rotavirus, l'ARN est dénaturé pendant 5 min à température ambiante en présence de 25 mM d'hydroxy-méthylmercure et de 10 μ M d'amorces anti-sens avant l'incubation pendant 15 minutes à 42°C.

Après cette étape de RT, 30 μ l de mélange de PCR sont ajoutés pour obtenir les concentrations suivantes: 10 mM Tris-HCL (pH 8.3), 50 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 1 μ M NVp110 et NVp36, 600 μ M de chaque dNTP, 1 unité d'*AmpliTaq* DNA polymérase (Perkin Elmer).

Les thermocycleurs suivants sont utilisés : le GeneAmp PCR System 9600 ou 2400 (Perkin Elmer). Les cycles de PCR sont les suivants :

- dénaturation à 94°C pendant 1 min

 - 40 cycles comprenant 3 températures : dénaturation de l'ADNc à 94°C pendant 30 s, hybridation de l'amorce à 37, 50 ou 55°C pendant 30 s selon le Tm de l'amorce, élongation de l'amorce à 72°C pendant 30 s

- élongation finale à 72°C pendant 7 min.

Pour chaque réaction de RT-PCR, un témoin négatif ne contenant pas d'ARN est réalisé afin de vérifier l'absence de contamination lors des différentes manipulations.

La révélation est faite par électrophorèse suivie de la lecture des gels par coloration au bromure d'Ethidium (Bet) et révélation sous UV par un analyseur d'images (Fluor-S MultiImager, Bio-Rad).

2- RT-PCR utilisée au FAHRP

Le protocole d'amplification utilisé en routine au laboratoire FAHRP est une RT-PCR en une étape. Le mélange réactionnel (50 μ l) est composé de 3 μ l d'ARN, 10 mM Tris-HCL (pH 8.3), 50 mM KCl, 2,5 mM MgCl₂, 200 nM dNTP, 200 nM de P110 et P290, une unité de reverse transcriptase AMV (Proméga), une unité de RNAse inhibitor (Perkin Elmer) et une unité de Taq polymérase (Proméga). Les conditions d'amplification sont les suivantes :

- 42°C pendant une heure

- dénaturation à 94°C pendant 4 minutes

- 40 cycles comprenant 3 températures : dénaturation à 94°C pendant 50 sec, hybridation à 50°C pendant 1min 20, élongation à 72°C pendant 1 min

- élongation finale à72°C pendant 10 min.

Ce protocole d'amplification a été comparé avec une RT-PCR en deux étapes. Le mélange réactionnel (25 μ l) de transcription inverse est le suivant : 3 μ l d'ARN, 2,5 μ l de tampon 10X, 2,5 mM de MgCl₂, 400 nM de dNTP, 400 nM de P110, 2 unités de reverse transcriptase AMV (Proméga) et de RNAse inhibitor (Perkin Elmer). Le mélange est incubé 1 heure à 42°C, suivi de 4 min de dénaturation.

Après cette étape de RT, 30 μ l de mélange de PCR ont été ajoutés pour obtenir les concentrations suivantes: 10 mM Tris-HCL (pH 8.3), 50 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 200 nM P110 et P290, 600 μ M de chaque dNTP, 1 unité de Taq DNA polymérase (Proméga). Les cycles de PCR ont été les suivants:

- dénaturation à 94°C pendant 1 min

 - 40 cycles comprenant 3 températures: dénaturation de l'échantillon à 94°C pendant 30 s, hybridation de l'amorce à 50°C pendant 1 min 20, élongation de l'amorce à 72°C pendant 1 min

- élongation finale à 72°C pendant 7 min.

Pour chaque réaction de RT-PCR, un témoin négatif ne contenant pas d'ARN a été réalisé afin de vérifier l'absence de contamination lors des différentes manipulations.

La révélation a été faite par électrophorèse suivie de la lecture des gels par coloration au bromure d'Ethidium et révélation sous UV par un analyseur d'images (Perkin Elmer).

Afin de comparer les deux méthodes, une gamme de dilution au dixième d'ARN extrait de la selle SG2US a été testée.

3- RT-PCR en une étape adaptée du kit Invitrogen

Les conditions de la RT-PCR en une étape adaptée du kit Platinum Quantitative RT-PCR thermoscript one-step system (Invitrogen) sont les suivantes : $2 \mu l$ d'ARN ont été ajoutés à un mélange composé de tampon Thermoscript 1X, 200 nM de chaque amorce, 0,5 μl du mélange d'enzymes Thermoscript Plus/Platinum Taq et 2 U de RNAse Inhibitor (Applied Biosystems). Les conditions d'amplification ont été de 30 min à 50°C pour l'étape de RT, suivie d'une dénaturation à 95°C pendant 5 min puis de 40 cycles d'amplification avec 30 sec de dénaturation à 95°C, 30 sec d'hybridation à 50°C et 30 sec d'élongation à 50°C, puis une élongation finale de 7 min à 72°C.

4- PCR semi-nichée

En cas de résultats positifs, une PCR semi-nichée (SN PCR) est réalisée. Le mélange réactionnel d'une SN PCR est composée de tampon PCR 1X, 2,5 mM MgCl₂, 600 nM de dNTP, 200 nM d'amorces et de 1 unité de Taq Polymérase (Proméga ou Perkin Elmer). Les 40 cycles de SN-PCR sont identiques à ceux d'une PCR classique.

5- Séquençage

Après amplification, 10 µl de produits de PCR sont purifiés, après migration en gel de polyacrylamide, avec le kit QiaExII gel extraction (Qiagen) selon les conditions décrites par le fabricant. Le séquençage est réalisé avec un séquenceur automatique ABI 373A et le kit Taq DieDeoxy Terminator cycle-sequencing (Applied Biosystems). Les électrophorégrammes et les séquences résultantes sont envoyés au laboratoire.

IX. Hybridation sur membrane

Une hybridation sur membrane a été réalisée sur les produits de RT-PCR afin de confirmer la spécificité de l'amplification et d'augmenter la sensibilité.

La dénaturation et la fixation des produits de RT-PCR sur membrane est réalisée par la technique du dot blot. Dix µl de produit de PCR sont dilués au 1/5 en tampon de dilution (10 mM tris/HCl pH 8 ; 1 mM EDTA pH 8), puis dénaturés à 100°C au bain-marie pendant 5 min et immédiatement placés sur glace afin de maintenir les brins d'ADN séparés. Les produits dénaturés ont ensuite été déposés sous vide sur une membrane de nylon chargée positivement (Roche) puis fixés de manière covalente à la membrane par exposition aux UV pendant 3 min.

Les sondes utilisées pour l'étape d'hybridation sont marquées à la digoxygénine à l'aide du 3' Tailing kit (Roche Molecular Diagnostics). Ce kit permet d'ajouter plusieurs Dig-11-dUTP en 3' de la sonde sous l'action de la terminale transférase.

Après pré-hybridation de la membrane 30 min à 45 ou 50°C selon le Tm de la sonde en tampon d'hybridation (5X SSC, agent bloquant Boehringer 1 %, N-laurylsarcosine 0,1 %, SDS 0,02 %), la membrane est hybridée avec la sonde marquée pendant 2 heures à 45 ou 50°C. Les sondes hybridées de manière non spécifique sont éliminées par une première série de 2 lavages de 5 min en tampon 2X SSC/0,1 % SDS à température ambiante, puis une série de 2 lavages de 15 min à 45°C en tampon 0,5X SSC/0,1 % SDS.

Toutes les étapes suivantes se sont déroulées à température ambiante. La membrane est rincée 5 min en tampon Tween 20 (Acide maléique 100 mM, NaCl 150 mM, Tween 20 0,3 %, pH 7,5), puis incubée 30 min en tampon bloquant (Tampon Tween 20, agent bloquant 10 g/l). L'anticorps anti-Dig alkaline phosphatase (Roche Molecular Diagnostics) est ajouté pendant 30 min. La membrane est ensuite rincée 2 fois 15 min en tampon Tween 20, puis 5 min en

tampon Tris HCl (Tris HCl 0,1M; NaCl 0,1 M pH 9,5) afin d'éliminer l'excès d'anticorps. La membrane est mise en contact et scellée sous plastique pendant 10 min avec le substrat chromogène de l'alcaline phosphatase, le CDP STAR (Roche Molecular Diagnostics). La lecture est effectuée avec le multi-imageur numérique (MultiImager, Bio-Rad) permettant de visualiser de spots lumineux en cas d'hybridation de la sonde (annexe 6).

X. RT-PCR en temps réel pour détecter les NoV

1- Alignement de séquences

Les alignements de séquences d'acides nucléiques ont été réalisés grâce au logiciel Multalin et Clustalw en appliquant les paramètres définis par défaut. Grâce à la banque de séquences Genbank, 7 séquences de NoV GI et 54 séquences de NoV GII ont été alignées.

2- Définition des amorces et sondes

Les amorces et sondes ont été définies à l'aide du logiciel Primer Express (Applied Biosystems). L'amplification par RT-PCR en temps réel par la technologie TaqMan impose certains critères tels que :

- une température de fusion Tm des amorces comprises entre 58 et 60°C
- un Tm de la sonde supérieur de 10°C à celui des amorces
- la sonde ne doit pas avoir de G en position 5' afin d'éviter un effet quencher de fluorescence
- la taille de l'amplicon doit être si possible comprise entre 50 et 150 pb
- pas plus de 4 paires de bases identiques successives
- préférer les sondes plus riches en C qu'en G
- éviter les séquences trop riches en GC à l'extrêmité 3' de l'amorce (5 dernières bases)

Les amorces et sondes NoV GI et GII ont donc été définies en tenant compte de ces paramètres et en imposant le maximum d'homologie avec les différentes séquences alignées, afin d'obtenir une bonne sensibilité de détection.

3- Comparaison des kits de RT-PCR en temps réel en une étape

Trois méthodes de RT-PCR en temps réel en une étape ont été testées dans les conditions suivantes sur des ARN extraits des selles S35 et SJV (GII) dilués au dixième. Pour chaque méthode, l'appareil ABI Prism 7000 SDS (Applied Biosystems) a été utilisé.

- kit TaqMan one-step RT-PCR master mix reagents (Applied Biosystems) : le mélange réactionnel (25 µl) est composé de 2 µl d'ARN, tampon master mix 1X, 300 nM d'amorces QNIF1 et QNIF2d, 250 nM de sonde QNIFS et de 0,625 µl de mélange enzymatique 40 X MultiScribe et RNAse Inhibitor. La réaction de RT-PCR est réalisée dans les conditions suivantes : reverse transcription à 50°C pendant 30 min, dénaturation pendant 10 min à 95°C, puis 45 cycles incluant chacun une étape de dénaturation à 95° pendant 15 sec, puis une élongation à 60°C pendant 1 min.
- méthode RT-PCR en temps réel en une étape « Eurogentec »: cette méthode utilise le kit Q-PCR core kit (Eurogentec) et la reverse transcriptase MuLV (Applied Biosystems). Le mélange réactionnel (25 µl) est composé de 2 µl d'ARN, tampon 1X, 6 mM de MgCl₂, 500 µm de dNTP, 300 nM d'amorces QNIF1 et QNIF2d, 200 nM de sonde QNIFS, 0,2 U de RNAse inhibitor (Applied Biosystems), 5 U reverse transcriptase MuLV et 1,5 U de HotStartGold (Eurogentec). La réaction de RT-PCR est réalisée dans les conditions suivantes : reverse transcription à 50°C pendant 30 min, dénaturation à 95°C pendant 10 min, puis 45 cycles incluant chacun une étape de dénaturation à 95° pendant 15 sec puis une élongation à 60°C pendant 1 min.
- kit Platinum Quantitative RT-PCR thermoscript one-step system (Invitrogen) : le mélange réactionnel (25 µl) est composé de 2 µl d'ARN, tampon ThermoScript reaction mix 1X, 200 nM d'amorces QNIF1 et QNIF2d et de sonde QNIFS, 0,5 µl de ROX, 0,2 U de RNAse inhibitor (Applied Biosystems) et 1 µl du mélange d'enzymes ThermoScript Plus/ Platinum Taq. La réaction de RT-PCR est réalisée dans les conditions suivantes : reverse transcription à 50°C pendant 30 min, dénaturation à 95°C pendant 5 min, 45 cycles incluant chacun une étape de dénaturation à 95° pendant 15 sec, puis une élongation à 60°C pendant 1 min.

4- Optimisation du kit de RT-PCR en temps réel en une étape Invitrogen

Différents paramètres tels que la concentration en amorces et en sonde ont été testés afin d'obtenir la meilleure sensibilité de détection. Les essais ont été réalisés sur l'ARN de la selle S35 dilué au dixième dans les conditions d'amplification décrite ci-dessus pour le kit Invitrogen. Nous avons d'abord testé une variation de concentration en amorces QNIF1 et QNIF2 simultanée de 100 à 500 nM. L'effet d'une variation de concentration en sonde de 100 à 500 nM a ensuite été étudié ainsi que des concentrations en MgSO₄ de 3 à 6 mM.

5- Validation des méthodes RT-PCR en temps réel NoV GI et GII

La sensibilité des amplifications par RT-PCR en temps réel a été comparée avec celle obtenue après RT-PCR classique suivie d'une hybridation. Pour les amplifications en temps réel, les amorces et sondes COG1R, COGIF, RING1 et QNIF1, QNIF2d, QNIFs ont été respectivement utilisées pour les NoVs GI et GII. Dans le cas de la validation sur selles humaines et sur des huîtres artificiellement contaminées, la sensibilité de l'amplification par RT-PCR en une étape adaptée du kit Invitrogen suivie d'une hybridation a également été étudiée.

a- Validation sur selles humaines.

Les selles NV et S35 ont été testées respectivement pour les NoVs GI et GII. Les couples amorces-sonde P110/P69-GGIa, COGIR/COGIF-RING1 et P110/NI-P116, QNIF1/QNIF2d-QNIFS ont été utilisés pour amplifier respectivement les NoVs GI et GII par RT-PCR classique ou une étape suivie de l'hybridation.

b- Validation sur des eaux de station d'épuration

Les eaux brutes prélevées à la station d'épuration de Nantes d'avril 2002 à avril 2003 ont été testées par RT-PCR classique suivie d'une hybridation avec les différents couples amorces-sonde NoV et par RT-PCR en temps réel.

c- Validation sur des huîtres artificiellement contaminées

Des glandes digestives disséquées ont été artificiellement contaminées avec les selles NV ou S35. Les virus ont été concentrés et les acides nucléiques extraits comme décrit précédemment par la méthode Baylor.

Les couples amorces-sonde P110/P69-GGIa, COGIR/COGIF-RING1 et P110/NI-P116, QNIF1/QNIF2d-QNIFS ont été utilisés pour amplifier respectivement pour les NoVs GI et GII par RT-PCR classique ou une étape suivie de l'hybridation.

d- Validation sur des ARN viraux de coquillages naturellement contaminés

Les extraits d'ARN des 150 coquillages ont été amplifiés par RT-PCR en temps réel et par détection classique, RT-PCR puis hybridation, en utilisant le panel d'amorces et de sondes décrit pour les NoVs. En cas de résultats discordants entre la détection classique et la RT-PCR en temps réel, la RT-PCR puis l'hybridation ont été refaites.

Ces 150 échantillons ont également été testés par RT-PCR en temps réel en utilisant les amorces COG2R/COG2F et la sonde RING2 décrites par Kageyama et al. (2003) pour l'amplification des NoVs GII.

XI. Contrôles et interprétation

Toutes les précautions ont été prises pour éviter l'obtention de résultats faux négatifs ou faux positifs. Les dissections, extractions, amplifications et révélations ont été réalisées dans des pièces différentes ; des cônes à filtre ont été utilisés.

1- RT-PCR classique

Un contrôle interne (CI) entérovirus (EV) a été obtenu à partir du poliovirus 1 par création d'une délétion de 121 pb (Le Guyader et al., 1997). Une série de dilutions au dixième jusqu'à la dilution 10^{-9} est conservée à -80°C. Afin de contrôler l'inhibition des ARN extraits, 1 µl de CI EV à la dilution 10^{-8} est co-amplifié avec 1 µl d'ARN extrait au lieu des 2 µl d'extrait. Un témoin positif ne contenant que le CI EV à la dilution limite 10^{-8} est amplifié en parallèle.

Un contrôle négatif ne contenant pas d'ARN est systématiquement inclus dans chaque amplification. Un échantillon est considéré comme positif si le produit de PCR est détecté après hybridation.

2- RT-PCR en temps réel

Deux contrôles négatifs ne contenant pas d'ARN et un contrôle positif (ARN de selles NV ou S35 à la dilution limite) sont inclus dans chaque réaction. Tous les échantillons sont testés purs et dilués au dixième pour évaluer les effets d'inhibition. Le « cycle seuil » Ct correspond au cycle à partir duquel un signal de fluorescence est détecté. Un échantillon ayant un Ct < 42 et des contrôles négatifs non détectables est considéré positif. Toutes les amplifications de RT-PCR en temps réel sont réalisées en double lors de deux amplifications indépendantes. Pour vérifier la spécificité de nos essais, les ARN d'huîtres contaminées en astrovirus,

rotavirus, entérovirus et hépatite A ou les ADN de différentes bactéries (Shewenella putrefaciens, Chromobacterium violaceum, Aeromonas sobria, Vibrio alginolyticus, Vibrio parahaemolyticus, Vibrio cholerae) ont été testés par RT-PCR en temps réel.

XII. Analyse statistique

L'analyse statistique est réalisée grâce au test du Chi-deux. L'écart réduit est calculé par la formule $|a-b| / \sqrt{(a+b)}$ où a et b sont les nombres de paires -/+ et +/- correspondant aux nombres d'échantillons positifs uniquement par l'une des 2 méthodes d'extraction des ARN. Une valeur d'écart réduit inférieure à 1,96 signifie que les pourcentages de réponses positives et négatives des deux méthodes d'extraction ne sont pas significatifs au risque $\alpha =$ 0,05.

B- Apport des Virus-like Particles (VLPs)

I. Souches virales et VLPs

1- Souches virales

La souche de rotavirus (RV) bovin RF nous a été fournie par J. Cohen (CNRS). La souche est multipliée par culture cellulaire en utilisant la lignée cellulaire de rein de singe (MA104) (Nejmeddine et al., 2000). Les particules triple couches sont purifiées par deux centrifugations en gradient de densité de chlorure de césium (CsCl). La suspension de rotavirus est quantifiée selon la méthode de Bradford en utilisant l'albumine de sérum bovin comme standard (Charpilienne et al., 2001).

La souche de virus de Norwalk (aimablement fournie par M.K. Estes, Baylor College of Medicine), est obtenue à partir d'une suspension de selle humaine, puis titrée à 10⁶ unités RT-PCR.

2- VLPs rotavirus (VLPs RV)

Des VLPs RV contenant les protéines de capside VP2 et VP6 (VLPs 2/6) marquées ou non à la GFP ou VP2, VP6 et VP7 (VLPs 2/6/7) nous ont été fournies par J. Cohen (CNRS). Ces VLPs ont été produites comme décrit par Crawford et al. (1998) et Charpilienne et al. (2001) dans le système d'expression Baculovirus. Les suspensions de VLPs sont quantifiées selon la méthode de Bradford.

3- Pseudovirus (PS)

Les PS nous sont fournis par J. Cohen (CNRS). Pour produire ces PS, un ARN hétérologue est introduit dans les VLPs 2/6. Brièvement, la première étape de construction des PS est de fusionner la protéine dimérique de l'enveloppe du bactériophage MS2 à l'extrémité amino terminale de la protéine VP2 du RV pour former la protéine MS-VP2. Cette protéine a ensuite été liée à un fragment de 133 nucléotides correspondant au domaine de fusion du génome de MS2 fixé à l'extrémité 3' du génome astrovirus (6709-6797). L'ensemble a

ensuite été co-exprimé avec la protéine VP6 de RV dans le système baculovirus pour produire des VLPs. Les PS ainsi formés sont purifiés sur gradients de CsCl puis filtrés par le système de filtre Centriplus YM-100 (Millipore). Les suspensions de PS sont quantifiées en utilisant la méthode de Bradford.

4- VLPs du virus de Norwalk (VLPs NV)

Les VLPs NV nous ont été fournies par M.K. Estes (Baylor College of Medicine). Ces VLPs NV sont obtenues par expression des protéines de capside NV1 et NV2, respectivement codée par l'ORF2 et l'ORF3, dans le système d'expression du Baculovirus. Les suspensions de VLPs NV sont quantifiées en utilisant la méthode de Bradford.

II- Contaminations artificielles

1- Contamination de l'eau de mer

Soixante ml d'eau de mer d'Argenton (salinité 36,5 g/l, turbidité < 1 NTU, coliforme totaux 1,6 10⁵ CFU/ml) sont inoculés avec 10⁹ particules (RV RF, VLPs2/6, PS, NV ou VLPs NV). Les échantillons sont placés à 25°C dans l'obscurité sous agitation.

2- Bio-accumulation au laboratoire

Dans un bécher équipé d'un bulleur, 500 ml d'eau de mer sont inoculés avec 5 10^8 particules de NV ou 10^{12} puis 10^9 particules de VLPs NV. Après 5 min d'homogénéisation, 3 huîtres sont incubées à température ambiante pendant 12 ou 24 h.

3- Bio-accumulation dans le pilote de purification

Un stock d'huîtres (*Crassostrea gigas*) calibrées est sélectionné de manière à avoir un stock d'huîtres homogène afin de limiter les effets physiologiques pendant la purification.

a- Contamination avec du rotavirus

Les huîtres (10 kg) sont artificiellement contaminées avec la souche de rotavirus bovin RF. Une suspension de 5 10^8 particules virales est inoculée dans un bassin contenant 6 m³ d'eau de mer prélevée dans l'Aber Benoît à côté de l'établissement. Après 20 min d'homogénéisation dans le bassin, les huîtres sont immergées pendant 96 h.

b- Contamination avec des VLPs

Les huîtres (10 kg) sont artificiellement contaminées avec une suspension de VLPs 2/6 contenant 5 10^{12} (expérience A), ou 5 10^{10} (expérience B) ou 5. 10^6 (expérience C) particules. Après 20 min d'homogénéisation dans 3 m³ d'eau de mer dans le bassin, les huîtres sont immergées pendant 24 h à 22°C.

Une expérience de contamination avec 10^8 particules de VLPs NV a également été réalisée à la même température.

c- Bi-contamination phages-VLPs 2/6

Une expérience de bi-contamination avec une suspension de VLPs 2/6 contenant 5.10^6 particules et une suspension de phages MS2 contenant 5.10^9 particules a été réalisée comme pour les VLPs.

III. Méthodes de détection

1- Western-blot (WB)

La méthode a été mise au point sur les RV et les VLPs 2/6. Les techniques sont identiques pour les PS. Pour la détection du NV et des VLPs NV, seuls les anticorps utilisés diffèrent.

a- SDS-PAGE

Les particules (VLPs, PS et souches virales) sont diluées en tampon de dissociation (25 mM Tris-HCl ; pH 6,8, 2 % SDS ; 10 % glycérol ; 140 mM β-mercaptoéthanol ; bleu de bromophénol). Les échantillons à analyser sont portés à ébullition pendant 5 min. Les gels de

SDS-PAGE comportent deux parties : un gel de concentration (acrylamide-bisacrylamide 39 :1 4 % ; Tris-HCl 125 mM pH 6,6 ; SDS 0,1 % ; Temed 0,01 %; persulfate d'ammonium 0,01 %), puis un gel de séparation (acrylamide-bisacrylamide 39 :1 10 % ; Tris-HCl 380 mM pH 8,9 ; SDS 0,1 % ; Temed 0,01 % ; persulfate d'ammonium 0,01 %). La migration est réalisée en tampon Tris 25 mM pH 6,6 ; glycine 185 mM ; SDS 0,1 % à 80 Volts pour la phase de concentration puis à 120 volts pour la phase de séparation.

Afin de déterminer la sensibilité, une gamme de dilutions au dixième de 10^{12} à 10^7 particules/ml est réalisée en tampon de dissociation.

b- Transfert sur membranes

Le transfert est réalisé sur membrane de PVDF (Immobilon-P, Sigma) dans le tampon de transfert (10 mM CAPS pH 11 ; 10 % méthanol) pendant environ 1 heure à 60 Volts. Deux types d'appareil de transfert ont été utilisés :

- transfert avec le système « semi-dry » (Fast-blot, Eurogentec)
- transfert en milieu liquide (Mini Trans-Blot, Biorad).

L'efficacité de transfert des deux appareils a été comparée par coloration du gel au bleu de Coomassie après transfert. Si le transfert est efficace à 100 %, aucune coloration ne doit apparaître sur le gel.

c- Révélation immunochimique

Après transfert, la membrane est saturée pendant 1 heure à température ambiante dans 40 ml de solution de western blocking (Tris 50 mM pH 7,5 ; NaCl 150 mM ; 0,05 % Tween 20 ; 1 % agent bloquant). La membrane est incubée avec 10 ml du 1^{er} anticorps dilué en tampon WB pendant 1 heure à température ambiante. Deux anticorps ont été testés :

- un sérum de lapin anti-rotavirus 8148 (fourni par J. Cohen) dilué au 1/2 500^{ème}
- un mélange d'anticorps monoclonaux de souris anti-VP6 1026 et anti-VP2 164F22 (fournis par J. Cohen) dilués au 1/2 000^{ème}.

La membrane est lavée 4 fois dans 40 ml de tampon TBST (Tris 50 mM pH 7,5 ; NaCl 150 mM ; 0,05 % Tween 20), avant l'ajout du second anticorps dilué au 1/5 000^{ème} dans 40 ml de tampon WB. Cet anticorps est une anti-immunoglobuline G (Sigma) de souris ou de lapin suivant le type du 1^{er} anticorps marqué à la péroxydase (révélation par chemiluminescence) ou l'alcaline phosphatase (révélation par colorimétrie). La membrane est incubée 1 heure à

température ambiante avant d'être lavée en tampon TBST. Deux types de révélation ont été comparés :

- révélation par colorimétrie : la membrane est incubée dans 40 ml de NBT/BCIP (p-nitro blue tetrazolium chloride/ 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate, toluidine salt, Biorad) au maximum pendant 4 heures. Une coloration violette est obtenue. La membrane a été scannée avec l'appareil Fluor-S MultiImager (Biorad)
- révélation par chemiluminescence : la membrane est incubée pendant 10 minutes au moins dans un pochette plastique contenant 1 ml de substrat Lumi-Light ^{plus} (Roche).
 Après 30 min d'exposition, la lecture est faite avec l'appareil Fluor-S MultiImager (Biorad).

Pour la détection des NV et VLPs NV, le premier anticorps utilisé pour la révélation est le sérum Rabbit 1 (fourni par M.K. Estes), le second anticorps étant une anti-immunoglobuline G (Sigma) de lapin marquée à la péroxydase.

2- Elisa RV, VLPs RV et PS

Afin d'obtenir la meilleure sensibilité, différentes méthodes Elisa (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) ont été comparées.

a- Elisa direct

Une gamme de dilution de VLPs 2/6 de 10^{10} à 10^4 particules est réalisée dans 100 µl de tampon carbonate/ bicarbonate pH 9,6 (Argène Biosoft). Les VLPs à différentes dilutions sont ensuite fixées dans des microplaques Falcon 3915 (Probind assay plate Becton- Dickinson) pendant la nuit à 4°C. Après 3 lavages de 5 min chacun, en tampon PBS (Argène-Biosoft) + tween 0.1 %, les microplaques sont saturées avec 200 µl de tampon PBS + lait 4 % pendant 1 h 30 à 37°C. Les plaques sont rincées et lavées avant la fixation du premier anticorps. Différents anticorps dilués en tampon PBS + tween 0.1 % + lait 4 % ont été testés :

- un sérum de lapin anti-rotavirus 8148 (fourni par J. Cohen) dilué au 1/25 000^{ème}

- un anticorps monoclonal de souris anti-VP6 1026 (fourni par J. Cohen) dilué au 1/1 000^{ème}
- un anticorps monoclonal de souris anti-VP6 remi-2 (Argène-biosoft) dilué au 1/4 000^{ème}. Les anticorps (100 μ l) sont fixés pendant 1 h 30 à 37°C. Après 3 lavages en tampon PBS + tween 0.1 %, 100 μ l du second anticorps sont ajoutés, dilués au 1/1 000^{ème} en tampon PBS +
tween 0.1 %. En fonction de l'origine du premier anticorps (lapin ou souris) deux anticorps ont été testés :

- un anticorps anti-immunoglobuline G de lapin développé chez la chèvre, marqué à l'alcaline phosphatase (Sigma)
- un anticorps anti-immunoglobuline G de souris développé chez la chèvre, marqué à la péroxydase (Sigma).

Les anticorps sont fixés 1 h à 37°C. Après 3 lavages, le substrat (100 μ l) est ajouté. Différents substrats sont utilisés suivant le type de marquage du second anticorps :

- le para-nitro-phénylphosphate (pNPP, Sigma) dans le cas d'un marquage à l'alcaline phosphatase
- l'o-phénylenediamine dihydrochloride (OPD, Sigma) ou la tetraméthyl benzidine (TMB, Roche Diagnostic) pour la péroxydase.

Dans le cas du pNPP, après 30 min d'incubation dans le noir, la réaction est stoppée par ajout de 100 μ l de NaOH 2N. La lecture est réalisée à 405 nm. Un temps d'incubation de 2 h a également été testé.

Dans le cas de l'OPD ou du TMB, la réaction est respectivement stoppée après 30 min ou 20 min maximum d'incubation dans le noir par ajout respectif de 100 μ l d'HCl ou de H₂SO₄ 1 N. La lecture est réalisée à 492 nm pour l'OPD et 450 nm pour le TMB.

b- Elisa sandwich simple

Les microplaques Falcon 3915 (Probind assay plate Becton-Dickinson) ont été recouvertes pendant la nuit à 4°C avec 200 µl d'anticorps dilués en tampon carbonate/ bicarbonate pH 9,6. Deux anticorps ont été testés :

- un anticorps monoclonal de souris anti-VP6 1026 (fourni par J. Cohen) dilué au 1/1 000^{ème}
- un sérum de lapin anti-rotavirus 8148 (fourni par J. Cohen) dilué au 1/25 000^{eme}.

Les microplaques sont ensuite rincées 2 fois, puis lavées 3 fois en tampon PBS + tween 0.1 % avant d'être saturées par 200 μ l de PBS + lait 4 % pendant 1 h 30 à 37°C. Après 3 lavages, 100 μ l de VLPs à différentes dilutions sont fixés pendant 1 h 30 à 37°C. La gamme de dilution de VLPs 2/6 de 10¹⁰ à 10⁴ particules est réalisée dans 100 μ l de tampon PBS. Après 3 lavages, 100 μ l d'anticorps monoclonal de souris anti-VP6 remi-2 (Argène Biosoft) dilué au 1/100^{ème} dans du tampon PBS + tween 0.1 % sont fixés pendant 1 h à 37°C. Après 3 lavages, la révélation a été faite par ajout de 100 μ l d'OPD ou de TMB. L'arrêt de la réaction et la lecture ont été faits comme décrit précédemment.

c- Elisa double sandwich

Les microplaques Falcon 3915 (Probind assay plate Becton-Dickinson) sont recouvertes pendant la nuit à 4°C avec 200 μ l d'anticorps dilués en tampon carbonate/ bicarbonate pH 9,6. Deux anticorps ont été testés :

- un sérum de lapin anti-rotavirus 8148 (fourni par J.Cohen) dilué au 1/25 000^{ème}
- un anticorps monoclonal de souris anti-VP6 1026 (J. Cohen), dilué au 1/1 000^{ème}.

Les microplaques sont ensuite rincées 2 fois puis lavées 3 fois en tampon PBS + tween 0.1 %, avant d'être saturées par 200 μ l de PBS + lait 4 % pendant 1 h 30 à 37°C. Après 3 lavages, 100 μ l de VLPs à différentes dilutions sont fixés pendant 1 h 30 à 37°C. La gamme de dilution de VLPs 2/6 de 10¹⁰ à 10⁴ particules est réalisée dans 100 μ l de tampon PBS. Après 3 lavages, 100 μ l du premier anticorps dilué en tampon PBS + tween 0.1 % sont fixés pendant 1 h 30 à 37°C. Selon l'anticorps utilisé pour recouvrir les microplaques, deux anticorps ont été utilisés :

- un anticorps monoclonal de souris anti-VP6 1026 dilué au 1/1 000^{ème} ou un anticorps monoclonal de souris anti-VP6 remi-2, dilué au 1/1 000^{ème} (dans le cas du sérum antirotavirus)
- un sérum de lapin anti-rotavirus 8148, dilué au 1/25 000^{ème} (dans le cas de l'anticorps anti-VP6).

Après 3 lavages, 100 μ l du second anticorps dilué dans du tampon PBS + tween 0.1 % sont ajoutés. Suivant le type du 1^{er} anticorps, différents anticorps ont été testés :

- un anticorps anti-immunoglobuline G de lapin développé chez la chèvre, marqué à l'alcaline phosphatase (Sigma)
- un anticorps anti-immunoglobuline G de souris développé chez la chèvre, marqué à la péroxydase (Sigma).

Les anticorps sont fixés 1 h à 37°C. Après 3 lavages, le substrat (100 µl) est ajouté. Les substrats (pNPP, OPD ou TMB) sont utilisés comme décrit précédemment.

3- Elisa NV et VLPs NV

Ce protocole est celui utilisé par le laboratoire de M.K. Estes. Les microplaques Falcon 3915 (Probind assay plate Becton-Dickinson) sont saturées pendant la nuit à température ambiante avec 100 µl de sérum guinea pig #4 et de pre-sérum guinea pig normal, dilués au 1/5 000^{ème} en tampon carbonate/ bicarbonate pH 9,6. Les plaques sont ensuite bloquées avec 200 µl de tampon Blotto 5 % (lait écrémé 5 g/l de PBS) pendant 2 h à 37°C. Après 3 lavages en tampon PBS-tween 20 0,05 %, une gamme de dilution au dixième des particules en tampon Blotto est fixée pendant 1 h à 37°C. Après 5 lavages en tampon PBS-tween 20 0,05 %, 100 µl de sérum rabbit 1 dilué au 1/5 000^{ème} en tampon Blotto 2,5 % pendant 1 h à 37°C. Les plaques sont lavées 5 fois avant incubation pendant 1 h à 37°C avec l'IgG de chèvre anti-lapin marquée à la péroxydase et diluée au 1/5 000^{ème} en tampon 2,5 % Blotto, 2 % de sérum Guinea pig normal. Après 5 lavages, 100 µl de TMB sont ajoutés, puis la réaction est stoppée après 20 min maximum d'incubation dans le noir par ajout respectif de H₂SO₄ 1 N. La lecture est réalisée à 450 nm. La limite de détection de la méthode est de 10⁵ particules/ml.

4- Quantification des PS par RT-PCR en temps réel

La quantification est réalisée selon la méthode décrite par Le Cann et al., (2004). L'ARN de 133 pb contenu dans les PS est amplifié en utilisant le kit Q-PCR (Eurogenec) décrit précédemment. Pour permettre la quantification, une gamme de dilution au dixième d'ARN astrovirus standard titré à $1,3 \times 10^9$ copies/µl est co-amplifié avec l'ARN extrait des PS. La courbe standard obtenue permet de déterminer le nombre de copies d'ARN dans les PS et par conséquent le nombre de particules de PS.

IV. Comparaison de la stabilité des souches virales et des VLPs en eau de mer naturelle

1- Méthodes de concentration de l'eau de mer

Quatre méthodes ont été comparées. L'eau de mer est inoculée avec 10⁸ particules/ ml de VLPs 2/6. Pour chaque méthode, le pourcentage de récupération des VLPs 2/6 est estimé par Elisa sandwich simple.

concentration par ultracentrifugation (Loisy et al., 2000): 60 ml d'eau de mer inoculés avec les VLPs sont ultracentrifugés pendant 1 h 30 à 40 000 g, le culot obtenu est remis en suspension dans 100 µl de PBS.

- concentration par PEG/NaCl (Vilagenès et al., 1997) : après inoculation de 50 ml d'eau de mer, 7,5 % de Polyethylene Glycol 6000 (PEG) et 2.5 % de NaCl sont ajoutés. Après 15 minutes d'agitation, l'échantillon est centrifugé 90 min à 3 500 g, puis 20 min à 10 000 g. Le culot obtenu est mis en suspension dans 100 µl de PBS.
- concentration par lyophilisation : cette méthode a été inspirée par la technique de concentration par lyophilisation utilisée pour concentrer les échantillons d'eau de station d'épuration (Bosch et al., communication personnelle). L'eau de mer (50 ml) inoculée avec les VLPs est dans un premier temps congelée à -20° C puis lyophilisée pendant une journée.
- concentration par filtration (Katayama et al., 2002) : 10 ml d'eau de mer inoculés avec les VLPs sont filtrés grâce au système YM-10 de Millipore. Ce système de filtration permet d'éliminer toutes les particules ayant une masse moléculaire inférieure à 100 000 Da. Après une centrifugation de 4 min à 3 000 g, les VLPS (100 µl environ) sont récupérées.
 - 2- Etude de comparaison de stabilité

Trois expériences de comparaison de stabilité, répétées 4 fois chacune, ont été réalisées : une comparaison de stabilité entre la souche de RV RF et les VLPs2/6, une comparaison de stabilité entre souche de RV RF, VLPs2/6 et PS et une comparaison de stabilité entre la souche NV et les VLPs NV.

A partir des échantillons d'eau de mer contaminés artificiellement, des prélèvements de 10 ml ont été réalisés à J0, J1, J2, J4 et J6 puis concentrés. Les particules concentrées (100 µl) ont été analysées par Elisa et WB ; pour les PS, une quantification par RT-PCR en temps réel a également été faite.

V- Etude de la purification des huîtres dans le pilote

1- Pilote de purification

Un pilote de purification constitué de 4 bassins a été construit dans l'établissement conchylicole Prat Ar Coum d'Y. Madec (Lannilis, France). La description et le calibrage du pilote ont été décrits par Pommepuy et al. (2003b). Les 4 bassins (figure 6) sont équipés de

pompes permettant une aération efficace, un recyclage de l'eau de mer (5 à 30 m³/h) et d'un système de chauffage / refroidisseur permettant de travailler à des températures constantes de 8 à 40°C. Chaque bassin a une capacité volumique de 6 m³ et peut contenir une charge maximum de 960 kg d'huîtres. Les eaux de rejet du pilote sont désinfectées par passage sur un large filtre à sable et traitement aux ultra violets. Ce pilote a permis de travailler en accord avec les pratiques de purification des professionnels



Figure 6 : Description du pilote de purification

2- Expériences de purification

Après bio-accumulation dans le pilote, les huîtres artificiellement contaminées sont immergées dans un bassin contenant de l'eau de mer à 22°C pendant 7 jours, et sous aération. Des prélèvements de 10 huîtres sont effectués à J0, 1, 2, 3 et 5.

Après 7 jours de purification dans le pilote, les huîtres artificiellement contaminées avec les VLPs 2/6 (expérience A, B et C) sont placées sur l'estran devant l'établissement conchylicole pour une purification naturelle sous influence des marées. Les huîtres sont prélevées jusqu'à extinction du signal positif en Elisa.

3- Analyse

Les analyses ont été systématiquement réalisées en double. Avant analyse, les huîtres ont été conservées à 4°C. A leur arrivée au laboratoire, les huîtres sont lavées, ouvertes, pesées et les glandes digestives disséquées.

Pour la détection du RV et des VLPs, la concentration des particules a été réalisée par le PEG 8 000, après homogénéisation en tampon glycine pH 9,6, comme décrit au chapitre A. Les ARN de RV ont été analysés par RT-PCR en utilisant le couple d'amorces Con1/ Con2 et la sonde Con3 comme décrit précédemment. Les VLPs 2/6 ont été analysées par la méthode d'Elisa sandwich simple.

Pour les phages, chaque analyse a été effectuée sur 6 huîtres. Après homogénéisation au warring blender dans 2 volumes d'eau peptonée, l'analyse a été faite selon le protocole ISO 10705-1, 2001.

VI. Analyse statistique

Une analyse des droites de régression linéaire a été faite en utilisant le logiciel Stat Graphic par calcul des probabilités de différence entre les pentes obtenues pour les différentes droites et test de la signification des résultats à un niveau de confiance de 0,05.

VII. Analyse immunohistochimique

1- Fixation des tissus

Immédiatement après ouverture, les tissus d'huîtres sont fixés dans le formol 10 % pendant 48 h. Les glandes digestives sont alors prélevées par dissection.

2- Inclusion

Les glandes digestives sont placées dans des caissettes. Après 3 rinçages de 10 min en tampon PBS, les tissus sont incubés 10 min dans des bains successifs d'éthanol de 20, 30, 50, 70, 80, 90 et 95°C puis dans 2 bains d'éthanol absolu pendant 30 min à température ambiante.

Après 3 bains de 30 min en tampon LMR (substituant non toxique du toluène), les caissettes sont incubées pendant 1 h dans un bain de paraffine fondu à 56°C sous vide. Les caissettes sont ensuite incubées à 56°C dans un nouveau bain de paraffine fondu pendant 48 h. Les tissus sont inclus dans des blocs de paraffine, séchés à température ambiante puis conservés à 4° C.

3- Coupes de tissus

Des coupes (5 μ m) de glandes digestives inclues sont réalisées à l'aide d'un microtome. Les coupes sont montées sur lames dans une goutte de paraffine puis séchées à 37°C.

4- Immunohistochimie

Les lames sont déparaffinées dans un bain de LMR pendant 10 min puis dans un second bain pendant 2 min à température ambiante. Les lames sont ensuite réhydratées par des bains successifs de 2 min à température ambiante en éthanol absolu, 90 %, 70 %, 50 %. Après rinçage de 5 min en PBS 1X, la péroxydase endogène est bloquée par incubation des lames 20 min en méthanol, 0,3 % d'eau oxygénée à température ambiante. Les lames sont ensuite rincées puis des puits ont été tracés autour des coupes de tissu (à l'aide d'un crayon type Dakopen). Les sites non spécifiques sont ensuite bloqués par dépôt dans les puits de 200 µl de PBS 1X, BSA 3 % et incubation 30 min à température ambiante. Les VLPs NV dilués au 1/4 000^{ème} dans 200 µl de tampon PBS 1X, BSA 1 % (2,5.10¹¹ particules/ml) sont ensuite fixées pendant une nuit à 4°C. Après 3 lavages de 5 min en PBS 1X, le premier anticorps, l'anticorps de lapin Lp130, dilué au 1/1 000ème dans 200 µl de PBS 1X, BSA 1 % est déposé dans les puits et les lames incubées pendant 1h à température ambiante. Après 3 lavages, le second anticorps, une IgG de chèvre anti lapin marquée à la péroxydase diluée au 1/1 000ème dans 200 µl de PBS 1X, BSA 1 % est déposé dans les puits. Après 1 h d'incubation à température ambiante, l'excédent d'anticorps est éliminé par 3 lavages. La révélation se fait par ajout de 200 µl de substrat 3-amino-9,6 éthylcarbazole AEC (Vector Biosys) et incubation des lames à l'obscurité jusqu'à l'obtention d'une coloration rouge-rosé (10 à 20 min). Après 3 lavages, une contre-coloration est réalisée à l'hématoxyline de Mayer pendant 10 sec. Après rinçage des lames à l'eau distillée, celles-ci sont observées au microscope après montage en milieu aqueux Aquatex.

VIII. Test d'inhibition de la fixation des VLPs sur coupes de glandes digestives

1- Inhibition par le périodate de sodium

Après blocage des sites non spécifiques, 200 µl de périodate de sodium 10 mM en tampon acétate pH 5,3 sont déposés dans les puits. Les lames sont incubées 30 min à température ambiante puis les fonctions aldéhydes ainsi libérées bloquées en tampon glycine 1 % pendant 10 min à température ambiante. Les VLPs NV sont ensuite fixées et les lames révélées par la méthode immunohistochimique.

2- Inhibition par le lait maternel

L'inhibition par des laits collectés chez des mères sécrétrices et non sécrétrices a été testée. Avant d'être fixées sur les lames, les VLPs NV sont incubées pendant 1 h 30 dans 200 μ l de lait dilué au 1/100^{ème} en tampon PBS 1X, BSA 1 %.

3- Inhibition par la salive

Des salives ont été collectées chez des personnes sécrétrices de groupe sanguin O (17), des personnes sécrétrices de groupes sanguins A (17), une personne sécrétrice de groupe sanguin B et chez 5 personnes non sécrétrices. Les échantillons de salive ont été portés à ébullition pendant 10 min après la collecte, puis centrifugés 5 min à 13 000 g. Le surnageant clair a été conservé à -20° C.

Avant d'être fixées sur les lames, les VLPs sont incubées dans 200 µl de surnageant dilué en tampon PBS 1X, BSA 1 % pendant 1 h 30. Différentes dilutions ont été testées : 1/10, 1/50 et 1/100.

IX. Comparaison de la fixation du virus de NV et des VLPs NV sur les glandes digestives d'huîtres

Après bio-accumulation, à l'échelle du laboratoire, de 5 10^8 particules de NV ou 10^{12} puis 10^9 particules de VLPs NV dans les huîtres pendant 12 ou 24 h, une analyse immunohistologique a été réalisée (en excluant l'étape de fixation des VLPs).

X. Test d'inhibition de la bio-accumulation des VLPs NV sur les glandes digestives d'huîtres

Les VLPs NV, 10¹² particules, sont incubées dans 10 ml de salive d'individu sécréteur et non sécréteur dilués au dixième dans l'eau de mer. Après 1 h 30 d'incubation, 3 huîtres sont ajoutées et le volume d'eau de mer ajusté à 500 ml. Après bio-accumulation à température ambiante pendant 12 h, l'analyse immunohistologique est réalisée.

A-Détection des Norovirus et des Rotavirus

I. Comparaison des deux méthodes d'extraction

Après concentration des virus à partir des glandes digestives de coquillages, deux méthodes d'extraction des acides nucléiques ont été comparées : la méthode dite «Baylor » (B) et le kit d'extraction Qiagen RNeasy Plant (K). La comparaison des résultats obtenus après RT-PCR et hybridation sur l'ensemble des 50 lots de coquillages ou sur les huîtres (32) et les moules (18) en terme de levée de l'inhibition (tableau 8) et de sensibilité (tableaux 9 et 10) a été étudiée.

1- Elimination des inhibiteurs

Tableau 8 : Comparaison de l'élimination des inhibiteurs par les 2 méthodes d'extraction

	Total			Huîtres			Moules		
	$\mathbf{B}+$	B-	total	$\mathbf{B}+$	B-	total	B +	B-	total
K+	14	25	39	8	17	25	6	8	14
K-	5	6	11	4	3	7	1	3	4
total	19	31		12	20		7	11	

B+ ou K+ : absence d'inhibiteur confirmé par amplification du CI

B- ou K- : présence d'inhibiteur détecté par absence d'amplification du CI.

En utilisant la méthode d'extraction Ifremer, 62 % des extraits ont été inhibés contre seulement 22 % en utilisant le kit. Quatre échantillons (8 %) n'ont été trouvés inhibés qu'après extraction par le kit. L'extraction avec le kit a donc permis une meilleure élimination des inhibiteurs aussi bien pour les échantillons d'huîtres que de moules. L'analyse statistique (test du Chi-deux) a confirmé que les résultats étaient significativement différents au risque de 0,05.

2- Comparaison de la pertinence

Les NoV (tableau 9) et les RV (tableau 10) ont été recherchés par RT-PCR confirmée par hybridation.

	Total			Huîtres			Moules		
	B+	B-		B+	B-		B+	B-	
K+	8	0	7	3	0	3	5	0	5
K-	3	39	43	2	27	29	1	12	13
	11	39		5	27		6	12	

B+ ou K+ : résultat trouvé positif par cette méthode après RT-PCR et hybridation,

Les analyses statistiques réalisées sur l'ensemble des coquillages ou sur huîtres et moules séparément ne montrent pas de différences significatives pour la détection des NoV. Il faut cependant noter que la méthode Baylor permet de détecter plus d'échantillons positifs. Tous les échantillons extraits avec la méthode Baylor ont été détectés après extraction par le kit.

Tableau 10 : Comparaison de la pertinence des 2 méthodes pour la détection des RV

	Total			Huîtres			Moules		
	B+	B-		B+	B-		B+	B-	
K+	0	2	2	0	0	0	0	2	2
K-	8	40	48	6	26	32	1	15	16
	8	42		6	26		1	17	

L 'analyse statistique réalisée sur l'ensemble des coquillages n'a pas montré de différence significative pour la détection des RV avec cependant une valeur d'écart calculée de 1,9 donc très proche de la valeur critique de 1,96. Si l'on considère les huîtres séparément, les résultats observés sont significativement différents. De nouvelles amplifications suivies d'hybridations ont été testées conduisant aux mêmes résultats négatifs pour les ARN extraits par le kit.

Concernant les acides nucléiques extraits de moules, aucune différence significative n'a été observée.

II. Etude au FAHRP sur la contamination en NoV des huîtres.

1- Transfert de la méthode d'analyse des huîtres

Afin de s'adapter aux matériels du FAHRP, différents changements ont été apportés aux techniques de concentration virale et d'extraction des ARN. Une contamination artificielle des huîtres avec deux concentrations de selle SG2US a été réalisée afin d'étudier l'effet de ces modifications. Après RT-PCR, l'ARN extrait de la selle a pu être amplifié jusqu'à la dilution 10⁻⁴. La même limite de détection a été obtenue dans les 2 cas de contamination artificielle. Les changements apportés n'ont donc pas modifié l'efficacité de l'extraction puisqu'une bonne sensibilité de détection a été observée.

Le protocole de RT-PCR utilisé en routine dans ce laboratoire était une RT-PCR en une étape avec les enzymes reverse transcriptase AMV et Taq polymérase (Promega). Ces enzymes n'étant pas spécifiques d'une RT-PCR en une seule étape, la sensibilité de détection de cette méthode a été comparée avec une RT-PCR en 2 étapes par amplification d'un extrait de selle humaine. La comparaison des 2 protocoles de RT-PCR a montré une sensibilité supérieure d'au moins une unité log avec le protocole en 2 étapes ; celui-ci a donc été retenu.

2- Analyse de la contamination en NoV des huîtres.

Cinquante et un échantillons ont été analysés (tableau 11). Vingt lots d'huîtres sur 51 des échantillons analysés ont été trouvés positifs en NoV après hybridation, soit 39 %. Cinq lots ont été trouvés positifs avec les sondes spécifiques du génogroupe I et 16 lots positifs en génogroupe II. Deux lots (ys 35 et 36) semblent avoir une contamination multiple. Un échantillon (ys 4) a été trouvé positif avec les amorces Mon 431, 432, 433, 434. Deux échantillons (ys 42 et 43) ont été trouvés positifs en PEC et 2 échantillons (ys 44 et 45) positifs en BEC. Parmi les 2 échantillons positifs en PEC, un (ys 43) a également été trouvé positif après hybridation avec des sondes spécifiques du génogroupe II.

Echantillon		RT-PCR								Hybridation		
(uate)	NI*	4611*	P36*	P290*	JV	PEC	BEC	Mon	GGI	GGII	P116	
vs1(19/7)	+	_	_	-	-	_	_	_	-	_	-	
ys2(20/6)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
ys3(17/7)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
ys4(3/6)	w+	w+	-	-	w+	-	-	w+	-	+	+	
ys5(6/26)	w+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
ys6(3/9)	-	-	-	-	-	w+	-	-	-	-	-	
ys7(17/6)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
ys8(?)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
ys9(24/10)	-	-	-	-	-	w+	-	-	-	-	-	
ys10(24/10)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
ys11(?)	+	-	-	-	w+	-	-	-	-	-	+	
ys12(?)	+	-	-	w+	-	-	-	-	-	-	+	
ys13(?)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
ys14(?)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
ys15(?)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
ys16(19/11)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
ys17(19/11)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
ys18(19/11)	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	
ys19(17/6)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
ys20(19/11)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
ys21(19/11)	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	
ys22(19/11)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
ys23(19/11)	-	-	-	w+	-	-	-	-	-	-	-	
ys24(19/11)	w+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
ys25(19/11)	w+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
ys26(19/11)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
ys27(19/11)	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	
ys28(18/7)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
ys29(27/6)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
ys30(?)	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	
ys31(26/6)	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	
ys32(22/7)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
ys33(24/9)	w+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	
ys34(12/12)	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	
ys35(12/12)	-	-	+	-	$\mathbf{w}+$	-	-	-	w+	+	+	
ys36(?/12)	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	
ys37(19/9)	-	-	w+	-	-	-	-	-	+	-	-	
ys38(?)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
ys39(?)	-	-	w+	-	-	-	-	-	+	-	-	
ys40(?/12)	+	-	w+	-	-	-	-	-	-	+	+	
ys41(12/12)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
ys42(hiver)	-	w+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	
ys43(hiver)	-	w+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	
ys44(6/1)	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	
ys45(hiver)	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	
ys46(6/1)	w+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	
ys47(hiver)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
ys48(5/2)	w+	w+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	
ys49(hiver)	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	
ys50(hiver)	w+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
ys51(5/2)	w+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

Tableau 11 : Résultats de l'analyse des huîtres

*: nom de l'amorce amont, la RT étant réalisée avec l'amorce NVp110,
+ : résultat positif détecté par RT-PCR ou par hybridation
w+ : faible signal obtenu sur gel après électrophorèse

Deux séquences uniquement ont pu être obtenues pour les échantillons ys4 et ys33 prélevés en septembre 2002 respectivement en Virginia et à Rhode Island (côte atlantique). La même séquence a été retrouvée. Cette séquence est proche à 90 % de la séquence Miami Beach (genbank number QF414424) qui appartient au génogroupe II génotype 4. Cette séquence Miami Beach est proche à 96,5 % de la séquence Farmington Hills (GII/4) circulant depuis le mois de mai 2002 aux Etats-Unis.

III. Développement de la RT-PCR en temps réel pour les NoV

Une analyse de similarité de 10 séquences de génome complet de NoV a démontré que la région de la jonction ORF1-ORF2 correspondait à une zone très conservée du génome et présentait de surcroît un consensus de 18 nucléotides présent chez les 2 génogroupes de NoV (Kageyama et al., 2003).

1- Définition des amorces et sonde NoV génogroupe I

Les résultats de l'alignement des séquences pour les NoV GI sont présentés dans la figure 7. Cet alignement confirme que la région localisée à la jonction ORF1/ORF2 est relativement bien conservée. Nous avons inséré la séquence consensus obtenue dans le logiciel Primer Express mais celui n'a pu définir d'amorces et de sonde correspondant aux conditions requises pour la RT-PCR en temps réel. Après un essai manuel de définition des amorces et les sondes en respectant aux mieux ces conditions, nous avons vérifié la bonne adéquation des amorces désignées par l'équipe japonaise aux souches circulant dans nos pays. L'alignement effectué a confirmé le choix fait par cette équipe et aucune modification n'a été apportée.



Figure 7: Alignement des 7 séquences de NoV GI. (nucléotides 4973 à 5693, souche Norwalk M87661)

La couleur rouge représente 100 % d'homologie, la bleue 90 % et la noire 75 %.

2- Définition des amorces et sonde NoV génogroupe II

A partir de la base de données Genbank, 54 séquences de NoV GII ont été alignées dans la région de la jonction ORF1/ORF2. Les résultats ont également permis de vérifier la forte conservation du génome dans la jonction ORF1-ORF2 puisqu'une séquence de 130 nucléotides a montré une homologie minimum de 84 % pour 52 des souches alignées, les 2 autres présentant une homologie légèrement inférieure (72 %). Les résultats sont présentés dans la figure 8.

	1 1	0	20	30	40	50	60	1	70	80 9	0 100	110	120	130
	COTCCOTT	ттоссти	cececocor	COOCOCCC	OTETTCOC	тесотерсот	TETERCOTO	COCCOCCT	eccoccccc	TCCCOOTCTCC	CTCCCOCCTTT	стеротеросо	тессетсео	TCOCCCCOO
LUKUSUNLE DE/1///17_UV2_17_1970	COTCCOTT	TTOCCTO	CCCCOCOC	DOCOCCCC		TCCOTCOCOT	TCTCOCOTCI	COCCOCCT	CCCCCCCCCC		CTCCCCCCTTT	стсоотсоосо	TECCETCEN	TCOCCCCOO
0E414425-Dupupobel ap	COTCCOTT	TTOCCT	CCCCOCOC	000000000	OTCTTCOCC	TCCOTCOCOT	TCTCOCOTCI	COCCOCCT	CCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCC	TCCCOOTCTCC	CTCCCOCTTT	стсоотсоосо	TECCETCED	TCOCCCCOO
DEALAA2A-Miswi-Dosob	COTCCOTT	TTOCCTO	CCCCOCOC	DOCOCCC	OTCTTCOCO	TCCOTCOCOT	TCTCOCOTCI	COCCOCCT	CCCOCCCCC		CTCCCOCTTT	стсоотсоосо	TECCETCED	TCOCCCCOO
DV001124_Mona_07_CC	COTCCOTT	TTOCCTO	CCCCOCOC	DOCOCCCC	OTCTTCOCC	TCCOTCOCOT	TCTCOCOTCI	COCCOCCT	CCCOCCCCC		CTCCCOCTTT	стсоотсоосо	TECCETCED	TCOCCCCOO
000E0EE0 VU400CTT	COTCCOTT	TTOCCTO		nnunuttr	INTETTOOC	TECOTOCOT	TETERCOTO		CCCOCCCCCC	TCCCONTETCO	CTCCCOCTTT	CTCOOTCOOCO	Teccetcen	TCOCCCCOO
0D0244EC 0C44420E (00	COTCCOTT	TTOCCTO		nnunuttr	INTETTOOC	TECOTOCOT	TETERCOTO		CCCOCCCCCC	TCCCONTETCO	CTCCCOCTTT	GTCOOTCOOCO	Teccetcen	TCOCCCCO
NB071136-05111763733	COTCCOTT	TTOCCTO	CCCCCCCCC	.nnunuttr	INTETTOOC	TECOTOCOT	TETERCOTO	COCCOCCT	CCCOCCCCCC	TCCCONTETCO	CTCCCOCTTT	GTCOOTCOOCO	Teccetcen	TCOCCCCO
HB070373-05112141720	COTCCOTT	TTOCCTO	CCCCCCCCC	.HHUHULLF	INTETTOOCO	TECOTOCOT	TETERCOTO	COCCOCCT	GOORDOGCOC	TCCCONTETCO	CTCCCOCTTT	GTCOOTCOOCO	Teccetcen	TCOCCCCO
HB070374-05111371733	COTCOPETT	TTOCCTO	GEEEGEGEGE	HHUHULLF	HIGITCHOP	TECOTOCOT	TETERCOTO	COCCOCCT	GOORDOGCOCCOCCOCCOCCOCCOCCOCCOCCOCCOCCOCCOCCO	TCCCONTETCO	CTCCCCCCTTTT	GTCOOTCOOCO	TOOLOTLON	TCOCCCCO
LHIDEKMELL	COTCCOCTT	TTOCCT	GEEEGEGEGE	HHUHULLF	HIGITCHOP	TCCOTCOCOT	TCTCOCOTCI	COCCOCCT	GOODECCCCCC	TCCCONTETCO	CTCCCCCCTTTT	GIGHHIGHHGH	TOOLOTLON	TCOCCCCO
046500		TTOTOTO	GEEEGEGEGE	HHUHULLF	HIGITCHUP	TCCOTCOCCT	TCTCOCOTCI	GACCOCOT	Geographic	TCCCONTCTCC	CTCCCCCTTTT	GTCOOTCOOCO	TOULUTLUM	TCOCCCTCC
018	HHIGHIII	TTOTOT	GEEEGEGEGE	HHUHUICH	HIGITHU	TCCOTCOCCT	TCTCOCOTCI	GHGCHCHI	George Contraction	TCCCONTCTCC	CTCCCCCTTTT	GIGHHIGHHGH	TUULUILUH	TCOCCCTCC
0201	HHIGHIII	TIHIGI	GULUHGHU	HHUHUIL	HIGITHU	TOUTION	TUTUHUHTU	HHULHLHI	6664666666	TUULHHILIUU	LILLLHGIIII	GIGHHIGHHGH	TUULUILUH	TUHLULIUL
HB058598-K09611	HHIGHIII	TIHIGI	GELEHGHE	HHGHGILF	HIGITHU	TOULTOUR	TUTUHUHTU	HHULHLHI	6664666666	TLULHHILIUU	LILLLHGIIII	616HH16HH6H	TUULUILUH	TUHLULIUL
IUKUNIU	HHIGHIII	TIHIGI	GULUHGHU	HHGHGILF	HIGIICHG	166H16H661	TUTUHUHTU	HHGCHCHI	666466666	TLULHHILIUU	LLLLLHGIIII	6168816886	TUULUILUH	TUHLULTUL
HF414411-Lionville-2	HHIGGHIII	TIHIGI	GELEHGHE	HHGHGICH	HIGIICHG	166H16H661	TUTUHUHTU	HHGCHCHI	GEGHEEEE	TCGCHHICIGG	LILLLHGIIII	GIGHHIGHHGH	TGGCGTCGH	TUHLULTUL
HF414413-Nontgonery-	HHIGGHIII	TIHIGIU	GUUUHGHU	HHGHGICH	HIGIICHG	166H16H661	TUTUHGHTU	HHGCHCHI	GEGHEEEE	ICGCHHICIGG	CILLUHGIIII	GIGHHIGHHGH	TGGCGTCGH	THELLECTER
HF414414-Towson-313-	HHIGGHIII	TIHIGIU	GUUUHGHU	HHGHGICH	HIGIICHG	166H16H661	TUTUHGHTU	HHGCHCHI	GEGHEEEE	ICGCHHICIGG	CILLUHGIIII	GIGHHIGHHGH	TGGCGTCGH	THELECIEC
HF414412-New-Urleans	HHIGGHIII	TIHIGIU	GUUUHGHU	HHGHGICH	HIGIICHG	IGGHIGHGGI	TUTUHGHTU	HHGCHCHI	GEGHEEEE	ICGCHHICIGG	CILLUHGIIII	GIGHHIGHHGH	TGGCGTCGH	THELECIEC
OTH-25	AHTGGACTI	TTATGI	GCCCHGH	RAGAGICA	ATGTTCAGE	TGGATGAGGT	TCTCHGATC	AAGCACAT	GGGAGGG <mark>C</mark> GF	TCGCAATCTGG	CICCCAGITTI	GTGAATGAAGA	TGGCGTCGA	TGACGCTGC
AF414415-Brattleboro	AATGGATTI	TTATGT	GCCCAGAC	RAGAGTCA	ATGTTCAGE	TGGATGAGGT	TCTCRGATCI	AAGCACAT	GGGAGGG <mark>C</mark> GF	ITCGCAATCTGG	CTCCCAGTTTT	GTGAATGAAGA	TGGCGTCGA	TGACGCTGC
MEXICO	AATGGATTT	TTATGTO	GCCCAGAC	AAGAGTCF	ATGTTCAGE	TGGATGAGGT	TCTCRGATCI	AAGCACAT	GGGAGGG <mark>C</mark> GF	ITCGCAATCTGG	CCTCCAGTTTT	GTGAATGAAGA	TGGCGTCGA	TCGCGCTGC
U1	CATGGATTI	TTACGTO	GCCCAGAC	AAGAGCCF	ATGTTCAGE	TGGATG <mark>A</mark> GGT	TCTCAGATCI	GAGCACGT	GGGAGGG <mark>C</mark> GF	ITCGCAATCTGC	CTCCCAGTTTT	GTGAATGAAGA	TGGCGTCGA	TGACGCC<mark>GC</mark>
AF414420-NLY-Honolul	CATGGATTI	TTACGTO	GCCCAGAC	CAAGAGCCF	ATGTTCAGE	TGGATG <mark>A</mark> GGT	TCTCAGATCI	GAGCACGT	GGGAGGG <mark>C</mark> GF	ITCGC <mark>A</mark> ATCT <mark>G</mark> G	CTCCCAGTTTT	GTGAATGAAGA	TGGCGTCGA	GTGACGCCGC
BD161573	CATGGATTI	CTACGTO	GCCCAGAC	CAAGAGCCF	ATGTTCAGE	TGGATG <mark>AGA</mark> T	TCTCAGATC1	GAGCACGT	GGGAGGG <mark>C</mark> GF	ITCGC <mark>A</mark> ATCT <mark>G</mark> G	CTCCCAGTTTT	GTGAATGAAGA	TGGCGTCGA	TGACGCCGC
HAMAII	CATGGACTT	TTACGTO	GCCCAGGC	CAAGAGCCO	GATGTTCAGE	TGGATG <mark>A</mark> GAT	TCTCAGACC1	GAGCACGT	GGGAGGG <mark>C</mark> GF	ITCGC <mark>a</mark> atct <mark>g</mark> g	CTCCCAGTTTT	GTGAATGAAGA	TGGCGTCGA	TGACGCCGC
AF414421-Port-Canave	CATGGATTT	TTACGTO	GCCCAGGC	CAAGAGCCF	ATGTTCAGE	TGGATG <mark>a</mark> Gat	TCTC <mark>agacc</mark> 1	GAGCACGT	'GGGAGGG <mark>C</mark> GF	ITCGC <mark>r</mark> atctgg	CTCCCAGTTTT	GTGAATGAAGA	TGGCGTCGA	TGACGCCGC
AF414419-Richmond/28	CATGGATTT	TTACGTO	GCC <mark>CAG</mark> GC	CAAGAGCCF	ATGTTCAGE	TGGATG <mark>A</mark> GAT	TCTC <mark>agacc</mark> 1	' <mark>G</mark> agcac <mark>g</mark> t	'GGGAGGG <mark>C</mark> GF	ITCGC <mark>a</mark> atct <mark>g</mark> g	CTCCCAGTTTT	GTGAATGAAGA	TGGCGTCGA	ITGACGCC <mark>GC</mark>
AF414418-Westover/30	CATGGATTI	TTACGTO	GCC <mark>CAG</mark> GC	CAAGAGCCF	ATGTTCAGE	TGGATG <mark>AGA</mark> T	TCTC <mark>A</mark> GACC1	' <mark>G</mark> agcac <mark>g</mark> t	'GGGAGGG <mark>C</mark> GF	ITCGC <mark>a</mark> atct <mark>g</mark> g	CTCCCAGTTTT	GTGAATGAAGA	TGGCGTCGA	ITGACGCC <mark>GC</mark>
AF414416-Miani/81/19	Catggatat	TTACGTO	GCC <mark>CAG</mark> GC	CAAGAGCCF	ATGTTCAGE	TGGATG <mark>A</mark> GGT	TCTC <mark>A</mark> GACC1	' <mark>Gagcacg</mark> t	'GGGAGGG <mark>C</mark> GF	ITCGC <mark>A</mark> ATCT <mark>G</mark> G	CTCCCAGTTTT	GTGAATGAAGA	TGGCGTCGA	ITGACGCC <mark>GC</mark>
SNOH-MOUNTAIN	CATGGATTI	TTACGTO	GCCCAGAC	:Aggaaccc	CATGTTCAGE	TGGATG <mark>A</mark> GAT	TCTCRGATTI	' <mark>Gagcacg</mark> t	'GGGAGGG <mark>C</mark> GF	ITCGC <mark>A</mark> ATCT <mark>G</mark> G	CTCCCAGTTTT	GTGAATGAAGA	TGGCGTCGA	ITGACGCC <mark>GC</mark>
MELKSHAM	AATGGATTT	TTACGTO	GCCCAGGC	AAGAACCC	CATGTTCAGE	TGGATG <mark>AGA</mark> T	TCTCRGATTI	GAGCACGT	GGGAGGG <mark>C</mark> GF	ITCGCRATCTTG	CTCCCAGTCTT	GTGAATGAAGA	TGGCGTCGA	TGACGCCGC
ARG320	CATGGACTT	TTACGTO	GCCTAGAC	CAAGAACCE	ATGTTCCGC	TGGATG <mark>a</mark> ggt	TCTCAGACTI	GAGCACGT	GGGAGGG <mark>C</mark> GF	ITCGC <mark>A</mark> ATCT <mark>G</mark> G	CTCCCAGCTTT	GTGAATGAAGA	TGGCGTCGA	TGACGCCAC
AB071025-05112277/20	CATGGACTT	TTACGTO	GCCTAGGC	CAAGAACCE	ATGTTCCGC	TGGATG <mark>a</mark> ggt	TCTCAGACTI	GAGCACGT	GGGAGGG <mark>C</mark> GF	ITCGC <mark>A</mark> ATCT <mark>G</mark> G	CTCCCAGCTTT	GTGAATGAAGA	TGGCGTCGA	TGACGCCAC
AF397156-NLV-MOH-99	AATGGATTT	TTACGTO	GCCAAGAC	CAAGAGCCT	TATGTTCAGE	TGGATG <mark>a</mark> Gat	TCTCTGACTI	GAGCACGT	'GGGAGGG <mark>C</mark> GF	ITCGC <mark>r</mark> atctgg	CTCCCAGTTTT	GTGAATGAAGA	TGGCGTCGA	TGACGCTAC
AF414423-White-River	AATGGATTT	TTACGTO	gccaagac	CAAGAGCCT	ratgttcage	TGGATG <mark>a</mark> Gat	TCTCTGACTI	' <mark>G</mark> agcac <mark>g</mark> t	'GGGAGGG <mark>C</mark> GF	ITCGC <mark>a</mark> atct <mark>g</mark> g	CTCCCAGTTTT	GTGAATGAAGA	TGGCGTCGA	TGACGCTAC
AF539440-Oberhausen-	AATGGATTT	TTACGT	GCCCAGAC	AAGAACCE	ATGTTTAG	TGGATGAGAT	TCTCAGATTI	GAGCACGT	GGGAGGG <mark>C</mark> GF	ITCGCAATCTGC	CTCCCAGTTTT	GTGAATGAAGA	TGGCGTCGA	TGACGCCAC
AB071035-05120458/01	AATGGATTI	TTACGT	GCCCAGAC	AAGAACC	ATGTTTAG	TGGATGAGAT	TCTCRGACT	GAGCACGT	GGGAGGG <mark>C</mark> GF	ITCGCAATCTGG	CTCCCAGTTTT	GTGAATGAAGA	TGGCGTCGA	TGACGCCAC
AF539440-Herzberg-38	AATGGATTT	TTACGT	acccagac	:AAGAACCF	ATGTTTAGE	TGGATG <mark>A</mark> GAT	TCTCRGATTI	' <mark>Gagcacg</mark> t	'GGGAGGG <mark>C</mark> GF	ITCGC <mark>A</mark> ATCT <mark>G</mark> G	CTCCCAGTTTT	GTGAATGAAGA	TGGCGTCGA	itgacgcca <mark>c</mark>
AF409067-Bad-Berlebu	AATGGATTT	TTACGT	acccagac	:AAGAACCO	ATGTTTA <mark>G</mark> C	TGGATG <mark>A</mark> GAT	TCTCAGATTI	' <mark>Gagcacg</mark> t	'GGGAGGG <mark>C</mark> GF	ITCGC <mark>A</mark> ATCT <mark>G</mark> G	CTCCCAGTTTT	GTGAATGAAGA	TGGCGTCGA	itgacgcca <mark>c</mark>
U16	TC <mark>tgga</mark> gtt	TTATGTO	GCCCAGAC	:AAGAGGCC	CATGTTTA <mark>G</mark> C	TGGATG <mark>A</mark> GAT	TCTCTGACC1	CAGCACAT	'GGGAGGG <mark>C</mark> GF	ITCGC <mark>R</mark> ATCTTG	CTCCCGAGAGT	GTGAATGAAGA	TGGCGTCGA	ITGACGCT <mark>GC</mark>
U17	TC <mark>tgga</mark> gtt	TTATGTO	GCCCAGAC	:AAGAGGCC	CATGTTTA <mark>G</mark> C	TGGATG <mark>A</mark> GAT	TCTCTGACC1	CAGCACAT	'GGGAGGG <mark>C</mark> GF	ITCGC <mark>r</mark> atcttg	CTCCCGAGAGT	GTGAATGAAGA	TGGCGTCGA	ITGACGCT <mark>GC</mark>
AF414408-Baltimore/2	TC <mark>TGGA</mark> GTT	TTATGTO	GCCCAGAC	:AAGAGGCC	CATGTTTAGE	TGGATG <mark>A</mark> GAT	TCTCTGACC1	CAGCACAT	'GGGAGGG <mark>C</mark> GF	ITCGC <mark>r</mark> atcttg	CTCCCGAAGGT	GTGAATGAAGA	TGGCGTCGA	ITGACGCT <mark>GC</mark>
AF414407-Florida/269	TCTGGAATT	TTATGTO	GCCCAGAC	:AAGAGGCC	CATGTTTAGE	TGGATG <mark>A</mark> GAT	TCTCTGACC1	CAGCACAT	'GGGAGGG <mark>C</mark> GF	ITCGC <mark>r</mark> atcttg	CTCCCGAAGGT	GTGAATGAAGA	TGGCGTCGA	ntgacgct <mark>gc</mark>
U3	TCTGGAATT	TTATGTO	GCCCAGAC	CAAGAGGCC	CATGTTTAGE	TGGATG <mark>AGA</mark> T	TCTCTGACC1	CAGCACAT	'GGGAGGG <mark>C</mark> GF	ITCGC <mark>r</mark> atcttg	CTCCCGAGGGT	GTGAATGAAGA	TGGCGTCGA	TGACGCCGC
U4	TCTGGAATT	TTATGTO	GCCCAGAC	:AAGAGGCC	CATGTTTAG	TGGATG <mark>AGA</mark> T	TCTCTGACC1	CAGCACAT	'GGGAGGG <mark>C</mark> GF	ITCGC <mark>r</mark> atcttg	CTCCCGAGGGT	GTGAATGAAGA	TGGCGTCGA	TGACGCCGC
AF414410-Miani/292/1	TCTGGAATT	TTATGTO	GCCCAGAC	CAAGAGGCC	:ATGTTTA <mark>g</mark> f	TGGATG <mark>AGA</mark> T	TCTCTGACC1	CAGCACAT	GGGAGGGTGF	ITCGC <mark>r</mark> atcttg	CTCCCGAGGGT	GTGAATGAAGA	TGGCGTCGA	ITGACGCT <mark>GC</mark>
AY038599-YA97207/199	TCTGGCGTT	TTATGTO	GCC <mark>CAGAC</mark>	:AAGAGGCC	:ATGTTTA <mark>G</mark> C	TGGATG <mark>AGA</mark> T	TCTCTGACC1	CAGCACAT	'GGGAGGG <mark>C</mark> GF	ITCGC <mark>R</mark> ATCTTG	CTCCCGAGGGT	GTGAATGAAGA	TGGCGTCGA	TGACGCAGC
AF414409-Gwynedd/273	TCTGGAATT	TTATGTO	GCC <mark>CAGAC</mark>	:AAGAGGCC	CATGTTCAG	TGGATG <mark>AGA</mark> T	TCTCTGACC1	CAGCACAT	'GGGAGGG <mark>C</mark> GF	ITCGC <mark>r</mark> atcttg	CTCCCGAAGGT	GTGAATGAAGA	TGGCGTCGA	atgacgca <mark>gc</mark>
025	TCTGGAGTT	TTA <mark>c</mark> gt(GCC <mark>CAGAC</mark>	:AGGAGGCC	:ATGTTCAGF	TGGATG <mark>AGA</mark> T	TTTCAGACC1	CAGCAC <mark>G</mark> T	'GGGAGGG <mark>C</mark> GF	ITCGCAATCTGG	CTCCCGAGAAT	GTGAATGAAGA	TGGCGTCGA	TGACGCAGC
AF414426-Fort-Lauder	GCATGAGTT	TTATGT	<mark>gccaa</mark> agt	TTGAGTCC	Catgta <mark>caa</mark> g	TGGATGCGGT	TCTCAGATTI	GAGCACTT	GGGAGGGGGF	TCGCGATCTCG	CTCCCGATTTT	GTGAATGAAGA	TGGCGTCGA	itgacgct <mark>gc</mark>
Consensus	at oGAL TT	TTACGT	GCCcAgar	aaGAg Ca	ATGTE cAge	TEGATE	TETE aGAL e1	ABCACaT	99-99998999	TEGEARTET	CTCCC age t t t	атсаатсааса	APUT PUBLE	TGACGC or

Figure 8: Alignement des 54 séquences de NoV GII. (nucléotides4980 à 5010, souche Camberwell AF145896)

La couleur rouge représente 100 % d'homologie, la bleue 90 % et la noire 75 %.

A partir de la séquence consensus, les amorces COG2R, QNIF2 et la sonde QNIFS ont été définies à l'aide du logiciel Primer Express. L'amorce antisens COG2R, localisée entre les nucléotides 100 et 119 sur la séquence consensus dans une région conservée à 100 % est identique à l'amorce inverse définie par Kageyama et al. (2003). QNIF2 (nucléotides 32 à 58) a été dégénérée pour obtenir 81 % d'homologie avec les 54 séquences alignées. La sonde QNIFS (nucléotide 62 à 82) a été définie à seulement 4 nucléotides de QNIF2 pour obtenir une bonne sensibilité de détection.

3- Comparaison de kits de RT-PR en temps réel une étape

L'efficacité de trois kits d'amplification (Applied Biosystems, Eurogentec et Invitrogen) a été testée sur une gamme de dilution de 10^{-3} à 10^{-7} des selles S35 et SJV (tableau 12).

Tableau 12 : Comparaison de l'efficacité d'amplification de kits de RT-PCR une étape en temps réel

	Selle	Dilution	Ct
Applied Biosystems	S35	<10 ⁻³	-
	SJV	<10-3	-
Eurogentec	S35	10 ⁻⁵	40
	SJV	10 ⁻³	37
Invitrogen	S35	10 ⁻⁶	39
	SJV	10 ⁻³	36

Le kit Applied ne permettant pas d'obtenir une bonne sensibilité a été rapidement écarté. Le kit Invitrogen a donné de meilleurs résultats pour S35. Pour SJV, les 2 kits ont permis d'atteindre les mêmes seuils de sensibilité. Le kit Eurogentec étant en fait un kit de PCR une étape auquel nous avons ajouté l'étape de RT, notre choix s'est orienté vers le kit Invitrogen. De plus, ce dernier permet de prendre en compte dans l'analyse des résultats la référence passive Rox, permettant de normaliser le signal de fluorescence.

4- Optimisation du kit Invitrogen

Afin d'optimiser les conditions d'utilisation du kit, nous avons testé une gamme de concentrations de 100 à 500 nM en amorces COG2R et QNIF2, la concentration en sonde QNIFS restant fixe à 200 nM. Les tests ont été faits sur l'ARN extrait de S35 et dilué au dixième (tableau 13).

	[QNIF1]	100	200	300	400	500
[QNIF2]						
100		24	24	25	28	28
200		24	24	27	34	35
300		29	30	35	38	35
400		36	36	nd	nd	nd
500		nd	nd	nd	nd	nd

Tableau 13 : Effet de la concentration en amorces COG2R et QNIF2.

Les valeurs des Ct sont indiquées en fonction des concentrations (en μ M) des amorces COG2R et QNIF2.

Les meilleurs résultats (Ct les plus faibles) ont été obtenus avec des concentrations de 100 et 200 nM. Nous avons choisi la concentration de 200 nM puisque celle-ci nous a permis d'observer les valeurs de fluorescence les plus élevées.

Nous avons ensuite testé des concentrations en QNIFS de 100 à 500 nM ; des valeurs de Ct identiques ont été obtenues pour les concentrations de 100 et 200 nM, les valeurs de Ct augmentant pour des concentrations supérieures. Compte tenu de l'allure des courbes obtenues, une concentration de 200 nM a été choisie.

L'effet des variations de concentration en $MgSO_4$ de 3 à 6 mM a également été étudié. Nous avons observé une augmentation des valeurs de Ct avec l'augmentation de la concentration en $MgSO_4$. La concentration de 3 mM a donc été retenue.

5- Comparaison de sensibilité des amorces

La méthode de RT-PCR classique a été utilisée pour titrer les ARN des selles SNV (GI) et S35 (GII) avec les amorces de polymérase P110/P69 (GI) et P110/NI (GII). Une unité RT-PCR (U RT-PCR) a été attribuée à la dernière dilution donnant un signal positif. Ce titre a été comparé avec celui obtenu en utilisant les amorces et la sonde de RT-PCR en temps réel (tableau 14).

Selle	Amorces	RT-PCR deux étapes	RT-PCR une étape	RT-PCR temps réel (Ct)
SNV				
	P110/P69 COGIR/COGIF	1 10	1 1	- 1 (40)
S35				
	P110/NI QNIF1/QNIF2d	1 10	10 1	1 (43)

Tableau 14 : Validation de la RT-PCR en temps réel sur des extraits de selles.

Les résultats sont exprimés en U RT-PCR.

Pour la même dilution de SNV, souche référence du GI, et en utilisant la méthode de détection classique par RT-PCR plus hybridation, les amorces temps réel sont dix fois moins sensibles (10 U RT-PCR) que les amorces P110/P69. Par contre, en utilisant une amplification en une étape, la même sensibilité (1 U RT-PCR) a été atteinte avec les 2 couples d'amorces démontrant la pertinence des amorces COGIR/COGIF.

Concernant la souche de référence S35 (GII), les mêmes résultats ont été observés : les amorces temps réel ont été dix fois moins sensibles par détection classique, mais la même limite de détection de 1 U RT-PCR a été atteinte par RT-PCR une étape.

Ces résultats ont donc validé notre méthode de RT-PCR temps réel sur des acides nucléiques extraits de selles GI et GII.

6- Linéarité, efficacité d'amplification et spécificité de l'essai de RT-PCR en temps réel

Des séries de dilutions des ARN extraits de SNV et S35 ont été amplifiés en triple et en même temps. Les courbes de titration (figure 9) ont été linéaires sur 5 et 6 log respectivement pour les essais de RT-PCR en temps réel GI et GII ; les pentes et coefficients de régression indiquant une bonne efficacité d'amplification. Comme le montre la figure 9, le titre de S35 était 10 fois supérieur à celui de SNV, les deux détectant une unité RT-PCR. Tous les essais ont été négatifs pour 0,1 U RT-PCR.



Figure 9 : Analyse de l'efficacité et de la linéarité des essais de RT-PCR en temps réel

La spécificité de la RT-PCR en temps réel a été évaluée en testant des ARN d'autres virus entériques humains et de bactéries susceptibles de contaminer les coquillages. Aucune amplification croisée n'a été observée. Pour confirmer la taille des produits de PCR obtenus, une électrophorèse sur gel d'acrylamide a été réalisée (figure 10).





Une bande unique à 89 pb a été observée démontrant la taille correcte du fragment amplifié, la spécificité étant confirmée lors de l'hybridation de la sonde durant la RT-PCR en temps réel. L'absence de bande parasite et de traînée sur le gel confirme la bonne efficacité de l'amplification.

7- Validation des méthodes RT-PCR en temps réel NoV GI et GII sur des huîtres artificiellement contaminées

Les glandes digestives d'huîtres ont été contaminées avec différentes concentrations de SNV et S35, extraites puis analysées par les différentes méthodes de détection (détection classique par RT-PCR plus hybridation, RT-PCR une étape plus hybridation, RT-PCR en temps réel). En prenant en compte le volume d'acide nucléique analysé et le nombre d'huîtres utilisées pour faire 1, 5 g d'organes digestifs, les résultats ont été exprimés en U RT-PCR par huître (tableau 15).

Tableau 15 : Sensibilité de la RT-PCR en deux étapes, RT-PCR une étape plus hybridation etde la RT-PCR en temps réel pour détecter les huîtres artificiellement contaminées.

Génogroupe	Format de détection	Huîtres artificiellement contaminées (U RT-PCR / huîtres)					
		7 000	700	70	7		
GI	RT-PCR 2 étapes+ hyb	3/3	3/3	2/3	0/3		
	RT-PCR une étape+ hyb	3/3	3/3	3/3	0/3		
	RT-PCR temps réel	3/3	3/3	3/3	0/3		
GII	RT-PCR 2 étapes + hyb	3/3	3/3	3/3	0/3		
	RT-PCR une étape + hyb	3/3	3/3	2/3	0/3		
	RT-PCR temps réel	3/3	3/3	3/3	2/3		

Pour le GI, des limites de détection identiques (70 U RT-PCR / huître) ont été observées indépendamment du format de détection utilisé. Pour le GII, la RT-PCR en temps réel a permis d'atteindre une sensibilité de 7 U RT-PCR / huître, dix fois supérieure à celle observée pour les 2 autres formats de détection.

8- Validation de la RT-PCR en temps réel sur des eaux de station d'épuration

Les méthodes de RT-PCR plus hybridation et de RT-PCR en temps réel ont été comparées sur 12 extraits d'eau de station d'épuration (tableau 16). Aucun échantillon n'ayant été détecté en GI, seuls les résultas GII sont présentés.

Tableau 16 : Validation de la RT-PCR en temps réel sur des eaux de station d'épurationprélevées d'avril 2002 à avril 2003.

	RT-PCR + hyb.	RT-PCR en temps réel (Ct)
avr. 02	-	nd
mai 02	-	nd
juin 02	-	nd
juil. 02	-	nd
août 02	-	nd
sept. 02	-	nd
oct. 02	+	27
nov. 02	+	26
déc. 02	+	23
janv. 03	+	26
fév. 03	+	22
mars 03	+	24
avr. 03	+	22

Tous les échantillons trouvés positifs par détection classique l'ont également été par RT-PCR en temps réel validant notre essai GII sur des échantillons de l'environnement. Par détection classique, des signaux ont été observés sur gel après électrophorèse, signe d'un niveau de contamination relativement élevé. Les valeurs des Ct obtenus par RT-PCR en temps réel ont confirmé cette observation.

9- Efficacité de la RT-PCR en temps réel sur des coquillages naturellement contaminés

Des extraits de coquillages (150) préalablement testés pour leur contamination en NoVs GI et GII par la méthode classique ont été analysés par RT-PCR en temps réel. La RT-PCR en temps réel a permis de détecter 61 échantillons positifs en NoVs (GI et GII), comparés à 53

échantillons positifs par détection classique. Parmi les échantillons positifs, les valeurs des Ct ont varié de 30 à 41. L'allure des courbes obtenues pour 15 de ces échantillons positifs (figure 11) a montré que la plupart des échantillons ont été détectés entre les cycles 37 et 41.



Figure 11 : Courbes d'amplification de 15 échantillons d'huîtres naturellement contaminées amplifiées par RT-PCR en temps réel NoVs GII.

Une inhibition a été observée pour 27 % des échantillons positifs, ces derniers n'étant positifs qu'après une dilution au dixième ou possédant une valeur de Ct pour l'ARN dilué inférieure à celle de l'acide nucléique pur.

L'essai de RT-PCR en temps réel défini pour détecter les NoVs GI n'a permis de détecter qu'un échantillon comparé à 7 par détection classique (tableau 17). Par contre l'essai de RT-PCR en temps défini pour détecter les NoVs GII a permis de détecter 60 échantillons alors que seulement 46 ont été détectés par méthode classique (tableau 17).

	Détection classique	RT-PCR en temps réel					
		Positive	Négatif	Total	P value*		
GI	Positive	1	6	7			
	Négatif	0	143	143			
	Total	1	149	150	< 0.05		
G II	Positive	46	0	46			
	Négatif	14	90	104			
	Total	60	90	150	< 0.001		

Tableau 17: Coquillages naturellement contaminés analysés par RT-PCR deux étapes ethybridation et par RT-PCR en temps réel pour les NoVs génogroupes I et génogroupes II

* test du Chi-deux

La reproductibilité des essais a été évaluée en testant 90 % des échantillons au moins deux fois et à différents jours. La variabilité des valeurs de Ct obtenues pour les intra et inter amplifications n'a pas dépassé 5 %, prouvant ainsi que les amplifications sont reproductibles.

Nous avons également testé ces 150 ARN extraits de coquillages naturellement contaminés en utilisant l'essai de RT-PCR en temps réel décrit par l'équipe japonaise pour la détection des NoV GII (Kageyama et al., 2003, Nishida et al., 2003). Par cette technique, seulement 14 échantillons sur les 60 échantillons trouvés positifs avec notre essai ont pu être détectés sans résultat discordant entre les 2 essais.

B- Apport des Virus-like particles (VLPs)

I. Mises au point méthodologiques

1- Western blot (WB)

La méthode de WB n'étant pas utilisée au laboratoire, des mises au point ont été nécessaires. Les différents essais ont été réalisés sur des VLPs 2/6 à une concentration de 10^{12} particules /ml (p/ml).

Dans un premier temps, nous avons testé deux types d'appareil de transfert : un transfert en milieu semi-liquide et un transfert liquide. Après transfert en milieu semi-liquide, aucune coloration n'est apparue après incubation du gel dans le bleu de Comassie contrairement au transfert en milieu liquide. L'appareil de transfert en milieu liquide Mini Trans-blot (Biorad) a donc été choisi.

Les deux types de révélation les plus couramment utilisés (colorimétrie ou chemiluminescence) ont été comparés. Des différences ont été observées entre les 2 méthodes de révélation. Les bandes correspondant aux différentes protéines (VP6 et VP2) ont été plus intenses après révélation par chemiluminescence. La netteté de l'image n'étant pas satisfaisante, nous avons augmenté le temps d'exposition des membranes au substrat Lumi-Light^{Plus} de 10 à 30 min de manière à obtenir une image correcte.

Nous avons ensuite comparé deux types d'anticorps primaire : un sérum de lapin antirotavirus 8148 et un mélange d'anticorps monoclonaux de souris anti-VP6 1026 et anti-VP2 164F22 sur une gamme de dilution au dixième de 10^{12} à 10^5 p/ml de VLPs 2/6. En utilisant le sérum, la bande correspondant à VP2 n'a plus été visible au-delà de 10^{10} p/ml alors que la bande VP6 était encore très intense. Une limite de 10^6 p/ml a par contre été obtenue en utilisant le mélange d'anticorps monoclonaux de souris anti-VP6 1026 et anti-VP2 164F22, les 2 bandes correspondant à VP6 et VP2 étant bien visibles (figure 12)



Figure 12 : Evaluation de la sensibilité de détection par Western-blot.

Western-blot révélé par chemiluminescence avec le mélange d'anticorps monoclonaux de souris anti-VP6 1026 et anti-VP2 164F22 sur une gamme de dilution au dixième de 10^{12} à 10^5 p/ml de VLPs 2/6.

2- Elisa RV et VLPs 2/6

Trois méthodes d'Elisa (direct, sandwich simple et double sandwich) ont été comparées afin d'obtenir une méthode sensible de quantification des particules. Les limites de détection obtenues (exprimées en p/ml) ont été comparées (tableau 18).

Tableau 18 : Comparaison des 3 technic	ques Elisa testées
--	--------------------

	ELISA DIRECT			ELISA SIMPLE SANDWICH		ELISA DOUBLE SANDWICH		
coating	VLPs			1026 (souris)	8148 (lapin)	1026 (souris)	81 (lap	48 pin)
premier anticorps	8148	remi-2	1026	remi-2 peroxydase		8148	remi-2	1026
second anticorps	anti-IgG lapin AP [*]	anti-l sour peroxy	lgG ris vdase			anti-IgG lapin AP	anti-IgG souris peroxydase	
pNPP	10 ⁷					10^{6}		
OPD		10^{10}	10^{9}	10^{7}	10^{5} - 10^{4}		$10^7 - 10^6$	10^{6}
TMB		10^{9}	10^{8}	$10^{5} - 10^{4}$	10 ⁴		10^{6}	$10^7 - 10^6$

* AP : alcaline phosphatase

D'après ces résultats, nous avons choisi la méthode d'Elisa simple sandwich avec des microplaques recouvertes avec le sérum 8148, fixation des VLPs, puis de l'anticorps remi-2

marqué à la péroxydase et une révélation avec le substrat TMB. Cette technique a permis de détecter 10⁴ VLPs / ml.

3- Concentration des échantillons d'eau de mer

Quatre méthodes de concentration ont été comparées en estimant, par quantification par la méthode Elisa, le pourcentage de VLPs 2/6 concentrées :

- la méthode de concentration par lyophilisation a rapidement été abandonnée puisque le lyophilisat n'a pu être mis en suspension de manière correcte pour être testé en Elisa.
- les méthodes d'ultracentrifugation et de PEG/NaCl, environ 10 % seulement des particules ont été concentrées.
- la méthode de concentration par filtration avec le système centricon a permis de récupérer
 50 % des particules.

De plus, la technique de filtration permet de concentrer des particules dont la masse moléculaire est supérieure à 100 kDa donc a priori des VLPs 2/6 entières. La méthode de filtration a donc été retenue.

II. Etude de la stabilité des VLPs en eau de mer naturelle

- 1- Comparaison de la stabilité du RV et de VLPs 2/6
 - a- Stabilité du RV et des VLPs 2/6 mesurée par Elisa

Une eau de mer naturelle a été inoculée avec 10^8 p/ml de rotavirus bovin RF ou de VLPs 2/6. Pour les 4 expériences, les particules ont été concentrées de la même façon par filtration, puis détectées par Elisa sandwich simple. Les moyennes géométriques calculées pour chaque prélèvement ont montré une réduction du titre initial d'environ 3 unités logarithmiques après incubation 6 jours à 25°C pour les RV et les VLPSs 2/6 (figure 13).



Figure 13 : Comparaison de la survie des particules de rotavirus et de VLPs 2/6 en eau de mer à 25°C pendant 6 jours.

Après analyse des droites de régression, les taux de décroissance pour les RV et les VLPs 2/6 ont été trouvées similaires [- 0,47 (CI à 95 % de - 0,54 à - 0,41) et -0,52 (CI à 95 % de - 0,63 à - 0,41) respectivement] en utilisant un modèle à un seul compartiment.

b- Analyse des protéines

Après concentration des échantillons d'eau de mer, les particules de RV et de VLPs 2/6 ont été analysées par SDS-PAGE suivi du western-blot pour confirmer la présence des 2 protéines VP2 et VP6. Les deux protéines ont été observées sur la membrane pour les deux types de particules jusqu'au quatrième jour avec une diminution de l'intensité des bandes chaque jour. La concentration relative des rotavirus et des VLPs 2/6 a été estimée d'après l'intensité des bandes correspondant à des concentrations connues de contrôle positif. Une concentration d'environ 10⁸ p/ml a été trouvé à J0 et J1 pour les RV et les VLPs 2/6. Les résultats obtenus pour les particules de rotavirus et les VLPs après 2 et 4 jours d'incubation en eau de mer à 25°C sont présentés figure 14.



Figure 14 : Analyse des protéines de rotavirus infectieux et des VLPs 2/6 par western-blot. **A**: protéines VP2 et VP6 présentes dans les particules de rotavirus au deuxième jour J2 (2) et quatrième jour J4 (1). Contrôles positifs: 10^6 p/ml (3) et 10^8 p/ml (4). **B**: protéines VP2 et VP6 présentes dans les particules de VLPs 2/6 à J2 (6) et J4 (5). Contrôles positifs: 10^6 p/ml (7) et 10^7 p/ml (8).

Les concentrations estimées pour les particules de rotavirus et de VLPs 2/6 ont été d'environ 10^7 p/ml à J2. Après quatre jours (J4), la concentration en RV a été évaluée à 10^6 p/ml et celle en VLPs 2/6 entre 10^6 et 10^5 p/ml compte tenu du faible signal observé sur la membrane. En six jours (J6), les concentrations ont été inférieures à la limite de détection de 10^6 p/ml. Ces résultats de concentrations relatives ont été similaires à ceux obtenus par Elisa.

2- Comparaison de la stabilité du RV, des VLPs 2/6 et des pseudovirus

Quatre expériences de contamination d'eau de mer naturelle, inoculée avec 10⁸ p/ml de rotavirus bovin RF, de VLPs 2/6 ou de PS, ont été réalisées. Les échantillons concentrés ont été analysés par Elisa et WB. La RT-PCR en temps réel a été également utilisée pour détecter les PS.

a- Stabilité des particules par Elisa

Les droites de régression linéaires ont été tracées à partir des valeurs des moyennes géométriques obtenues sur les 4 expériences (figure 15).



Figure 15 : Comparaison des décroissances des particules RV, VLPs 2/6 et PS incubées à 25°C pendant 6 jours.

Pour les RV et les VLPs 2/6, la même décroissance d'environ 2 unités log_{10} a été observée confirmant les résultats précédents. Par contre, une décroissance plus rapide d'environ 4 unités log_{10} a été obtenue pour les PS. Une analyse des régressions linéaires a été réalisée pour voir si les décroissances étaient significativement différentes (tableau 19). Une différence significative a été observée entre les particules de RV et les PS. Bien que la décroissance obtenue pour les PS soit en limite de l'intervalle de confiance à 95 % observé pour les VLPs 2/6, la différence de décroissance entre les deux types de particules n'a pas été significative.

Tableau 19 : Analyse des régressions linéaires de la décroissance du RV, des VLPs 2/6 et desPS à 25°C en eau de mer.

	RV	VLPs 2/6	PS
Pente	-0,3405	-0,349	-0,536
CI à 95 %	(-0,467, -0,21)	(-0,574, -0,124)	(-0,87, -0,202)

b- Analyse des protéines

Pour les RV et VLPs 2/6, comme précédemment, les deux protéines VP2 et VP6 ont été observées sur la membrane jusqu'au quatrième jour, avec une diminution de l'intensité des bandes chaque jour. Concernant les pseudovirus, les bandes correspondant à VP2 et VP6 ont été observées en début d'expérimentation (J0, J1) et très faiblement le deuxième jour (J2) (figure 16) confirmant ainsi les résultats obtenus par Elisa (quantification en moyenne à 3 10^7 , 3 10^6 et 3 10^5 respectivement à J0, J1 et J2). Après deux jours (J2), aucune bande n'a été observée sur membrane, laissant supposer que la concentration des particules PS était inférieure à la limite de détection du WB (10^6 p/ml).



Figure 16 : Analyse des protéines des pseudovirus par western-blot

c- Analyse des PS par RT-PCR en temps réel

Après concentration des prélèvements d'eau de mer inoculée avec les pseudovirus et extraction des acides nucléiques par ébullition, l'ARN a été quantifié par RT-PCR en temps réel. Sachant que le nombre de copies d'ARN contenu dans une particule de PS a été estimé à 50 par quantification en temps réel, nous avons déduit du nombre de copies donné par l'amplification le nombre de particules contenues dans les prélèvements (figure 17).



Figure 17 : Analyse par RT-PCR en temps réel de la décroissance des PS en eau de mer à 25°C.

Une décroissance d'environ 1,5 unités \log_{10} a été observée contrairement au 4 unités \log_{10} obtenues par quantification par Elisa. Pour vérifier si l'ARN détecté par RT-PCR en temps réel correspondait à de l'ARN libre ou attaché à VP2, nous avons fait une nouvelle incubation à 25°C d'eau de mer inoculée avec 10^8 p/ml de PS et 10^5 copies/ml d'ARN ayant servi à la construction des pseudovirus. Après concentration des échantillons, les PS ont été quantifiés par Elisa et par RT-PCR en temps réel, l'ARN par RT-PCR en temps réel (figure 18). Les mêmes résultats que ceux obtenus précédemment, à savoir une différence de décroissance significative, ont été observés entre la quantification par Elisa et celle par RT-PCR en temps réel. Une décroissance de plus de 4 unités \log_{10} a été obtenue pour l'ARN libre. D'après l'analyse des régressions linéaires, cette décroissance est significativement différente de celle observée pour les PS laissant donc penser que l'ARN détecté par quantification des pseudovirus par RT-PCR en temps réel n'est pas libre.



Figure 18 : Comparaison de la décroissance des PS (RT-PCR en temps réel et Elisa) et de l'ARN libre (RT-PCR en temps réel) en eau de mer à 25°C.

- 3- Comparaison de la stabilité du virus de Norwalk et des VLPs NV
 - a- Stabilité du NV et des VLPs NV mesurée par Elisa

Une eau de mer naturelle a été inoculée avec 10^8 p/ml de virus de Norwalk ou de VLPs NV. Pour les 4 expériences, les particules ont été concentrées de la même façon par filtration puis analysées par Elisa double sandwich. Les moyennes géométriques calculées pour chaque prélèvement ont montré une réduction du titre initial d'environ 2 unités logarithmiques après incubation 6 jours à 25°C pour les NV et les VLPs NV (figure 19). Après analyse des droites de régression, les taux de décroissance pour les NV et les VLPs NV ont été trouvés similaires [- 0,324 (CI à 95 % de - 0,48 à - 0,17) et - 0,374 (CI à 95 % de - 0,48 à - 0,27) respectivement].



Figure 19 : Comparaison de la stabilité des particules de rotavirus et de VLPs 2/6 en eau de mer à 25°C pendant 6 jours.

b- Analyse des protéines

Après concentration des échantillons d'eau de mer, les particules de NV et de VLPs NV ont été analysées par western-blot. Seule la protéine VP1 est visible sur gel, VP2 étant présente en trop faible quantité. La seconde bande observée correspond à un produit de dégradation. La protéine VP1 a été observée sur la membrane pour les deux types de particules jusqu'au sixième jour (J6) avec une diminution de l'intensité des bandes chaque jour (figure 20).



Figure 20 : Analyse des protéines de NV (A) et des VLPs NV (B) par western-blot.

III. Etude de la purification des huîtres

1- Purification des huîtres artificiellement contaminées avec du RV bovin

Après 96 h de contamination, les huîtres ont été mises en purification à 22 °C dans le pilote. Après concentration virale et extraction, les acides nucléiques ont été amplifiés par RT-PCR. Deux expériences de contamination suivies de 11 jours de purification ont été réalisées. Lors du premier essai de purification, les RV ont pu être détectés jusqu'au neuvième jour de purification. Un signal positif a été obtenu jusqu'au onzième jour de purification lors de la seconde expérience.

2- Purification des huîtres après bio-accumulation de VLPs 2/6

Les huîtres ont été artificiellement contaminées avec 3 concentrations différentes de VLPs 2/6 (expérience A: 5.10¹² particules; expérience B: 5.10¹⁰ particules, expérience C: 5.10^6 particules) pendant 24 h puis mises en purification dans le pilote pendant 7 jours à 22°C. Les VLPs ont été concentrés par PEG, puis analysées par Elisa. Après 24 h de contamination, et ce quel que soit le nombre de VPLs 2/6 inoculés dans l'eau de mer, toutes les particules ont été retrouvées dans les huîtres. La contamination des huîtres a donc été d'environ 10^{12} , 10^{10} et 10⁶ particules / huître respectivement pour les expériences A, B et C. Comme démontré par les valeurs des moyennes géométriques calculées pour chaque prélèvement, le titre initial de 10¹² particules/ huître en début d'expérimentation (J0) (expérience A) a été réduit d'environ 1,5 unités log₁₀ après 7 jours de purification 22°C; la décroissance observée pour les expériences B et C étant d'une unité log₁₀ (figure 16). Les taux de décroissance des expériences B et C ont été similaires et le taux de décroissance de l'expérience B légèrement supérieur à la limite de l'intervalle de confiance à 95 % de l'expérience A comme le démontre l'analyse de régression linéaire (- 0.235 [CI à 95 % de - 0.317 à - 0.154], - 0.147 [CI à 95 % de - 0.236 à - 0.06] et - 0.161 [CI à 95 % de - 0.240 à - 0.08], respectivement pour expérience A, B et C).



Figure 21 : Cinétiques de purification des huîtres contaminées avec lesVLP2/6 dans le pilote à 22°C pendant 7 jours.

3- Purification naturelle des huîtres sur l'estran sous influence des marées

Pour les expériences A, B et C, les 7 jours dans une eau à 22°C dans le pilote n'ont pas permis de purifier les huîtres artificiellement contaminées en VLPs 2/6. Comme les VLPs ne sont pas des particules pathogènes, nous avons mis ces huîtres sur l'estran devant l'établissement conchylicole pour une purification naturelle sous influence des marées. Les huîtres ont été prélevées régulièrement puis analysées par Elisa jusqu'à obtention d'un résultat négatif (< 10^4 particules / huître). La variation de la température de l'eau de mer (de juillet à septembre 2003) a été de 17 à 22°C. Pour comparer les décroissances indépendamment du niveau de contamination en VLPs 2/6, la valeur de N/N₀ (où N est le nombre de particules / huître à un temps t et N₀ le nombre de particules / huître après les 7 jours de purification dans le pilote) a été calculée et les droites de régression tracées pour chaque expérience (figure 22). Pour les expériences A et B, les pentes des droites de régression ont été du même ordre (- 0,069 et - 0,060 respectivement) comparées à celle de l'expérience C (- 0,031). Pour l'expérience A, 89
jours ont été nécessaires pour obtenir un résultat négatif par Elisa ; 77 et 44 jours ayant été nécessaires pour atteindre cette limite de détection respectivement pour les expériences B et C.



Figure 22 : Cinétiques de purification naturelle des huîtres artificiellement contaminées.

L'analyse de régression linéaire à un niveau de confiance de 95 %, montre une différence significative entre les valeurs obtenues pour l'expérience C comparées aux valeurs des expériences A et B.

4- Purification des huîtres après bi-contamination phages et VLPs 2/6

Les huîtres ont été artificiellement contaminées dans le pilote avec 10^9 PFU/ml de phages MS2 et 5 10^6 particules de VLPs 2/6. Après 24 h, le niveau de contamination obtenu pour les phages (2,6 10^3 PFU/ huître) a été inférieur à celui obtenu pour les VLPs 2/6 dans les huîtres (10^6 particules / huître). Pour comparer les décroissances indépendamment du niveau de contamination initiale, les valeurs de N/N₀ ont été calculées pour chaque prélèvement. Comme démontré par les valeurs des moyennes géométriques calculées, après 7 jours à 22°C, une réduction d'environ 0,4 unités \log_{10} a été observée pour les phages alors que le niveau de contamination en VLPs 2/6 n'a été réduit que de 0,15 unité \log_{10} (figure 23). Après analyse

statistique, une différence significative a été observée entre les taux de décroissance des phages et des VLPs 2/6.



Figure 23 : Cinétiques de purification des huîtres contaminées en phages MS2 et VLPs 2/6 dans le pilote à 22°C pendant 7 jours.

5- Purification des huîtres artificiellement contaminées en VLPs NV

Après 24 h de contamination avec 10^8 particules de VLPs NV, les huîtres ont été placées en purification dans le pilote à 22°C. L'analyse par Elisa détecte 10^6 particules / huître et aucune VLP NV dès le 1^{er} jour (J1), bien que les contrôles Elisa soient positifs. Des expériences de bio-accumulation à l'échelle du laboratoire ont été réalisées en testant des contaminations en VLPs de 5 10^8 , 10^9 et 10^{12} particules. Après analyse par Elisa, aucune concentration supérieure à 10^6 particules / huîtres n'a pu être mise en évidence. La vérification de l'absence de particules dans l'eau de mer ayant servie à la contamination, a confirmé que les huîtres avaient bien filtré. Ces résultats paraissant surprenants, nous avons réalisé une détection par immunohistochimie sur les coupes des glandes digestives. Par cette technique, des VLPs ont été visualisées. Cette méthode ayant une sensibilité de détection supérieure à 10^6 particules / huître, ceci suggère un problème de détection par la méthode Elisa ou de concentration des particules.

Pour éliminer cette hypothèse, nous avons testé une précipitation PEG d'une nuit au lieu de 1 h. Cet essai n'a pas permis d'améliorer la détection des VLPs par Elisa. D'autres essais sont en cours pour identifier le problème méthodologique qui doit exister au niveau du test Elisa.

IV. Etude de la fixation des VLPs NV et du NV sur les tissus d'huîtres

1- Fixation des VLPs NV sur coupes de glandes digestives

Après fixation des VLPs NV dilué au 1/4 000^{ème}, les coupes ont été révélées par immunohistochimie. Une fixation sur des tissus spécifiques des glandes digestives a été obtenue (figure 24).



Figure 24 : Fixation des VLPs NV sur les glandes digestives d'huîtres.

A : contrôle négatif sans VLPs NV. B : VLPs NV fixées sur les diverticules et tubules digestifs C : VLPs NV fixées sur les cellules intestinales

Aucune coloration brune-rosée n'a été observée sur les contrôles négatifs (figure 24 A). Aucune fixation n'a été notée sur le tissu conjonctif. Une fixation des VLPs NV a été observée sur les diverticules et les tubules digestifs (figure 24 B) ainsi que sur les cellules intestinales (figure 24 C). Une fixation a également été obtenue sur les cellules de l'estomac quand celui-ci était visible. Nous avons pu également constater une fixation des VLPs NV sur les palpes labiaux lorsque ceux-ci ont été prélevés lors de certaines dissections des glandes digestives.

- 2- Identification de la structure de fixation des VLPs NV sur coupes de glandes digestives
 - a- Inhibition par le périodate de sodium

Les coupes de glandes digestives ont été traitées par le périodate de sodium avant la fixation des VLPs NV. Les lames ont ensuite été révélées par immunohistochimie (figure 25).



Figure 25 : Effet du traitement au périodate de sodium sur la fixation des VLPs NV sur coupes de glandes digestives.

A : sans traitement. B : avec traitement.

Une inhibition partielle de la fixation des VLPs NV a été obtenue après traitement au périodate de sodium. Le périodate de sodium permettant d'ouvrir les cycles osidiques, ces résultats pourraient supposer une fixation des VLPs NV sur des sucres.

b- Inhibition par le lait maternel

L'effet de deux laits maternels, l'un provenant d'une mère sécrétrice et l'autre d'une mère non sécrétrice, a été testé sur la fixation des VLPs NV sur les coupes de glandes digestives. Une inhibition partielle a été observée après traitement avec un lait de mère sécrétrice (figure 26 B et D). Le lait de mère non sécrétrice n'a eu aucun effet sur la fixation des VLPs NV (figure 26 A et C).



Figure 26 : Effet de lait maternel de mère non sécrétrice (A, C) et de mère sécrétrice (B, D) sur la fixation des VLPs NV sur les glandes digestives.

c- Inhibition par la salive

Avant fixation sur les coupes de tissus, les VLPs NV ont été incubées avec des salives d'individus de phénotype sécréteur (17 salives d'individus de phénotype O, 17 salives d'individus de phénotype A et une salive d'individu de phénotype B) ou de phénotype non sécréteur (5 salives). L'effet inhibiteur de ces salives a été testé par révélation immunohistologique. Par rapport au contrôle positif sans incubation avec la salive (figure 27 A), l'incubation avec les 5 salives d'individus de phénotype non sécréteur n'a pas eu d'effet sur la fixation des VLPs (figure 27 B). Au contraire, un effet inhibiteur quasi-total de la fixation a été observé après incubation des VLPs NV avec les salives d'individus de

phénotype sécréteur (figure 27 C et D). L'inhibition de la fixation avec la salive d'individu de phénotype B n'a été que partielle.



Figure 27 : Effet de salives d'individu de phénotype non sécréteur et sécréteur sur la fixation des VLPs NV sur les glandes digestives.

A : contrôle positif ; B : salive d'individu de phénotype non sécréteur ; C : salive d'individu de phénotype A sécréteur ; D : salive d'individu de phénotype O sécréteur.

3- Comparaison de la fixation du NV et des VLPs NV après bio-accumulation dans les huîtres

Après bio-accumulation du NV (5 10⁸ particules) ou de VLPs NV (10¹² ou 10⁹ particules) dans les huîtres pendant 12 ou 24 h, les glandes digestives ont été prélevées puis les inclusions réalisées. Les coupes ont ensuite été révélées par immunohistochimie. Après 12 h de bio-accumulation, les NV ont été retrouvés dans les conduits et tubules digestifs mais aussi dans les cellules circulantes dans le tissu conjonctif tels que les hémocytes, les macrophages et les sinus veineux (figure 28 A). Après 24 h de bio-accumulation, les NV ont

été beaucoup plus visibles dans les cellules circulantes que dans les tissus digestifs (figure 28 B)



Figure 28 : Fixation des NV après bio-accumulation pendant 12 (A) ou 24 h (B)

Pour les VLPs NV, les mêmes observations que pour les NV ont été obtenues quelle que soit la concentration en particules (figure 29).



Figure 29 : Fixation des VLPs NV après bio-accumulation dans les huîtres de 10^9 particules pendant 12 h (A) ou de 10^{12} pendant 12 h (B) ou 24 h (C).

4- Inhibition de la bio-accumulation des NV et des VLPs NV dans les huîtres

Afin de vérifier si l'effet inhibiteur des salives d'individu de phénotype sécréteur sur la fixation des VLPs NV était reproductible sur la bio-accumulation, deux salives (individu de phénotype sécréteur et non sécréteur) ont été incubées avec les NV et les VLPs avant de contaminer les huîtres. Un témoin positif de bio-accumulation sans salive a été réalisé. Après 12 h d'incubation, les glandes digestives ont été prélevées puis l'inclusion réalisée. Les premiers résultats d'immunohistochimie suggèrent une inhibition de la fixation des NV et des VLPs par la salive d'individu de phénotype sécréteur. D'autres essais sont en cours pour confirmer ces résultats.

A-Détection des norovirus (NoV) et des rotavirus (RV)

Dans cette partie de notre travail, nous nous sommes intéressés :

- à l'amélioration de la détection des NoV et RV dans les coquillages par évaluation d'un kit d'extraction des acides nucléiques
- au développement de la RT-PCR en temps réel pour les NoVs avec une étude de la sensibilité de cette méthode
- à la question d'une potentielle contamination des huîtres par des NoV animaux (étude réalisée aux USA).

I. Comparaison des deux méthodes d'extraction

Il a été clairement démontré que la méthode de choix pour détecter les NoV, les RV et autres virus entériques humains dans les coquillages est la RT-PCR. Cependant les méthodes d'extraction ne sont pas toujours compatibles avec une amplification génomique, en effet, dans certains cas, les substances inhibitrices peuvent être extraites et concentrées en même temps que les ARN viraux. Cet effet inhibiteur est d'autant plus notable que le nombre de copies de génome viral dans l'échantillon est faible (Jaykus et al., 1996). Le degré d'efficacité de la détection virale par RT-PCR dans les coquillages résulte ainsi de deux facteurs : l'efficacité de la méthode d'extraction utilisée et le degré de pureté finale de l'acide nucléique extrait (Bosch et al., 2003).

L'étape de concentration virale utilisant le PEG est efficace puisque, lors des expériences de contamination artificielle d'eau de mer ou d'huîtres avec des VLPs RV, l'analyse par Elisa a montré une récupération totale des particules inoculées, dans le culot obtenu après concentration par PEG. Nous nous sommes donc orientés vers une comparaison de deux techniques d'extraction.

La méthode d'extraction « Baylor » (mise au point au Baylor College of Medicine, R. Atmar) est utilisée au laboratoire depuis une dizaine d'années. Cette méthode a été largement validée sur des échantillons contaminés artificiellement ou naturellement, lors d'études épidémiologiques ou de surveillance (Atmar et al., 1995, 1996 ; Le Guyader et al., 1996, 2000, 2003). Elle présente des inconvénients (méthode longue, environ 8 h de manipulation, comportant de nombreuses étapes pouvant entraîner des pertes d'acides nucléiques) et des avantages (pas d'équipements lourds, réactifs peu toxiques et peu chers). Cette méthode est

difficilement standardisable en raison des nombreuses étapes, bien qu'une inter-calibration ait été réalisée aux USA avec succès dans cinq laboratoires (Atmar et al., 1996). Cependant, tous les inhibiteurs ne sont pas éliminés lors de l'extraction. Une étude de site réalisée dernièrement au laboratoire a montré un taux d'inhibition de 15 %, après extraction par la méthode Baylor. L'efficacité d'élimination des inhibiteurs par une capture spécifique des ARN sur billes magnétiques a été démontré pour les échantillons d'eaux lors d'un travail récent (Loisy et al., 2000 : **publication N° 6**)

Depuis quelques années, la pertinence de kits d'extraction simples et rapides a été démontrée pour l'extraction d'ARN des virus dans les selles de malades (Bon et al., 1999 ; Traoré et al., 2000 ; Greening et al., 2001 ; Lees et al., 2000 ; Atmar et al., 2001). Bien que ces kits soient coûteux, ils offrent la possibilité d'avoir une méthode rapide, reproductible et facilement applicable, même par des manipulateurs peu habitués aux extractions d'acides nucléiques. Nous avons donc décidé de comparer un kit d'extraction avec la méthode Baylor en terme d'efficacité d'extraction et d'élimination des inhibiteurs.

Notre choix s'est orienté vers le kit d'extraction Qiagen RNeasy plant. Il n'existe pas de kit spécial pour l'extraction des acides nucléiques des coquillages, le kit EZBA Mollusc RNA (Omega Bio-Tech) n'étant pas efficace pour les coquillages, mais plutôt destiné aux mollusques terrestres, arthropodes et asticots (Ribao et al., 2004). L'efficacité des kits RNeasy Qiagen a été démontrée lors de différentes études cliniques (Bon et al., 1999 ; Chikhi-Brachet et al., 2002). Ces kits sont basés sur une lyse en tampon guanidium isothiocyanate, suivie de fixation sur colonnes de gel de silice, puis élution de l'ARN. C'est une méthode donc proche de celle décrite par Boom et al., (1990) recommandée pour extraire les ARN des coquillages dans de nombreuses méthodes (Hafliger et al., 1997 ; Legeay et al., 2000 ; Lees et al., 2000 ; Muniain-Mujika et al., 2000 ; Formiga Cruz et al., 2002). Le kit Qiagen RNeasy plant a été validé sur des échantillons de selles pour les NoV et RV (Kok et al., 2000).

Le virus, généralement adsorbé sur des particules, est accumulé dans les coquillages naturellement contaminés après persistance dans l'environnement. Au contraire, dans le cas de la contamination artificielle, l'inoculum est rajouté directement dans un broyat de coquillages avec un temps de contact court. Nous avons choisi de comparer les deux méthodes d'extraction directement sur des coquillages prélevés en milieu naturel. Pour disposer de coquillages potentiellement contaminés, les prélèvements ont été effectués dans des zones classées B et C. L'effet matrice pouvant être important pour les coquillages, la comparaison a été faite sur des huîtres et des moules (Hafliger et al., 1997).

Concernant l'élimination des inhibiteurs, le kit a donné les meilleurs résultats permettant de lever l'inhibition dans 78 % des échantillons contre seulement 38 % pour la méthode Baylor avec une discordance pour seulement 8 % des échantillons. Il n'y a pas eu d'effet matrice observé. Ces résultats confirment ceux observés par Sair et al., (2002) et Ribao et al., (2004). Si aucune différence n'a été montrée statistiquement concernant l'efficacité d'extraction des

ARN pour les deux méthodes, moules et huîtres cumulées, il semble que la méthode Baylor permette de détecter plus d'échantillons. Une différence plus marquée a été observée pour l'efficacité d'extraction des RV en particulier pour les huîtres. Aucun RV n'a pu être détecté après extraction avec le kit alors que 6 échantillons ont été trouvés positifs après extraction par la méthode Baylor. Le kit Qiagen RNeasy plant semble donc peu efficace pour l'extraction des ARN double brins dans les coquillages. A notre connaissance, aucun kit d'extraction des RV dans les mollusques filtreurs n'a été validé pour les RV. Suite à ces résultats, nous avons comparé l'efficacité des deux méthodes d'extraction pour les astrovirus, entérovirus et virus de l'hépatite A. Aucun virus de l'hépatite A n'a été détecté pour les 2 méthodes. Comme observé pour les NoV, si statistiquement, les différences d'efficacité d'extraction ne sont pas significatives, la méthode Baylor a toujours permis de détecter un plus grand nombre d'échantillons positifs en astrovirus et entérovirus que l'extraction par le kit (données non présentées). Le kit Qiagen RNeasy plant semble avoir une efficacité d'extraction des ARN viraux inférieure à celle de la méthode Baylor.

Pourtant depuis quelques années, des kits d'extraction sont de plus en plus utilisés pour extraire les ARN des coquillages (Mullendore et al., 2001 ; Di Pinto et al., 2003 ; Nishida et al., 2003 ; Beuret et al., 2003 ; Shieh et al., 2003 ; Sunen et al., 2004). Sair et al., (2002) ont montré que la colonne Qiashredder Homogenizer (Qiagen) permettait une meilleure élimination des inhibiteurs, une filtration des débris insolubles, une diminution de la viscosité et par conséquent une suspension plus facile du culot d'ARN final. Une étude de comparaison de 8 kits commercialisés pour l'extraction du virus de l'hépatite A dans les moules a démontré qu'une très bonne sensibilité de détection pouvait être atteinte avec le kit Qiagen RNeasy plant, sur des moules artificiellement contaminées par le virus de l'hépatite A (Ribao et al., 2004).

Dans la méthode Baylor, la lyse des virus par la protéinase K apparaît efficace. Le kit permet quant à lui, d'éliminer les inhibiteurs (Sair et al., 2002). Il pourrait être intéressant de tester une combinaison entre les deux méthodes avec (1) une étape de lyse par la protéinase K, au lieu de la lyse par le tampon du kit à base de guaninidium isothiocyanate, (2) une étape de centrifugation sur la colonne Qiashredder Homogenizer, (3) les différentes étapes de fixationélution sur colonnes de silice permettant l'élimination des inhibiteurs. Une telle méthode permettrait également d'évaluer d'éventuelles pertes d'ARN viraux lors des différents passages sur colonne en comparaison avec la méthode Baylor ou vice versa.

La validation d'une méthode de détection des virus dans les coquillages nécessite également l'utilisation d'un contrôle d'extraction et de RT-PCR ajouté en quantité connue dans l'échantillon à analyser. Ces contrôles sont en général de courts fragments d'ARN, comme par exemple les armored-RNA Norovirus GI et GII (Ambion) dont la taille fait 281 pb. L'intérêt d'un contrôle type Armored RNA est d'avoir un ARN calibré, disponible, encapsidé dans une particule et donc protégé des dégradations par les RNAses (Pasloske et al., 1998 ; Beld et al., 2004). Or, les colonnes de gel de silice utilisées dans les kits, ne permettent pas de fixer des ARN de taille inférieure à 200 pb. Après extraction directe des Armored-RNA par le kit, aucun signal n'a été obtenu alors qu'une extraction par ébullition nous a permis d'atteindre une limite de 10⁻³ unités RT-PCR. Ce critère de taille minimum peut constituer un facteur déterminant dans le choix de la méthode.

Le kit RNeasy plant ne nous a pas apporté entière satisfaction, une adaptation aux coquillages étant sans doute nécessaire. La concentration par le PEG peut constituer un des éléments limitant pour le kit en diminuant l'efficacité de la colonne Qiashredder Homogenizer. Sans remettre en cause l'efficacité de la protéinase K, afin de simplifier la méthode Baylor, il pourrait être intéressant d'évaluer la pertinence de réactifs tels que le Trizol, RNAzol ou Trireagent, mélanges de guanidium isothiocyanate, de phénol et de chloroforme (Myrmel et al., 2004 ; Kingsley et al., 2002 ; Sair et al., 2002 ; Schwab et al., 2000 ; Arnal et al., 1999).

Depuis nos essais de comparaison, l'efficacité des kits RNeasy Qiagen a été démontrée lors de différentes études sur des coquillages artificiellement ou naturellement contaminés ou impliqués dans une épidémie (Mullendore et al. 2001 ; Shieh et al., 2003 ; Nishida et al., 2003). A contrario, une faible efficacité d'extraction du kit RNeasy Qiagen a été démontrée sur des huîtres naturellement contaminées, par comparaison avec la méthode d'extraction du Laboratoire Communautaire de Référence pour la surveillance de la contamination bactériologique et virale des mollusques bivalves (Lees, 2004).

A l'heure actuelle, la méthode Baylor, en raison de son efficacité et de sa sensibilité prouvées, reste notre méthode de choix.

II. Contamination en norovirus dans les huîtres

L'efficacité mais aussi l'adaptabilité de la méthode Baylor ont également été prouvées lors de l'étude de la contamination des huîtres américaines.

Lors du transfert de la méthode d'analyse, chaque modification apportée a été validée sur des extraits de selles ou d'huîtres artificiellement contaminées. La méthode mise en place, 51 échantillons d'huîtres commercialisées ont été analysés. Un panel de 8 couples d'amorces, spécifiques de souches humaines, de souches animales (PEC, BEC ou les 2) ou de souches humaines et animales a été utilisé. Les extraits ont été analysés par RT-PCR, confirmée par hybridation ; lorsque cela a été possible, le séquençage a été réalisé après purification des produits de PCR.

Sur les 51 lots d'huîtres analysés, 5 ont été trouvés positifs en NoV GI et 16 en NoV GII. Ce résultat est en accord avec les données cliniques démontrant que le génotype GII.4 prédomine aux USA (Fankhauser et al., 2002). Dans une épidémie survenue à Wooster en février 2003 dans une maison de retraite, nous avons également trouvé dans les selles de malades une souche (Hun95) appartenant au NoV GII.4 (données non présentées). Parmi les échantillons positifs en GII, une séquence proche à 90 % de la souche Miami Beach (GII.4) et à 96,5 % de la souche Farmington Hill (GII.4) a été obtenue. La souche Miami Beach appartient au groupe 95-96 US ayant une circulation mondiale (Noel et al., 1999). De mai à décembre 2002, 45 % des épidémies de gastro-entérites ont été attribuées à la souche Farmington Hills, souche également détectée lors de croisières successives (Widdowson et al., 2004).

Le réseau de surveillance « Foodborne viruses in Europe », mis en place en 2001, a démontré une prédominance des épidémies dans les établissements de santé avec un nombre important d'épidémies à NoVs GII en 2002 (augmentation de 77-126 % aux Pays-Bas, Angleterre, Pays de Galles et Allemagne). Cette observation a été corrélée avec l'émergence d'un nouveau variant de NoV GII.4 à travers l'Europe associée à l'apparition inusuelle de pics épidémiques atypiques au printemps et en été (Lopman et al., 2004). Comme le souligne Kirkwood (2004), les souches GII.4 sont reconnues comme le génogroupe le plus commun dans différents pays et en Europe. Pourquoi ces souches prédominent-elles ? Sont-elles plus virulentes ? Par rapport aux autres souches GII.4, le nouveau variant ne possède qu'une substitution en acide aminé de signification peu claire, situé dans la région de la polymérase. L'apparition de nouveaux phénotypes semble liée à des altérations structurales comme la disparition de la structure en hélice et à l'accumulation de mutations dans la protéine de capside (Nilsson et al.,

2003). Ces modifications dans la région hyper variable de la capside semblent avoir un rôle dans l'antigénicité et pourraient ainsi influencer la réponse immunitaire (Chen et al., 2004). Vinje et al., (2003) après comparaison de 7 méthodes, ont rapporté un taux de détection des GII.4 de 66 à 100 %, supérieur aux taux obtenus pour les autres GII. Cette prédominance des GII.4 pourrait alors être due à un biais dans le diagnostic favorisant la détection de ce génotype. Dans tous les cas, nos résultats démontrent bien que la contamination des huîtres reflète celle de la population, et après commercialisation, pourrait présenter un risque pour la santé humaine.

Les amorces Mon 431, 432, 433, 434 définies par le CDC, s'étant révélées très pertinentes pour la détection des NoVs dans les selles de malades, nous les avons testées sur les échantillons de coquillages (Green et al., 2002). Seul un échantillon (ys 4) s'est révélé positif après amplification des ARN extraits d'huîtres avec ces amorces. Sur les conseils de Steeve Monroe (CDC), une RT-PCR multiplex en une étape utilisant les 4 amorces dans le même mélange réactionnel a été évaluée afin d'augmenter la sensibilité. Aucun résultat positif n'ayant alors été obtenu, le kit Qiagen One Step RT-PCR a été utilisé plutôt que les enzymes reverse transcriptase AMV et Taq polymérase Proméga non préconisées pour une amplification du kit recommandées par le fabricant. Ce résultat peut être dû à la faible efficacité d'amplification du kit de RT-PCR une étape Qiagen (Ribao et al., 2004). Les autres amorces utilisées ayant permis d'obtenir une bonne sensibilité de détection, aucun autre kit n'a été testé.

Aucun échantillon trouvé positif en NoV GI n'a pu être amplifié avec les amorces JV13/JV12. Il a été montré que ces amorces ne permettaient pas d'amplifier les souches Desert Shield like ce qui pourrait expliquer nos résultats (Johansson et al., 2002). Ces amorces ont depuis été modifiées (JV13I/JV12Y) (Vennema et al., 2002).

Pour 2 échantillons, une contamination multiple en NoV GI et GII a été trouvée. La contamination multiple n'est pas un phénomène rare pour les coquillages puisqu'elle a été fréquemment démontrée pour des huîtres impliquées dans une épidémie (Sugieda et al., 1996 ; Henshilwood et al., 1998 ; Le Guyader et al., 2000). L'échantillon ys 43 a été amplifié avec les amorces P110 /4611, JV13/JV12 puis confirmé par les sondes GGII et P116 mais aussi avec les amorces PEC65/PEC66. L'analyse de l'échantillon ys 42 démontre que le couple JV13/JV12 permet d'amplifier les NoV porcins, résultats en accord avec Van der Poel et al., (2000). Bien que deux souches aient été classées dans un nouveau génotype du GII, les PEC appartiennent généralement au GIV (Sugieda et Nakajima, 2002 ; Green et al., 2001). Les

sondes GGII et P116, spécifiques des NoV GII, n'ayant pas confirmé l'amplification par PEC65/66, ce résultat suggère une contamination multiple NoV GII et PEC pour le lot ys 43. Deux échantillons d'huîtres (ys 42, ys 43) ont été trouvés positifs en PEC et deux autres échantillons (ys 44, ys 45) en BEC. Bien que ces échantillons n'aient pu être séquencés à l'heure actuelle, les mêmes résultats ont été obtenus à partir de différents ARN extraits de ces huîtres et amplifiés au moins deux fois, laissant supposer une amplification spécifique. Les NoV bovins n'ont pu être amplifiés qu'avec les amorces définies spécifiquement pour détecter les BEC, confirmant que ceux-ci appartiennent à un génogroupe différent des NoV GI et GII (Oliver et al., 2003 ; Smiley et al., 2003 ; Wise et al., 2004).

Ces résultats confirment la pertinence de la méthode Baylor et démontrent la présence de norovirus animaux accumulés dans les huîtres.

III. Développement de la RT-PCR en temps réel pour les NoV

Suite à notre comparaison de méthodes d'extraction, nous nous sommes intéressés à la simplification de la détection des norovirus dans les coquillages. Cette détection repose sur la méthode de RT-PCR suivie d'un test de confirmation tel que l'hybridation ou la PCR seminichée (Le Guyader et al., 2003 ; Koopmans et al., 2004). A l'heure actuelle, aucune amorce définie dans la région de la polymérase ou de la capside ne permet de couvrir la diversité génétique des NoV (Atmar et al., 2001 ; Vinjé et al., 2003). Leur détection est donc relativement longue, surtout lorsque plusieurs couples d'amorces et différentes sondes sont nécessaires pour atteindre une bonne sensibilité (Le Guyader et al., 1996, 2000, 2003).

Des données récentes ont démontré qu'une région relativement conservée existait dans les régions 3' de l'ORF1 et 5' de l'ORF2 (Katayama et al., 2002 ; Kageyama et al., 2003 ; Vinjé et al., 2004 ; Chen et al., 2004). La région 5' de l'ORF2 a récemment été utilisée pour la détection par RT-PCR en temps réel (Katayama et al., 2002 ; Kageyama et al., 2003 ; Höhne et Schreier, 2004). La RT-PCR en temps réel permettant de combiner l'amplification, l'hybridation et la détection des virus, il nous est apparu intéressant d'évaluer la pertinence de cette technique par apport à notre méthode classique (RT-PCR et hybridation) pour la détection des NoV dans les coquillages.

La première étape a concerné la définition des amorces et sondes de RT-PCR en temps réel. A partir des séquences disponibles dans GenBank pour cette région et en privilégiant les souches circulant en Europe (base de données « Foodborne Calicivirus in Europe »), nous avons

vérifié la bonne adéquation des amorces désignées par l'équipe japonaise (Kageyama et al., 2003) afin d'optimiser la sensibilité de détection. Concernant le génogroupe I, aucune modification n'a été apportée, car peu de séquences sont disponibles dans cette région et la variabilité observée est encore importante. Pour le génogroupe II, une nouvelle combinaison d'amorces et de sonde a été définie afin de diminuer au maximum la distance entre l'amorce sens et la sonde, paramètre important pour obtenir une bonne sensibilité de détection.

Notre choix s'est orienté vers une chimie TaqMan où l'hybridation avec une sonde spécifique est réalisée en temps réel, plutôt qu'une chimie Sybr Green où la spécificité est vérifiée seulement en fin d'amplification par le tracé de courbes de fusion, sans utilisation de sonde (Laverick et al., 2004 ; Höhne et Schreier, 2004). Différents kits de RT-PCR en temps réel en une étape permettant une amplification rapide, simple et limitant les risques de contamination ont ensuite été testés. L'analyse d'échantillons de selles a démontré la meilleure sensibilité avec le kit Platinum Quantitative RT-PCR thermoscript one-step system (Invitrogen). Ces résultats ont été confirmés par une comparaison des kits Invitrogen et Eurogentec sur les extraits d'eau de station d'épuration où les meilleurs résultats ont été obtenus avec le kit Invitrogen. De même, ce kit Invitrogen défini pour une RT-PCR classique (utilisant la même combinaison d'enzymes) a été montré comme étant le plus sensible dans une étude comparative (Ribao et al., 2004). Par RT-PCR en temps réel, en utilisant le kit Invitrogen, une sensibilité identique à celle observée par la méthode classique a été obtenue. Une étude récente a également décrit la sensibilité de ce kit Platinum Quantitative RT-PCR thermoscript one-step system (Invitrogen) (Hewitt et Greening, 2004). D'autres essais de RT-PCR en temps réel en une étape ont été décrits pour la quantification des entérovirus et des astrovirus dans l'environnement (Monpoeho et al., 2000 ; Le Cann et al., 2004).

Bien qu'une bonne sensibilité ait été obtenue, après détection des NoV GI par RT-PCR en temps réel, dans les extraits de selles et d'huîtres artificiellement contaminées, cette méthode n'a permis d'amplifier qu'un seul échantillon comparé aux 7 positifs par la méthode classique. Pourtant le couple d'amorces et sonde défini pour le GI a démontré une large réactivité dans l'étude japonaise (Nishida et al., 2003). Comme nos extraits d'acides nucléiques sont restés congelés pendant plusieurs mois voire années, nous avons vérifié la possible dégradation de l'ARN. En utilisant la méthode de détection classique, ces 7 échantillons étaient toujours positifs, il aurait été surprenant d'observer une dégradation des ARN de NoV GI et une stabilité des ARN NoV GII. Une explication possible pourrait être une mauvaise homologie de ces amorces et sonde GI avec les séquences circulant en France, conduisant à une limite de détection plus élevée que celle observée pour la souche de

112

référence du virus de Norwalk. Les 4 séquences obtenues pour ces échantillons d'huîtres positifs ont montré une homologie avec 4 génotypes GI différents donc une assez large diversité. Une récente étude allemande a présenté une modification de ces amorces pour l'analyse de selles (Höhne et Schreier, 2004). Les premiers résultats d'évaluation de ces amorces sur la souche de référence virus de Norwalk et sur un extrait de coquillage n'ont à priori pas permis d'atteindre une bonne sensibilité de détection (données non présentées), mais d'autres essais sont à réaliser. De même, le Laboratoire Communautaire de Référence a également proposé une modification de ces amorces (Lees, 2004), qui est en cours d'évaluation au laboratoire.

Concernant la détection des NoV GII, notre essai s'est révélé très pertinent. Tous les échantillons positifs détectés par la méthode classique l'ont aussi été par RT-PCR en temps réel en utilisant un seul couple d'amorces comparé au panel d'amorces et de sondes traditionnellement utilisé au laboratoire (Le Guyader et al., 1996, 2000, 2003, données personnelles). Parmi les 14 échantillons positifs détectés uniquement par RT-PCR en temps réel, un seul a pu être détecté après une nouvelle amplification avec le couple d'amorces G2SKR/G2SKF défini dans la région de la jonction ORF1/ORF2 (Kojima et al., 2002). Ces résultats pourraient indiquer une amplification non spécifique. Cependant, ces échantillons ont des valeurs de Ct comprises entre 37 et 41 et un produit de PCR de taille appropriée (98 pb) après migration sur gel d'électrophorèse. De plus, 9 autres échantillons détectés par la méthode classique et par RT-PCR en temps réel avec des valeurs de Ct de cet ordre, correspondent à des souches NoV GII après séquençage. Tous les extraits d'eau de station d'épuration détectés positifs par la méthode classique l'ont également été par RT-PCR en temps réel. Dans une étude précédente, nous avons pu détecter une souche impliquée dans une épidémie uniquement avec des amorces spécifiques de la capside. Cela démontre que certaines amorces définies dans la polymérase ne sont pas nécessairement les plus sensibles pour l'analyse des coquillages (Le Guyader et al., 2003). Certaines souches visualisées par microscopie électronique dans les selles ne peuvent pas être détectés par RT-PCR à l'heure actuelle (Rabeneau et al., 2003; Gallimore et al., 2004). De plus, durant notre étude, Kageyama et al., (2004) ont défini une nouvelle amorce sens NoV GII très similaire à celle que nous avons décrite. Cette modification leur a permis d'amplifier un grand nombre de souches NoV GII dont certaines n'avaient jamais été décrites. L'amplification et le séquençage du domaine N/S du gène de capside VP1 de ces souches a permis d'identifier 7 nouveaux génotypes NoV GII. En raison du faible niveau de contamination de nos coquillages, nous n'avons malheureusement pas pu séquencer ces 14 échantillons. Cependant,

la définition des amorces, la haute température d'hybridation, la taille des produits de PCR et les données publiées renforcent la spécificité de notre essai de RT-PCR en temps réel.

Lors de la comparaison, notre essai s'est révélé plus sensible que celui de Kageyama et al., (2002). Ces résultats ont été confirmés puisque une étude récente a décrit la modification de cet essai, les amorces nouvellement définies étant très proches des nôtres renforçant ainsi notre choix (Kageyama et al., 2004).

Il est également intéressant de noter que des ARN conservés à -80°C depuis 1995 sont toujours positifs, démontrant une bonne stabilité des acides nucléiques et une bonne qualité de la méthode d'extraction (Atmar et al., 1995). Ce point souligne également la possibilité d'amplifier un large panel de NoV GII circulant depuis 1995.

De nombreuses méthodes de quantification des NoV ont été décrites, soit par simple dilution en point limite dans des échantillons divers mais le plus souvent dans des selles (Jiang et al., 1992b; Schwab et al., 1998; Gilpatrick et al., 2000; Kingsley et Richards, 2001; Greene et al., 2003; Rabeneau et al., 2003), par la méthode du nombre le plus probable dans les coquillages (Le Guyader et al., 2003) et par RT-PCR en temps réel dans les selles (Kageyama et al., 2003), les coquillages (Nishida et al., 2003) ou les eaux (Laverick et al., 2004). La quantification par RT-PCR en temps réel se fait par utilisation d'un standard permettant également d'évaluer la reproductibilité inter et intra essais. Cependant, la présence d'inhibiteurs d'amplification (Ct d'un échantillon testé pur supérieur au Ct d'un échantillon dilué au 1/10) a été détectée dans plus d'un quart de nos échantillons, avec un effet reproductible de ces substances inhibitrices sur l'efficacité de l'amplification. Ces données confirment l'inconvénient de la méthode d'extraction Baylor concernant les inhibiteurs, et suggèrent des limites à l'aspect quantitatif de la RT-PCR en temps réel. Les effets d'une inhibition partielle sont vraisemblablement moins marqués en RT-PCR classique puisque l'intensité du signal est mesurée dans la phase plateau de la PCR et non en temps réel. Ce problème d'inhibition, bien connu pour les coquillages (Schwab et al., 1998, 2001 ; Le Guyader et al., 2000), mais aussi pour les échantillons d'eaux usées (Loisy et al., 2000; Monpoeho et al., 2000 ; Laverick et al., 2004), doit être résolu pour une quantification plus fiable par RT-PCR en temps réel. Une autre limite à cette technique réside dans le faible niveau de contamination des coquillages. En effet, la majorité de nos échantillons possèdent des valeurs de Ct comprises entre 37 et 41 correspondant généralement aux limites de détection des standards pour lesquels la détection n'est pas toujours fidèle et reproductible (Bustin, 2002; Laverick et al., 2004). D'après les études de quantification des NoV décrites, la majorité de nos valeurs de Ct correspondraient à une contamination d'environ 10 à 100

copies/huître (Kageyama et al., 2003 ; Höhne et Schreier, 2004 ; Laverick et al., 2004). Ces résultats sont en accord avec ceux de Nishida et al., (2003) pour lesquels des contaminations de $<10^2$ à 10^4 copies/ huître ont été trouvées.

Notre essai de RT-PCR en temps en une étape est sensible, rapide et reproductible. Il est donc compatible avec la détection des faibles niveaux de contamination NoV GII trouvés dans les coquillages qu'il est nécessaire de mettre en évidence compte tenu de la forte infectiosité des norovirus.

B- Apport des Virus-like Particles (VLPs)

La transmission des NoV et des RV via l'environnement marin constitue un important problème de santé publique. Jusqu'à maintenant, il n'existe pas d'outil disponible pour se substituer aux virus dans l'environnement. La faible dose infectieuse, la forte diversité génétique, la possibilité de transmission inter-espèce et le risque de réassortiments entre souche animale et humaine conduisant à l'émergence de nouvelles souches, renforcent le besoin de développer un outil permettant d'étudier le devenir des NoV et RV dans l'environnement.

Une importante barrière à l'étude du comportement de ces virus dans l'environnement à échelle autre que celle du laboratoire, réside dans l'impossibilité d'introduire des pathogènes potentiels dans les eaux de station d'épuration, les parcs ostréicoles ou dans les huîtres. Les VLPs, substituts recombinants non infectieux, totalement inoffensifs, apparaissent alors comme un outil modèle.

Comme nous l'avons vu précédemment, les VLPs NV et RV ont essentiellement été utilisées dans le domaine clinique, une seule étude concernant l'environnement et l'investigation de l'influence des interactions électrostatiques sur la filtration des VLPs NV sur le sable de quartz a été décrite (Redman et al., 1997, 2001).

Cependant si la stabilité des VLPs RV et NV en eau stérile à 4°C est connue, aucune donnée n'est disponible concernant la stabilité de ces particules en eau de mer. La première étape de notre travail a donc été de vérifier si les VLPs NV et RV possédaient les mêmes propriétés de stabilité en eau de mer que les virus natifs.

I. Etude de la stabilité des VLPs en eau de mer naturelle

Les expériences ont été conduites à 25°C en eau de mer naturelle, car ces facteurs températures et salinité sont importants pour l'inactivation des virus (Girones et al., 1989 ; Bosch et al., 1993 ; Rzezutka et Cook, 2004). Pour concentrer et sélectionner uniquement des particules complètes, la méthode d'ultrafiltration avec un seuil à 100 kDA a été utilisée. Deux méthodes de détection ont été utilisées: la méthode Elisa permettant de quantifier les particules et la méthode de Western-blot permettant de vérifier l'intégrité structurale des VLPs par la présence de la ou des différentes protéines de capsides composant les VLPs. Ces deux méthodes, non utilisées au préalable au laboratoire, ont d'abord été optimisées afin

d'obtenir des sensibilités de détection compatibles avec les concentrations rencontrées dans l'environnement.

Concernant les rotavirus, une persistance similaire entre les RV bovins et les VLPs 2/6 a été démontrée par les deux méthodes. Des résultats similaires ont été observés avec les VLPs 2/6/7 (données non présentées). Caballero et al. (2004) ont également démontré une stabilité quasi identique entre les GFP-VLPs 2/6 et le RV humain Ito^r P13 en eau de mer à 20°C. Ces deux études, réalisées dans deux laboratoires différents et en utilisant des méthodes de détection différentes, démontrent que les diverses constructions de VLPs RV constituent de bons outils de substitution à l'utilisation des RV bovins et humains. Le taux de décroissance observé pour les VLPs est comparable à celui obtenu par titration en culture cellulaire de virus infectieux (Chung et al., 1993). Une bonne corrélation entre la décroissance de l'antigénicité et l'infectiosité a été démontrée (Pancorbo et al., 1987). Dans l'étude de Caballero et al. (2004), la décroissance observée est dix fois plus faible que dans notre étude. Cette différence par rapport à nos résultats peut être due à la température (20°C contre 25°C) et aux méthodes de détection utilisées, à savoir culture cellulaire pour les RV et cytométrie de flux pour les GFP-VLPs.

Nous avons également étudié la stabilité des pseudovirus par rapport à celles du RV bovin et des VLPs 2/6. Si nous avons retrouvé la même stabilité entre les RV et les VLPs 2/6, la décroissance observée pour les pseudovirus par Elisa et WB a été plus rapide. Par RT-PCR en temps réel, la quantification des pseudovirus a montré une décroissance du nombre de particules/ml inférieure à celle observée pour l'ARN libre servant à la construction des pseudovirus. Ces résultats suggèrent que l'ARN détecté par quantification des pseudovirus par RT-PCR en temps réel n'est pas libre mais toujours fixé à VP2. Une décroissance identique a été démontrée pour les pseudovirus concentrés par ultrafiltration et quantifiés par RT-PCR après immunocapture sur un anticorps anti-VP6 (Caballero et al., 2004). Ces données, combinées à nos résultats d'Elisa, suggèrent qu'une partie de l'ARN détecté par RT-PCR en temps réel lors de l'analyse des pseudovirus, est fixée sur des VLPs dégradées mais de poids moléculaire supérieur à 100 kDA. Les GFP-VLPs et les pseudovirus ont montré une résistance plus importante sous l'effet des UV que celles des RV humains, critère permettant une estimation plus sécuritaire de l'effet des UV sur les virus (Caballero et al., 2004). Les

Concernant les norovirus, nos résultats d'Elisa et de WB ont montré une stabilité identique du NV et des VLPs NV en eau de mer à 25°C mettant en évidence le potentiel de VLPs NV à constituer un substitut du virus. Une décroissance identique a été observée pour les deux types de particules, résultats comparables à ceux obtenus pour les calicivirus félin et canin (Duizer et al., 2004).

Ces données ont démontré pour la première fois la stabilité des VLPs RV et NV dans des conditions environnementales. Ces particules peuvent être utilisées comme outils novateurs pour étudier le devenir des virus en eau de mer ou lors de la purification des coquillages.

II. Etude de la purification des huîtres

Comme nous l'avons vu précédemment, très peu d'études ont été décrites concernant la purification des coquillages, en particulier dans des bassins de type professionnel. Ce type de bassin de purification a récemment été évalué pour la purification virale des coquillages (Pommepuy et al., 2003b). Ce pilote de purification, permet une bonne stabilité, fiabilité et reproductibilité des paramètres testés (aération, UV, rapidité du recyclage de l'eau, température, désinfection des eaux usées). Pommepuy et al., (2003b) ont montré qu'une température supérieure à 20°C et un apport de nourriture constituaient des critères importants pour une bonne purification. Si la température de 22°C a été sélectionnée, l'apport de nourriture n'étant pas compatible avec des pratiques professionnelles pour des raisons de coûts, n'a pas été retenu.

Après 11 jours de purification à 22°C d'huîtres artificiellement contaminées avec du RV bovin, un signal positif a été obtenu en RT-PCR démontrant la persistance du virus. Ces résultats sont en accord avec les données décrites pour les NoV et les VHA (Abad et al., 1997 ; Schwab et al., 1998 ; Lees et al., 2004 ; Kingsley et Richards, 2003). Compte tenu du risque d'introduire des virus dans l'environnement et de la difficulté de quantifier l'efficacité de la purification par la méthode de RT-PCR, l'expérience n'a pas été renouvelée. L'utilisation des VLPs RV et NV comme substitut viral a été préférée pour l'étude de la purification.

Les expériences de bio-accumulation réalisées avec différentes concentrations de VLPs RV 2/6 ont démontré le pouvoir de concentration de ces coquillages, confirmant les données précédemment décrites (Metcalf et al., 1982 ; Richards, 1988 ; Sobsey et Jaykus, 1991 ; Burkardt et al., 2000). L'expérience de purification, après bi-contamination des huîtres avec le

phage MS2 et les VLPs 2/6, a montré une décroissance plus importante et rapide pour les phages. Le temps de purification pour observer une décroissance de la concentration en bactériophage d'1 log₁₀ a été évalué entre 0,77 et 6,2 jours à des températures supérieures à 20°C (Pommepuy et al., soumis). Bien que le bactériophage, en raison de ses caractéristiques physico-chimiques, puisse constituer un modèle pour étudier l'élimination des virus, les VLPs semblent plus appropriées comme substitut viral.

Le niveau de contamination ne semble pas influer sur la purification puisque quel que soit le nombre initial de VLPs 2/6 dans les huîtres, la décroissance observée du nombre de particules a été identique. Compte tenu de la faible purification observée, les huîtres ont été transférées dans l'estuaire devant l'établissement ostréicole pour étudier l'effet d'une purification naturelle sous influence des marées. Ceci a été possible puisque les VLPs, particules non pathogènes, ne représentent pas de danger pour l'homme ou l'environnement. Les résultats de purification naturelle ont démontré que plus le niveau de contamination était élevé, plus la persistance des particules dans les coquillages était longue ; un résultat déjà observé pour d'autres virus (Richards et al., 1988; Schwab et al., 1998). Il est important de rappeler que les cinétiques de purification observées ne sont valables que pour une contamination finale inférieure à 10⁴ VLPs / huître, correspondant à la limite de notre technique Elisa, et non pas à une contamination nulle. A noter qu'après analyse par RT-PCR des ARN extraits, aucun signal n'a été obtenu, démontrant que les résultats d'Elisa ne correspondaient pas à une contamination naturelle des huîtres dans l'estuaire. Il est difficile de comparer nos données puisque la plupart des études réalisées concernent le VHA et que la purification diffère selon le type de virus (Richards, 1988; Sobsey et Jaykus, 1991). La persistance du VHA dans des huîtres contaminées avec 9.10⁴ PFU, puis placées en aquarium, a été de 6 semaines par RT-PCR ; l'infectiosité n'a plus été détectée après 3 semaines (Kingsley et Richards, 2003). Bien que les techniques de détection utilisées soient différentes, ces données confirment nos résultats. La cinétique de purification observée pour l'expérience ayant le plus faible niveau de contamination semble plus lente que celle des expériences réalisées avec des doses de VLPs plus importantes. Cependant, l'élimination des VLPs est sans doute moins appréciable pour des niveaux de contamination proche de la limite de sensibilité de l'Elisa. Néanmoins, cette expérience présente l'intérêt d'être réalisée dans des conditions proches de celles trouvées dans l'environnement. Pour une température identique, la persistance des VLPs a été plus longue dans les huîtres que dans l'eau de mer. Ce résultat suggère un effet protecteur des huîtres vis à vis des VLPs. Ces données de persistance très longue des VLPs dans les huîtres semblent confirmer l'hypothèse d'une séquestration des particules virales dans le tractus digestif (Di Girolamo et al., 1977 ; Sobsey et Jaykus, 1991 ; Romalde et al., 1994 ; Schwab et al., 1998). Les particules ainsi séquestrées ne seraient pas sujettes à une libération rapide et pourraient persister pendant de longues périodes, l'adhérence aux parois du tractus digestif jouant un rôle protecteur (Richards et al., 1988 ; Pommepuy et al., 2003b).

Une expérience de purification dans le bassin professionnel a été réalisée avec les VLPs NV. Après 24 h de contamination avec des VLPs NV à 10^8 particules, le niveau de contamination détecté dans les huîtres n'était que de 10^6 particule / huître. Aucune VLP détectée à J1 alors que les capacités de bio-accumulation et de persistance des NoV dans les huîtres ont été démontrées (Schwab et al., 1998 ; Le Guyader et al., 2003 ; Lees et al., 2004). Les différents essais réalisés à l'échelle du laboratoire avec différents niveaux de contamination n'ont pas permis de détecter plus de 10^6 particules / huîtres. Par contre la détection par immunohistochimie sur les coupes de glandes digestives a permis de visualiser les VLPs, bien que cette méthode ait une sensibilité de détection supérieure à 10^6 particules / huître. Ces résultats suggèrent un effet matrice des huîtres sur notre méthode de détection par Elisa. Il est difficile d'évaluer cet effet puisque la technique d'Elisa n'est pas utilisée pour la détection des NoV dans les huîtres en raison de sa sensibilité (Metcalf et al., 1995). Une solution pourrait résider dans l'immunocapture des VLPs NV pour éliminer la matrice coquillage avant l'analyse par Elisa (Gilpatrick et al., 2000).

Ces données confirment l'intérêt des VLPs comme substitut des virus et la nécessité d'améliorer les techniques de purification virale des coquillages.

III. Etude de la fixation des VLPs NV et du NV sur les tissus d'huîtres

Les résultats d'étude de la purification et la persistance des VLPs dans les coquillages suggèrent une fixation des virus sur les tissus d'huîtres. Afin d'étudier l'éventuelle fixation, la technique d'immunohistochimie a été utilisée et le virus du Norwalk choisi comme modèle. Les premières expériences ont été effectuées sur des coupes de glandes digestives d'huîtres, tissu dans lequel les virus se concentrent lors d'une contamination en aquarium (Di Girolamo et al., 1977 ; Sobsey et Jaykus, 1991 ; Romalde et al., 1994 ; Schwab et al., 1998). Nos essais confirment que les VLPs se fixent sur les conduits et diverticules digestifs, l'intestin et l'estomac.

Après bio-accumulation des VLPs NV ou du NV dans les huîtres, la présence de particules a été révélée sur les tissus digestifs, mais également dans les cellules circulant dans l'hémolymphe. Ces résultats confirment la fixation observée sur coupes de tissus et la capacité des VLPs à se substituer au virus natif. L'absence de différence marquée pour des temps d'accumulation de 12 ou 24 h est en accord avec l'idée d'un processus dynamique d'accumulation des particules, avec apparition d'un plateau dans les heures suivant l'exposition (Sobsey et Jaykus, 1991 ; Richards, 1988).

Une fixation des VLPs NV a également été observée sur les palpes labiaux, suggérant le cheminement de la nourriture ingérée par filtration à savoir un piégeage par le mucus des branchies, un transport le long des branchies jusqu'à la bouche, un tri par les palpes labiaux, pénétration dans la bouche puis entrée dans le tractus digestif. La détection des NV dans les cellules circulant dans l'hémolymphe a été suggérée par Richards (1988). Canzonnier (1971) a spéculé que le processus d'accumulation virale dans les coquillages se faisait par deux voies différentes. La première serait celle où les particules, après passage par le manteau, sont collectées dans le tractus digestif, puis éliminées dans les pseudofèces. La seconde voie impliquerait une séquestration des particules dans les glandes digestives, les tissus associés et l'hémolymphe, lorsque les coquillages sont soumis à de faibles quantités de virus pendant de longues périodes. Sans pouvoir exclure la première, cette seconde voie semble vérifiée par nos observations. Pain (1986) avait aussi suggéré une capture des virus par les hémocytes à partir des glandes digestives, puis une distribution dans les autres tissus du coquillage. Une étude de distribution des NV, effectuée par recherche de l'ARN viral, dans les tissus d'huîtres et de palourdes a montré qu'une partie du virus était présent dans les cellules de l'hémolymphe, mais aussi sur le muscle adducteur (Schwab et al., 1998). Liu et al., (1967) ont montré que la purification du poliovirus était plus rapide dans les diverticules digestifs que dans l'hémolymphe. Il est intéressant de souligner que nos travaux, utilisant des outils modernes, confirment des hypothèses formulées il y a plusieurs années mais qui n'avaient jamais été validées.

Des études récentes ont démontré que les VLPs NV utilisaient comme ligands les sucres présents sur la surface des cellules épithéliales gastro-intestinales humaines des individus de phénotypes sécréteurs, c'est à dire exprimant des antigènes de groupe sanguin dans leur salive et leur épithélium de surface intestinal (Marionneau et al., 2002, Lindesmith et al., 2003; Hutson et al., 2004). Basés sur ces études, nous avons réalisé des tests d'inhibition pour vérifier l'hypothèse d'un site de fixation commun. Un traitement des VLPs NV, avant incubation sur les lames, par le périodate (composé permettant l'ouverture des cycles

osidiques) ou par le lait de mère sécrétrice, a permis une inhibition partielle de la fixation. Une inhibition quasi complète a été observée après traitement par la salive d'individu de phénotype sécréteur. Ces résultats suggèrent l'intervention de sucres dans la liaison VLPs NV- glandes digestives, comme observé chez l'homme.

Pour confirmer cette hypothèse, des particules ont été pré-incubées dans de l'eau de mer en présence de salive d'individu de phénotype sécréteur avant bio-accumulation dans les huîtres. Une inhibition partielle de la fixation a été observée, mais doit être confirmée car un certain nombre de paramètres ne sont pas maîtrisés, comme l'effet de la salinité de l'eau de mer sur la salive.

La fixation spécifique des NV expliquerait la longue persistance du virus dans les coquillages. Ces données sont novatrices et permettent d'expliquer un certain nombre de phénomènes observés lors de la contamination ou purification des huîtres. Par exemple, ces travaux ont été réalisés avec des VLPs du virus de Norwalk, prototype du génogroupe I. Or, les quelques données obtenues, soit lors d'études sur sites, soit lors d'épidémies liées à la consommation d'huîtres, montrent un pourcentage élevé de souches appartenant au GI par rapport à celles circulant dans la population (80 % de souches appartenant au GII). Cette différence peut s'expliquer soit par une résistance plus importante des souches GI ou par une fixation préférentielle des GI par les tissus d'huîtres. Il sera important de vérifier si cette spécificité de fixation est observée pour les NoV du GII mais aussi pour les autres virus entériques humains et les différentes espèces de coquillages.

Les données obtenues, en partie grâce aux VLPs NV, démontrent une fixation spécifique du virus de Norwalk sur les tissus des glandes digestives puis une distribution dans les cellules de l'hémolymphe. Cette fixation semblerait faire intervenir des composés sucrés. Cette thèse « Devenir des virus entériques humains en milieu marin : apport des VLPs pour la purification des coquillages » s'est développée selon deux axes de recherche: l'amélioration de la détection des norovirus (étude partiellement réalisée aux USA) et des rotavirus, et l'évaluation du potentiel des VLPs comme substitut viral pour l'étude de leur devenir en milieu marin. Par ailleurs, ces études, permettent de répondre, en partie, aux différentes questions que posent ces virus présents dans l'environnement ; questions que nous avons soulevées lors de la synthèse bibliographique et notées Q1 à Q14.

Les norovirus et les rotavirus, difficilement ou non multipliables en culture cellulaire, ne peuvent être détectés dans l'environnement que par biologie moléculaire. Ainsi, la qualité de l'extraction des acides nucléiques, la sensibilité et la spécificité de la RT-PCR sont essentiels pour leur mise en évidence. La sensibilité légèrement inférieure observée avec le kit Qiagen RNeasy Plant pourrait avoir un impact considérable lors d'étude sur un site où la contamination se situe souvent en limite de détection. C'est également le cas pour des échantillons impliqués dans des épidémies où un mélange de souches peut être observé. Cet argument nous fait préférer la méthode « Baylor », relativement longue et compliquée, mais validée dans de nombreuses études (Q13). Le kit, en particulier, ne s'est pas montré efficace pour la mise en évidence de rotavirus. Cette différence peut s'expliquer à la fois par la résistance importante de la capside triple couche et par la structure de l'ARN double brin (Q3). A l'approche de la mise sur le marché du vaccin rotavirus, il est important de disposer d'outils performants pour détecter ces virus, surtout si l'on considère l'émergence de nouvelles souches et le potentiel zoonotique des rotavirus. La pertinence d'autres kits ou réactifs pourrait être évaluée mais, pour le moment, la méthode « Baylor » reste notre méthode de choix, même si le problème des inhibiteurs persiste. La purification des acides nucléiques après capture par un oligonucléotide spécifique fixé sur billes magnétiques (publication N°6) ou une queue poly-A pourrait être une piste intéressante pour optimiser cette méthode.

Malgré leur organisation génomique complexe et leur importante diversité génomique, la détection des rotavirus par RT-PCR est moins problématique que celle des norovirus (Q3, Q4). Pour ces derniers, l'utilisation d'un large panel d'amorces et de sondes définies dans les régions codant pour la polymérase et la protéine de capside est nécessaire pour obtenir une détection sensible et spécifique par RT-PCR et hybridation (Q4). Les avancées en recherche fondamentale sur les norovirus ont mis en évidence une région conservée, située à la jonction ORF1/ORF2. Cette région s'est avérée très pertinente pour la détection des NoV GII par RT-

PCR en temps réel, alors que des résultats plus décevants ont été obtenus pour les NoV GI. Le peu de données disponibles pour les souches NoV GI dans cette région peut expliquer ce résultat ; l'amorce amont et la sonde sont en particulier à redéfinir. Le développement de la RT-PCR en temps réel, même partielle, constitue un atout considérable et un outil de screening rapide et sensible (Q14). Cette méthode va permettre d'optimiser la détection, par la mise en évidence de l'inhibition, et d'aborder la quantification par rapport à une gamme étalon d'un standard interne. Ce standard, inclus à l'échantillon dès le début de l'analyse, permettrait de vérifier les différentes étapes de concentration et d'extraction et constituerait ainsi un contrôle qualité. Afin d'uniformiser les techniques de détection, il serait par ailleurs intéressant de développer un standard de référence international. De plus, la technique de RT-PCR en temps réel doit rester adaptative afin de prendre en compte les mutations des NoV et l'émergence de nouvelles souches (Q7). Pour ce faire, il est important de travailler en collaboration avec les laboratoires de virologie cliniques, par le biais par exemple, de réseau de surveillance.

L'utilisation de la RT-PCR en temps réel permet un criblage rapide, sensible et spécifique de la contamination virale des échantillons (Q7) et devra être développée pour tous les virus d'intérêt. Cependant, si la RT-PCR en temps réel constitue un outil de détection voire de quantification, elle ne permet pas de typer et d'identifier précisément les souches (Q14).

La transmission de virus entre espèces constitue un danger difficile à estimer mais qui doit être pris en compte. L'environnement, réceptacle de rejets humains et animaux, y a certainement un rôle à jouer. Il est donc important de pouvoir évaluer cette contamination. Les travaux réalisés au FAHRP ont permis de mettre en évidence, pour la première fois, la présence d'une souche de NoV animal dans les coquillages. Aucune transmission d'animaux à l'homme n'a été documentée jusqu'à maintenant. Les essais d'innoculation de souches humaines à de jeunes veaux ou porcs gnotobiotiques n'ont pas été concluants jusqu'à présent. Le potentiel zoonotique des norovirus apparaît très controversé, toutefois si celui-ci était démontré, les huîtres constituerait un possible réservoir de souches animales (Koopmans et al., 2004 ; Harrington et al., 2004 ; Wise et al., 2004) (Q6). Concernant le rotavirus, des cas de co-infection par des souches animales et humaines ont été décrits, et une souche d'origine lapine a été détectée chez un enfant. D'autres études sur site devront être développées pour évaluer la présence de souches animales de ces différents virus, leur impact sur la population et la survenue de mutant. Il nous semble que la contamination multiple dans un même échantillon d'huître pourrait ainsi favoriser les recombinaisons et les réassortiments, contribuant ainsi à l'émergence de nouvelles souches, aussi bien pour les norovirus que pour les rotavirus (Q4).

Une question fondamentale, quelle que soit la souche détectée par RT-PCR dans des échantillons de l'environnement, réside dans la signification du résultat par rapport à l'infectiosité du virus (Q9, Q10, Q11). A l'heure actuelle, il est impossible de répondre à cette question, puisqu'il n'existe pas de système de culture cellulaire pour les norovirus et que cette technique demeure difficile pour certaines souches de rotavirus. De plus, un virus infectieux peut présenter divers niveaux de pathogénicité difficile à estimer selon la population, les conditions d'inoculation et la dose infectante. Par ailleurs, les traitements nécessaires à l'élimination des effets cytotoxiques d'une matrice aussi complexe que celle des coquillages, peuvent engendrer une sous-estimation de la charge en virus infectieux. L'application de la RT-PCR en temps réel à des études épidémiologiques ou chez les volontaires, devrait permettre d'accumuler des données concernant le nombre de copies de génome nécessaire pour causer une infection. Ces données faciliteraient l'estimation du risque lié à la consommation de coquillages contaminés. Il faut également souligner, qu'en plus de la charge en virus infectieux, d'autres facteurs peuvent intervenir dans le déclenchement d'une infection. En effet les personnes immunodéprimées, stressées et les enfants peuvent constituer une population à risque. Enfin, pour les NoV, la susceptibilité génétique a été démontrée comme étant un critère important dans la survenue des gastro-entérites.

L'une des idées novatrices de ce travail est l'utilisation des VLPs pour étudier le devenir des virus en milieu marin. La capacité des VLPs RV et NV à se substituer aux virus a été démontrée dans l'eau de mer et les coquillages. Nos travaux montrent, qu'à priori, le meilleur outil pour suivre le comportement d'un virus est son substitut non infectieux (Q1, Q8, Q12). Les résultats de stabilité en eau de mer suggèrent que les différences structurales existant entre les RV et les NV (capside triple couche / capside simple couche) n'influencent pas la persistance à la température (Q2). Si des études sont encore nécessaires pour valider ce modèle, en particulier pour l'utilisation des VLPs NV dans les coquillages, l'étude réalisée avec les VLPs RV a permis de montrer qu'une huître pouvait rester contaminée par la même souche pendant 3 mois en conditions naturelles (huîtres sur l'estran). Ces résultats ont un impact sanitaire important, car ils suggèrent une protection non passive de la particule par le coquillage, et vraisemblablement une fixation spécifique. De tels résultats avaient été suggérés par des études antérieures, mais nos travaux démontrent que cette hypothèse est

plausible et peut être reproduite. Grâce à l'utilisation des VLPs RV, la persistance des particules dans les huîtres, à grande échelle, a pu être étudiée (Q8, Q12). Nos données démontrent l'intérêt des VLPs pour évaluer l'efficacité des traitements d'épuration. D'autres expériences sont à mener pour évaluer la persistance des virus dans d'autres types de coquillages ou d'autres matrices alimentaires.

Compte tenu de la longue persistance des RV dans les huîtres, comment expliquer la faible implication des RV dans les épidémies liées à la consommation de coquillage ? A une même température, la persistance plus longue des VLPs RV dans les huîtres que dans l'eau de mer a suggérée une séquestration des particules dans les coquillages. Cette possible séquestration pourrait masquer les spicules VP4 nécessaire aux virus pour pénétrer dans les cellules humaines (Q10). Des expériences utilisant une contamination artificielle d'huîtres avec des VLPs RV 2/6/7/4 puis une détection basée sur VP4 (Elisa, immunocapture) sont à réaliser pour confirmer ou infirmer cette hypothèse

Les études de fixation des virus sur les tissus d'huîtres réalisées ont une nouvelle fois confirmé le potentiel des VLPs à se substituer au virus. Les données obtenues suggèrent une fixation spécifique du virus de Norwalk sur les tissus des glandes digestives, puis une distribution dans les cellules circulantes de l'hémolymhe (Q5). Cette fixation semblerait faire intervenir un composé sucré. La structure exacte de ce récepteur reste à déterminer. La fixation spécifique des NV expliquerait la longue persistance dans les huîtres et certains résultats observés lors d'étude de contamination ou de purification (Q5, Q12). L'étude de la fixation des VLPs des autres génotypes GI et des VLPs NoV GII permettra de déterminer s'il existe une fixation préférentielle pour certains génotypes. De manière similaire, le comportement d'autres virus, tel que le rotavirus, est à explorer. Des études de fixation sur les différents tissus d'huîtres permettraient également de comprendre le cheminement des virus dans le coquillage. Par des études menées à différentes périodes de l'année, l'influence de l'état physiologique du coquillage sur la concentration des virus pourrait être évaluée. Il serait également intéressant de vérifier si la spécificité de cette fixation est observée chez d'autres espèces de coquillages.

Bien que de nombreuses questions restent en suspens, les principaux objectifs de ce travail de thèse ont été atteints. Le développement de la RT-PCR en temps réel pour la détection des norovirus constitue une réelle avancée technologique. La démonstration de l'utilité des VLPs en virologie de l'environnement a été largement démontrée.

Il apparaît important de continuer à développer, dans un soucis d'assurance qualité, des méthodes simples de détection des virus. Les recherches doivent se poursuivre en prenant en compte l'émergence de nouveaux pathogènes tels que le virus de l'hépatite E ou le virus Aïchi. La mondialisation facilitant les échanges, il est également nécessaire de réaliser des études épidémiologiques afin de collecter des données cliniques.

Concernant la protection du consommateur, ces résultats montrent que du fait de la très grande persistance du virus dans le coquillage, il est indispensable de préserver la qualité des eaux côtières. Des efforts doivent donc être faits pour limiter les apports d'eaux contaminées à proximité des parcs conchylicoles en équipant les stations d'épuration de systèmes efficaces de désinfection des eaux ou en recourant au lagunage et aux rejets hors des zones de production. Des systèmes d'alerte adaptés, prenant en compte la surveillance des épidémies dans la population et les évènements susceptibles de dégrader la qualité des eaux (fortes précipitations, dysfonctionnements des stations d'épuration), pourraient être mis en place.

La virologie de l'environnement a commencé, il y a environ un demi-siècle, avec la reconnaissance de l'eau comme origine de transmission de la poliomyélite. Cette discipline, relativement récente, s'est surtout développée grâce aux outils de biologie moléculaire. Les nouveaux outils de détection en temps réel, couplées aux avancées de la recherche fondamentale, vont permettre un nouvel élan pour cette discipline. En effet, la simplification des techniques de détection et le développement de la quantification vont permettre de mieux évaluer, par les modèles mathématiques, le devenir des virus après rejet, et d'acquérir davantage de données. Ces outils vont faciliter l'appréhension du rôle de l'environnement dans la transmission de ces virus, et le développement d'études d'analyse de risque afin de mieux protéger le consommateur. La possibilité d'utiliser des modèles viraux non pathogènes va permettre d'évaluer les traitements in situ, et de mimer plus efficacement le devenir de ces virus, non seulement en milieu marin, mais aussi dans diverses filières alimentaires.

L'apparition régulière, dans différentes régions du globe, de nouveaux virus, justifie amplement le développement de la virologie de l'environnement.

PUBLICATIONS

LOISY, F., J.C LE SAUX, M.P CAPRAIS, C. LE MENNEC, M. POMMEPUY, J. COHEN, S. LE GUYADER. Rotavirus VLP2/6 utilization to evaluate viral shellfish depuration. *In preparation* (**Publication** N°5)

LOISY, F., M.K.ESTES, M. KOOPMANS, S.F. LE GUYADER. Les Norovirus humains : du nouveau? *Acceptée dans Virologie*. (Publication N°3)

LOISY F., R. L. ATMAR, P. LE CANN, M. POMMEPUY, F. LE GUYADER. Real-time RT-PCR to detect Norovirus in oysters. *Accepted in Journal of Virological Methods*. (**Publication N°4**)

LOISY F., R. L. ATMAR, J. COHEN, A. BOSCH, F. LE GUYADER. 2004. Rotavirus VLP2/6: a new tool to track rotavirus in the marine environment. *Research in Microbiology*, 155: 575-578 (**Publication N**°1)

CABALLERO S., F. X ABAD, F. LOISY, F. LE GUYADER, J. COHEN, R. M. PINTO, A. BOSCH. 2004. Rotavirus virus like particles as tracers in environmental studies. *Applied and Environment Microbiology*, 70: 3904- 3909. (Publication $N^{\circ}2$)

POMMEPUY, M., A. BOSCH, A. M de RODA HUSMAN, L. SVENSSON, **F. LOISY**, J. COHEN, R. ATMAR, H. van der PELT-HEERSHAP, M.P CAPRAIS, J.C LE SAUX, G. BREST, F. LE GUYADER. Viral shellfish contamination and consumer protection : data and recommendations from the « Virus Safe Seafood » EU project. *Submitted to à Journal of Shellfish Research*.

LE GUYADER F., F.H. NEILL, E. DUBOIS, F. BON, F. LOISY, M.P. CAPRAIS, E. KOHLI, M. POMMEPUY, R. ATMAR. 2003. A semi-quantitative approach to estimate Norwalk-like viruses contamination of oysters implicated in an outbreak. *International Journal of Food Microbiology*, 87 :107-112.

LOISY F., P. Le CANN , M. POMMEPUY , F. LE GUYADER. An improved method to detect Norwalk-like caliciviruses in environmental samples. *Letters in Applied Microbiology*, 2000, 31: 411-414. (**Publication N°6**)

COMMUNICATIONS ORALES

LOISY F., J. LE PENDU, R.L. ATMAR, M. POMMEPUY, M.K. ESTES, S. LE GUYADER. Specific binding of Norwalk virus to oyster tissues. Calicivirus Conference, 6-9 novembre 2004

LOISY F., S. PARNAUDEAU, R.L. ATMAR, M. POMMEPUY, S. LE GUYADER. Real-time RT-PCR for genogroup II Norovirus detection in shellfish. International conference on molluscan shellfish sanity. Galway, 14-18 juin 2004.

LOISY F., A. CHARPILIENNE , J. COHEN , M. POMMEPUY, S. LE GUYADER. VLPS de rotavirus : utilisation en milieu marin. Vième congrès national de la Société Française de Microbiologie. Bordeaux, 10-12 Mai 2004.

LOISY F., S. LE GUYADER, R.L. ATMAR, J. COHEN, M. POMMEPUY. VLPS de rotavirus : utilisation en milieu marin. Journées de l'école doctorale « Innovation thérapeutique : du fondamental à l'appliqué ». 3-4 mai 2004.

COSTANTINI V, F. LOISY, L. JOENS , S. LEGUYADER , L. SAIF. Calicivirus survey in U.S. market oysters: preliminary findings. 22^{nd} congress of of the American Society of Virology. 10-14 July 2003.

HERVIO-HEATH D., S. LOAEC S., **F. LOISY**, M. POMMEPUY. Direct detection of pathogenic vibrios in mussels sampes by magnetic beads DNA-capture PCR. 10TH Bacteriology and applied Microbiology, July 27- august 1, 2002, Paris.

HERVIO-HEATH D., E. GUILLERM, S. LOAEC , **F. LOISY**, M. POMMEPUY. Direct detection of Vibrio Parahaemolyticus in environmental samples by magnetic beads DNA capture-PCR. 4 th International Conference on Molluscan Shellfish Safety, 4-8 June 2002, Santiago de Compostela, Galicia, Spain.

LOISY F., F. LE GUYADER, M. POMMEPUY. Optimisation de la détection des calicivirus et autres virus entériques humains dans les coquillages. Devenir et pathogénécité des micro-organismes dans les aliments. SFM, Paris, 15-16 novembre 2001.

LE GUYADER F., **F. LOISY F.**, F. NEILL , S. PARNAUDEAU , M. POMMEPUY , R.L. ATMAR. Detection of Norwalk-like viruses and other human enteric viruses in shelfish. 5 th Annual ESCV meeting, Lahti, Finland, 2-5 septembre 2001.

COMMUNICATIONS AFFICHEES

LOISY F., , S. PARNAUDEAU, R. ATMAR, M. POMMEPUY, F. LE GUYADER. Realtime RT-PCR for genogroupII norovirus screening in shellfish. Calicivirus Conference, 6-9 novembre 2004

PARNAUDEAU S., F. BON, F. RUGGERI, **F. LOISY**, A. DOYLE, D. de MEDICI, E. KOHLI, S. LE GUYADER. Multiple norovirus contamination of oyters implicated in outbreaks in Italy and France. Calicivirus Conference, 6-9 novembre 2004.

LE GUYADER, S., **F. LOISY**, R.L. ATMAR, J. COHEN, M. POMMEPUY. Rotavirus virus like particles used in viral depuration of shellfish. 23rd annual meeting of the American Society of Virology. 10-14 juillet 2004.

PARNAUDEAU S., BON F., **LOISY F.**, ATMAR R., GALLAY A., KOHLI E., POMMEPUY M., POTHIER P., RUGGIERI E., LE GUYADER F. Three outbreaks of gastroentiritis linked to shellfish consumption. International conference on molluscan shellfish sanity. Galway, 14-18 juin 2004.

LE GUYADER, S., **F. LOISY**, S. PARNAUDEAU, F. BON, E. KOHLI, P. POTHIER, A. GALLAY, M. POMMEPUY. Vième congrès national de la Société Française de Microbiologie. Bordeaux, 10-12 Mai 2004

LE GUYADER F., NEILL F., **LOISY F.**, BON F., KHOLI E., ATMAR R.L. Semi-quantitative appraoch to evaluate viral contamination of shellfish implicated in an outbreak. American Society for Virology, July 21-25 2001, Wisconsin (USA).

- Abad F.X., Pinto R.M., Diez J.M. and A. Bosch. 1994. Disinfection of human enteric viruses in water by copper and silver in combination with low levels of chlorine. Appl. Environ. Microb. 60: 2377-2383.
- Abad F.X., Pinto R.M., Gajardo R. and A. Bosch. 1997. Viruses in mussels : public health implications and depuration. J. Food Prot. 60: 677-681.
- Abbaszadegan, M., Stewart, P. and M. Le Chevallier. 1999. A strategy for detection of viruses in groundwater by PCR. Appl. Environ. Microbiol. 65:444-449.
- Anderson, E.J. and S.G. Weber. 2004. Rotavirus infection in adults. Lancet Infect. Dis. 4: 91-99.
- Ando, T., Jin, Q., Gentsch, J.R., Monroe, S.S., Noel, J. ., Dowell, S.F., Cicirello, H.G., Kohn, M.A. and R.I. Glass. 1995. Epidemiologic applications of novel molecular methods to detect and differentiate small round structured viruses (Norwalk-like viruses). J. Med. Virol. 47: 145-52.
- Arnal, C., Ferre Aubineau, V., Besse, B., Mignotte, B., Schwartzbrod, L. and S. Billaudel. 1999. Comparison of seven RNA extraction methods on stool and shellfish samples prior to hepatitis A virus amplification. J. Virol. Methods 77: 17-26.
- Atmar, R.L. and M.K. Estes. 2001. Diagnosis of noncultivatable gastroenteritis viruses, the human caliciviruses. Clin. Microbiol. Rev. 14: 15-37, CP1, CP2.
- Atmar, R.L., Neill, F.H., Romalde, J.L., Le Guyader, F., Woodley, C.M., Metcalf T.G. and M.K. Estes. 1995. Detection of Norwalk virus and hepatitis A virus in shellfish tissues with the PCR. Appl. Environ. Microbiol. 61: 3014-8.
- Atmar, R.L., Neill, F.H., Woodley, C.M., Manger, R., Fout, G.S., Burkhardt, W., Leja, L., McGovern, E.R., Le Guyader, F., Metcalf, T.G. and M.K. Estes. 1996. Collaborative evaluation of a method for the detection of Norwalk virus in shellfish tissues by PCR. Appl. Environ. Microbiol. 62: 254-8.
- Azevedo, M.S., Yuan, L., Iosef, C., Chang, K.O., Kim, Y., Nguyen, T.V. and L.J. Saif. 2004. Magnitude of serum and intestinal antibody responses induced by sequential replicating and nonreplicating rotavirus vaccines in gnotobiotic pigs and correlation with protection. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 11: 12-20.

B

- Baggi, F., Demarta, A. and R. Peduzzi. 2001. Persistence of viral pathogens and bacteriophages during sewage treatment: lack of correlation with indicator bacteria. Res. Microbiol. 152: 743-751.
- Ball J.M., Graham D.Y., Opekun A.R., Gilger M.A., Guerrero R.A. and M.K. Estes. 1999. Recombinant Norwalk virus-like particles given orally to volunteers: phase 1 study. Gastroenterology **117:** 40-48.
- Ball, J.M., Hardy, M.E., Atmar, R.L., Conner, M.E. and M.K. Estes. 1998. Oral immunization with recombinant Norwalk virus-like particles induces a systemic and mucosal immune response in mice. J. Virol. 72: 1345-53.
- Baric R.S., Yount B., Lindesmith L., Harrington P.R., Greene S.R., Tseng F.C., Davis N., Johnston R.E., Lklapper D.G. and C.L. Moe. 2002. Expression and self-assembly of Norwalk virus capsid protein from venezuelan equine encephalitis virus replicons. J. Virol. 76: 3023-3030.
- Beld, M., Minnaar, R., Weel, J., Sol, C., Damen, M., van der Avoort, H., Wertheim-van Dillen, P., van Breda, A. and R. Boom. 2004. Highly sensitive assay for detection of enterovirus in clinical specimens by reverse transcription-PCR with an armored RNA internal control. J. Clin. Microbiol. 42: 3059-64.
- Berke, T., Golding, B., Jiang, X., Cubitt, D.W., Wolfaardt, M., Smith, A.W. and D.O. Matson. 1997. Phylogenetic analysis of the Caliciviruses. J Med. Virol. 52: 419-24.
- Bertolotti-Ciarlet, A., Ciarlet, M., Crawford, S.E., Conner, M.E. and M.K. Estes. 2003a. Immunogenicity and protective efficacy of rotavirus 2/6-virus-like particles produced by a dual baculovirus expression vector and administered intramuscularly, intranasally, or orally to mice. Vaccine **21**: 3885-3900.
- Bertolotti-Ciarlet, A., Crawford, S.E., Hutson, A.M. and M.K. Estes. 2003b. The 3' End of Norwalk Virus mRNA Contains Determinants That Regulate the Expression and Stability of the Viral Capsid Protein VP1: a Novel Function for the VP2 Protein. J. Virol. 77: 11603-11615.
- Bertolotti-Ciarlet, A., White, L.J., Chen, R., Prasad, B.V.V. and M.K. Estes 2002. Structural requirements for the assembly of Norwalk-like particles. J. Virol. **76**: 4044-4055.
- Beuret, C., Baumgartner, A. and J. Schluep. 2003. Virus-contaminated oysters: a three-month monitoring of oysters imported to Switzerland. Appl. Environ. Microbiol. 69: 2292-2297.
- Beuret, C., Kohler, D. and T. Luthi. 2000. Norwalk-like virus sequences detected by reverse transcriptionpolymerase chain reaction in mineral waters imported into or bottled in Switzerland. J. Food Prot. 63: 1576-1582.

- Bhattacharya, S.S., Kulka, M., Lampel, K.A., Cebula, T.A. and B.B. Goswami. 2004. Use of reverse transcription and PCR to discriminate between infectious and non-infectious hepatitis A virus. J. Virol. Methods 116: 181-7.
- Bishop, R.F., Davidson, G.P., Holmes, I.H. and B.J. Ruck. 1973. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis. Lancet 2: 1281-3.
- Boher, S. and L. Schwartzbrod. 1993. Study of viral purification of oysters. Wat. Sci. Tech. 27: 55-60.
- Bok, K., Matson, D.O. and J.A. Gomez. 2002. Genetic variation of capsid protein VP7 in genotype g4 human rotavirus strains: simultaneous emergence and spread of different lineages in Argentina. J. Clin. Microbiol. 40: 2016-22.
- Bon, F., Fascia, P., Dauvergne, M., Tenenbaum, D., Planson, H., Petion, A.M., Pothier, P. and E. Kohli. 1999. Prevalence of group A rotavirus, human calicivirus, astrovirus, and adenovirus type 40 and 41 infections among children with acute gastroenteritis in Dijon, France. J. Clin. Microbiol. **37:** 3055-3058.
- Bon, F., Giraudon, H., Sancey, C., Barranger, C., Joannes, M., Pothier, P. and E. Kohli. 2004. Development and evaluation of a new commercial test allowing the simultaneous detection of noroviruses and sapoviruses by reverse transcription-PCR and microplate hybridization. J. Clin. Microbiol 42: 2218-20.
- Boom, R., Sol, C.J., Salimans, M.M., Jansen, C.L., Wertheim-van Dillen, P.M. and J. van der Noordaa. 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. J. Clin. Microbiol. 28: 495-503.
- Borchardt, M.A., Bertz, P.D., Spencer, S.K. and D.A. Battigelli. 2003. Incidence of enteric viruses in groundwater from household wells in Wisconsin. Appl. Environ. Microbiol. 69: 1172-1180.
- Bosch, A., Sanchez, G., Pinto, R.M., Abad, F.X., Pommepuy, M. and F. Le Guyader. 2003. Methods for virus detection in molluscs : validation and standardisation. Molluscan Shellfish Safety, Edts Villalba et al., pp. 333-340.
- Bosch A., Diez J.M. and F.X. Abad. 1993. Disinfection of human enteric viruses in water by copper, silver and reduced level of chlorine. Wat. Sci. Tech. 27: 351-356.
- Brugha, R., Vipond, I.B., Evans, M.R., Sandifer, Q.D., Roberts, R. J., Salmon, R. L., Caul, E.O. and A.K. Mukerjee. 1999. A community outbreak of food-borne small round-structured virus gastroenteritis caused by a contaminated water supply. Epidemiology and Infection 122: 145-154.
- Burkhardt, W., 3rd. and K. R. Calci. 2000. Selective accumulation may account for shellfish-associated viral illness. Appl. Environ. Microbiol. 66: 1375-8.
- Bustin, S. A. 2002. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. J. Mol. Endocrinol. **29:** 23-39.

С

- Caballero, S., Abad, F.X., Loisy, F., Le Guyader, F., Cohen, J., Pinto, R.M. and A. Bosch. 2004. Rotavirus virus-like particles as surrogates in environmental persistence and inactivation studies. Appl. Environ. Microbiol. **70:** 3904-3909.
- Canzonnier, W.J. 1971. Accumulation and elimination of coliphage S-13 by the hard clam Mercenaria mercenaria. Appl. Microbiol. 21: 1024-1031.
- Casas, N. and E. Sunen. 2001. Detection of enterovirus and hepatitis A virus RNA in mussels (Mytilus spp.) by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. J. Appl. Microbiol. **90:** 89-95.
- Charpilienne, A., Lepault, J., Rey, F. and J. Cohen. 2002. Identification of rotavirus VP6 residues located at the interface with VP2 that are essential for capsid assembly and transcriptase activity. J. Virol. 76: 7822-7831.
- Charpilienne, A., Nejmeddine, M., Berois, M., Parez, N., Neumann, E., Hewat, E., Trugnan, G. and J. Cohen. 2001. Individual rotavirus-like particles containing 120 molecules of fluorescent protein are visible in living cells. The Journal of Biological Chemistry 276: 29361-29367.
- Chen, R., Neill, J.D., Noel, J.S., Hutson, A.M., Glass, R.I., Estes, M.K. and B.V. Prasad. 2004. Inter and intragenus structural variations in caliciviruses and their functional implications. J. Virol. **78**: 6469-79.
- Chikhi Brachet, R., Bon, F., Toubiana, L., Pothier, P., Nicolas, J.C., Flahault, A. and E. Kohli. 2002. Virus diversity in a winter epidemic of acute diarrhea in France. J. Clin. Microbiol. 40: 4266-4272.
- 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.
- Cook, N., Bridger, J., Kendall, K., Gomara, M. I., El-Attar, L. and J. Gray. 2004. The zoonotic potential of rotavirus. J. Infect. 48: 289-302.
- Coste, A., Sirard, J.C., Johansen, K., Cohen, J. and J.P. Kraehenbuhl. 2000. Nasal immunization of mice with virus-like particles protects offspring against rotavirus diarrhea. J. Virol. 74: 8966-8971.
- Crawford, S.E., Estes, M.K., Ciarlet, M., Barone, C., O'Neal, C.M., Cohen, J. and M.E. Conner. 1999. Heterotypic protection and induction of a broad heterotypic neutralization response by rotavirus-like particles. J. Virol. **73**: 4813-4822.
- Crawford, S.E., Labbe, M., Cohen, J., Burroughs, M.H., Zhou, Y.J. and M.K. Estes. 1994. Characterization of virus-like particles produced by the expression of rotavirus capsid proteins in insect cells. J. Virol. 68: 5945-5922.
- Croci, L., De Medici, D., Scalfaro, C., Fiore, A., Divizia, M., Donia, D., Cosentino, A.M., Moretti, P. and G. Costantini. 2000. Determination of enteroviruses, hepatitis A virus, bacteriophages and *Escherichia coli* in Adriatic Sea mussels. J. Appl. Microbiol. 88: 293-298.

D

- De Leener, K., Rahman, M., Matthinjnssens, J., van Hoovels, L., Goegebuer, T., van der Donck, I. and M. van Ranst. 2004. Human infection with a P[14], G3 lapine rotavirus. **325**: 11-17.
- **Desselberger, U., Iturriza-Gomara, M. and J.J. Gray.** 2001. Rotavirus epidemiology and surveillance. Novartis Found Symp. **238**: 125-47; discussion 147-152.
- Di Girolamo, R., Liston, J. and J. Matches. 1977. Ionic bonding, the mechanism of viral uptake by shellfish mucus. Appl. Environ. Microbiol. 33: 19-25.
- Di Pinto, A., Forte, V.T., Tantillo, G.M., Terio, V. and C. Buonavoglia. 2003. Detection of hepatitis A virus in shellfish (Mytilus galloprovincialis) with RT-PCR. J. Food Prot. 66: 1681-1685.
- **Dingle, K.E., Lambden, P.R., Caul, E.O. and I.N. Clarke.** 1995. Human enteric Caliciviridae: the complete genome sequence and expression of virus-like particles from a genetic group II small round structured virus. J. Gen. Virol. **76:** 2349-2355.
- Dolin, R., Blacklow, N.R., DuPont, H., Buscho, R.F., Wyatt, R.G., Kasel, J.A., Hornick, R. and R.M. Chanock. 1972. Biological properties of Norwalk agent of acute infectious nonbacterial gastroenteritis. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 140: 578-583.
- Dolin, R., Blacklow, N.R., DuPont, H., Formal, S., Buscho, R.F., Kasel, J.A., Chames, R.P., Hornick, R. and R.M. Chanock. 1971. Transmission of acute infectious nonbacterial gastroenteritis to volunteers by oral administration of stool filtrates. J. Infect. Dis. 123: 307-312.
- Dore, W.J., Henshilwood, K. and D.N. Lees. 2000. Evaluation of F-specific RNA bacteriophage as a candidate human enteric virus indicator for bivalve molluscan shellfish. Appl. Environ. Microbiol. 66: 1280-1285.
- Doultree, J.C., Druce, J.D., Birch, C.J., Bowden, D.S. and J.A. Marshall. 1999. Inactivation of feline calicivirus, a Norwalk virus surrogate. J. Hosp. Infect. 41: 51-57.
- Dowell, S.F., Groves, C., Kirkland, K.B., Cicirello, H.G., Ando, T., Jin, Q., Gentsch, J.R., Monroe, S.S., Humphrey, C.D., Slemp, C., Dwyer, D.M., Meriwether, R.A. and R.I. Glass. 1995. A multistate outbreak of oyster-associated gastroenteritis: implications for interstate tracing of contaminated shellfish. J. Infect. Dis. **171**: 1497-1503.
- **Dubois, E., Le Guyader F., Haugarreau, L., Kopecka, H., Cormier, M. and M. Pommepuy.** 1997. Molecular epidemiological survey of rotaviruses in sewage by reverse transcriptase seminested PCR and restriction fragment length polymorphism assay. Appl. Environ. Microbiol. **63:** 1794-1800.
- Duizer, E., Bijkerk, P., Rockx, B., De Groot, A., Twisk, F. and M. Koopmans. 2004. Inactivation of caliciviruses. Appl. Environ. Microbiol. 70: 4538-4543.

E

- Estes, M.K., Kang, G., Zeng, C.Q., Crawford, S.E. and M. Ciarlet. 2001. Pathogenesis of rotavirus gastroenteritis. Novartis Found Symp. 238: 82-96; discussion 96-100.
- Estes, M.K., Ball, J.M., Guerrero, R.A., Opekun, A.R., Gilger, M., Pacheco, S.S. and D.Y. Graham. 2000. Norwalk virus vaccines: Challenges and progress. J. Infect. Dis. **181 Suppl. 2:**S367-S373.
- Estes, M.K., Graham, D.Y., Gerba, C. and E.M. Smith. 1979. Simian rotavirus SA11 replication in cell cultures. J. Virol. 31: 810-815.

F

Fankhauser, R.L., Monroe, S.S., Noel, J.S., Humphrey, C.D., Bresee, J.S., Parashar, U.D., Ando, T. and R.I. Glass. 2002. Epidemiologic and molecular trends of "Norwalk-like viruses" associated with outbreaks of gastroenteritis in the United States. J. Infect. Dis. 186: 1-7. Epub 2002 Jun 10.

- Fletcher, M., Levy, M.E. and D.D. Griffin. 2001. Foodborne outbreak of group A rotavirus gastroenteritis among college students District of Columbia, March-April 2000 (Reprinted from MMWR, vol 49, pg 1131-1133, 2000). Jama J. American Medical Association **285:** 405-406.
- Flewett, T.H., Davies, H., Bryden, A.S. and M.J. Robertson. 1974. Diagnostic electron microscopy of faeces. II. Acute gastroenteritis associated with reovirus-like particles. J. Clin. Pathol. 27: 608-614.
- Flores, J., Sears, J., Schael, I.P., White, L., Garcia, D., Lanata, C. 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.
- Formiga-Cruz, M., Tofino-Quesada, G., Bofill-Mas, S., Lees, D.N., Henshilwood, K., Allard, A.K., Conden-Hansson, A.C., Hernroth, B.E., Vantarakis, A., Tsibouxi, A., Papapetropoulou, M., Furones, M.D. and R. Girones. 2002. Distribution of Human Virus Contamination in Shellfish from Different Growing Areas in Greece, Spain, Sweden and the United Kingdom. Appl. Environ. Microbiol. 68: 5990-5998.
- Fout, G.S., Martinson, B.C., Moyer, M.W.N. and D.R. Dahling. 2003. A Multiplex Reverse Transcription-PCR Method for Detection of Human Enteric Viruses in Groundwater. Appl. Environ. Microbiol. 69: 3158-3164.

G

- Gallimore, C.I., Cubitt, D.W., Richards, A.F. and J.J. Gray. 2004. Diversity of enteric viruses detected in patients with gastroenteritis in a tertiary referral paediatric hospital. J. Med. Virol. 73: 443-449.
- Gault, E., Schnepf, N., Poncet, D., Servant, A., Teran, S. and A. Garbarg Chenon. 2001. A human rotavirus with rearranged genes 7 and 11 encodes a modified NSP3 protein and suggests an additional mechanism for gene rearrangement. J.Virol. **75**: 7305-7314.
- Gerba, C.P. and J.E. Naranjo. 2000. Microbiological water purification without the use of chemical disinfection. Wilderness Environ. Med. 11: 12-16.
- Gerba, C.P., Rose, J.B., Haas, C.N. and K.D. Crabtree. 1996. Waterborne rotavirus : a risk assessment. Wat. Res. 30: 2929-2940.
- Gilbert, J.M. and H.B. Greenberg. 1997. Virus-like particle-induced fusion from without in tissue culture cells: role of outer-layer proteins VP4 and VP7. J. Virol. 71: 4555-4563.
- Gill, O.N., Cubitt W.D., Macswiggan D.A., Watney B.M. and C.L.R. Barlett. 1993. Epidemic of gastroenteritis caused by oysters contaminated with small round structured viruses. Brit. Med. J. 287: 1532-1534.
- Gilpatrick, S.G., Schwab, K.J., Estes, M.K. and R.L. Atmar. 2000. Development of an immunomagnetic capture reverse transcription-PCR assay for the detection of Norwalk virus. J. Virol. Methods **90:** 69-78.
- Girones, R., Jofre, J. and A. Bosch. 1989. Natural inactivation of enteric viruses in seawater. J. Environ. Qual. 18: 34-39.
- Glass, P.J., Zeng, C.Q. and M.K. Estes. 2003. Two nonoverlapping domains on the Norwalk virus open reading frame 3 (ORF3) protein are involved in the formation of the phosphorylated 35K protein and in ORF3-capsid protein interactions. J. Virol. 77: 3569-3577.
- Glass, R.I., Bresee, J.S., Parashar, U.D., Jiang, B. and J. Gentsch. 2004. The future of rotavirus vaccines: a major setback leads to new opportunities. Lancet 363: 1547-1550.
- Gonzalez, A.M., Nguyen, T.V., Azevedo, M.S., Jeong, K., Agarib, F., Iosef, C., Chang, K., Lovgren-Bengtsson, K., Morein, B. and L.J. Saif. 2004. Antibody responses to human rotavirus (HRV) in gnotobiotic pigs following a new prime/boost vaccine strategy using oral attenuated HRV priming and intranasal VP2/6 rotavirus-like particle (VLP) boosting with ISCOM. Clin. Exp. Immunol.135: 361-372.
- Gouvea, V. and M. Brantly. 1995. Is rotavirus a population of reassortants? Trends Microbiol. 3: 159-162.
- Gouvea, V., Glass, R.I., Woods, P., Taniguchi, K., Clark, H.F., Forrester, B. and Z.Y. Fang. 1990. Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. J. Clin. Microbiol. 28: 276-282.
- Gratacap Cavallier, B., Genoulaz, O., Brengel Pesce, K., Soule, H., Innocenti Francillard, P., Bost, M., Gofti, L., Zmirou, D. and J.M. Seigneurin. 2000. Detection of human and animal rotavirus sequences in drinking water. Appl. Environ. Microbiol. 66: 2690-2692.
- Green, K.Y., Belliot, G., Taylor, J.L., Valdesuso, J., Lew, J.F., Kapikian, A.Z. and F.Y.C. Lin. 2002. A predominant role for Norwalk-like viruses as agents of epidemic gastroenteritis in Maryland nursing homes for the elderly. J. Infect. Dis. 185: 133-146.
- Green, K.Y., Chanock, R. . and A.Z. Kapikian. 2001. Human Caliciviruses. In Fields Virology, Edts Knipe. D. M et Howley P.M., Griffin DE Raven Publishers, pp 841-874.

- Green, J., Vinje, J., Gallimore, C.I., Koopmans, M., Hale, A. and D.W.G. Brown. 2000. Capsid protein diversity among Norwalk-like viruses. Virus Genes 20: 227-236.
- Green, D.H. and G.D. Lewis. 1999. Comparative detection of enteric viruses in wastewaters, sediments and oysters by reverse transcription PCR and cell culture. Water Research 33: 1195-1200.
- Green, K.Y. 1997. The role of human caliciviruses in epidemic gastroenteritis. Arch. Virol. Suppl. 13: 153-165.
- Green, K.Y. and A.Z. Kapikian. 1992. Identification of VP7 epitopes associated with protection against human rotavirus illness or shedding in volunteers. J. Virol. 66: 548-553.
- Green, S.M., Lambden, P. ., Deng, Y., Lowes, J.A., Lineham, S., Bushell, J., Rogers, J., Caul, E.O., Ashley, C.R. and I.N. Clarke. 1995. Polymerase chain reaction detection of small round-structured viruses from two related hospital outbreaks of gastroenteritis using inosine-containing primers. J. Med. Virol. 45: 197-202.
- Greene, S.R., Moe, C.L., Jaykus, L. ., Cronin, M., Grosso, L. and P. van Aarle. 2003. Evaluation of the NucliSens (R) Basic Kit assay for detection of Norwalk virus RNA in stool specimens. J.Virol.Meth. 108: 123-131.
- Greening, G.E., Mirams, M. and T. Berke. 2001. Molecular epidemiology of 'Norwalk-like viruses' associated with gastroenteritis outbreaks in New Zealand. J. Med. Virol. 64: 58-66.
- Griffin, D.W., Donaldson, K.A., Paul, J.H. and J.B. Rose. 2003. Pathogenic human viruses in coastal waters. Clin. Microbiol. Rev. 16: 129-143,CP3,CP4.
- Grohmann, G.S., Greenberg, H.B., Welch, B.M. and A.M. Murphy. 1980. Oyster-associated gastroenteritis in Australia: the detection of Norwalk virus and its antibody by immune electron microscopy and radioimmunoassay. J. Med. Virol. 6: 11-19.
- Guerrero, R.A., Ball, J.M., Krater, S.S., Pacherco, S.E., Clements, J.D. and M.K. Estes. 2001. Recombinant Norwalk virus like particles administered intranasally to mice induce systemic and mucosal (fecal and vaginal) immune responses. J. Virol. **75**: 9713-9722.
- Guo, M., Qian, Y., Chang, K.O. and L.J. Saif. 2001. Expression and self assembly in baculovirus of porcine enteric calicivirus capsids into virus like particles and their use in an enzyme linked immunosorbent assay for antibody detection in swine. J. Clin. Microbiol. **39:** 1487-1493.
- Guo, M., Chang, K.O., Hardy, M.E., Zhang, Q., Parwani, A.V. and L.J. Saif. 1999. Molecular characterization of a porcine enteric calicivirus genetically related to Sapporo-like human caliciviruses. J. Virol. 73: 9625-9631.

H

- Hafliger, D., Gilgen, M., Luthy, J. and P. Hubner. 1997. Seminested RT-PCR systems for small round structured viruses and detection of enteric viruses in seafood. Int. J. Food.Microbiol. 37: 27-36.
- Hale, A.D., Crawford, S.E., Ciarlet, M., Green, J., Gallimore, C., Brown, D.W., Jiang, X. and M.K. Estes. 1999. Expression and self-assembly of Grimsby virus: antigenic distinction from Norwalk and Mexico viruses. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 6: 142-145.
- Haramoto, E., Katayama, H. and S. Ohgaki. 2004. Detection of noroviruses in tap water in Japan by means of a new method for concentrating enteric viruses in large volumes of freshwater. Appl. Environ. Microbiol. 70: 2154-2160.
- Hardy, M.E. 1999. Norwalk and "Norwalk-like viruses" in epidemic gastroenteritis. Clinics in Laboratory Medicine 19: 675-690,VIII.
- Harrington, P.R., Vinje, J., Moe, C.L., Baric, R. S., Hutson, A.M., Atmar, R.L., Graham, D. Y., Estes, M.K., Tamura, M., Natori, K., Kobayashi, M., Miyamura, T. and N. Takeda. 2004. Norovirus capture with histo-blood group antigens reveals novel virus-ligand interactions. J. Virol. 78: 3035-3045.
- Hedlund, K., Rubilar Abreu, E. and L. Svensson. 2000. Epidemiology of calicivirus infections in Sweden, 1994-1998. J. Infect. Dis. 181 Suppl. 2: S275-S280.
- Henshilwood, K., Green, J., Gallimore, C.I., Brown, D.W.G. and D.N. Lees. 1998. The development of polymerase chain reaction assays for detection of small round structured and other human enteric viruses in molluscan shellfish. J. Shellfish Res. 17: 1675-1678.
- Hernandez, F., Monge, R., Jimenez, C. and L. Taylor. 1997. Rotavirus and hepatitis A virus in market lettuce (Lactuca sativa) in Costa Rica. Int. J. Food Microbiol. 37: 221-223.
- Hewitt, J. and G. E. Greening. 2004. Survival and persistence of norovirus, hepatitis A virus and feline calicivirus in marinated mussels. J. Food Prot. 67: 1743-1750.
- Hoebe, C.J., Vennema, H., de Roda Husman, A.M. and Y.T. van Duynhoven. 2004. Norovirus outbreak among primary schoolchildren who had played in a recreational water fountain. J. Infect. Dis. 189: 699-705. Epub 2004 Feb 4.

- Hohne, M. and E. Schreier. 2004. Detection and characterization of norovirus outbreaks in Germany: application of a one-tube RT-PCR using a fluorogenic real-time detection system. J. Med. Virol. 72: 312-319.
- Holmes, J.L., Kirkwood, C.D., Gerna, G., Clemens, J.D., Rao, M.R., Naficy, A.B., Abu-Elyazeed, R., Savarino, S.J., Glass, R.I. and J.R. Gentsch. 1999. Characterization of unusual G8 rotavirus strains isolated from Egyptian children. Arch. Virol. 144: 1381-1396.
- Holmes, J.L. 1991. Reoviridae. In classification and nomenclature of viruses. Edts Frnaki R.I.B, Fauquet C. m., Knudson D. L., Brown F. Arch. Virol. (Suppl.), pp 186-191.
- Hot, D., Legeay O., Jacques, J., Gantzer, C., Caudrelier, Y., Guyard, K., Lange, M. and L. Andreoletti. 2003. Detection of somatic phages, infectious enteroviruses and enterovirus genomes as indicators of human enteric viral pollution in surface water. Wat. Res. 37: 4703-4710.
- Hutson, A.M., Atmar, R.L. and M.K. Estes. 2004. Norovirus disease: changing epidemiology and host susceptibility factors. Trends in Microbiology 12: 279-287.
- Hutson, A.M., Atmar, R.L., Graham, D.Y. and M.K. Estes. 2002. Norwalk virus infection and disease is associated with ABO histo-blood group type. J. Infect. Dis. 185: 1335-1337. Epub 2002 Apr 16.

I

- Iosef, C., Van Nguyen, T., Jeong, K., Bengtsson, K., Morein, B., Kim, Y., Chang, K.O., Azevedo, M.S., Yuan, L., Nielsen, P. and L. J. Saif. 2002. Systemic and intestinal antibody secreting cell responses and protection in gnotobiotic pigs immunized orally with attenuated Wa human rotavirus and Wa 2/6rotavirus-like-particles associated with immunostimulating complexes. Vaccine 20: 1741-1753.
- Iturriza-Gomara, M., Kang, G., Mammen, A., Jana, A.K., Abraham, M., Desselberger, U., Brown, D. and J. Gray. 2004. Characterization of G10P[11] rotaviruses causing acute gastroenteritis in neonates and infants in Vellore, India. J. Clin. Microbiol. 42: 2541-2547.
- Iturriza-Gomara, M., Isherwood, B., Desselberger, U. and J. Gray. 2001. Reassortment in vivo: driving force for diversity of human rotavirus strains isolated in the United Kingdom between 1995 and 1999. J. Virol. **75:**3696-3705.
- Iturriza-Gomara, M., Green, J., Brown, D.W.G., Desselberger, U. and J. Gray. 1999. Comparison of specific and random priming in the reverse transcriptase polymerase chain reaction for genotyping group A rotaviruses. J. Vir. Met. **78**: 93-103.

J

- Jayaram, H., Estes, M.K. and B.V. Prasad. 2004. Emerging themes in rotavirus cell entry, genome organization, transcription and replication. Virus Res. 101: 67-81.
- Jaykus, L.A., De Leon, R. and M.D. Sobsey. 1996. A virion concentration method for detection of human enteric viruses in oysters by PCR and oligoprobe hybridization. Appl. Environ. Microbiol. 62: 2074-2080.
- Jiang, B., Gentsch, J.R. and R.I. Glass. 2002. The role of serum antibodies in the protection against rotavirus disease: an overview. Clin. Infect. Dis. 34: 1351-1361. Epub 2002 Apr 22.
- Jiang, X., Zhong, W., Kaplan, M., Pickering, L. K. and D.O. Matson. 1999. Expression and characterization of Sapporo-like human calicivirus capsid proteins in baculovirus. J. Virol. Meth. **78**: 81-91.
- Jiang, X., Matson, D.O., Ruiz-Palacios, G.M., Hu, J., Treanor, J. and L.K. Pickering. 1995a. Expression, self-assembly, and antigenicity of a snow mountain agent-like calicivirus capsid protein. J. Clin. Microbiol. 33: 1452-1455.
- Jiang, X., Cubitt, D., Hu, J., Dai, X., Treanor, J., Matson, D.O., Pickering, L.K. and G.M. Ruiz-Palacios. 1995b. Development of an ELISA to detect MX virus, a human calicivirus in the snow Mountain agent genogroup. J. Gen. Virol. 76: 2739-2747.
- Jiang, X.W.M., Graham, D.Y. and M.K. Estes 1992a. Expression, self assembly and antigenicity of the Norwalk virus capsid protein. J. Virol. 66: 6527-6532.
- Jiang X.W.J., Graham, D.Y. and M.K. Estes 1992b. Detection of Norwalk virus in stool by polymerase chain reaction. J. Clin. Microb. 30: 2529-2534.
- Johansson, P.J.H., Torven, M., Hammarlund, A.C., Bjorne, U., Hedlund, K.O. and L. Svensson. 2002. Food-borne outbreak of gastroenteritis associated with genogroup I calicivirus. J. Clin. Microbiol. 40: 794-798.

- Kageyama, T., Kojima, S., Shinohara, M., Uchida, K., Fukushi, S., Hoshino, F.B., Takeda, N. and K. Katayama. 2003. Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-Like Viruses based on real-time quantitative reverset-PCR. J. Clin. Microbiol. 41: 1548-1557.
- Kageyama, T., Shinohara, M., Uchida, K., Fukushi, S., Hoshino, F.B., Kojima, S., Takai, R., Oka, T., Takeda, N. and K. Katayama. 2004. Coexistence of multiple genotypes, including newly identified genotypes, in outbreaks of gastroenteritis due to Norovirus in Japan. J. Clin. Microbiol. 42: 2988-2995.
- Kapikian, A. and R. Chanock 2001. Rotaviruses. In Fields Virology, Edts Knipe. D. M et Howley P.M., Griffin DE Raven Publishers, pp. 285-343
- Kapikian, A. Z. 2000. The discovery of the 27-nm Norwalk virus: an historic perspective. J. Infect. Dis. 181: S295-302.
- Karst, S.M., Wobus, C.E., Lay, M., Davidson, J. and H.W.T. Virgin. 2003. STAT1-dependent innate immunity to a Norwalk-like virus. Science 299: 1575-1578.
- Katayama, K., Shirato-Horikoshi, H., Kojima, S., Kageyama, T., Oka, T., Hoshino, F., Fukushi, S., Shinohara, M., Uchida, K., Suzuki, Y., Gojobori, T. and N. Takeda. 2002. Phylogenetic analysis of the complete genome of 18 Norwalk-like viruses. Virology 299: 225-239.
- Keswick, B.H., Satterwhite, T.K., Johnson, P.C., DuPont, H.L., Secor, S.L., Bitsura, J.A., Gary G.W. and J.C. Hoff. 1985. Inactivation of Norwalk virus in drinking water by chlorine. Appl. Environ. Microbiol. 50: 261-264.
- Kim, Y., Chang, K.O., Kim, W.Y. and L.J. Saif. 2002. Production of hybrid double or triple layered virus-like particles of group A and C rotaviruses using a baculovirus expression system. Virology **302**: 1-8.
- Kingsley, D.H. and G.P. Richards. 2003. Persistence of hepatitis A virus in oysters. J.Food Protection 66: 331-334.
- Kingsley, D.H., Meade, G.K. and G.P. Richards. 2002. Detection of both hepatitis A virus and Norwalk-like virus in imported clams associated with food-borne illness. Appl. Environ. Microbiol. 68: 3914-3918.
- **Kingsley, D.H. and G.P. Richards.** 2001. Rapid and efficient extraction method for reverse transcription-PCR detection of hepatitis A and Norwalk-like viruses in shellfish. Appl. Environ. Microbiol. **67:** 4152-4157.
- Kirkwood, C. 2004. Viral gastroenteritis in Europe: a new norovirus variant? Lancet 363: 671-672.
- Kitamoto, N., Tanaka, T., Natori, K., Takeda, N., Nakata, S., Jiang, X. and M.K. Estes. 2002. Crossreactivity among several recombinant calicivirus virus-like particles (VLPs) with monoclonal antibodies obtained from mice immunized orally with one type of VLP. J. Clin. Microbiol. **40**: 2459-2465.
- Kojima, S., Kageyama, T., Fukushi, S., Hoshino, F.B., Shinohara, M., Uchida, K., Natori, K., Takeda, N. and K. Katayama. 2002. Genogroup-specific PCR primers for detection of Norwalk-like viruses. J. Virol. Meth. 100: 107-114.
- Kok, T., Wati, S., Bayly, B., Devonshire Gill, D. and G. Higgins. 2000. Comparison of six nucleic acid extraction methods for detection of viral DNA or RNA sequences in four different non-serum specimen types. J. Clin.Vir. 16: 59-63.
- Koopmans, M. and E. Duizer. 2004. Foodborne viruses: an emerging problem. Int. J. Food Microbiol. 90: 23-41.
- Koopmans, M., Von Bosdorff, C.H., Vinje, J., de Medici, D. and S. Monroe. 2002. Foodborne viruses. FEMS Microbiol. Rev. 26: 187-205
- Kukkula, M., Maunula, L., Silvennoinen, E. and C.H. von Bonsdorff. 1999. Outbreak of viral gastroenteritis due to drinking water contaminated by Norwalk-like viruses. J. Infect. Dis. 180: 1771-1776.

L

- Labbe, M., Charpilienne, A., Crawford, S.E., Estes, M.K. and J. Cohen. 1991. Expression of rotavirus VP2 produces empty corelike particles. J. Virol. 65: 2946-2952.
- Lamothe, G.T., Putallaz, T., Joosten, H. and J.D. Marugg. 2003. Reverse transcription-PCR analysis of bottled and natural mineral waters for the presence of noroviruses. Appl. Environ. Microbiol. 69: 6541-6549.
- Laverick, M.A., Wyn-Jones, A.P. and M.J. Carter. 2004. Quantitative RT-PCR for the enumeration of noroviruses (Norwalk-like viruses) in water and sewage. Lett. Appl. Microbiol **39**: 127-136.
- Le Cann, P., Ranarijaona, S., Monpoeho, S., Le Guyader, F. and V. Ferre. 2004. Quantification of human astroviruses in sewage using real-time RT-PCR. Res. in Microbiol. 155: 11-15.
- Le Guyader, F., Neill, F.H., Dubois, E., Bon, F., Loisy, F., Kohli, E., Pommepuy, M. and R.L. Atmar. 2003. A semiquantitative approach to estimate Norwalk-like virus contamination of oysters implicated in an outbreak. Int.J. Food Microbiol. 87: 107-112.

- Le Guyader, F., Haugarreau, L., Miossec, L., Dubois, E. and M. Pommepuy. 2000. Three-year study to assess human enteric viruses in shellfish. Appl. Environ. Microbiol. 66: 3241-3248.
- Le Guyader, F., Menard, D., Dubois, E., Haugarreau, L., Kopecka, H. and M. Pommepuy. 1997. Use of an RT-PCR internal control to evaluate viral removal. Wat. Sci. Tech. 35: 461-465.
- Le Guyader, F., Estes, M.K., Hardy, M.E., Neill, F.H., Green, J., Brown, D.W. and R.L. Atmar. 1996. Evaluation of a degenerate primer for the PCR detection of human caliciviruses. Arch. Virol. 141: 2225-2235.
- Lees, D. 2004. Human pathogens associated with bivalve molluscan shellfish. Rapport final DG Sanco funded research projectin support of EU policy in the aera of microbiological contaminants of bivalve shellfish.
 Lees, D. 2000. Viruses and bivalve shellfish. Int. J. Food Microbiol.59: 81-116.
- Lees, D., Henshilwood, K., Green, J., Gallimore, C.I. and D.W. Brown. 1995. Detection of small round structured viruses in shellfish by reverse transcription-PCR. Appl. Environ. Microbiol 61: 4418-4424.
- Legeay, O., Caudrelier Y., Cordevant, C., Rigotiier-Gois, L. and M. Lange. 2000. Simplified procedure for detection of enteric pathogenic viruses in shellfish by RT-PCR. J. Vir. Meth. 90: 1-14.
- Leite, J.P., Ando, T., Noel, J.S., Jiang, B., Humphrey, C.D., Lew, J.F., Green, K.Y., Glass, R.I. and S.S. Monroe. 1996. Characterization of Toronto virus capsid protein expressed in baculovirus. Arch. Virol. 141: 865-875.
- Lindesmith, L., Moe, C., Marionneau, S., Ruvoen, N., Jiang, X., Lindblad, L., Stewart, P., LePendu, J. and R. Baric. 2003. Human susceptibility and resistance to Norwalk virus infection. Nat. Med. 9: 548-553.
- Lochridge, V.P. and M.E. Hardy. 2003. Snow Mountain virus genome sequence and virus-like particle assembly. Virus Genes 26: 71-82.
- Lodder, W.J., Vinje, J., van de Heide, R., Husman, A.M.D, Leenen, E. and M.P.G. Koopmans. 1999. Molecular detection of Norwalk-like caliciviruses in sewage. Appl. Environ. Microbiol 65: 5624-5627.
- Loisy, F., Atmar, R.L., Guillon, P., Le Cann, P., Pommepuy, M. and F. Le Guyader. 2004a. Real-time Rt-PCR for Noroviruses screening in shellfish. Acceptée dans J. Virol. Meth.
- Loisy, F., Atmar, R.L., Cohen, J., Bosch, A. and F. Le Guyader. 2004b. Rotavirus VLP2/6: a new tool for tracking rotavirus in the marine environment. Res. Microbiol. 155: 575-578.
- Loisy, F., Le Cann P., Pommepuy M. and F. Le Guyader. 2000. An improved method for the detection of Norwalk-like caliciviruses in environmental samples. Letters Appl. Microbiol. **31:** 411-415.
- Lopman, B., Vennema, H., Kohli, E., Pothier, P., Sanchez, A., Negredo, A., Buesa, J., Schreier, E., Reacher, M. and D. Brown. 2004. Increase in viral gastroenteritis outbreaks in Europe and epidemic spread of new norovirus variant. The Lancet 363: 682-688.
- Lopman, B.A., Adak, G.K., Reacher, M.H. and D.W.G. Brown. 2003. Two epidemiologic patterns of Norovirus outbreaks: Surveillance in England and Wales, 1992-2000. Emerg. Infect. Dis. 9: 71-77158.
- Lopman, B.A., Brown D.W.G. and M. Koopmans. 2002. Human caliciviruses in Europe. J. Clin. Virol. 24: 137-160.
- Liu, O.C., Seraichekas, H.R. and B.L. Murphy. 1967. Viral pollution and self-cleaning mechanism of hard clams. Transmission of viruses by water route. Edts Berg G. Interscience publisher. pp 41-437.

М

- Madore, H.P., Estes, M.K., Zarley, C.D., Hu, B., Parsons, S., Digravio, D., Greiner, S., Smith, R., Jiang, B. and A. Corsaro. 1999. Biochemical and immunologic comparison of virus-like particles for a rotavirus subunit vaccine. Vaccine 17: 2461-2471.
- Marionneau, S., Ruvoen, N., Le Moullac-Vaidye, B., Clement, M., Cailleau-Thomas, A., Ruiz-Palacois, G., Huang, P., Jiang, X. and J. Le Pendu. 2002. Norwalk virus binds to histo-blood group antigens present on gastroduodenal epithelial cells of secretor individuals. Gastroenterology 122: 1967-1977.
- Marshall, J., Botes, J., Gorrie, G., Boardman, C., Gregory, J., Griffith, J., Hogg, G., Dimitriadis, A., Catton, M. and R. Bishop. 2003. Rotavirus detection and characterisation in outbreaks of gastroenteritis in aged-care facilities. J. Clin. Virol. 28: 331-340.
- Mason, H.S., Ball, J.M., Shi, J.J., Jiang, X., Estes, M.K. and C.J. Arntzen. 1996. Expression of Norwalk virus capsid protein in transgenic tobacco and potato and its oral immunogenicity in mice. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 93: 5335-5340.
- Matsui, S.M. and H.B. Greenberg. 2000. Immunity to calicivirus infection. J. Infect. Dis. 181: S331-335.
- Mattion, N.M., Mitchell, D.B., Both, G.W. and M.K. Estes. 1991. Expression of rotavirus proteins encoded by alternative open reading frames of genome segment 11. Virol. 181: 295-304.
- Metcalf, T.G., Melnick, J.L. and M.K. Estes. 1995. Environmental virology: from detection of virus in sewage and water by isolation to identification by molecular biology-a trip of over 50 years. Ann. Rev. Microbiol. **49:** 461-487.

- Miossec, L., Le Guyader, F., Haugarreau, L. and M. Pommepuy. 2000. Magnitude of rainfall on viral contamination of the marine environment during gastroenteritis epidemics in human coastal population. Rev. Epid. Santé Publique **48 Suppl. 2:** 62-71.
- Miossec, L., Le Guyader, F., Haugarreau, L., Comps, M.A. and M. Pommepuy. 1998. Possible relation between a winter epidemic of acute gastroenteritis in France and viral contamination of shellfish. J. Shellfish Res. 17: 1661-1664.
- Monpoeho, S., Dehee, A., Mignotte, B., Schwartzbrod, L., Marechal, V., Nicolas, J. C., Billaudel, S. and V. Ferre. 2000. Quantification of enterovirus RNA in sludge samples using single tube real-time RT-PCR. Biotech. 29: 88-93.
- Mullendore, J.L., Sobsey, M.D. and Y.S.C. Shieh. 2001. Improved method for the recovery of hepatitis A virus from oysters. J. Virol. Meth. 94: 25-35.
- Muniain-Mujika, I., Calvo, M., Lucena, F. and R. Girones. 2003. Comparative analysis of viral pathogens and potential indicators in shellfish. Int. J. Food Microbiol. 83: 75-85.
- Muniain Mujika, I., Girones, R., Tofino Quesada, G., Calvo, M. and F. Lucena. 2002. Depuration dynamics of viruses in shellfish. Int. J. Food Microbiol. 77: 125-133.
- Muniain Mujika, I., Girones, R. and F. Lucena. 2000. Viral contamination of shellfish: evaluation of methods and analysis of bacteriophages and human viruses. J. Virol. Meth. 89: 109-118.
- Murphy, A.M., Grohmann, G.S., Christopher, P.J., Lopez, W.A., Davey, G.R. and R.H. Millsom. 1979. An australian wide outbreak of gastroenteritis from oysters caused by Norwalk virus. Med. J. Australia. 2: 329-333.
- Myrmel, M., Berg, E.M., Rimstad, E. and B. Grinde. 2004. Detection of enteric viruses in shellfish from the Norwegian coast. Appl. Environ. Microbiol **70**: 2678-2684.

N

- Nakagomi, O., Isegawa, Y., Ward, R.L., Knowlton, D.R., Kaga, E., Nakagomi, T. and S. Ueda. 1994. Naturally occurring dual infection with human and bovine rotaviruses as suggested by the recovery of G1P8 and G1P5 rotaviruses from a single patient. Arch. Virol. **137**: 381-388.
- Nejmeddine, M., Trugnan, G., Sapin, C., Kohli, E., Svensson, L., Lopez, S. and J. Cohen. 2000. Rotavirus spike protein VP4 is present at the plasma membrane and is associated with microtubules in infected cells. J. Virol. 74: 3313-3320.
- Nicand, E., Teyssou R. and Y. Buisson. 1998. Le risque fécal viral en 1998. Virol. 2: 103-116.
- Nicollier-Jamot, B., Ogier, A., Piroth, L., Pothier, P. and E. Kohli. 2004. Recombinant virus-like particles of a norovirus (genogroup II strain) administered intranasally and orally with mucosal adjuvants LT and LT(R192G) in BALB/c mice induce specific humoral and cellular Th1/Th2-like immune responses. Vaccine 22: 1079-1086.
- Nicollier-Jamot, B., Pico, V., Pothier, P. and E. Kohli. 2003. Molecular cloning, expression, self-assembly, antigenicity, and seroepidemiology of a genogroup II norovirus isolated in France. J. Clin. Microbiol. 41: 3901-3904.
- Nilsson, M., Hedlund, K.O., Thorhagen, M., Larson, G., Johansen, K., Ekspong, A. and L. Svensson. 2003. Evolution of human calicivirus RNA in vivo: Accumulation of mutations in the protruding P2 domain of the capsid leads to structural changes and possibly a new phenotype. J. Virol. **77:** 13117-13124.
- Nishida, T., Kimura, H., Saitoh, M., Shinohara, M., Kato, M., Fukuda, S., Munemura, T., Mikami, T., Kawamoto, A., Akiyama, M., Kato, Y., Nishi, K., Kozawa, K. and O. Nishio. 2003. Detection, quantitation, and phylogenetic analysis of noroviruses in japanese oysters. Appl. Environ. Microbiol. 69: 5782-5786.
- Noel, J.S., Fankhauser, R.L., Ando, T., Monroe, S.S. and R.I. Glass. 1999. Identification of a distinct common strain of "Norwalk-like viruses" having a global distribution. J. Inf. Dis. **179**: 1334-1344.
- Nuanualsuwan, S., Mariam, T., Himathongkham, S. and D.O. Cliver. 2002. Ultraviolet inactivation of feline calicivirus, human enteric viruses and coliphages. Photochem. Photobiol. **76:** 406-410.

0

- Oliver, S.L., Dastjerdi, A.M., Wong, S., El-Attar, L., Gallimore, C., Brown, D.W.G., Green, J. and J.C. Bridger. 2003. Molecular characterization of bovine enteric caliciviruses: a distinct third genogroup of noroviruses (Norwalk-like viruses) unlikely to be of risk to humans. J. Virol. 77: 2789-2798.
- Pain, S. 1986. Are British shellfish safe to eat ? New Sci: 29-33.

- Р
- Palombo, E.A. 2002. Genetic analysis of Group A rotaviruses: evidence for interspecies transmission of rotavirus genes. Virus Genes 24: 11-20.
- Pancorbo, O.C., Evanshemn, B.G., Campbell, W.F., Lambert, S., Curtis, S.K. and T.W. Woolley 1987. Infectivity and antigenicity reduction rates of human rotavirus strain Wa in fresh waters. Appl. Environ. Microbiol. 53: 1803-1811.
- Parashar, U.D., Hummelman, E.G., Bresee, J. S., Miller, M.A. and R.I. Glass. 2003. Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. Emerg. Infect. Dis. 9: 565-572.
- Pasloske, B.L., Walkerpeach, C.R., Obermoeller, R.D., Winkler, M. and D.B. DuBois. 1998. Armored RNA technology for production of ribonuclease-resistant viral RNA controls and standards. J. Clin. Microbiol 36: 3590-3594.
- Pommepuy, M., Bosch, A., de Roda Husman, A. M, Svensson, L., Loisy, F., Cohen, J., Atmar, R., van der Pelt-Heershap, H., Caprais, M.P., Le Saux, J.C., Brest, G., and F. Le Guyader. Viral shellfish contamination and consumer protection : data and recommendations from the « Virus Safe Seafood » EU project. Soumis à J. Shellfish Res.
- Pommepuy, M., Dumas, F., Caprais, M.P., Camus, P., Le Mennec, C., Parnaudeau, S., Haugarreau, L., Sarrette, B., Vilagines, P., Pothier, P., Kholi, E. and F. Le Guyader. 2004. Sewage impact on shellfish microbial contamination. Wat. Sci. Tech. 50: 117-124.
- Pommepuy, M., Cohen, J., Bosch, A., van Pelt-Heerschap, H., van der Poel, W., Svensson, L., Atmar, R., Estes, M.K. and G. Brest. 2003a. Rapport final Virus Safe Seafood. http://www.ifremer.fr/vsseafood
- Pommepuy, M., Caprais, M.P., Le Saux, J.C., Le Mennec, C., Parnaudeau, S., Madec, Y., Monier, M., Brest, G. and F. Le Guyader. 2003b. Evaluation of viral shellfish depuration in a semi-professional size tank. Molluscan Shellfish Safety, Edts Villalba et al., pp 485-499.
- Pommepuy, M., Caprais, M.P., Bon, F., Le Mennec, C., Parnaudeau, S., Pothier, P., Kohli, E., Brachet, R., Flahault, A., Sarrete, B., Vilagines, P., Camus, P., Dimeet, J., Treguier, C. and F. Le Guyader. 2002. Contamination virale et indicateurs du risque. Rapport interne Ifremer, 98 p.
- Prasad, B.V.V., Hardy, M.E., Dokland, T., Bella, J., Rossmann, M.G. and M.K. Estes. 1999. X-ray crystallographic structure of the Norwalk virus capsid. Science 286: 287-290.
- Prasad, B.V.V., Hardy, M.E. and M.K. Estes. 2000. Structural studies of recombinant Norwalk capsids. J. Inf. Dis. 181 Suppl. 2: S317-S321.

R

- Rabenau, H.F., Sturmer, M., Buxbaum, S., Walczob, A., Preiser, W. and H.W. Doerr. 2003. Laboratory diagnosis of norovirus: which method is the best? Intervirol. 46: 232-238.
- Redman, J.A., Grant, S.B. and T.M. Olson. 1997. Filtration of recombinant Norwalk virus particles and bacteriophage MS2 in quartz sand: importance of electrostatic interactions. Environ. Sci. Tech. **31**: 3378-3383.
- Redman, J.A., Grant, S.B., Olson, T.M. and M.K. Estes. 2001. Pathogen filtration, heterogeneity, and the potable reuse of wastewater. Environ. Sci. Tech. 35: 1798-1805.
- **Ribao, C., Torrado, I., Vilarino, M.L. and J.L. Romalde.** 2004. Assessment of different commercial RNAextraction and RT-PCR kits for detection of hepatitis A virus in mussel tissues. J. Virol. Meth. **115**: 177-182.
- Richards, G.P. 1988. Microbial purification of shellfish: a review of depuration and relaying. J. food Protect. 51: 218-251.
- Richards, G.P., Watson, M.A. and D.H. Kingsley. 2004. A SYBR green, real-time RT-PCR method to detect and quantitate Norwalk virus in stools. J. Virol. Meth. 116: 63-70.
- Romalde, J.L., Estes, M.K., Szucs, S. G., Atmar, R.L., Woodley, C.M. and T.G. Metcalf. 1994. In situ detection of hepatitis A virus in cell cultures and shellfish tissues. Appl. Environ. Microbiol 60: 1921-1926.
- Roderick, G.E. and K.R. Schneider. 1994. Depuration and relaying of molluscan shellfish. In the environmental indicators and shellfish safety. Edts Harkney C. R., Pierson M. B. pp 331-363.
- Rzezutka, A. and N. Cook. 2004. Survival of human enteric viruses in the environment and food. FEMS Microbiol. Rev. available online

Sair, A.I., Souza, D.H.D., Moe, C.L. and L.A. Jaykus. 2002. Improved detection of human enteric viruses in foods by RT-PCR. J. Virol. Meth. 100: 57-69.

S

- Schaub, S.A. and R.K. Oshiro. 2000. Public health concerns about caliciviruses as waterborne contaminants. J. Inf. Dis. 181 Suppl. 2: S374-S380.
- Schvoerer, E., Bonnet, F., Dubois, V., Cazaux, G., Serceau, R., Fleury, H.J.A. and M.E. Lafon. 2000. PCR detection of human enteric viruses in bathing areas, waste waters and human stools in southwestern France. Res. Microbiol. 151: 693-701.
- Schvoerer, E., Bonnet, F., Dubois, V., Rogues, A.M., Gachie, J.P., Lafon, M.E. and H.J.A Fleury. 1999. A hospital outbreak of gastroenteritis possibly related to the contamination of tap water by a small round structured virus. J. Hosp. Infect. **43**: 149-54.
- Schwab, K.J., Neill, F.H., Fankhauser, R.L., Daniels, N.A., Monroe, S.S., Bergmire Sweat, D.A., Estes, M.K. and R.L. Atmar. 2000. Development of methods to detect "Norwalk-like viruses" (NLVs) and hepatitis A virus in delicatessen foods: Application to a food-borne NLV outbreak. Appl. Environ. Microbiol 66: 213-218.
- Schwab, K.J., Neill, F.H., Estes, M.K., Metcalf, T.G. and R.L. Atmar. 1998. Distribution of Norwalk virus within shellfish following bioaccumulation and subsequent depuration by detection using RT-PCR. J. Food Prot. 61: 1674-1680.
- Shieh, Y.C., Baric, R.S., Woods, J.W. and K.R. Calci. 2003. Molecular surveillance of enterovirus and Norwalk-like virus in oysters relocated to a municipal-sewage-impacted gulf estuary. Appl. Environ. Microbiol. 69: 7130-7136.
- Shieh, Y.C., Monroe, S.S., Fankhauser, R.L., Langlois, G.W., Burkhardt, W. and R.S. Baric. 2000. Detection of Norwalk-like virus in shellfish implicated in illness. J. Inf. Dis. 181 Suppl. 2: S360-S366.
- Shin, G.A. and M.D. Sobsey. 2003. Reduction of Norwalk Virus, Poliovirus 1, and bacteriophage MS2 by ozone disinfection of water. Appl. Environ. Microbiol. 69: 3975-3978.
- Slomka, M.J. and H. Appleton. 1998. Feline calicivirus as a model system for heat inactivation studies of small round structured viruses in shellfish [In Process Citation]. Epidemiol. Infect. **121**: 401-407.
- Smiley, J.R., Hoet, A.E., Traven, M., Tsunemitsu, H. and L.J. Saif. 2003. Reverse transcription-PCR assays for detection of bovine enteric caliciviruses (BEC) and analysis of the genetic relationships among BEC and human caliciviruses. J. Clin. Microbiol. 41: 3089-3099.
- Smiley, J.R., Chang, K.O., Hayes, J., Vinje, J. and L.J. Saif. 2002. Characterization of an enteropathogenic bovine calicivirus representing a potentially new calicivirus genus. J. Virol.76: 10089-10098.
- Sobsey, M.D. and L.A. Jaykus. 1991. Human enteric viruses and depuration of bivalve mollusks. Molluscan Shellfish depuration. Edts Otwell W. S., Rodrick G.E., Martin R.E. CRC Press. pp 71-114
- Sugieda, M. and S. Nakajima. 2002. Viruses detected in the caecum contents of healthy pigs representing a new genetic cluster in genogroup II of the genus "Norwalk-like viruses". Virus Res. 87: 165-172.
- Sugieda, M., Nakajima, K. and S. Nakajima. 1996. Outbreaks of Norwalk-like virus-associated gastroenteritis traced to shellfish: coexistence of two genotypes in one specimen. Epidemiol. Infect. **116**: 339-346.
- Sunen, E., Casas, N., Moreno, B. and C. Zigorraga. 2004. Comparison of two methods for the detection of hepatitis A virus in clam samples (Tapes spp.) by reverse transcription-nested PCR. Int. J. Food Microbiol. 91: 147-154.

Т

- Tacket, C.O., Sztein, M.B., Losonsky, G.A., Wasserman, S.S. and M.K. Estes. 2003. Humoral, mucosal, and cellular immune responses to oral Norwalk virus-like particles in volunteers. Clin. Immunol. 108: 241-247.
- Tacket, C.O., Mason, H.S., Losonsky, G., Estes, M.K., Levine, M.M. and C.J. Arntzen. 2000. Human immune responses to a novel Norwalk virus vaccine delivered in transgenic potatoes. J. Inf. Dis. 182: 302-305.
- Tamura, M., Natori, K., Kobayashi, M., Miyamura, T. and N. Takeda. 2000. Interaction of recombinant norwalk virus particles with the 105-kilodalton cellular binding protein, a candidate receptor molecule for virus attachment. J. Virol.74: 11589-11597.
- Tan,M., Hegde, R.S., Jiang, X. 2004. The P domain of norovirus capsid protein forms dimer and binds to histoblood antigen receptors. J. Virol. 78: 6233-42.
- Tan, M., Huang, P., Meller, J., Zhong, W. Farkas, T., Jiang, X. 2003. Mutations within the P2 domain of norovirus capsid affect binding to human histo-blood group antigens: evidence for a binding pocke. J. Virol. 77: 12562-71.
- Thurston-Enriquez, J.A., Haas, C.N., Jacangelo, J. and C.P. Gerba. 2003. Chlorine inactivation of adenovirus type 40 and feline calicivirus. Appl. Environ. Microbiol. 69: 3979-3985.
- **Traore, O., Belliot, G., Mollat, C., Piloquet, H., Chamoux, C., Laveran, H., Monroe, S.S. and S. Billaudel.** 2000. RT-PCR identification and typing of astroviruses and Norwalk-like viruses in hospitalized patients with gastroenteritis: evidence of nosocomial infections. J. Clin.Virol. **17:** 151-158.

Tsai, Y.L., Tran, B. and C.J. Palmer. 1995. Analysis of viral RNA persistence in seawater by reverse transcriptase-PCR. Appl. Environ. Microbiol 61: 363-366.

V

- Van der Poel, W.H.M., Vinje, J., van der Heide, R., Herrera, M.I., Vivo, A. and M.P.G. Koopmans. 2000. Norwalk-like calicivirus genes in farm animals. Emerg. Inf. Dis. 6: 36-41.
- Van Regenmortel, M.H.V. 2000. Virus Taxonomy. VIIth report of the ICTV. Academic Press. pp 1167.
- Vaughn, J.M., Chen, Y.S., Lindburg, K. and D. Morales. 1987. Inactivation of human and simian rotaviruses by ozone. Appl. Environ. Microbiol 53: 2218-2221.
- Velazquez, F.R., Matson, D.O., Guerrero, M.L., Shults, J., Calva, J.J., Morrow, A.L., Glass, R.I., Pickering, L.K. and G.M. Ruiz-Palacios. 2000. Serum antibody as a marker of protection against natural rotavirus infection and disease. J. Inf. Dis. 182: 1602-1609. Epub 2000 Oct 23.
- Vennema, H., de Bruin, E. and M. Koopmans. 2002. Rational optimization of generic primers used for Norwalk-like virus detection by reverse transcriptase polymerase chain reaction. J. Clin. Virol. 25: 233-235.
- Vilagines, P., Suarez, A., Sarrette, B. and R. Vilagines. 1997. Optimisation of the PEG reconcentration procedure for virus detection by cell culture or genomic amplification. Wat. Sci.Tech. 35: 455-459.
- Villena, C., El-Senousy, W.M., Abad, F.X., Pinto, R.M. and A. Bosch. 2003. Group A Rotavirus in sewage samples from Barcelona and Cairo: Emergence of unusual genotypes. Appl. Environ. Microbiol. 69: 3919-3923.
- Vinje, J., Hamidjaja, R.A. and M.D. Sobsey. 2004. Development and application of a capsid VP1 (region D) based reverse transcription PCR assay for genotyping of genogroup I and II noroviruses1. J. Virol. Meth. 116: 109-117.
- Vinje, J., Vennema, H., Maunula, L., von Bonsdorff, C.H., Hoehne, M., Schreier, E., Richards, A., Green, J., Brown, D., Beard, S.S., Monroe, S.S., de Bruin, E., Svensson, L. and M.P.G. Koopmans. 2003. International collaborative study to compare reverse transcriptase PCR assays for detection and genotyping of noroviruses. J. Clin. Microbiol. 41: 1423-1433.
- Vinje, J. and M.P.G. Koopmans. 2000. Simultaneous detection and genotyping of "norwalk-like viruses" by oligonucleotide array in a reverse line blot hybridization format. J. Clin. Microbiol. **38**: 2595-2601.
- Vinje, J. and M.P.G. Koopmans. 1996. Molecular detection and epidemiology of small round-structured viruses in outbreaks of gastroenteritis in the Netherlands. J. Inf. Dis. 174: 610-615.

W

- White, L.J., Ball, J.M., Hardy, M.E., Tanaka, T.N., Kitamoto, N. and M.K. Estes. 1996. Attachment and entry of recombinant Norwalk virus capsids to cultured human and animal cell lines. J. Virol.**70:** 6589-6597.
- Widdowson, M.A., Cramer, E.H., Hadley, L., Bresee, J.S., Beard, R.S., Bulens, S.N., Charles, M., Chege, W., Isakbaeva, E., Wright, J.G., Mintz, E., Forney, D., Massey, J., Glass, R.I. and S.S. Monroe. 2004. Outbreaks of acute gastroenteritis on cruise ships and on land: identification of a predominant circulating strain of norovirus-United States, 2002. J. Inf. Dis. 190: 27-36. Epub 2004 Jun 8.
- Wise, A.G., Monroe, S.S., Hanson, L.E., Grooms, D.L., Sockett, D. and R.K. Maes. 2004. Molecular characterization of noroviruses detected in diarrheic stools of Michigan and Wisconsin dairy calves: circulation of two distinct subgroups. Virus Res. **100**: 165-177.

Y

Yuen, L.K.W., Catton, M.G., Cox, B.J., Wright P.J. and J.A. Marshall. 2001. Heminested multiplex reverse transcription-PCR for detection and differentiation of Norwalk-like virus genogroups 1 and 2 in fecal samples. J. Clin. Microbiol. 39: 2690-2694.

Z

Zeng, C.Q., Estes, M.K., Charpilienne, A. and J. Cohen. 1998. The N terminus of rotavirus VP2 is necessary for encapsidation of VP1 and VP3. J. Virol.72: 201-208.

Séjour doctoral

D'octobre à mars j'ai eu l'opportunité de séjourner pendant 6 mois dans le département « Food Animal Health Research Program » (FAHRP) de l'Ohio Agricultural Research and Development Center (OARDC, Ohio State University) dans le département de Médecine Vétérinaire Préventive.





Ce laboratoire, dirigé par le professeur Linda Saif, se compose d'une professeur assistante, de 3 techniciens, 2 post-doctorants, 5 thèsards, un étudiant en master, une « visiting scientist » et un étudiant du « College of Wooster ». Les principaux thèmes de recherche sont :

- identification et mise en évidence du rôle des agents infectieux associés aux pathologies humaines et animales,
- étude du pouvoir pathogène, des facteurs de virulence et de l'épidémiologie associés à ces virus,
- études des réponses immunitaires de l'hôte,

- évaluation du contrôle des maladies infectieuses, de leur prévention et des stratégies d'élimination.

Les virus animaux, et plus particulièrement les virus porcins et bovins sont les plus étudiés. Les virus recherchés sont les Entérovirus de gastro-entérites transmissibles (TGEV), les Coronavirus porcins, les Torovirus bovins, les Calicivirus et les Rotavirus. Ces 2 derniers occupent la majeure partie du travail de recherche. Ce laboratoire possède une grande expérience concernant la production de VLPs rotavirus et l'utilisation de méthodes (ELISA, western-blot...) permettant l'étude de l'immunité et le développement de vaccins.

Le Pr Saif, par ses compétences sur la détection des calicivirus animaux, a proposé en collaboration avec d'autres laboratoires américains un projet d'études intitulé « les pathogènes entériques dans les huîtres ». Les buts de ce projet sont :

- étudier la présence et la prévalence des calicivirus, des coliformes fécaux, des *Campylobacter spp*. et des *Salmonella spp*. dans les huîtres commercialisées aux USA
- comparer les souches de calicivirus, de coliformes fécaux, de *Campylobacter spp.* et de *Salmonella spp.* détectées dans les huîtres commercialisées avec les souches associées aux gastroentérites humaines
- évaluer les techniques utilisées par les agences « State Shellfish Sanitation » identifier le risque de santé publique
- évaluer le système de classification des parcs de production ostréicole basée sur un contrôle de la croissance bactérienne (impédancemétrie).

Dans le cadre de ces travaux, ma compétence en matière de recherche de virus dans les coquillages a été appréciée. Les actions réalisées dans ce laboratoire au cours de ce séjour m'ont permis :

- d'implanter la technique d'analyse des huîtres

- de la valider sur des échantillons commercialisés

J'ai également suivi une épidémie qui s'est déclarée à Wooster durant mon séjour. Par rapport à ma thèse, outre la valorisation de ce travail par des publications conjointes, ce séjour m'a permis d'acquérir des compétences méthodologiques sur les VLPs, le portage animal et la culture cellulaire.

Extraction des ARNs viruax à partir de selles : QI Amp Viral RNA QI AGEN

Réactifs et matériels

QIAmp Viral RNA kit éthanol à 100% pipettes et embouts stériles PBS stérile

Préparation des dilutions des selles

Faire une suspension de selles de 10 à 50% dans 1 ml de PBS stérile.

Centrifuger 30 min à 300 rpm et récupérer le surnagenant

Centrifuger 15 min à 10 000 rpm et récupérer le surnagenant, renouveler l'opération si le surnageant est encore trouble.

Extraction

Mettre X x 140 µl de suspension de selles dans un tube de 5 ml. Ajouter X x 560 µl de tampon AVL+carrier, vortexer. Incuber 10 min à temprérature ambiante. Ajouter X x 560 µl d'éthanol à 100%, vortexe.r Mettre 630 µl de solution de selles lysées sur la colonne. Centrifuger 1 min à 6000g. Vider le tube à déchet et répéter l'opération jusqu'à avoir passer toute le solution de lyse des selles. Mettre la colonne sur un tube propre et déposer 500 µl de tampon de lavage AW1. Centrifuger 1 min à 6000g. Mettre la colonne sur un tube propre et déposer 500 µl de tampon de lavage AW2. Centrifuger 3 min à 20 000g. Mettre la colonne sur un tube propre et centrifuger 1 min à 6000g. Mettre la colonne sur un tube propre et déposer 50 µl d'eau RNAse free. Incuber 5min à 80°C dans un thermixeur. Centrifuger 1 min à 6000g et récupérer l'ADN élué.

Conservation à -80°C.

Extraction des ARN viraux à partir des coquillages : « méthode Baylor »

Réception et dissection

Dès réception noter sur le cahier de prélèvement la date, le lieu et l'espèce des coquillages. Laver les coquillages à l'eau distillée stérile, les ouvrir et placer la chair dans une boîte de pétri sur de la glace

Dissséquer soigneusement les hépato-pancréas et les placer dans une nouvelle boîte de pétri sur la glace

Aliquoter les hépato-pancréas dans des tubes épendorf soous un poids de 1,5 g

Conserver le reste des hépato-pancréas (dissection grossière) dans un pot à prélèvement Marquer soigneusement les tubes et les congeler

Noter sur le cahier le nombre de tubes et de pots congelés

Extraction

- Broyer un aliquot de 1,5 g au poter en présence de 2 ml de PBS.

- Verser dans un tube à usage unique de 50 ml, rincer le poter par 3 ml de tampon glycine pH

9,6 puis par 3 ml de chloroforme-butanol. Verser sur le broyat de coquillage, vortexer 30 sec.
Ajouter 0,5 ml de Cat-Floc, mélanger immédiatement par renversement, agiter doucement 5 min à température ambiante.

- Décanter 15 min sur la paillasse, centrifuger 15 min à 13 500 xg à 4°C.

- Récupérer le surnageant avec une pastette (ne surtout pas prendre de chloroforme-butanol) et verser le dans un tube de polypropylène contenant 3 ml de PEG/NaCl..

- Agiter doucement 1 h à 4°C puis centrifuger 20 min à 11 000 xg à 4°C. Eliminer le surnageant et laisser le tube s'égoutter pendant quelques minutes sur papier absorbant.

- Dissoudre le culot dans 1 ml de Trizol et centrifuger à 12 000 xg 10 min à 4°C.
- Récupérer le surnageant et laissr 5 min à température ambiante.
- Ajouter 0,2 ml de chloroforme, agiter 15 sec puis incuber 2-3 min à température ambiante.
- Centrifuger 15 min à 12 000 xg à 4°C et récupére l'ARN dans la phase incolore.
- Précipiter avec 0,5 ml d'isopropanol et incuber 15 min à température ambiante.
- Centrifuger 10 min à 12 000 xg à 4°C.

- Dissoudre le culot dans 450 μ l d'eau stérile et 180 μ l de CTAB, incuber 15 min à température ambiante puis centrifuger à 12 000 XG pendant 30 min à 24°C.

- Reprendre le culot dans 0,15 ml de NaCl 1M, noter le volume (x μ l)obtenu et ajouter 300- x μ l d'eau DEPC, ajouter 30 μ l d'acétate de sodium et 900 μ l d'éthanol absolu.

- Précipiter 30 min à -80°C (ou la nuit à -20°C) et centrifuger 30 min à 13 000 xg à 4°C.
- Rincer par 500 µl d'éthanol à 70°C puis centrifuger 10 min à 13 000 xg à 4°C.
- Sécher le culot 5 min au speed vaccum.
- Reprendre le culot dans 100 µl d'eau distillée stérile.

Tampons

PBS/NaCl : 145 mM NaCl 7,7 mM Na₂HPO₄ 2,3 mM NaH₂PO₄ H₂O qsp 1 litre Répartir en flacons de 100 ml et autoclaver

Chloroforme/ butanol : 50 % CHCl₃/ 50 % 1-butanol (volume à volume)

PEG/NaCl : 24 % P/V PEG 6000 1,2 M NaCl H₂O stérile qsp 500 ml

CTAB/NaCl : 5 % CTAB 0,4 M NaCl H₂O stérile qsp 100 ml

Extraction des ARN viraux à partir de coquillage: Kit Qiagen Rneasy Plant

Avant toute chose :

- allumer le bain-marie à 56°C
- préparer le tampon RLT : ajouter 10 μ l de β -mercaptoéthanol (solution mère à 14,5 M) pour 1 ml de tampon
- préparer le tampon RPE : 1 volume de tampon + 4 volume d'éthanol absolu
- toutes les centrifugations se font à 10 000 g à 20°C
- utiliser des cônes à filtre
- Reprendre le culot de PEG dans 450 μl de tampon RLT : bien homogénéiser le culot avec la pointe du cône contre la paroi du tube. Fermer le tube avec du saran et incuber 3 min à 56°C. Vortexer rapidement pour bien homogénéiser.
- 2. Transférer sur une colonne violette (marquer le N° sur le tube et pas sur la colonne). Centrifuger 2 min. Conserver la phase liquide.
- 3. Ajouter 225 μl d'éthanol absolu, mélanger avec le cône, transférer sur une colonne rose (marquer le N° sur la colonne). Centrifuger 15 sec.
- 4. Vider le tube collecteur, rincer la colonne avec 700 μl de tampon RW1. Centrifuger 15 sec.
- 5. Changer le tube collecteur et ajouter 500 µl de tampon RPE. Centrifuger 15 sec.
- 6. Vider le tube collecteur et ajouter 500 µl de tampon RPE. Centrifuger 2 min.
- 7. Prendre 650 μl d'eau distillée stérile et ajouter 5 μl de RNAse OUT (Ribonuclease Inhibitor, Invitrogen). Mélanger.
- Placer la colonne sur un tube de 1,5 ml et éluer la colonne avec 50 μl d'eau/ RNAse out. Centrifuger 1 min.
- Répéter la phase d'élution une seconde fois. Homogénéiser le tube et séparer immédiatement en 2. Etiqueter les 2 tubes (nom de l'échantillon, date de prélèvement, date d'extraction entre parenthèse). Congeler un aliquot à -70°C.

Extraction des ARN viraux à partir des eaux de station d'épuration

Ultracentrifugation

Déposer 5 ml d'eau de station dansun tube d'ultracentrifugation. Centrifuger à 50 000 rpm à 4°C pendant 1 heure. Eliminer le surnagenat

Extraction de l'ARN viral (kit Boehringer High Pure Viral RNA kit)

Reprendre le culot dans 200 µl d'eau stérile.

Ajouter 400 µl de solution de lyse du kit (binding buffer contenant l'ARN poly A carrier). Vortexer et laisser 10 min à température ambiante.

Transférer lecontenu du tube sur une colonne disposée sur une tube collecteur. (si la solution présente des agrégats, centrifuger 1 min à 8000g puis transférer le surnageant sur la colonne). Centrifuger 15 secondes à 8000g.

Transférer la colonne sur un tube collecteur, ajouter 450 µl de solution de lavage. centrifuger 15 secondes à 8000g.

Transférer la colonne sur un tube collecteur, ajouter 450 µl de solution de lavage.

Centrifuger 15 secondes à 8000g puis 10 secondes à 15000g.

Transférer la colonne sur un tube épendorf, ajouter 50 µl de tampon d'élution. Centrifuger 1 min à 8000g.

Reprendre le culot dans 50 µl d'eau stérile.

Hybridation

1- Préhybridation :

En tampon d'hybridation pendant au moins 30 min. à 50°C (sous agitation). Mettre les sondes à décongeler

2- Hybridation :

Eliminer le tampon de préhybridation et mettre la membrane en contact avec la sonde marquée diluée dans le tampon d'hybridation (1 à 10 pmol/ml).

Temps de contact : 2h à 50°C (sous agitation) pour EV, AV, CV, HAV.

2h à 38°C (sous agitation \Rightarrow four écotox) pour RV (sonde VP4)

♦ NE PAS JETER LES SONDES ♦

<u>N.B.</u>: faire une croix sur le tube de sonde, après 5 utilisation , on jette les sondes

3- Lavages sous agitation :

2 fois 5 min. à température ambiante en 2x SSC/ .0,1% SDS

2 fois 15 min. à 45 °C (ou 32°C pour RV) en 0.5xSSC/0.1% SDS.

3. Révélation :

<u>N.B.</u>: Toutes les étapes se font sous agitation à température ambiante avec les réactifs à température ambiante \Rightarrow amener le four à 21 °C

1- Rinçage **5 min. dans le tampon de lavage** (possibilité de conserver les membranes à ce stade pendant environ 24H).

2- rassembler les membranes dans les tubes (pas plus de 3 membranes/tube)

2- Incubation **30 min.** (ou plus) dans **tampon 2** (faible volume).

3- Incubation 30 min. avec l'anticorps Anti-Dig-Alkaline-Phosphatase dilué au 1:10000 soit 1 μ l dans 10 ml de tampon 2 (peut se conserver 24h à +4°C)

♦ NE PAS JETER LA SOLUTION D'ANTICORPS ♦

4- Lavages 2 fois 15 min. dans tampon de lavage (grand volume).

5- Rinçage dans tampon 3 (faible volume) pendant environ 5 min.

6- **Sceller** les membranes sous plastique.

7-Préparer la solution de CDP STAR diluée au 1/100 soit 10µl de CDP STAR dans 1 ml de tampon 3.

8- **Déposer environ 1 à 5 ml** de CDP STAR dilué dans le sac (selon la surface des membranes de sorte à ce qu'elles soient bien recouvertes).

9- **Fermer** le sac en le soudant.

10- Placer les **membranes** (**face écrite vers le haut**) cliquer sur **«position»**, centrer les membranes, puis **«stop »**, puis régler l'ouverture du diaphragme de la caméra sur 1,4 11- Dans le menu **« select »**, choisir **« custom »**, puis **« dot blot »**.

11- Dans le menu « select », choisir « custom », puis « dot blot ».

13- Régler le temps d'acquisition sur 600 sec., puis « acquire ».

14- Après 20 min. l'image apparaît, elle peut être traitée (« **image** » puis « **transform** »), enregistrée (« **save as** ») puis imprimer (« **file** », « **print** » puis « **print actual size** »)

Si la membrane n'est pas sèche, déshybrider en faisant **bouillir** dans du **0.5% SDS** et laisser refroidir.

Tous les tampons sont à utiliser à température ambiante

Tampon d'hybridation :

Tumpon a nyoriaan						
SSC (20 X) Agent bloquan N-laurylsarcos SDS (10%) H ₂ O	22 t 1 ine 0. 0. qs	5 ml g .1 g .2 ml sp 100 ml	5x 1% 0.1% 0.02%		Chauffe mari disso	er éventuellement au bain- e à 50-60°C pour bien oudre l'agent bloquant (Borhinger)
Solutions de lavages	:				(Conserver a 4°C
2X SSC/0.1% SDS	5					
SSC (20 X)	1(00 ml				
SDS(10X)	1	0 ml				
H ₂ O	q	sp 11				
0.5X SSC/0.1% SI	DS					
SSC (20 X)	2:	5 ml				
SDS (10X)	10	0 ml				
H ₂ O	q	sp 11				
20X SSC						
NaCl	1′	75.3 g	87.65g			
Citrate de Na	8	8.2 g	44.10 g			Sterinser a l'autociave
H_2O	q	sp 11	qsp 500 n	nl		
HCl 1N	p]	Ĥ 7				
Tampon pour la révé	elation					
Tampon 1 : Tamp	on maléate					
Acide maléiqu	e 1	1.61g	100 mM			
NaCl	8	.77g	150mM			
NaOH	7.	.00g				
H ₂ O	a	sp 11				
NaOH 10N	p]	H 7.5				
Tampon de lavage						
Tampon 1	11	1				Conserver à 4°C
Tween 20	3	ml	0.3% (v/v	7)		
Tampon 2 : agent	bloquant					
Agent bloquan	t 1	g	ſ	Bien	dissoud	re l'agent bloquant au bain
Tampon 1		00 ml			a 3 56°C	
T C				Conse	erver de	s aliquote de 20 ml à –20°C
Tampon 3						•
Tris HCl (1 M)) 50	0ml	0.1M			
NaCl (5M)	10	0ml	0.1M			
H2O	q	sp 500ml				
NaOH 10N	pl	H 9.5				

RESUME

Cette thèse s'est développée selon deux axes de recherche: l'amélioration de la détection des norovirus (humains et animaux) et des rotavirus, et l'évaluation du potentiel des VLPs comme substitut viral pour l'étude de leur devenir en milieu marin. Le point majeur concernant l'optimisation de la détection est la mise au point de la détection des norovirus par RT-PCR en temps réel. La seconde partie du travail a permis de mettre en évidence le potentiel des VLPs de RV et de NV à se substituer aux virus natifs, prouvé par une étude de stabilité des particules en eau de mer naturelle. Grâce à leur caractère non pathogène, la longue persistance des VLPs RV dans les coquillages a été démontrée en conditions naturelles (huîtres sur estran). Les études de fixation des VLPs NV sur les tissus d'huîtres ont montré une fixation spécifique sur divers tissus.

Mots clés

norovirus, rotavirus, VLPs, RT-PCR en temps réel, coquillage, persistance, fixation spécifique

Laboratoire de rattachement

IFREMER, laboratoire de Microbiologie BP 21105, 44311 Nantes cedex 3

Groupe de formation doctorale : MICROBIOLOGIE/PARASITOLOGIE Université Paris XI, faculté de pharmacie de Châtenay-Malabry 5, rue Jean-Baptiste Clément

92296 Châtenay- Malabry cedex