

**Recherche par « RT-PCR » des virus enteriques
chez des moules (<Mytilus galloprovincialis>)
et des palourdes (<Ruditapes decussatus>)**

Item Type	Journal Contribution
Authors	Aouni, M.; Essebai El Amri, D.
Citation	Bulletin de l Institut national des sciences et technologies de la Mer, 32. p. 93-98
Publisher	INSTM
Download date	06/02/2023 13:20:06
Link to Item	http://hdl.handle.net/1834/3755

RECHERCHE PAR « RT-PCR » DES VIRUS ENTERIQUES CHEZ DES MOULES (*MYTILUS GALLOPROVINCIALIS*) ET DES PALOURDES (*RUDITAPES DECUSSATUS*)

Dorsaf ESSEBAI ELAMRI^{1*}, M. AOUNI²

1-Institut National des Sciences et Technologies de la Mer (INSTM), Tunis, Tunisie. Tél. /Fax : 00 216 (71) 735 848

2- Faculté de Pharmacie, Laboratoire des Maladies Transmissibles Et Substances Biologiquement Actives (LAB.MDT-01), Monastir, Tunisie. Tél. : 00 216 (73) 461 000.

* e_dorsaf@yahoo.fr/ dorsaf.elamri@instm.rnrt.tn

ملخص

البحث عن الفيروسات المعوية الممرضة للإنسان عند بلع البحر و المحار : وردت ضمن هذه الدراسة مقارنة تقييميه لطريقتين لاستخلاص اربعة انواع من الفيروسات المعوية الممرضة للإنسان (فيروس الايباتيت-أ- ، الاستروفيروس ، النورولك فيروس و الانثيرو فيروس) و المحمولة في أنسجة بلع البحر و المحار و ذلك باستعمال تقنية تفاعلات أنزيم البلمرة المتسلسل . وقع جمع عينات الصدفيات الغير معالجة بين شهر مارس 2000 و شهر سبتمبر 2001 من مواقع طبيعية مختلفة من بحيرة بنزرت الكائنة بشمال تونس. من بين النتائج المتحصل عليها ضمن هذه الدراسة تبين لنا ان نسبة تشخيص الفيروسات باستعمال تقنية تفاعلات أنزيم البلمرة المتسلسل تكون افضل عندما يقع استخراج الفيروسات من المعدة و من الجهاز الهضمي للصدفيات علي نقيض استعمال النسيج بأكمله. من بين العينات المحللة تبين ان 35 % من الصدفيات تبدو ملوثة علي الاقل بأحد الفيروسات المعوية .

كلمات مفاتيح : الصدفيات البحرية , استخلاص الفيروسات , تفاعلات أنزيم البلمرة المتسلسل .

RESUME

Dans cette étude comparative, deux méthodes d'extraction de quatre types de virus entériques pathogènes pour l'homme (virus de l'hépatite A, l'astrovirus, le norovirus et l'entérovirus) contaminant des moules (*Mytilus galloprovincialis*) et des palourdes (*Ruditapes decussatus*) ont été évaluées par l'application de la technique « Reverse Transcriptase- Polymerase Chain Reaction : RT-PCR ». Les échantillons des mollusques bivalves analysés ont été prélevés entre le mois de mars 2000 et le mois de septembre 2001 dans différents sites naturels de la lagune de Bizerte et sans subir l'étape de purification. Les résultats obtenus montrent que le taux de détection des virus par RT-PCR est meilleur lorsque les virus sont extraits à partir de l'estomac et de l'appareil digestif plutôt qu'à partir de la totalité de la chair des mollusques. Il en résulte également que 35% des échantillons analysés sont contaminés par au moins l'un des virus recherchés.

Mots clés : mollusques bivalves, virus entériques, extraction virale, RT-PCR

ABSTRACT

Research by RT-PCR of enteric viruses in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) and in clams (*Ruditapes decussates*): In this study, two extraction methods of four enteric viruses types (Hepatitis A virus, astrovirus, norovirus and enterovirus) known to be pathogenic for human beings were applied on mussels (*Mytilus galloprovincialis*) and clams (*Ruditapes decussatus*) and were comparatively evaluated by « Reverse Transcriptase- Polymerase Chain Reaction: RT-PCR ». Shellfish samples were collected between March 2000 and September 2001 in different natural sites of the Bizerta lagoon located in northern Tunisia and without undergoing the purification step. Results obtained here show that virus detection rate by RT-PCR is better when the viruses are extracted from stomach and digestive diverticula's rather than from the entire shellfish flesh and also, that 35% of the analyzed samples are contaminated by at least one type of the virus searched for.

Key words: bivalve mollusks, human pathogens, enteric viruses, RT-PCR

INTRODUCTION

Pour respirer et pour se nourrir, les mollusques bivalves filtrent par l'intermédiaire de leurs branchies, de grandes quantités d'eau de mer (jusqu'à 1 500 l/jour/huître selon Gerba et Goyal (1978)). Cependant, outre le plancton et les matières en suspension indispensables à leur développement, des

virus entériques transportés par des eaux usées peu ou pas épurées sont souvent adsorbés et accumulés à

différents niveaux de leur organisme. A l'occasion d'une consommation de mollusques bivalves contaminés, ces virus se transmettent de nouveau à l'homme chez lequel ils sont susceptibles de se multiplier au niveau de son tractus digestif. Ils sont ensuite éliminés dans ses selles pour se retrouver de nouveau dans les eaux usées. Bien qu'ils ne se

multiplient pas en dehors de la cellule de l'hôte vivant, les virus peuvent, en raison de leur résistance particulière, persister longtemps dans le milieu extérieur, favorisés par leur adsorption sur les particules solides en suspension dans l'eau de mer ou dans les sédiments ou bien dans la chair des coquillages (Schwartzbrod, 1992). A l'heure actuelle, on connaît plus de 140 virus entériques qui sont excrétés dans les fèces humaines. Toutefois, d'après Kilgen et Cole, un petit nombre seulement a été reconnu responsable chez l'homme de maladies associées aux produits de la mer (1991). Ces virus sont présentés dans le tableau I.

Tableau I : Virus entériques associés aux mollusques bivalves

Calicivirus (Norovirus)	Caliciviridae	30- 35
Virus	Famille	Taille (nm Ø)
Hépatite E	NFCGV*	-
Astrovirus	Astroviridae	28 – 30
Rotavirus	Rotaviridae	72
Adénovirus entériques	Adenoviridae	80
Entérovirus(Poliovirus)	Picornaviridae	27
Hépatite A	Picornaviridae	27 – 32

*NFCGV = Non formellement classé dans aucun groupe de virus

La dose infectieuse des virus est beaucoup plus faible que celle des bactéries (Cliver, 1988) ; en effet, 10 à 100 particules virales suffisent à provoquer une infection chez l'homme. La détection des virus entériques humains chez les mollusques bivalves nécessite des méthodes sensibles et spécifiques en raison des faibles niveaux de contamination mais aussi de l'hétérogénéité de la chair de ces animaux. De ce fait, une extraction suivie d'une élution et d'une étape de concentration des virus à partir de la chair des mollusques bivalves sont indispensables. La méthode permettant la détection des virus entériques infectieux est fondée sur l'isolement sur culture cellulaire *in vitro*. Or, c'est une technique lourde, longue et coûteuse. De plus, elle ne permet pas de détecter tous les virus du milieu hydrique car certains parmi eux ne se multiplient pas sur système cellulaire ou se multiplient très mal ou très lentement, d'où le recours aux techniques de biologie moléculaires qui sont rapides, sensibles et spécifiques. La détection par les techniques moléculaires « RT-PCR et d'hybridation moléculaires » de quatre virus différents a été réalisée dans cette étude suite à l'extraction de ces derniers soit à partir de l'appareil digestif soit à partir de la totalité de la chair de mollusques bivalves sauvages prélevés dans la lagune de Bizerte.

MATERIEL ET METHODES

MATERIEL

Echantillons de mollusques : des échantillons de 11 lots de moules (*Mytilus galloprovincialis*) et de 19 lots de palourdes autochtones appelées également « clovisse » (*Ruditapes decussatus*), ont été collectés vivants à l'état sauvage dans la lagune de Bizerte et sans subir l'étape de purification. Les prélèvements des coquillages ont été effectués entre le mois de mars 2000 et le mois de septembre 2001 sur différents sites de la lagune. Chaque prélèvement composé d'au moins 30 individus a été divisé en deux lots égaux.

Virus recherchés : Nous avons opté pour la recherche des virus entériques suivants : les entérovirus, le virus de l'hépatite A, l'astrovirus et le norovirus (souche prototype des calicivirus humain, anciennement nommé norwalk like virus).

Souches virales de références : Quatre souches virales de références ont été utilisées comme témoins positifs lors de l'amplification génique par RT-PCR des Acides Ribonucléiques (ARN) des virus entériques recherchés. Le témoin positif des entérovirus est une souche de poliovirus vaccinal type 1 Mahoney, cultivé sur cellules BGM. Le témoin positif du virus de l'hépatite A est une souche de collection HM-175 cultivée au laboratoire sur la lignée FrHK-4 en milieu MEM (Gibco -BRL) avec 8% de sérum de veau (Eurobio) à 34 °C. Pour les astrovirus, il s'agit d'une souche d'astrovirus sérotype 1, isolée à partir de selles de patients et cultivée sur des cellules CaCO2-2. Enfin, pour les norovirus nous avons utilisé une souche isolée à partir de selles de patients révélée positive par observation en microscopie électronique.

Amorces et sondes : Les amorces et les sondes utilisées dans cette étude pour la réalisation de la RT-PCR qualitative sont utilisées par l'équipe de recherche EA1156 de la Faculté de Pharmacie de Nantes et/ou par l'équipe de recherche du Laboratoire de microbiologie, IFREMER, centre de Nantes (Tab II).

METHODES

Extraction des particules virales des échantillons de mollusques bivalves :

Les mollusques bivalves sont débarrassés des corps étrangers présents sur leurs coquilles par un brossage sous l'eau de robinet, puis lavés abondamment à l'eau stérile. Après ouverture de la coquille, nous avons appliqué sur le premier lot de coquillage la technique (T1) décrite par Lewis et al. (1988) dans laquelle la chair et le liquide inter-valvaire sont recueillis dans des flacons stériles. Alors que la technique (T2) décrite par Le Guyader et al. (2000) dans laquelle uniquement l'appareil digestif

Tableau II : les amorces et les sondes spécifiques pour chaque virus recherché utilisées dans les techniques de RT-PCR et d'hybridation moléculaires

Virus	Amorce	Sonde	Taille fragment	Référence
Astrovirus	Mon2/Mon1	Ap	89 pb	Mitchell D.K. et al. (1995)
Virus de l'Hépatite A	HAV ₂₄₀ /HAV ₆₉	VHA-sonde	172 pb	Bosch A. et al. (2001)
Entérovirus	PV444/ P1	P2	235 pb	Bosch A. et al. (1996)
Contrôle Interne	Primer 3/ Primer 2	Primer F2	312 pb	Le Guyader F. et al. (1997)
Calicivirus	NV _p 110/ P36	NV _p 116/ NV _p 117	396 pb	Le Guyader F. et al. (1996)
	NV _p 110/ NI	NVP 118	116 pb	Le Guyader F. et al. (1996)
	NV _p 110/SR _{48/50/52}	SR _{47/61}	118 pb	Ando T. et al. (1995)

est disséqué, homogénéisé et recueilli dans des tubes eppendorf stériles a été appliqué sur le deuxième lot de coquillage. Une conservation à -20°C au plus est préconisée pour chaque lot d'échantillon jusqu'à l'extraction virale.

Extraction de l'ARN viral : L'ARN des virus de tous les échantillons analysés sont extraits à l'aide d'un kit commercial (RNeasy plant Mini kit, Qiagen, Courtaboeuf, France) selon les instructions du fournisseur. Une modification est tout de même apportée à la composition du tampon de lyse, du polyvinylpyrrolidone (PVP) - 40 (Sigma St. Quentin, France) est rajouté à une concentration de 2 % (Monpoeho. S. et al., 2001).

Co-amplification d'un contrôle interne (CI) : Le CI est un simple brin d'ARN construit dans notre cas à partir du génome du poliovirus cloné dans un plasmide ; il va jouer le rôle d'un compétiteur au fragment d'ARN à amplifier (Le Guyader F., et al. 1997) et il est amplifié par les amorces 2 et 3 (Tab II). Au mélange réactionnel de la RT-PCR, 1µl d'une dilution de CI [10 x] et 1 µl de l'extrait viral sujet à une amplification sont ajoutés. Après amplification, dans le cas d'absence d'inhibiteurs, une bande de 312 pb est détectée après révélation par électrophorèse sur gel d'acrylamide à 9 %. Les résultats de la RT-PCR sont également confirmés par des hybridations moléculaires avec la sonde F2 (Tab II). Ensuite, une amplification des extraits viraux est effectuée en absence du contrôle interne afin d'éviter les résultats faux –négatifs engendrés par la compétition. En cas d'inhibition, une purification additionnelle ou une dilution de l'extrait viral sont effectuées.

Détection moléculaire des génomes viraux par la RT- PCR: Des RT-PCR sont réalisées pour la détection moléculaire des VHA, des astrovirus, des entérovirus et des norovirus recherchés dans les échantillons de mollusques bivalves analysés. Chaque mélange réactionnel est préparé dans un seul tube PCR à raison de 20 µl / tube. 5 µl d'extrait d'ARN

viral sont additionnés au tube. Une Reverse Transcriptase est réalisée avant l'amplification. Des amorces spécifiques pour chaque virus (Tab II) ont été utilisées. Des témoins positifs (souches virales positives spécifiques pour chacun des virus) et un témoin négatif (eau) sont amplifiés en parallèle avec les échantillons.

Révélation des produits de la PCR : Après amplification, les produits de la PCR peuvent être visualisés par électrophorèse en gel d'acrylamide à 9% et coloration au bromure d'éthidium (BET).

L'hybridation moléculaire : Une hybridation moléculaire par dot blot est appliquée sur les produits de la RT-PCR (ADNc amplifié) et permet de détecter spécifiquement une séquence d'acide nucléique à l'aide d'une sonde marquée et de confirmer le résultat de la RT-PCR.

RESULTATS

Après l'extraction-concentration des particules virales contenues dans les échantillons de moules et de palourdes par les deux protocoles décrits précédemment (T1 et T2), la présence d'inhibiteurs a pu être vérifiée au préalable dans chaque extrait génomique par la co-amplification d'un contrôle interne (CI) en même temps que les extraits de l'ARN viral. Le CI est amplifié par les amorces 2 et 3 (Tab II). Après amplification, la révélation d'une bande de 312 Pb par électrophorèse sur gel d'acrylamide à 9%, confirme l'absence d'inhibiteurs (Fig. 1). En l'absence d'inhibiteurs, une RT-PCR spécifique à chacun des virus recherchés a été appliquée sur chaque extrait génomique par l'utilisation des amorces spécifiques (Tab II) pour chaque virus recherché. Les résultats des RT-PCR ont également été confirmés par des hybridations moléculaires (résultats non montrés). La figure 2 illustre le taux de détection de chacun des virus recherchés dans chaque échantillon analysé. Les résultats obtenus montrent que le rendement de la technique de RT- PCR lors de la détection des virus est meilleur lorsque

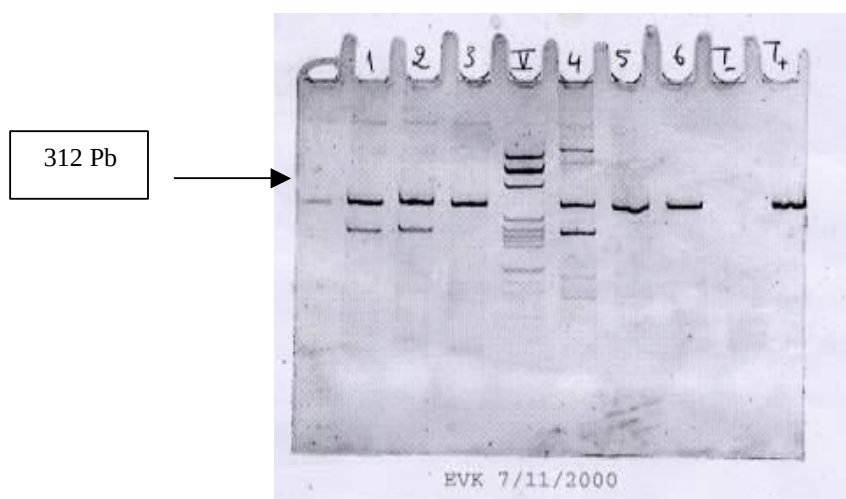


Figure 1 : Résultats de la recherche d'inhibiteurs par co-amplification d'un contrôle interne dans 5 échantillons de mollusques bivalves 1- 5 : Echantillons de mollusques bivalves analysés, V : Marqueur de taille : 0,05-1,5 Kpb (Boehringer Mannheim). 6 : T+ : témoins positifs, T- : témoin négatif (eau)

l'échantillon est traité par la technique (T2). Le virus le plus décelé est l'astrovirus à raison de 59 %, suivi du norovirus à 45 % et du virus de l'hépatite A à 32 %. Un seul échantillon sur trente s'est révélé positif en entérovirus.

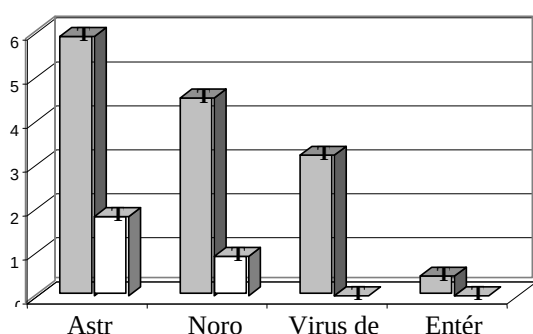


Figure. 2 : Résultats des RT-PCR qualitatives appliquées sur des échantillons de mollusques bivalves extraits par la technique (T1) et la technique (T2)

Par contre, les résultats de la RT-PCR obtenus sur les mêmes échantillons extraits par la technique (T1) révèlent la présence des astrovirus dans 18 % des cas, suivis des norovirus dans 9 % des cas. Aucun entérovirus ni virus de l'hépatite A n'ont pu être détecté. Sur les trente échantillons analysés, dans 7 % des cas, nous avons détecté la présence simultanée de trois types de virus à savoir l'astrovirus, le norovirus et le virus de l'hépatite A. 30 % d'échantillons sont contaminés par deux types de virus et 23 % d'échantillons sont contaminés par un seul virus (figure 3). Enfin, les palourdes analysées s'avèrent

plus contaminées que les moules, 63 % par rapport à 55 % (figure 4).

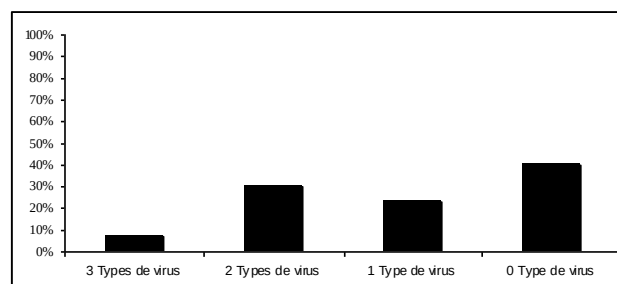


Figure3. : Taux de présence simultanée des virus recherchés par échantillon analysé

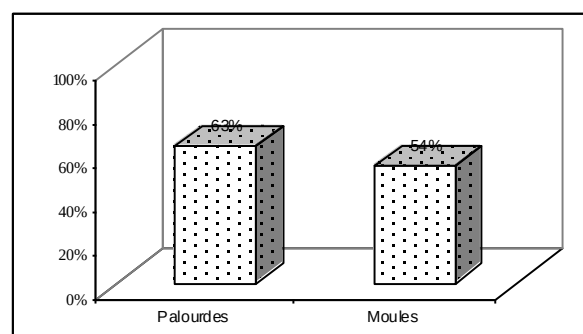


Figure. 4 : Influence de l'espèce de mollusques sur le taux de contamination par les virus entériques

DISCUSSION ET CONCLUSION

Des différences d'efficacité d'amplification ont été observées en fonction de la méthode d'extraction utilisée dans cette étude. Les résultats obtenus

montrent que le rendement de la technique de « RT-PCR » lors de la détection des virus entériques est meilleur lorsque l'échantillon de coquillage est traité par la technique (T2). Technique basée uniquement sur le traitement de l'appareil digestif de l'animal, organe naturellement riche en virus, pauvre en inhibiteurs (Enriquez R. et al. 1992; Schwab K.J. et al. 1998) et dont la contamination est plus représentative que la totalité de la chair des mollusques bivalves naturellement riche en inhibiteurs, puisque d'après le Guyader et al. (2000), 1,5 g de tissu digestif représente à peu près 10 moules. En effet, l'interférence des substances inhibitrices lors de l'étape de la Reverse Transcriptase représente un facteur limitant au bon déroulement de l'amplification génomique (Wild J. et al., 1990). Pour vérifier l'élimination de ces inhibiteurs, une co-amplification d'un contrôle interne (CI) en même temps que l'extrait viral a été effectuée. Les résultats obtenus sur les échantillons dont seul l'appareil digestif a été traité montre qu'environ 35% des échantillons traités sont contaminés par les virus entériques recherchés. Ces résultats sont comparables à ceux obtenus dans différentes études analogues obtenues par des équipes de recherche issues de pays européens ou des Etats-Unis (Le Guyader et al., 1994, Le Guyader et al., 2000, le Formiga-Cruz, et al. 2002, Shieh et al. 2003). Les astrovirus et les norovirus sont plus fréquemment retrouvés dans les échantillons analysés que les autres virus recherchés (entérovirus et virus de l'hépatite A). Il s'agit peut-être des deux virus les plus excrétés dans les eaux usées. Quant à la présence très faible des entérovirus, elle pourrait s'expliquer par la diminution de la circulation de la poliomyélite «agent prototype des entérovirus», éradiquée depuis quelques années grâce aux larges campagnes de vaccination contre ce sérotype. Elle pourrait également s'expliquer par la faible capacité d'accumulation des entérovirus par le coquillage. D'après Metcalf (1995) la contamination virale des mollusques bivalves par les entérovirus n'est pas fréquente. La contamination d'un même échantillon de coquillage par plus d'un virus a été également rapportée par Le Guyader et al. (2000), sur cinquante-cinq échantillons de moule analysées, 75% sont contaminées par au moins un virus ou plus. Enfin, les palourdes se révèlent plus contaminées que les moules et cela pourrait éventuellement être lié à leur mode de vie. En effet, les palourdes vivent enfouies dans les sédiments tandis que les moules vivent à la surface du sédiment ; de par ce mode de vie, les espèces fouisseuses concentrent des quantités importantes de virus (Le Guyader F. et al. 1994). De plus, d'après De Léon R. et al. (1997), la chair des moules est plus riche en inhibiteur et l'importance des inhibiteurs varie selon l'espèce des mollusques bivalves.

L'isolement des virus entériques dans les coquillages par les techniques d'amplifications génique reste encore difficile à valider à cause de l'absence d'une méthode standard d'extraction des virus. Cependant, ces techniques sont aujourd'hui bien adaptées à la virologie de l'environnement, elles sont globalement rapides, sensibles et ont l'avantage de détecter des virus non cultivables comme par exemple les souches sauvage de VHA ou les Norovirus. Mais il demeure néanmoins qu'elles ne permettent pas d'affirmer le risque infectieux de ces virus. Les résultats obtenus dans cette étude sont utiles pour comprendre le mode de circulation de ces virus dans l'environnement dans le but d'améliorer les moyens de surveillance contribuant à une production conchylicole de qualité sanitaire satisfaisante. Un typage moléculaire des souches virales détectées serait intéressant pour caractériser les souches isolées dans cette étude et mieux comprendre leurs pouvoir infectieux sur le consommateur Tunisiens, surtout qu'à ce jour, aucune épidémie d'origine alimentaire (après consommation de coquillages) causée par les virus responsables des gastro-entérites et/ ou le virus de l'hépatite A n'a été signalée en Tunisie, ce qui nous laisse supposer que les virus que nous avons détectés chez les mollusques sauvages constitueraient soit des variétés peu ou pas pathogènes pour le consommateur soit que ces virus ne sont pas transmis aux consommateurs parce qu'ils seraient éliminés par la procédure de purification.

REMERCIEMENTS

Les auteurs expriment leurs vifs remerciements à l'UNESCO-L'OREAL pour avoir rendu possible cette étude en faisant bénéficier le premier auteur de cette article de la bourse de l'an 2000 pour les jeunes femmes se consacrant à l'étude des sciences de la vie. Nos remerciements s'adressent également à Madame le Professeur Sylvianne Billaudel et à toute son équipe du Laboratoire de Virologie du CHU de Nantes, pour ses compétences scientifiques et ses précieux conseils et à Madame F.S de Guyader ainsi qu'à ces collaborateurs du Laboratoire de Microbiologie, IFREMER de Nantes

BIBLIOGRAPHIE

- Ando, T., Monroe, S.S., Gentsch, J.R., Jin, Q., Lewis, D.C., and Glass, R. 1995. Detection and differentiation of antigenically distinct small round viruses (Norwalk-like viruses) by reverse transcriptase and southern hybridization. *Journal of Clinical Microbiology*, 33, 64-71.
- Bosch, A., Gajardo, R., Diez, J.M., and Pinto, R.M. 1996. Non isotopic automatable molecular procedures for the detection of enteroviruses. *Molecular and Cellular Probes*, 10, 81-89.
- Bosch, A., Sanchez, G., Le Guyader, F.S., Vanaclocha, H., Haugarreau, L., and Pinto,

- R.M. 2001. Human enteric viruses in coquina clams associated with a large hepatitis A outbreak. *Water Science and Technology*, 43, 61-65.
- Cliver, D.O. 1988. Virus transmission via foods. *Food Technol.*, 42, 241-248.
- De Léon R. et Jaykus L. A. (1997), Detection of the presence of bacteria and viruses in shellfish. pp 203-212. In manual of environment microbiology. Hurst C. J., Knudsen G. R., McInemey M. J., Stetzenbach L. D. et Walter M. V. (eds) ASM Press, Washington, D. C.
- Enriquez R., Frosner G.G., Hochstein-Mintzel V., Riedemann S. et Reihardt G. -1992. Accumulation and persistence of hepatitis A virus in mussels. *J. Med. Virol.* 37: 174-179.
- Formiga-Cruz, M., Tofino-Quesada, G., Bofill-Mas, S. *et al.* (2002) Distribution of human virus contamination in shellfish from different growing areas in Greece, Spain, Sweden, and the United-Kingdom. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 5990-5998.
- Gerba, C.P., and Goyal, S. M. - 1978. Detection and occurrence of enteric viruses in shellfish. *J. Food Prospection*, 41: 743-754.
- Kilgen, M.B. and M.T. Cole. - 1991. Viruses in seafood. In *Microbiology of Marine Food Products*. Eds: D.R. Ward and C. Hackney. Van Nostrand Reinhold, 197-209.
- Kopecka H., Dubrou S., Prevot., Marechal J. and Lopez-Pila J.M. 1993. Detection of naturally occurring enteroviruses in waters by reverse transcription polymerase chain reaction and hybridization. *App. Environ. Microbiol.*, 59: 1213-1219.
- Le Guyader F., Dubois E., Menard D. et Pommepuy M. 1994. Detection of hepatitis A virus, Rotavirus and Enterovirus in naturally contaminated shellfish and sediment by reverse transcription-semi-nested PCR. *App. Environ. Microbiol.*, 60 : 3365-3671.
- Le Guyader, F., Estes, M.K., Hardy, M.E., Neill, F.H., Green, J., Brown, D.W.G., and Atmar, R.L. (1996) Evaluation of a degenerate primer for the PCR detection of human caliciviruses. *Archives of Virology* 141, 2225-2235.
- Le Guyader F. Menard D. Dubois E. Haugarreau L. Kopecka H., and Pommepuy M. (1997). Use of an RT-PCR internal control to evaluate viral removal. *Wat. Sci. Technol.*, 35 : 461-465.
- Le Guyader, F., Haugarreau, L., Miossec, L., Dubois, E. and Pommepuy, M. (2000). Three-year study to assess human enteric viruses in shellfish. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 3241-4248.
- Lewis G. D. et Metcalf T. G. -1988. Polyethylene glycol precipitation for recovery of pathogenic viruses including hepatitis A virus and human rotavirus, from oysters, water and sediment samples. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54: 1983-1988.
- Metcalf T. G., Melnick J.L. et Estes M.K. -1995. Environmental microbiology: 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.
- Mitchell, D.K., Monroe, S.S., Jiang, X., Matson, D.O., Glass, R.I., and Pickering, L.K. 1995. Virologic features of an astrovirus diarrhea outbreak in a day care center revealed by reverse transcriptase polymerase chain reaction. *Journal of Infectious Disease*, 172, 1437-1444.
- Monpoeho. S, Maul, A. Mignotte-Cadiegues, B. Schwartzbrod, L. Billaudel, S. and ferre' V. 2001. Best viral elution method available for quantification of enteroviruses in sludge by both cell culture and Reverse Transcription-PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 2484-2488.
- Schwab K. J., Neill F.H., Estes M.K., Metcalf T.G. et Atmar R.L. 1998. Distribution of Norwalk virus within shellfish following bioaccumulation and subsequent depuration by detection using RT-PCR. *J. Food. Prot.*, 61 : 1674-1680.
- Schwartzbrod L. 1992. Mollusques bivalves et santé publique, du risque à la prévention. Edition Ecole Nationale de la Santé Publique.
- Shieh, Y.C., Baric, R.S., Woods, J.W., and Calci, K.R. (2003) Molecular surveillance of enterovirus and Norwalk-like virus in oysters relocated to a municipal-sewage-impacted gulf estuary. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 7130-7136.
- Wild J., Eiden J. et Yolke R. -1990. Removal of inhibitory substances from human faecal specimen for detection of group A rotaviruses by reverse transcriptase and polymerase chain reactions. *J. Clin. Microbiol.*, 28 : 1300-1307.