

M-III3

APPORT DE L'IMMUNO-MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE
À LA DÉTECTION DES VIRUS DANS LE MILIEU HYDRIQUE

Chantal PIETRI* et Bernard HUGES**

* Unité 303 de l'INSERM, 1 avenue Jean Lorrain, Nice (France)
** Laboratoire d'Hygiène de Nice, 8 rue Hôtel des Postes, Nice (France)

Si la recherche des Entérovirus dans les eaux usées est faite classiquement par inoculation sur cultures cellulaires, la détection des Adénovirus et du virus de l'hépatite A (VHA) doit être réalisée par d'autres moyens. En effet, la mise en évidence des Adénovirus sur cultures cellulaires est rendue difficile quand ces derniers à effet cytopathique (E.C.P.) lent se trouvent en compétition avec les Entérovirus à E.C.P. rapide (1). La recherche de VHA, quant à elle, est très difficile à faire en routine sur cultures cellulaires (2, 3). Ainsi, pour avoir une idée réelle de la présence des différents groupes de virus dans les eaux usées, il est nécessaire d'utiliser une autre technique telle l'immuno-microscopie électronique (I.M.E.). Notre but a été, à partir d'échantillons d'eaux usées ayant montré sur cultures cellulaires la présence d'Entérovirus, de voir quelles informations complémentaires l'I.M.E. pouvait apporter sur leur composition vis-à-vis des Adénovirus et des V.H.A.

Nos résultats montrent que, sur 12 échantillons d'eaux usées analysés, l'IME a permis la mise en évidence d'Adénovirus pour 6 d'entre eux (Tableau 1) ; dans tous les cas la recherche par inoculation sur cultures cellulaires des Entérovirus a été positive et celle des Adénovirus négative. Dans le tableau 2 sont inscrits pour 15 échantillons d'eaux usées testés, les titres d'Entérovirus et les résultats de la recherche de VHA par IME : le tiers des échantillons d'eaux usées contient du VHA alors que les titres viraux trouvés à partir de cultures cellulaires sont faibles.

Tableau 1

Essai n°	VIRUS RECHERCHES				
	Entérovirus			Adénovirus	
	sur cultures cellulaires			sur cultures cellulaires	IME
	$L_i <$	NPPUC/litre	$< L_s$	NPPUC/litre	
1	4,9	6,2	8,4	0	+
2	1,6	2,1	2,7	0	-
3	14,0	20,0	27,0	0	-
4	20,0	26,0	35,0	0	-
5	130,0	160,0	190,0	0	-
6	14,0	20,0	27,0	0	-
7	28,8	37,5	50,5	0	+
8	6,7	9,5	13,5	0	-
9	30,0	50,0	80,0	0	+
10	30,0	70,0	96,0	0	+
11	130,0	160,0	190,0	0	-
12	100,0	140,0	180,0	0	-

L_i : limite inférieure de confiance à 95 % ; L_s : limite supérieure de confiance à 95 %
NPPUC/litre : nombre le plus probable d'unités cytopathiques par litre d'eaux usées.
+ : présence d'Adénovirus ; - : absence d'Adénovirus.

Tableau 2

Essai n°	VIRUS RECHERCHES			
	Entérovirus			VHA par IEM
	$L_i <$	NPPUC/litre	$< L_s$	
1	4,5	9,0	17,5	-
2	1,5	3,5	7,5	-
3	8,0	14,5	25,5	-
4	12,0	19,0	30,5	-
5	7,0	11,0	17,5	-
6	5,0	8,0	13,0	+
7	5,5	11,0	21,0	-
8	1,0	2,5	6,0	+
9	0,5	1,5	4,5	-
10	4,5	9,5	19,0	+
11	18,0	27,5	42,5	-
12	38,0	49,5	65,0	+
13	37,5	47,5	69,0	+
14	10,0	17,0	28,5	-
15	11,5	19,5	32,5	-

L_i : limite inférieure de confiance à 95 % ; L_s : limite supérieure de confiance à 95 %
NPPUC/litre : nombre le plus probable d'unités cytopathiques par litre d'eaux usées.
+ : présence de VHA ; - : absence de VHA.

Il faut donc, pour avoir un bilan plus complet de la composition virale d'un échantillon d'eaux usées, appliquer deux méthodes sur l'éluat : l'inoculation sur cultures cellulaires et l'IME. Ces deux méthodes sont complémentaires puisque l'IME permet la mise en évidence de virus qui ne pouvait pas se faire par le seul emploi des cultures cellulaires. L'intérêt des familles virales mises en évidence n'est pas à négliger surtout en ce qui concerne VHA dont la présence dans le milieu hydrique n'est pas sans danger sur le plan sanitaire (5, 6, 7). Notons l'importance du nombre d'échantillons contenant des Adénovirus et VHA par rapport aux faibles titres d'Entérovirus trouvés dans la majorité des cas sur cultures cellulaires.

Même si l'IME ne donne que des résultats qualitatifs et ne met en oeuvre que des structures antigéniques sans savoir pour autant s'il s'agit de particules infectieuses (4), nous pensons, en regard de nos résultats, que l'emploi de cette technique permet de mieux définir l'état sanitaire d'une eau.

Bibliographie

- CATEIGNE G., MAURIN J., 1965. Isolement et étude des virus dans l'oeuf embryonné et en cultures cellulaires. Ed. de la Tourelle, Saint-Mandé.
- CRANGE J.M., DELOINCE R., LECHEVALLIER Ch., CREVAT D., LAVERAN H., FONTANGES R., 1983. Libération du virus de l'hépatite A dans le milieu de culture, lors de sa répliquation dans des cellules PLC/PRF/S. *C.R. Acad. Sci. Paris*, 297, 111-114.
- CRANGE J.M., PASSAGOT J., VERWAERDE N., BIZIAGOS E., GANDRE H., DELOINCE R., 1985. Adaptation à la lignée cellulaire PLC/PRF/5 du virus de l'hépatite A libéré dans le surnageant de culture. *C.R. Acad. Sci. Paris*, 301 (7) : 361-363.
- FOURNIER J.C., ROUSSET S., BOUTEILLE M., 1978. Application de l'immunomicroscopie électronique à la détection de virus en milieu hydrique. *C.R. Acad. Sci. Paris*, 286 : 1637-1639.
- OHARA H., NARUTO N., WATANABE W., EBISAWA I., 1983. An outbreak of hepatitis A caused by consumption of raw oysters. *H. Hyg. Camb.*, 91 : 163-165.
- ROSENBERG M.L., KOPLAN J.P., POLLARD R.A., 1980. The risk of acquiring hepatitis from sewage contaminated water. *Am. J. Epidemiol.*, 112 (1) : 17-22.
- SKINKOJ P., HOLLINGER L., HOVIND-HOUGEN K., LOUS P., 1979. Infectious liver diseases in three groups of Copenhagen workers : correlation of hepatitis A infection to sewage exposure. *Arch. Environ. Health*, 36 (3) : 139-143.

M-IV1

EFFET DE L'HYALURONIDASE SUR QUELQUES BACTÉRIES DE L'ENVIRONNEMENT

Evelyn RICHELLE-MAURER et Zima MOUREAU

Institut Royal des Sciences Naturelles de Belgique, Bruxelles (Belgique)

Après une étude sur la formation de glycocalyx in vitro (1), nous nous sommes attachées à rechercher les effets de l'hyaluronidase sur *Citrobacter freundii* et *Proteus mirabilis*, isolés respectivement de l'étang de Virelles et d'un puits du Zaïre.

L'hyaluronidase est ajoutée, à une concentration finale de 0,1 %, à des cultures de 48 heures de *Citrobacter* et *Proteus*, en milieu faiblement nutritif (milieu minimum additionné de 1g de peptone et 7 mg de glucose par litre). L'incubation se fait avec agitation à 20°C et 35°C.

L'action de l'hyaluronidase sur les bactéries est suivie par mesure de la densité optique et par dosage du glucose par la méthode à l'anthrone.

Les résultats observés sont les suivants :

- à 35°C, dès la première demi-heure de contact avec l'enzyme, on observe une augmentation importante de la densité optique des cultures alors qu'elle était restée stationnaire pendant plus de 24 heures et qu'elle n'est pas modifiée dans les cultures témoins. La croissance se ralentit après 1h30 à 2h de contact et la phase stationnaire s'installe progressivement.

- à 20°C, on observe le même phénomène mais la croissance est moins rapide et la phase stationnaire s'installe plus tardivement.

- l'addition d'hyaluronidase dans les cultures de *Citrobacter* intensifie la formation d'agrégats, déjà visibles dans les premières heures qui suivent l'inoculation. Nous avons d'ailleurs observé plusieurs fois que l'addition d'enzyme provoque une floculation des cultures.

- le dosage du glucose au cours du temps, dans les cultures traitées, indique des fluctuations de concentration, contrairement à ce qui se passe dans les cultures témoins. Quelquefois, on observe une légère augmentation du glucose après 1h à 1h30 de contact avec l'enzyme. Mais ce phénomène n'est pas concluant.

En conclusion :

- l'hyaluronidase a un effet marqué sur la croissance bactérienne. Nous avons mis en évidence que cet effet n'est pas dû à la présence du mannose dans la préparation de l'enzyme Merck utilisée.

- les glycocalyx sont toujours présents après action de l'hyaluronidase comme on peut l'observer macroscopiquement (formation d'agrégats) et au microscope électronique à balayage.

- si du glucose apparaît au cours du traitement, les fluctuations pourraient signifier qu'il est consommé au fur et à mesure de sa libération.

Toutefois, l'hyaluronidase elle-même pourrait servir de nutriment, de même que la glucosamine également présente dans la préparation.

(1) Evelyn Richelle-Maurer et Zima Moureau (1986) : Evidence of in vitro glycocalyx formation in the bacterial species : *Citrobacter freundii*, *Proteus mirabilis* and *Planococcus sp.* Effects of polysaccharases. A paraître.