

**UNIVERSITE CHEIKH ANTA DIOP DE DAKAR**  
**ECOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA VIE, DE LA SANTE ET DE**  
**L'ENVIRONNEMENT**



**ANNEE 2018**

**N° 131**

**MEMOIRE POUR L'OBTENTION DU MASTER DE NIVEAU II**  
**UER 102 Biologie et pathologies humaines**  
***Mention : Microbiologie fondamentale et appliquée***

**DETECTION, IDENTIFICATION ET CARACTERISATION MOLECULAIRE**  
**DES ASTROVIRUS HUMAINS EN MILIEU PEDIATRIQUE ET DANS**  
**L'ENVIRONNEMENT DAKAROIS**

*Présenté et soutenu le 30/07/2018*

*Par*

***Mr Codjo Mahugnon Boris-Enock ZINSOU***

**MEMBRES DU JURY**

***PRESIDENT : Professeur Coumba Touré Kane***

***FMPO-UCAD***

***MEMBRES : Professeur Makhtar Camara***

***FMPO-UCAD***

***Professeur Halimatou Diop Ndiaye***

***FMPO-UCAD***

***Sous la direction de Dr Abdou Kader NDIAYE***

***IPD***

## *Dédicaces*

### ***A Dieu notre Créateur.***

*Que la Gloire te soit rendue, toi qui m'as donné la force d'arriver à la fin de ce parcours. Que les hommes voient et reconnaissent que tu es Grand.*

***A mon Père Codjo Patrice ZINSOU (In memoriam),***

*J'aurais tellement souhaité que tu sois là mais...!*

***Repose en paix Papa.***

***A ma Mère Odette OUINSOU***

*Merveilleuse, majestueuse et sublime être adoré*

*A toi les honneurs, mérites et lauriers d'amour*

*Ma plus belle réussite est un don du ciel que je t'offre en trophée*

*Avec hommages et vénération glamour*

*Née de ton sein et grâce à ce couronnement, nos vies resteront liées pour une éternité dorée !*

***Maman, Santé et Longévité... !***

***A mes Frères et Sœurs, Brunel, Jaurès, Carine et Diane***

*Je vous aime tous. Que le Seigneur vous protège, vous comble de sa grâce et nous unisse davantage.*

***Au couple KPANGON,***

*Plus qu'une connaissance, pour nous vous êtes une famille. Vous avez toujours su encourager notre motivation pour les études. De vous, nous avons appris les règles fondamentales de la vie que sont : l'humilité, la simplicité, la rigueur au travail, l'amour pour Dieu et pour le prochain. Ces qualités font de vous des êtres exceptionnels. Recevez à travers cette note l'expression de notre grande admiration. Puisse l'Eternel combler tous vos besoins et que grandissent la volonté et le pouvoir d'aider avec rigueur dans l'honnêteté dont vous faites preuve.*

***Santé et Longévité !***

# *Remerciements*

*A la direction de l'Institut Pasteur de Dakar de m'avoir accordé ce stage, et surtout pour le matériel et les moyens nécessaires mis à ma disposition pour la réalisation de ce travail*

***Au Président et aux membres de jury,***

*Pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de siéger dans ce jury. Je tiens également à vous remercier pour la relecture de ce travail ainsi que pour la qualité de vos enseignements dispensés au cours de cette formation. Soyez assurés de mon profond respect.*

***Au Professeur Cheikh Saad Bouh BOYE, Coordonnateur du Master de Microbiologie Fondamentale.***

*Nos remerciements pour avoir accepté notre inscription au dit Master et pour votre disponibilité.*

*Santé et longévité.*

***Au Dr Abdoulaye SECK,***

*Nos chaleureux remerciements pour votre dynamisme, votre gentillesse et l'intérêt que vous avez porté à notre travail. Que Dieu vous garde.*

***Au Docteur Babacar MBENGUE, Professeur en Immunologie et Chercheur-Associé de l'Unité d'Immuno-génétique de l'Institut Pasteur de Dakar.***

*Ma reconnaissance et mes vifs remerciements pour vos conseils, votre disponibilité, vos encouragements et votre entière participation. Santé et Longévité !*

***A mon superviseur, Dr Abdou Kader NDIAYE, Chargé de recherche à l'Institut Pasteur de Dakar.***

*Mes plus tendres sourires vous sont adressés. Je ne cesserai de saluer votre simplicité, votre disponibilité, votre authenticité et votre justesse. Travailler avec vous a été un vrai bonheur et une fierté ! Merci pour vos enseignements. Santé et Félicité à vous ainsi qu'à tous vos proches !*

***Au personnel du laboratoire de Virologie Médicale de l'Institut Pasteur de Dakar.***

*J'ai été accueilli au sein d'une formidable équipe qui m'a encouragée par sa participation et sa bonne humeur. A toutes et à tous merci, pour votre patience, votre disponibilité et pour votre collaboration.*

*Paix et Joie !*

# Abréviations

<b>ADNc</b>	Acide désoxyribonucléique complémentaire
<b>ARN</b>	Acide ribonucléique
<b>BET</b>	Bromure d'Ethidium
<b>CaCo2</b>	Adénocarcinome du côlon
<b>ELISA</b>	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
<b>EPI</b>	Equipement de Protection Individuelle
<b>HAsTV</b>	Human Astrovirus
<b>ICTV</b>	International Committee on Taxonomy of Viruses
<b>IEM</b>	immuno-électromicroscopie
<b>IFN-β</b>	Interféron-bêta
<b>IgG</b>	Immunoglobuline G
<b>in/del</b>	Insertion / Deletion
<b>KDa</b>	kilodalton
<b>LLCMK2</b>	Rhesus Monkey Kidney Epithelial Cells
<b>ME</b>	Microscopie Electronique
<b>MLB-HAstVs</b>	Melbourne Human Astrovirus
<b>nm</b>	Nanomètre
<b>nsp</b>	Non Structural Protein
<b>nt</b>	Nucléotide
<b>OMS</b>	Oganisation Mondiale de la Santé
<b>ORF</b>	Open Reading Frame
<b>pb</b>	Paire de bases
<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction
<b>PEG</b>	Polyéthylène Glycol
<b>pH</b>	Potentiel Hydrogène
<b>RdRp</b>	RNA-dependent RNA Polymerase
<b>RNases</b>	Ribonucleases
<b>RT-PCR</b>	Reverse transcription- PCR
<b>UTR</b>	Untranslated Transcribed Region
<b>UV</b>	Ultraviolet
<b>VA-HAstVs</b>	Virginia Human Astrovirus
<b>VIH</b>	Virus de l'Immunodéficience Humaine
<b>VP</b>	Viral Protein
<b>VPg</b>	Viral Protein Genome Linked
<b>GEA</b>	Gastroentérite Aiguë
<b>HMO</b>	Human-Mink-Ovine

# Liste des figures et tableaux

## FIGURES

- Figure 1 :** *Astrovirus en microscopie électronique*
- Figure 2 :** *Relations phylogénétiques au sein de la famille des Astroviridae*
- Figure 3 :** *Schéma de l'organisation du génome*
- Figure 4 :** *Précurseurs polyprotéiniques de l'astrovirus humain*
- Figure 5 :** *Cycle réplcatif des astrovirus humain*
- Figure 6 :** *Voies potentielles de transmission des astrovirus humains*
- Figure 7 :** *Réactifs essentiels pour la réalisation de la PCR*
- Figure 8 :** *Structure schématique du génome de HAstV et région ciblée pour la PCR*
- Figure 9 :** *Amplification et. résultats de la migration électrophorétique*
- Figure 10 :** *Distribution des échantillons d'eaux usées positives selon l'année de collecte*
- Figure 11 :** *Distribution mensuelle des échantillons d'eaux usées positives pour HAstV*
- Figure 12 :** *Analyse phylogénétique des séquences d'astrovirus détectés*
- Figure 13 :** *Taux de positivité à HAstV classique chez différentes populations*

## TABLEAUX

- Tableau I** *Séquences des amorces utilisées pour la caractérisation des HAstVs*
- Tableau II** *Résultats de la PCR selon le type d'échantillons*
- Tableau III** *Résultats de la PCR selon le type d'échantillons*

# TABLE DES MATIERES

Introduction .....	1
--------------------	---

## Première partie : Revue bibliographique

<b>I. Généralités sur les <i>Astroviridae</i></b> .....	<b>3</b>
1. Définition et Historique .....	3
2. Taxonomie et Classification .....	4
3. Propriétés physicochimiques .....	6
4. Structure génomique des astrovirus.....	6
5. Variabilité génétique des astrovirus.....	8
6. Cycle de réplication .....	9
7. Sérotypes et composition protéique .....	11
8. Propriétés immunologiques.....	12
9. Epidémiologie des infections à astrovirus.....	13
10. Pouvoir pathogène.....	17
11. Diagnostic au laboratoire .....	18
12. Traitement et prophylaxie des infections à astrovirus.....	20

## Deuxième partie : Travail experimental

<b>I. Objectifs</b> .....	<b>22</b>
<b>II. Laboratoire d'accueil</b> .....	<b>22</b>
<b>III. Matériels et méthodes</b> .....	<b>22</b>
1. Nature et sélection des échantillons .....	22
2. Extraction de l'ARN viral.....	23
3. Amplification de l'ARN viral (RT-PCR).....	24
4. Phylogénie moléculaire .....	29
<b>IV. Résultats</b> .....	<b>30</b>
<b>V. Discussions</b> .....	<b>33</b>
<b>VI. Conclusion-Perspectives</b> .....	<b>37</b>
<b>Références Bibliographiques</b> .....	<b>39</b>

# INTRODUCTION

La gastroentérite est l'une des maladies les plus courantes chez l'homme et continue d'être un problème majeur de santé publique dans le monde entier (Thongprachum, *et al.*, 2016). Elle représente de nos jours la deuxième cause de morbidité et de mortalité infantile dans le monde avec 2 à 3 millions de décès chaque année. Dans cette part de mortalité, les pays en développement tels que les pays d'Afrique paient un lourd tribut avec plus de 2 millions de décès touchant majoritairement les jeunes enfants (Stella SI & Ajayi A, 2017). Outre les enfants de moins de 5 ans, elle sévit également chez les personnes âgées et chez les immunodéprimés (Oude Munnink & van der Hoek, 2016).

De nombreux agents microbiologiques dits « entériques » sont à l'origine de ces diarrhées infectieuses mais les agents viraux constituent l'étiologie majeure en Afrique (Stella SI & Ajayi A, 2017). Plusieurs groupes de virus ont été signalés comme étant impliqués dans la genèse des gastroentérites aiguës (GEA). Parmi ceux-ci, les rotavirus sont la principale cause chez les enfants dans le monde, notamment en Afrique (30-60%), suivis par les norovirus (8-30%), les astrovirus (6-9%) et les adénovirus (6-9%) (Stella SI *et al.*, 2017 ; Thongprachum, *et al.*, 2016). Avec l'introduction du vaccin antirotavirus dans le programme élargi de vaccination de plusieurs pays, on note un déclin des gastroentérites aiguës associées au rotavirus (Steele *et al.*, 2016). On note parallèlement une augmentation de l'incidence des GEA associées aux astrovirus et aux norovirus comme cause principale des diarrhées infantiles en Afrique (Stella SI *et al.*, 2017). Les astrovirus sont des virus à ARN appartenant à la famille des *Astroviridae* qui comprend le genre **Mamastrovirus** et le genre **Avastrovirus** (Chu *et al.*, 2008, Bosch *et al.*, 2011). Leur génome code pour trois cadres de lecture ouverts (ORF), avec ORF1a et ORF1b codant respectivement pour les protéines de protéase et de polymérase non structurales, et ORF2 codant pour les protéines de capsid. Les astrovirus sont reconnus comme cause endémique de GEA dans le monde. Des études sérologiques attestent que 90% des individus dans certaines populations ont des anticorps dirigés contre les astrovirus (Koopmans *et al.*, 1998 ; Glass *et al.*, 2001). En plus des enfants, la gastroentérite à astrovirus humains (HAstV) sévit aussi fréquemment chez les personnes âgées et chez les personnes immunodéprimées. Des astrovirus humains hautement divergents ont été récemment découverts grâce aux nouvelles

techniques de séquençage à haut débit (NGS). L'association définitive entre ces nouveaux astrovirus et la GEA n'est pas encore entièrement établie (Cordey et al., 2017; Vu et al., 2017).

Des cas d'infections extra-intestinales (méningite et encéphalite mortelles) ont été rapportés, en particulier chez les personnes immunodéprimées. La transmission zoonotique entre les astrovirus animaux et humains a été évoquée en raison de similarités génétiques entre certains virus humains et animaux (Cordey et al., 2017; Vu et al., 2017).

La recherche des virus dans les eaux usées présente également un intérêt épidémiologique d'importance majeure car permettant d'évaluer les paramètres associés à la circulation des virus excrétés par les populations (distribution spatiale, saisonnalité, épidémiologie moléculaire, etc.). Elle permet également de manière prospective ou rétrospective de détecter précocement les épidémies et de suivre leur dynamique.

L'objectif principal de notre étude était d'évaluer la prévalence et les géotypes des astrovirus humains (HAstV) en milieu pédiatrique et en circulation dans l'environnement à partir d'eaux usées collectées en zone urbaine dakaroise. Ce travail s'est déroulé au laboratoire de Virologie de l'Institut Pasteur de Dakar.

Ce document est structuré en 2 grandes sections avec :

- Une revue de la littérature sur la famille des *Astroviridae*.
- Dans la 2<sup>ème</sup> partie, nous allons évaluer de manière rétrospective la prévalence et la diversité des astrovirus humains dans des échantillons d'eaux usées et de selles diarrhéiques antérieurement collectés dans la région Dakaroise et stockés dans la biobanque du laboratoire de virologie de l'Institut Pasteur de Dakar.

### I. Généralités sur les astrovirus

#### 1. Historique et définition

Les astrovirus sont des virus à ARN simple brin de polarité positive (ARN+) (Bosch, *et al.*, 2014 ; Cordey *et al.*, 2017). Ils ont été découverts en 1975 par Appleton et Higgins (Appleton *et al.*, 1975) au cours d'une épidémie de gastroentérites dans une maternité en Ecosse. Ils ont été décrits pour la première fois dans la même année par Madeley et Cosgrove (Madeley *et al.*, 1975). Ces auteurs ont observé en microscopie électronique (ME), dans les selles d'enfants souffrant de gastroentérites, un petit virus de 28 à 30 nm de diamètre avec des motifs de surface en étoile à 5 ou 6 branches. Ces motifs caractéristiques, observables sur environ 10 % des particules virales, leur ont valu le nom d'astrovirus (astron=étoile en grec) (Figure 1). L'étude de ces virus a considérablement progressé à partir de 1981 après que Kurtz et Lee aient pu les adapter en culture cellulaire en utilisant la trypsine (Bosch *et al.*, 2014; Cordey *et al.*, 2017). L'adaptation, d'abord sur lignées primaires issues de rein embryonnaire, puis sur des lignées continues de cellules rénales (LLCMK2) ou coliques (CaCo2), a permis une description plus précise de l'épidémiologie et des structures protéiques et génomiques de ces virus. Les données obtenues ont permis de classer les astrovirus dans une nouvelle famille : celle des *Astroviridae* (Traoré, *et al.*, 1998).

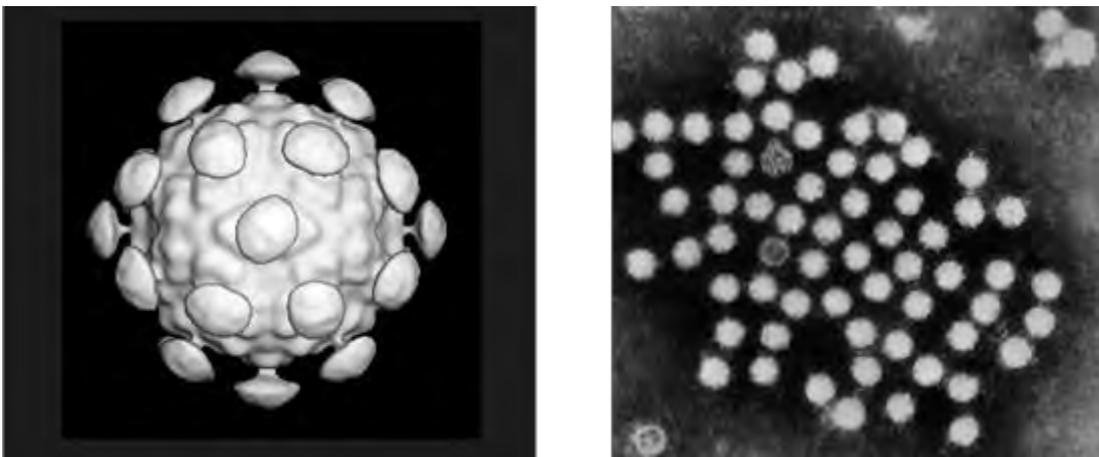


Figure 1 : Astrovirus en microscopie électronique. (<https://talk.ictvonline.org/> consulté le 23/06/2018)

## 2. Classification et taxonomie

Les astrovirus appartiennent à la famille des *Astroviridae* qui, selon le Comité international de taxonomie des virus [ICTV Online \(10th\) Report](https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/) accessible sur <https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/>, est divisée en deux genres : les **Mamastrovirus** (souches infectant les mammifères) qui regroupent 19 espèces (Mamastrovirus 1-19) et les **Avastrovirus** (souches infectant les espèces aviaires) qui regroupent 3 espèces (**Fischer et al., 2016 ; Bosch, et al., 2014; Lacroix et al., 2017**). Les astrovirus sont classés en **sérotypes** et en **génogroupes**.

En 1984, Kurtz et Lee ont établi la méthodologie, basée sur l'utilisation de sérums de référence pour reconnaître les différents sérotypes des astrovirus humains (HAstV) (**De Benedictis, et al., 2011**). De nos jours, huit sérotypes d'HAstV **dits classiques (HAstV 1-8)** ont été identifiés en fonction de leur antigénicité et classés selon plusieurs critères. Les sept premiers sérotypes humains (HAstV-1 à HAstV-7) ont été classés à partir de la réactivité du virus avec des anticorps polyclonaux et le huitième (HAstV-8) par géotypage. On note 64% à 84% de similarités d'acides aminés de capsidie entre eux. Selon le Comité International de Taxonomie des Virus (**ICTV**), ce groupe définit les espèces de **Mamastrovirus 1** dans le genre Mamastrovirus. Au sein de chaque sérotype, différents lignées ou sous-types génétiques peuvent également être identifiés, sur la base d'une homologie nucléotidique inférieure à 93% -95% de l'ORF2 partiel. La classification des lignées a été récemment revue (**Bosch et al., 2014 ; Martella et al., 2014**) avec : six lignées dans **HAstV-1** (1a à 1f), quatre dans **HAstV-2** (2a à 2d), deux dans **HAstV-3** (3a et 3b), trois dans **HAstV-4** (4a à 4c), trois dans **HAstV-5** (5a à 5c), et deux dans **HAstV-6** (6a et 6b). Le HAstV-3c identifié par la suite devrait être ajouté à la classification (**Medeci et al., 2015 ; Bosch et al., 2014**).

Découverts grâce aux nouvelles techniques de séquençage, les nouveaux HAstV sont plus diversifiés que les HAstV classiques.

- **MLB-HAstVs** (Mamastrovirus 6) est classé en trois types ou clades (MLB1, MLB2 et MLB3),
- Les **VA HAstVs** sont divisés en :
  - Espèces Mamastrovirus 8, contenant VA2 (également appelé HMO-B) et VA4,
  - Espèces Mamastrovirus 9 contenant VA1 (également nommé HMO-C) et VA3 (HMO-A)
    - Bien qu'il ne soit pas encore officiellement reconnu par l'ICTV, et basé sur l'homologie de la capsidie, le clade VA5 récemment identifié peut être classé comme une nouvelle espèce (**Jiang et al., 2013 ; Meyer et al., 2015**).

Tableau I : Astrovirus humains. (HAstVs). (Adapté de Perot 2016)

Genre	Mamastrovirus (MAstV)			
Espèces	MAstV 1	MAstV 6	MAstV 8	MAstV 9
Serotypes/Souches	HAstV 1*	MLB 1	VA2/HMO-A	VA1/HMO-C
	HAstV 2*	MLB 2	VA4	VA3/HMO-B
	HAstV 1*	MLB 3	VA5	
	HAstV 3*		BF34	
	HAstV 4*			
	HAstV 5*			
	HAstV 6*			
	HAstV 7*			
	HAstV 8*			

HAstV \* : Astrovirus classiques

L'analyse phylogénétique de la région capsidale, en particulier du domaine hypervariable de la protéine structurale codée par ORF2, indique une forte corrélation entre les sérotypes et les génotypes, permettant ainsi le typage des différents isolats d'astrovirus par analyse séquentielle. La diversité des séquences dans la région de la capside permet la reconnaissance des sous-types ou des lignées dans les différents génotypes (Yoneda *et al.*, 2017). L'analyse de la séquence partielle bien conservée près de la région codante du motif protéase permet l'établissement de deux génogroupes : *le génogroupe I* (avec les sérotypes HAstV-1 à 8) et *le génogroupe II* (avec les sérotypes Hastrovirus-VA1, Hastrovirus-VA2, HMO astrovirus-A, HMO astrovirus-B et HMO astrovirus-C) (Figure 2). L'analyse de séquences de la région hypervariable dans la région codant pour nsP1a /4 dans ORF1a a permis la différenciation supplémentaire de 12 génotypes : 9 dans le génogroupe I et 3 dans le génogroupe II (Bosch *et al.*, 2014). Afin de les distinguer clairement des sérotypes dérivés d'ORF2, les génotypes dérivés d'ORF1a sont nommés en utilisant des chiffres romains.

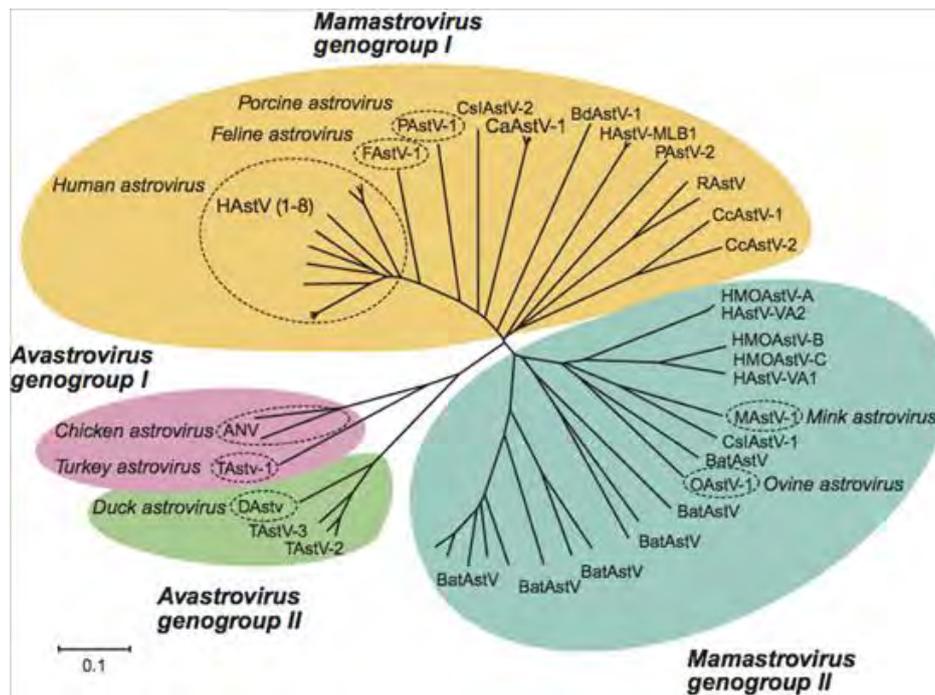


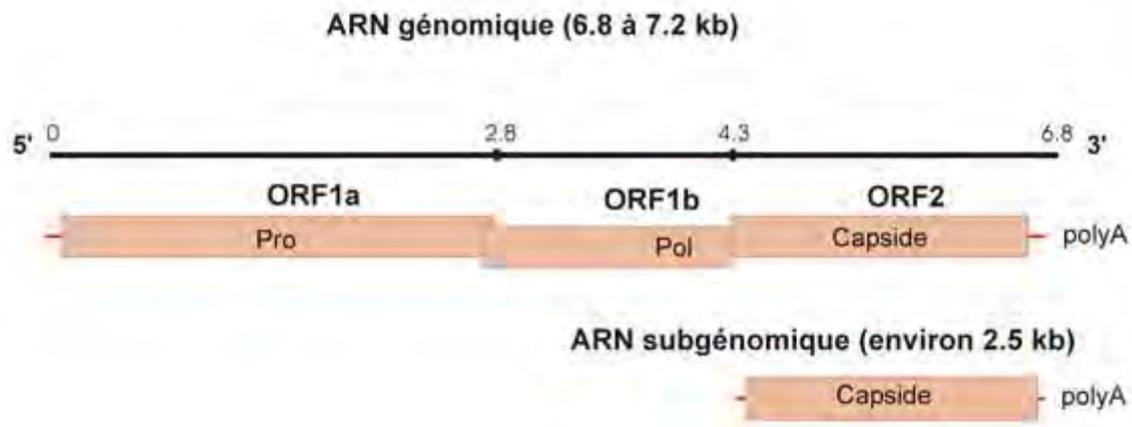
Figure 2 : Relations phylogénétiques au sein de la famille des *Astroviridae* ([https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv\\_9th\\_report](https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report) consulté le 23/06/2018)

### 3. Propriétés physico chimiques

Les astrovirus résistent aux solvants des lipides car ils ne possèdent pas d'enveloppe. Ils sont également très résistants au chloroforme, aux détergents et à la chaleur mais sont inactivés après 5 minutes à 60°C. Ils survivent pendant 1 heure à un pH de 3.5. Gardés à -70°C, ils conservent leurs propriétés infectieuses pendant 6 à 10 ans ( **Campus de Microbiologie médicale** accessible sur <http://www.microbes-edu.org> consulté le 16/07/2018

### 4. Structure génomique des astrovirus

Le génome des astrovirus est composé d'un ARN simple brin à polarité positive long d'environ 6 800 paires de bases (**Bosch et al., 2014**). Un ARN subgénomique de 2 500 bases est également détecté dans des cellules LLCMK2 infectées par un astrovirus. L'ARN génomique est polyadénylé en 3' ; Une protéine VPg (*Viral protein genome-linked*) est liée de manière covalente à l'extrémité 5' du génome qui est constitué de trois (3) cadres ouverts de lecture, ou Open Reading Frame en anglais (ORFs) : les ORF1a et ORF1b codent les protéines non structurales, et l'ORF2 code les protéines structurales qui portent les caractères antigéniques). (**Fuentes et al., 2012**). Il possède également des régions non traduites (UTR) aux extrémités 3' et 5' du génome. (**Figure 3**).



**Figure 3** : Schéma de l'organisation du génome des *Astroviridae*.  
 Accessible sur <http://www.microbes-edu.org/> consulté le 16/07/2018)

#### 4.1. La région ORF1a

L'**ORF1a** est composé d'environ 2 800 nucléotides (nt) et code pour un polypeptide d'environ 900 acides aminés (aa) qui sera clivé en quatre protéines, dont une protéase. Aucune région codant l'hélicase n'a à l'heure actuelle été identifiée dans le génome des *Astroviridae*, ce qui est rare chez les virus à ARN simple brin de taille supérieure à 6 000 nt. L'hélicase joue, en effet, un rôle important dans la réplication du génome (**Méndez et al., 2012**). Une région en amont de la protéase codant pour 6 motifs transmembranaires qui présentent des sites de liaison et de catalyse similaires à ceux retrouvés chez l'hélicase, existe néanmoins. Deux autres protéines peu caractérisées sont également codées par l'ORF1b : **(i)** une superhélice à l'extrémité N terminale et **(ii)** une phosphoprotéine hypervariable ressemblant fortement aux protéines VPg des calicivirus, jouant un rôle essentiel d'amorce dans la réplication du génome viral, ainsi que dans l'initiation de la traduction du génome répliqué (**Fuentes et al., 2012**).

#### 4.2. La région ORF1b

L'**ORF1b** est constitué d'environ 1500 nt et contient le gène de l'ARN polymérase ARN dépendante (RdRp ou RNA-dependent RNA polymerase). Cette protéine prend en charge la réplication du virus à partir du brin d'ARN viral (**Lekana-Douki et al., 2015**). Un chevauchement de 10 à 148 nt entre les ORF1a et ORF1b permet un décalage de phase nécessaire à la traduction de l'ORF1b en RdRp. Un chevauchement supplémentaire entre l'ORF1b et l'ORF2 est observé chez les astrovirus de mammifères (**Bosch et al., 2014; Lacroix et al., 2017**).

### 4.3. La région ORF2

L'ORF2 fait environ 2 500 nt et code pour trois protéines (VP34, VP27 et VP25 chez les astrovirus humains) qui constituent la capsid du virus.

## 5. Variabilité génétique des astrovirus

Des analyses de séquences entre astrovirus issus d'hôtes différents montrent une variabilité importante entre les protéines structurales et non structurales. Ainsi, la séquence d'acides aminés codant pour la RdRp peut présenter jusqu'à 25 % de différence entre diverses souches d'astrovirus humains du même groupe (HAstV-VA1 et HAstV-VA2, par exemple) (Vu *et al.*, 2017).

La longueur des cadres de lecture varie également selon les astrovirus en raison des phénomènes d'insertions/délétions (in/del) :

- La taille de l'**ORF1a** est la plus variable du fait de la présence plus fréquente d'in/del près de l'extrémité 3'.
- L'**ORF1b** qui code l'ARN polymérase ARN dépendante est la région la plus conservée du génome.
- Même si l'**ORF2** ne varie pas autant que l'ORF1a en longueur, cette portion du génome présente la plus grande variabilité de séquences nucléotidiques d'un virus à l'autre. La portion codant la protéine VP34, principal composant de la coque de la capsid, reste assez conservée, tandis que les régions codant les protéines VP25 et VP27, en interaction avec les récepteurs des cellules hôtes, présentent de très fortes variabilités (Bosch *et al.*, 2014 ; Cordey *et al.*, 2017).

Alors que dans la plupart des cas, une corrélation existe entre les génotypes ORF1a et les sérotypes ORF2, certains génotypes sont partagés par plus d'un sérotype, et certains sérotypes peuvent être associés à plusieurs génotypes, mettant en évidence l'occurrence d'événements de recombinaison entre souches. Des génotypes d'ORF1a sélectionnés ont été associés à des niveaux plus élevés d'excrétion virale (Fuentes *et al.*, 2012).

La forte variabilité génétique des HAstV, associée à la survenue d'événements de recombinaison lors d'infections concomitantes à de multiples souches, font d'eux un candidat sérieux pour les infections zoonotiques émergentes. Les transmissions inter-espèces sont particulièrement fréquentes chez les virus aviaires (Karlsson *et al.*, 2015). Une étude récente sur des primates non humains montre qu'ils peuvent être infectés par différentes souches

d'astrovirus étroitement apparentées à celles qui infectent habituellement d'autres mammifères, ou des espèces aviaires ou même des humains, y compris le nouveau HAstV MLB (Meliopoulos *et al.*, 2014). Chez l'homme, des anticorps dirigés contre les astrovirus non humains ont été identifiés (Oude Munnink *et al.*, 2016). Ainsi, il existe certainement un chevauchement entre les souches d'astrovirus animal et humain, et de plus en plus de données suggèrent que les infections à astrovirus ne sont pas spécifiques à l'espèce. Fait intéressant, un nouveau type d'astrovirus a récemment été détecté dans les selles d'individus infectés par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) et d'individus sains (Oude Munnink *et al.*, 2016). Ce nouveau virus, nommé provisoirement Bastrovirus, montre l'homologie la plus proche avec HAstV MLB au niveau de la capsidie et des membres de la famille des *Hepeviridae* au niveau des protéines non structurales, indiquant un événement de recombinaison putatif entre les membres de ces deux familles virales proches (Vu *et al.*, 2017).

## 6. Cycle de réplication

La culture *in vitro* des astrovirus humains et de certaines souches animales a permis de comprendre et de caractériser le cycle de réplication des astrovirus, bien que de nombreuses étapes nécessitent encore d'être clarifiées. La description du cycle de réplication ci-dessous s'applique aux Mamastrovirus en général (Figure 5).

Le cycle de réplication présente de nombreuses similitudes avec ceux des familles *Caliciviridae* et *Picornaviridae*. Les astrovirus possèdent cependant des caractéristiques de cycle biologique uniques, comme le *processus de clivage protéolytique* des particules virales par les caspases cellulaires, nécessaire à la maturation et à la sortie des virions (Méndez *et al.*, 2012).

### 6.1. Entrée du virus dans la cellule.

L'entrée du virus dans la cellule hôte se fait par endocytose. Les mécanismes précis de l'entrée sont assez méconnus, mais nécessitent l'intervention de trypsine extracellulaire. Celle-ci clive les protéines VP25 et VP27 et induit des changements de conformation qui rendent le virus infectieux. Lorsque le virus interagit avec les récepteurs cellulaires, la perméabilité de la cellule augmente (Moser, Carter, & Schultz-Cherry, 2007). Cette interaction active également des voies de signalisation cellulaire qui jouent un rôle important dans l'efficacité de l'infection virale, même si les mécanismes sont encore méconnus (Sanchez *et al.*, 1994).

## 6.2. Multiplication du virus

Une fois le virus internalisé et l'endosome mûré, les éléments du virus sont relargués dans le cytoplasme. L'ARN viral, de polarité positive (ARN<sup>+</sup>), est traité comme un ARN messager par la cellule hôte : il est directement traduit par la machinerie cellulaire en précurseur polyprotéique. Deux précurseurs de protéines non structurales sont générés : les nsp1a et nsp1b (figure 4).

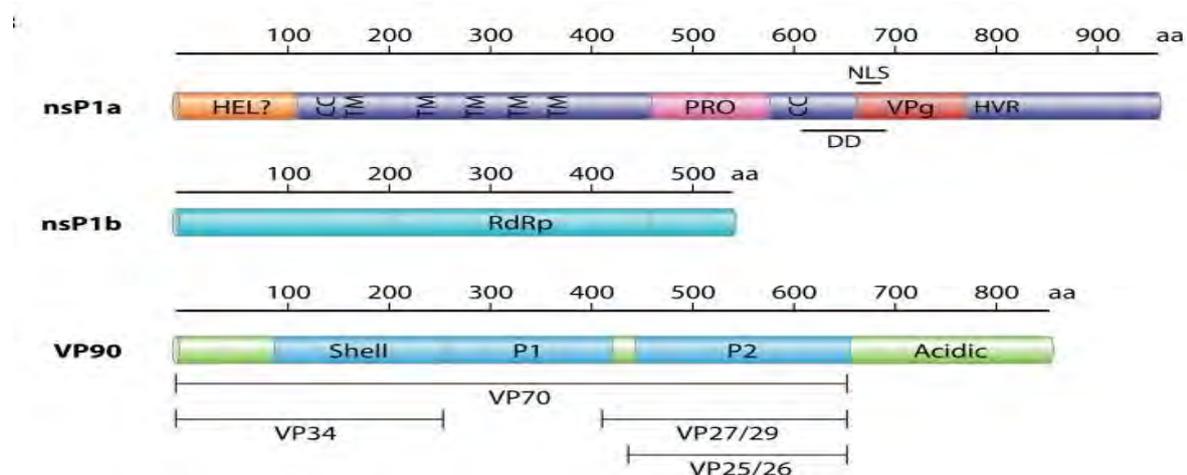


Figure 4 : précurseurs polyprotéiques de l'astrovirus humain (Modifié de Bosch *et al.*, 2014).

Des protéases cellulaires et virales les clivent en 5 protéines nécessaires à la réplication du génome viral et à l'assemblage des virions. L'ARN<sup>+</sup> génomique est ensuite répliqué par l'ARN polymérase nouvellement synthétisée en une molécule d'ARN à polarité négative (ARN<sup>-</sup>) qui servira de matrice pour la synthèse de nouveaux génomes viraux et d'ARN subgénomiques. Le précurseur de la capsidie (VP90) est traduit à partir de cet ARN subgénomique. La réplication et l'assemblage des virus à ARN<sup>+</sup> fait intervenir les membranes cellulaires de l'hôte (Méndez *et al.*, 2012).

## 6.3. Assemblage et sortie des virions

A la fin du cycle de réplication, la polyprotéine VP90, synthétisée à partir de l'ORF2, est dissociée des particules membranaires. Elle est clivée dans le cytosol par des caspases au niveau de l'extrémité C' générant une nouvelle pré protéine plus courte VP70 (70-79 KDa), qui est nécessaire pour la sortie des virions immatures de la cellule. La sortie des virions fait intervenir des caspases intracellulaires de l'hôte, dont le mode d'action reste encore peu connu (Lacroix, 2016). Des trypsines extracellulaires clivent la VP70 en trois protéines (VP34,

VP27 et VP25), qui composeront la capsid virale. A la suite de cette maturation extracellulaire, le virus devient infectieux (Vu *et al.*, 2017). La protéine VP34 à l'extrémité N', est la partie la plus conservée de la capsid, tandis que les protéines VP25 (27-29 KDa) et VP27 (25-26 KDa) contiennent des domaines variables. Ces motifs se fixent aux récepteurs des cellules hôtes dans les premières phases de l'infection et possèdent les déterminants antigéniques. Des altérations et lyses des cellules ont été observées sur des lignées cellulaires infectées (Cortez *et al.*, 2017). Cependant, les connaissances actuelles ne permettent pas de déterminer si l'infection par les astrovirus conduit à un processus lytique ou non de la cellule infectée. La production de virions commence entre 8 et 12 heures après l'infection. Au bout de 24 heures, 30 à 50% des virus produits sont excrétés par les cellules infectées.

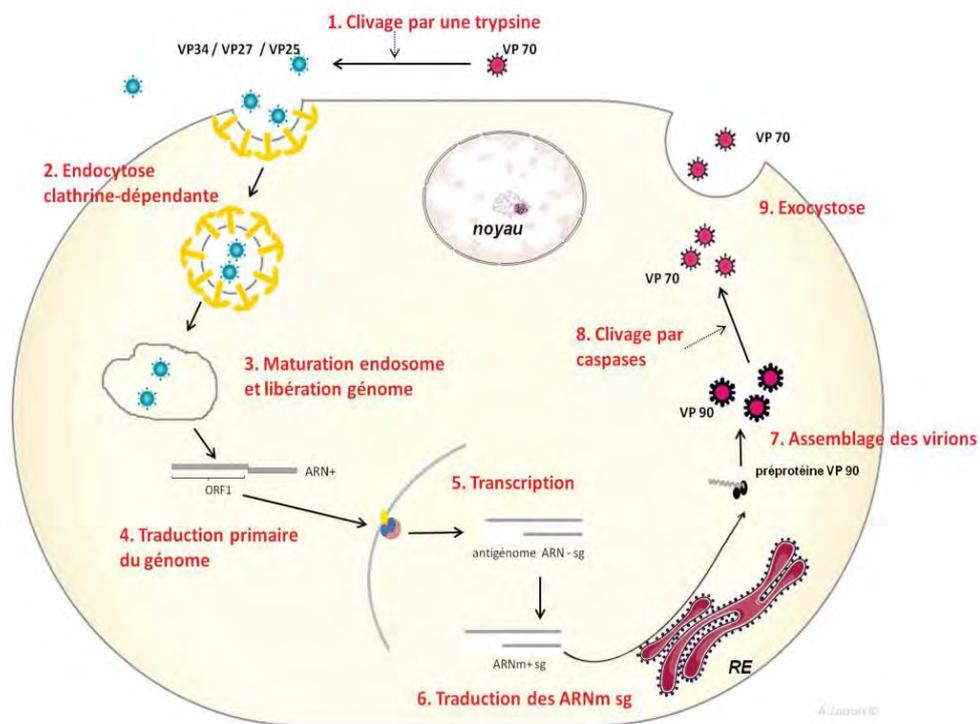


Figure 5 Cycle réplcatif des astrovirus humains (Mendéz *et al.*, 2012 modifié par Lacroix 2016 accessible sur <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01653087/document> consulté le 23/07/2018)

## 7. Sérotypes et composition protéique

Huit sérotypes d'astrovirus (HAstV 1-8) sont actuellement reconnus. Initialement, les astrovirus ont été regroupés en cinq sérotypes par immuno-électromicroscopie (IEM) et immunofluorescence avec les souches de référence isolées d'infections cliniques et les sérums de patients immunisés (Bosch *et al.*, 2014).

Les sérotypes 6, 7 ont été caractérisés plus récemment par les mêmes techniques au cours d'une étude sur la prévalence des astrovirus humains dans la région d'Oxford en Grande-Bretagne (Lacroix *et al.*, 2017). Aucune information n'est actuellement disponible sur la caractérisation du sérotype 8. Des travaux équivalents menés pour les astrovirus bovins ont permis de distinguer au moins deux sérotypes (Bosch *et al.*, 2014). En IEM, aucune parenté antigénique ne semble exister entre les astrovirus bovins et humains.

La taille et le nombre des protéines structurales d'astrovirus humains et animaux varient selon les études. Deux à cinq protéines sont décrites pour les souches animales et trois ou quatre pour les souches humaines (Vu *et al.*, 2017).

## 8. Propriétés immunologiques

### 8.1. Immunité naturelle

L'immunité contre les infections dues aux astrovirus n'est pas bien comprise. La défense contre les agents pathogènes se fait à partir de l'immunité naturelle d'origine muqueuse et secondairement à partir du tissu lymphoïde. Les jeunes enfants et les personnes âgées, (populations à risques), sont généralement ceux qui développent des infections asymptomatiques. Ce qui suggère que les anticorps sont acquis tôt dans l'enfance. A la naissance, les anticorps maternels passent chez l'enfant par voie transplacentaire et semble intervenir dans le système de défense pendant une durée indéterminée.

Le lait maternel et le colostrum fournissent également des protections initiales contre les microorganismes par le biais des anticorps qu'ils contiennent. Ces anticorps assurent la protection au cours de l'enfance mais diminuent avec l'âge (Bosch *et al.*, 2014; Phan *et al.*, 2014 ; Marvin, 2016). La présence des HAsTVs active d'une part les macrophages qui produisent l'oxyde nitrique qui supprime la réplication virale (Cortez *et al.*, 2017). La réplication virale induit la production d'IFN- $\beta$  qui concourt aussi à la suppression de ce dernier et diminue la perméabilité de la barrière induite par l'astrovirus.

Le système immunitaire inné en particulier les macrophages, l'oxyde nitrique inductible synthétase (iNOs) et l'IFN- $\beta$  jouent un rôle clé dans le contrôle de la réplication. Les anticorps spécifiques du virus (Abs) sont essentiels à la résistance aux infections à astrovirus (Bosch *et al.*, 2014).

## 8.2. Immunité acquise

L'immunité acquise implique l'action des anticorps synthétisés par l'hôte pour neutraliser les antigènes des astrovirus. L'action des cytokines, des interleukines et les lymphocytes est peu efficace à cause de l'immaturation du système immunitaire chez les nourrissons tandis que, chez les adultes, c'est l'immunodépression qui favorise la progression de la maladie (Bosch *et al.*, 2014; Marvin, 2016).

## 9. Epidémiologie des infections à astrovirus

### 9.1. Distribution et répartition géographique

Les astrovirus infectent les humains, les bovins, les porcins, les ovins, les visons, les chiens, les chats, les souris, les poulets et les dindes (Jonassen *et al.*, 2001, 2003). Les HAstV touchent principalement la population pédiatrique, bien que des infections chez les personnes âgées et les hôtes immunodéprimés soient également signalées. L'âge des enfants infectés par les HAstV classiques est très variable, allant des nouveau-nés aux enfants de plus de 5 ans ; cependant, l'infection est plus fréquente chez les enfants de moins de 2 ans (Yoneda *et al.*, 2017). Les HAstV classiques ont une distribution mondiale à l'instar des rotavirus et sont associés à 2 à 9% des cas de diarrhée aiguë non bactérienne chez les enfants (Ahmed *et al.*, 2011). Des pics saisonniers ont été observés durant les mois d'hiver dans les régions tempérées (Vu *et al.*, 2017) et durant la saison des pluies en climat tropical, bien que des incidences aussi élevées que 61% chez les nourrissons Mayas en Amérique Latine aient été rapportées (Maldonado *et al.*, 1998). L'incidence moyenne mondiale est de 11%, avec des incidences de 7% et 23% respectivement dans les zones urbaines et rurales (Vu *et al.*, 2017; Yoneda *et al.*, 2017). L'incidence des infections à HAstV est généralement plus élevée dans les pays en développement, bien que paradoxalement, une faible incidence de l'infection soit observée en Afrique subsaharienne (Phan *et al.*, 2014).

La distribution des HAstV classiques suit une tendance saisonnière avec une incidence plus élevée d'infection dans les régions tempérées en période de froid, et bien qu'il y ait une baisse spectaculaire du nombre de cas en période chaude, les astrovirus humains continuent à circuler tout au long de l'année et les infections surviennent aussi en été. Cette saisonnalité peut être la conséquence d'une meilleure stabilité du virus à des températures plus basses (Phan *et al.*, 2014; Vu *et al.*, 2017) . D'autres agents de gastro-entérite virale tels que les rotavirus

et les norovirus présentent un profil saisonnier similaire. Dans les régions tropicales, l'incidence maximale des infections à HAstV a tendance à se produire pendant la saison des pluies. Néanmoins, certaines études n'ont pas réussi à observer un pic d'infection distinct tout au long de l'année. En outre, d'autres études ont rapporté un plus grand fardeau de la diarrhée à astrovirus chez les enfants tous les deux ans (Vu *et al.*, 2017). Un comportement différent en ce qui concerne la saisonnalité semble se produire avec des souches non classiques d'HAstV. Dans une étude, de nouvelles infections d'astrovirus (MLB1, MLB2 et VA/HMO) ont été observées en mars, avril, mai, juillet et novembre. Cependant, d'autres études sont nécessaires pour élucider si les souches non classiques d'HAstV suivent un schéma de distribution saisonnière (Vu *et al.*, 2017) .

## 9.2. Modalités épidémiologiques

Les HAstV classiques sont le plus souvent impliqués dans des cas sporadiques de gastro-entérite. Cependant des épidémies de GEA à HAstV ont également été décrites dans le monde entier. C'est ainsi que l'HAstV a été impliqué dans 0,5% de toutes les flambées de gastro-entérite aiguë signalées de 1994 à 2005 aux Pays-Bas (Svraska *et al.*, 2007) .

## 9.3. Mode de transmission

Les HAstV sont transmis essentiellement par la voie féco-orale, comme le prouvent les études sur des volontaires humains (Vu *et al.*, 2017). Cependant, dans ces études, peu d'adultes receveurs ont développé une maladie gastroentéritique avec une excrétion du virus dans les fèces, probablement en raison de leur âge. La nourriture et l'eau peuvent servir de véhicules pour la transmission du virus entérique humain (Figure 6) (Cordey *et al.*, 2017). Plusieurs grandes épidémies de HAstV ont été associées à la consommation d'aliments contaminés (Mitchell *et al.*, 1995). De plus, des vecteurs passifs contaminés par des matières fécales ont été impliqués dans des éclosions déclarées dans des écoles, des maisons de soins infirmiers et des hôpitaux. Mais elles peuvent également affecter les unités de soins néonataux et les maternités (Sirinavin *et al.*, 2007 Marshall *et al.*, 2007 ; Li, C.-y *et al.*, 2010 ; Jarchow *et al.*, 2015).

Fait intéressant, une flambée épidémique touchant de jeunes adultes en bonne santé dans un camp de police anti-émeute en Corée a été causée par HAstV sérotype 5, qui est rarement identifié dans les cas sporadiques de gastro-entérite à HAstV (Hwang *et al.*, 2009).

Dans une étude prospective aux États-Unis, Lyman *et al.*, ont montré également que les HAstV peuvent causer 10% de toutes les éclosions signalées dans les garderies (Lyman *et al.*, 2009).

La transmission hydrique des HAstV a été suggérée comme un risque de morbidité digestive pour la population générale. La transmission environnementale des HAstV est soutenue par la stabilité du virus dans l'eau potable, l'eau douce et l'eau de mer (Phan *et al.*, 2014).

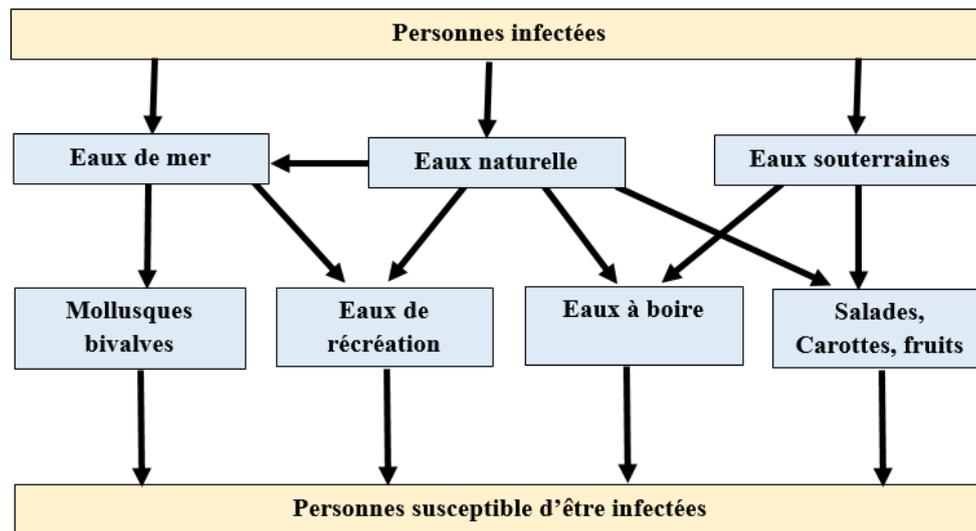


Figure 6. Voies potentielles de transmission des astrovirus humains (Yoneda *et al.*, 2017).

Les HAstV peuvent être excrétés en très grand nombre, atteignant jusqu'à  $10^{13}$  copies du génome par gramme, dans les selles des individus infectés (Bosch *et al.*, 2014). Puisque les pratiques de traitement des eaux usées n'assurent pas l'élimination complète des pathogènes viraux, les HAstV présents dans les eaux usées (traitées ou non) sont rejetés dans l'environnement et peuvent devenir des contaminants des eaux marines, et des eaux douces et souterraines qui peuvent également être contaminées par l'injection d'eaux usées récupérées.

Les mollusques bivalves cultivés dans des eaux polluées et les fruits et légumes frais irrigués avec de l'eau contaminée, comme la laitue, l'oignon vert et d'autres légumes verts, ainsi que les fruits mous, comme les framboises et les fruits secs, sont susceptibles d'être contaminés par HAstV (Le Guyader, *et al.*, 2000).

Ces produits subissent généralement peu ou pas de traitement avant d'être consommés et sont donc susceptibles d'agir en tant que vecteurs de la transmission des virus entériques humains. Les eaux de surface et les eaux souterraines sont utilisées comme sources d'eau

potable pour la consommation publique, et la mauvaise qualité de l'eau est reconnue comme une menace majeure pour la santé. L'OMS estime que près de 90% de la charge mondiale de gastro-entérite est attribuable à une eau insalubre et à de mauvaises conditions d'hygiène et d'assainissement. La population pédiatrique des pays en développement étant le groupe le plus vulnérable (Yoneda *et al.*, 2017). Ces ainsi que des génomes HAstV ont été détectés dans l'eau du robinet au Ghana (Vu *et al.*, 2017).

Bien que le risque lié aux activités récréatives dans les eaux polluées par les eaux usées soit beaucoup plus faible que celui des eaux contaminées, une gastro-entérite est apparue chez des enfants et des adultes se baignant dans une patageoire extérieure d'Helsinki contaminée par des norovirus et des astrovirus. De plus, une étude de séroprévalence au Royaume-Uni a montré que 93% des surfeurs avaient des anticorps anti-HAstV, alors que seulement 23% des témoins appariés selon l'âge avaient ces anticorps (Bosch *et al.*, 2014).

Les pratiques d'hygiène inadéquates avec une mauvaise manipulation des aliments sont généralement responsables de la contamination de certains produits alimentaires, particulièrement les aliments prêts-à-manger comme les salades, les sandwiches et la charcuterie qui sont tous consommés crus ou non cuits. Les HAstV provoquent souvent des infections asymptomatiques chez les enfants et les adultes. Les travailleurs de l'alimentation asymptomatiques sont plus souvent impliqués dans des flambées de gastro-entérite que les manipulateurs symptomatiques (Lekana-Douki *et al.*, 2015). Il est essentiel de déterminer l'importance de l'excrétion asymptomatique ainsi que de l'exsudation pré symptomatique et post symptomatique des HAstV dans la transmission des infections d'origine alimentaire.

Les vecteurs passifs ou les surfaces inanimées jouent un rôle important dans la propagation institutionnelle des infections à HAstV (Traoré *et al.*, 1998). Les vecteurs passifs comprennent les ustensiles de service et de hachage. La capacité du virus à persister sur ces surfaces assez longtemps et en nombre suffisant pourrait représenter un risque et constituer un problème majeur de santé publique. Les pratiques de désinfection, ainsi que les mesures d'hygiène améliorées, en particulier dans les environnements à haut risque tels que les hôpitaux, les institutions pour personnes âgées, les garderies ou les restaurants, sont d'une importance majeure pour prévenir la propagation des infections. (Bosch *et al.*, 2014).

## 9.4. Épidémiologie moléculaire

Dans l'ensemble, HAstV-1 est le sérotype le plus fréquemment identifié dans de nombreuses régions du monde (Gaggero *et al.*, 1998 ; Mustafa *et al.*, 2000 ; Mendez-Toss *et al.*, 2004). Elle représente plus de 50% des cas dans tous les rapports récents (Vu *et al.*, 2017)

Cependant, il existe des exceptions, comme dans une étude menée au Mexique dans laquelle le HAstV-2 était le plus répandu (Guerrero *et al.*, 1998). La prévalence classique des infections à HAstV peut être influencée par le manque d'immunité hétérotypique, car les enfants dans un endroit donné peuvent souffrir d'infections ultérieures avec différents sérotypes. La plupart des infections par HAstV-1 et HAstV-3 ont été observées chez des enfants de moins de 2 ans, tandis que les infections à HAstV-4 ont été observées chez des enfants de plus de 4 ans, confirmant l'absence de protection croisée après infection par un sérotype avant les infections avec d'autres types ou variantes (Lekana-Douki *et al.*, 2015).

De nouveaux HAstV ont également été identifiées dans le monde entier, sans différences significatives entre les pays industrialisés et les pays en développement. Une revue récente sur l'épidémiologie des nouveaux astrovirus (Lekana-Douki, *et al.*, 2015) montre un taux de positivité global dans les selles inférieur à celui observé pour les HAstV classiques (1,5%)

## 10. Pouvoir pathogène des infections à astrovirus

Les infections à astrovirus semblent spécifiques d'espèce et il n'existe donc pas de modèle animal pour l'infection humaine. Les HAstV classiques sont une cause fréquente de gastro-entérite bénigne chez les enfants de moins de cinq ans, causant généralement une maladie spontanément résolutive (Vu *et al.*, 2017). Les caractéristiques cliniques des infections à HAstV peuvent également dépendre de plusieurs facteurs. Plusieurs études ont mis en évidence des co-infections fréquentes des HAstV avec le rotavirus et le calicivirus (13 à 65%) (Bosch *et al.*, 2014). La période d'incubation d'une infection à astrovirus humain est en moyenne de quatre à cinq jours (Vu *et al.*, 2017). La diarrhée associée à HAstV est caractérisée par une durée moyenne de 3 jours (extrêmes 1 à 21 jours), une fréquence moyenne de 4 selles (extrêmes 1 à 10 selles) pendant les 24 premières heures, des vomissements (20 à 62%), et de la fièvre (7 à 25%). Il a été montré que la protéine de capsid de l'astrovirus humain et de la dinde agit comme une entérotoxine et induit un dysfonctionnement de la barrière épithéliale intestinale, selon des modèles *in vitro* et animaux, respectivement (Vu *et al.*, 2017). La diarrhée

associée à HAstV est moins sévère que la diarrhée induite par le rotavirus, mesurée par le nombre de selles et la durée de la diarrhée. La fièvre et la durée des vomissements et de la diarrhée étaient significativement plus fréquentes lors d'infections isolées à rotavirus que dans les infections isolées par AstV. Seuls 0 à 3% des cas de gastro-entérite à HAstV ont entraîné une déshydratation et aucune infection symptomatique répétée n'a été observée. Très peu d'enfants infectés par l'AstV (3%) ont été hospitalisés. (*Bosch et al., 2014*). La sévérité globale des infections à HAstV était la plus faible parmi les agents entériques examinés. La sévérité de l'infection à HAstV par les génotypes n'est pas complètement élucidée (*Vu et al., 2017*)

## 11. Diagnostic des infections à astrovirus au laboratoire

### 11.1. Les méthodes directes

Ces méthodes cherchent à identifier le virus lui-même à partir des matériels biologiques.

- **La culture cellulaire** constitue la technique de référence car étant la seule permettant de témoigner du caractère infectieux des virus isolés. Elle est sensible et spécifique (*AFSSA, 2007*). Les lignées continues de cellules rénales (LLCMK2) ou coliques (CaCo2) sont permissives pour l'isolement des astrovirus (*Bosch et al., 2014*). La culture cellulaire reste cependant l'apanage de laboratoires spécialisés
- **La microscopie électronique** consiste à placer un échantillon suffisamment mince sous un faisceau d'électrons et à utiliser un système de lentilles magnétiques pour projeter l'image de l'échantillon sur un écran phosphorescent qui transforme l'image électronique en image optique. Les effets d'interactions entre les électrons et l'échantillon donnent naissance à une image dont la résolution peut atteindre 0,08 nm. C'est ainsi que les HAstVs de 28 à 30 nm ont été observés par microscopie électronique (*Appleton & Higgins, 1975*). Les inconvénients majeurs de cette technique sont le coût élevé de l'appareil et la possibilité de confondre souvent les astrovirus à d'autres petits virus ronds entériques. Elle est moins sensible et difficile à utiliser en routine (*Glass et al., 2001*).
- La PCR (**Polymerase Chain Reaction**) ou amplification en Chaîne par Polymérisation (ACP en français), est une méthode de biologie moléculaire permettant d'amplifier en quelques heures, plusieurs centaines de millions de fois le nombre de copies d'une

séquence spécifique d'ADN (amplicon), même si la quantité initiale est très faible (quelques picogrammes). La RT-PCR est une technique qui associe une transcription reverse (RT) suivie d'une réaction de polymérisation en chaîne (PCR). Elle est 3 fois plus sensible que les tests enzymatiques. Une étude de Grote *et al* en (2011) a révélé que 30% des échantillons fécaux négatifs par ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) étaient positifs par RT-PCR. Des résultats similaires ont été obtenus en Arabie Saoudite et en Corée (Tayeb, Dela Cruz, Al-Qahtani, Al-Ahdal, & Carter, 2008). L'inconvénient majeur de cette technique est le coût élevé de l'appareil.

- L'avènement du **séquençage à haut débit** (High Throughput Sequencing ou HTS) a ouvert la voie à la métagénomique, (séquençage parallèle suivi de la description ultérieure de toutes les molécules d'acide nucléique présentes dans un échantillon.) La technique est basée sur une amplification aléatoire de génomes ou de transcrits microbiens et de l'exploration secondaire des données. Ce séquençage en profondeur a la capacité de fournir des informations taxonomiques plus détaillées que les PCR classiques, et peut également être utilisé pour la découverte de nouveaux pathogènes. L'utilisation de la HTS au cours des dernières années dans les laboratoires de recherche a permis des progrès dans l'identification et la caractérisation des astrovirus chez plusieurs espèces y compris les humains. (Shan, T *et al.*, 2011 Stenglein, M.D *et al.*, 2012 ; Chen, X *et al.*, 2013 ; Amimo, J.O *et al.*, 2016 )

## 11.2. Les méthodes indirectes

Ces types d'analyses médicales ne visent pas directement le virus mais les anticorps anti-astrovirus synthétisés par l'organisme humain lors du contact avec l'antigène viral. Les méthodes les plus connues et les plus utilisées sont : Les tests ELISA et le test d'agglutination au latex (LA).

- L'**ELISA** est une technique immuno-enzymatique de détection qui permet de visualiser une réaction antigène-anticorps grâce à une réaction colorée produite par l'action sur un substrat d'une enzyme préalablement fixée à l'anticorps. La prévalence des astrovirus serait sous-estimée par l'utilisation des tests enzymatiques qui sont moins sensibles que la RT-PCR (De Benedictis *et al.*, 2011). Le test est rapide (2 heures 30mn) et sensible (utilisation d'anticorps monoclonaux). Cependant on note une faible sensibilité en cas de période de séroconversion.

- Le **test d'agglutination au latex** est plus simple et plus pratique. C'est la méthode de diagnostic rapide de référence utilisée pour la détection du virus dans les échantillons de selles. Elle est plus rapide que la microscopie électronique ou la RT-PCR. (Komorya *et al.*, 2003) ont rapporté une sensibilité et une spécificité de 88,5% et de 97,9% du test d'agglutination au latex dans le diagnostic des astrovirus.

## 12. Traitement et prophylaxie des infections

La thérapie habituelle appliquée aux patients (jeunes enfants ou adultes) souffrant de gastro-entérite grave consiste en un remplacement du liquide par voie orale ou intraveineuse pour éviter la déshydratation. Un traitement intraveineux par IgG pour des hôtes immunodéprimés présentant une diarrhée sévère ou persistante a également été proposé, bien que l'efficacité de ce traitement n'ait pas encore été établie dans des études à grande échelle (Bosch *et al.*, 2014).

La prévention des infections à HAstV repose essentiellement sur le *contrôle des voies de transmission* et sur la *prévention et le contrôle de la maladie au niveau de l'hôte*.

*Le contrôle des voies de transmission* comprend la détection et l'inactivation du virus dans l'eau et les aliments, ainsi que la désinfection des vecteurs passifs contaminés. Des méthodes de détection et de quantification des HAstV sont disponibles, mais le seuil de nombre acceptable de copies du génome dans les matrices eau et nourriture doit encore être défini non seulement pour les HAstV mais également pour d'autres agents responsables de gastro-entérites.

Bien que la survie des HAstV classiques dans l'eau potable soit élevée, les traitements de désinfection de 2 h avec 1 mg/ml de chlore libre sont assez efficaces. Cependant, le génogroupe II est un peu plus résistant à la désinfection au chlore que le génogroupe I, ce qui suggère que des différences de persistance dans l'environnement peuvent exister entre les souches (Morsy El-Senousy, Guix, Abid, Pinto, & Bosch, 2006). La survie et l'inactivation des astrovirus dans les matrices alimentaires n'ont pas été étudiées de manière exhaustive, probablement parce que seulement quelques poussées d'origine alimentaire liées à HAstV ont été décrites et parce que des efforts ont été consacrés à l'inactivation d'autres agents viraux comme le norovirus et le virus de l'hépatite A. En ce qui concerne la désinfection des vecteurs passifs

contaminés, l'alcool à 90% s'est avéré utile (**Phan et al., 2014**). Malheureusement, aucune information sur l'inactivation n'est encore disponible pour les HAstV non classiques.

La prévention du développement de la maladie chez l'hôte comprend la vaccination et la potentialisation des défenses naturelles telles que le microbiote intestinal. Aucun vaccin n'a été développé pour les HAstV malgré plusieurs descriptions de la production de particules pseudo-virales dans différents systèmes (**Vu et al., 2017**). Ce manque d'intérêt commercial pour la production de vaccins peut être dû au faible impact clinique de l'infection par l'astrovirus chez les patients en bonne santé et à la nécessité d'un vaccin multivalent pour couvrir tous les sérotypes et souches circulants, ou du moins les plus courantes protections hétérologues. Certains auteurs ont spéculé que les probiotiques, qui peuvent interférer avec le cycle biologique du virus entérique à plusieurs étapes différentes, peuvent être utilisés comme mesure pour prévenir et/ou traiter les infections virales intestinales (**Bosch et al., 2014**). De plus, l'activité antivirale de certains flavonoïdes synthétiques sur la réplication de l'astrovirus a été décrite.

## 2<sup>ème</sup> partie

# TRAVAIL EXPERIMENTAL

## I. OBJECTIFS

### 1. Objectif général

Evaluer la prévalence et les génotypes des astrovirus humains (HastV) circulant en milieu pédiatrique et dans l'environnement à partir d'eaux usées collectées en zone urbaine dakaroise.

### 2. Objectifs spécifiques

- a. Détecter par PCR classique la présence des astrovirus humains dans au moins 50 échantillons de selles diarrhéiques et dans au moins 50 échantillons d'eaux usées brutes concentrées et stockées dans la biobanque du laboratoire
- b. Définir le génotype des astrovirus détectés par séquençage
- c. Comparer génétiquement les astrovirus humains de l'environnement avec les génotypes décrits ailleurs dans le monde.

## II. Laboratoire d'accueil

Nous avons effectué notre stage au Centre Inter Pays de Référence pour la poliomyélite au sein du Pôle de Virologie de l'Institut Pasteur de Dakar sur une période de 6 mois allant de janvier à juin 2018.

## III. Matériel et méthodes

### 1. Nature et sélection des échantillons

Nous avons effectué nos recherches à partir de 2 matrices biologiques conservées à -20° C:

- Des échantillons d'eaux usées brutes collectés en 2016 et 2017 au niveau de la station de Cambéréne dans la région Dakaroise. Nous avons travaillé à partir d'échantillons concentrés par la méthode biphasique décrite par **Albertsson et al.**, en 1958. (**Schwartzbrod 2000 ; Lewis et coll., 1988; Albert et coll., 1995**). En résumé, Des macromolécules (sulfate de Dextran et le Polyéthylène glycol (PEG) sont mélangées avec l'échantillon à analyser

en concentrations bien définies en solution aqueuse, donnant (après agitation et décantation) un système à deux phases liquides (Albertsson, 1958). En raison de leur taille, les virus se répartissent dans la phase inférieure et l'interface du mélange.

- Des prélèvements de selles diarrhéiques collectées en 2010 chez des enfants de moins de 5 ans consultant ou hospitalisés à l'Hôpital des enfants Albert Royer à Dakar

## 2. Extraction de l'ARN viral

Il s'agit d'extraire et de purifier l'ARN viral à travers des mini colonnes. L'échantillon subit une lyse avec inactivation des RNases et après fixation sur un gel de silice, l'ARN viral subit différentes phases de lavage, avant d'être élué et récupéré avant conservation à  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### i. Matériel et réactifs

#### Matériel

- Hotte
- Mini centrifugeuse
- Pipette de 1000 et 200  $\mu\text{l}$
- Cônes à filtre
- Tubes à hémolyse de 10 ml
- Tubes Eppendorf de 1,5 ml
- Bécher plus désinfectant
- EPI (Gants, Blouse)
- Vortex

#### Réactifs

- Ethanol (96-100%)
- Echantillons à tester
- Kit QIAGEN QIAamp Viral RNA Mini Kit 250 (Ref 52906)

### ii. Mode opératoire pour l'extraction (Voir en annexe 2)

### iii. Reconstitution des amorces et préparation des stocks pour la PCR

Les amorces commandées et reçues sous forme lyophilisée au laboratoire ont une quantité donnée en **nmole** mentionnée sur la fiche qui accompagne le tube. Pour les utiliser, on doit constituer un stock-mère **100  $\mu\text{M}$** , qui sera conservé à  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Le stock de travail se fera à partir du stock-mère et les dilutions se feront en fonction de la concentration de travail désirée. Ce stock de travail peut être conservé à  $+4^{\circ}\text{C}$  pour de courtes périodes.

### 3. Amplification de l'ARN viral par RT-PCR en une étape

En utilisant une enzyme (Taq Polymerase) résistante à des températures élevées, la technique PCR permet l'amplification d'une région d'ADN délimitée par des amorces spécifiques complémentaires de courts segments de l'ADN. La Taq Polymérase synthétise l'ADN de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3'.

La technique consiste à répéter des cycles de durée et de températures différentes. Appliquée au diagnostic virologique, elle permet de copier en très grand nombre une partie du génome pouvant se trouver en faible quantité dans les échantillons biologiques.

Les produits d'amplification peuvent être facilement détectés sur un gel d'agarose contenant du bromure d'éthidium qui est un agent intercalant de l'ADN.

Pour réaliser l'amplification on a besoin des éléments essentiels suivants :

- L'ADN extrait
- La paire d'amorces spécifiques au microorganisme recherché
- L'ADN polymérase (Taq Polymerase)
- Les 4 désoxyribonucléotides (dNTPs) ajoutés en excès par rapport à l'ADN extrait : Adénine (A), Thymine (T), Cytosine (C) et Guanine (G)

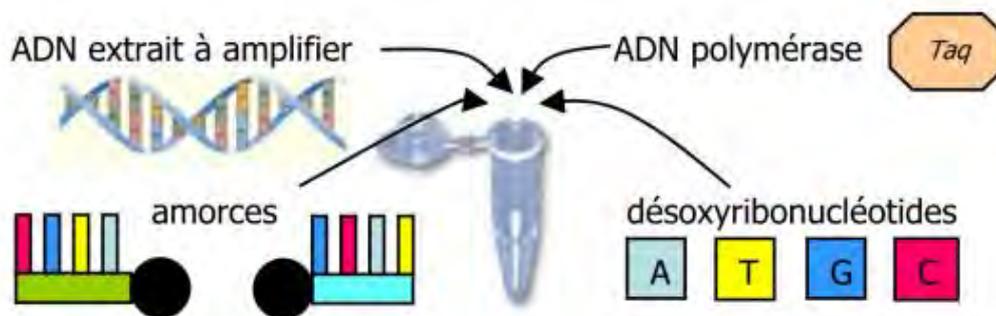


Figure 7 : Réactifs essentiels pour la réalisation de la PCR

Un mélange réactionnel (Mix) de ces éléments dans un microtube à PCR est placé dans un thermocycleur et soumis à un programme d'amplification spécifique qui va permettre grâce à la répétition de plusieurs cycles (30 en moyenne) d'amplifier des millions de copie du gène. Chaque cycle comprend 3 températures différentes :

- **Dénaturation** (Environ 95°C)
- **Hybridation** (Entre 40 et 65°C)
- **Elongation** à 72°C

Le génome viral des astrovirus est constitué d'ARN et ne peut servir directement de matrice pour l'amplification par PCR. Après extraction de l'ARN viral de l'échantillon biologique, la PCR sera précédée par une étape de transcription inverse (RT) permettant de transformer l'ARN viral en ADN complémentaire (ADNc) grâce à une enzyme, la reverse transcriptase.

Après l'extraction de l'ARN, les étapes de rétro-transcription et de PCR sont effectuées en 4 étapes :

- ❑ **La dénaturation initiale de l'ARN double brin** en présence des amorces permet de déshybrider les ARN double brins par rupture des liaisons hydrogène, de casser les structures secondaires, d'homogénéiser le milieu réactionnel par agitation thermique.

- ❑ **La transcription inverse** : l'ARN est mis en présence de l'enzyme transcriptase inverse, des nucléotides et d'un tampon réactionnel.

- ❑ **L'amplification par PCR**

- Dénaturation
- Hybridation des amorces avec baisse de la température pour permettre l'appariement avec les bases complémentaires.
- Elongation avec relèvement de la température pour permettre à la Taq polymérase de se fixer sur les amorces et de permettre le rajout des dNTPs pour la synthèse du brin complémentaire de l'ADN.

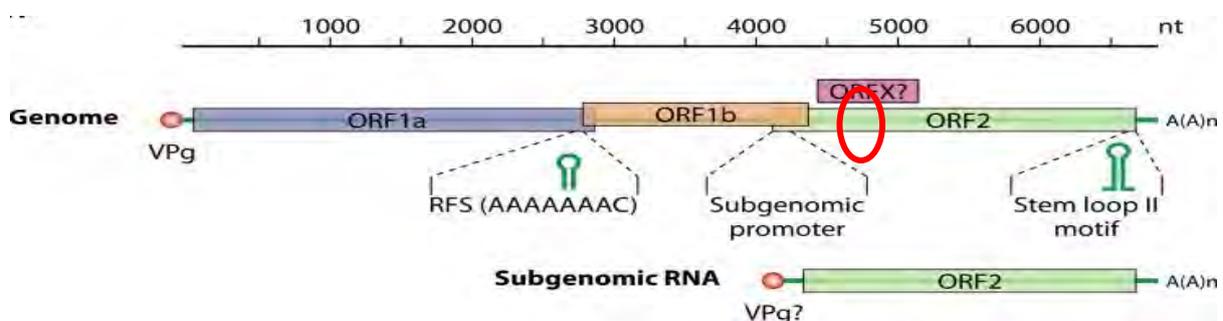
Ce cycle est répété plusieurs fois (40 cycles) afin d'obtenir plusieurs séquences de l'ADN cible.

- ❑ **La détection des produits amplifiés** par migration électrophorétique sur gel d'agarose avec visualisation des amplicons sous lumière UV.

- Les produits d'amplification peuvent être facilement détectés sur un gel d'agarose contenant du bromure d'éthidium qui est un agent intercalant de l'ADN.
- Les amplicons (produits de PCR) générés par les virus sont des fragments d'ADN bicaténaire. Par conséquent, un test PCR positif produira un fragment d'ADN spécifique de la séquence ciblée et apparaîtra comme une bande sur le gel coloré au BET. La taille moléculaire de la bande peut être déterminée en comparant la migration de la bande avec celle des bandes du témoin marqueur de poids moléculaire sur le même gel.

- Habituellement, un résultat négatif ne donne lieu à aucune bande visible dans un gel coloré au BET. Bien qu'il s'agisse de cas extrêmement rares, des échantillons donnant des bandes ne correspondant pas à la taille prévue de l'amplicon (amplification non spécifique) ne sont pas considérés comme échantillons présumés positifs.
- La présence d'une bande dans le couloir du témoin négatif, indique un problème de contamination du mélange réactionnel. Dans ce cas, tout le lot est considéré comme étant suspect et doit être jeté. Les échantillons doivent être analysés de nouveau à l'aide de réactifs fraîchement préparés.

On utilisera dans notre étude un couple d'amorces ciblant un segment de **449 bp** au niveau de la région ORF2 codant pour la polyprotéine structurale VP90 (Capsidale) avec les amorces décrites par **Noel J.S. et al, 1995** en utilisant le kit QIAGEN<sup>®</sup> OneStep RT-PCR selon les recommandations du fabricant. La PCR en une étape est une variante de la RT-PCR qui s'effectue en une seule étape associant la reverse transcriptase et la Taq-polymerase assurant le couplage de la transcription reverse et l'amplification génomique. Cette technique est plus avantageuse car elle réduit la possibilité de contamination croisée. Elle a la même sensibilité que la RT-PCR classique (**Phan et al., 2014**).



**Figure 8** Structure schématique du génome d'astrovirus et la localisation de la région ciblée pour l'amplification (encerclée au rouge) (Adapté de Bosch et al., 2014)

#### a. Consommables et matériel

- |                                      |                       |
|--------------------------------------|-----------------------|
| - EPI (Blouse, gants)                | - Portoirs réfrigérés |
| - Tubes Eppendorf de 1,5 ml          | - Bloc + glace pilée  |
| - Tubes pour PCR de 0,5 ml ou 0,2 ml | - Vortex              |
| - Pipette de 2 µl, 20 µl et 100 µl   | - Thermocycleur       |
| - Picofuge pour tube de 0,2 ml       |                       |

## b. Réactifs

- QIAGEN<sup>®</sup> OneStep RT-PCR Kit Réf : 210212
- Amorces

**Tableau I :** Séquences des amorces utilisées pour la caractérisation moléculaire des HAstV

Amorces	Séquences	Position
Mon269	5'CAACTCAGGAAACAGGGTGT 3'	4526-4545
Mon270	5'TCAGATGCATTGTCATTGGT 3'	4955-4974

## c. Protocole d'amplification

1. Installer sur le thermocycleur le programme d'amplification suivant:

RT :	50°C x 30 min	
Dénaturation initiale :	95°C x 15 min	
PCR	95°C x 30 sec	} 40 cycles
	55°C x 30 sec	
	72°C x 1 mn	
Elongation terminale:	72°C x 5 min	
Pause :	4°C x infini	

2. Sortir tous les réactifs et les produits à amplifier pour un dégel
3. Remplir les fiches de paillasse (Cf. Annexe 5)
4. Allumer la hotte
5. Allumer le thermocycleur et afficher le programme d'amplification
6. Dans la **zone de préparation des réactifs (Pré-PCR)**
  - Préparer un tube Eppendorf de 1,5 ml pour le mélange réactionnel (Master Mix) ;
  - Préparer des tubes de 0,2 ml pour chaque produit à amplifier (inclure un **contrôle positif**, un **contrôle négatif** et un **contrôle d'extraction**). Ecrire sur les tube le numéro de l'échantillon, les amorces utilisées et la date du test ;
  - Préparer le volume total de **Master Mix** (MM) nécessaire dans le tube Eppendorf de 1,5 ml selon les indications figurant sur la fiche de paillasse\* ; Vortexer, centrifuger brièvement (10s) et placer sur la glace ;

**\*Quantité pour une réaction** (QIAGEN® OneStep RT-PCR Kit)

RT-PCR	Concentration initiale	Quantité (µl)
H <sub>2</sub> O		19
Tampon	5X	10
Solution Q	5X	10
dNTP	10 mM	2
RNAseinh		1
Mélange enzymatique		2
<b>Amorce Mon269</b>	20 µM	1,5
<b>Amorce Mon270</b>	20 µM	1,5
<b>Volume réactionnel</b>		<b>47</b>

- Distribuer le mélange réactionnel dans les tubes de 0,2ml (**47 µl**) placés sur portoir réfrigéré ou sur la glace et contenant les amorces;
- Centrifuger brièvement (10s) et placer sur la glace ou le portoir ;

#### **7. Dans la zone N° 2** (Salle PCR),

- Allumer le thermocycleur et afficher le programme d'amplification "**Astro**"
- Sous la hotte, ajouter l'ARN extrait dans les tubes de 0,2ml et homogénéiser par pipetage. (Changer de cône après chaque rajout)
- Centrifuger brièvement (10s) et placer les tubes dans le thermocycleur pour 40 cycles selon le programme indiqué sur la fiche de paillasse.

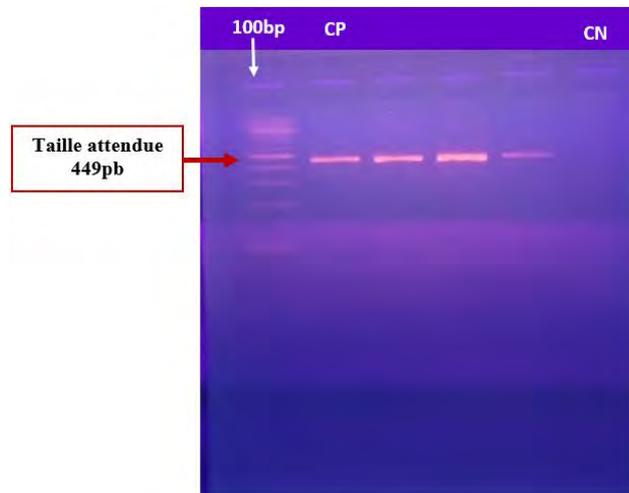
#### **8. Dans la zone N° 3** (Salle Post-PCR) Préparer un gel d'agarose à 1,5 % ([Voir annexe 3](#))

- Faire ensuite migrer les produits d'amplification sur le gel d'agarose préparé (à 100 volts) avec le marqueur de poids moléculaire adapté.

#### **d. Expression des résultats**

Les amplicons (produits de PCR) générés par les astrovirus sont des fragments d'ADN bicaténaire. Par conséquent, un test PCR positif produira un fragment d'ADN spécifique de la séquence ciblée et apparaîtra comme une bande sur le gel coloré au BET. La taille moléculaire de la bande peut être déterminée en comparant la migration de la bande avec celle des bandes du témoin marqueur de poids moléculaire sur le même gel ([Figure 9](#)).

La taille attendue des amplicons pour le segment amplifié avec les amorces Mon269 et Mon270 est de **449 paires de bases**. Les produits d'amplification positifs seront envoyés pour un séquençage partiel de la région d'intérêt ORF2.



**Figure 9** : Amplification en une étape d'un segment de 449 bp. Résultats de la migration par électrophorèse. **Ligne 1** (Marqueur de poids moléculaire 100 bp , **Ligne 2** Contrôle positif **Ligne 3-5** (amplicons positifs à 449bp), **Ligne 6** : Contrôle négatif. (Test du 02/05/2018)

## 5. Phylogénie moléculaire

Le travail d'analyse phylogénétique se déroule en 3 étapes:

- Acquisition des données moléculaires (Séquences d'ADN)
- Reconstructions phylogénétiques
- Test de robustesse des reconstructions phylogénétiques

Avant l'analyse phylogénétique, et afin d'obtenir une matrice de positions homologues, dérivant chacune d'une position ancestrale commune, nous avons procédé à l'alignement multiple de toutes les séquences d'ADN obtenues à l'aide du programme ClustalW (<http://www.clustal.org/webcite>) inclus dans le pack du logiciel Bioedit (BioEdit Sequence Alignment Editor package, version 7.0.9.0.) (Larkin MA, 2007). Nous n'avons tenu compte que des substitutions ; les brèches ou gaps (événements d'insertion/délétion) n'ont pas été utilisées. Les analyses phylogénétiques et les distances génétiques ont été établies à l'aide du logiciel MEGA 5 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) (Tamura K, 2011).

La reconstruction de l'arbre a été effectuée en utilisant l'algorithme de groupement des voisins ou Neighbour Joining Method (Saitou and Nei, 1987) qui est une méthode de distance basée sur les similarités entre paires de séquences. Elle a l'avantage d'être rapide et plus adaptée aux études phylogénétiques moléculaires.

Si le temps de divergence entre deux séquences augmente, la probabilité d'avoir une seconde mutation à un site augmente également. Ceci fait que le simple comptage des différences entre deux séquences n'est pas le reflet exact de la réalité mais sous-estime le nombre d'évènements mutationnels. Pour corriger ce biais, nous avons utilisé la correction de Kimura à 2 paramètres (**Kimura M,1980**) avec les hypothèses suivantes :

- Tous les sites évoluent indépendamment et de la même façon.
- Il existe deux taux de substitutions : un pour les transitions, un pour les transversions.
- Le processus de substitution se produit à taux constant dans le temps.

Il faut ensuite évaluer la confiance que l'on peut avoir dans cet arbre par un bootstrapping (évaluation des branches internes de l'arbre) consistant à échantillonner les positions de l'alignement pour relancer la construction phylogénétique de façon itérative puis de comparer les résultats obtenus après 10, 100, 5000 répétitions (typiquement 100 à 1000). Elle permet d'estimer la robustesse de la phylogénie. On aura entre chaque branche de l'arbre une valeur de bootstrap (de 0 à 100%) traduisant le nombre de fois où cette branche a été retrouvée au fil des répétitions permettant de juger ainsi de sa crédibilité. En général une valeur en dessous de 95 n'est pas à prendre en compte. Mais selon les cas, on pourra revoir ce seuil (cut-off) à la baisse et on pourra parfois se contenter d'un bootstrap d'environ 70. Nous avons comparé les résultats après 1000 répétitions et nous avons tenu compte des valeurs de bootstrap supérieures à 80%.

Pour obtenir un arbre enraciné permettant d'obtenir une estimation de la direction des changements au cours du temps, nous avons introduit à priori comme groupe externe (outgroup) une séquence d'astrovirus aviaire.

## II. Résultats

### 1. Distribution des échantillons

67 échantillons d'eaux usées concentrées et 91 selles diarrhéiques stockés à -20°C depuis leur collecte (Respectivement en 2016 et 2017 pour les eaux usées et en 2010 pour les selles) ont été sélectionnés pour cette étude.

### 2. Résultats de la RT-PCR

Tableau III : Résultats de la RT-PCR selon le type d'échantillons

	<u>Positifs</u>		<u>Négatifs</u>		<b>Total</b>
	n	%	n	%	
Eaux usées	14	(21%)	53	(79%)	<b>67</b>
Selles	04	(4,4%)	87	(95,6%)	<b>91</b>
<b>Total</b>	<b>18</b>	<b>(11,4%)</b>	<b>140</b>	<b>(88,6%)</b>	<b>158</b>

4.4% échantillons de selles et 21% des échantillons d'eaux usées sont positifs en RT-PCR classique en une étape pour la détection de l'ARN des astrovirus humains.

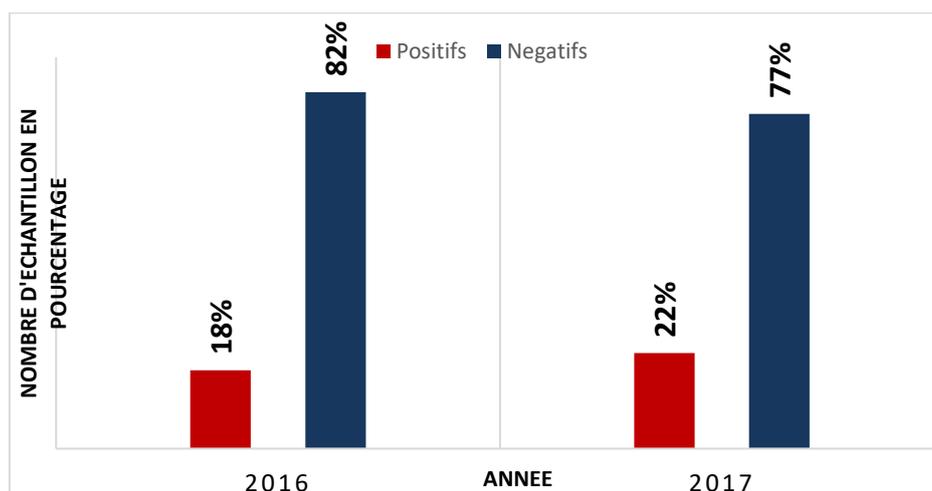
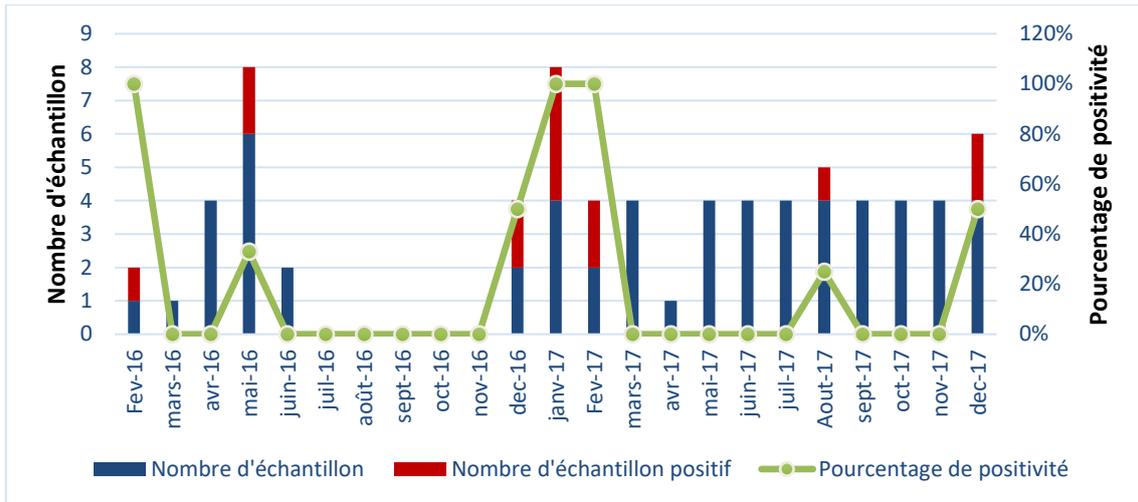


Figure 10 : Distribution des échantillons d'eaux usées positives selon l'année de collecte

La prévalence des astrovirus humains dans l'environnement est plus élevée en 2017 qu'en 2016 avec des pourcentages respectifs de 22 et 18.



**Figure 11 : Distribution mensuelle des échantillons d'eaux usées positifs pour HAstV**

En février de 2016 et en janvier et février 2017, 100% des échantillons ont été positifs

En décembre 2016 et 2017 nous avons un taux de positivité de 50%.

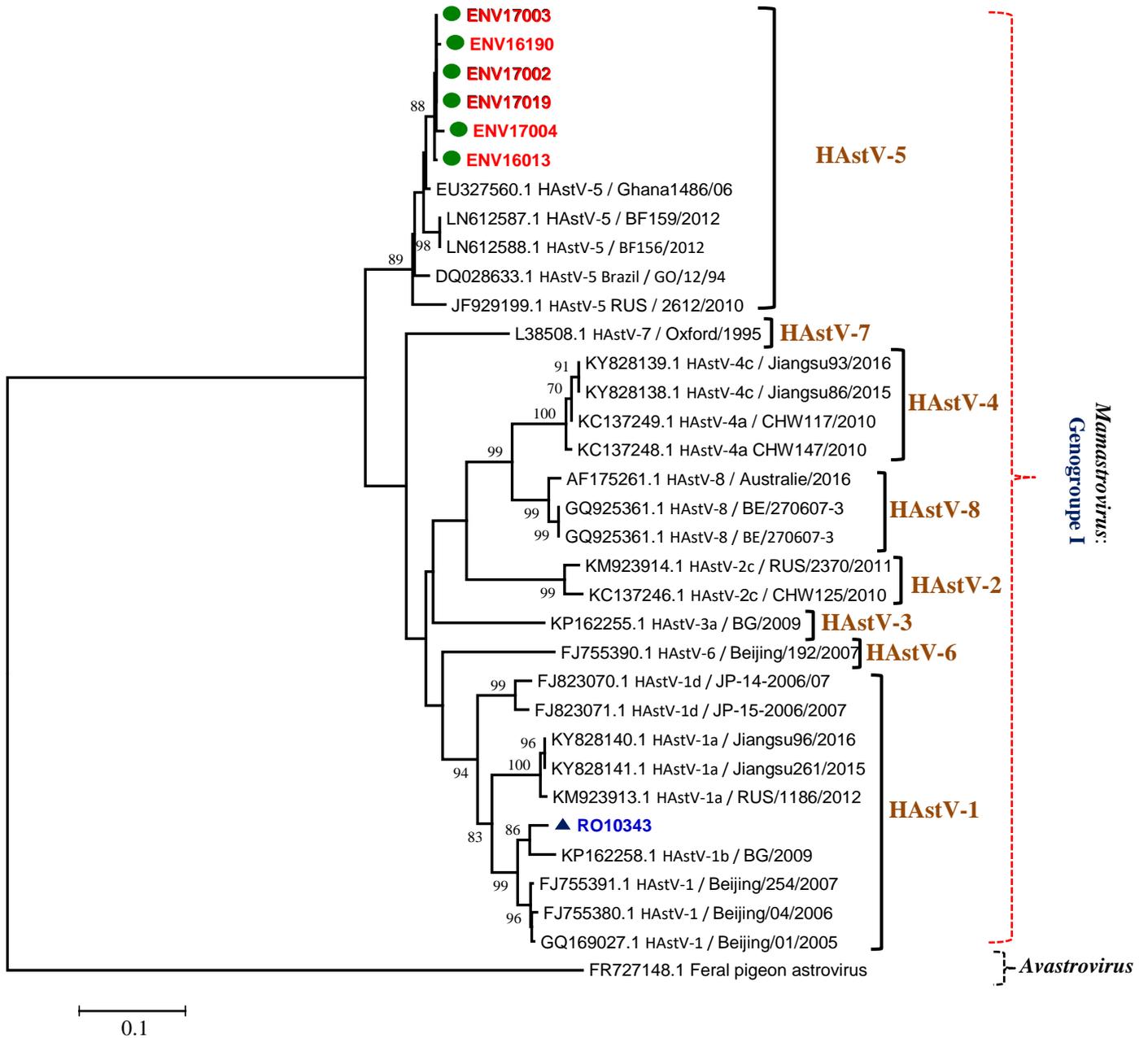
En mai 2016 et aout 2017 un taux de positivité respectifs de 33 et 25% sur les échantillons d'eaux usées ont été observés.

De juillet en novembre 2016 il n'y pas eu de collecte

### 3. Résultats de l'analyse phylogénétique

Les résultats de l'analyse phylogénétique sont représentés sur l'arbre figurant en **figure 12**

- **Analyse phylogénétique des astrovirus humain identifiés**



**Fig. 12.** Analyse phylogénétique des astrovirus détectés dans les eaux usées et les échantillons de selles basée sur la comparaison d'une séquence de 449 pb de la région ORF2 codant pour la polyprotéine structurale VP90. Les nombres sur la gauche représentent le niveau de confiance des branches suite au test phylogénétique du bootstrap avec 1000 tirages. L'échelle en bas indique le taux attendu de nucléotides divergents entre deux lignées. Nous avons utilisé comme groupe externe une séquence d'astrovirus aviaire (FR727148.1 Feral pigeon astrovirus). Les virus détectés dans les eaux usées x sont représentés en rouge, tandis que les séquences génomiques des virus détectés dans les selles diarrhéiques sont indiqués en bleu.

### III. Discussions

Les astrovirus humains font partie des agents viraux majoritairement responsables de gastroentérites. Cependant, aucun système de surveillance spécialisé sur ces virus n'a été mis en place en Afrique plus précisément au Sénégal. Dans cette étude, nous avons évalué la circulation et les géotypes des astrovirus humains circulants à partir d'échantillons de selles et de concentrats d'eaux usées collectés respectivement en 2010 et au cours de la période 2016-2017 dans la région dakaroise.

Notre étude a révélé une prévalence de **4,4%** (4/91) d'échantillons positifs dans les selles diarrhéiques sélectionnées pour l'année 2010 avec 02 séquences obtenues sur les 4 échantillons positifs envoyés pour séquençage. Les HAstV classiques sont ubiquitaires mais leur fardeau est remarquable dans les pays en développement. La prévalence chez les enfants souffrant de gastro-entérite, dans les études utilisant la méthode de criblage par RT-PCR comme dans notre étude est d'environ 5% (allant de 0 à plus de 20%)([Tableau III](#)).

**Tableau III : Taux de positivité à HAstV classique chez différentes populations, publiées au cours des 10 dernières années. (Adapté de (Vu et al., 2017)**

Zone géographique (Période étude)	Méthode	Taux de positivité (%)	% d'échantillons positifs coinfectés	Reference
Chine (2010-2011)	RT-PCR	<b>4,4</b> (32/723)	64% avec rotavirus	Wang F. et al.2011
Inde (2004-2008)	RT-PCR	<b>3,1</b> (42/1340)	8,8% avec rotavirus	Wang F. et al.2015
Chine (2005-2006)	RT-qPCR	<b>9,15</b> (43/470)	Données indisponibles	Dai Y. et al.2010
Burkina Faso (2011-2012)	RTqPCR	4,9 (13/263)	7,7% avec autres VE*	Ouedraogo. et al.2016
Gabon (2010-2011)	RT-PCR	<b>6,3</b> (20/317)	55 % avec autres VE*	Lekana D. et al.2015
Bulgarie (2009)	RT-PCR	<b>6,9</b> (7/115)	55 % avec autres VE*	Mladenova, Z et al.2015
Brésil (2005-2011)	RT-PCR	<b>7,1</b> (207 / 2913)	Données indisponibles	Xavier, M.d et al.2015
Etats Unis (2008-2009)	RT-qPCR	4,9	25 % avec autres VE*	Chhabra P et al.2015

VE\*= Virus entériques

La prévalence trouvée dans notre étude est proche de celles observées à travers le monde ces 10 dernières années (2 à 9 %) (Vu et al., 2017). En Côte D'Ivoire en 2007, une prévalence de 5,4% avait été retrouvé chez les enfants de moins de 5 ans (Bini, J.C. et al.2007). La technique de PCR quantitative en temps réel (RT-qPCR) utilisé dans plusieurs études notamment au Burkina Faso (2011-2012) et aux Etats-Unis (2008-2009) dans la même cible d'étude (enfants < 5 ans) ontrapporté une prévalence similaire de 4,9% chacune. Pour des raisons inconnues, les études

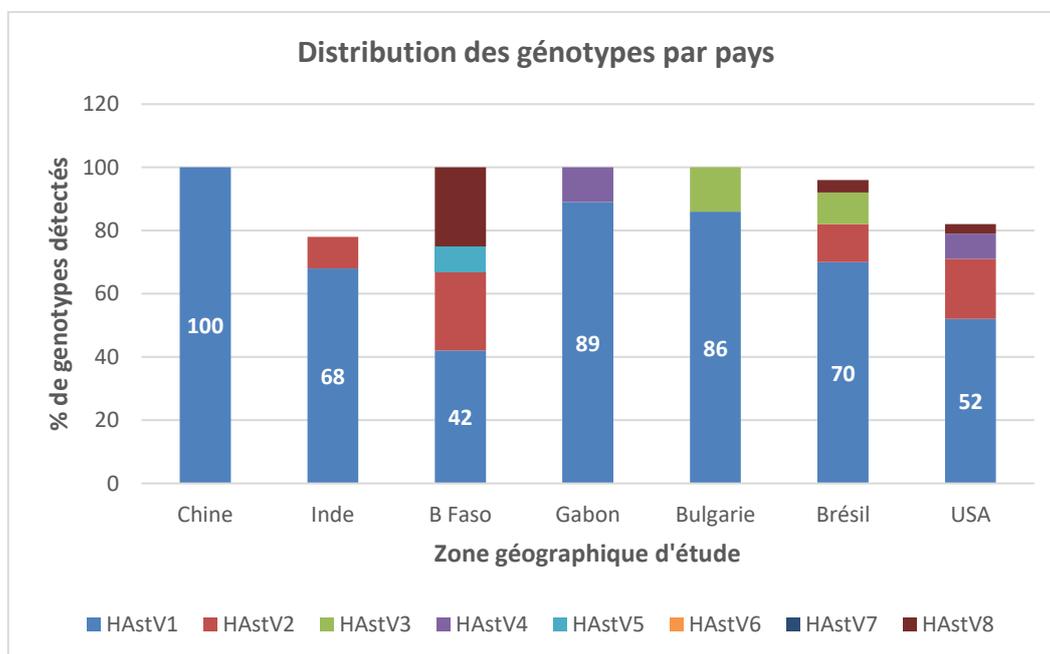
utilisant la RT-PCR multiplex pour le dépistage tendent à générer une prévalence plus faible (Guyen *et al.*, 2007 ; Rimoldi *et al.*, 2011 ; Gonzalez *et al.*, 2011 ; Al Thani *et al.*, 2013).

En revanche, une étude menée en Chine (2005-2006) dans la région de Jiangmen en utilisant la RT-PCR en temps réel pour la détection des astrovirus a rapporté un taux de positivité de 9,15% chez les enfants de moins de 5 ans. Une tendance à la baisse de l'incidence des infections à HAstV classiques semble s'être produite au cours des dernières décennies, comme en témoignent les données d'études menées dans la même région à plusieurs années d'intervalle (exemple France ou Japon) (Yoneda *et al.*, 2017). L'incidence moyenne des infections à HAstV classiques dans les années 1980 était de 22%, alors qu'elle était de 15% dans les années 1990 et de 5% dans la première décennie du nouveau millénaire (Vu *et al.*, 2017). Cependant, il existe des différences dans les méthodes utilisées et dans les populations étudiées qui rendent difficile la comparaison adéquate de ces études. Il est plausible que la diminution de l'incidence de l'infection à HAstV classique puisse être liée au déplacement des infections à HAstV classiques par ceux avec de nouvelles souches HAstV telles que MLB et VA/HMO, qui pourraient être en concurrence avec les HAstV classiques. En fait, des rapports récents indiquent une **prévalence élevée de certaines de ces souches** (Dongdem, Damanka, & Asmah, 2011).

Les échantillons de selles sélectionnées dans notre étude avaient initialement été testés par méthode ELISA pour la détection des rotavirus et 90% des échantillons étaient positifs (82/91) pour la présence des rotavirus. Nous avons retrouvé les 4 astrovirus détectés en cocirculation avec des rotavirus. Des co-infections de HAstV avec d'autres virus entériques sont souvent rapportées, et il y a des données indiquant une corrélation significative entre les co-infections et la maladie clinique (Reither *et al.*, 2007). Il convient de noter que le taux moyen de co-infections par HAstV, en particulier avec les virus entériques, est supérieur à 30%, ce qui rend l'association avec la gastro-entérite plus difficile.

Les HAstVs peuvent être trouvés dans les eaux usées (Pinto *et al.*, 2001 ; Le Cann *et al.*, 2007) et, comme d'autres pathogènes viraux, ne sont pas complètement éliminés après le traitement de ces eaux (Senousy *et al.*, 2007). Les HAstV classiques et les nouveaux sont tous rejetés dans des environnements d'eau douce et marine (Guyader *et al.*, 2000 ; Nadan *et al.* 2003 ; Pinto *et al.*, 1996). Dans les concentrats d'eaux usées brutes étudiés nous avons noté un taux d'astrovirus humains positif élevé de **21%** (14/67). Cette prévalence est proche de celle décrite. En Allemagne où des taux de positivité pour les astrovirus entre 24 et 42 % ont été enregistrés

sur des prélèvements effectués sur des effluents de plusieurs station d'épuration (**Pusch et al., 2005; Zhou et al., 2014**). En Hongrie, des astrovirus humains ont été détectés dans 43% des échantillons d'eaux usées brutes (**Meleg et al., 2006**). Sur les 14 échantillons positifs, 7 ont été envoyés pour séquençage et 6 sont revenus avec une bonne qualité pour le traitement. Le génotype 1 identifié dans les selles au cours de cette étude concorde avec les résultats d'études menées dans plusieurs pays (**Vu et al., 2017**). Il est par ailleurs le génotype le plus fréquent au monde correspondant à plus de 50% des génotypes circulants (**Vu et al., 2017; Zhou et al., 2014**).



**Figure 13 : Taux de positivité à HAstV classique chez différentes populations, publiées au cours des 10 dernières années. (Adapté de (Vu et al., 2017))**

Dans les concentrats d'eaux usées le génotype 5 a été le seul identifié au cours de la période 2016-2017. Ceci est en accord avec les résultats d'une étude précédente menée à Houston et Mexico dont les isolats ont tous été tous du type 5 après avoir été typés par RT-PCR (**Zhou et al., 2014**).

L'analyse des séquences nucléotidiques du génotype humain détecté (HAstV-1) a révélé une relation étroite avec une homologie de séquence de 99% avec la souche de référence HAstV-1(KY815037) détectée lors d'une étude en Inde (**Gupta et al., 2018**).

Dans notre étude, les génotypes des astrovirus humains détectés dans l'environnement (HAstV-5) présentent une homologie de séquences élevée les unes par rapport aux autres

et forment à un cluster unique. Ils sont proches des virus homotypiques ayant circulé en Afrique (au Ghana en 2006 (**EU327560.1 HAstV-5 / Ghana1486/06**) et au Burkina Faso en 2012 (**LN612587.1 HAstV-5 / BF159/2012**). Ils sont classés dans le genogroupe I selon le 10<sup>ème</sup> rapport de l'ICTV accessible sur <https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/>

## V. Conclusions-Perspectives

Notre étude a montré une forte circulation des astrovirus dans l'environnement et leur présence dans les selles diarrhéiques d'enfants de moins de 5 ans consultants ou hospitalisés en structure pédiatrique dakaroise. Cette prévalence tout comme les génotypes identifiés par séquençage confirment les résultats décrits dans des études menées au niveau mondial.

La détection des astrovirus dans ces échantillons stockés pour les selles depuis 8 ans et pour les eaux usées depuis plus de 2 ans témoignent de la viabilité et de la résistance des astrovirus dans certaines conditions. Une des limites de cette étude a été la non disponibilité des données épidémiologiques et cliniques. Des études prospectives en population générale sur une période d'au moins 2 années devraient permettre d'avoir une prévalence actualisée et de déterminer les profils épidémiologiques de circulation. Elle permettrait également de déterminer les génotypes circulants, de suivre leur dynamique évolutive et d'établir des mesures d'association avec les maladies diarrhéiques (suivi de cohorte, enquête cas-témoins, etc.). Avec l'augmentation de la sensibilité de la méthode RT-PCR en temps réel, un taux de positivité significativement plus élevé d'HAstV chez les enfants asymptomatiques a été rapporté (**Ouedraogo,2016 ; Reither 2007, Grant 2012**), d'environ 4%, mais atteignant plus de 20% dans certaines études (**Resque,2007**). Une quantification précise de la charge virale serait importante pour déterminer si le degré de réplication virale peut contribuer à expliquer l'expression clinique des infections par HAstV. Une étude de cohorte de naissance communautaire réalisée en Tanzanie et utilisant des cartes de TaqMan ciblant 19 entéropathogènes, n'a montré aucune association entre la diarrhée et les résultats qualitatifs, mais a trouvé une association significative pour l'astrovirus, le rotavirus et *Escherichia coli* entéro-invasive avec les données quantitatives (**Platts-Mills,2014**). Des études cas-témoins supplémentaires seraient utiles pour évaluer s'il existe une corrélation entre la charge virale établie par tests RTqPCR et les symptômes chez les individus infectés en tant que

réservoir de virus. La corrélation de la maladie et les analyses quantitatives doivent également être effectuées en cas d'infections mixtes. D'autre part, les HAV doivent également être surveillés chez les patients immunodéprimés atteints d'une infection du SNC d'étiologie inconnue: un diagnostic définitif est crucial pour mieux estimer le fardeau de HAstV dans l'encéphalite infectieuse inexplicée et identifier les facteurs de risque modifiables potentiels qui pourraient être importants pour la prévention.

Les HAstV ne devraient plus être considérés uniquement comme des virus responsables de GEA mineurs chez les enfants. Malgré la prévalence globale apparemment faible des nouveaux génotypes, des études sérologiques aux Etats-Unis ont rapporté une séroprévalence HAstV-MLB1 et HAstV-VA1 (HMO-C) étonnamment élevée (86% et 65%, respectivement) (Burbelo *et al.*, 2011 ; Holtz *et al.*, 2014). Ainsi, le *développement et l'optimisation des méthodes de diagnostic sensibles* et le *dépistage plus systématique des nouveaux HAstV* devraient être conduites pour obtenir une estimation plus exacte de leur prévalence.

De nombreux cas de méningite et d'encéphalite provoqués par une nouvelle infection à HAstVs ont été rapportés. Ceci a poussé des groupes de chercheurs à effectuer un dépistage rétrospectif en grande partie des nouveaux HAstV dans des échantillons de liquide céphalo rachidien(LCR). (Brown, 2015 ; Cordey,2016). Le taux de positivité observé est faible (0-0,2%), ce qui suggère que soit l'infection du système nerveux central soit très rare, ou que la population ciblée et / ou le type d'échantillon ne sont pas adéquats.

La notification d'infections du système nerveux central potentiellement mortelles associées aux HAstV, ainsi que le large panel d'espèces hôtes, et leur transmissibilité élevée renforcent l'hypothèse selon laquelle les astrovirus peuvent émerger et évoluer pour provoquer des maladies non encore reconnues chez l'homme. Le *développement de méthodes diagnostiques sensibles*, telles que les dosages RTqPCR (PCR), de réactifs immunologiques et de souches adaptées à la culture cellulaire, devrait être la priorité pour mieux comprendre leur évolution et leur pathogénèse. Les HAstV devraient également faire l'objet d'un suivi épidémiologique, en accordant une attention particulière à la transmission inter-espèces.

# REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

## A

- Al-Thani, A.;** Baris, M.; Al-Lawati, N.; Al-Dhahry, S. **(2013)**. *Characterising the aetiology of severe acute gastroenteritis among patients visiting a hospital in Qatar using real-time polymerase chain reaction.* *BMC Infect. Dis.* 13, 329.
- Amoo-Sakyi, F.;** Danikuu, F. **(2007)**. *Acute childhood diarrhoea in northern Ghana: Epidemiological, clinical and microbiological characteristics.* *BMC Infect. Dis.* 7, 104.
- Ahmed, S. F.,** Sebeny, P. J., Klena, J. D., Pimentel, G., Mansour, A., Naguib, A. M., ... Wang, D. **(2011)**. *Novel Astroviruses in Children, Egypt.* *Emerging Infectious Diseases,* 17, 2391-2393. <https://doi.org/10.3201/eid1712.110909>
- Amimo, J.O.;** El Zowalaty, M.E.; Githae, D.; Wamalwa, M.; Djikeng, A.; Nasrallah, G.K. **(2016)**. *Metagenomic analysis demonstrates the diversity of the fecal virome in asymptomatic pigs in East Africa.* *Arch. Virol.* 161,887–897.
- Appleton, H., & Higgins, P. G. (1975)**. *Viruses and gastroenteritis in infants.* *The Lancet,* 305(7919), 1297. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(75\)92581-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(75)92581-7)

## B

- Bini, J. C.,** Ekaza, E., Faye-Kette, H., Veh, K. A., Nigue, L., Borget-Alloue, M. Y., Dosso, M. **(2007)**. *Detection by RT-PCR of the 1st cases of Astrovirus in human stools in Abidjan, Côte d'Ivoire].* *Bulletin De Société De Pathologie Exotique* 100(4), 243-245.
- Bosch, A.,** Pintó, R. M., & Guix, S. **(2014)**. *Human Astroviruses.* *Clinical Microbiology Reviews,* 27(4), 1048-1074. <https://doi.org/10.1128/CMR.00013-14>
- Brown, J.R.;** Morfopoulou, S.; Hubb, J.; Emmett, W.A.; Ip, W.; Shah, D.; Brooks, T.; Paine, S.M.; Anderson, G.; Virasami, A.; **(2015)** *Astrovirus VA1/HMO-C: An increasingly*

recognized neurotropic pathogen in immunocompromised patients. *Clin. Infect. Dis.*, 60, 881–888.

**Burbelo, P.D.;** Ching, K.H.; Esper, F.; Iadarola, M.J.; Delwart, E.; Lipkin, W.I.; Kapoor, A. (2011) Serological studies confirm the novel astrovirus HMOAstV-C as a highly prevalent human infectious agent. *PLoS ONE*, 6,e22576.

## C

**Chen, X.;** Zhang, B.; Yue, H.; Wang, Y.; Zhou, F.; Zhang, Q.; Tang, C. (2013). A novel astrovirus species in the gut of yaks with diarrhoea in the Qinghai–Tibetan Plateau. *J. Gen. Virol.* 2015, 96, 3672–3680.

**Cordey, S.;** Vu, D.-L.; Schibler, M.; L'Huillier, A.G.; Brito, F.; Docquier, M.; Posfay-Barbe, K.M.; Petty, T.J.; Turin, L.; Zdobnov, E.M. (2016) Astrovirus MLB2: A new gastroenteric virus associated with meningitis and disseminated infection. *Emerg. Infect. Dis.* 22, 846–853.

**Cordey, S.;** Vu, D.-L., Zanella, M.-C., Turin, L., Mamin, A., & Kaiser, L. (2017). Novel and classical human astroviruses in stool and cerebrospinal fluid: comprehensive screening in a tertiary care hospital, Switzerland. *Emerging Microbes & Infections*, 6(9), e84. <https://doi.org/10.1038/emi.2017.71>

**Cortez, V.;** Meliopoulos, V. A., Karlsson, E. A., Hargest, V., Johnson, C., & Schultz-Cherry, S. (2017). Astrovirus Biology and Pathogenesis. *Annual Review of Virology*, 4(1), 327-348. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-101416-041742>

## D

**Dai, Y.;** Xu, Q., Wu, X., Hu, G., Tang, Y., Li, J., Nie, J. (2010). Development of real-time and nested RT-PCR to detect astrovirus and one-year survey of astrovirus in Jiangmen City, China. *Archives of Virology*, 155, 977-982. <https://doi.org/10.1007/s00705-010-0664-6>

---

**De Benedictis, P.,** Schultz-Cherry, S., Burnham, A., & Cattoli, G. (2011). *Astrovirus infections in humans and animals – Molecular biology, genetic diversity, and interspecies transmissions*. *Infection, Genetics and Evolution*, 11(7), 1529-1544. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.07.024>

**Dongdem, J. T.,** Damanka, S., & Asmah, R. (2011). *Molecular isolation of human norovirus and astrovirus in tap water by RT-PCR*. *Int. Res. J. Biochem. Bioinformat*, 1, 131–138.

## E

**El Sayed Zaki, M.,** & Abo El Kheir, N. (2017). *Molecular study of astrovirus, adenovirus and norovirus in community acquired diarrhea in children: One Egyptian center study*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 7(11), 987-990. <https://doi.org/10.1016/j.apitb.2017.10.003>

**El-Senousy, W.M.;** Guix, S.; Abid, I.; Pinto, R.M.; Bosch, A. (2007). *Removal of astrovirus from water and sewage treatment plants, evaluated by a competitive reverse transcription-PCR*. *Appl. Environ. Microbiol.* 73,164–167.

## F

**Fang, Z.,** Sun, Y., Ye, X., Wang, H., Zhang, Q., Duan, Z., Glass, R. (2006). *Astrovirus infection among hospitalized children with acute diarrhea in seven regions of China, 1998-2005*. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi*, 27(8), 673-676.

**Fischer, K.,** Zeus, V., Kwasnitschka, L., Kerth, G., Haase, M., Groschup, M. H., & Balkema-Buschmann, A. (2016). *Insectivorous bats carry host specific astroviruses and coronaviruses across different regions in Germany*. *Infection, Genetics and Evolution*, 37, 108-116. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2015.11.01>

**Fuentes, C.,** Bosch, A., Pintó, R. M., & Guix, S. (2012). *Identification of Human Astrovirus Genome-Linked Protein (VPg) Essential for Virus Infectivity*. *Journal of Virology*, 86(18), 10070-10078. <https://doi.org/10.1128/JVI.00797-12>

## G

- Gaggero, A.,** O’Ryan, M., Noel, J. S., Glass, R. I., Monroe, S. S., Mamani, N., Avendaño, L. F. (1998). *Prevalence of astrovirus infection among Chilean children with acute gastroenteritis.* Journal of Clinical Microbiology, 36(12), 3691-3693.
- Glass, R. I.,** Bresee, J., Jiang, B., Gentsch, J., Ando, T., Fankhauser, R., Monroe, S. S. (2001). *Gastroenteritis viruses: an overview.* Novartis Foundation Symposium, 238, 5-19; discussion 19-25.
- Guerrero, M. L.,** Noel, J. S., Mitchell, D. K., Calva, J. J., Morrow, A. L., Martínez, J., Ruiz-Palacios, G. M. (1998). *A prospective study of astrovirus diarrhea of infancy in Mexico City.* The Pediatric Infectious Disease Journal, 17(8), 723-727.
- Gupta, S.,** Krishnan, A., Sharma, S., Kumar, P., Aneja, S., & Ray, P. (2018). *Changing pattern of prevalence, genetic diversity, and mixed infections of viruses associated with acute gastroenteritis in pediatric patients in New Delhi, India.* Journal of Medical Virology, 90, 469-476. <https://doi.org/10.1002/jmv.24980>
- Gonzalez, G.G.;** Liprandi, F.; Ludert, J.E. (2011). *Molecular epidemiology of enteric viruses in children with sporadic gastroenteritis in Valencia, Venezuela.* J. Med. Virol. 83, 1972–1982.
- Grant, L.;** Vinje, J.; Parashar, U.; Watt, J.; Reid, R.; Weatherholtz, R.; Santosham, M.; Gentsch, J.; O'Brien, K. (2012). *Epidemiologic and clinical features of other enteric viruses associated with acute gastroenteritis in American Indian infants.* J. Pediatr. 2012, 161, 110–115; e111.

## H

- Holtz, L.R.;** Bauer, I.K.; Jiang, H.; Belshe, R.; Freiden, P.; Schultz-Cherry, S.L.; Wang, D. (2014). *Seroepidemiology of astrovirus MLB1.* Clin. Vaccine Immunol. 2014, 21, 908–911.
- Hwang, B.J.S.;** Jeong, H.J.; Chung, G.T.; Kang, Y.; Yang, S.J.; Seo, N.Y.; Shin, T.H.; Yoo, C.; Lee, D.Y. *Outbreak of astrovirus in adults with acute gastroenteritis in Korea.* J. Gastrointest. Dig. Syst. 2015, S13.

## J

**Jarchow-Macdonald, A.A.**; Halley, S.; Chandler, D.; Gunson, R.; Shepherd, S.J.; Parcell, B.J. *First report of an astrovirus type 5 gastroenteritis outbreak in a residential elderly care home identified by sequencing.* *J. Clin. Virol.* 2015, 73, 115–119.

**Jonassen, C. M.**, Jonassen, T. O., Saif, Y. M., Snodgrass, D. R., Ushijima, H., Shimizu, M., & Grinde, B. (2001). *Comparison of capsid sequences from human and animal astroviruses.* *The Journal of General Virology*, 82(Pt 5), 1061-1067.  
<https://doi.org/10.1099/0022-1317-82-5-1061>

**Jonassen, C. M.**, Jonassen T, T. Ø., Sveen, T. M., & Grinde, B. (2003). *Complete genomic sequences of astroviruses from sheep and turkey: comparison with related viruses.* *Virus Research*, 91(2), 195-201

## K

**Kimura, M. (1980)** *A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences.* *Journal of Molecular Evolution* 16:111-120.

**Karlsson, E. A.**, Small, C. T., Freiden, P., Feeroz, M., Matsen, F. A., San, S., Schultz-Cherry, S. (2015). *Non-Human Primates Harbor Diverse Mammalian and Avian Astroviruses Including Those Associated with Human Infections.* *PLOS Pathogens*, 11(11), e1005225. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005225>

**Le Guyader, F.**; Haugarreau, L.; Miossec, L.; Dubois, E. (2000). *Pommepuy, M. Three-Year study to assess human enteric viruses in shellfish.* *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 3241–3248.

## L

**Lacroix, A.,** Duong, V., Hul, V., San, S., Davun, H., Omaliss, K., Buchy, P. (2017). *Diversity of bat astroviruses in Lao PDR and Cambodia.* *Infection, Genetics and Evolution*, 47, 41-50. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.11.013>

**Le Cann, P.;** Ranarijaona, S.; Monpoeho, S.; Le Guyader, F.; Ferre, V. (2004). *Quantification of human astroviruses in sewage using real-time RT-PCR.* *Res. Microbiol.* 155, 11–15.

**Lekana-Douki, S. E.,** Kombila-Koumavor, C., Nkoghe, D., Drosten, C., Drexler, J. F., & Leroy, E. M. (2015). *Molecular epidemiology of enteric viruses and genotyping of rotavirus A, adenovirus and astrovirus among children under 5 years old in Gabon.* *International Journal of Infectious Diseases*, 34, 90-95. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2015.03.009>

**Li, C.-y.;** Liu, N.; Guo, W.-d.; Yu, Q.; Wang, W.-r.; Song, Z.-Z.; Yan, H.; Luo, Y.; Lu, A.-t.; Li, H.-Y. (2010). *Outbreak of neonatal gastroenteritis associated with astrovirus serotype 1 at a hospital in Inner Mongolia, China.* *J. Clin. Microbiol.* 48, 4306–4309.

**Lyman, W.H.;** Walsh, J.F.; Kotch, J.B.; Weber, D.J.; Gunn, E.; Vinje, J. (2009) *Prospective study of etiologic agents of acute gastroenteritis outbreaks in child care centers.* *J. Pediatr.* 154, 253–257.

## M

**Maldonado, Y.,** Cantwell, M., Old, M., Hill, D., Sanchez, M. L., Logan, L., Matsui, S. (1998). *Population-based prevalence of symptomatic and asymptomatic astrovirus infection in rural Mayan infants.* *The Journal of Infectious Diseases*, 178(2), 334-339.

**Marshall, J.A.;** Bruggink, L.D.; Sturge, K.; Subasinghe, N.; Tan, A.; Hogg, G.G. (2007) *Molecular features of astrovirus associated with a gastroenteritis outbreak in an aged-care centre.* *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 26, 67–71.

**Marvin, S. A. (2016).** *The Immune Response to Astrovirus Infection.* *Viruses*, 9(1). <https://doi.org/10.3390/v9010001>

- Meleg, E., Jakab, F., Kocsis, B., Bányai, K., Melegh, B., & Szucs, G. (2006).** *Human astroviruses in raw sewage samples in Hungary.* *Journal of Applied Microbiology*, 101(5), 1123-1129. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.02997.x>
- Meliopoulos, V. A., Kayali, G., Burnham, A., Oshansky, C. M., Thomas, P. G., Gray, G. C., ... Schultz-Cherry, S. (2014).** *Detection of Antibodies against Turkey Astrovirus in Humans.* *PLoS ONE*, 9(5), e96934.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096934>
- Méndez, E., Murillo, A., Velázquez, R., Burnham, A., & Arias, C. F. (2012).** *Replication Cycle of Astroviruses.* In *Astrovirus Research* (p. 19-45). Springer, New York, NY.  
[https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4735-1\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4735-1_2)
- Méndez-Toss, M., Griffin, D. D., Calva, J., Contreras, J. F., Puerto, F. I., Mota, F., Arias, C. F. (2004).** *Prevalence and genetic diversity of human astroviruses in Mexican children with symptomatic and asymptomatic infections.* *Journal of Clinical Microbiology*, 42(1), 151-157.
- Mitchell, D. K., Monroe, S. S., Jiang, X., Matson, D. O., Glass, R. I., & Pickering, L. K. (1995).** *Virologic features of an astrovirus diarrhea outbreak in a day care center revealed by reverse transcriptase-polymerase chain reaction.* *The Journal of Infectious Diseases*, 172(6), 1437-1444.
- Mladenova, Z.; Steyer, A.; Steyer, A.F.; Ganesh, B.; Petrov, P.; Tchervenjakova, T.; Iturriza-Gomara, M. (2015)** *Aetiology of acute paediatric gastroenteritis in Bulgaria during summer months: Prevalence of viral infections.**J. Med. Microbiol.* 64, 272–282.
- Morsy El-Senousy, W., Guix, S., Abid, I., Pinto, R. M., & Bosch, A. (2006).** *Removal of Astrovirus from Water and Sewage Treatment Plants, Evaluated by a Competitive Reverse Transcription-PCR.* *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 164-167. <https://doi.org/10.1128/aem.01748-06>

**Moser, L. A.,** Carter, M., & Schultz-Cherry, S. (2007). *Astrovirus Increases Epithelial Barrier Permeability Independently of Viral Replication*. *Journal of Virology*, 81(21), 11937-11945. <https://doi.org/10.1128/JVI.00942-07>

**Mustafa, H.,** Palombo, E. A., & Bishop, R. F. (2000). Epidemiology of astrovirus infection in young children hospitalized with acute gastroenteritis in Melbourne, Australia, over a period of four consecutive years, 1995 to 1998. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(3), 1058-1062.

## N

**Nadan, S.;** Walter, J.E.; Grabow, W.O.; Mitchell, D.K.; Taylor, M.B. (2003) Molecular characterization of astroviruses by reverse transcriptase PCR and sequence analysis: Comparison of clinical and environmental isolates from South Africa. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 747–753.

**Nagai, M.;** Omatsu, T.; Aoki, H.; Otomaru, K.; Uto, T.; Koizumi, M.; Minami-Fukuda, F.; Takai, H.; Murakami, T.; Masuda, T. (2015). *Full genome analysis of bovine astrovirus from fecal samples of cattle in Japan: identification of possible interspecies transmission of bovine astrovirus*. *J. Virol.* 160,2491–2501.

**Nguyen, T.A.;** Yagyu, F.; Okame, M.; Phan, T.G.; Trinh, Q.D.; Yan, H.; Hoang, K.T.; Cao, A.T.; Le Hoang, P.; Okitsu, S. (2007). *Diversity of viruses associated with acute gastroenteritis in children hospitalized with diarrhea in Ho Chi Minh city, Vietnam*. *J. Med. Virol.* 79, 582–590.

**Ng, T.F.F.;** Kondov, N.O.; Deng, X.; van Eenennaam, A.; Neiberghs, H.L.; Delwart, E. A.(2015) *metagenomics and case-control study to identify viruses associated with bovine respiratory disease*. *J. Virol.* 89, 5340–5349.

**Ng, T.F.F.;** Mesquita, J.R.; Nascimento, M.S.J.; Kondov, N.O.; Wong, W.; Reuter, G.; Knowles, N.J.; Vega, E.; Esona, M.D.; Deng, X. (2014). *Feline fecal virome reveals novel and prevalent enteric viruses*. *Vet. Microbiol.* 171, 102–111.

**Ng, T.F.F.;** Marine, R.; Wang, C.; Simmonds, P.; Kapusinszky, B.; Bodhidatta, L.; Oderinde, B.S.; Wommack, K.E.; Delwart, E. (2012). *High variety of known and new RNA*

---

and DNA viruses of diverse origins in untreated sewage. *J. Virol.* 86, 12161–12175.

Noel, J. S., Lee, T. W., Kurtz, J. B., Glass, R. I., & Monroe, S. S. (1995). Typing of human astroviruses from clinical isolates by enzyme immunoassay and nucleotide sequencing. *Journal of Clinical Microbiology*, 33(4), 797-801.

## O

Oude Munnink, B. B., Cotten, M., Canuti, M., Deijns, M., Jebbink, M. F., van Hemert, F. J., van der Hoek, L. (2016). A Novel Astrovirus-Like RNA Virus Detected in Human Stool. *Virus Evolution*, 2(1), vew005. <https://doi.org/10.1093/ve/vew005>

Oude Munnink, B. B., & van der Hoek, L. (2016). Viruses Causing Gastroenteritis: The Known, The New and Those Beyond. *Viruses*, 8(2). <https://doi.org/10.3390/v8020042>

Ouédraogo, N., Kaplon, J., Bonkougou, I. J. O., Traoré, A. S., Pothier, P., Barro, N., & Ambert-Balay, K. (2016). Prevalence and Genetic Diversity of Enteric Viruses in Children with Diarrhea in Ouagadougou, Burkina Faso. *PLoS ONE*, 11, e0153652. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153652>

Oishi, I.; Yamazaki, K.; Kimoto, T.; Minekawa, Y.; Utagawa, E.; Yamazaki, S.; Inouye, S.; Grohmann, G.S.; Monroe, S.S.; Stine, S.E. (1994). A large outbreak of acute gastroenteritis associated with astrovirus among students and teachers in Osaka, Japan. *J. Infect. Dis.* 170, 439–443.

## P

Padmanabhan, A.; Hause, B.M. (2016). Detection and characterization of a novel genotype of porcine astrovirus 4 from nasal swabs from pigs with acute respiratory disease. *Arch. Virol.* 161, 2575–2579.

Pankovics, P.; Boros, Á.; Kiss, T.; Delwart, E.; Reuter, G. (2015). Detection of a mammalian-like astrovirus in bird, European roller (*Coracias garrulus*). *Infect. Genet. Evol. J. Mol. Epidemiol. Evol. Genet. Infect. Dis.* 34,114–121.

**Phan, T.G.;** Nordgren, J.; Ouermi, D.; Simpore, J.; Nitiema, L.W.; Deng, X.; Delwart, E. **(2014)**. *New astrovirus in human feces from Burkina Faso*. *J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol.* 60, 161–164.

**Phan, T.G.;** Kapusinszky, B.; Wang, C.; Rose, R.K.; Lipton, H.L.; Delwart, E.L. **(2011)**. *The fecal viral flora of wild rodents*. *PLoS Pathog.* 7, e1002218.

**Pintó, R.M.;** Abad, F.X.; Gajardo, R.; Bosch, A. **(1996)**. Detection of infectious astroviruses in water. *Appl. Environ. Microbiol.*1996, 62, 1811–1813.

**Pintó, R.M.;** Villena, C.; Le Guyader, F.; Guix, S.; Caballero, S.; Pommepeuy, M.; Bosch, A. Astrovirus detection in wastewater samples. *Water Sci. Technol.* 2001, 43, 73–76.

**Phan, T. G.,** Nordgren, J., Ouermi, D., Simpore, J., Nitiema, L. W., Deng, X., & Delwart, E. **(2014)**.

*New astrovirus in human feces from Burkina Faso*. *Journal of clinical virology* :

the official **publication of the Pan American Society for Clinical Virology**,

60(2), 161-164. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2014.03.024>

**Pusch, D.,** Oh, D.-Y., Wolf, S., Dumke, R., Schröter-Bobsin, U., Höhne, M., Schreier, E. **(2005)**. *Detection of enteric viruses and bacterial indicators in German environmental waters*. *Archives of Virology*, 150(5), 929-947. <https://doi.org/10.1007/s00705-004-0467-8>

## R

**Resque, H.R.;** Munford, V.; Castilho, J.G.; Schmich, H.; Caruzo, T.A.; Racz, M.L. *Molecular characterization of astrovirus in stool samples from children in Sao Paulo, Brazil*. **(2007)**. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 102, 969–974.

**Reuter, G.;** Pankovics, P.; Delwart, E.; Boros, Á. **(2012)**. *Identification of a novel astrovirus in domestic sheep in Hungary*. *J. Virol.* 157, 323–327.

**Rimoldi, S.G.;** Stefani, F.; Pagani, C.; Chenal, L.L.; Zanchetta, N.; Di Bartolo, I.; Lombardi, A.; Ruggeri, F.M.; Di lillo, D.; Zuccotti, G.V. **(2011)**. *Epidemiological and clinical characteristics of pediatric gastroenteritis associated with new viral agents*. *J. Virol.* 2011, 156, 1583.

## S

**Sirinavin, S.;** Techasaensiri, C.; Okascharoen, C.; Nuntnarumit, P.; Tonsuttakul, S.; Pongsuwan, Y. (2006) *Neonatal astrovirus gastroenteritis during an inborn nursery outbreak.* *J. Hosp. Infect.* 64, 196–197.

**Stella SI, Ajayi A (2017)** *Viral Causes of Diarrhea in Children in Africa: A Literature Review.* *J Mole Biol Tech* 1(1): 104.

**Steele, A. D.,** Madhi, S. A., Cunliffe, N. A., Vesikari, T., Phua, K. B., Lim, F. S., ... Benninghoff, B. (2016). Incidence of rotavirus gastroenteritis by age in African, Asian and European children: Relevance for timing of rotavirus vaccination. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 12(9), 2406-2412.  
<https://doi.org/10.1080/21645515.2016.1179412>

**Svraka, S.;** Duizer, E.; Vennema, H.; de Bruin, E.; van der Veer, B.; Dorresteijn, B.; Koopmans, M. (2007). *Etiological role of viruses in outbreaks of acute gastroenteritis in the Netherlands from 1994 through 2005.* *J. Clin. Microbiol.*, 45, 1389–1394.  
[CrossRef] [PubMed]

## T

**Tayeb, H. T.,** Dela Cruz, D. M., Al-Qahtani, A., Al-Ahdal, M. N., & Carter, M. J. (2008). *Enteric viruses in pediatric diarrhea in Saudi Arabia.* *Journal of Medical Virology*, 80(11), 1919-1929. <https://doi.org/10.1002/jmv.21291>

**Thongprachum, A.,** Takanashi, S., Kalesaran, A. F. C., Okitsu, S., Mizuguchi, M., Hayakawa, S., & Ushijima, H. (2015). *Four-year study of viruses that cause diarrhea in Japanese pediatric outpatients.* *Journal of Medical Virology*, 87, 1141-1148.  
<https://doi.org/10.1002/jmv.24155>

**Thongprachum, A.,** Khamrin, P., Maneeakarn, N., Hayakawa, S., & Ushijima, H. (2016). *Epidemiology of gastroenteritis viruses in Japan: Prevalence, seasonality,*

and outbreak. *Journal of Medical Virology*, 88(4), 551-570.

<https://doi.org/10.1002/jmv.24387>

**Traoré, O.**, Belliot, G., Monroe, S., & Laveran, H. (1998). *Les astrovirus humains*. *Virologie*, 2(1), 33-39.

## V

**Vu, D.L.**; Cordey, S.; Brito, F.; Kaiser, (2016) L. *Novel human astroviruses: Novel human diseases?* *J. Clin. Virol.*, 82, 56–63.

**Vu, D.-L.**, Bosch, A., Pintó, R. M., & Guix, S. (2017). *Epidemiology of Classic and Novel Human Astrovirus: Gastroenteritis and Beyond*. *Viruses*, 9(2).

## W

**Wang, F.**; Wang, Y.-H.; Peng, J.-S.; Zhou, X.; Tang, L.; Kobayashi, N.; Hu, Q.; Zhou, D.-J.; Huang, H.-J.; Liu, M.-Q.(2011) *Genetic characterization of human astrovirus infection in Wuhan, People's Republic of China,2007–2008*. *Can. J. Microbiol.* 2011, 57, 964–968.

## X

**Xavier, M.d.P.T.P.**; Carvalho Costa, F.A.; Rocha, M.S.; Andrade, J.d.S.R.d.; Diniz, F.K.B.; Andrade, T.R.d.; Miagostovich, M.P.; Leite, J.P.G.; Volotão, E.d.M. (2015) *Surveillance of human astrovirus infection in Brazil: The first report of MLB1 astrovirus*. *PLoS ONE* 2015, 10, e0135687.

## Y

**Yoneda, M.,** Nakano, M., Sugimoto, D., Inada, M., Fujitani, M., & Kitahori, Y. (2017). *Epidemiological Characteristics of Sapovirus and Human Astrovirus Detected among Children in Nara Prefecture, Japan, during the 2009/2010–2014/2015 Seasons.* Japanese Journal of Infectious Diseases, 70, 87-91. <https://doi.org/10.7883/yoken.jjid.2015.529>

## Z

**Zhou, N.,** Lin, X., Wang, S., Wang, H., Li, W., Tao, Z., & Xu, A. (2014). *Environmental Surveillance for Human Astrovirus in Shandong Province, China in 2013.* Scientific Reports, 4, 7539. <https://doi.org/10.1038/srep07539>

**Zhang, B.;** Tang, C.; Yue, H.; Ren, Y.; Song, Z. *Viral metagenomics analysis demonstrates the diversity of viral flora in piglet diarrhoeic faeces in China.* (2014). J. Gen. Virol. 95, 1603–1611.

**Zhang, W.;** Li, L.; Deng, X.; Kapusinszky, B.; Pesavento, P.A.; Delwart, E. *Faecal virome of cats in an animal shelter.* (2014). J. Gen. Virol. 95, 2553–2564.

**Ziniel, P.;** Amoo-Sakyi, F.; Danikuu, F. (2007). *Acute childhood diarrhoea in northern Ghana: Epidemiological, clinical and microbiological characteristics.* BMC Infect. Dis. 7, 104.

# *Webographie*

**Audrey Lacroix.** La détection et la caractérisation de coronavirus et astrovirus chez les chiroptères au Cambodge et au Laos. Biologie animale. Université Montpellier, 2016. Français. <NNT : 2016MONTT141>. <tel-01653087>  
<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01653087/document> consulté le 23/07/2018

**Campus de Microbiologie médicale** (Projet de l'Université René Descartes)  
<http://www.microbes-edu.org> consulté le 16/07/2018

**International Committee on Taxonomy of Virus on line :**

<https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/> consulté le 23/06/2018

# ***ANNEXES***

## **ANNEXE 1 : Préparation des tampons pour l'utilisation du Kit d'extraction QIAGEN QIAamp Viral RNA Mini Kit 250 (Ref 52906)**

### **1. Addition d'ARN entraîneur au tampon AVL**

Ajouter 310 µl de tampon AVE au tube d'ARN entraîneur lyophilisé (310 µg), pour obtenir une solution à 1 µg/µl. Bien dissoudre l'ARN entraîneur. Aliquoter et stocker à -20°C. Ne pas congeler-décongeler plus de 3 fois.

Si nécessaire, dissoudre les précipités présents dans le tampon AVL en l'incubant à 80°C.

Calculer le volume de tampon AVL nécessaire pour l'extraction, en fonction du nombre d'échantillons. Ajouter 5,6 µl d'ARN entraîneur reconstitué pour 560 µl de tampon AVL (voir tableau notice) Mélanger doucement par retournement du tube.

Cette solution est stable à 2-8°C jusqu'à 48h. Le précipité qui se forme à 2-8°C peut être dissous en chauffant à 80°C (pas plus de 5 min, et pas plus de 6 fois)

### **2. Tampon AW1**

Le tampon AW1 est livré sous forme concentrée. Avant la 1<sup>ère</sup> utilisation, ajouter la quantité appropriée d'éthanol (96 à 100%) selon les indications mentionnées sur le flacon ou dans le tableau ci-dessous :

<b>Référence</b>	<b>Conditionnement</b>	<b>AW1 concentré</b>	<b>Ethanol</b>	<b>Volume final</b>
52904	50	19 ml	25 ml	44 ml
52906	250	95 ml	125 ml	220 ml

### **3. Tampon AW2**

Le tampon AW2 est livré sous forme concentrée. Avant la 1<sup>ère</sup> utilisation, ajouter la quantité appropriée d'éthanol (96 à 100%) selon les indications mentionnées sur le flacon ou dans le tableau ci-dessous :

<b>Référence</b>	<b>Conditionnement</b>	<b>AW1 concentré</b>	<b>Ethanol</b>	<b>Volume final</b>
52904	50	13 ml	30 ml	43 ml
52906	250	66 ml	160 ml	226 ml

## **ANNEXE 2 : Protocole d'extraction avec le kit QIAGEN QIAamp Viral RNA Mini Kit 250 (Ref 52906)**

1. Sortir les échantillons à tester du congélateur (- 20°C) et les laisser revenir à température ambiante (15-25°C) avant le test.
2. Amener le tampon AVE à température ambiante.
3. Vérifier que les tampons AW1, AW2 et AVL /ARN entraîneur ont été préparés selon les indications requises (**voir annexe**) et si nécessaire chauffer le tampon AVL/ARN entraîneur pour dissoudre d'éventuels précipités et laisser revenir ensuite à température ambiante avant utilisation.
4. Identifier pour chaque échantillon à tester, 1 tube eppendorf de 1,5 ml et une minicolonne QIAamp
5. Déposer **560 µl de tampon AVL /ARN** entraîneur dans un tube Eppendorf
6. Ajouter **140 µl** de l'échantillon à tester au tampon AVL/ARN entraîneur. Boucher le tube et vortexer pendant 15 secondes puis laisser incubé à température ambiante (15-25°C) pendant 10 min.
7. Ajouter **560 µl d'éthanol** (96-100%) au mélange, fermer le tube, puis vortexer pendant 15 secondes.
8. Déposer avec précaution **630 µl de la solution** obtenue à l'étape 7 dans la colonne QIAamp placée dans un tube collecteur de 2 ml, sans mouiller le bord de la colonne. Fermer le capuchon et **centrifuger 1 min à 6000xg (8000 rpm)**. Transférer la colonne QIAamp dans un nouveau tube collecteur et jeter le tube contenant l'effluent dans le bécher. Ouvrir la colonne avec précaution et répéter l'étape 8 plusieurs fois si nécessaire, jusqu'à ce que tout le lysat obtenu à l'étape 7 soit passé dans la colonne.
9. Ouvrir la colonne QIAamp avec précaution et **ajouter 500 µl de tampon AW1**. Fermer le capuchon et **centrifuger 1 min à 6000Xg (8000 rpm)**. Transférer la colonne QIAamp dans un tube collecteur de 2 ml propre et jeter le tube contenant l'effluent dans le bécher.
10. Ouvrir la colonne QIAamp avec précaution et **ajouter 500 µl de tampon AW2**. Fermer le capuchon et **centrifuger 3 mn à 20 000Xg (14 000 rpm)**.
11. Mettre la colonne sur un tube de 2 ml propre et jeter le tube contenant l'effluent dans le bécher. Centrifuger 1 min à 20 000Xg (14 000 rpm).
12. Transférer la colonne QIAamp dans un tube eppendorf de 1,5ml. Jeter l'ancien tube collecteur contenant l'effluent. Ouvrir avec précaution la colonne QIAamp et **déposer au centre 60 µl de tampon AVE.. Centrifuger 1 mn à 6000Xg (8000rpm)**.
13. Conserver l'ARN viral à – 20°C ou à -70°C.

## **2- Précautions d'emploi:**

- *Les tampons AVL et AW1 contiennent du **thiocyanate et du chlorure de guanidine** et peuvent former des composés réactifs au contact de l'eau de Javel (Ne jamais verser directement de l'eau de javel ou des solutions acides dans les déchets de préparation. Nettoyer la paillasse de travail avec de l'eau ou du détergent de laboratoire en cas d'épanchement.*
- *Ces produits sont irritants pour la peau et les yeux et sont nocifs en cas d'ingestion.*
  - *Après inhalation : Donner de l'air frais, consulter un médecin en cas de troubles.*
  - *Après contact avec la peau : Laver immédiatement à l'eau et au savon et bien rincer.*
  - *Après contact avec les yeux : Rincer les yeux, pendant plusieurs minutes, sous l'eau courante en écartant bien les paupières et consulter un médecin.*
  - *Après ingestion : Consulter immédiatement un médecin.*

## **3- Gestion des déchets:**

*Tous les matériels utilisés au cours du test sont à usage unique et doivent être décontaminés dans un bécher contenant un désinfectant avant leur élimination selon les procédures et réglementations en vigueur dans le laboratoire.*

## ANNEXE 3 : préparation du gel d'agarose

### I. PRINCIPE

L'électrophorèse est une méthode de séparation de particules chargées électriquement par migration différentielle sous l'action d'un champ électrique. Elle permet d'analyser des fragments d'ADN en fonction de leur taille

Elle se réalise sur des supports gélamineux, de type acrylamide, agarose, ou semi solide de type capillaire. L'agarose qui est un polysaccharide extrait d'une algue, la Rhodophyceae, permet d'analyser de manière très simple de grands fragments d'ADN obtenus après amplification par PCR.

### II. MATERIEL ET REACTIFS

#### 2. Matériel

- EPI (Blouses, gants, etc)
- Éprouvette, erlenmeyer;
- Balance de précision;
- Plaque chauffante ou micro-onde ;
- Bacs pour coulage de gel
- Ruban adhésif (Type Nastro)
- Cuves à électrophorèse
- Peignes de séparation des puits

#### 3. Réactifs

- Eau distillée
- Tris/Borate/EDTA(TBE) 1X (Voir préparation en annexe) **Ref. Thermo Scientific #B52**
- ou Tris/Acétate/EDTA (TAE) ,1X
- Agarose (**Ref. SIGMA A9539-50G**)
- Bromure d'éthidium (**Ref.161-0433 BIO-RAD**)

### III. PROTOCOLE :

#### 1. Mode opératoire :

Choix de la concentration du gel en % (c'est un pourcentage massique pour un volume donné).

**Pouvoir de séparation d'ADN linéaire, double brin, selon la concentration d'agarose du gel**

Concentration d'agarose (% en m/V)	Gamme de tailles idéales (en Kb)
0.3	5 – 60
0.6	1 – 20
0.7	0.8 – 10
0.9	0.5 – 7
1.2	0.4 – 6
1.5	0.2 – 3
2.0	0.1 – 2

### **Méthode de calcul pour la quantité d'agarose nécessaire :**

Masse à peser (m en gramme), pour un volume (v en ml) :  $m = v \times \text{pourcentage} / 100$

**Exemple:** pour préparer un gel à 0,8 % pour un volume de 100 ml :  $100 \times 0,8 / 100 = 0,8 \text{ g à peser}$

**NB :** le volume nécessaire est fonction de la taille du gel (les bacs de migration ayant des tailles différentes)

- À l'aide d'une bande adhésive ou d'un autre moyen, scellez les extrémités d'un moule en plastique propre et sec. Positionnez le peigne adéquat de façon à former des puits complets au moment de couler la solution d'agarose.
- Peser précisément (+/- 0,1g) sur la balance la masse d'agarose nécessaire dans un erlenmeyer taré ;
- Préparer 200 ml de TBE à 1 X à partir de la solution fournie;
- Mesurer le volume de TBE 1 X dans une éprouvette (+/-) une demi-graduation);
- Ajouter le TBE 1 X à l'agarose et homogénéiser par une légère agitation par rotation.
- Chauffer (micro-onde ou plaque chauffante) de sorte à dissoudre totalement l'agarose. Agiter de temps en temps et éviter l'excès d'ébullition.
- contrôlez le volume de la solution après l'avoir chauffée et au besoin compléter au volume initial
- Laisser refroidir sur la paillasse pendant au moins 5 mn on doit pouvoir saisir le flacon des 2 mains sans se brûler). Température < 60°
- Après refroidissement, ajouter le **bromure d'éthidium** (agent intercalant couramment utilisé comme marqueur d'acide nucléique. Lorsqu'il est exposé à des rayonnements ultraviolets, il devient fluorescent avec une couleur rouge-orangée, plus intense lorsqu'il est lié à l'ADN). On ajoutera 1 goutte (50 µl) de BET à 0,5 mg/ml pour 50 ml (pour obtenir une concentration finale de 0,5 µg/ml de BET).
- Homogénéiser par une légère agitation par rotation
- Verser lentement le gel dans les plaques de moulage en évitant les bulles (Éliminer les bulles détectées à l'aide de la pointe d'un cône)
- Attendre 30 minutes à température ambiante la solidification du gel (le bac ne devra pas bouger durant cette période).
- Nettoyer soigneusement à l'eau les récipients (Erlenmeyer) ayant été en contact avec le BET pour ne pas exposer le personnel de service responsable de l'entretien du matériel. L'eau souillée doit être éliminée selon le même circuit que les déchets dangereux.

### **2. Précautions d'emploi:**

- Risque de brûlure en manipulant le récipient dans le micro-onde sans précaution
- Ne pas fermer hermétiquement le couvercle du récipient à introduire dans le micro onde
- **Le bromure d'éthidium (BET) est un produit hautement mutagène et carcinogène** et présente également une toxicité modérée. Toujours manipuler avec des gants les produits contenant du BET. Ne pas s'exposer aux vapeurs de la solution agarose +TBE+ BET (Cf. fiche de sécurité en annexe et sur clés USB).

3. **Gestion des déchets:** Les résidus en contenant doivent être éliminés comme déchet dangereux.

## **Préparation des réactifs pour la confection du gel d'agarose**

### **Rappel :**

Parfois, la concentration initiale ainsi que la concentration finale désirée sont connues, mais il faut alors trouver la quantité de solvant à ajouter ou le volume initial de solution à diluer pour obtenir cette nouvelle concentration. La formule suivante peut aider à résoudre ce type de problème :

$$C_i \times V_i = C_f \times V_f$$

$C_i$  : concentration initiale disponible (avant dilution)  $V_i$  : volume initial à prélever pour réaliser la dilution

$C_f$  : concentration finale à atteindre après dilution  $V_f$  : volume final total présent ( $V_f = V_{\text{diluant}} + V_i$ )

### **Solution TBE 1 X**

Pour obtenir 500 ml de TBE 1 X :

- Mesurer à l'aide d'une éprouvette 50 ml de solution TBE 10 X ;
- Compléter à 500 ml avec de l'eau distillée ;
- Homogénéiser l'ensemble ;
- La solution 1 X est prête à l'emploi.

## ANNEXE 4 : Protocole de reconstitution des amorces

### Matériel et réactifs

- Eau ultra pure ou Tampon TE 1X
- Amorces lyophilisées
- Tubes Eppendorf stériles ou cryotubes de 1,5 ml
- Marqueurs indélébiles
- Vortex
- Microcentrifugeuse

### Protocole

#### 1. Préparation du stock-mère (100 $\mu$ M)

- Centrifuger brièvement (30 secondes à 10,000 rpm) les tubes contenant les amorces à resuspendre avant de rajouter le solvant. Ceci permet de déposer tout le contenu au fond du tube.
- On doit préparer des **solutions 100  $\mu$ M** avec de l'eau double distillée stérile ou du TE 1X, à partir des amorces lyophilisées. On multiplie par 10 la quantité (nmole) indiquée sur la fiche de réception. Le résultat obtenu correspond à la quantité de solvant (eau bidistillée stérile ou TE 1X) à ajouter pour obtenir une stock-solution 100  $\mu$ M.
- Bien identifier le nom de l'amorce et le sens sur le dessus et sur les parois des tubes
- Laisser l'amorce à 4°C durant 2 heures au minimum (Idéal= 12H) puis bien vortexer avant utilisation puis conserver à -20°C.

#### 2. Préparation du stock de travail

- On utilise les stocks d'amorces à une concentration de travail de **20  $\mu$ M** dans le cadre de notre étude pour les amorces **JV12 et JV13** (Amplification du gène codant, on fera des dilutions au 1/5).
- Prévoir un volume de 500  $\mu$ l pour faire toutes les analyses avec le même stock d'amorce.  
**NB** : Avant utilisation laisser complètement décongeler, et toujours agiter au vortex avant de faire une dilution à partir du stock
- Bien identifier le contenant (solution, initiales, date et concentration).

Conserver à 4°C

## ANNEXE 5 : Fiche de paillasse

### ASTROVIRUS (RT-PCR One Step QIAGEN)

Nombre d'échantillon :

Date :

RT-PCR	Concentration initiale	Quantité 1 X réaction	Quantité n réactions =
H <sub>2</sub> O		19 µl	
Tampon	5X	10 µl	
Solution Q	5X	10 µl	
dNTP	10mM	2 µl	
RNA inh		1 µl	
Mélange enzymatique		2 µl	
Amorce Mon269	20µM	1.5 µl	
Amorce Mon270	20µM	1.5 µl	
Volume réactionnel	-	47µl	

Solution mixte 47 µl + Echantillons 3 µl

#### Cycles d'amplifications

RT : 50°C x 30 min

Dénaturation initiale : 95°C x 15 min

PCR  
95°C x 30 sec  
55°C x 30 sec  
72°C x 1 mn

} 40 cycles

Elongation terminale: 72°C x 5 min

Pause : 4°C x infini

N°	Echantillons	Résultats
1		
2		
3		
4		
5		
6		
7		
8		
9		
10		

Photo de la migration

# Résumé

## Contexte

Les gastroentérites aiguës constituent un problème majeur de santé publique surtout dans les pays en développement où les enfants de moins de 5 ans sont les plus touchés en rapport avec les conditions d'hygiène relativement précaires et les mauvaises conditions de prise en charge (Accessibilité, condition socio-économiques, etc.) Parmi les agents responsables, les virus constituent l'étiologie la plus prépondérante. Les astrovirus humains qui sont des virus à ARN + représentent la 2ème étiologie virale après la réduction de la morbidité associée au GEA à rotavirus après l'introduction du vaccin dans les programmes nationaux.

## Objectif

Dans le cadre de ce mémoire d'étude, nous nous proposons d'évaluer la prévalence et les géotypes des astrovirus humains (HAstV) en milieu pédiatrique et en circulation dans l'environnement à partir des eaux usées en zone urbaine dakaroise.

## Méthodes

Nous avons sélectionné **158** échantillons biologiques **91** selles diarrhéiques et **67** concentrats d'eaux usées collectés respectivement à l'Hôpital des enfants Albert Royer à Dakar (en 2010) et à la station d'épuration de Cambéréne dans la région dakaroise (en 2016 et 2017). Ces échantillons étaient conservés à  $-20^{\circ}\text{C}$  au laboratoire. Après extraction de l'ARN viral, nous avons procédé à l'amplification génomique par RT-PCR en une étape et au séquençage partiel du génome viral pour les échantillons positifs.

## Résultats

L'astrovirus a été détecté dans 18 échantillons sur les 158 testés (11,4%) avec une prévalence de 4,4% dans les échantillons de selles et 21% dans les eaux usées. 16 produits d'amplification sur les 18 ont été séquencés par la méthode Sanger (4 provenant des selles diarrhéiques et 14 de l'environnement). Pour les eaux usées 6 séquences de bonne qualité appartenait au **sérotype 5** et formaient un cluster unique tandis que la seule séquence de bonne qualité pour les selles diarrhéiques appartenait au **sérotype 1**. Toutes les séquences appartenaient au **génogroupe 1**.

## Conclusions-Perspectives

Le taux de détection élevé dans cette étude reflète le fait que les HAstV ont circulé à une fréquence relativement élevée dans la population locale et démontrent que la surveillance de l'environnement est une méthode efficace pour étudier les HAstV en circulation.

Une meilleure compréhension de l'épidémiologie moléculaire et des caractéristiques des souches de HAstV pourrait s'avérer utile pour développer des stratégies de prévention spécifiques.

**Mots clés : astrovirus humains –Gastro entérite aiguë – Eaux usées– Dakar**