

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



ANNEE 2016

N° 1404

MEMOIRE POUR L'OBTENTION DU MASTER NIVEAU 2
Mention : MICROBIOLOGIE FONDAMENTALE ET APPLIQUEE
UER 102 Biologie et pathologies humaines

PREVALENCE ET DIVERSITE GENETIQUE DES VIRUS AICHI
DANS L'ENVIRONNEMENT

Présenté et soutenu le 14/05/2016

Par

Mr Ousmane KEBE

MEMBRES DU JURY

PRESIDENT : *Professeur Cheikh Saad Bouh BOYE*

MEMBRES : *Professeur Amy Sow GASSAMA*

Professeur Ndéye Coumba Kane TOURE

Docteur Abdou Kader NDIAYE

MCA- FMPO -UCAD

MCA- FMPO -UCAD

MCA- FMPO -UCAD

Chargé de Recherche IPD

Dédicaces

*A Dieu le Tout Puissant ALLAH
Et à notre Prophète Mohamed (PSL)*

A mon père M. Babou Kébé

Quoi te dire PAPA ! Tu n'avais ménagé aucun effort pour que ce jour puisse arriver. Dans la dignité, tu as su transmettre à tes enfants le respect et le sens de l'abnégation du travail.

Je n'oublierai jamais tes conseils à la veille de chaque rentrée scolaire et je saurai les transmettre à tes petits enfants inchalla.

Je t'aime PAPA. Qu'ALLAH le Tout puissant t'accueille dans son paradis. Amen

A ma mère Fatou Sall

Extraordinaire maman, que de larmes versées ! Que de souffrances ! Que de prières élevées vers les cieux ! Que de sacrifices. Tu peux sécher tes larmes et dire Amen. Aucun mot ne saurait traduire mon profond amour pour toi. Que le tout Puissant te laisse avec nous en bonne santé et aussi longtemps que possible. Amen

A ma femme Ndéye Khoudia Dramé,

Tes encouragements ne m'ont jamais fait défaut. Je me souviens toujours de ta devise « Rien n'est facile dans cette vie, il faut nous battre pour notre famille ». Ce travail est aussi le tien. Que le tout puissant nous donne ce que nous souhaitons toujours. Amen

Courage et persévérance.

A ma fille Fatimatou Kébé

Qu'Allah t'accorde une longue vie, une bonne santé et une éducation comme celle de ton homonyme Fatima Zahra

A mes frères, sœurs et à toute la famille.

Seul le bon travail donne à l'homme sa dignité. Cela était le sacerdoce de notre brave père

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,

*Monsieur le **Professeur Cheikh Saad Bouh BOYE**,*

*Madame le **Professeur Amy Sow GASSAMA***

*Madame le **Professeur Ndéye Coumba Kane TOURE***

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 rassurés de mon profond respect.

*A mon encadreur, Le Dr **Abdou Kader NDIAYE**, Chargé de Recherche à l'Institut Pasteur de Dakar pour avoir accepté de diriger ce travail.*

Je vous remercie pour les nombreuses heures passées à la relecture de ce travail, pour la rigueur scientifique des corrections que vous avez apportées et pour votre très grande disponibilité. Que ce travail témoigne de ma sincère reconnaissance.

*Au Dr **Abdoulaye SECK**, pour vos conseils méthodologiques pour la rédaction de ce document, ainsi que les enseignements en développement personnel que vous m'avez inculqués. Merci pour tout le soutien.*

*Au Dr **Lola FERNANDEZ** pour son soutien scientifique.*

*A **Mme Aichatou Diouf Fall** et à tous mes collègues du pôle de virologie de l'IPD.*

Laboratoire d'accueil



36, Avenue Pasteur, BP 220 Dakar

Pole de Virologie

Centre National de Référence des virus entériques

 ***Dr Amadou Alpha SALL***

 ***Dr Mbayame NIANG***

 ***Dr Kader NDIAYE***

 ***Dr Ndongo DIA***

Abréviations

- ADN:** *Acide désoxyribonucléique*
- ADNc:** *ADN complémentaire*
- AiV:** *Aichi virus*
- ARN:** *Acide ribonucléique*
- ARNm:** *ARN messenger*
- BET:** *Bromure d'Ethidium*
- dNTP:** *Déoxynucléotidetriphosphate*
- ECP:** *Effet cytopathique*
- ELISA:** *Enzyme-linked immunosorbent assay*
- EPI:** *Equipement de protection individuelle*
- EUB:** *Eaux usées brutes*
- EUD:** *Eaux usées décantées*
- EUT:** *Eaux usées traitées*
- ICTV:** *International Committee on Taxonomy of Viruses*
- IDEA:** *Initiative against Diarrheal and Enteric Diseases*
- IRES:** *Internal Ribosome entry site*
- NTR:** *Non translated region*
- ONAS:** *Office National de l'Assainissement du Sénégal*
- ORF:** *Open reading frame*
- Pb:** *Paire de base*
- PCR:** *Polymerase Chain Reaction*
- PEG:** *Polyéthylène glycol*
- pH:** *Potentiel hydrogène*
- RD:** *Rhabdomyosarcome*
- RT:** *Reverse Transcription*
- ssRNA:** *Single-stranded RNA*
- Taq:** *Thermophilus aquaticus*
- TBE:** *Tris Borate EDTA*
- UV:** *Ultra violet*
- VP:** *Viral Protein*
- VPg:** *Protéine virale génomique*

Liste des figures et tableaux

FIGURES

Figure 1 :	<i>Voies de transmission des virus des gastro-entérites</i>	4
Figure 2 :	<i>Arbre phylogénétique des picornaviridae</i>	6
Figure 3 :	<i>Image électromicrographique et analyse par SDS Page du virus Aichi</i>	7
Figure 4 :	<i>L'organisation des protéines de la capsid chez les Kobuvirus</i>	8
Figure 5 :	<i>Organisation génomique des kobuvirus</i>	9
Figure 6 :	<i>Organisation génomique des AiV Comparaison avec la structure d'autres picornaviridae</i>	9
Figure 7 :	<i>Attachement, pénétration, décapsidation du virus</i>	10
Figure 8 :	<i>Cycle infectieux complet des Picornaviridae</i>	11
Figure 9 :	<i>Arbre phylogénétique des kobuvirus</i>	11
Figure 10 :	<i>Organisation génomique de AiV1- Cible des tests de PCR de diagnostic</i>	16
Figure 11 :	<i>Réseau d'assainissement de la région dakaraise</i>	20
Figure 12 :	<i>Schéma général pour la concentration des eaux usées par méthode biphasique</i>	22
Figure 13 :	<i>Les différents éléments essentiels d'une PCR</i>	24
Figure 14 :	<i>Amplification d'un segment de 519 bp- Résultats de la migration par électrophorèse</i>	28
Figure 15 :	<i>Résultats de la détection en fonction du mois et de l'année de collecte</i>	31
Figure 16 :	<i>Analyses phylogénétique des AiV détectés dans les eaux usées de la région dakaraise.</i>	32

TABLEAUX

Tableau I	<i>Classification des Kobuvirus</i>	6
Tableau II	<i>Répartition des types d'eaux sélectionnées par année et par mois</i>	30
Tableau III	<i>Résultats de la détection dans les différents types d'eaux usées</i>	30
Tableau IV	<i>Comparaison des techniques de détection des AiV dans les eaux usées brutes et traitées</i>	35

TABLE DES MATIERES

Introduction	1
--------------------	---

Première partie: Revue bibliographique

I. Généralités sur les gastroentérites	5
II. Le genre Kobuvirus	5
1. Historique et Définition	5
2. Classification	7
3. Structure des Kobuvirus	7
4. Propriétés physicochimiques	10
5. Cycle de réplication	10
III. Le virus Aichi	10
1. Le génome	12
2. Le pouvoir pathogène	12
3. Epidémiologie	
a. Prévalence et incidence	12
b. Epidémiologie moléculaire	13
c. Le virus Aichi dans l'environnement	13
4. Diagnostic au laboratoire	15

Deuxième partie: Travail expérimental

I. Objectifs	18
II. Matériels et méthodes	19
1. Site d'étude.....	19
2. Collecte et transport des échantillons	20
3. Concentration des eaux usées par la méthode biphasique	21
4. Extraction de l'ARN viral.....	22
5. Amplification de l'ARN viral par RT-PCR	23
6. Phylogénie moléculaire	28
III. Résultats	30
IV. Discussions	32
V. Conclusion-Perspectives	37
Références Bibliographiques	39
Annexes	

INTRODUCTION

Les virus entériques sont des virus, résistants dans le milieu extérieur et capables de persister longtemps dans l'environnement. Ils sont responsables de gastro-entérites aiguës touchant en majorité les enfants vivant surtout dans les pays en développement. Leur transmission se fait de manière directe ou de manière indirecte par des eaux souillées ou des aliments contaminés (**Schwartzbrod L., 1991**). La transmission indirecte serait à l'origine de nombreuses épidémies dans les pays en développement (**Hejkal T.W. et coll., (1982) ; Lippy and Waltrip (1984) ; Cliver D.O. (1984)**).

Éliminés dans les selles, ces virus se retrouvent dans les eaux usées qui constituent le premier maillon d'un cycle au centre duquel se trouve l'homme en tant que contamineur primaire mais aussi en tant que récepteur secondaire des agents pathogènes véhiculés par l'eau (**Schwartzbrod L., 1991**).

Les virus entériques contenus dans ces eaux usées sont susceptibles de contaminer les nappes souterraines ainsi que les eaux de surface. Ils représentent un danger lorsque ces eaux sont utilisées pour la consommation ou pour irriguer des cultures vivrières ou pour les baignades. Chaque année 1,7 million de jeunes enfants meurent de diarrhées dont l'origine est une mauvaise qualité des eaux de boisson, un assainissement inexistant et une hygiène défectueuse (**Sandy C. et coll., 2003**). L'importante quantité de virus retrouvés dans les eaux usées est associée à un faible niveau d'hygiène et à une grande proportion d'enfants dans la communauté (**Dahling D.R. et coll., 1989**).

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

L'objectif principal de notre étude est d'évaluer la prévalence et les génotypes des virus Aichi (AiV) circulant dans l'environnement à partir des eaux usées sur la période 2012-2013 en zone urbaine dakaroise.

Notre travail est structuré en 2 grandes sections avec :

- Une revue de la littérature permettant de comprendre le rôle des virus en général et celui des kobuvirus (Famille à laquelle appartiennent les virus Aichi) en particulier dans la survenue des gastro-entérites aiguës.
- Dans la 2^{ème} partie expérimentale, nous allons évaluer la prévalence et la diversité des virus Aichi humains dans des eaux usées de la région dakaroise.

1^{ère} partie

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I- Généralités sur les gastroentérites

Les maladies entériques représentent la deuxième cause de mortalité chez les enfants de moins de 5 ans, avec 2,5 milliard de cas estimés, conduisant à 1,5 million de morts chaque année (Liu L et coll., 2012 ; Kotloff K.L. et coll.,2013 ; Parashar U.D et coll., 2003 ; Parashar U.D et coll., 2006 ;Walter C.L. et coll.,2013). Dans les pays en développement et particulièrement ceux de l'Afrique subsaharienne, ces maladies sévissent de façon endémo-épidémique surtout chez les jeunes enfants et les personnes âgées avec une mortalité relativement élevée favorisée par la déshydratation, la malnutrition et les problèmes de prise en charge sanitaire (Clasen T. et coll., 2007).

De nombreux agents microbiologiques dits « entériques » sont à l'origine de ces diarrhées infectieuses. Il peut s'agir notamment de **bactéries** (*Salmonella*, *Shigella*, *E.coli*, *Campylobacter jejuni*, *Vibrio cholerae*, *Clostridium difficile*, etc.), **de virus** (Rotavirus connus comme première cause de diarrhée chez l'enfant, Norovirus, Astrovirus Adénovirus, etc.), **parasites et protozoaires** (*Cyclospora*, *Entamoeba histolytica*, *Cryptosporidium*, *Giardia lamblia*, etc.).

A côté de ces agents classiques de gastroentérites, nous notons l'apparition de pathogènes dits "émergents", c'est-à-dire soit récemment découverts, soit dont l'apparition ou l'expression est favorisée par certaines conditions (réchauffement climatique modifiant la zone de présence d'un pathogène, réchauffement des eaux littorales permettant la multiplication d'un pathogène, mauvaise urbanisation, etc.).

Les norovirus sont responsables d'au moins 80 % des gastro-entérites chez les plus de 65 ans. Ces virus subissent une dérive génétique tous les 2 à 3 ans avec apparition de nouveaux variants antigéniques à l'origine de gastroentérites épidémiques. Un nouveau variant a été détecté dans l'hémisphère Sud en 2012 et a connu une rapide diffusion dans la moitié nord du globe.

Le virus Aichi (Espèce Aichi virus, genre *Kobuvirus*) de la famille des picornaviridae est responsable de gastroentérites chez l'homme. C'est un virus à ARN très résistant à la chaleur, à l'éther à 10 % et aux doses de chlore utilisées pour la chloration habituelle des eaux de boissons. Il a été découvert en 1989 au Japon (Aichi) suite à une épidémie de gastroentérite non bactérienne consécutive à une consommation d'huitres (Yamashita, T. et coll., 1991). Il a une diffusion mondiale car ayant été responsable d'épidémies de

gastroentérites dans de nombreuses zones du monde (Asie, Amérique du Sud, Europe et en Afrique) (Ana Alcalá et coll., 2010; Di Martino B. et coll., 2013; Ambert-Balay K. et coll., 2008; Sdiri-Loulizi K., et coll., 2010)

Les produits de mer ont été indexés initialement comme réservoir du virus ; mais il a également été détecté dans les eaux usées et emprunterait donc la voie orofécale comme tous les autres *Picornaviridae*.

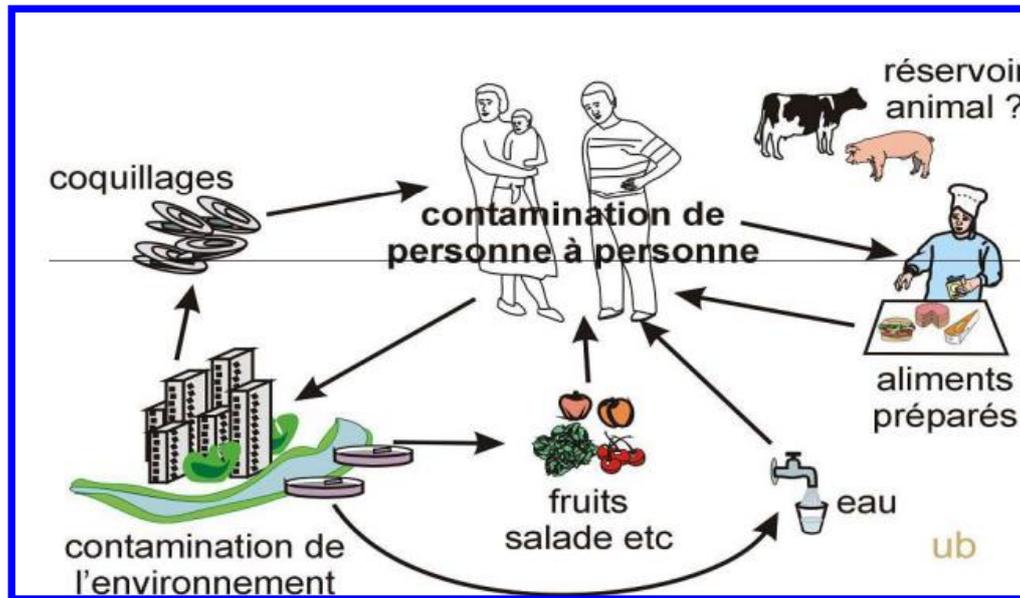


Figure 1: Voies de transmission des virus des gastro-entérites (www.microbes-edu.org)

Des études dans plusieurs pays comme le Japon (Yamashita, T. et coll., 1993), la France (Goyer, M. et coll., 2010), Espagne (Ribes, J.M. et coll. ; 2010), l'Allemagne (Oh, D.-Y. et coll. ; 2006) et la Tunisie (Sdiri-Loulizi, K. et coll., 2010) ont démontré une séroprévalence élevée dans ces populations (au moins 80%) contrastant avec les faibles taux d'incidence déclaré. Au moins 90% de la population auraient été exposés au virus Aichi avant l'âge de 40 ans (Reuter G. et coll., 2011).

Ceci serait le témoin d'une circulation à bas bruit du virus ou d'une co-circulation avec les autres virus entériques qui feraient écran. L'épidémiologie du virus Aichi est très mal connue dans le monde et en particulier en Afrique où à l'exception de la Tunisie il n'existe aucune étude sur l'épidémiologie clinique et moléculaire du virus Aichi (Sdiri-Loulizi K., 2000).

II- Le genre Kobuvirus

1- Historique et définition

En 1989, au Japon dans une sous-préfecture du nom de Aichi, un nouveau virus cytopathique sur des cellules BS-C1 (cellules de rein de singe de l'espèce *Cercopithecus aethiops*) a été isolé chez des patients souffrant de gastro-entérite. Sa capacité à croître dans des cellules en culture, ainsi que d'autres propriétés biologiques (résistance au chloroforme et stabilité sous un faible pH) ont fait suggérer que le virus Aichi était membre des entérovirus. Cependant, aucun des sérums d'entérovirus n'a neutralisé le virus Aichi. Et inversement, le sérum antiviral Aichi n'a pas réagi avec les entérovirus ou tout autre virus entériques tels que les norovirus et les astrovirus. Ce virus a été affecté au début des années 90 à un nouveau genre appelé **Kobuvirus** classé en 1997 dans la famille des *Picornaviridae* (**Yamashita T. et coll., 1991**). Le terme japonais "Kobu" signifie bosse ou molette en japonais, a été choisi pour désigner le genre à cause de la structure icosaédrique distinctive de ces virus (**Mahy B., 1999**).

2- Classification

Les Kobuvirus appartiennent à la famille des *Picornaviridae* qui est constituée de virus humains et animaux. Cette famille regroupait 12 espèces pouvant affecter l'homme en 2013 (entérovirus de A à H et rhinovirus A, B et C) eux même subdivisés en plus de 300 sérotypes. Cette nouvelle classification a été approuvée par l'ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses) en février 2013 (**ICTV 2013**). Leur classification évolue très rapidement, notamment suite à la découverte récente de nombreux génomes grâce à la métagénomique (séquençage à haut débit d'échantillons biologiques).

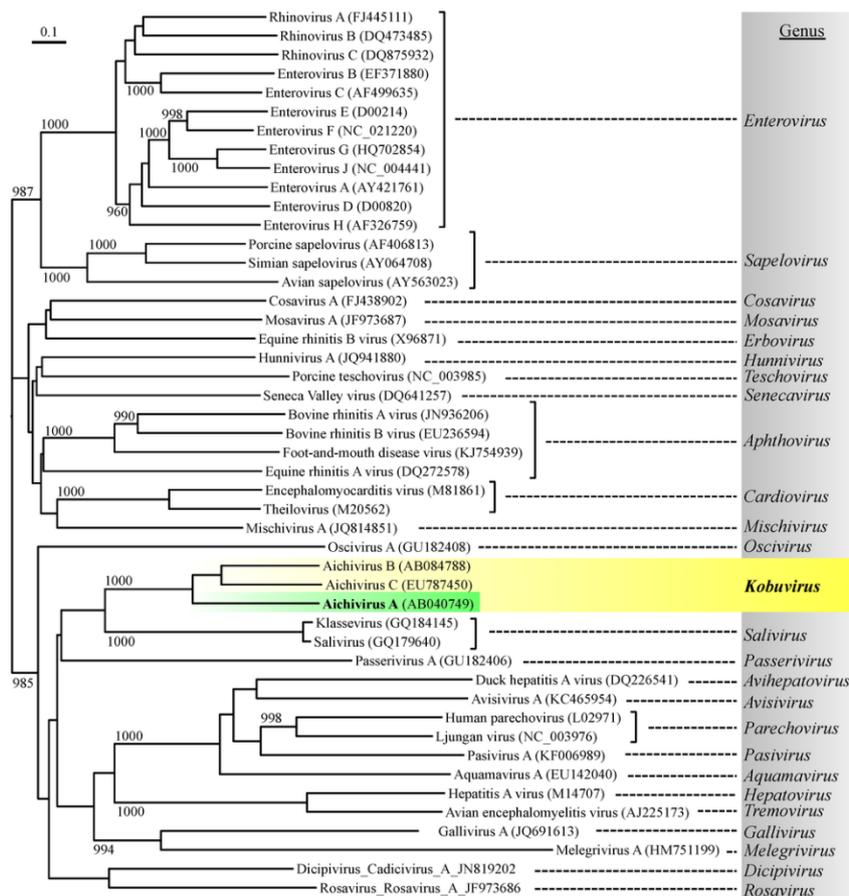


Figure 2 : Arbre phylogénétique des *Picornaviridae* (Kitajima M.et coll., 2015)

Le genre *Kobuvirus* se compose de trois espèces : ***Aichi virus A*** (anciennement appelé virus Aichi), ***Aichi virus B*** (anciennement appelé Kobuvirus bovin) et ***Aichi virus C*** (anciennement appelé Kobuvirus porcin). Récemment, deux autres types (canin de type 1 et murin 1), ont été décrits et appartiennent probablement à l'espèce Aichi virus A (Phan Tung G. et coll., 2011). D'autres virus apparentés (kobu-like) ont été identifiés chez les chauves-souris (Li et coll., 2010; Reuter G. et coll., 2011).

Tableau I : Classification des *Kobuvirus*

Adapté de <http://www.picornaviridae.com/kobuvirus/kobuvirus.htm> accédé le 26/10/2015

Espèce	Aichi virus A	Aichi virus B	Aichi virus C
Types	Aichi virus 1	Bovine kobuvirus 1	Porcine kobuvirus 1
	Feline kobuvirus 1	Ferret kobuvirus 1	
	Canine Kobuvirus 1	Sheep Kobuvirus 1	
	Murine kobuvirus 1		

3- Structure des Kobuvirus

Les *Kobuvirus* sont des petits virus (environ 30 nm de diamètre) non enveloppés dont le génome est un ARN simple brin de polarité positive. (Yamashita T. et coll., 1991 ; Reuter G. et coll. 2009). La structure du virus a une forme sphérique qui ressemble à un astrovirus quand on les regarde sous un microscope électronique (Figure 3).

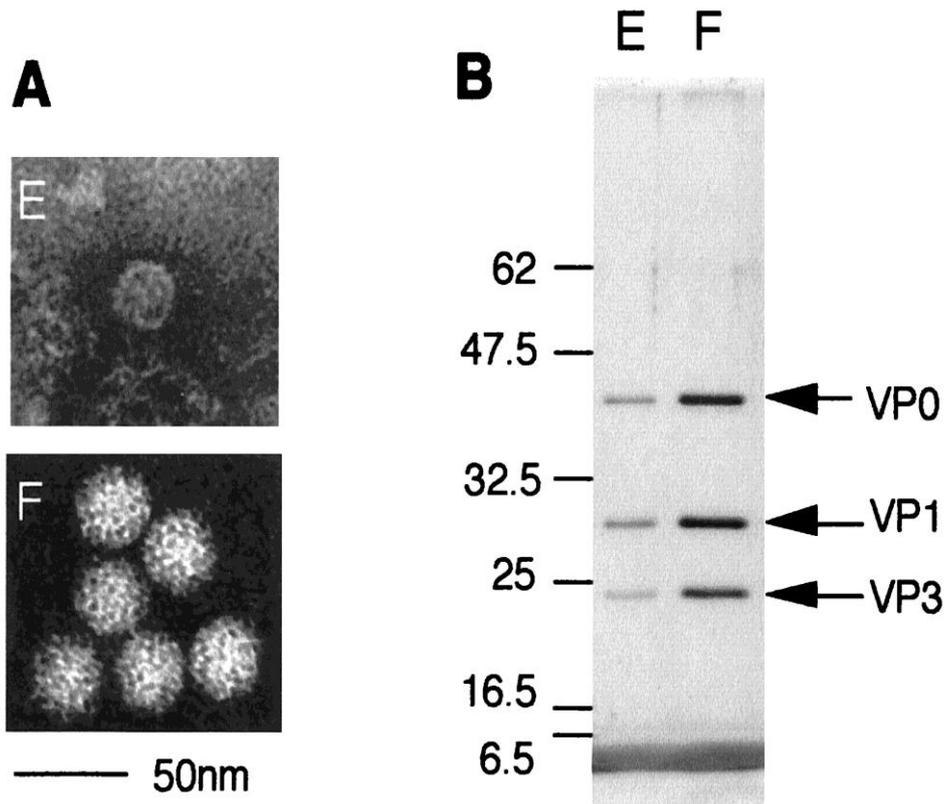


Figure 3 : (A) Image électromicrographique et (B) analyse par SDS Page du virus Aichi avec des particules pleines (E) et vides(F) (Yamashita T., et coll., 1998)

a-Structure de la capside

Le génome est contenu dans une structure protéique appelée capside, du mot grec « capsa », signifiant « boîte ». La capside icosaédrique des Kobuvirus est un arrangement de 60 protomères identiques, ou capsomères étant constitué de 3 polypeptides VP0, VP1 et VP3. Il n'y a pas de protéine interne.

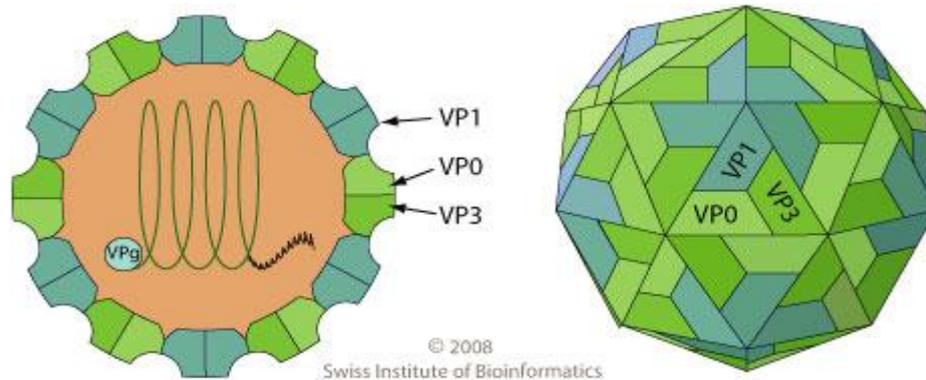


Figure 4: Organisation des protéines de la capsid chez les Kobuvirus .
 (http://viralzone.expasy.org/viralzone/all_by_species/652.html)

b-Structure du génome

Le génome des *Picornaviridae* est constitué d'un fragment d'ARN simple brin de polarité positive d'environ 7200-8500 nucléotides.

L'ARN est dit « infectieux » parce qu'il peut être directement traduit en protéines virales nécessaires à la réplication dès sa libération dans la cellule par les ribosomes grâce à la présence d'un IRES (Internal Ribosome Entry Site) dans la région 5' non-codante. Cette organisation génomique est généralement conservée pour l'ensemble des représentants de cette famille bien que de légères différences existent entre les genres humains et animaux. Le génome des *Picornaviridae* peut être divisé en quatre parties distinctes : une longue région 5' non traduite (5'NTR) d'environ 800 nt , un cadre de lecture ouvert unique (ORF) d'environ 6400 nt de long , une courte région 3' non traduite de taille variable et une queue poly(A) à l'extrémité 3'NC. Une des caractéristiques de l'organisation du génome des Kobuvirus c'est qu'il encode une protéine leader (Protéine L) de 170 nucléotides en amont de la région codant la capsid et il n'y a pas d'homologie significative avec les autres picornavirus. Cette protéine est impliquée dans la réplication et l'encapsidation d'ARN viral. Des études ont montré que cette protéine L n'a pas d'activité auto catalytique et n'est pas impliquée dans le clivage de la polyprotéine. Les Kobuvirus se distingue aussi des autres picornavirus par l'absence d'un site de clivage au niveau de la protéine VP0 et une forme distincte de la protéine 2A (**Sasaki et coll., 2003**).

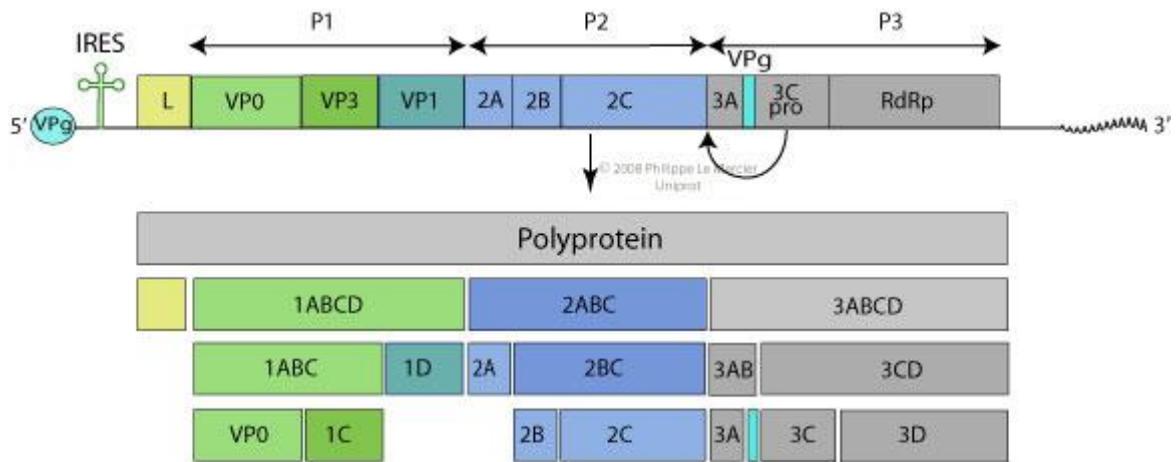


Figure 5 : Organisation génomique des kobuvirus.
 (http://viralzone.expasy.org/viralzone/all_by_species/652.html)
P1=Protéines virales P2 et P3=protéines non structurale

La région codante est entourée de 2 régions non codantes en 5' et 3' impliquées dans la régulation de la répliation et de la traduction. Elle code, elle-même, des protéines structurales (les 3 protéines de capside) et des protéines non structurales (protéases et polymérase) .

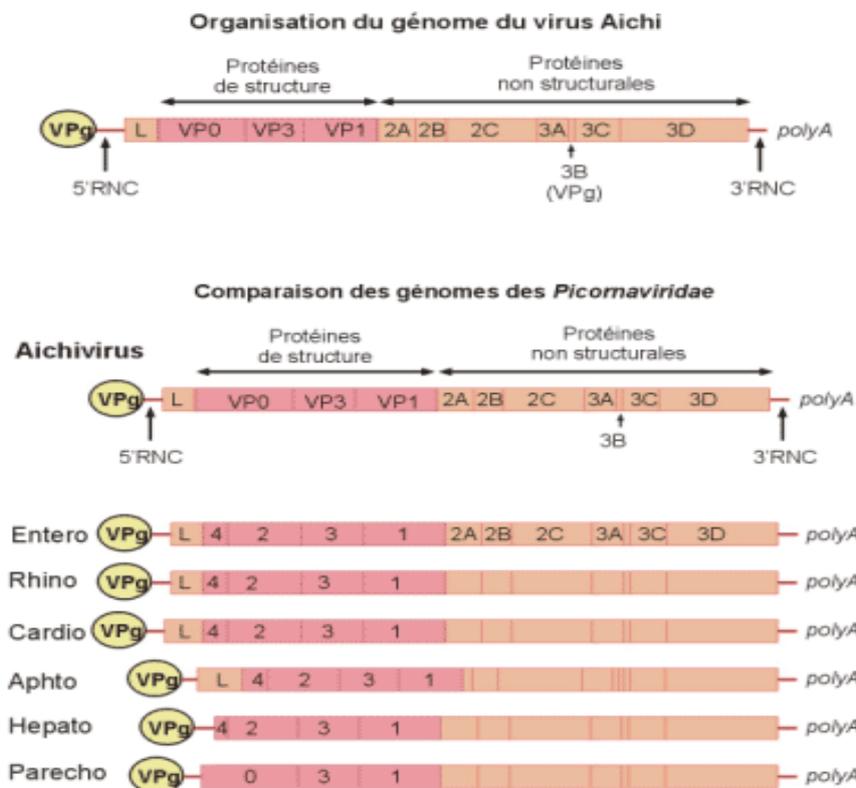


Figure 6 : Organisation génomique des AiV Comparaison avec la structure d'autres picornaviridae
 (<http://www.microbes-edu.org/>)

3. Propriétés physico chimiques

Les particules virales sont décrites être relativement stable in-vitro comme les autres Picornavirus : stables sous un faible pH (3,5), résistant aux traitements avec quelques produits chimiques comme le chloroforme, l'éther, les détergents non-ioniques. Cependant le virus est thermolabile et est inactivé à 60°C pendant 30 minutes (Yamashita et coll., 1998).

4-Cycle de réplication

Le processus de reproduction pour le virus Aichi est inhabituel et la multiplication a lieu en totalité dans le cytoplasme de la cellule.

- Le virus passe par les récepteurs de l'hôte qui facilitent son entrée dans la cellule par un processus d'endocytose.
- La capside subit un changement et crée une ouverture à l'intérieur de la membrane des endosomes de l'hôte.

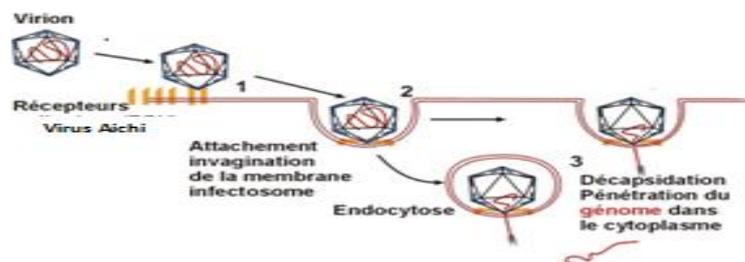


Figure 7: Attachement, pénétration, décapsidation du virus.

Adaptée de <http://www.microbes-edu.org/>

À ce stade, l'ARN génomique viral pénètre dans le cytoplasme de la cellule hôte.

- La protéine VPg, est alors libérée de l'ARN viral et traduite en une polyprotéine qui peut être clivée en plusieurs protéines mineures avec divers rôles biologiques.
- Après ce processus découle la réplication qui se produit dans des vésicules membranaires résultant du réticulum endoplasmique
- Un ARN double brin du génome est ensuite fabriqué à partir de la ssRNA génomique (+). De même, un génome ARN double brin est ensuite transcrit en fournissant le génome de l'ARNm.

- Cet ARN génomique sensé être mis en pro capside, qui est une coque protéique qui ne dispose pas d'un génome viral.
- La protéine L du virus est nécessaire pour la réplication d'ARN viral.

Des études ont été menées sur l'importance de la protéine L. Elle est indispensable à la réplication de l'ARN viral et à l'encapsidation. C'est un aspect unique du virus Aichi par rapport à d'autres Picornavirus (Sasaki et coll., 2003)..

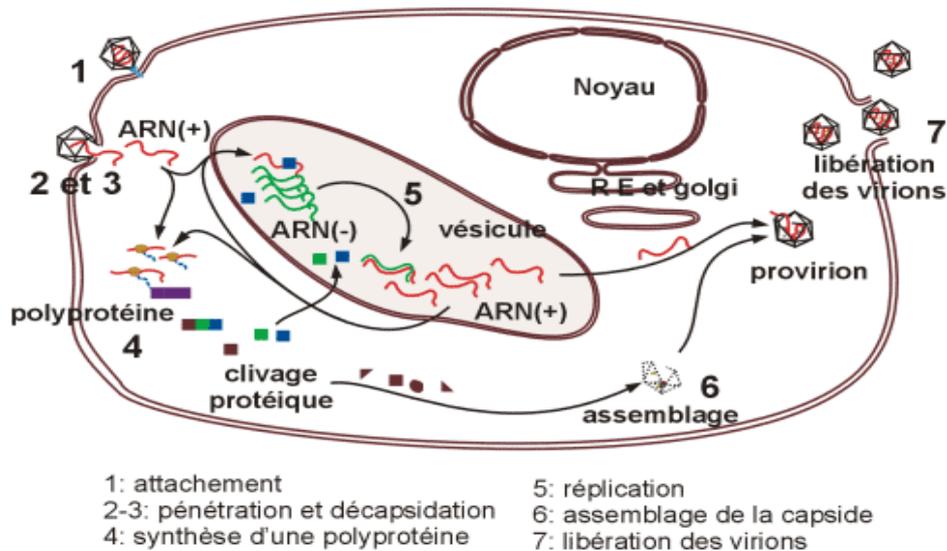


Figure 8: Cycle infectieux complet des Picornaviridae (<http://www.microbes-edu.org/>)

III- Le virus Aichi

Les virus Aichi appartiennent à la famille des picornaviridae, au genre Kobuvirus et à l'espèce Aichi virus.

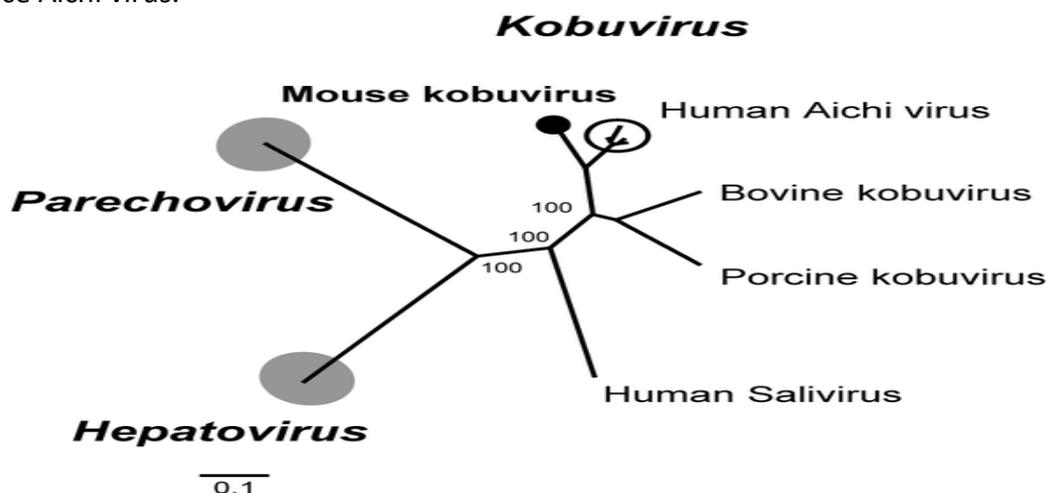


Figure 9: Arbre phylogénétique des kobuvirus (Pham T.G 2011)

1- Le génome

Le génome du virus Aichi est constitué d'une molécule d'ARN de sens positif simple brin avec 8,280 bases excluant un poly queue (A). Le génome a une teneur en G+C de 59%, ce qui est très élevé pour les picornavirus (Yamashita T. et coll., 1998), il contient un grand cadre de lecture ouvert avec 7302 nucléotides et qui code pour une polyprotéine précurseur de 2.433 acides aminés. Cette polyprotéine sera clivée pour donner des protéines structurales (VP0, VP1, VP3) et les protéines non structurales (2A 2B 2C 3A 3B 3C 3D).

Le génome contient une région 5' non traduite (NTR) de 712 bases et une région 3' NTR de 240 bases, suivie d'une poly queue (A) qui contribue à la stabilité et à la réduction de la dégradation du génome (Xiaohong H. et coll. 2011). La structure du génome (VPg-5' NTR-Protéine leader-Protéines structurales-Protéines non structurales-3'NTR-poly(A)), a été jugée typique d'un picornavirus. Un dendrogramme basé sur la protéine 3D Pol a indiqué que le virus Aichi est génétiquement distinct des six genres connus des picornavirus, y compris entéro-, rhino-, cardio-, aphto, hépatovirus et échovirus 22 (Parechovirus) (Yamashita T., et coll., 1998).

2- Le pouvoir pathogène

Le virus Aichi est responsables de gastroentérites aiguës chez l'homme (Yamashita T et coll., 1991). Les formes cliniques asymptomatiques ou pauci symptomatiques sont les plus fréquentes. Les principaux symptômes sont : la diarrhée, des douleurs abdominales, des nausées, des vomissements et de la fièvre, (Yamashita T et coll. 2001. Le virus a été par ailleurs retrouvé chez un enfant japonais souffrant d'une maladie des voies respiratoires inférieures (Yamashita T et coll., 1993). De même, l'excrétion du virus Aichi a été notée chez un enfant présentant de la diarrhée et des symptômes respiratoires en Hongrie (Reuter et coll., 2009).

3- Epidémiologie

a- Prévalence et incidence

Le virus Aichi a été trouvé avec une faible incidence chez les patients atteints de gastroentérite dans plusieurs régions du monde, notamment en Amérique du Sud , en Asie, en Europe et en Afrique Les études sérologiques indiquent que jusqu'à 90% de la population humaine a été exposé à des virus Aichi à l'âge de 40 ans. Cependant, l'épidémiologie de la

gastro-entérite causée par le virus Aichi est, dans une large mesure, inconnue (**Lodder W. J. et coll. 2013**). Au Japon, la séroprévalence est de 50% chez les jeunes de 19 ans contre 83% chez les personnes âgées de 39 ans (**Yamashita et coll. 1993**). Dans certains pays européens comme la France, cette prévalence est de 25% entre 7 mois et 9 ans et 80% entre 30 et 39 ans (**Goyer M. et coll. 2010**). Elle est de 86% entre 15 et 19 ans en Allemagne (**Oh D.Y et coll., 2006**). Toutes ces études montrent une augmentation du taux d'anticorps avec l'âge, ce qui suggère une large exposition au virus Aichi durant l'enfance. Ces résultats, cependant, ne révèlent pas un rôle d'AiV dans les maladies entériques humaines car l'incidence de ces virus dans les gastroentérites est très faible (0,9-4.1%) , et donc leur prévalence réelle, la pathogénèse et l'épidémiologie moléculaire restent floues (**Di Martino, B. et coll., 2013**).

b-Epidémiologie moléculaire

Les virus Aichi peuvent être classés en en génotypes (A, B et C) en se basant sur les analyses phylogénétiques de la région VP1 ou de la jonction 3CD du génome viral. Néanmoins, il est à noter que les identités de nucléotides au sein du génotype A étaient plus faibles pour la région VP1 (93%) que pour la région 3CD (95%) (**Yamashita et coll. 2000 ; Oh et coll., 2006**). La diversité de la séquence dans la région de P1 peut être plus élevée que dans la région 3CD. Malgré ce constat, la bonne corrélation entre les deux analyses phylogénétiques indique que les classifications des génotypes basées soit sur la région 3CD ou la région VP1 sont valables (**K. Ambert-Balay et coll.2008**).

Les données préliminaires suggèrent que le génotype A du virus Aichi peut être commun en Asie et en Europe. Le génotype B a été détecté en Amérique, en Asie et en Europe et le génotype C a été trouvé en Afrique plus précisément Mali (**Ambert-Balay K. et coll., 2008**). Comme il n'y a pas beaucoup de données sur la prévalence des virus Aichi en Afrique, d'autres études seront nécessaires pour apprendre davantage sur son épidémiologie et de pouvoir déterminer si ce génotype C est la plus répandue à travers le continent.

c- Le virus Aichi dans l'environnement

Récemment, il a été révélé que le virus Aichi est souvent détecté dans divers types d'échantillons environnementaux comme les eaux usées, les eaux de rivière, les eaux souterraines et les coquillages, ce qui suggère que ce virus est un virus pathogène émergent

associé à la contamination de l'environnement particulièrement l'eau et aux infections d'origine alimentaire **(Kitajima M. et coll., 2015)**.

Les virus Aichi rejetés avec les excréments humains contaminent les eaux de surface, directement ou après rejet d'eaux usées traitées ou non traitées **(Lodder W.J., 2005)**. Les humains peuvent être exposés à ces virus par l'intermédiaire des eaux superficielles utilisées pour la production d'eau potable (après traitement insuffisant) ou à des fins récréatives et après consommation de coquillages crus cultivés dans les eaux de surface contaminées. Les virus Aichi peuvent être transmis par la voie féco-orale et ont été détectés dans des échantillons d'eaux usées en Tunisie **(Sdiri-Loulizi K., et coll., 2010)**, dans des eaux de surface au Venezuela **(Ana Alcalá et coll., 2010)**, et dans des eaux d'égout et de rivière au Japon **(Kitajima M. et coll., 2011)**. Certaines de ces études ont montré une prévalence élevée du virus Aichi dans les échantillons d'eau. La présence des virus dans les eaux usées démontre leur potentielle circulation dans la population humaine, car provenant de l'excrétion du virus par des personnes asymptomatiques ou symptomatiques **(Lodder W.J., 2012)**. Par conséquent, les études de surveillance environnementale sont extrêmement utiles pour déterminer la circulation du virus dans la population humaine **(Lodder W.J., 2012 ; Hovi T. et coll., 2012)** et pour obtenir des informations sur les séquences des souches circulantes.

c.1 Eaux usées.

La présence d'un virus humain dans les eaux usées est un bon indicateur pour avoir une idée sur la circulation de ce virus dans la population.

De nombreuses études ont montré la présence de l'ARN du virus Aichi dans les eaux usées de nombreux pays avec une prévalence allant de 60 à 100%. **(Kitajima M. et coll., 2015)**.

c.2 Eaux de la rivière

La contamination virale de l'eau de la rivière pose des problèmes de santé publique car ces eaux sont des sources importantes d'eau potable dans de nombreuses régions du monde et sont souvent utilisées à des fins récréatives (comme la natation et la baignade).

Le virus Aichi a été détecté dans des échantillons d'eaux de rivière au Venezuela. **(Ana Alcalá et coll., 2010)**. La détection et la caractérisation moléculaire des AiV-1 dans l'eau de la rivière ont ensuite été rapportées au Japon où il a été détecté dans 60% des échantillons. Cette étude a démontré une détection plus fréquente de AiV-1 que les

norovirus humains et sapovirus dans le même ensemble d'échantillons d'eau de rivière (Kitajima M. et coll., 2011).

c.3 Les eaux souterraines

Le virus Aichi a été détecté dans les eaux souterraines dans trois régions différentes des Etats-Unis (Betancourt W.Q. et coll., 2014). La concentration de AiV-1 dans cette eau était supérieure à $1,52 \times 10^4$ copies/L. Cette étude est la seule enquête sur l'apparition d'AiV-1 dans les eaux souterraines à ce jour. Le comportement des AiV-1 dans l'aquifère du sol n'a pas été bien compris et mérite d'être examinée.

c.4 Fruits de mer

La première épidémie liée au virus Aichi était survenue suite à la consommation d'huitres au Japon en 1989 (Yamashita T. et coll., 1991). Depuis, de nombreuses études ont été réalisées pour détecter ce virus dans les fruits de mer.

Au Japon, l'ARN des AiVs-1 a été détecté dans 33% des paquets de palourdes japonaises par RT-PCR, et seulement le génotype A a été identifié par séquençage direct des produits de RT-PCR. (Hansman G.S. et coll., 2008).

En France, une étude menée par l'équipe de Le Guyader a rapporté que le génotype A du virus Aichi a été détecté dans 8% des échantillons d'huîtres (Le Guyader F.S. et coll., 2008). En Tunisie, l'étude menée par Sdiri-Loulizi K. et coll., 2010 a également signalé la présence du virus Aichi (génotype A) dans 4 des 60 échantillons de crustacés.

En revanche, les études menées en Espagne (Vilariño M.L. et coll., 2009) et au Maroc (Benabbes, L. et coll., 2013) n'ont pas détecté le virus Aichi dans les coquillages.

4-Diagnostic au laboratoire

- **Culture cellulaire** : Le virus Aichi a été isolé pour la première fois en 1989 à partir d'une lignée de cellules primaires (lignée BS-C-1) provenant de reins de singe vert adulte du genre Cercopithecus aethiops. Il se multiplie aussi sur des cellules Vero mais pas sur les cellules humaines comme Hela, ou RD (Yamashita et coll., 1991). Cependant il faut noter que le délai d'apparition de l'ECP est extrêmement long (4-6 semaines) avec une sensibilité faible.

-La détection du virus au **microscope électronique** est très délicate car sur le plan morphologique, il peut être confondu aux astrovirus.

- Une **technique Elisa** utilisant des anticorps monoclonaux dirigés contre le virus Aichi a été développée pour la détection de l'antigène dans des échantillons de selles au Japon avec une meilleure sensibilité par rapport à la culture cellulaire (**Yamashita et coll. 1993**).

- **RT-PCR** : En 2000 une RT-PCR pour la détection du virus Aichi a été élaborée. Les amorces utilisées ciblent la jonction 3CD du génome du virus. La région 3CD est beaucoup plus conservée génétiquement que la VP1 chez les Kobuvirus. Malheureusement ces amorces ont échoué à détecter le Kobuvirus bovin. (**Yamashita T et coll. 2000**)

Des tests de PCR nichée ciblant les régions 3C et VP3-VP1 ont également été développés (**Fig.10**) et utilisés pour la détection du virus Aichi dans les eaux (**Lodder W.J., 2013**).

Pham et coll. 2009 ont rapporté une PCR semi-nichée en multiplex en utilisant des amorces spécifiques de génotype qui ciblent la région VP0-VP3 pour la différenciation des génotypes A et B. Récemment des amorces consensus permettant d'amplifier une région de la zone 3D conservée par les trois espèces du genre Kobuvirus de 216 nucléotides ont été conçus (**Reuter G et coll., 2009**).

En 2013, Kitajima et coll., ont développé un système RT-qPCR ciblant la région VP0 (**Fig.10**) qui est en mesure de quantifier AIV-1 et de différencier les génotypes A et B (**Kitajima M et coll., 2013**)

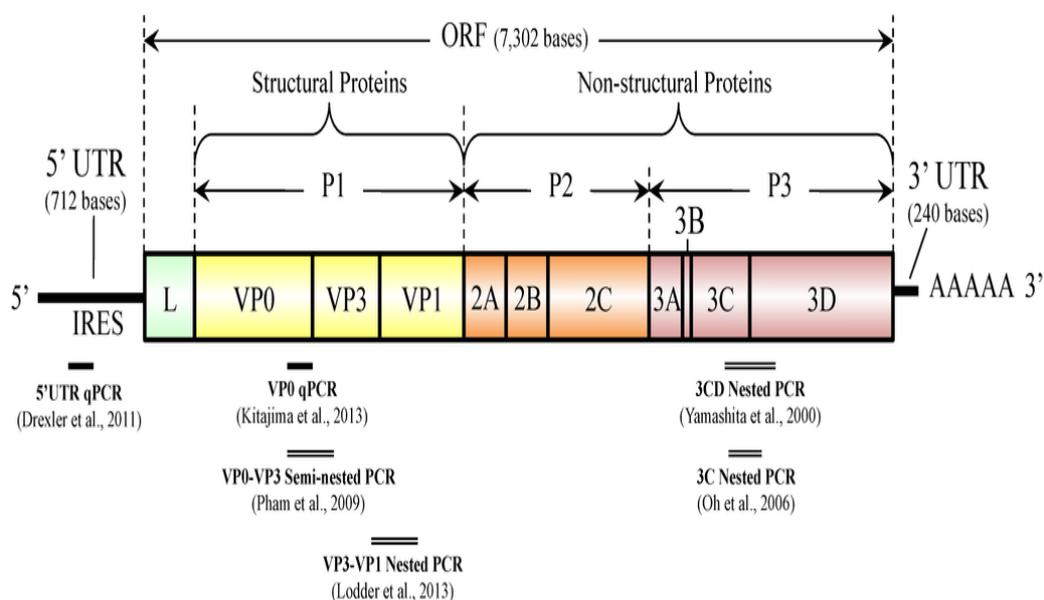


Figure 10. Organisation génomique de Aiv1- Cible des tests de PCR de diagnostic (**Kitajima M. et coll., 2015**)

2^{ème} partie

TRAVAIL EXPERIMENTAL

I. OBJECTIFS

1. OBJECTIF GENERAL

Evaluer la prévalence et les génotypes des virus Aichi (AiV) circulant dans l'environnement à partir des eaux usées sur la période 2012-2013 en zone urbaine dakaroise.

2. OBJECTIFS SPECIFIQUES

- a. Recueillir au moins 50 échantillons d'eaux usées brutes sur la période d'étude
- b. Détecter par PCR classique la présence des virus Aichi.
- c. Définir le génotype des virus Aichi détectés par séquençage
- d. Comparer génétiquement les AiV de l'environnement avec les génotypes d'AiV décrits ailleurs dans le monde.

II. Matériels et méthodes

1. Site d'étude

Notre étude s'est déroulée dans la région dakaroise où il existe un important réseau d'assainissement sous la responsabilité de l'Office National de l'Assainissement du Sénégal (ONAS). L'ONAS est un établissement public à caractère industriel et commercial chargé de la gestion du secteur de l'assainissement. Il a été créé par la loi n° 96-02 du 22 Février 1996, et organisé par le décret 96-667 du 07 Août 1996. Entre autres missions, l'ONAS a en particulier la charge d'exploitation et de maintenance des installations d'assainissement d'eaux usées et pluviales dans la limite des zones urbaines et périurbaines.

L'ONAS exerce ses missions dans 7 grandes villes du Sénégal : Dakar, Rufisque, Saint-Louis, Thiès, Kaolack et Louga, ainsi qu'à la station balnéaire de Saly Portudal (Mbour). Les autres villes ne bénéficient pas d'un système de traitement et/ou de système de collecte des eaux usées.

La région dakaroise est une presqu'île située à l'Ouest du Sénégal limitée en grande partie par l'Océan Atlantique. Pour une superficie de 525 km², Dakar compte selon le dernier recensement 3 millions d'habitants, soit une densité supérieure à 3400 habitants/km². Dans la région de Dakar, environ 39% des foyers sont raccordés au réseau public d'assainissement (35%) et au réseau semi-public (4%). La majorité des foyers de la banlieue (Pikine, Guédiawaye) n'est pas reliée au réseau (**Figure 11**)

Le réseau d'assainissement de la région de Dakar se subdivise schématiquement en 2 zones

- Une zone Nord desservie par la station d'épuration de Cambéréne qui reçoit toutes les eaux usées collectées à travers des conduites;
- Une zone Sud où les eaux usées sont directement rejetées vers la mer (baie de Hann en zone industrielle, baie de la Madeleine à l'Ouest, Ouakam, etc.).

Les échantillons de cette étude ont été collectés à la station d'épuration de Cambéréne construite entre 1987 et 1989 et située en zone péri urbaine à la sortie de la ville. Elle collecte les effluents de la partie nord de la ville allant de la pointe des Almadies au quartier de Guédiawaye en passant par les quartiers traditionnels de Yoff et les parcelles assainies qui constituent la plus grande agglomération de la région dakaroise.



Figure 11: Réseau d'assainissement de la région dakaroise (ONAS)

La station d'épuration de Cambérène est une station classique à boues activées moyenne charge. Les eaux usées drainées par les conduites vont être traitées selon un cycle précis comportant 4 étapes principales :

- Prétraitement [Dégrillage-Dessablage-Dégraissage-Déshuilage]
- Traitement primaire [Décantation]
- Traitement secondaire [Traitement biologique]
- Traitement tertiaire [Clarification]

2. Collecte, nature et transfert des échantillons

Les échantillons de notre étude ont été collectés entre le mois de Novembre 2012 et le mois de Mars 2013 sur une fréquence hebdomadaire entre 9 heures et 11 heures du matin au niveau de la station de Cambérène.

Les eaux usées ont été recueillies à 3 niveaux de traitement à l'aide d'un seau et d'une corde :

- **Eaux usées brutes (EUB)** : directement dans le flux versant après dégrillage (A l'arrivée, les eaux usées en provenance des égouts passent entre les barreaux d'une grille qui vont retenir les grosses matières solides en suspension (papiers, feuilles, branches, matières plastiques, etc.) qui vont être triées et éliminées.)
- **Eaux usées décantées (EUD)** : au niveau du bassin de décantation primaire où 70 % des matières minérales et organiques en suspension vont se déposer par

décantation au fond du bassin sous forme de boues dites boues primaires qui sont récupérées et traitées secondairement dans un digesteur en milieu anaérobie, des bactéries dégradent la matière organique, et produisent du méthane qui est utilisé pour les besoins de la station (énergie).

- **Eaux usées traitées (EUT)** : au niveau des bassins de décantation secondaire et après désinfection par chloration.

Environ 1 l d'eau a été prélevé dans des flacons en verre pyrex stériles portant label du site et date du prélèvement. Les échantillons sont transférés vers le laboratoire à l'aide de glacières ou de boîtes en polystyrène contenant des blocs réfrigérants.

3. Concentration des eaux usées par la méthode biphasique

Au niveau du laboratoire, les échantillons d'eaux collectées ont été concentrés par la méthode de séparation biphasique. Des macromolécules 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. Nous utilisons le sulfate de Dextran et le Polyéthylène glycol (PEG) qui est un polymère synthétique soluble dans l'eau, non toxique qui agit en piégeant l'eau autour des virus provoquant ainsi leur précipitation. C'est une macromolécule chimiquement neutre qui réalise une précipitation des virus en suspension à partir de n'importe quel type de solution, protéique ou non. (**Schwartzbrod 2000 ; Lewis et coll., 1988; Albert et coll., 1995**). La procédure utilisée au laboratoire est schématisée sur la **figure 12**.

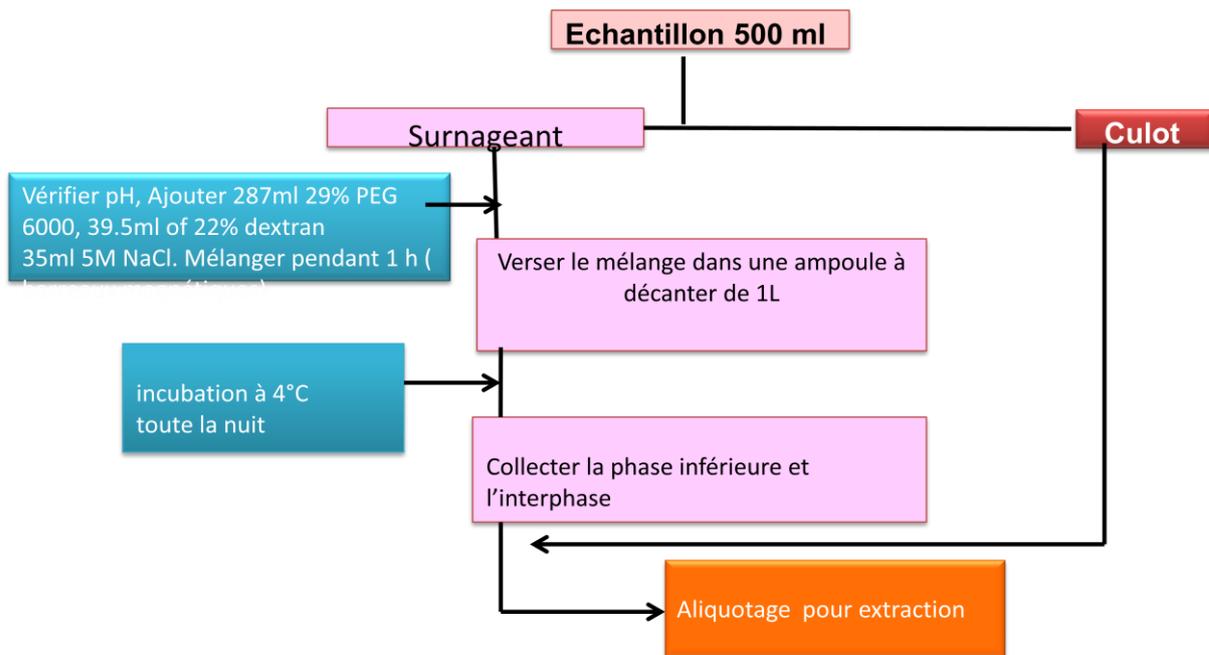


Figure 12 : Schéma général pour la concentration des eaux usées utilisant la méthode biphasique

4. 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°C .

a. Matériel et réactifs

Matériel

- Hotte
- Mini centrifugeuse (avec rotor pour tubes de 1,5 et 2 ml)
- Pipette de 1000 μl , Pipette de 200 μl
- Cônes à filtre
- Tubes à hémolyse de 10 ml + bouchons
- Tubes Eppendorf de 1,5 ml
- Bécher plus désinfectant
- EPI (Gants, Blouse)
- Vortex
- Bain-marie à 80°C

Réactifs

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

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

c. 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 µM**, qui sera conservé à – 20°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°C pour de courtes périodes.

5. Amplification de l'ARN viral extrait par RT-PCR en une étape

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).

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 Polymerase 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), Thymines (T), Cytosine (C) et Guanine (G)

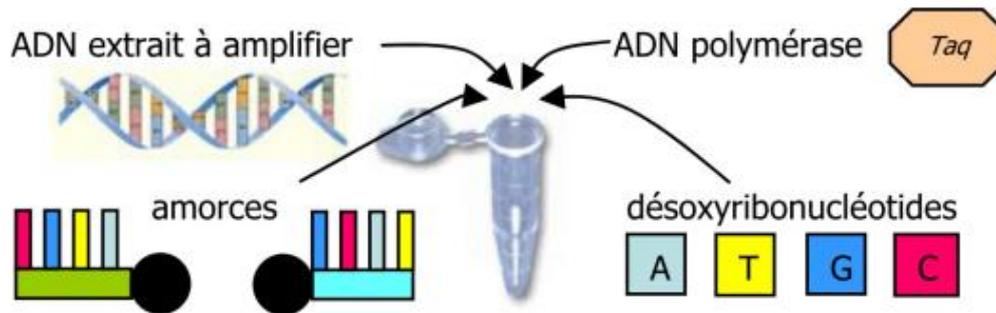


Figure 13 : Réactifs essentiels pour la réalisation de la PCR

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 aichivirus 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 un couple d'amorces ciblant d'un segment de **519 bp** au niveau de la jonction 3C et 3D (3CD) codant pour la polymérase avec les amorces décrites par **Yamashita et coll., (2000)** utilisant le kit QIAGEN® OneStep RT-PCR selon les recommandations du fabricant.

b. Consommables et matériels

- EPI (Blouse, gants)
- Tubes Eppendorf de 1,5 ml
- Tubes pour PCR de 0,5 ml ou 0,2 ml

- Pipette de 2 µl, 20 µl et 100 µl
- Picofuge pour tube de 0,2 ml
- Portoirs réfrigérés
- Bloc + glace pilée
- Vortex
- Thermocycleur

c. Réactifs

- QIAGEN® OneStep RT-PCR Kit Réf : 210212
- ARN double brin à amplifier
- Amorces

Amorces	Séquences	Position
6261 (Sens)	5'- ACA CTC CCA CCT CCC GCC AGT A-3'	6290-6311
6779 (Anti sens)	5'- GGA AGA GCT GGG TGT CAA GA-3'	6789-6808

d. 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**)
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**). Noter sur les tubes 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 ₂ O		19
Tampon	5X	10
Solution Q	5X	10
dNTP	10 mM	2
RNAsinh		1
Mélange enzymatique		2
Amorce 6261	20 µM	1,5
Amorce 6779	20 µM	1,5
Volume réactionnel		47

- 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 "**AICHI**"
- 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](#))

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

e. Expression des résultats

Les amplicons (produits de PCR) générés par les virus Aichi 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.

La taille attendue des amplicons pour le segment amplifié avec les amorces 6261 et 6779 est de **519 paires de bases**.

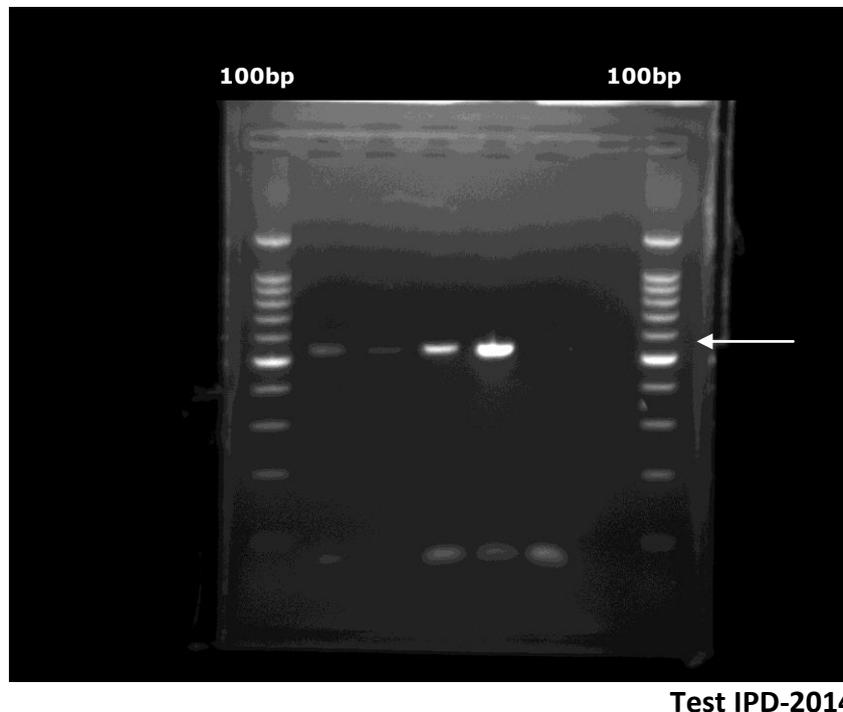


Fig 14 : Amplification en une étape d'un segment de 519 bp au niveau de la jonction 3CD codant pour la polymérase. Résultats de la migration par électrophorèse. **Ligne 1 et 8** (Marqueur de poids moléculaire 100 bp), **Ligne 2-5** (amplicons positifs à 519 bp), **Ligne 6** :Contrôle négatif. La flèche indique l'échelle pour 500 bp.

Les produits d'amplifications positifs ont été envoyés pour un séquençage partiel de la région d'intérêt 3CD.

6. 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 phylogéniques 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 a priori comme groupe externe (outgroup) une séquence de kobuvirus porcin.

III. Résultats

66 échantillons d'eaux usées ont été sélectionnés dans le cadre de notre étude entre le 14 novembre 2012 et le 13 mars 2013 et sont répartis comme suit :

Tableau II : Répartition des types d'eaux sélectionnées par année et par mois

	2012			2013		Total
	Nov. 12	Déc.12	Janv. 13	Févr. 13	Mars 13	
EUB	3	4	5	4	4	20
EUD	3	4	5	4	3	19
EUT	4	7	9	4	3	27
Total	10	15	19	12	10	66

EUB : eaux usées brutes

EUD : eaux usées décantées

EUT : eaux usées traitées

65% (43/66) des échantillons sont positifs en RT-PCR classique en une étape pour la détection de l'ARN du virus Aichi. La prévalence du virus Aichi a été beaucoup plus élevée dans les EUB soit **70%** suivi des EUD (**68,4%**) et des eaux usées traitées (**59,26%**).

Tableau III : Résultats de la détection dans les différents types d'eaux usées

Nature	Positif (%)	Négatif (%)	Total
EUB	14 (70)	6(30)	20
EUD	13 (68,4)	6(31,2)	19
EUT	16 (59,26)	11(40,74)	27
Total	43(65,15%)	23 (34,85%)	66

La distribution mensuelle des résultats montrent une prévalence beaucoup plus faible durant les deux premiers mois de l'année 2013 avec 47.3% au mois de janvier et 50% au mois de février.

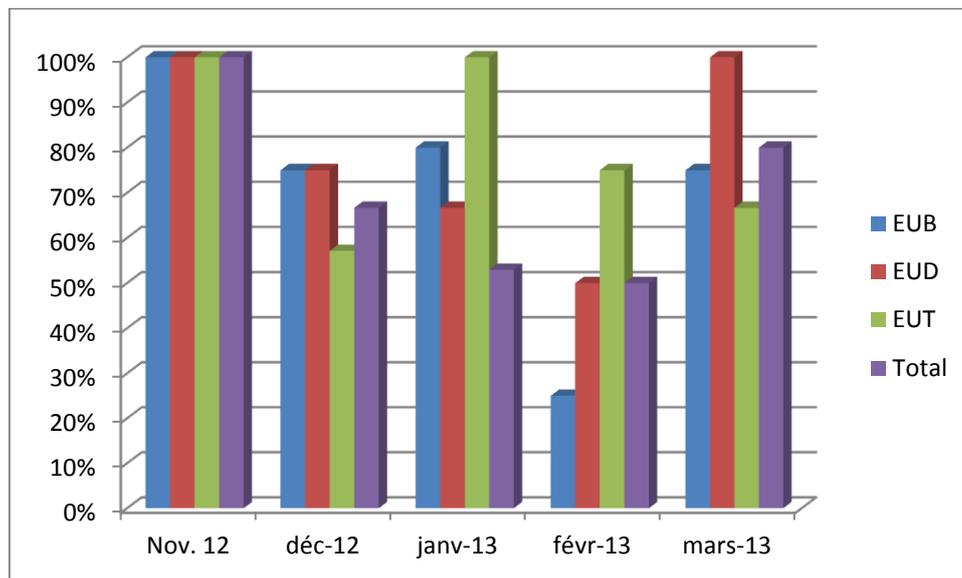


Figure 15 : Résultats de la détection en fonction du mois et de l'année de collecte.

- Résultats de l'analyse phylogénétique

Les résultats de l'analyse phylogénétique sont représentés sur l'arbre figurant en **figure 16**.

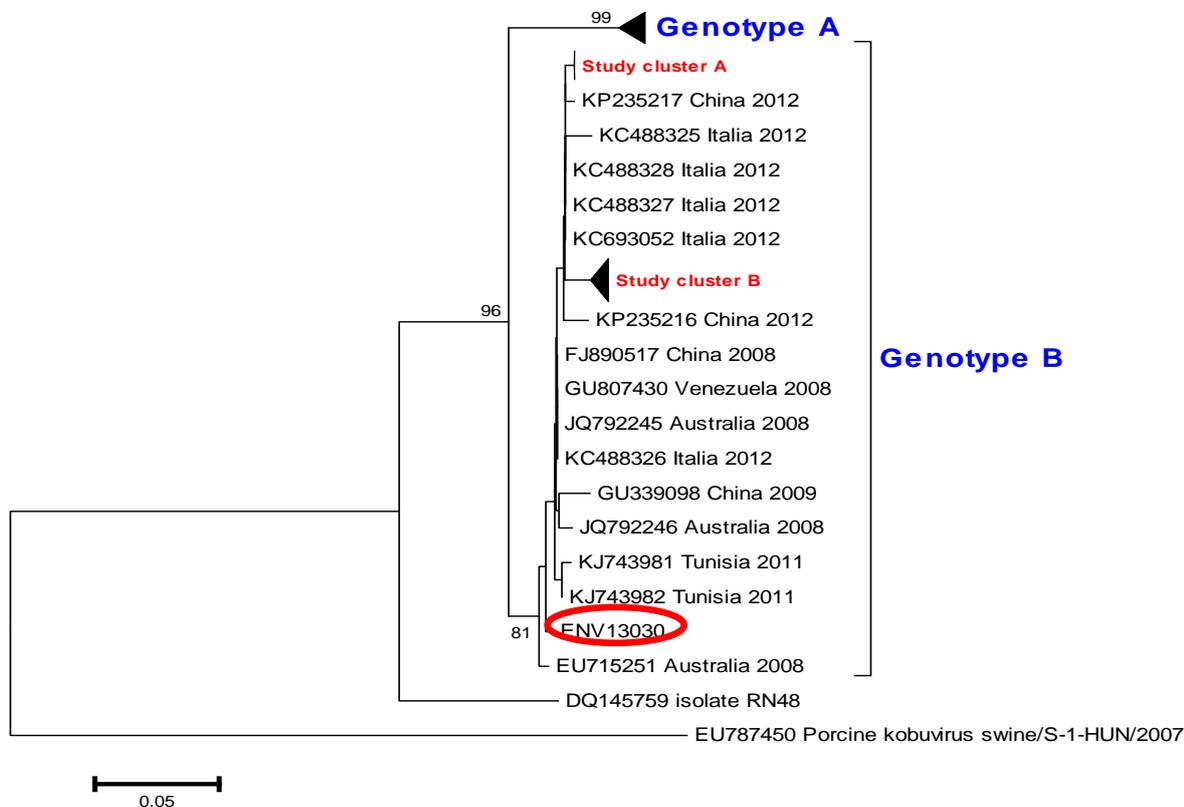


Fig. 16. Analyse phylogénétique des virus Aichi détectés dans les eaux usées de la région Dakaroise basée sur la comparaison d'une séquence de 519 pb de la jonction 3CD. L'arbre a été reconstruit en utilisant l'algorithme de groupement des voisins ou Neighbour Joining Method. Les nombres sur la gauche 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. **En rouge**, le cluster A correspond à 10 échantillons d'eaux usées prélevées en 2012 et le cluster B a 15 échantillons d'eaux usées prélevées en 2013.

Nous avons utilisé comme groupe externe une séquence de kobuvirus porcin (EU 787 450 Porcine Kobuvirus swine/S-1-HUN/2007)

IV. DISCUSSIONS

Notre étude a permis de détecter une prévalence globale de **65%** pour la détection des virus Aichi dans les eaux usées; ceci constitue un témoin indirect de la circulation du virus dans la communauté. La présence du virus a été constante sur les 4 mois d'étude avec des prévalences de 100% au mois de Novembre 2012 pour les 3 types d'eaux collectées.

Le manque de données cliniques et épidémiologiques ne permet pas de décrire une saisonnalité tranchée pour la circulation des Aichi virus à Dakar; mais les résultats décrits

par **Kitajima et coll., 2013** au Japon suggèrent une circulation maximale du virus en hiver et au printemps. **Prevost et coll., 2015** ont également décrit une plus grande circulation en hiver en France entre 2013 et 2014. Les données générées par notre étude suggèrent une circulation pendant la saison sèche coïncidant avec une baisse des températures entre les mois de Novembre et Mars. Ces résultats doivent néanmoins être consolidés par des études longitudinales sur des périodes plus étendues afin de mieux décrire la distribution temporelle du virus en zone tropicale.

La présence du virus est plus importante dans les eaux usées brutes (70% de positivité) et décantées (68,4%). Le virus a cependant été détecté dans plus de la moitié (59%) des échantillons d'eaux usées traitées et collectées dans le cadre de l'étude. On retrouve respectivement des prévalences de 67%, 53%, 50% et 80% pour les mois de décembre 2012 à mars 2013. Ceci témoigne d'une forte résistance du virus à la chloration ou d'un traitement insuffisant au niveau de la station d'épuration. On notera qu'une partie de ces eaux traitées est réutilisée dans le cadre du maraichage dans la zone des Niayes. Une évaluation du risque liée à l'exposition, à la manipulation et à la consommation des produits dérivés du maraichage serait de la plus grande importance en santé publique, Cette prévalence élevée a été rapportée dans d'autres études environnementales faites dans différentes zones géographiques.

Le taux de virus trouvé dans les eaux brutes usées (EUB) de notre étude (69%) est supérieur aux taux décrits dans des études utilisant la même technique de PCR directe suivie de séquençage. C'est ainsi qu'un taux de 8% (10/125) a été noté par **Sdiri-Loulizi, K et coll., 2010** en Tunisie. On notera cependant que les auteurs ont utilisé une technique de concentration par adsorption-élution. La technique de concentration biphasique utilisée dans notre étude semble plus efficace. En Italie **Di Martino, B. et coll., 2013**, en faisant une PCR directe sur les échantillons sans concentration préalable ont obtenu une prévalence de 12,5% (9/48) inférieure à nos chiffres.

Les techniques de PCR nichée suivie de séquençage augmentent la sensibilité du diagnostic, C'est ainsi que **Kitajima, M et coll.,2011**, au Japon et **Lodder, W.J. et coll., 2013** en Hollande ont obtenu respectivement des taux de 100% (12/12 pour le Japon, et 13/13 pour la Hollande) dans leurs études.

La technique de PCR suivi de clonage et de séquençage décrite par **Yamashita, T., et coll., 2014** donne un taux de 66,2% (137/207) voisin de celui retrouve dans notre étude

La PCR quantitative en temps réel permet d'obtenir des taux similaires de 100% (**Kitajima, M. et coll., 2013; Kitajima, M et coll., 2014**)

Les techniques de métagénomique virale utilisées pour la détection des virus Aichi dans les EUB en Espagne et aux USA par l'équipe de **Cantalupo, P.G et coll., (2011)**, et au Népal, en Thaïlande et aux USA par **Ng, T.F et coll., (2012)** ont montré des prévalences respectives de 50% (2/4) et 75% (3/4). Cependant, la taille des effectifs ne permet pas une appréciation objective de la sensibilité de la méthode par rapport aux autres décrites.

La prévalence des virus Aichi dans les eaux usées brutes varie donc en fonction des méthodes de concentration des eaux et des techniques de détection (**Tableau IV**).

Dans les eaux usées traitées, nous avons trouvé au cours de notre étude une prévalence de 59,26%. Dans l'étude de **Sdiri-Loulizi, K et coll., (2010)** en Tunisie, cette prévalence est très faible (4%) en utilisant la même technique de concentration que celle décrite précédemment (adsorption-élution).

Dans les études où la PCR nichée (nested PCR) ou la PCR en temps réel (qPCR) sont utilisées, cette prévalence est nettement plus élevée comme le confirment les études de **Kitajima, M. et coll.,(2011 et 2013)** au Japon, **Kitajima, M. et coll.,(2014)** aux USA et **Prevost, B. et coll., (2015)** en France. Ces auteurs ont respectivement trouvé des taux de 92% (11/12) , 100% (24/24) et 61% (61/100) voir (**Tableau IV**). La prévalence des virus Aichi est plus faible dans les eaux usées traitées que dans les EUB dans toutes les études. Cependant l'ARN viral reste toujours détectable et à des taux élevés variant entre 50 et 100%. Ce constat remet en cause l'efficacité des techniques de traitements viraux des eaux usées dans les sites de traitement.

Tableau IV: Comparaison des techniques de détection des AiV dans les eaux usées brutes et traitées. (Adapté de Kitajima et coll., 2015)

Type	Methode de detection	Taux de positivite	Pays	Reference
Eaux usees brutes	PCR nichee-Clonage-Séquençage	100% (12/12)	Japon	Kitajima, M et coll.,2011
	PCR directe-Séquençage	69% (27/39)	Senegal	Kebe O., et coll., 2015 (non publiees)
	PCR directe-Séquençage	8% (10/125)	Tunisie	Sdiri-Loulizi, K et coll., 2010
	PCR quantitative	100% (12/12)	Japon	Kitajima, M. et coll., 2013
	PCR nichee-Clonage-Séquençage	100% (16/16)	Hollande	Lodder, W.J. et coll., 2013
	PCR directe-Séquençage	12,5% (6/48)	Italie	Di Martino, B. et coll., 2013
	PCR quantitative	100% (24/24)	USA	Kitajima, M et coll., 2014
	Metagénomique virale	50% (2/4)	Espagne-USA Nepal Thailande	Cantalupo, P.G et coll., 2011
	Metagénomique virale	75% (3/4)	USA	Ng, T.F.F et coll., 2012
	PCR-Clonage-Séquençage	66,2% (137/207)	Japon	Yamashita, T., et coll., 2014
Eaux usees traitees	PCR nichee-Clonage-Séquençage	92% (11/12)	Japon	Kitajima, M. et coll.,2011
	PCR directe-Séquençage	59% (16/27)	Senegal	Kebe O., et coll., 2015 (non publiees)
	PCR directe-Séquençage	4% (4/125)	Tunisie	Sdiri-Loulizi, K et coll., 2010
	PCR quantitative	92% (11/12)	Japon	Kitajima, M. et coll.,2013
	PCR quantitative	100% (24/24)	USA	Kitajima, M et coll., 2014
	PCR quantitative	61% (61/100)	France	Prevost, B. et coll., 2015

Les séquences nucléotidiques obtenues de la région non structurale 3CD sont hautement conservées (99% d'homologie), avec une identité des acides aminés entre 99 et 100%.

Tous les 26 échantillons sélectionnés pour l'analyse phylogénétique appartiennent au groupe B selon la classification proposée par **Yamashita et coll., en 2000**. Le génotype A est le plus commun décrit en Europe pour AiV (**Ambert-Balay, K. et coll.,2008; Drexler JF et coll.,2011; Jonsson N. et coll.,2012; Le Guyader et coll.,2008; Oh DY et coll.,2006; Reuter et coll.,2009**). Néanmoins une co circulation des génotypes A et B a été décrite en Allemagne (**Drexler JF et coll.,2011**) et en Hollande où **Lodder, W.J. et coll., (2013)** ont constaté une dominance du génotype A entre 1987 et 2000 avec une expansion du génotype B à partir de 2005. En Asie, **Kitajima, M et coll.(2011)** ont également décrit cette cocirculation à partir d'observation dans l'environnement au Japon. Mais dans cette étude, sur 260 virus identifiés, 255 étaient du génotype A et seuls 5 virus appartenait au génotype B.

Le génotype B est décrit comme en expansion dans ce continent par rapport aux AiV du groupe A. En Italie **Di Martino et coll.,2013** ont retrouvé une prévalence de 12,5% de AiV dans les eaux usées; tous les virus appartenait au génotype B.

En Afrique, les seules données moléculaires disponibles décrivent une circulation du génotype A en Tunisie (**Sdiri-Loulizi, K. et coll., 2010**) et un cas rapporté de AiV appartenant au génotype C identifié chez un patient en provenance du Mali (**Ambert-Balay K, et coll.,2008**). Le génotype C n'a jamais été isolé à partir des eaux usées (**Kitajima, M. 2015**). Le manque de données sur la circulation du virus en Afrique noire, ne permet pas de définir une spécificité des génotypes circulants et donc de leur éventuelle expansion vers les autres continents.

Les 10 virus identifiés pour l'année 2012 (001, 003, 005, 008, 011, 012, 015, 019, 024 et 027) forment un seul cluster (A) sur l'arbre phylogénétique (**Figure 16**) et présente une similarité pour le génotype B avec les virus Aichi détecté en Chine (KP 235217 China 2012) et en Italie en 2012

Les virus isolés pour l'année 2013 forment également un cluster unique (B) pour les échantillons (031, 037, 040, 043, 047, 048, 050, 051, 054, 055, 059, 062, 064, 065 et 067). L'échantillon 030 de l'année 2013 est isolé sur une branche mineure. Ceci témoigne d'une légère variabilité parmi les échantillons ayant circulé en 2013.

V. CONCLUSIONS-PERSPECTIVES

De nombreux paramètres (pollution, eutrophisation, surexploitation, dérèglements climatiques, salinisation, accessibilité, poussées démographiques, agriculture intensive, catastrophes naturelles etc.) sont responsables d'une raréfaction croissante des ressources en eau de qualité. La réutilisation des eaux usées épurées constitue un bon palliatif pour combler les déficits hydriques comme démontré par de nombreuses études scientifiques qui démontrent qu'un traitement efficace des eaux usées permet de les rendre tout à fait conformes aux normes relatives aux eaux d'irrigation. Toutefois, ce recyclage comporte le risque de contribuer à la transmission des maladies associées aux excréta.

les zones littorales sont soumises à de nombreuses pressions dues aux activités humaines et un des risques majeurs à maîtriser est le risque microbiologique lié à la pollution par les micro-organismes (bactéries, virus, protozoaires, helminthes, champignons, efflorescences planctoniques, etc.) dont certains sont pathogènes et responsables d'infections bénignes (gastro-entérite, parasitoses, etc.) , comme de maladies mortelles (choléra, typhoïde, etc.).

Les virus entériques, responsables de gastroentérites aiguës (GEA) et d'hépatites, sont excrétés en grande quantité et durant de longues périodes par les malades, entraînant une forte contamination des eaux usées urbaines notamment en période hivernale. Ils sont très résistants dans le milieu extérieur et peuvent persister aux traitements dans les stations d'épuration et ensuite être retrouvés dans les eaux de surface, les eaux littorales ou les aliments. La détection des virus entériques dans les eaux usées reflètent leur circulation actuelle au sein de la communauté.

Il existe très peu de données sur les virus dans les milieux hydriques en Afrique subsaharienne; et encore moins pour les virus entériques. La recherche des virus dans les eaux usées présente un intérêt épidémiologique d'importance majeure car elle permet d'estimer la distribution, les mécanismes de résistance et de transmission ainsi que la dynamique de circulation des agents viraux excrétés par les populations. Elle permet de manière prospective ou rétrospective de détecter précocement les épidémies et vient en appui à la surveillance épidémiologique basée sur la détection et la notification des cas.

Les virus Aichi sont des agents microbiologiques émergents associés aux gastro-entérites aiguës non bactériennes transmises par voie féco-orale. La séroprévalence du virus Aichi dans la population humaine dans le monde entier est élevée. Dans certaines études, jusqu'à 95% des

personnes de 30-40 ans ont des anticorps contre le virus Aichi, indiquant un taux élevé d'exposition au virus (Reuter et al.,2011). Ces fortes séroprévalences contrastent avec les faibles incidences notées dans les échantillons cliniques. Une meilleure compréhension de l'épidémiologie et de la physiopathologie des virus Aichi nécessitent la génération de plus de données. La surveillance environnementale des virus entériques permet d'obtenir des informations sur la circulation éventuelle de virus Aichi dans la population humaine au Sénégal, ainsi que leurs dynamiques évolutives.

Notre étude est la première effectuée en Afrique Sub Saharienne sur le virus Aichi dans l'environnement. Nous avons testé des échantillons d'eau prélevés dans la région de Dakar sur une période de 5 mois en 2012 et 2013 ; La forte prévalence trouvée dans notre étude suggère une circulation de AiV au sein de la communauté en période sèche. D'autres études seront cependant nécessaires pour donner une signification clinique à ces résultats. Les charges de morbidité et de mortalité associées à la présence du virus devront être évaluées dans le cadre d'une surveillance sentinelle au sein de la population pédiatrique surtout. Des enquêtes de séroprévalence dans la population générale pourraient confirmer le caractère endémique ou non des gastro-entérites aiguës liées au virus Aichi. Tous les virus caractérisés dans notre étude appartiennent au génotype B. Une observation sur des périodes plus étendues devraient permettre d'avoir plus d'information sur les génotypes circulant en Afrique en général et au Sénégal en particulier ainsi que sur l'évolution génétique des virus Aichi.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

A

Adams, M.J.; King, A.M.Q.; Carstens, E.B. **(2013)** Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses **(2013)**. Arch. Virol. **2013**, 158, 2023–2030.

Albertsson, P.A. (1958). Particle fractionation in liquid two-phase systems. The composition of some phase systems and the behavior of some model particles in their application to the isolation of cell walls from microorganisms. Biochim. Biophys. Acta, 27, 378-395.

Albert, M., Vannesson C. and Schwartzbrod L. **(1995).** Recovery of somatic coliphages in shellfish. Wat. Sci. Tech., 31, 453-465.

Ambert-Balay K., M. Lorrot, F. Bon, et coll., **(2008)** Prevalence and Genetic Diversity of Aichi Virus Strains in Stool Samples from Community and Hospitalized Patients. Journal of Clinical Microbiology, Apr. 2008, p. 1252–1258.

Ana Alcalá, Esmeralda V., J. Rodríguez-Díaz, José L. Z., et coll., **(2010).** Molecular Detection and Characterization of Aichi Viruses in Sewage-Polluted Waters of Venezuela. Appl. Environ. Microbiol. 2010, 76(12):4113.

B

Benabbes L., Ollivier, J., Schaeffer J., et coll., **(2013).** Norovirus and other human enteric viruses in moroccan shellfish. Food Environ. Virol. 2013, 5, 35–40.

Betancourt W.Q., Kitajima, M., Wing, A.D., et coll., **(2014)** Assessment of virus removal by managed aquifer recharge at three full-scale operations. J. Environ. Sci. Heal. Part A 49, 1685–1692

C

Clasen T., Schmidt W.P., Rabie T., Roberts I., Cairncross S., **(2007).** Interventions to improve water quality for preventing diarrhoea: systematic review and meta-analysis. BMJ. 2007; 334:782.

Cliver D. O. (1984) Significance of water and the environment in the transmission of virus disease in enteric viruses in water, Melnick J. L., Monog. Virol. 15, 30-42.

Cyril C Y, Kin-Land Lo, Tak-Lun Que, et coll.,(2014).Epidemiology of human parechovirus, Aichi virus and salivirus in fecal samples from hospitalized children with gastroenteritis in Hong Kong. Virology Journal 2014, 11:182

D

Dahling D.R., Saffermann R. S. And Wright B. A. (1989) Isolation of enterovirus and reovirus from sewage and treated effluents in selected Puerto Rican communities. Appl. Environ. Microbiol. 55, 503-506.

Di Martino Barbara,Federica Di Profio ,Chiara Ceci, et coll.,(2013). Molecular detection of Aichi virus in raw sewage in Italy. Arch Virol (2013) 158:2001–2005

Drexler J. F., Sigrid Baumgarte, Luciano Kleber de Souza Luna, et coll., Aichi Virus Shedding in High Concentrations in Patients with Acute Diarrhea. Emerg. Infect. Dis Vol. 17, No. 8, **August 2011** DOI: 10.3201/eid1708.101556.

G

Goyer M, Aho L-S, Bour J-B, et coll., (2010). Seroprevalence distribution of Aichi virus among a French population in 2006– 2007. Archives of Virology 2010; 153: 1171–1174.

H

Hansman G.S.; Oka, T.; Li, T.-C.; Nishio, O.; Noda, M.; Takeda, N.(2008). Detection of human Enteric viruses in Japanese clams. J. Food Prot. 2008, 71, 1689–1695.

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

Hello S.L., Harrois D., Bouchrif B., et coll., (2013). Highly drug-resistant Salmonella enterica serotype Kentucky ST198-X1: a microbiological study. Lancet.Infect.Dis. (2013) 13(8):672-9.

Hovi T., Shulman LM, van der Avoort H, Deshpande J, Roivainen M and DE Gourville EM.(2012). Role of environmental poliovirus surveillance in global polio eradication and beyond. Epidemiol Infect. 2012 Jan; 140(1):1-13.

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.
- King, A.M.Q.,** F. Brown, P. Christian, et coll., (1999). Picornaviridae, p. 996. In M. H. V. van Regenmortel, C. M. Fauquet, et coll., (ed.), Virus taxonomy: seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Academic Press, New York, N.Y.
- Kitajima M.,** Eiji Haramoto, Chanetta Phanuwan and Hiroyuki Katayama (2011). Prevalence and Genetic Diversity of Aichi Viruses in Wastewater and River Water in Japan. Appl.Environ.Microbiol. 2011, 77(6):2184. DOI: 10.1128/AEM.02328-10. Published Ahead of Print 21 January 2011.
- Kitajima, M.;** Hata, A.; Yamashita, T.; Haramoto, E.; Minagawa, H.; Katayama, H. (2013) Development of a reverse transcription-quantitative PCR system for detection and genotyping of Aichi viruses in clinical and environmental samples. Appl. Environ. Microbiol. 2013, 79, 3952–3958.
- Kitajima M.** and Charles P. Gerba.(2015) Aichi Virus 1: Environmental Occurrence and Behavior Pathogens 2015, 4, 256-268; doi:10.3390/pathogens4020256
- Kotloff K.L.,** Nataro J.P., Blackwelder W.C., et coll.,(2013). Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): A prospective, case-control study. Lancet. 2013;382:209–222.

L

- Larkin MA,** Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG. (2007). "Clustal W and Clustal X version 2.0." Bioinformatics, 23, 2947-2948.
- Le Guyader F.S. ,** le Saux J.-C.; Ambert-Balay K., et coll., Aichi virus, norovirus, astrovirus, enterovirus, and rotavirus involved in clinical cases from a French oyster-related gastroenteritis outbreak. J. Clin. Microbiol. 2008, 46, 4011–4017.

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

Li, L., Victoria, J.G., Wang, C., Jones, M., Fellers, G.M., Kunz, T.H. and Delwart, E. (2010). Bat guano virome: predominance of dietary viruses from insects and plants plus novel mammalian viruses. *J. Virol.* 84: 6955–6965 [Epub 2010 May 12].

Lodder W.J. , de Roda Husman AM. Presence of noroviruses and other enteric viruses in sewage and surface waters in the Netherlands. Appl Environ Microbiol. **2005**;71:1453–61. [org/10.1128/AEM.71.3.1453-1461.2005](https://doi.org/10.1128/AEM.71.3.1453-1461.2005)

Lodder W.J. , A. M. Buisman, S. A. Rutjes, J. C. Heijne, P. F. Teunis and A. M. de Roda Husman. Feasibility of Quantitative Environmental Surveillance in Poliovirus Eradication Strategies. Appl. Environ. Microbiol. **2012**, 78(11):3800. DOI: 10.1128/AEM.07972-11.

Lodder W.J. , Saskia A. Rutjes, Katsuhisa Takumi, and Ana Maria de Roda Husman. Aichi Virus in Sewage and Surface Water, the Netherlands. *Emerg. Infect. Dis* Vol. 19, No. 8, **August 2013**

Lippy E.C. And Waltrip S.C. (1984) Waterborne disease outbreaks 1946-1980: a thirty five year perspective. J. Am. Water works Assoc. 60-67.

Liu L., Johnson H.L., Cousens S., et coll., (2012). Child Health Epidemiology Reference Group of WHO and UNICEF. Global, regional, and national causes of child mortality: an updated systematic analysis for 2010 with time trends since 2000. Lancet 2012; 379:2151–61.

M

Mahy B. The dictionary of virology, 4th edition. London: Elsevier; 2009; Pringle CR. Virus taxonomy at the XIth International Congress of Virology, Sydney, Australia, 1999. *Arch Virol* 1999; 144:2066–70.

O

Oh, D.-Y., Silva, P. A., Hauroeder, B., Diedrich, S.,, Cardoso, D. D. P.; Schreier, E. Molecular

Characterization of the first Aichi viruses isolated in Europe and in South America. Archives of Virology **2006**; 151: 1199–1206

P

Parashar U.D., Bresee J.S.; Glass R.I. **(2003)**. The global burden of diarrhoeal disease in children. Bull World Health Organ vol.81 n.4 Geneva Jan. 2003

Parashar U.D., Hummelman E.G., Bresee J.S., Miller M.A., Glass R.I. **(2003)**. Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. Emerg. Infect. Dis. 2003;9:565–572.

Parashar U.D., Gibson C.J., Bresee J.S., Glass R.I. **(2006)**. Rotavirus and severe childhood diarrhea. Emerg. Infect. Dis. 2006; 12:304–306.

Pham T.G Trinh QD, Nguyen TA, Dey SK et coll., **(2009)** Development of genotype-specific primers for differentiation of genotypes A and B of Aichi viruses. J Virol Methods. 2009 Mar;156(1-2):107-10

Pham T.G., Kapusinszky, B., Wang, C., Rose, R.K., et coll., **(2011)**. The fecal viral flora of wild rodents. PLoS Pathog. 2011, 7, e1002218

R

Reuter, G., Boldizsár, Á., Kiss, I. and Pankovics, P. **(2008)**. Candidate new species of kobuvirus in porcine hosts [letter]. Emerg. Infect. Dis. 14: 1968-1970.

Reuter G, Boldizsár Á, Pankovics P., **(2009)**. Complete nucleotide and amino acid sequences and genetic organization of porcine kobuvirus, a member of a new species in genus Kobuvirus, family Picornaviridae. Arch Virol. 2009;154:101–8..

Reuter, G., Boldizsár, A.; Papp, G.; Pankovics, P. **(2009)** Detection of Aichi virus shedding in a child with enteric and extraintestinal symptoms in Hungary. Arch. Virol. 2009, 154, 1529–1532.

Reuter G., Sándor Kecskeméti, and Péter Pankovics **(2010)**. Evolution of Porcine Kobuvirus Infection, Hungary. Emerging Infectious Diseases . Vol. 16, No. 4, April 2010.

Reuter G., Boros A, Pankovics P. Kobuviruses—a comprehensive review **(2011)**.. Rev Med Virol. 2011;21:32–41.

Ribes J.M., Montava, R., Téllez-Castillo C.J., Fernández-Jiménez M., Buesa J., **(2010)**. Seroprevalence of Aichi Virus in a Spanish Population from 2007 to 2008. Clin. Vaccine Immunol. 2010, 17,545–549.

S

Saitou, N., and Nei, M. **(1987)**, The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees , Mol. Biol. Evol., 4(4):406-425.

Sandy C., Dominic O., Anne Mc C., Dinesh S. **(2003)** La santé, l'environnement et le fardeau des maladies. Traduit en Français en Juin 2004. Department for International Development (DFID), 60 p.

Sasaki J, Kusuhara Y, Maeno Y, et coll., Construction of an infectious cDNA clone of Aichi virus (a new member of the family Picornaviridae) and mutational analysis of a stem-loop structure at the 5' end of the genome. Journal of Virology 2001; 75: 8021– 8030.

Sasaki J., S. Nagashima , Koki Taniguchi **(2003)** Aichi Virus Leader Protein Is Involved in Viral RNA Replication and Encapsidation. J. Virol. 2003, 77(20):10799.

Schwartzbrod L. (1991) Virologie des milieux hydriques. Tec δ Doc Lavoisier. 304 p.

Schwartzbrod L. (2000). Virus humains et sante publique: conséquences de l'utilisation des eaux usées et des boues en agriculture et conchyliculture. OMS (2000).

Sdiri-Loulizi K., M Hassine, Z. Aouni , et coll., **(2010)**. First molecular detection of Aichi virus in sewage and shellfish samples in the Monastir region of Tunisia. Arch Virol (2010) 155:1509–1513

Sdiri-Loulizi K, M. Hassine, Jean-Baptiste Bour, et coll., **(2010)**.. Aichi Virus IgG Seroprevalence in Tunisia Parallels Genomic Detection and Clinical Presentation in Children with Gastroenteritis. Clinical and Vaccine immunology, july 2010, p. 1111–1116 1556-

Studier,J.A. and Keppler,K.J. **(1988)** A note on the neighbor-joining algorithm of Saitou and Nei. Mol. Biol. Evol.,5 , 729–731

T

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, and Kumar S (2011) "MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods." **Molecular Biology and Evolution** 28: 2731-2739.

V

Vilarino M.L.; le Guyader, F.S.; Polo, D.; Schaeffer, J.; Kröl, J.; Romalde, J.L **(2009)**. Assessment of human enteric viruses in cultured and wild bivalve molluscs. Int. Microbiol. 2009, 12, 145–151.

W

Walker C.L., Rudan I., Liu L., Nair H., Theodoratou E., Bhutta Z.A., et coll.,**(2013)**. **Global burden of childhood pneumonia and diarrhea.** Lancet. 2013; **381**:1405-16

X

Xiaohong Han, Wen Zhang, Yanjun Xue and Shihe Shao **(2011)**. Sequence analysis reveals mosaic genome of Aichi virus. Virology Journal 2011, 8:390

Y

Yamashita T., Kobayashi S., Sakae K, Nakata S., Chiba S., Ishihara Y., Isomura S. **(1991)** Isolation of cytopathic small round viruses with BS-C-1 cells from patients with gastroenteritis. J Infect Dis 164(5):954–957.

Yamashita T, K Sakae, Y Ishihara, S Isomura and E Utagawa **(1993)**. Prevalence of newly isolated, cytopathic small round virus (Aichi strain) in Japan. J. Clin. Microbiol. 1993, 31(11):2938.

Yamashita T., Sakae K, Tsuzuki H, et coll.,**(1998)** Complete nucleotide sequence and genetic organization of Aichi virus, a distinct member of the Picornaviridae associated with acute gastroenteritis in humans. J Virol 72(10):8408–8412

Yamashita T, M. Sugiyama, H. Tsuzuki, K. Sakae, Y. Suzuki and Y. Miyazaki (2000). Application of a Reverse Transcription-PCR for Identification and Differentiation of Aichi Virus, a New Member of the Picornavirus Family Associated with Gastroenteritis in Humans. J. Clin. Microbiol. 2000, 38(8):2955.

Yang S., Zhang W, Shen Q, Yang Z, Zhu J, Cui L, et coll., Aichi virus strains in children with gastroenteritis China. Emerg Infect Dis. 2009; 15:1703–5.

Yu, J.-M., Jin, M., Zhang, Q., Li, H.-Yet coll., (2009). Candidate porcine kobuvirus, China. Emerg. Infect. Dis. 15: 823-825

Yu, J.-M., Xu, Z.-Q., Li, B.W., Zhang, Q., Cui, S.-X., Jin, M. and Duan, Z.-J. (2011). Analysis and characterization of the complete genome of a member of a new species of kobuvirus associated with swine. Arch Virol. 156: 747-751. 2011 Jan 28.

RESSOURCES INTERNET

Picornaviridae [en ligne] (page consultée le 26/10/2015) Disponible sur:

<http://www.microbes-edu.org>

Kobuvirus [en ligne] (page consultée le 26/10/2015) Disponible sur:

<http://www.picornaviridae.comedu.org>

Kobuvirus [en ligne] (page consultée le 26/10/2015) Disponible sur:

<http://www.picornaviridae.com/kobuvirus/kobuvirus.htm>.

Kobuvirus [en ligne] (page consultée le 26/10/2015) Disponible sur:

http://viralzone.expasy.org/viralzone/all_by_species/652.html

Le virus Aichi (AiV) [en ligne] (page consultée le 20/01/2015). Disponible sur:

<http://www.microbes-edu.org/etudiant/picor/picorAiV.html>

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^{ère} utilisation, ajouter la quantité appropriée d'éthanol (96 à 100%) selon les indications mentionnées sur le flacon ou dans le tableau ci-dessous :

Référence	Conditionnement	AW1 concentré	Ethanol	Volume final
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^{ère} utilisation, ajouter la quantité appropriée d'éthanol (96 à 100%) selon les indications mentionnées sur le flacon ou dans le tableau ci-dessous :

Référence	Conditionnement	AW1 concentré	Ethanol	Volume final
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 incuber 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 béccher 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 gélatineux, de type acrylamide, agarose, ou semi solide de type capillaire. L'agarose qui est un polysaccharide extrait d'une algue, la Rhodophycea, 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 pailasse 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 (Eliminer 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 dilut°
 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 μ 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 μ 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 μ 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 μ M** dans le cadre de notre étude pour les amorces **JV12 et JV 13** (Amplification du gène codant, on fera des dilutions au 1/5).
- Prévoir un volume de 500 μ 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

Résumé

Contexte

Les gastroentérites sont des maladies communes et ubiquitaires. Elles sont responsables d'une morbidité et d'une mortalité élevées chez les jeunes enfants surtout dans les pays en développement et sont le plus souvent d'origine virale. Les rotavirus, calicivirus, adénovirus et astrovirus sont reconnus comme étant les principaux agents étiologiques de ces maladies cliniques. Néanmoins, dans de nombreux cas de gastro-entérites non bactériennes, aucun agent étiologique n'est diagnostiqué, et il a été émis l'hypothèse que d'autres agents viraux puissent être impliqués (torovirus, picobirnavirus, parechovirus, picornavirus, etc.) Parmi ceux-ci, le virus Aichi (AIV) a d'abord été reconnu en 1989 comme étant la cause probable de gastro-entérite associée à la consommation d'huîtres au Japon. Ce virus est un nouveau membre de la famille des Picornaviridae et est classé dans un nouveau genre, Kobuvirus. Ce sont des virus transmissibles par voie féco-orale comme attesté par la détection du virus dans les eaux usées (Tunisie, Japon, Hollande Italie, etc.) et celles de surface (Venezuela, Japon, etc.) avec une prévalence élevée dans l'environnement. Les données concernant la circulation en Afrique et son impact en santé publique sont rares voire inexistantes surtout pour sa partie Sub Saharienne. L'objectif principal de notre étude est d'évaluer la prévalence et les génotypes des virus Aichi (AiV) circulant dans l'environnement à partir des eaux usées sur la période 2012-2013 en zone urbaine dakaroise.

Méthodes

66 échantillons d'eaux usées ont été collectés au niveau de la station d'épuration de Cambéréne dans la région de Dakar entre le 14 novembre 2012 et le 13 mars 2013. Après concentration au laboratoire par une méthode biphasique utilisant le Polyéthylène Glycol 6000 (PEG) et le Dextran 40, nous avons recherché la présence du virus Aichi dans les concentrats en amplifiant la région génomique non structurale 3CD. Nous avons ensuite effectué un séquençage partiel pour déterminer les génotypes correspondants aux virus détectés.

Résultats

Le virus Aichi a été détecté dans **65%** des échantillons collectés (**43/66**). Les souches détectées et ayant circulé au Sénégal entre 2012 et 2013 appartiennent tous au génotype B.

Conclusions-Perspectives

Notre étude atteste de la circulation du virus Aichi dans l'environnement avec un risque de transmission par l'intermédiaire d'eaux usées non ou insuffisamment traitées. Elle constitue par ailleurs une preuve indirecte de la circulation du virus dans la population générale. Des enquêtes de séroprévalence et de suivi de cohorte permettront d'avoir une estimation plus précise des charges de morbidité et de mortalité associées aux gastro-entérites dues au virus Aichi

Les données sur le virus Aichi sont limitées en Afrique; nos résultats contribuent à une meilleure connaissance de l'épidémiologie moléculaire des virus Aichi.

Mots clés : Virus Aichi humains –Station d'épuration – Eaux usées– Dakar