



UNIVERSITÉ DE BOURGOGNE
UFR DES SCIENCES DE SANTÉ
CIRCONSCRIPTION PHARMACIE



N° de thèse : 119

MÉMOIRE
DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES DE
BIOLOGIE MÉDICALE

Tenant lieu de Thèse pour l'obtention du Diplôme d'État de Docteur en Pharmacie
soutenu publiquement le 30 novembre 2020

par

AUFFRET Nicolas

né le 28 avril 1993 à Gien (Loiret)

**DÉTERMINATION DES SÉROPRÉVALENCES DE BUFAVIRUS
ET TUSAVIRUS, DEUX NOUVEAUX *PROTOPARVOVIRUS*, EN
BOURGOGNE**

JURY : **M. le Professeur François GIRODON** **(Président)**
 M. le Professeur Alexis de ROUGEMONT **(Directeur)**
 M. le Docteur Gaël BELLIOU
 M. le Docteur Jean-Baptiste BOUR



UNIVERSITÉ DE BOURGOGNE
UFR DES SCIENCES DE SANTÉ
CIRCONSCRIPTION PHARMACIE



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à la disposition de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur.

Ceci implique une obligation de citation et de référencement dans la rédaction de vos travaux.

D'autre part, toutes contrefaçons, plagiat, reproductions illicites encourrent une poursuite pénale.

De juridiction constante, en s'appropriant tout ou partie d'une œuvre pour l'intégrer dans son propre document, l'étudiant se rend coupable d'un délit de contrefaçon (au sens de l'article L.335.1 et suivants du code de la propriété intellectuelle). Ce délit est dès lors constitutif d'une fraude pouvant donner lieu à des poursuites pénales conformément à la loi du 23 décembre 1901 dite de répression des fraudes dans les examens et concours publics.



UNIVERSITÉ DE BOURGOGNE
UFR DES SCIENCES DE SANTÉ
CIRCONSCRIPTION PHARMACIE



N° de thèse : 119

MÉMOIRE
DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES DE
BIOLOGIE MÉDICALE

Tenant lieu de Thèse pour l'obtention du Diplôme d'État de Docteur en Pharmacie
soutenu publiquement le 30 novembre 2020

par

AUFFRET Nicolas

né le 28 avril 1993 à Gien (Loiret)

**DÉTERMINATION DES SÉROPRÉVALENCES DE BUFAVIRUS
ET TUSAVIRUS, DEUX NOUVEAUX *PROTOPARVOVIRUS*, EN
BOURGOGNE**

JURY : **M. le Professeur François GIRODON** **(Président)**
 M. le Professeur Alexis de ROUGEMONT **(Directeur)**
 M. le Docteur Gaël BELLIOU
 M. le Docteur Jean-Baptiste BOUR

Vice – Doyen : Mme Christine MARIE

Professeurs

ARTUR Yves
CHAMBIN Odile
GROS Claude
HEYDEL Jean-Marie
LESNIEWSKA Eric
MARIE Christine
OFFER Anne-Claire
TESSIER Anne
VERGELY-VANDRIESSE Catherine

Biochimie générale et clinique
Pharmacotechnie
Chimie organique
Biochimie, biologie moléculaire
Biophysique
Physiologie
Pharmacognosie
Physiologie
Physiopathologie, génétique

PU-PH

BOULIN Mathieu
KOHLI Evelyne
GIRODON François

Pharmacie clinique
Immunologie, Virologie
Hématologie

Professeurs Emérites

ROCHETTE Luc
BELON Jean-Paul
LACAILLE-DUBOIS Marie-Aleth

Physiologie
Pharmacologie
Pharmacognosie

Maîtres de Conférences

ANDRES Cyrille
ASSIFAOUÏ Ali
BASSET Christelle
BERARD Véronique
BOUYER Florence
BOUYER Frédéric
CACHIA Claire
COLLIN Bertrand
DESBOIS Nicolas
FAURE Philippe
GUELDRY Serge
GUERRIAUD Matthieu
LEMAITRE Jean-Paul
NEIERS Fabrice
ROCHELET Murielle
SEGUY Nathalie
VIENNEY Fabienne
WENDREMAIRE Maëva

Pharmacotechnie
Pharmacotechnie
Immunologie, hématologie
Pharmacotechnie
Pharmacologie
Chimie physique, Chimie générale
Biomathématiques
Pharmaco-imagerie, radiopharmacie
Chimie organique
Biochimie générale et clinique
Biologie cellulaire
Droit pharmaceutique
Bactériologie
Biochimie, biologie moléculaire, enzymologie
Chimie analytique
Mycologie médicale, botanique
Biophysique
Toxicologie

MCU-PH

FAGNONI Philippe
LIRUSSI Frédéric
SAUTOUR Marc
SCHMITT Antonin

Pharmacie clinique
Toxicologie, toxicovigilance
Biodiversité végétale et fongique
Pharmacologie, Pharmacie clinique

PRCE

ROUXEL Virginie

Anglais

PAST

BERNARD Dominique-Alain
CADOT Rachel
CRANSAC Amélie

ATER

BARBIER Elodie
BRUGUIERE Antoine

Chimie analytique
Pharmacognosie



UNIVERSITÉ DE BOURGOGNE
UFR DES SCIENCES DE SANTÉ
CIRCONSCRIPTION PHARMACIE



L'UFR des Sciences de Santé - Circonscription Pharmacie de Dijon déclare que les opinions émises dans les thèses qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs, et qu'elle entend ne leur donner ni approbation, ni improbation.



UNIVERSITÉ DE BOURGOGNE
UFR DES SCIENCES DE SANTÉ
CIRCONSCRIPTION PHARMACIE



SERMENT

En présence des Maîtres de la Faculté, des Conseillers de l'Ordre des Pharmaciens et de mes condisciples, je jure :

D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.

REMERCIEMENTS

Aux membres du jury :

Je tiens à remercier le Professeur Alexis de Rougemont pour avoir accepté de me confier ce travail, d'avoir trouvé le temps de le diriger et de l'encadrer malgré les circonstances très particulières auxquelles le laboratoire de Virologie a dû faire face cette année. J'ai pu, grâce à vous, m'investir dans un sujet intéressant, enrichissant, et source de nombreux apprentissages. Votre expertise et votre aide dans toutes les étapes de ce travail m'ont été très précieuses.

Je tiens également à remercier le Professeur François Girodon pour avoir accepté de présider ce jury et de juger ce travail. Soyez aussi chaleureusement remercié pour votre disponibilité, votre écoute et votre bienveillance à l'égard des internes qui ont la chance de vous rencontrer.

J'adresse tous mes remerciements au Docteur Gaël Belliot pour son investissement à mes côtés et sa contribution à l'aboutissement de cette thèse, ainsi que pour les réponses aux nombreuses questions que j'ai pu lui poser. Vos idées et vos suggestions très pertinentes m'ont permis d'enrichir et d'approfondir ce travail.

Je veux enfin exprimer au Docteur Jean-Baptiste Bour toute ma reconnaissance pour son savoir, son expertise virologique et sérologique, mais aussi pour ses conseils dans la conduite de ces travaux. Merci pour votre gentillesse, votre bonne humeur et pour l'opportunité d'apprentissage que constitue chaque discussion avec vous.

À l'ensemble du personnel du laboratoire de virologie du CHU de Dijon, merci de m'avoir accueilli parmi vous pendant les quelques semaines qui ont été nécessaires à la réalisation de ces travaux. Je remercie tout particulièrement Marie Estienney pour son aide, pour ses explications et son expertise technique, ainsi que pour sa participation aux près de 650 lavages de plaques ELISA.

Je remercie l'ensemble des équipes des laboratoires dans lesquels j'ai eu la chance d'effectuer mes stages, à la fois ceux du CHU de Dijon, du Centre Georges François Leclerc et du Centre Hospitalier de l'Agglomération de Nevers. Merci pour votre accueil chaleureux et pour vos précieux enseignements.

À ma famille et à mes amis, qui n'auront malheureusement pas pu assister à la soutenance de cette thèse, mais que je remercie vivement pour leurs encouragements tout au long de mes études.

À l'ensemble des internes avec qui j'ai partagé mes aventures dijonnaises et nivernaises et qui les ont rendues si agréables, je ne saurais vous remercier assez. Si d'aucuns ont prétendu avec péremption que « c'est pas la kermesse ici », force est de constater que l'ambiance s'en est parfois dangereusement approchée. J'ai pu nouer de belles amitiés, et faire vivre le fameux dialogue clinico-biologique avec passion, belote et week-ends jurassiens ! « Tracer, dater, signer, et engager ma responsabilité », voilà à quoi devrait ressembler la suite...

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES TABLEAUX	9
TABLE DES FIGURES	10
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	14
A. INTRODUCTION	16
I - GÉNÉRALITÉS SUR LES GASTRO-ENTÉRITES AIGUËS.....	16
a) DÉFINITIONS.....	16
b) PHYSIOPATHOLOGIE.....	17
c) ÉPIDÉMIOLOGIE MONDIALE.....	18
d) ÉPIDÉMIOLOGIE FRANÇAISE.....	18
e) INÉGALITÉS GÉOGRAPHIQUES ET ÉCONOMIQUES.....	20
f) ÉVOLUTION TEMPORELLE.....	20
g) TRAITEMENT DES GASTRO-ENTÉRITES AIGUËS.....	21
h) PRÉVENTION DES GASTRO-ENTÉRITES AIGUËS.....	22
i) AGENTS PATHOGÈNES.....	23
II - BUFAVIRUS ET TUSAVIRUS, DEUX NOUVEAUX <i>PROTOPARVOVIRUS</i>	25
a) CIRCONSTANCES DE DÉCOUVERTE.....	25
b) CARACTÉRISTIQUES DES <i>PARVOVIRIDAE</i>	27
c) BUFAVIRUS.....	29
1) GÉNOME ET STRUCTURE DE BUFAVIRUS.....	29
2) ÉTUDES MOLÉCULAIRES SUR BUFAVIRUS.....	30
3) ÉTUDES SÉROLOGIQUES SUR BUFAVIRUS.....	33
d) TUSAVIRUS.....	35
1) GÉNOME ET STRUCTURE DE TUSAVIRUS.....	35
2) ÉTUDES MOLÉCULAIRES SUR TUSAVIRUS.....	36
3) ÉTUDES SÉROLOGIQUES SUR TUSAVIRUS.....	37
III - OBJECTIFS DE L'ÉTUDE.....	37
B. MATÉRIELS ET MÉTHODES	39
I - PRINCIPE GÉNÉRAL DE L'ÉTUDE DE SÉROPRÉVALENCE RÉALISÉE.....	39
II - POPULATION D'ÉTUDE.....	39
III - PRODUCTION DE PSEUDO-PARTICULES VIRALES DE BUFAVIRUS ET DE TUSAVIRUS	40

a) TYPE DE PROTÉINES PRODUITES.....	40
b) PRINCIPE GÉNÉRAL DU SYSTÈME BACULOVIRUS-CELLULES D'INSECTE.....	41
c) PRODUCTION DES BACULOVIRUS RECOMBINANTS.....	43
d) PRODUCTION DES PROTÉINES VP2 RECOMBINANTES SUR CELLULES Hi5.....	45
IV - RÉALISATION DES TESTS ELISA.....	49
a) PRINCIPE GÉNÉRAL DES TESTS ELISA.....	49
b) PROTOCOLE RETENU POUR LA RÉALISATION DES TESTS ELISA INDIRECTS.....	50
V - DÉTERMINATION DE LA LIAISON DES VLP DE BUFAVIRUS AUX ANTIGÈNES TISSULAIRES DE GROUPE SANGUIN.....	57
a) PRINCIPE GÉNÉRAL.....	57
b) ORIGINE ET PRÉPARATION DES HBGA.....	57
c) ÉCHANTILLONS DE SÉRUM SÉLECTIONNÉS.....	58
d) PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL RETENU.....	58
C. RÉSULTATS.....	60
I - RÉSULTATS DES TESTS SÉROLOGIQUES.....	60
a) RÉSULTATS BRUTS ET TRAITEMENT STATISTIQUE DES DONNÉES.....	60
b) RÉSULTATS DÉFINITIFS.....	68
1) RÉSULTATS GLOBAUX.....	68
2) RÉSULTATS PAR TRANCHE D'ÂGE.....	70
3) SYNTHÈSE DES RÉSULTATS.....	73
II - DÉTERMINATION DE LA LIAISON DE BUFAVIRUS AUX ANTIGÈNES TISSULAIRES DE GROUPE SANGUIN.....	74
D. DISCUSSION.....	79
I - VALIDITÉ DES RÉSULTATS OBTENUS.....	79
a) CONTRAINTES ET DIFFICULTÉS RENCONTRÉES.....	79
d) CAS DES ÉCHANTILLONS HYPER-RÉACTIFS VIS-À-VIS DU LYSAT CELLULAIRE TÉMOIN (WT).....	81
II - DISCUSSION DES RÉSULTATS DE SÉROPRÉVALENCE.....	82
III - DISCUSSION DES RÉSULTATS DE LA DÉTERMINATION DE LA LIAISON DE BUFAVIRUS AUX HBGA.....	85
CONCLUSIONS.....	86
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	87
ANNEXES : Résultats bruts.....	91

TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Résumé des principales caractéristiques virologiques de bufavirus et de tusavirus.....	27
Tableau 2 : Synthèse des études moléculaires sur bufavirus.....	32
Tableau 3 : Synthèse des études sérologiques sur bufavirus.....	35
Tableau 4 : Synthèse des études sérologiques sur tusavirus.....	37
Tableau 5 : Répartition des effectifs de la population d'étude par tranche d'âge.....	40
Tableau 6 : Exemples de DO mesurées pour quelques échantillons avec une forte réactivité vis-à-vis du lysat cellulaire témoin.....	63
Tableau 7 : Résultats de séroprévalence de bufavirus.....	69
Tableau 8 : Résultats de séroprévalence de tusavirus (entre parenthèses et en italique sont indiqués les pourcentages correspondants).....	70
Tableau 9 : Séroprévalences globales de bufavirus et de tusavirus avec intervalles de confiance..	73
Tableau 10 : DO initialement obtenues pour les quatre échantillons sélectionnés vis-à-vis des différents types de VLP et du lysat cellulaire témoin.....	74
Tableau 11 : DO obtenues vis-à-vis des VLP de BuV1, BuV2 et BuV3 après repassage des échantillons sélectionnés.....	75
Tableau 12 : DO obtenues vis-à-vis des VLP de BuV1, BuV2 et BuV3 après incubation des sérums avec un mélange d'échantillons salivaires.....	75

TABLE DES FIGURES

Figure 1 : Représentation des mécanismes physiopathologiques impliqués dans les gastro-entérites aiguës causées par le rotavirus d'après de Rougemont et Pothier, EMC 2010.....	17
Figure 2 : Taux d'incidence hebdomadaire des consultations médicales pour gastro-entérite aiguë en France en fonction du temps (entre 1991 et 2019), d'après le bilan annuel de 2019 du réseau Sentinelles.....	19
Figure 3 : Arbre décisionnel de traitement des gastro-entérites chez l'enfant.....	22
Figure 4 : Modes de transmission des virus de gastro-entérites chez l'Homme.....	23
Figure 5 : Images en microscopie électronique à balayage des principaux virus responsables de gastro-entérites aiguës chez l'Homme.....	24
Figure 6 : Arbre phylogénétique des sous-familles et genres de la famille Parvoviridae, d'après Cotmore et coll. (50).....	26
Figure 7 : Présentation schématique du génome de quelques virus de la famille Parvoviridae, d'après Cotmore et Tattersall (51).....	28
Figure 8 : Représentation du génome de bufavirus, du mécanisme d'épissage de l'ARNm de la protéine VP1, et des motifs phospholipase A2 (PLA2) de la protéine VP1.....	29
Figure 9 : Structure des capsides des trois génotypes de bufavirus, d'après Ilyas et coll.(24).....	30
Figure 10 : Représentation du génome de tusavirus, du mécanisme d'épissage de l'ARNm de la protéine VP1, et des motifs phospholipase A2 (PLA2) de la protéine VP1.....	36
Figure 11 : Photographies de baculovirus observés en microscopie électronique, d'après l'International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV).....	41
Figure 12 : Photographie de structures polyédriques de baculovirus observées en microscopie électronique à transmission, d'après Williams T. (52).....	42
Figure 13 : Photographie de structures polyédriques de baculovirus observées en microscopie électronique à balayage, d'après Chateigner A. (53).....	42
Figure 14 : Schéma du principe de la production de baculovirus recombinant à l'aide du kit Bac to Bac Baculovirus Expression System.....	44
Figure 15 : Électrophorèse des suspensions de VLP recombinantes de BuV1, BuV2, BuV3 et TuV comparées à un norovirus GII.4.....	47
Figure 16 : Photographies des VLP de bufavirus (de génotype 1,2 et 3) et de tusavirus observés en microscopie électronique.....	48

Figure 17 : Schéma illustrant le principe d'un test ELISA indirect.....	50
Figure 18 : DO mesurées pour l'échantillon aléatoire n°1 à différentes dilutions pour 100 ng de VLP de BuV1.....	51
Figure 19 : DO mesurées pour l'échantillon aléatoire n°2 à différentes dilutions pour 100 ng de VLP de BuV1.....	51
Figure 20 : DO mesurées pour l'échantillon aléatoire n°3 à différentes dilutions pour 100 ng de VLP de BuV1.....	51
Figure 21 : DO mesurées pour l'échantillon aléatoire n°4 à différentes dilutions pour 100 ng de VLP de BuV1.....	52
Figure 22 : DO mesurées pour l'échantillon aléatoire n°5 à différentes dilutions pour 100 ng de VLP de BuV1.....	52
Figure 23 : DO mesurées pour l'échantillon aléatoire n°6 à différentes dilutions pour 100 ng de VLP de BuV1.....	52
Figure 24 : DO mesurées pour l'échantillon aléatoire n°7 en fonction de la dilution du lysat cellulaire témoin.....	53
Figure 25 : DO mesurées pour l'échantillon aléatoire n°8 en fonction de la dilution du lysat cellulaire témoin.....	53
Figure 26 : DO mesurées pour l'échantillon aléatoire n°9 en fonction de la dilution du lysat cellulaire témoin.....	54
Figure 27 : DO mesurées pour l'échantillon aléatoire n°10 en fonction de la dilution du lysat cellulaire témoin.....	54
Figure 28 : DO mesurées pour l'échantillon aléatoire n°11 en fonction de la dilution du lysat cellulaire témoin.....	55
Figure 29 : DO mesurées pour l'échantillon aléatoire n°12 en fonction de la dilution du lysat cellulaire témoin.....	55
Figure 30 : Réaction catalysée par l'enzyme HRP, oxydant le substrat TMB en produit coloré.....	57
Figure 31 : Distribution de fréquences des DO mesurées pour le BuV1 pour l'ensemble des échantillons (en abscisse, changement d'échelle à partir de 1 ; la dernière classe correspond aux valeurs >2).....	60
Figure 32 : Distribution de fréquences des DO mesurées pour le BuV2 pour l'ensemble des échantillons (en abscisse, changement d'échelle à partir de 1 ; la dernière classe correspond aux valeurs >2).....	61

Figure 33 : Distribution de fréquences des DO mesurées pour le BuV3 pour l'ensemble des échantillons (en abscisse, changement d'échelle à partir de 1 ; la dernière classe correspond aux valeurs >2).....	61
Figure 34 : Distribution de fréquences des DO mesurées pour le TuV pour l'ensemble des échantillons (en abscisse, changement d'échelle à partir de 1 ; la dernière classe correspond aux valeurs >2).....	62
Figure 35 : Distribution de fréquences des DO mesurées pour le lysat cellulaire témoin pour l'ensemble des échantillons (en abscisse, changement d'échelle à partir de 1 ; la dernière classe correspond aux valeurs >2).....	63
Figure 36 : Distribution de fréquences des rapports BuV1 pour l'ensemble des échantillons (en abscisse, rupture d'échelle à partir de 5 ; la dernière classe correspond aux valeurs >10).....	65
Figure 37 : Distribution de fréquences des rapports BuV2 pour l'ensemble des échantillons (en abscisse, rupture d'échelle à partir de 5 ; la dernière classe correspond aux valeurs >10).....	65
Figure 38 : Distribution de fréquences des rapports BuV3 pour l'ensemble des échantillons (en abscisse, rupture d'échelle à partir de 5 ; la dernière classe correspond aux valeurs >10).....	66
Figure 39 : Distribution de fréquences des rapports TuV pour l'ensemble des échantillons (en abscisse, rupture d'échelle à partir de 5 ; la dernière classe correspond aux valeurs >10).....	66
Figure 40 : Séroprévalence de bufavirus (tous génotypes confondus) en fonction de la tranche d'âge des individus, avec intervalle de confiance à 95 %.....	70
Figure 41 : Séroprévalence du BuV1 en fonction de la tranche d'âge des individus, avec intervalle de confiance à 95 %.....	71
Figure 42 : Séroprévalence du BuV2 en fonction de la tranche d'âge des individus, avec intervalle de confiance à 95 %.....	71
Figure 43 : Séroprévalence du BuV3 en fonction de la tranche d'âge des individus, avec intervalle de confiance à 95 %.....	72
Figure 44 : Séroprévalence du TuV en fonction de la tranche d'âge des individus, avec intervalle de confiance à 95 %.....	73
Figure 45 : DO mesurées pour l'échantillon A5-5 sur différents types salivaires avec ou sans VLP de BuV1.....	77
Figure 46 : DO mesurées pour l'échantillon H1-2 sur différents types salivaires avec ou sans VLP de BuV2.....	77
Figure 47 : DO mesurées pour l'échantillon E1-5 sur différents types salivaires avec ou sans VLP de BuV3.....	78

Figure 48 : DO mesurées pour l'échantillon A10-2 sur différents types salivaires avec ou sans mélange de VLP de BuV.....78

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

AAV : Adeno-associated virus

ADN : Acide désoxyribonucléique

ARNm : Acide ribonucléique messenger

BuV : Bufavirus

BuV1 : Bufavirus de génotype 1

BuV2 : Bufavirus de génotype 2

BuV3 : Bufavirus de génotype 3

CSHPF : Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France

ELISA : Enzyme-linked immunosorbent assay

GEA : Gastro-entérite aiguë

HBGA : Histo-blood group antigens, ou antigènes tissulaires de groupe sanguin

Hi5 : Lignée cellulaire mise en culture issue de l'espèce *Trichoplusia ni*

HRP : Horseradish peroxidase, ou peroxydase de Raifort

HSCP : Haut Conseil de la Santé Publique

IC_{95 %} : Intervalle de confiance à 95 %

ICTV : International Committee on Taxonomy of Viruses

kb : Kilobase

kDa : Kilodalton

OMS : Organisation mondiale de la santé

ONU : Organisation des Nations Unies

ORF : Open reading frame

PCR : Polymerase chain reaction

PLA2 : Phospholipase A2

rpm : Rotations par minute

SDS-PAGE : Électrophorèse sur gel de polyacrylamide avec dodécylsulfate de sodium

Sf9 : Lignée cellulaire mise en culture issue de l'espèce *Spodoptera frugiperda*

SRO : Soluté de réhydratation orale

TIAC : Toxi-infection alimentaire collective

TMB : 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine

TNC : Tampon Tris-NaCl-CaCl₂ de pH 7,2

TuV : Tusavirus

VLP : « Virus-like particle », ou pseudo-particule virale

WT : Wild type, ou lysat cellulaire témoin

A. INTRODUCTION

I - GÉNÉRALITÉS SUR LES GASTRO-ENTÉRITES AIGUËS

a) DÉFINITIONS

Une gastro-entérite aiguë (GEA) désigne une inflammation des muqueuses du système digestif (estomac, intestin grêle, côlon) d'origine infectieuse pouvant entraîner des nausées, des douleurs abdominales diffuses, une diarrhée et des vomissements, seuls ou en association. De la fièvre peut également accompagner ces symptômes, qui régressent la plupart du temps en quelques jours. Les micro-organismes responsables sont multiples et peuvent être des virus, des bactéries ou des parasites.

Une diarrhée est communément définie par l'émission d'au moins trois selles molles ou liquides par jour. On parle de diarrhée aiguë lorsque celle-ci apparaît brutalement et qu'elle évolue depuis moins de deux semaines. Elle est au contraire qualifiée de prolongée lorsque son apparition date de deux à quatre semaines, et de chronique quand elle persiste au-delà d'un mois. Une diarrhée peut être d'origine infectieuse lorsqu'elle est un symptôme d'une gastro-entérite aiguë mais elle peut aussi avoir d'autres causes (maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, antibiothérapie...).

Lorsqu'une diarrhée d'origine infectieuse s'accompagne d'une altération de l'état général, de fièvre, de douleurs abdominales et que les selles émises ont un aspect glaireux, mucopurulent voire glairo-sanglant, on parle de syndrome dysentérique. Celui-ci témoigne d'une infection par des germes entéro-invasifs, tels que la bactérie *Shigella dysenteriae*.

Au contraire, lorsque les selles émises sont profuses et ont un caractère aqueux, avec un aspect en « eau de riz », souvent associées à des vomissements, et qu'elles ne s'accompagnent pas de fièvre, on parle de syndrome cholériforme. Celui-ci est causé par un mécanisme toxinique, et les bactéries telles que *Vibrio cholerae* ou *Staphylococcus aureus* sont des exemples de micro-organismes capables de sécréter de telles toxines.

b) PHYSIOPATHOLOGIE

Les mécanismes physiopathologiques à l'origine des signes digestifs observés dans les gastro-entérites aiguës sont variables. Ainsi, par exemple, le rotavirus, qui est l'agent pathogène le plus fréquemment impliqué dans les gastro-entérites aiguës chez les enfants de moins de cinq ans, entraîne la destruction des entérocytes après les avoir infectés, une malabsorption des nutriments causée par cette lyse cellulaire et par la perturbation des fonctions enzymatiques impliquées dans la digestion (saccharidases, ...), et une sécrétion active d'ions chlorure accompagnés d'eau déclenchée par l'entérotoxine NSP4. L'association de ces différents mécanismes est à l'origine d'une diarrhée à composante osmotique, sécrétoire et par malabsorption (**Figure 1**).

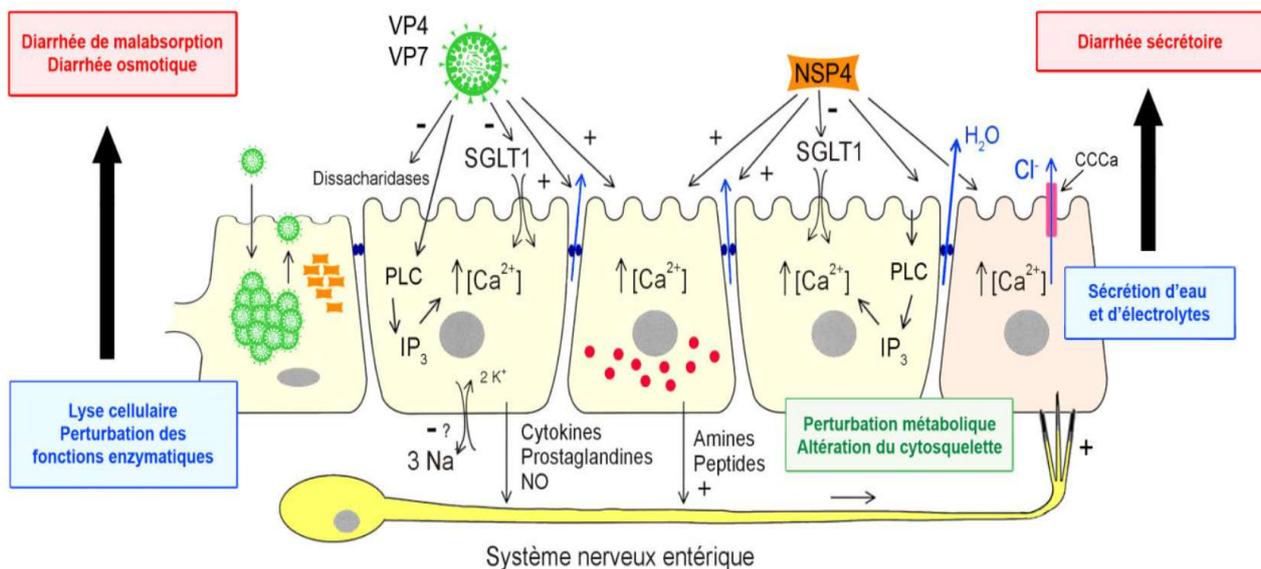


Figure 1 : Représentation des mécanismes physiopathologiques impliqués dans les gastro-entérites aiguës causées par le rotavirus d'après de Rougemont et Pothier, EMC 2010

Certaines bactéries responsables de gastro-entérites aiguës telles que *Shigella dysenteriae* ou *Campylobacter sp.* sont, quant à elles, capables de pénétrer et de se multiplier au sein de la muqueuse digestive. Ce phénomène est à l'origine d'une réaction inflammatoire locale avec une activation du système immunitaire ainsi que d'une altération de l'intégrité de l'épithélium digestif. Il en résulte des douleurs abdominales et l'émission de selles purulentes ou glaireuses, voire glairo-sanglantes, mais également une atrophie villositaire et une réduction de l'absorption des nutriments. Ces infections digestives peuvent aussi entraîner un sepsis, suite au passage des bactéries impliquées dans la circulation générale.

Par ailleurs, l'émission de selles liquides et/ou de vomissements répétés qui accompagnent les gastro-entérites aiguës est à l'origine d'une perte d'eau et d'électrolytes plus ou moins importante et qui, si elle n'est pas compensée de façon adaptée, peut conduire à la déshydratation, voire au décès dans les cas les plus graves, et ce d'autant plus rapidement chez les nourrissons et les jeunes enfants, dont l'organisme est constitué d'une plus grande proportion d'eau que les adultes. Les personnes âgées atteintes de gastro-entérite aiguë sont également à risque de subir des complications liées à la déshydratation.

c) ÉPIDÉMIOLOGIE MONDIALE

Les gastro-entérites aiguës et les maladies diarrhéiques sont un problème majeur de santé publique mondiale. Elles ont en effet une très forte incidence, avec environ 4,480 milliards d'épisodes survenus en 2016 dans le monde, tous âges confondus, dont 1,105 milliard chez les enfants de moins de cinq ans. Elles auraient entraîné la mort de 1,656 millions de personnes cette même année, dont environ 446.000 enfants de moins de cinq ans. Ces données épidémiologiques font des gastro-entérites infectieuses la 8^{ème} cause de décès dans le monde tous âges confondus et la 5^{ème} cause de décès chez les enfants de moins de cinq ans **(1)**. Ces derniers sont donc tout particulièrement impactés par les gastro-entérites. Derrière les infections respiratoires, les gastro-entérites aiguës et les maladies diarrhéiques, prises dans leur ensemble, sont encore à ce jour la deuxième maladie infectieuse la plus mortelle dans le monde d'après l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS).

d) ÉPIDÉMIOLOGIE FRANÇAISE

En France, une étude réalisée en 2011 estimait que l'incidence annuelle des gastro-entérites était de 21 millions d'épisodes **(2)**. Le réseau Sentinelles, grâce aux données transmises par les quelque 1.400 médecins généralistes et pédiatres libéraux qui le composent, évaluait dans son bilan annuel de 2019 que le nombre de cas de gastro-entérites aiguës ayant motivé une consultation médicale ambulatoire s'élevait à environ 3,73 millions en 2019, ce qui correspond à un taux d'incidence annuel estimé de 5.665 consultations pour 100.000 habitants. Les épisodes de gastro-entérites sont chaque année plus fréquents pendant la période hivernale, comme le montre l'évolution du taux d'incidence hebdomadaire des consultations médicales qu'elles entraînent depuis 1991 **(Figure 2)**. Cette variation est plus ou moins marquée selon les années, et on peut observer que depuis 2010, le pic hivernal du taux d'incidence hebdomadaire est en diminution.

Pendant la période hivernale 2019-2020, le nombre de consultations médicales pour gastro-entérite est estimé par le réseau Sentinelles à 1,95 millions, avec un pic constaté lors de la deuxième semaine de janvier 2020. Pendant cette période, l'âge médian des patients vus en consultation était de 27 ans, la part des enfants de moins de cinq ans était de 12,1 % et une demande d'hospitalisation par le médecin a été faite dans 0,5 % des cas à l'issue de la consultation, parmi lesquels la part des enfants de moins de cinq ans était de 27,3 %.

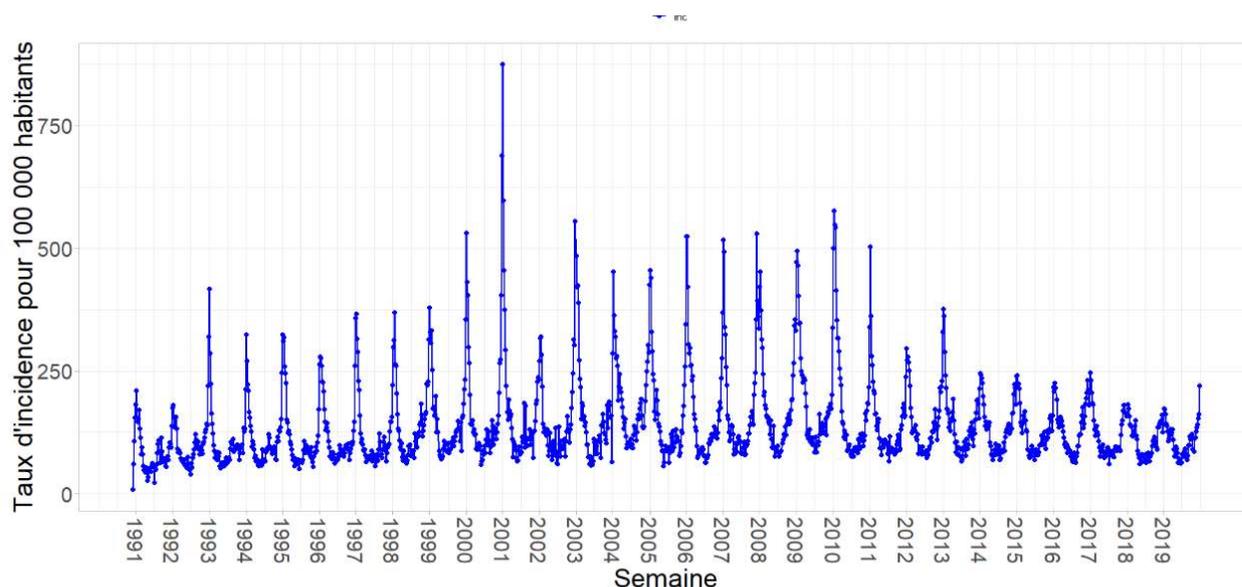


Figure 2: Taux d'incidence hebdomadaire des consultations médicales pour gastro-entérite aiguë en France en fonction du temps (entre 1991 et 2019), d'après le bilan annuel de 2019 du réseau Sentinelles.

En plus des consultations en médecine ambulatoire, les gastro-entérites aiguës sont un motif régulier de passage aux urgences hospitalières, notamment aux urgences pédiatriques. Ainsi, pendant la période hivernale 2018-2019, les données fournies par le réseau OSCOUR indiquent qu'elles ont entraîné environ 135.000 consultations non programmées, soit 2 % de l'ensemble de ces passages. Les enfants de moins de cinq ans représentaient 58 % des patients concernés.

Les gastro-entérites sont donc un enjeu important de santé publique en France, car elles sont responsables de plus de 20 millions d'épisodes par an, de plusieurs millions de consultations médicales et de plusieurs dizaines de milliers de passages aux urgences hospitalières chaque

année. Elles sont donc à l'origine de dépenses de santé considérables et d'un impact économique important (3). Le système de santé français permet de prendre en charge et de traiter efficacement la quasi-totalité de ces épisodes. Cependant, certaines formes sévères ou mal prises en charge induisent une déshydratation rapide et/ou sévère et sont à l'origine de quelques décès, dont le nombre exact est difficile à estimer avec précision. En 1997, 14 décès d'enfants de moins de cinq ans étaient comptabilisés par une vaste étude réalisée à partir des données relatives aux hospitalisations pour gastro-entérite aiguë (3). Le Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France (CSHPF), aujourd'hui remplacé par le Haut Conseil de la Santé Publique (HSCP), avait estimé dans un avis relatif à la vaccination des nourrissons de moins de six mois contre le rotavirus, principal agent pathogène des gastro-entérites aiguës dans cette tranche d'âge, que celui-ci entraînait la mort de 13 à 14 enfants de moins de cinq ans chaque année.

e) INÉGALITÉS GÉOGRAPHIQUES ET ÉCONOMIQUES

Si la mortalité des gastro-entérites est très faible en France, son analyse comparative à l'échelle continentale et selon le niveau de développement économique révèle des disparités majeures. En effet, sur les 446.000 décès estimés d'enfants de moins de cinq ans qu'elles ont entraînés en 2016, environ 291.000 étaient recensés en Afrique subsaharienne et 102.000 en Asie du Sud. Ainsi, ces deux régions du monde regroupaient à elles seules près de 90 % des décès comptabilisés dans cette population, et supportent donc l'essentiel du fardeau que représentent ces pathologies (1). Le poids des gastro-entérites y serait même encore plus important puisqu'elles sont à l'origine, chez les enfants qui en survivent, de retards de croissance et de malnutrition, qui sont des facteurs pouvant augmenter l'incidence et la mortalité d'autres pathologies, notamment infectieuses.

f) ÉVOLUTION TEMPORELLE

La mortalité des enfants de moins de cinq ans due aux gastro-entérites aiguës au niveau mondial est en constante et significative diminution depuis plusieurs décennies. Ainsi, en 2004, l'OMS avait estimé qu'environ 1,8 millions d'entre eux en étaient décédés (4), ce qui était plus de trois fois supérieur au nombre de décès estimés dans cette population en 2016. La réduction de la mortalité globale des enfants de moins de cinq ans par gastro-entérite était un des objectifs du millénaire pour le développement qu'avait adopté l'Organisation des Nations Unies (ONU) en 2000. Elle a de nouveau formulé cet objectif dans ses objectifs de développement durable en 2015.

Pour parvenir à réduire la mortalité des gastro-entérites chez les jeunes enfants et atteindre ces objectifs, des moyens efficaces de traitement et de prévention doivent être mis en œuvre.

g) TRAITEMENT DES GASTRO-ENTÉRITES AIGÜES

Le traitement des gastro-entérites aiguës est symptomatique et repose essentiellement sur une réhydratation adaptée, à l'aide notamment de solutés de réhydratation orale (SRO), dont l'efficacité est aujourd'hui largement démontrée dans cette indication, puisqu'ils pourraient prévenir jusqu'à 93 % des décès (5). En effet, l'émission répétée de selles liquides et/ou de vomissements est à l'origine d'une perte d'eau et d'électrolytes qu'il faut compenser par un traitement approprié. Un examen clinique du patient permet d'apprécier le degré de déshydratation, et conditionne les modalités de mise en place du traitement, qui pourra être suivi à domicile ou sous surveillance hospitalière. Une réhydratation par voie intra-veineuse peut être indiquée dans les cas de déshydratation sévère. Enfin, le délai séparant l'initiation de la réhydratation et la reprise de l'alimentation doit être bref et ne pas excéder 4 heures, afin d'éviter toute dénutrition secondaire. En cas de vomissements associés, il est déconseillé d'utiliser des antiémétiques et l'utilisation des SRO pourra être fractionnée (**Figure 3**). Bien que la plupart des gastro-entérites soient d'origine virale en France, une étiologie bactérienne doit être suspectée devant un syndrome dysentérique. Sa confirmation par une analyse bactériologique des selles permettra d'isoler le germe responsable et de tester sa sensibilité aux antibiotiques. L'utilisation de ces derniers n'est pas systématique mais un traitement par macrolide ou céphalosporine de troisième génération peut être indiqué dans certains cas, en plus des mesures de réhydratation.

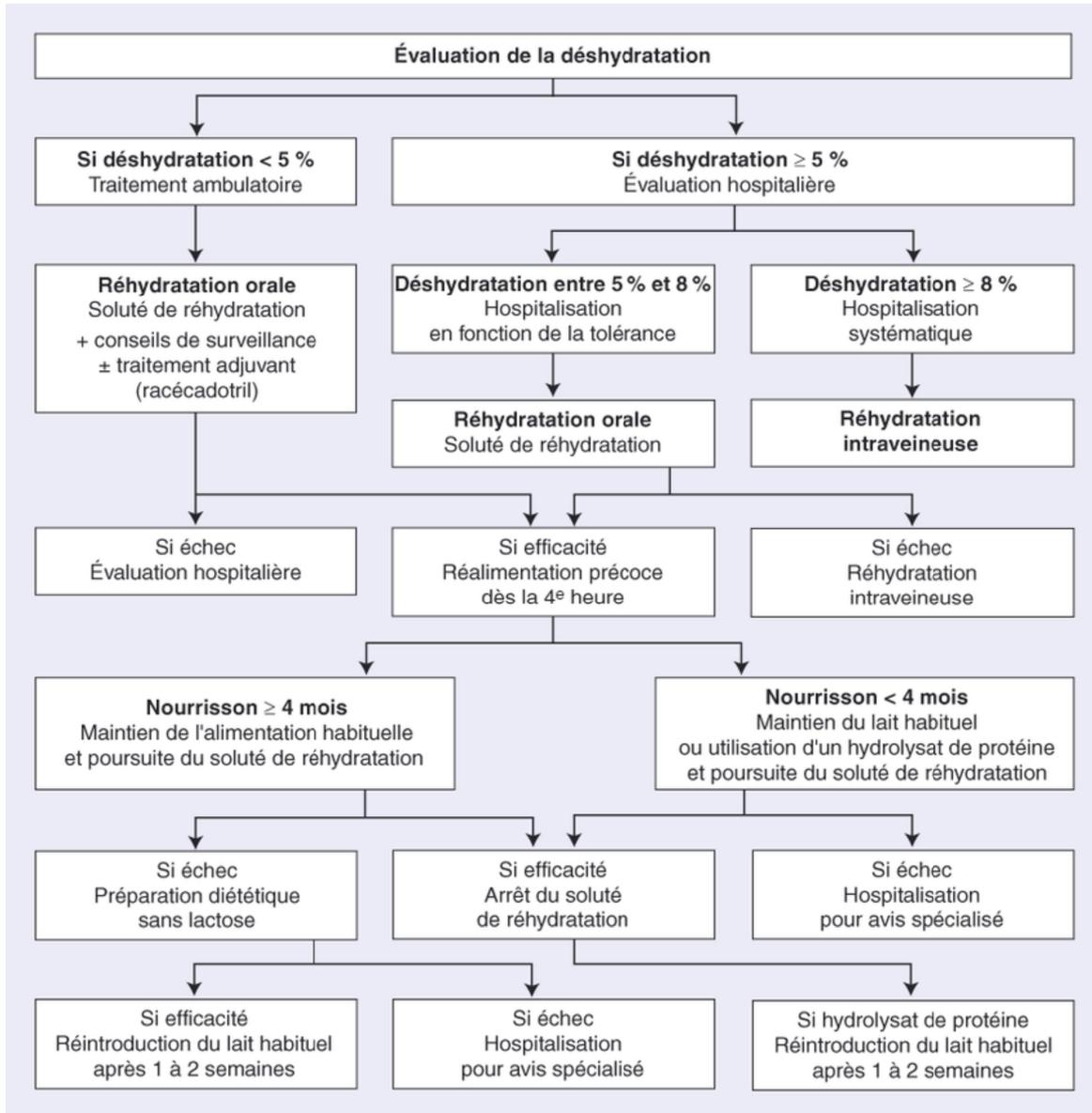


Figure 3: Arbre décisionnel de traitement des gastro-entérites chez l'enfant

h) PRÉVENTION DES GASTRO-ENTÉRITES AIGUËS

La prévention des gastro-entérites repose en premier lieu sur des mesures d'hygiène individuelle et collective. En effet, la transmission des agents pathogènes impliqués est féco-orale et interhumaine. Cette transmission peut être directe de personne à personne via les mains sales, ou indirecte par consommation d'eau ou d'aliments contaminés, ou par contact avec des objets ou des surfaces souillés (**Figure 4**). Le lavage des mains à l'eau et au savon ou avec une solution

hydro-alcoolique, la désinfection des objets et surfaces souillés, l'accès à l'eau potable, la mise en place d'installations sanitaires, l'assainissement de l'eau, ou encore la vaccination contre le rotavirus et la promotion de l'allaitement maternel dans les régions les plus touchées sont autant de mesures à promouvoir dans la lutte contre les gastro-entérites aiguës et les maladies liées au péril fécal au sens large.

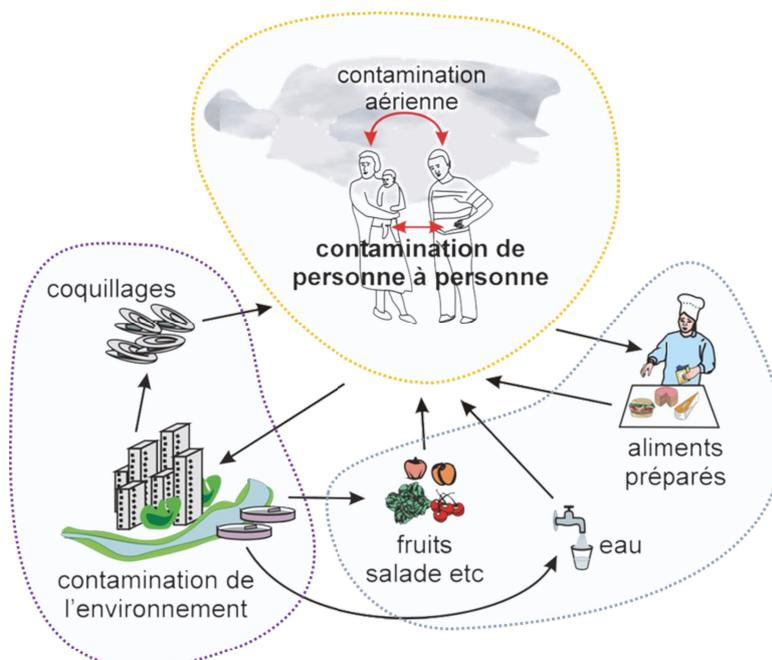


Figure 4: Modes de transmission des virus de gastro-entérites chez l'Homme

i) AGENTS PATHOGÈNES

Les gastro-entérites aiguës peuvent être d'origines virale, bactérienne ou parasitaire, et de nombreux micro-organismes qui en sont responsables sont aujourd'hui identifiés. La découverte et l'étude de ces agents pathogènes est primordiale, car elle permet de mieux comprendre leur épidémiologie et leur pathogénicité et ainsi de développer des stratégies de prévention (vaccination, développement de procédures d'inactivation virale...), de diagnostic (détection d'agents pathogènes par leur mise en culture sur milieux adaptés, par la recherche d'antigènes spécifiques à l'aide de tests immunochromatographiques ou par la recherche de séquences génétiques ciblées à l'aide de tests de biologie moléculaire...) et de traitement (antibiotiques, solutés de réhydratation orale) efficaces.

La découverte de la majorité des micro-organismes responsables de pathologies gastro-intestinales actuellement connus date du XIX^e et du XX^e siècles, bien que la première observation d'un protozoaire intestinal, rendue possible par l'utilisation des microscopes par M. van Leeuwenhoek, ait été rapportée dès 1681 (6). Près de deux cents ans plus tard, *Vibrio cholerae*, la bactérie responsable du choléra, a été identifiée, d'abord par M. Pacini en 1854 puis par M. Koch en 1883 (7). D'autres bactéries responsables de gastro-entérites ont ensuite été découvertes grâce aux progrès de la bactériologie : *Shigella dysenteriae*, *Campylobacter jejuni*, *Yersinia enterocolitica*, certains sérovars de *Salmonella enterica subsp. enterica*, et certaines souches pathogènes d'*Escherichia coli*, par exemple. En 1972, grâce à la microscopie électronique, le premier virus responsable de gastro-entérite, le virus de Norwalk, premier virus découvert du genre *Norovirus* de la famille *Caliciviridae*, a été identifié lors d'une épidémie à Norwalk dans l'État de l'Ohio aux Etats-Unis (8). D'autres virus ont ensuite été découverts à la fin du XX^e siècle : les rotavirus de la famille *Reoviridae* en 1973 (9), les astrovirus de la famille *Astroviridae* en 1975 (10), les sapovirus de la famille *Caliciviridae* en 1977 (11) ou encore le virus Aichi du genre Kobuvirus de la famille *Picornaviridae* en 1991 (12) (Figure 5).

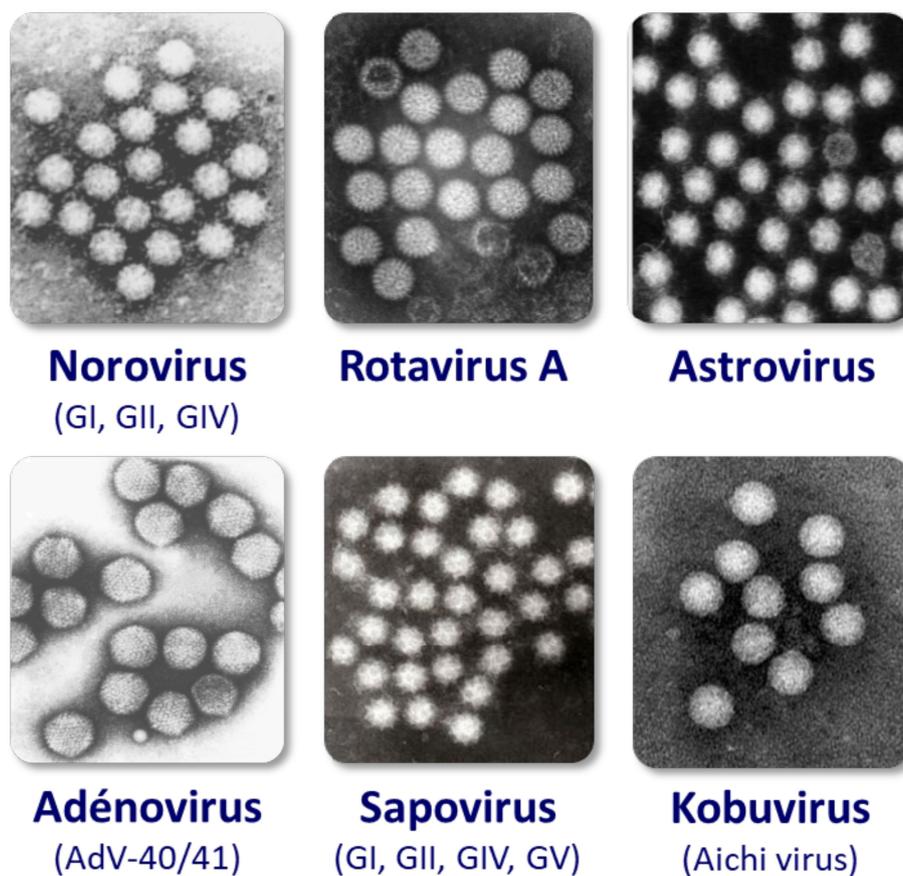


Figure 5: Images en microscopie électronique à balayage des principaux virus responsables de gastro-entérites aiguës chez l'Homme

Parmi ces nombreux agents pathogènes, les virus sont les principaux responsables de gastro-entérites aiguës dans les pays développés. Ainsi, le rotavirus est l'agent étiologique majeur des gastro-entérites aiguës des jeunes enfants âgés de six mois à deux ans, tandis que le norovirus est, quant à lui, le principal responsable des épidémies de gastro-entérites aiguës tous âges confondus, en particulier en collectivité, et le deuxième responsable des épisodes hivernaux de gastro-entérites aiguës chez les enfants. La diarrhée du voyageur est en revanche le plus souvent bactérienne et causée principalement par des souches toxigènes d'*Escherichia coli* (ETEC), responsables de la « turista », suivies par les norovirus. Enfin, les bactéries du genre *Salmonella* sont les plus fréquemment identifiées dans les toxi-infections alimentaires collectives (TIAC).

II - BUFAVIRUS ET TUSAVIRUS, DEUX NOUVEAUX *PROTOPARVOVIRUS*

a) CIRCONSTANCES DE DÉCOUVERTE

Durant ces dernières années, les progrès de la biologie moléculaire, le développement des nouvelles techniques de séquençage à haut débit et le traitement bio-informatique du très grand nombre de séquences génétiques ainsi obtenues ont récemment permis de mener des études métagénomiques, afin d'évaluer la diversité biologique d'un échantillon par le séquençage et l'analyse de l'ensemble de son contenu génétique.

Une étude de ce type réalisée en 2012 à partir d'échantillons de selles diarrhéiques provenant du Burkina Faso a notamment permis de retrouver un grand nombre de génomes appartenant à des virus entériques déjà connus, mais également un génome viral d'environ 4,9 kilobases (kb), inconnu jusqu'alors, dont la séquence présentait des similarités avec celles des virus formant la famille *Parvoviridae*, de la sous-famille *Parvovirinae* et plus particulièrement du genre *Protoparvovirus*. Ce nouveau virus a été nommé bufavirus, en choisissant le préfixe « bufa- » en référence au Burkina Faso (13).

Une étude métagénomique différente, réalisée cette fois-ci en 2014 en Tunisie à partir d'échantillons de selles diarrhéiques de jeunes enfants, a permis d'identifier par le même procédé un autre virus s'apparentant au genre *Protoparvovirus*. Celui-ci a été nommé tusavirus, pour « Tunisian stool-associated virus » (14).

La famille *Parvoviridae* est divisée en deux sous-familles : *Densovirinae* et *Parvovirinae*. La première regroupe les virus infectant les animaux invertébrés répartis en 5 genres, et la seconde regroupe les virus infectant les vertébrés répartis en 8 genres, dont le genre *Protoparvovirus* (Figure 6). C'est à celui-ci que bufavirus et tusavirus appartiennent, au sein des espèces *Primate protoparvovirus 1* et *Primate protoparvovirus 4*, respectivement (15,16). Les caractéristiques virologiques de ces deux nouveaux *Protoparvovirus* sont résumées ci-après (Tableau 1).

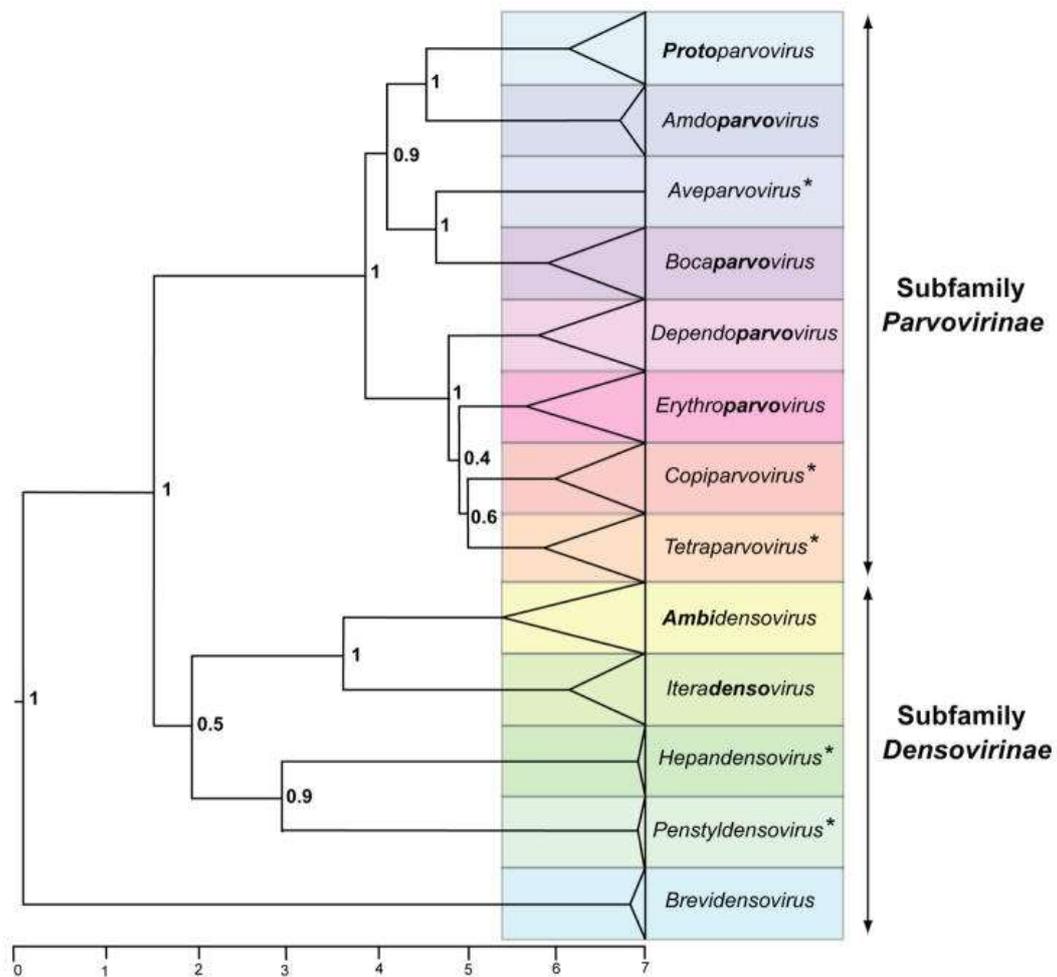


Figure 6: Arbre phylogénétique des sous-familles et genres de la famille *Parvoviridae*, d'après Cotmore et coll. (50)

Tableau 1: Résumé des principales caractéristiques virologiques de bufavirus et de tusavirus

Taxonomie	Famille	<i>Parvoviridae</i>
	Sous-famille	<i>Parvovirinae</i>
	Genre	<i>Protoparvovirus</i>
	Espèce	bufavirus : <i>Primate protoparvovirus 1</i> tusavirus : <i>Primate protoparvovirus 4</i>
Taille		23-28 nm de diamètre
Enveloppe		Absente
Symétrie de la capsid		Icosaédrique
Génome		ADN simple brin linéaire (4,4 à 4,9 kb)

b) CARACTÉRISTIQUES DES PARVOVIRIDAE

La famille *Parvoviridae*, à laquelle appartiennent bufavirus (BuV) et tusavirus (TuV), sont des virus de petite taille, de 23 à 28 nm de diamètre, non enveloppés et par conséquent très résistants dans l'environnement, formés d'une capsid icosaédrique et d'un acide désoxyribonucléique (ADN) linéaire simple brin de 4 à 6 kb (17). Leur culture en milieu cellulaire classique est en général difficilement réalisable. Le préfixe « parvo » choisi pour nommer cette famille provient du mot latin « parvus », qui signifie « petit ».

Le premier virus découvert de cette famille impliqué en pathologie humaine est parvovirus B19 du genre *Erythrovirus*, décrit pour la première fois en 1975, et responsable notamment du mégalérythème épidémique chez les enfants (aussi appelé « cinquième maladie »), d'érythroblastopénies chez les sujets souffrant d'anomalies constitutionnelles des hématies, d'anémies chroniques chez les sujets immunodéprimés et d'infections materno-fœtales potentiellement graves pouvant entraîner une anasarque fœto-placentaire, voire un avortement spontané (18).

Dix ans avant cette découverte, un autre virus de cette famille avait été décrit chez l'Homme mais sans être pathogène : le virus adéno-associé (également désigné AAV pour « adeno-associated virus ») du genre *Dependovirus* (19). Il a néanmoins été très étudié depuis, en raison de son utilisation potentielle comme vecteur en thérapie génique (20).

Enfin, en 2005, le bocavirus du genre *Bocaparvovirus* et utilisant le préfixe « boca- » pour « bovine-canine », un autre virus appartenant à la famille *Parvoviridae*, est identifié dans plusieurs prélèvements naso-pharyngés effectués chez des jeunes enfants (21), et il est désormais reconnu comme responsable d'infections respiratoires basses (22). Les virus de cette famille ont généralement un tropisme pour les cellules en phase de divisions rapides, telles que les progéniteurs érythroblastiques pour le parvovirus B19.

L'organisation du génome de bufavirus et de tusavirus est similaire à celle des autres virus de la famille *Parvoviridae*. Chez ces virus, l'ADN simple brin peut être de polarité positive ou négative. La partie codante centrale est habituellement encadrée en 5' et en 3' par des répétitions inversées qui permettent au brin d'ADN monocaténaire de s'apparier en se repliant sur lui-même à chaque extrémité dans une conformation dite en « épingle à cheveux ». Cette conformation permet d'initier la synthèse du brin complémentaire par les enzymes cellulaires lors du cycle de réplication virale (17). Une représentation schématique de cette conformation en « épingle à cheveux » est visible sur la **Figure 7**.

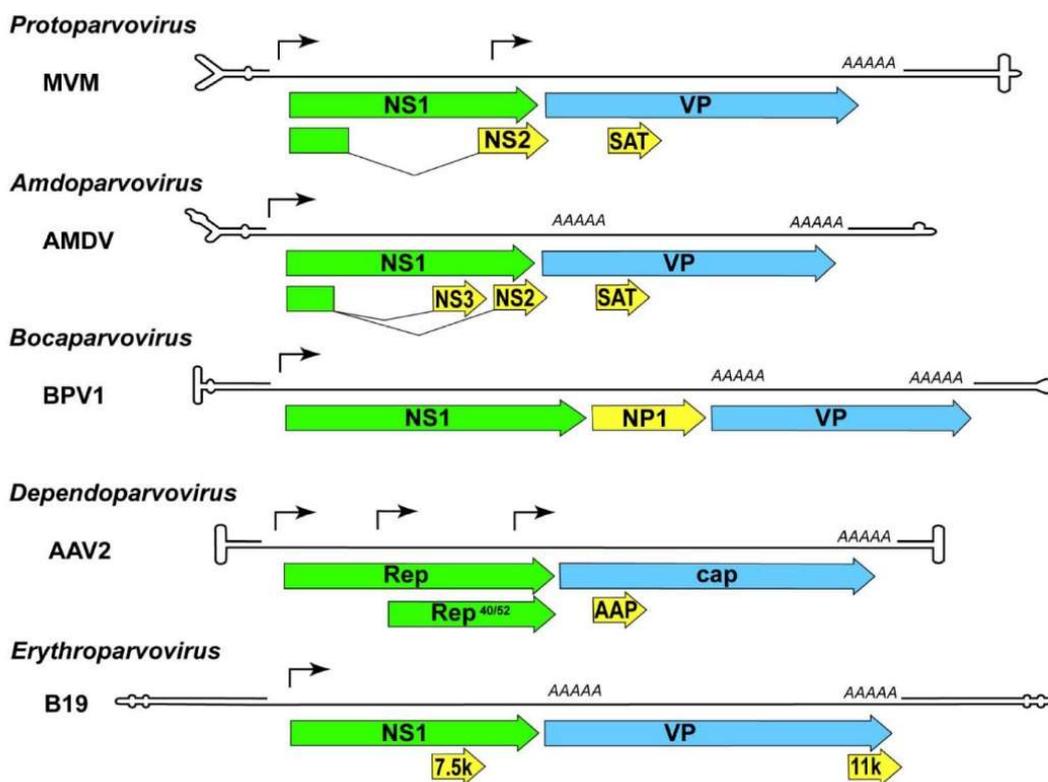


Figure 7: Présentation schématique du génome de quelques virus de la famille *Parvoviridae*, d'après Cotmore et Tattersall (51)

c) BUFAVIRUS

1) GÉNOME ET STRUCTURE DE BUFAVIRUS

Le génome de bufavirus est formé d'un ADN simple brin linéaire d'environ 4,9 kb (15). Celui-ci contient trois cadres de lecture ouverts (ou ORF pour « *open reading frame* »). Le premier, situé du côté 5', code la protéine non structurale NS1. Le deuxième, situé du côté 3', code la totalité de la protéine de capsid VP2 et la partie C-terminale de l'autre protéine de capsid VP1. Un troisième ORF est situé au milieu du génome, entre les deux premiers, et code la partie N-terminale de la protéine VP1. La protéine VP1 est donc plus grande que la protéine VP2 et diffère de celle-ci par un groupement N-terminal supplémentaire appelé VP1u. Les séquences en acides aminés des protéines VP1 et VP2 sont donc identiques dans leur partie C-terminale. La transcription de l'acide ribonucléique messager (ARNm) codant pour VP1 passe par un mécanisme d'épissage éliminant un intron (15). Enfin, des séquences répétées sont retrouvées dans la partie 3' non codante à la différence des autres virus de sa famille. L'organisation du génome de bufavirus est représentée sur la **Figure 8**.

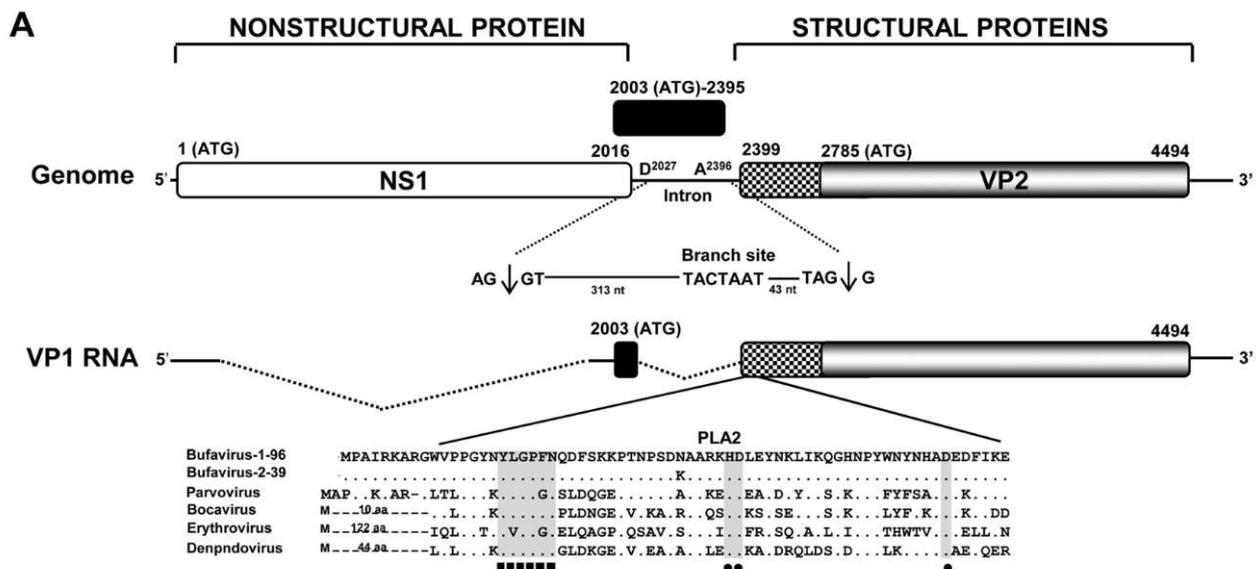


Figure 8: Représentation du génome de bufavirus, du mécanisme d'épissage de l'ARNm de la protéine VP1, et des motifs phospholipase A2 (PLA2) de la protéine VP1

Lors de la découverte et de la première description de bufavirus, deux génotypes (BuV1 et BuV2) ont été initialement décrits (13). Un troisième génotype (BuV3) a depuis été découvert lors d'une étude menée au Bhoutan (23). La protéine NS1 est très conservée parmi les trois génotypes

connus à ce jour, puisqu'elle présente une homologie de séquence en acides aminés de 94 à 96 %. En revanche, les protéines VP1 et VP2 présentent une plus grande variabilité, avec des homologies de séquences en acides aminés de 71-78 % et de 65-73 %, respectivement (15). La capside de bufavirus est composée d'un total de 60 copies des deux protéines VP1 et VP2 (17), qui contiennent 707 et 569 acides aminés pour un poids moléculaire de 80,4 kDa et 64,5 kDa, respectivement (13,24) (Figure 9).

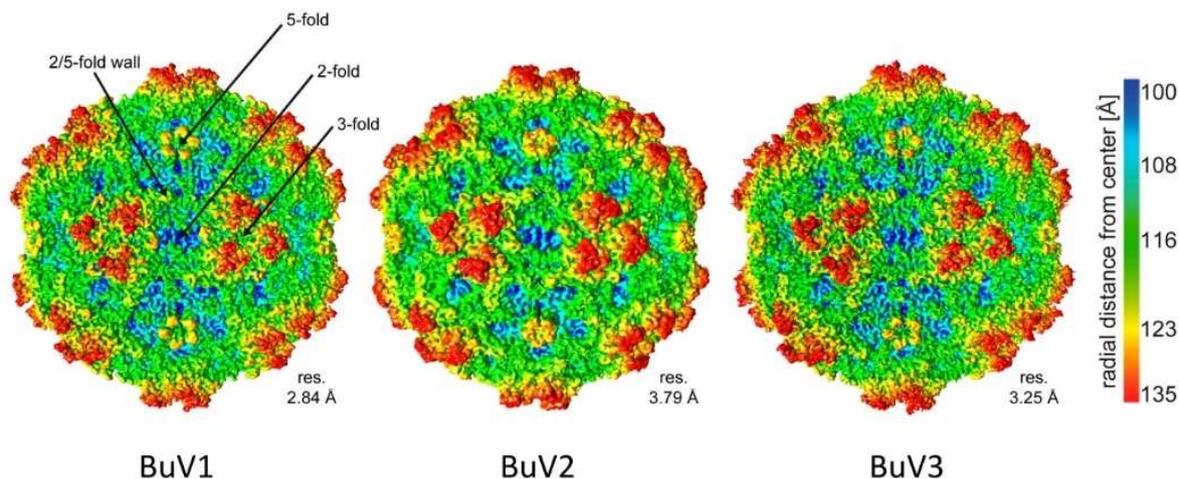


Figure 9: Structure des capsides des trois génotypes de bufavirus, d'après Ilyas et coll.(24)

La protéine VP1 est le constituant minoritaire de la capside. En effet, celle-ci serait constituée, en proportion, d'une protéine VP1 pour dix protéines VP2 (24). Comme les autres *Parvoviridae*, la partie VP1u de la protéine VP1 possède une activité phospholipase A2 (13), et celle-ci est nécessaire à l'infectiosité des virus appartenant à cette famille (25), puisqu'elle permettrait aux particules virales, une fois à l'intérieur de vésicules d'endocytose des cellules infectées, d'échapper à ces vésicules pour rejoindre le noyau. Si le cycle viral de parvovirus B19 a été étudié (17), ce n'est pas le cas de celui de bufavirus, et les cellules hôtes ainsi que le récepteur cellulaire à l'origine de la pénétration du virus à l'intérieur de celles-ci n'ont pas été formellement identifiés.

2) ÉTUDES MOLÉCULAIRES SUR BUFAVIRUS

Depuis la découverte de bufavirus en 2012, des études ont été menées pour le rechercher de façon ciblée à l'aide de réaction en chaîne par polymérase (ou PCR pour « polymerase chain reaction ») spécifique, avec d'autres virus, dans plusieurs séries d'échantillons de selles,

diarrhéiques ou non, ainsi que dans d'autres prélèvements (écouvillonnage naso-pharyngé ou liquide cérébro-spinal). L'ensemble de ces études publiées à ce jour et la synthèse de leurs résultats sont exposés ci-après (**Tableau 2**).

L'analyse de l'ensemble de ces études révèle que bufavirus n'est pas géographiquement restreint au Burkina Faso ou à l'Afrique, puisqu'il a été retrouvé en Chine, en Finlande, au Bhoutan, aux Pays-Bas, en Turquie ou encore au Pérou, à la fois chez des enfants et chez des adultes. De plus, il a principalement été retrouvé au sein d'échantillons pathologiques, et il n'a été retrouvé que dans un seul échantillon de selles non diarrhéiques à ce jour, au Bangladesh. Cependant, la prévalence de bufavirus au sein des échantillons de selles diarrhéiques était faible dans l'ensemble, n'excédant pas 4,1 %, et dans certains cas, une co-infection par un autre virus pathogène responsable de gastro-entérite aiguë a été rapportée. La charge virale de bufavirus dans les échantillons de selles, lorsqu'elle a été mesurée, était faible. Enfin, il a été retrouvé dans un prélèvement naso-pharyngé. Le rôle pathogène de bufavirus n'est donc pas clairement démontré, mais sa présence quasi-exclusive au sein d'échantillons pathologiques serait en faveur d'une association entre sa présence et la survenue de gastro-entérites aiguës.

Tableau 2: Synthèse des études moléculaires sur bufavirus

Étude	Pays	Population d'étude	Type d'échantillon étudié	Nombre d'échantillons positifs	Génotype	Co-infection	Autres observations
(26)	Thaïlande	non renseigné	selles diarrhéiques	4/1495 (0,27%)	BuV1	non renseigné	
			selles témoins	0/726			
(27)	Pays-Bas	0-97 ans	selles diarrhéiques négatives pour les virus entéro-pathogènes connus	1/27 (3,7%)	BuV1	non	patient positif : 25 ans
(28)	Koweït	0-10 ans	selles diarrhéiques	1/84 (1,2%)	BuV3	cosavirus	cosavirus : rôle pathogène douteux
		1-5 ans	selles témoins	0/10			
(29)	Chine (Nord)	0-85 ans	selles diarrhéiques	9/520 (1,7%)	BuV1 (4 éch.) BuV3 (5 éch.)	sapovirus (1 éch.) norovirus (1 éch.)	patients positifs : 0-60 ans
		non renseigné	selles témoins	0/76			
	Chine (Sud)	0-85 ans	selles diarrhéiques	0/1357			
		non renseigné	selles témoins	0/345			
(30)	Bhoutan	0-4 ans	selles diarrhéiques	3/393 (0,8%)	BuV3	norovirus (1 éch.)	
(13)	Burkina Faso	0-4 ans	selles diarrhéiques	4/98 (4,1%)	BuV1 (3 éch.) BuV2 (1 éch.)	rotavirus, norovirus et cosavirus (1 éch.) sapovirus et parechovirus (1 éch.)	
	Chili	enfants	selles diarrhéiques	0/100			
	Tunisie	enfants	selles de patients atteints de paralysie flasque aiguë non poliomyélitique	1/63 (1,6%)	BuV1	non renseigné	
(31)	Finlande	0-99 ans	selles diarrhéiques	7/629 (1,1%)	BuV1	norovirus (1 éch.)	- positifs : 21-89 ans - 7 positifs dont 2 éch. du même patient

Étude	Pays	Population d'étude	Type d'échantillon étudié	Nombre d'échantillons positifs	Génotype	Co-infection	Autres observations
(32)	Tunisie	0-4 ans	selles diarrhéiques	2/203 (1,0%)	BuV1	adenovirus (1 éch.) adenovirus+ rotavirus (1 éch.)	
(33)	Turquie	0-4 ans	selles diarrhéiques	8/583 (1,4%)	BuV3	norovirus (1 éch.) norovirus+ bocavirus (1 éch.) bocavirus (1 éch.)	
		0-4 ans	selles témoins	0/148			
(34)	Finlande	0-15 ans avec diarrhée et/ ou infection respiratoire	selles	3/955 (0,3%)	non déterminé	norovirus (2 éch.) rotavirus+ bocavirus (1 éch)	3 positifs dont : - 2 avec GEA - 1 avec GEA + infection respiratoire
			prélèvement naso- pharyngé	1/955 (0,1%)	non déterminé	norovirus + bocavirus (dans les selles)	positif : GEA + infection respiratoire
(35)	Pérou	enfants	selles diarrhéiques	?/300	BuV3	non déterminé	prélèvements analysés par groupes
(36)	Bangladesh	5-6 ans	selles témoins	1/227 (0,4%)	non renseigné	cosavirus	

3) ÉTUDES SÉROLOGIQUES SUR BUFAVIRUS

Afin de déterminer si un virus est capable d'infecter l'Homme, il est possible de mener des études sérologiques visant à mettre en évidence des anticorps produits contre ce virus (ou, plus exactement, contre les éléments protéiques constitutifs de ce virus) par un individu lorsque celui-ci est infecté. En effet, en cas de réelle infection par un virus et de réplication de celui-ci, son hôte produira vraisemblablement des anticorps. En revanche, en cas de simple transit de virions, de particules ou de matériel génétique d'origine virale dans le tube digestif ou les voies respiratoires n'entraînant pas d'infection de l'hôte, celui-ci ne produira pas d'anticorps.

Ainsi, en plus des études recherchant directement bufavirus au sein d'échantillons pathologiques et témoins, des études de séroprévalence ont été conduites, afin de déterminer si les populations étudiées avaient produit des anticorps contre lui.

Les études de séroprévalence des virus associés aux gastro-entérites présentent un intérêt épidémiologique et permettent de déterminer si le virus étudié circule dans la population ciblée et, si c'est le cas, dans quelle proportion. Elles permettent aussi d'observer d'éventuelles variations en fonction de l'âge des individus testés. Ainsi, par exemple, une étude de séroprévalence du virus Aichi réalisée en population française avait démontré que celle-ci était de 25 % chez les enfants de moins de dix ans, mais qu'elle s'élevait à environ 85 % chez les adultes de plus de 30 ans, démontrant que la circulation d'Aichivirus était active en France d'une part, et que la séroconversion avait lieu avant l'âge de 40 ans d'autre part (37).

La séroprévalence de bufavirus a été étudiée en Finlande, aux États-Unis, en Iran, en Irak et au Kenya. Celle-ci est plutôt faible chez les adultes en Finlande et aux États-Unis (1,9 % et 3,6 %, respectivement), mais elle est bien plus importante chez les adultes en Iran, en Irak et au Kenya (56,1 %, 84,8 % et 72,3 %, respectivement). De plus, au sein de la population finlandaise, la séroprévalence de bufavirus des adultes d'origine asiatique était plus élevée que celle des adultes d'origine finlandaise (41,7 % contre 3,1 % respectivement). Cependant, le nombre d'adultes d'origine asiatique dans cette étude était faible (12 individus). Ces résultats sont en faveur d'une circulation importante de bufavirus en Afrique et en Asie, mais plutôt faible en Amérique du Nord et en Finlande. De plus, l'étude de la séroprévalence par groupe d'âge au sein de la population du Kenya montre que celle-ci augmente significativement avec l'âge. Ainsi, elle était de 12 % chez les enfants de moins de cinq ans, de 28,1 % chez les enfants de cinq à dix-huit ans et de 72,3 % chez l'ensemble des adultes de dix-huit ans ou plus (**Tableau 3**).

Par ailleurs, aucune infection aiguë à bufavirus n'a été mise en évidence par une séroconversion à l'heure actuelle.

Enfin, la réalisation d'études sérologiques à partir d'une protéine VP2 recombinante a montré que les génotypes de bufavirus actuellement décrits étaient également des sérotypes, puisqu'il n'y avait pas de réactivité croisée entre ceux-ci (15).

Tableau 3: Synthèse des études sérologiques sur bufavirus

Étude	Pays	Nombre de sujets	Âge des sujets	Échantillons positifs	Génotype			Autres observations
					BuV1	BuV2	BuV3	
(38)	Finlande	324	Adultes	6 (1,9%)	4 (1,2%)	1 (0,3%)	1 (0,3%)	
	États-Unis	84	Adultes	3 (3,6%)	0	0	3 (3,6%)	
	Irak	99	Adultes	84 (84,8%)	80 (80,8%)	33 (33,3%)	15 (15,2%)	
	Iran	107	Adultes	60 (56,1%)	55 (51,4%)	17 (17,9%)	6 (5,6%)	
	Kenya	119	Adultes	86 (72,3%)	31 (26,1%)	43 (36,1%)	56 (47,1%)	
107		Enfants	22 (20,6%)	3 (2,8%)	4 (3,7%)	20 (18,7%)	- 12 % chez les moins de 5 ans - 28,1 % chez les 5-18 ans	
(34)	Finlande	180	Adultes	10 (5,6%)	4 (2,2%)	5 (2,8%)	1 (0,6%)	10 positifs : - dont 5/12 d'origine Asiatique - dont 5/163 d'origine Finlandaise
		228	Enfants	7 (3,1%)	2 (0,9%)	4 (1,8%)	2 (0,9%)	7 positifs : entre 0 et 5 ans

d) TUSAVIRUS

1) GÉNOME ET STRUCTURE DE TUSAVIRUS

Le génome et la structure de tusavirus sont similaires à ceux de bufavirus. Le génome de tusavirus est formé d'un ADN simple brin d'environ 4,4 kb (14). Celui-ci code également trois protéines : une protéine non structurale NS1 dans sa partie 5' et deux protéines structurales VP1 et VP2 dans sa partie 3'. La protéine VP1 est, ici encore, plus grande que la protéine VP2 et la transcription de l'ARNm codant pour VP1 passe par un mécanisme d'épissage éliminant un intron (Figure 10). Le virus présentant les plus grandes homologies de séquence en acides aminés entre les protéines NS1, VP1 et VP2 (44 %, 39 % et 37 %, respectivement) est celui correspondant à l'espèce *Rodent protoparvovirus 1*.

Enfin, des motifs correspondant à une activité phospholipase A2 ont également été identifiés au sein de la protéine VP1, dans le domaine VP1u. Il n'a pas été décrit de différents

génotypes de tusavirus à ce jour, contrairement à bufavirus. L'organisation du génome de tusavirus est représentée dans la **Figure 10**.

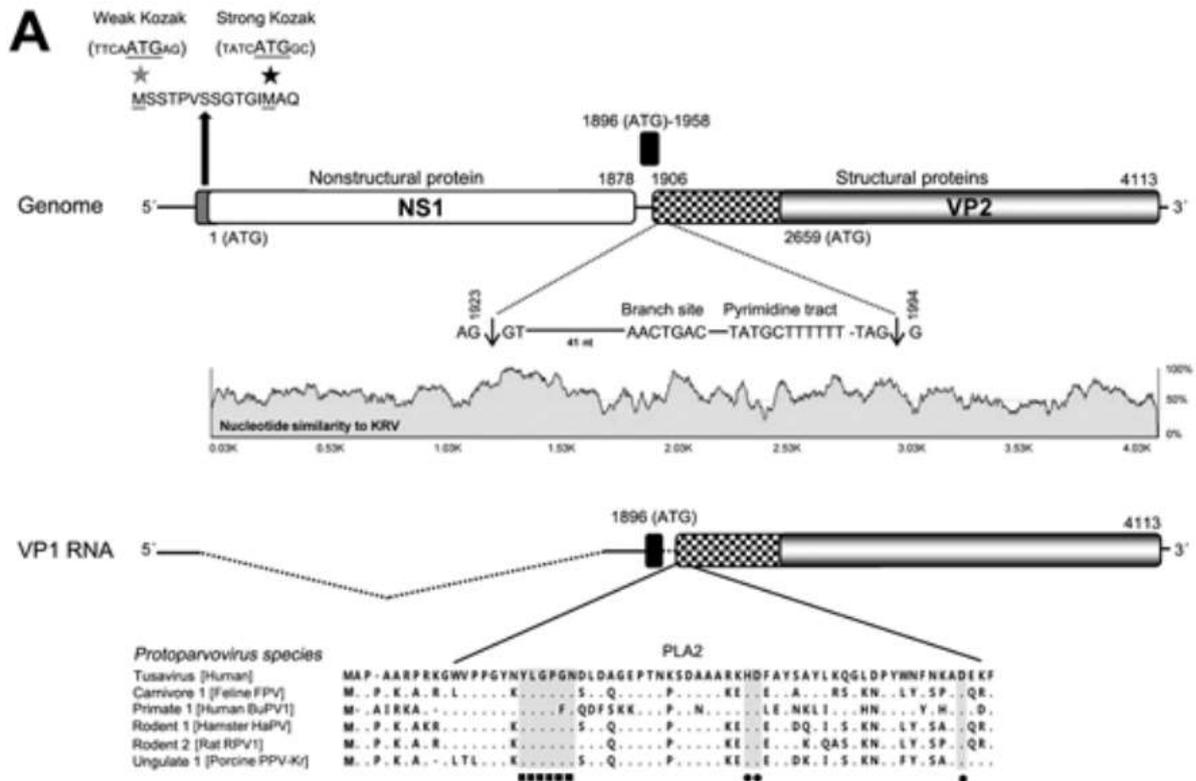


Figure 10: Représentation du génome de tusavirus, du mécanisme d'épissage de l'ARNm de la protéine VP1, et des motifs phospholipase A2 (PLA2) de la protéine VP1

2) ÉTUDES MOLÉCULAIRES SUR TUSAVIRUS

La seule étude indiquant la prévalence de tusavirus au sein d'échantillons de selles diarrhéiques ou de selles témoins est celle ayant rapporté sa découverte. Dans cette étude, tusavirus n'était présent que dans 1/180 (0,56%) des échantillons de selles diarrhéiques étudiés (14).

3) ÉTUDES SÉROLOGIQUES SUR TUSAVIRUS

Les résultats des études de séroprévalence de tusavirus menées à ce jour sont résumés ci-après (**Tableau 4**). Cette séroprévalence a été étudiée sur les mêmes populations que celle de bufavirus. La séroprévalence de tusavirus est quasi-nulle, puisque seul un enfant testé possédait des anticorps contre ce virus.

Au total, tusavirus n'a donc été retrouvé que dans un seul échantillon de selles diarrhéiques et seul un individu possédait des anticorps contre celui-ci. Ces résultats ne permettent pas d'établir le rôle pathogène de ce virus, ni même de confirmer qu'il s'agit bien d'un virus humain (38).

Tableau 4: Synthèse des études sérologiques sur tusavirus

Étude	Pays	Nombre de sujets	Âge des sujets	Échantillons positifs	
(38)	Finlande	324	Adultes	0/324	
	États-Unis	84	Adultes	0/84	
	Irak	99	Adultes	0/99	
	Iran	107	Adultes	0/107	
	Kenya		119	Adultes	0/119
			107	Enfants	0/107
(34)	Finlande	180	Adultes	0/180	
		228	Enfants	1/228	

III - OBJECTIFS DE L'ÉTUDE

Aucune étude n'a pour l'heure établi la séroprévalence de bufavirus et de tusavirus en France. L'objectif principal de cette étude est de la déterminer par la mise au point et la réalisation d'un test ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) indirect à la recherche d'anticorps anti-bufavirus et anti-tusavirus, à partir de particules virales de synthèse ou pseudo-particules virales (appelées également « *virus-like particles* » ou VLP) et d'une large sélection d'échantillons

de sérum pour mieux connaître et décrire l'épidémiologie de ces deux virus en France, ou, plus exactement, en Bourgogne. Cette étude va également permettre d'apprécier d'éventuelles tendances ou variations de séroprévalence en fonction de l'âge des individus, grâce aux effectifs conséquents que nous avons inclus.

L'objectif secondaire de cette étude est de déterminer, à partir d'éventuels échantillons séropositifs à bufavirus et à tusavirus, si les antigènes de groupes sanguins ABO sont des récepteurs cellulaires sur lesquels les particules virales sont susceptibles de se fixer, comme ils peuvent l'être pour d'autres virus entériques tels que les norovirus (39,40).

B. MATÉRIELS ET MÉTHODES

I - PRINCIPE GÉNÉRAL DE L'ÉTUDE DE SÉROPRÉVALENCE RÉALISÉE

La réalisation d'une étude de séroprévalence de bufavirus et de tusavirus comprend plusieurs étapes. Elle nécessite dans un premier temps de définir le nombre et le mode de sélection des sérums à tester, c'est-à-dire des sérums dans lesquels seront recherchés d'éventuels anticorps dirigés contre bufavirus et contre tusavirus. Ensuite, cette étude requiert de disposer d'éléments protéiques constitutifs des trois génotypes connus de bufavirus ainsi que de tusavirus, qui seront les antigènes que reconnaîtront les anticorps recherchés. Pour cela, il est nécessaire de produire des pseudo-particules virales (VLP) issues de protéines de capsid VP2 recombinantes capables d'auto-assemblage. Enfin, après avoir sélectionné les sérums à tester et obtenu les VLP de bufavirus et de tusavirus, il devient possible de réaliser un dosage immuno-enzymatique de type ELISA. Celui-ci consiste à incuber chaque sérum sélectionné avec chacun des quatre types de VLP produites, puis de révéler l'éventuelle liaison entre les VLP et les anticorps contenus dans le sérum testé à l'aide d'une réaction enzymatique.

II - POPULATION D'ÉTUDE

Nous avons sélectionné un total de 844 échantillons de sérum issus de la sérothèque du laboratoire de virologie du CHU de Dijon. Ces échantillons ont tous été prélevés entre le 21 février 2007 et le 18 septembre 2007, et conservés à -20°C depuis. La distribution des échantillons par tranche d'âge des patients au moment du prélèvement est résumée ci-après (**Tableau 5**).

Tableau 5: Répartition des effectifs de la population d'étude par tranche d'âge

Tranche d'âge	Effectif
0-9 ans	104
10-19 ans	64
20-29 ans	113
30-39 ans	86
40-49 ans	89
50-59 ans	94
60-69 ans	81
70-79 ans	95
80-89 ans	79
90-99 ans	39

III - PRODUCTION DE PSEUDO-PARTICULES VIRALES DE BUFAVIRUS ET DE TUSAVIRUS

a) TYPE DE PROTÉINES PRODUITES

La réalisation d'études de séroprévalence de bufavirus et de tusavirus à l'aide d'un test immuno-enzymatique nécessite, comme nous l'avons brièvement abordé précédemment, de disposer de pseudo-particules virales de synthèse, ou VLP, issues de l'auto-assemblage de la protéine de capsid VP2 recombinante.

Nous avons ainsi produit et obtenu au laboratoire quatre types de VLP à partir de protéines VP2 recombinantes : un type de VLP pour chaque génotype de bufavirus (BuV1, BuV2, BuV3) et pour tusavirus (TuV).

Pour produire ces protéines recombinantes, nous avons utilisé le système baculovirus-cellules d'insectes. Il s'agit d'une méthode de biotechnologie particulièrement adaptée à cette fin, bien maîtrisée, et dont l'utilisation s'est aujourd'hui largement répandue.

b) PRINCIPE GÉNÉRAL DU SYSTÈME BACULOVIRUS-CELLULES D'INSECTE

Les baculovirus appartiennent à la famille *Baculoviridae*. Il s'agit de virus enveloppés, dont la capside est en forme de bâtonnet mesurant 30 à 60 nm de largeur et 250 à 300 nm de longueur (**Figure 11**). Cette capside contient le génome viral constitué d'un ADN double brin circulaire dont la taille est comprise entre 80 et 180 kb. Les baculovirus infectent spécifiquement les insectes ainsi que quelques crustacés et sont donc incapables d'infecter les mammifères, dont l'Homme. Leur utilisation en biotechnologie pour la production de protéines recombinantes est ancienne et a été rapportée pour la première fois en 1983 pour la production d'interféron (41). Depuis, elle s'est largement répandue et ce système constitue désormais une des principales méthodes de production de protéines recombinantes, et notamment de VLP. Ainsi, par exemple, c'est en 1992 qu'a été décrite la première production de VLP de norovirus à l'aide d'un baculovirus recombinant (42). Il est également possible de produire des VLP de papillomavirus, identiques à celles composant le vaccin utilisé pour prévenir les cancers du col de l'utérus induits par certains papillomavirus (43).

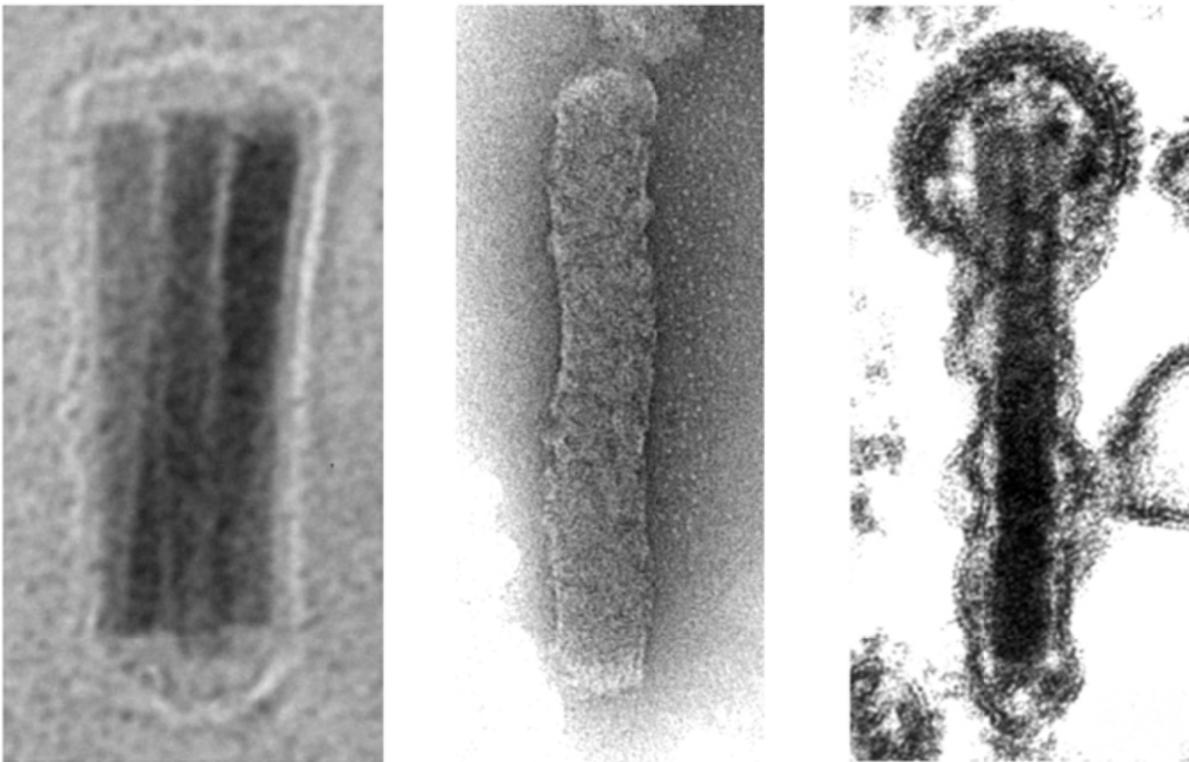


Figure 11: Photographies de baculovirus observés en microscopie électronique, d'après l'International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV).

Le principe général de production d'une protéine recombinante par ce système s'appuie sur les propriétés des baculovirus et exploite une des caractéristiques de leur cycle de réplication virale. En effet, après avoir infecté une cellule hôte d'insecte et détourné la machinerie cellulaire pour produire de nouvelles particules virales (ou virions), les baculovirus ont la particularité de former à l'intérieur de la cellule hôte des structures polyédriques formant des corps d'inclusion, visibles en microscopie électronique (**Figures 12 et 13**).

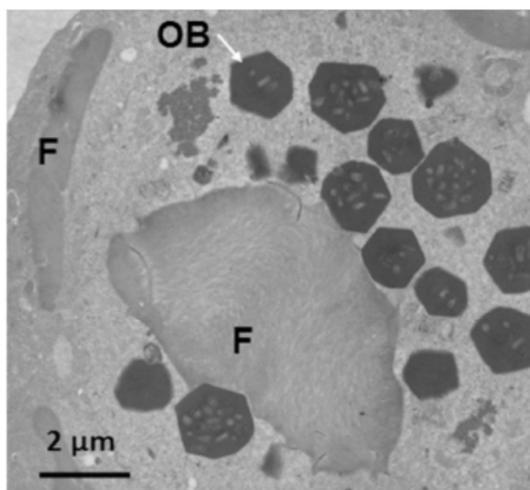


Figure 12: Photographie de structures polyédriques de baculovirus observées en microscopie électronique à transmission, d'après Williams T. (52)

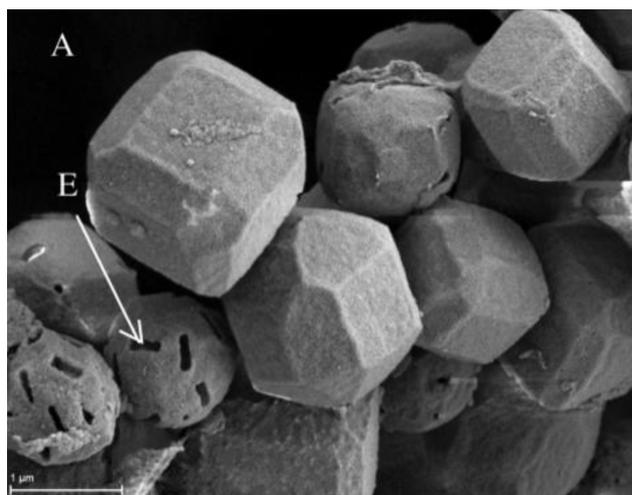


Figure 13: Photographie de structures polyédriques de baculovirus observées en microscopie électronique à balayage, d'après Chateigner A. (53)

Ces structures polyédriques sont constituées d'un assemblage de nombreuses copies d'une protéine appelée polyhédrine, codée par le génome viral et produite en quantité considérable par la cellule hôte, à l'intérieur desquelles se trouvent les virions, alors recouverts d'une épaisse couche protéique. Ainsi, après la lyse des cellules infectées et la libération des virions produits dans le milieu extérieur, ceux-ci vont être protégés par ces structures polyédriques qui vont leur conférer une importante résistance à la dégradation et aux conditions du milieu extérieur. Ils conserveront alors aisément leur pouvoir infectieux jusqu'à ce qu'un nouvel insecte ingère et dissolue cette structure protéique, libérant les virions et leur permettant d'infecter les cellules de ce nouvel hôte.

Dans leur cycle naturel à l'intérieur des cellules infectées, les baculovirus induisent la production de polyhédrine en quantité importante, grâce à la présence d'un promoteur fort, appelé *polh*, à proximité du gène codant pour cette protéine. Cependant, la production de polyhédrine n'est pas nécessaire au cycle de réplication virale et n'a d'intérêt que pour protéger les virions de la dégradation en milieu extérieur. Ainsi, il est possible de remplacer, au sein du génome d'un baculovirus, le gène codant pour la polyhédrine par le gène codant pour la protéine que l'on souhaite produire, en maintenant à proximité de ce gène le promoteur fort *polh*, tout en conservant le pouvoir infectieux du baculovirus. On obtient alors un baculovirus recombinant, qui peut infecter des lignées cellulaires d'insectes cultivées en laboratoire. Ce baculovirus recombinant est donc capable d'induire la production d'importantes quantités de la protéine d'intérêt par les cellules d'insectes infectées au cours de son cycle de réplication.

Les avantages de ce système sont multiples. Il permet notamment de produire des protéines avec un haut rendement, et les protéines produites en cellules d'insecte subissent des modifications post-traductionnelles (création de ponts disulfures, glycosylation, phosphorylation...) qu'il ne serait pas possible d'obtenir dans un système utilisant des organismes procaryotes. De plus, il existe au sein du génome des baculovirus un autre promoteur fort, appelé *p10*, permettant la production de deux protéines recombinantes différentes simultanément.

c) PRODUCTION DES BACULOVIRUS RECOMBINANTS

Dans le cadre de notre étude, et afin de produire les quatre types de protéines VP2 recombinantes, quatre baculovirus recombinants ont été produits par le Dr. Elina Väisänen et fournis gracieusement par le Dr. Maria Söderlund-Venermo du Département de Virologie de l'Université de Helsinki, Finlande.

Les génomes de ces quatre baculovirus recombinants ont été obtenus grâce à l'utilisation du kit « *Bac-to-Bac Baculovirus Expression System* », produit par Thermo Fisher Scientific (**Figure 14**). Pour chaque type de protéine de capsid VP2 recombinante à produire, le gène codant pour cette protéine, accompagné du promoteur *polh*, a été cloné puis inséré dans un plasmide noté *VP2-pFastBacDual*, en suivant les instructions du fournisseur. Chacun de ces plasmides a ensuite été inséré dans une souche DH10Bac d'*Escherichia coli* fournie. Cette souche comprend dans son cytoplasme un génome modifié de baculovirus sous forme de plasmide nommé « bacmide », ainsi qu'un plasmide « *helper* ».

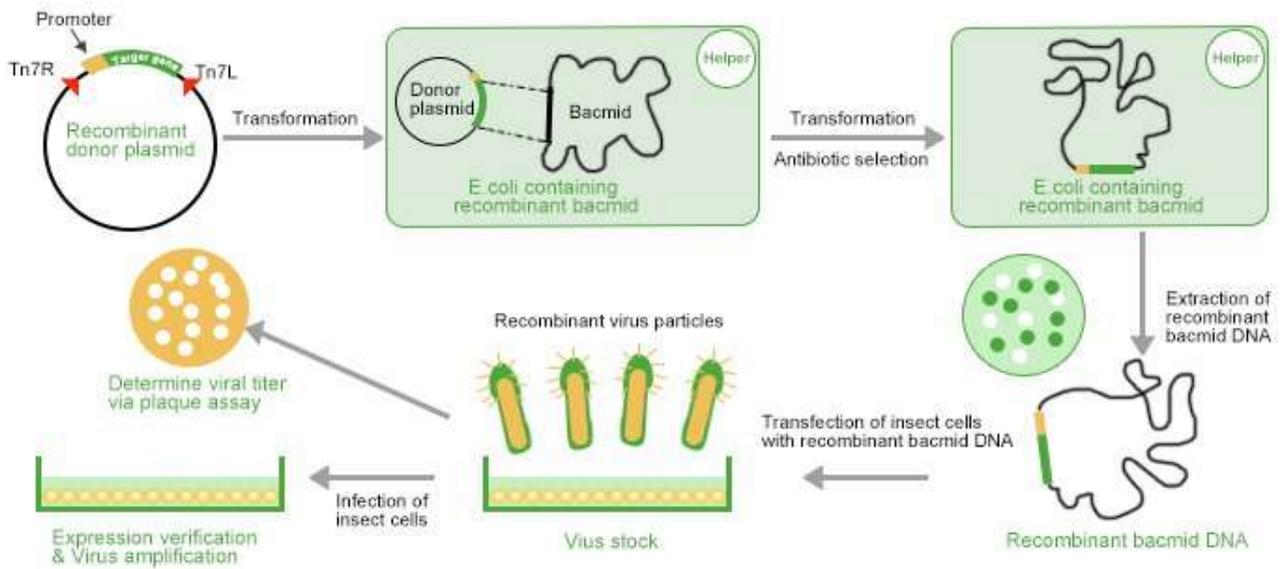


Figure 14: Schéma du principe de la production de baculovirus recombinant à l'aide du kit Bac to Bac Baculovirus Expression System

L'obtention du génome de baculovirus recombinant souhaité se fait par un mécanisme de transposition au sein de cette souche bactérienne. En effet, le plasmide *VP2-pFastBacDual* comprend des éléments du transposon bactérien *Tn7*, et le bacmide comprend une cible de ce transposon, notée *mini-attTn7*. Le gène de la protéine VP2 ainsi que le promoteur *polh* vont donc être transposés au sein du bacmide et former le génome du baculovirus recombinant. Les éléments nécessaires à cette transposition, tels que la transposase, sont codés par le plasmide « *helper* » contenu dans la souche DH10Bac.

La mise en culture sur un milieu nutritif adapté de cette souche DH10Bac d'*E. coli* contenant le bacmide recombinant permet à celui-ci d'être répliqué et transmis lors de chaque division bactérienne. Après cette mise en culture, les bactéries forment des colonies visibles sur le milieu gélosé, et les colonies formées de bactéries possédant le bacmide recombinant doivent être différenciées des colonies formées de bactéries pour lesquelles le mécanisme de transposition n'a pas fonctionné. À cette fin, le gène *lacZ* codant pour une beta-galactosidase a été inséré sur le bacmide initial de telle sorte que lorsqu'une transposition a lieu sur le site *mini-attTn7*, le gène *lacZ* ne s'exprime plus. Ainsi, sur un milieu nutritif supplémenté en X-gal, substrat chromogénique de la beta-galactosidase, il devient aisé de différencier les colonies contenant le bacmide recombinant, qui seront blanches, des colonies contenant un bacmide non modifié, qui seront bleues. En effet, le X-gal, une fois hydrolysé par la beta-galactosidase, libère un composé de

couleur bleue précipitant à l'endroit de la réaction. Il suffit donc de prélever les colonies restées blanches avant de poursuivre.

Cette opération a été effectuée quatre fois en parallèle, une fois pour chaque génome de baculovirus recombinant produit. Chaque génome de baculovirus ainsi obtenu a été extrait par une lyse alcaline. Ensuite, une transfection de chacun de ces quatre génomes a été réalisée à l'intérieur de cellules de *Spodoptera frugiperda* (également appelées cellules Sf9), mises en culture avec le milieu TNM-FH de Thermo Fisher Scientific, à l'aide du réactif de transfection Cellfectin, fourni par Thermo Fischer Scientific. *Spodoptera frugiperda*, également appelé le légionnaire d'automne, est une espèce de lépidoptères dont la chenille est un ravageur de cultures de maïs ou de coton, notamment. Cette transfection a permis la production et l'amplification de particules virales (ou virions) de baculovirus recombinants par les cellules Sf9.

À réception des suspensions virales contenant les quatre baculovirus recombinants produits par un laboratoire extérieur (1,5 ml de chaque suspension), ceux-ci ont été réamplifiés sur cellules Sf9. Nous avons ainsi inoculé 200 µl de chacune des quatre suspensions reçues sur 5 flasques de 175 cm² contenant 20.10⁶ cellules Sf9 chacune, ce qui représente un total de 20 flasques. L'incubation a duré 6 jours et s'est faite à 27°C. En parallèle, 2 flasques de 175 cm² de cellules Sf9 ont été incubées dans les mêmes conditions avec un baculovirus sauvage ne possédant pas le gène de la polyhédrine.

d) PRODUCTION DES PROTÉINES VP2 RECOMBINANTES SUR CELLULES Hi5

Les baculovirus recombinants obtenus ont été inoculés séparément sur des cellules de *Trichoplusia ni*, également appelées cellules Hi5, mises en cultures avec le milieu Express High-Five de Thermo Fisher Scientific. *Trichoplusia ni* est une autre espèce de lépidoptère, aussi désignée comme la fausse-arpenreuse du chou. Chaque suspension de baculovirus amplifié a ainsi été inoculée sur 20.10⁶ cellules Hi5 dans des flasques de 175 cm² pendant 6 jours, à 27°C, ce qui représente un total de 15 flasques de 175 cm² pour chaque type de baculovirus recombinant (soit un total de 60 flasques pour les 4 baculovirus), et 6 flasques pour le baculovirus sauvage. Lors de cette incubation, les baculovirus recombinants vont infecter les cellules Hi5, et le gène codant la protéine VP2 introduit au sein de leur génome va s'exprimer, induisant la production de cette protéine en grande quantité par la machinerie cellulaire, en lieu et place de la polyhédrine normalement produite par un baculovirus sauvage.

À l'issue de cette phase d'incubation, l'ensemble des cellules et du milieu a été collecté séparément, ce qui a représenté un total d'environ 270 ml pour chaque baculovirus recombinant et de 30 ml pour le baculovirus sauvage.

Les protéines recombinantes de bufavirus et de tusavirus induites par nos baculovirus et produites par les cellules d'insecte infectées ne sont pas ou mal excrétées dans le milieu extérieur. Il est donc nécessaire de lyser les cellules d'insecte collectées à l'issue de l'incubation afin de pouvoir récupérer les protéines en suspension. Pour cela, plusieurs cycles de congélation et décongélation ont été effectués à l'aide d'azote liquide. On obtient ainsi un lysat cellulaire pour chaque baculovirus.

Le lysat cellulaire issu de l'infection de cellules Hi5 par le baculovirus sauvage a ensuite été centrifugé dans une ultracentrifugeuse basse vitesse Super T-21 (Sorvall). Afin d'éliminer les membranes cellulaires, les lysats ont été centrifugés à 6.000 x g à 4°C pendant 30 minutes avec un rotor SL-250T (Sorvall). Les surnageants ont été ensuite centrifugés à 14.000 x g à 4°C pendant 30 minutes avec un rotor SL-50T (Sorvall) pour éliminer les débris cellulaires résiduels. Le surnageant de la culture a été filtré sur pores de 0,22 µm de diamètre afin de purifier le baculovirus en suspension. Ce lysat cellulaire centrifugé, que nous désignerons comme lysat cellulaire témoin, a été conservé à 4°C jusqu'à la réalisation des tests immuno-enzymatiques.

Les VLP produites par les baculovirus recombinants ont été quant à elles purifiées par une centrifugation à 6.000 x g à 4°C pendant 30 minutes avec un rotor SL-250T (Sorvall). Les surnageants ont été ensuite centrifugés à 14.000 x g à 4°C pendant 30 minutes avec un rotor SL-50T (Sorvall) pour sédimenter le baculovirus recombinant avant d'être ultracentrifugés sur une ultracentrifugeuse Optima™ LX-80 (Beckman). Le surnageant a été centrifugé à l'aide d'un rotor SW32 Ti (Beckman) à 30.000 rpm (environ 150.000 x g) pendant 2 heures à 4°C sur un coussin de sucrose à 30% dans du tampon TNC (50 mM Tris-HCl (pH 7,4), 0,15 M NaCl, 10 mM CaCl₂). Les culots ont ensuite été repris dans 200 à 500 µl de tampon TNC avec de la leupeptine à 0,5 µg/ml (Leupeptine trifluoroacétate, de Sigma-Aldrich), qui est un inhibiteur de protéase, afin de protéger les VLP d'une dégradation enzymatique, et placés à 4°C toute la nuit.

Une électrophorèse en gel de polyacrylamide additionné de laurylsulfate de sodium (ou SDS-PAGE) avec une révélation par coloration non spécifique des protéines au bleu de Coomassie a ensuite été effectuée pour chaque suspension protéique obtenue afin de vérifier la présence des protéines recombinantes formant les VLP et d'apprécier leur degré de pureté (**Figure 15**).

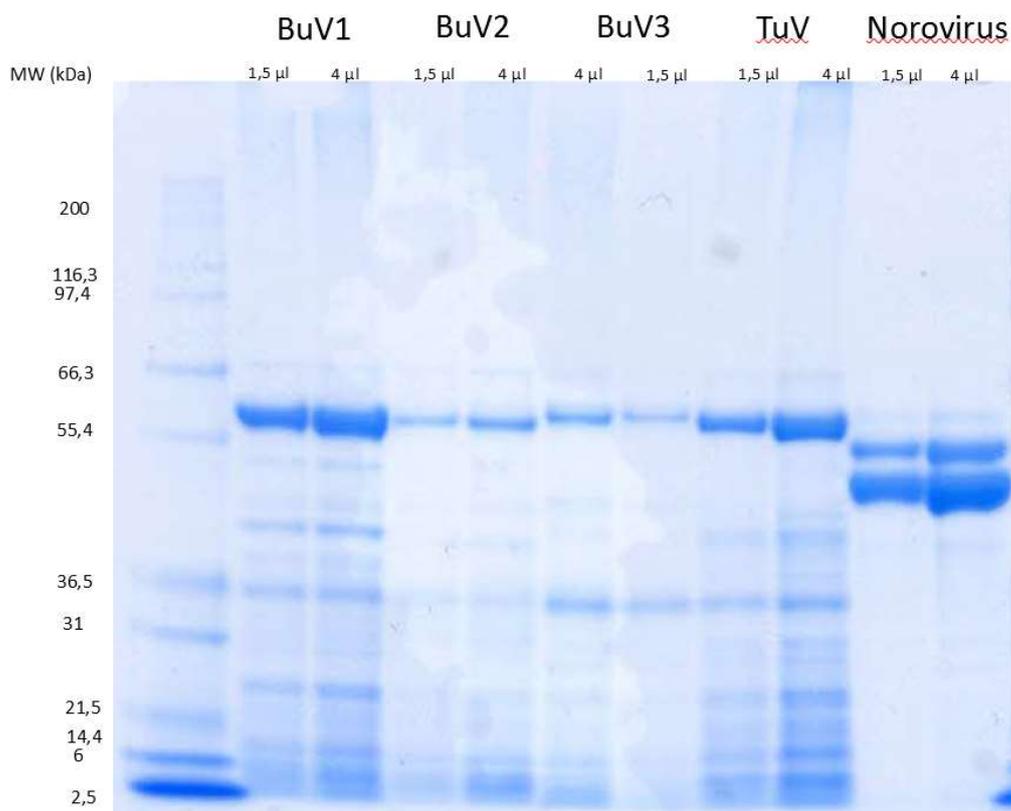


Figure 15: Électrophorèse des suspensions de VLP recombinantes de BuV1, BuV2, BuV3 et TuV comparées à un norovirus GII.4

Cette électrophorèse a montré la présence de protéines d'environ 60 kDa dans chacune des quatre suspensions, ce qui correspond à la taille attendue des VLP. En effet, pour la réalisation de la première étude de séroprévalence de bufavirus et de tusavirus en Finlande, les VLP produites avaient un poids moléculaire de 62 à 64 kDa (34).

Par ailleurs, il est possible de visualiser les VLP de bufavirus et de tusavirus par une observation des suspensions obtenues en microscopie électronique par l'équipe d'Helsinki ci-après (Figure 16).

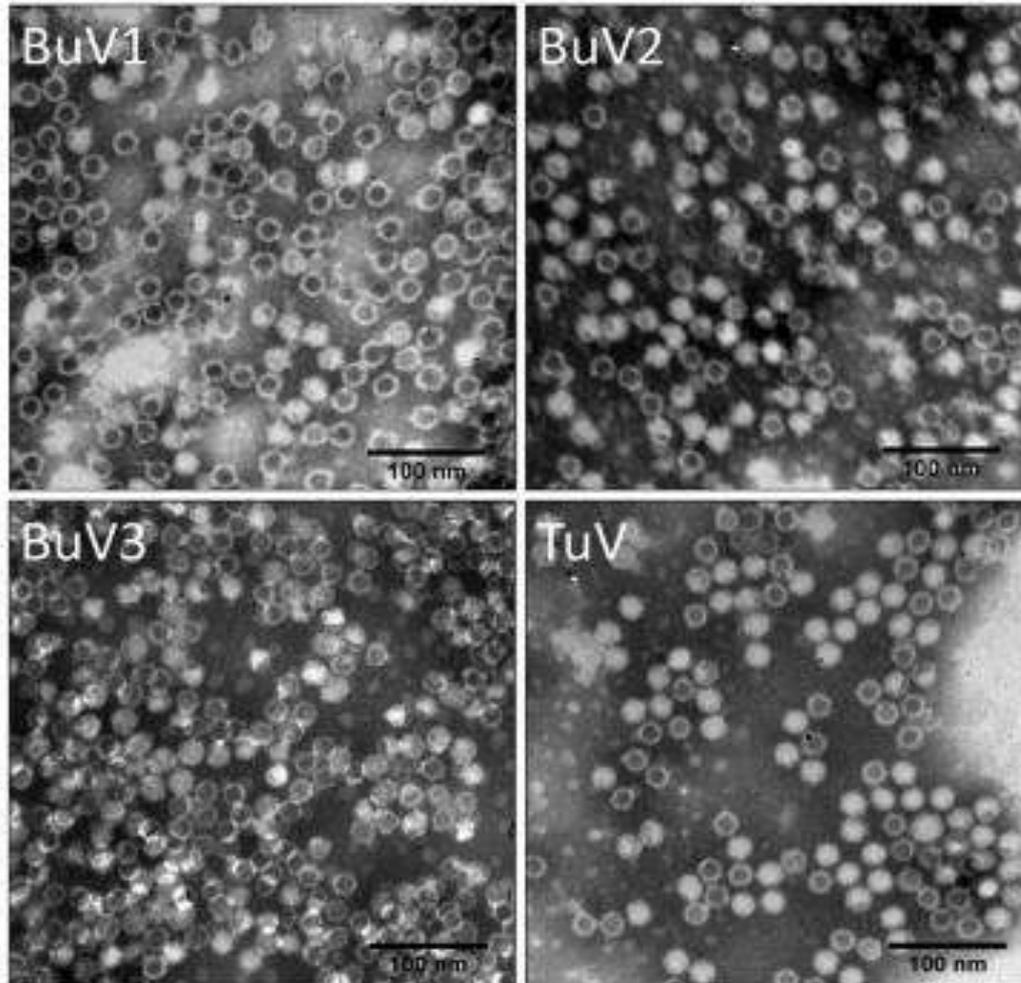


Figure 16: Photographies des VLP de bufavirus (de génotype 1,2 et 3) et de tusavirus observés en microscopie électronique.

L'électrophorèse et la quantification des VLP montrent par ailleurs un meilleur rendement de production pour les VLP de bufavirus de génotype 1 (BuV1) et de tusavirus (TuV), mesurées à 2,2 mg/ml et 1,9 mg/ml respectivement, contre 1,3 mg/ml pour les VLP de bufavirus de génotype 2 (BuV2) et 1,0 mg/ml pour celles de bufavirus de génotype 3 (BuV3). Les protéines totales de chaque suspension ont été dosées et quantifiées à l'aide du kit BC Assay Kit de Uptima. Bien que les bandes les plus intenses de chaque piste d'électrophorèse corresponde aux VLP, on observe également la présence de plusieurs autres protéines de poids moléculaire inférieur, correspondant probablement à des protéines de baculovirus ainsi qu'à des protéines de cellules d'insecte. Enfin, les suspensions de VLP ont chacune été ajustées à 1,0 mg/ml, puis réparties en aliquotes de 30 μ l, avant de subir une congélation rapide en azote liquide puis d'être conservées à -30°C jusqu'à la réalisation des dosages immuno-enzymatiques.

IV - RÉALISATION DES TESTS ELISA

a) PRINCIPE GÉNÉRAL DES TESTS ELISA

Un test ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) est un test immuno-enzymatique développé et mis au point en 1971 par Peter Perlmann et Eva Engvall à l'Université de Stockholm, en Suède (44). Son principe général repose sur l'utilisation d'un support solide sur lequel il est possible de doser un antigène ou un anticorps dans un échantillon par la révélation d'une liaison antigène-anticorps à l'aide d'une réaction enzymatique. Plusieurs déclinaisons de tests ELISA ont été développées à ce jour : tests direct, en « sandwich », ou compétitif en sont quelques exemples.

Dans le cadre de cette étude, nous avons mis au point un test ELISA indirect. Dans ce type de test ELISA, un support solide tel qu'un puits d'une plaque pour microtitration est recouvert d'un antigène, sur lequel est incubé l'échantillon contenant l'anticorps à doser. Celui-ci, lorsqu'il est présent, reconnaît l'antigène et s'y fixe avec une forte affinité. Les éléments non fixés sont ensuite éliminés par un premier lavage. Une seconde incubation est effectuée avec un anticorps anti-immunoglobuline couplé à une enzyme, comme par exemple la peroxydase de Raifort (« *horseradish peroxidase* » ou HRP), suivie d'un autre lavage. Enfin, un substrat chromogène spécifique de l'enzyme est ajouté, comme le 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine (TMB) dans notre exemple.

La densité optique (DO) est mesurée par spectrométrie à l'issue de la réaction. Celle-ci est directement liée à la quantité de substrat catalysée par l'enzyme, elle-même directement liée à la présence de complexes antigène-anticorps sur le support solide. Ainsi, la présence d'anticorps recherchés dans l'échantillon initial entraîne la mesure d'une DO élevée. À l'inverse, une DO faible ou semblable à celle d'un témoin négatif signifie l'absence de ces anticorps (**Figure 17**).

L'absence de témoins positifs et négatifs à notre disposition vis-à-vis des différents virus testés a rendu la mise au point et l'optimisation des conditions du test ELISA indirect délicates. Nous avons cependant tenté d'établir les conditions analytiques adaptées à la bonne discrimination entre un échantillon séropositif et un échantillon séronégatif.

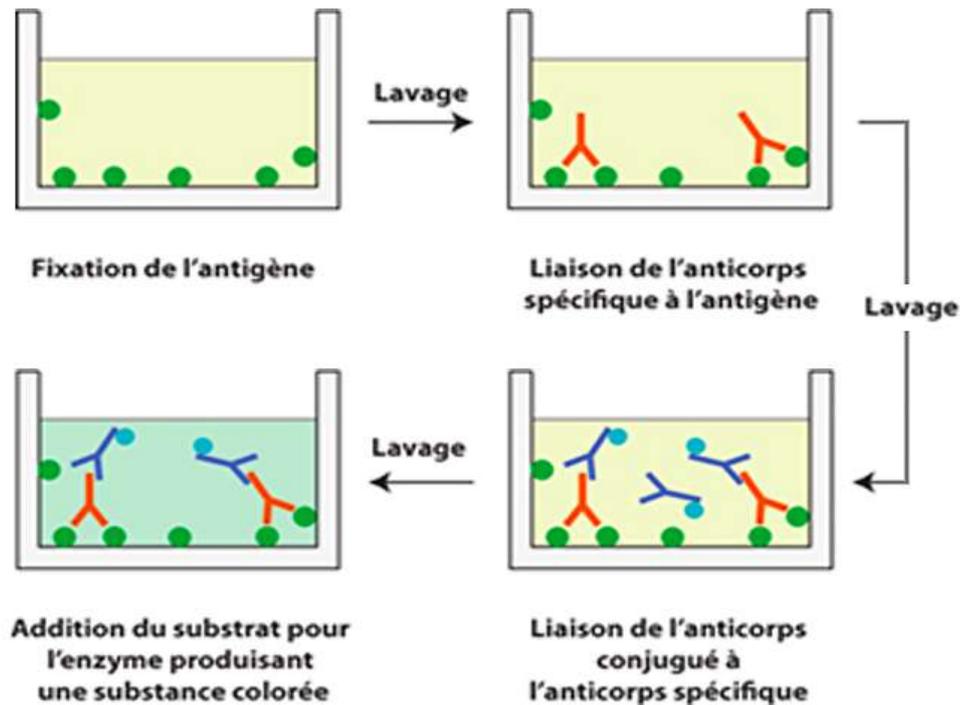


Figure 17: Schéma illustrant le principe d'un test ELISA indirect

b) PROTOCOLE RETENU POUR LA RÉALISATION DES TESTS ELISA INDIRECTS

Nous avons utilisé des barrettes de puits F16 MaxiSorp Loose produites par Thermo Scientific. Nous avons choisi de tester chaque sérum sélectionné séparément pour les quatre types de VLP, et pour le lysat cellulaire témoin (WT). Ainsi, chaque sérum a été incubé dans cinq puits distincts, recouverts pour quatre d'entre eux d'un type de VLP différent (VLP de BuV1, BuV2, BuV3 et TuV) ou bien d'une suspension de lysat cellulaire témoin (WT) pour le cinquième puits. Chacun des puits a été recouvert de 100 ng de VLP dans un volume de 200 μ L de tampon carbonate-bicarbonate, ou bien de 200 μ L de lysat cellulaire témoin dilué au 1/50 dans du tampon carbonate-bicarbonate.

Cette quantité de 100 ng de VLP a été établie après un essai réalisé sur six échantillons aléatoires. Les DO de ces six échantillons ont été mesurées vis-à-vis du BuV1 en faisant varier le facteur de dilution du sérum, et en gardant toujours la quantité de 100 ng de VLP fixée au fond des puits. Les valeurs ainsi obtenues sont représentées sur les **Figures 18 à 23**. On observe une décroissance du signal lorsque le sérum est dilué dans tous les cas, traduisant une situation d'excès d'antigène.

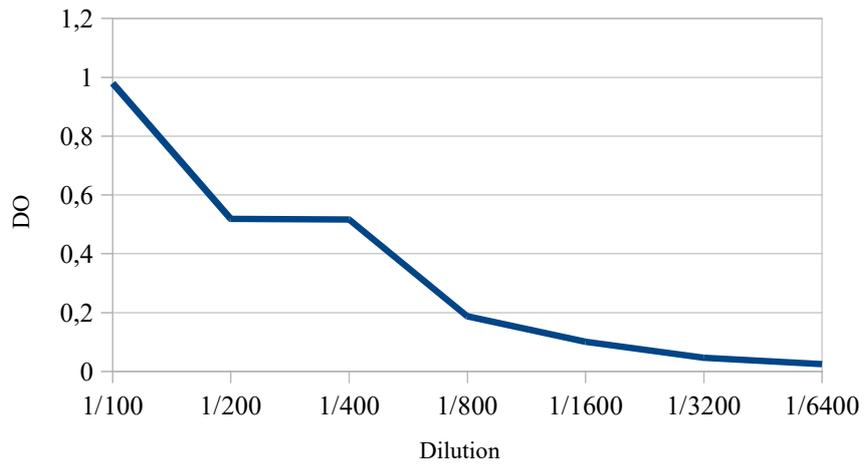


Figure 18: DO mesurées pour l'échantillon aléatoire n°1 à différentes dilutions pour 100 ng de VLP de BuV1

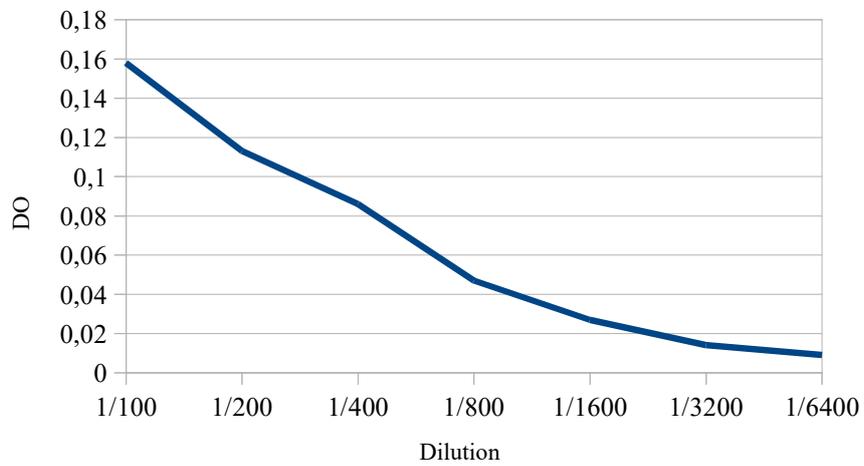


Figure 19: DO mesurées pour l'échantillon aléatoire n°2 à différentes dilutions pour 100 ng de VLP de BuV1

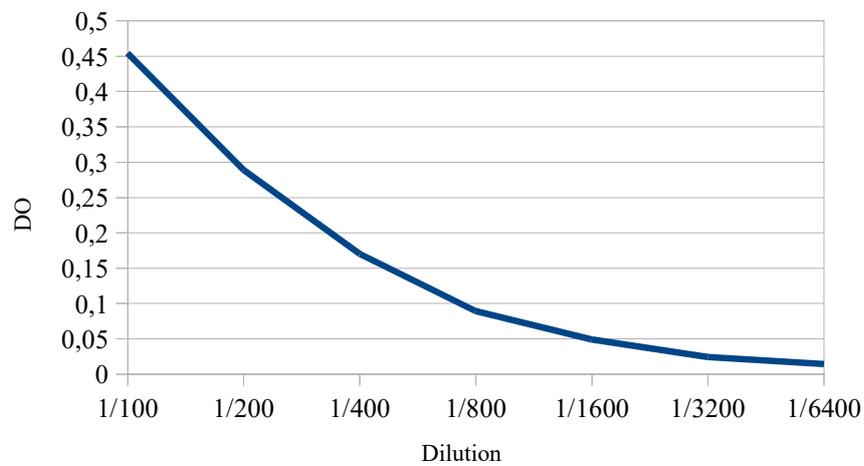


Figure 20: DO mesurées pour l'échantillon aléatoire n°3 à différentes dilutions pour 100 ng de VLP de BuV1

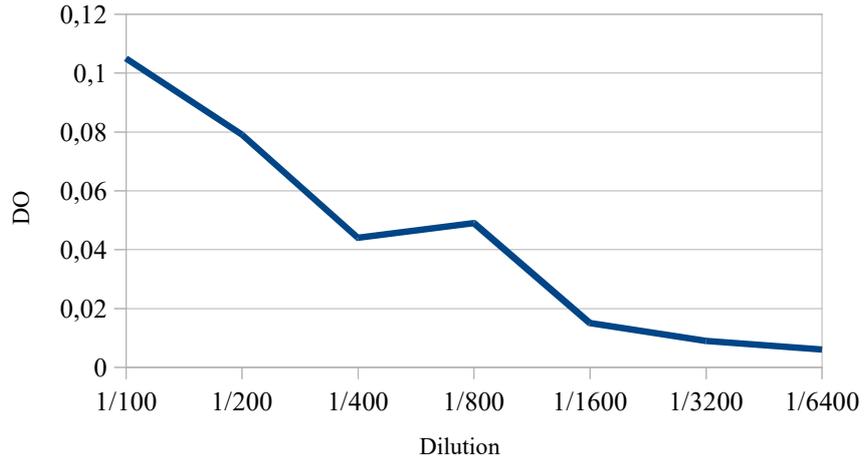


Figure 21: DO mesurées pour l'échantillon aléatoire n°4 à différentes dilutions pour 100 ng de VLP de BuV1

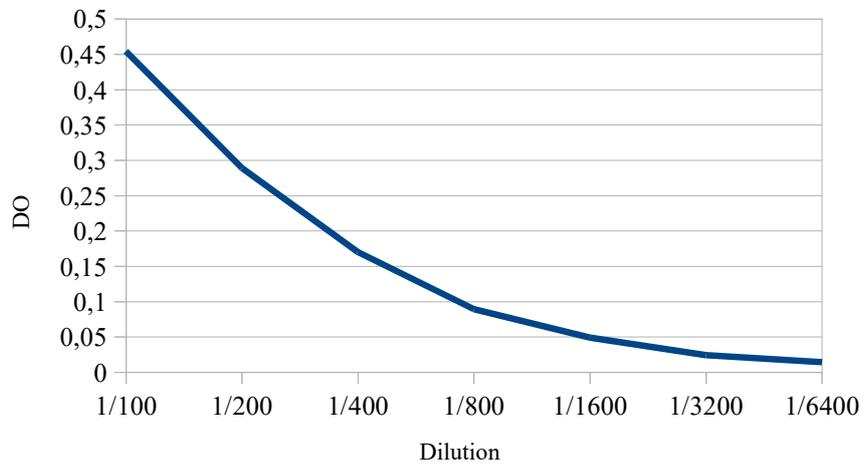


Figure 22: DO mesurées pour l'échantillon aléatoire n°5 à différentes dilutions pour 100 ng de VLP de BuV1

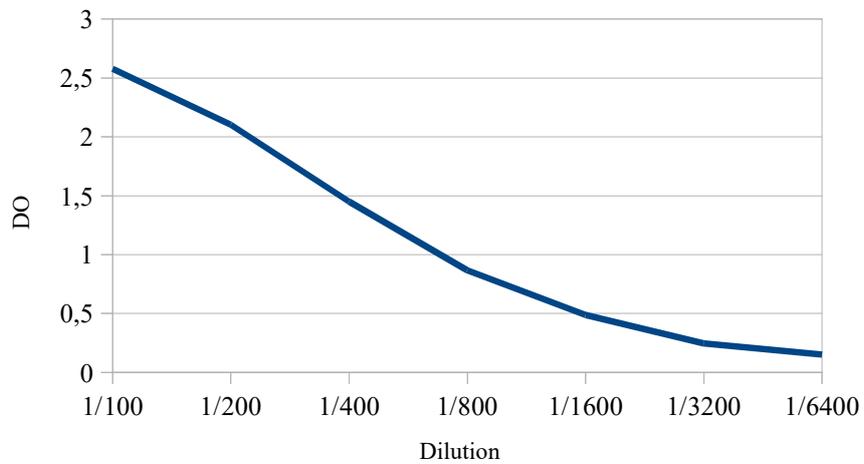


Figure 23: DO mesurées pour l'échantillon aléatoire n°6 à différentes dilutions pour 100 ng de VLP de BuV1

D'autres expérimentations ont été réalisées pour déterminer la quantité de lysat cellulaire témoin à fixer au fond des puits. Elles ont consisté en la mesure des DO de plusieurs échantillons aléatoires vis-à-vis du lysat cellulaire témoin préparé à plusieurs dilutions. Ces mesures ont été répétées pour plusieurs dilutions de chaque échantillon et les résultats de ces essais sont présentés sur les **Figures 24 à 29**.

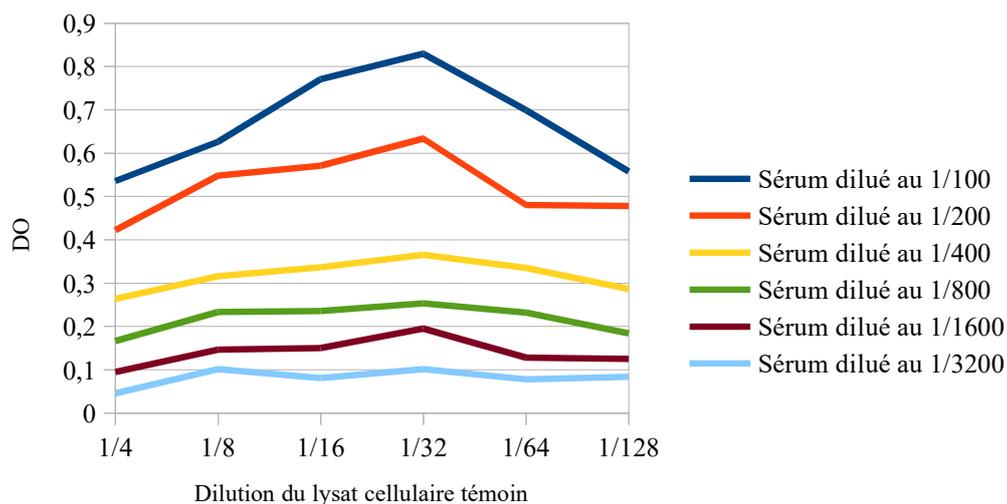


Figure 24: DO mesurées pour l'échantillon aléatoire n°7 en fonction de la dilution du lysat cellulaire témoin

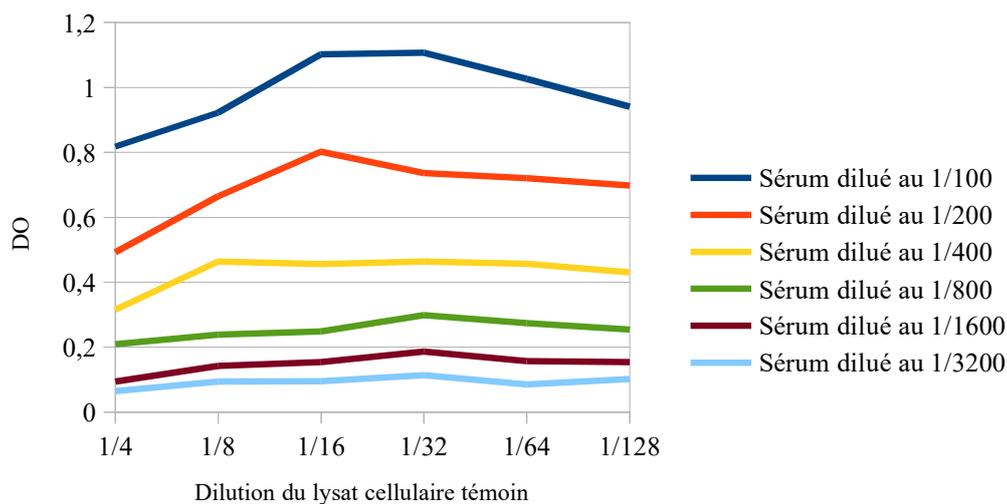


Figure 25: DO mesurées pour l'échantillon aléatoire n°8 en fonction de la dilution du lysat cellulaire témoin

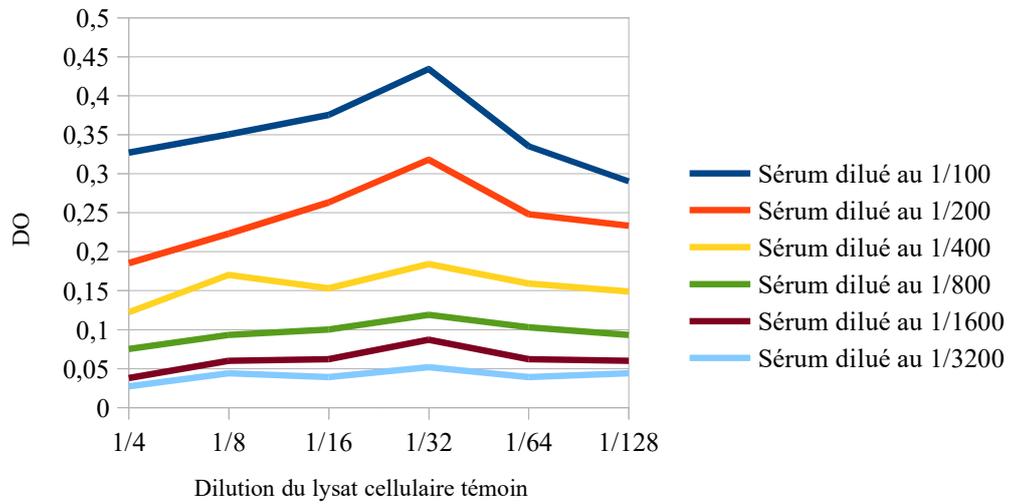


Figure 26: DO mesurées pour l'échantillon aléatoire n°9 en fonction de la dilution du lysat cellulaire témoin

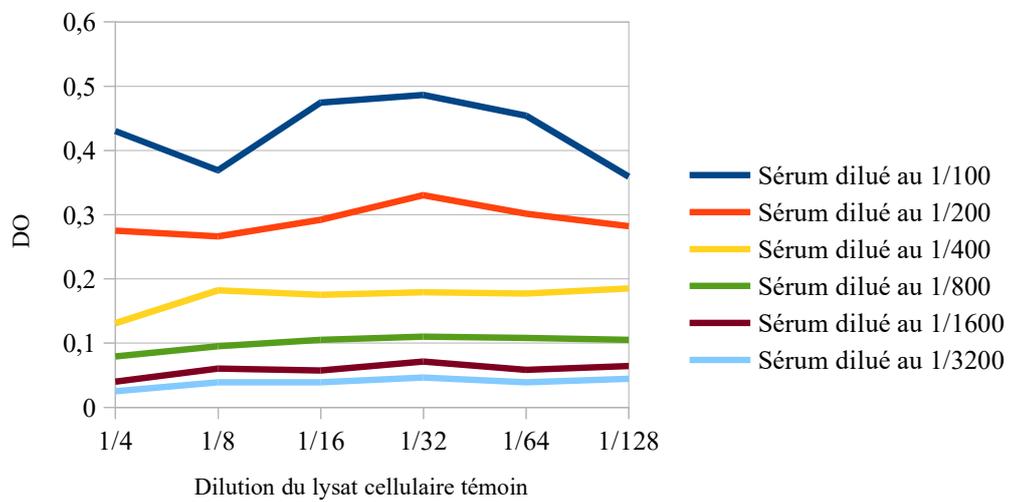


Figure 27: DO mesurées pour l'échantillon aléatoire n°10 en fonction de la dilution du lysat cellulaire témoin

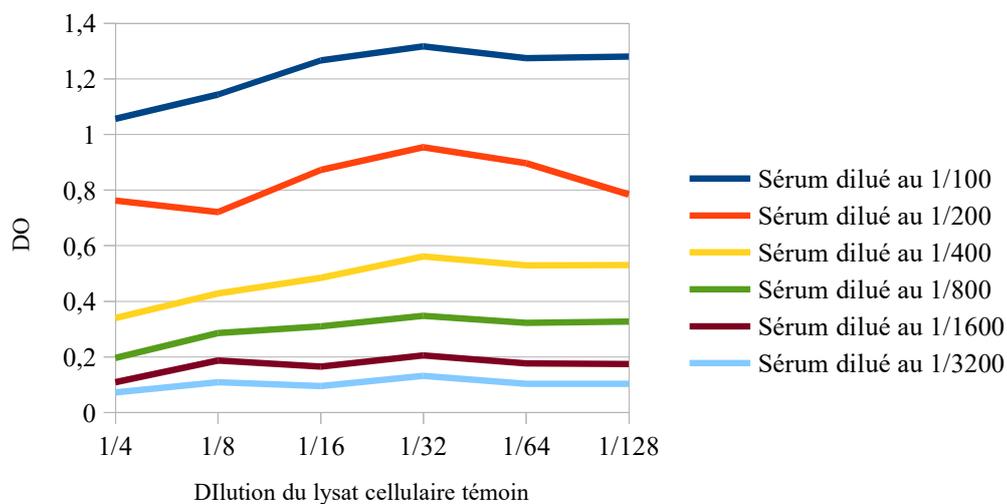


Figure 28: DO mesurées pour l'échantillon aléatoire n°11 en fonction de la dilution du lysat cellulaire témoin

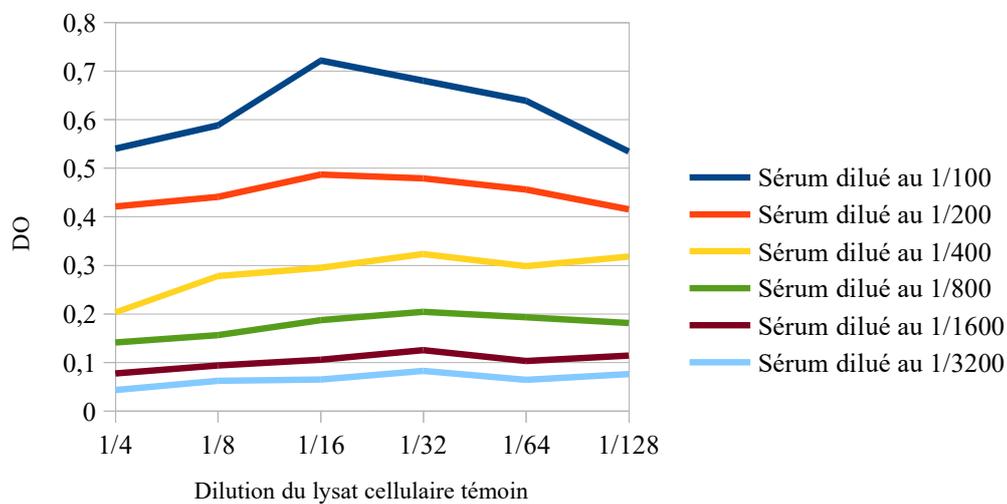


Figure 29: DO mesurées pour l'échantillon aléatoire n°12 en fonction de la dilution du lysat cellulaire témoin

Nous pouvons remarquer d'après ces résultats que pour un sérum dilué d'un facteur supérieur à 400, la quantité de lysat cellulaire n'influe que peu sur la mesure de la DO, et le signal reste linéaire pour des dilutions de lysat cellulaire témoin comprises entre 1/4 et 1/128. Nous avons donc choisi de travailler avec un lysat cellulaire dilué au 1/50 dans un tampon carbonate-bicarbonate pour un volume de 200 µL par puits pour la réalisation des tests ELISA indirects.

Après avoir déposé au fond des puits les VLP ou le lysat cellulaire témoin dilué, ces puits ont été placés pendant 2 h à 37°C. La fixation des protéines au fond des puits est de nature électrostatique.

À l'issue de cette incubation, les puits ont subi deux lavages avec 200 µL de tampon phosphate salin (PBS) 1X additionné de 0,05 % de polysorbate 20 (Tween 20).

Une saturation des puits par 200 µL de protéines de lait de vache écrémé en poudre reconstitué à 4 % dans du tampon PBS 1X est ensuite effectuée pendant 1 h à 37°C. Cette étape permet de s'affranchir de toute fixation non spécifique d'anticorps sur les parois des puits, qui pourrait générer un signal élevé sans formation de complexes antigènes-anticorps.

L'excédent de protéines a été éliminé par trois lavages successifs avec 200 µL de tampon PBS 1x additionné de 0,05 % de Tween 20.

Les puits ont été incubés 1 h à 37°C avec 100 µL de sérum dilué au 1/800 dans du tampon PBS 1x, avant d'être lavés à quatre reprises avec 200 µL de tampon PBS 1x additionné de 0,05 % de Tween 20.

Puis, 100 µL d'un anticorps anti-fragment Fc d'IgG humaine produit chez la chèvre et couplé avec une peroxydase de Raifort (HRP), produit par Millipore, dilué au 1/10.000 dans des protéines de lait de vache écrémé en poudre reconstitué à 4 % dans du tampon PBS 1X, ont été incubés dans chaque puits pendant 45 minutes à 37°C. Quatre derniers lavages avec 200 µL de tampon PBS 1X additionné de 0,05 % de Tween 20 permettent d'éliminer les anticorps couplés à l'HRP qui ne se sont pas fixés aux complexes antigène-anticorps.

Enfin, 100 µL d'une solution de 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine (TMB) produite par SeraCare sont déposés dans chaque puits et incubés pendant 10 minutes à température ambiante, avant que la réaction ne soit arrêtée par l'ajout de 50 µL d'une solution d'acide chlorhydrique 1N. La réaction enzymatique catalysée par l'HRP transforme le TMB, composé incolore, en un composé

oxydé de couleur bleue (**Figure 30**). L'ajout d'acide chlorhydrique provoque un changement de couleur de la solution, qui devient alors jaune. La densité optique (DO) de chaque puits est aussitôt lue à 450 nm à l'aide d'un lecteur de plaques PR4100 fabriqué par BioRad.

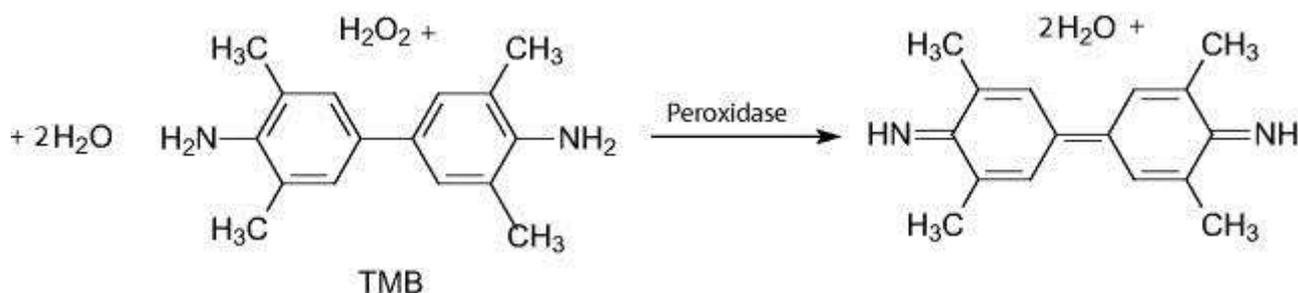


Figure 30: Réaction catalysée par l'enzyme HRP, oxydant le substrat TMB en produit coloré

V - DÉTERMINATION DE LA LIAISON DES VLP DE BUFAVIRUS AUX ANTIGÈNES TISSULAIRES DE GROUPE SANGUIN

a) PRINCIPE GÉNÉRAL

La mise en évidence d'une éventuelle fixation de bufavirus et de tusavirus aux antigènes tissulaires de groupes sanguins (HBGA pour « *human blood group antigens* ») peut être réalisée à l'aide d'un test ELISA indirect adapté. En effet, il suffit de reproduire un test ELISA indirect à partir d'un échantillon séropositif à bufavirus ou à tusavirus et des VLP correspondantes, mais en fixant préalablement des HBGA au fond des puits. Ainsi, par exemple, en cas de fixation de bufavirus aux antigènes de groupe sanguin ABO, les anticorps anti-bufavirus contenus dans l'échantillon sélectionné viendront s'y fixer, mais pas en cas d'absence de liaison entre bufavirus et ces antigènes, car les VLP non fixées auront été éliminées par des lavages.

b) ORIGINE ET PRÉPARATION DES HBGA

Trois échantillons salivaires ont été recueillis à partir d'individus de groupe sanguin A, B, et O. La salive des individus contient en effet des antigènes de groupe sanguin du système ABO (dénommés A, B et H), de nature osidique, qui y sont sécrétés, à l'exception de celle des individus

dits « non sécréteurs », qui en est dépourvue. Un échantillon de salive provenant d'un tel individu a également été recueilli, pour un total final de quatre échantillons.

Ces salives ont été chauffées pendant 10 minutes à 95°C, centrifugées une première fois pendant 2 minutes à 3.000 rpm, puis le surnageant a été centrifugé une seconde fois pendant 10 minutes à 10.000 rpm. Le surnageant ainsi obtenu a ensuite été conservé à -20°C jusqu'à la réalisation des expérimentations.

c) ÉCHANTILLONS DE SÉRUM SÉLECTIONNÉS

Quatre échantillons de sérum ont été sélectionnés pour la réalisation de ces expérimentations : un échantillon séronégatif pour les virus testés, un échantillon séropositif uniquement au BuV1, un autre séropositif uniquement au BuV2 et enfin un dernier uniquement séropositif au BuV3. Ils ont été dilués au 1/800 dans un tampon PBS et ont tous été incubés une nuit à température ambiante avec un mélange des échantillons salivaires utilisés, afin de s'affranchir autant que possible de réactions entre les antigènes tissulaires de groupe sanguin présents dans les échantillons salivaires fixés au fond des puits et les anticorps présents dans les échantillons de sérum.

d) PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL RETENU

Pour la réalisation de ces expérimentations, la fixation des antigènes de groupe sanguin au fond des puits a été réalisée à partir des échantillons salivaires. Ces derniers ont été préalablement dilués au 1/1 000 dans un tampon carbonate-bicarbonate, puis 200 µL ont été déposés au fond des puits pendant une nuit à 37°C.

Les puits ont ensuite été saturés par des protéines de lait de vache, puis les antigènes de groupe sanguin ont été recouverts de 500 ng de VLP. Les conditions de saturation et de lavage, la nature et la dilution de l'anticorps secondaire, la dilution du sérum déposé, la révélation au TMB ainsi que la lecture de la DO des puits ont été identiques à celles définies plus haut.

Chaque échantillon de sérum a ensuite subi différents tests ELISA indirects afin de déterminer une éventuelle liaison entre les VLP de bufavirus et les HBGA.

Une première expérimentation a confirmé la séropositivité ou la séronégativité des échantillons sélectionnés contre les VLP seules, dans les mêmes conditions analytiques que les tests réalisés précédemment.

Une deuxième expérimentation a vérifié la persistance d'anticorps anti-bufavirus et de réactivité des échantillons de sérum contre les VLP seules après une incubation nocturne avec des échantillons salivaires.

Puis, une troisième expérimentation a mesuré le signal obtenu pour chaque échantillon séropositif en incubant ces sérums au contact de puits recouverts d'échantillons salivaires recouverts de VLP. Plus précisément, chacun de ces trois échantillons de sérum a été déposé dans huit puits, dont quatre paires recouvertes chacune d'un échantillon salivaire différent et recouvert du type de VLP contre lequel le sérum réagit. Par exemple, l'échantillon séropositif au BuV1 a été déposé dans huit puits, dont deux recouverts d'un échantillon de salive d'un individu de groupe A, deux puits recouverts d'un échantillon de salive d'un individu de groupe B, deux puits recouverts d'un échantillon de salive d'un individu de groupe O et enfin deux puits recouverts d'un échantillon de salive d'un individu « non sécréteur », et l'ensemble de ces huit puits a été recouvert de VLP de BuV1 par-dessus les salives. L'échantillon de sérum séronégatif a, quant à lui, été déposé dans autant de puits recouverts des mêmes échantillons salivaires, mais ceux-ci ont été recouverts d'un mélange de VLP de BuV1, BuV2 et BuV3.

Enfin, une quatrième et dernière expérimentation a été réalisée en parallèle, cherchant à vérifier le degré de réactivité des sérums préalablement incubés pendant une nuit avec les échantillons salivaires utilisés. Cette expérimentation a reproduit les conditions de la troisième, la seule différence consistant en l'absence de VLP recouvrant les HBGA déposés au fond des puits. Cela nous a permis de comparer les DO obtenues à partir de puits recouverts de salive et de VLP avec celles obtenues à partir de puits recouverts de salive seule.

C. RÉSULTATS

I - RÉSULTATS DES TESTS SÉROLOGIQUES

a) RÉSULTATS BRUTS ET TRAITEMENT STATISTIQUE DES DONNÉES

Pour chacun des 844 échantillon analysés, nous avons obtenu, à l'issue des tests ELISA indirects, un ensemble de 5 valeurs de DO : une valeur de DO pour chaque type de VLP (soit 4 valeurs de DO) et une autre valeur de DO pour le lysat cellulaire témoin. L'ensemble des résultats bruts figure en annexe. L'enjeu est désormais de tenter d'établir des seuils de positivité et de négativité vis-à-vis de chacun des quatre virus testés.

À cette fin, visualisons d'abord les distributions de fréquences des DO mesurées pour chaque type de VLP et pour chaque échantillon. Celles-ci sont représentées sur les **Figures 31** à **34**.

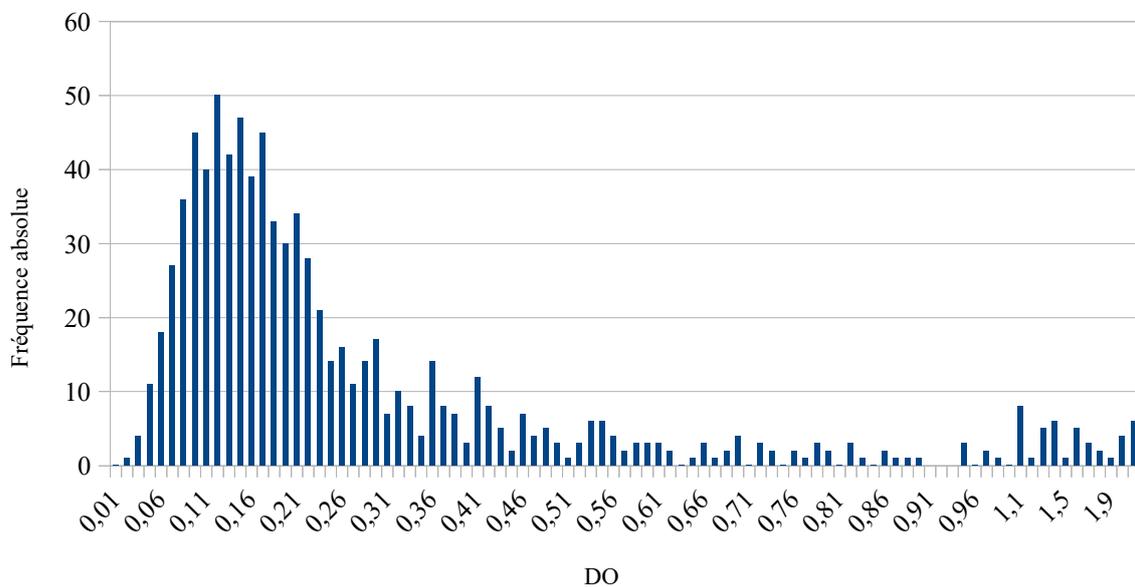


Figure 31: Distribution de fréquences des DO mesurées pour le BuV1 pour l'ensemble des échantillons (en abscisse, changement d'échelle à partir de 1 ; la dernière classe correspond aux valeurs >2)

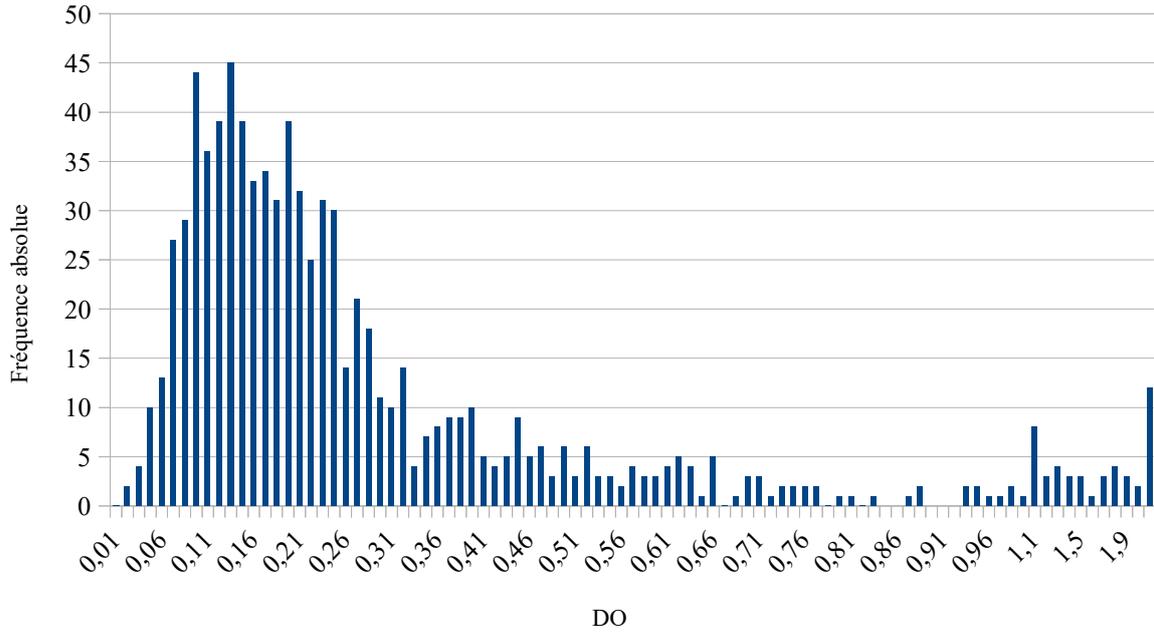


Figure 32: Distribution de fréquences des DO mesurées pour le BuV2 pour l'ensemble des échantillons (en abscisse, changement d'échelle à partir de 1 ; la dernière classe correspond aux valeurs >2)

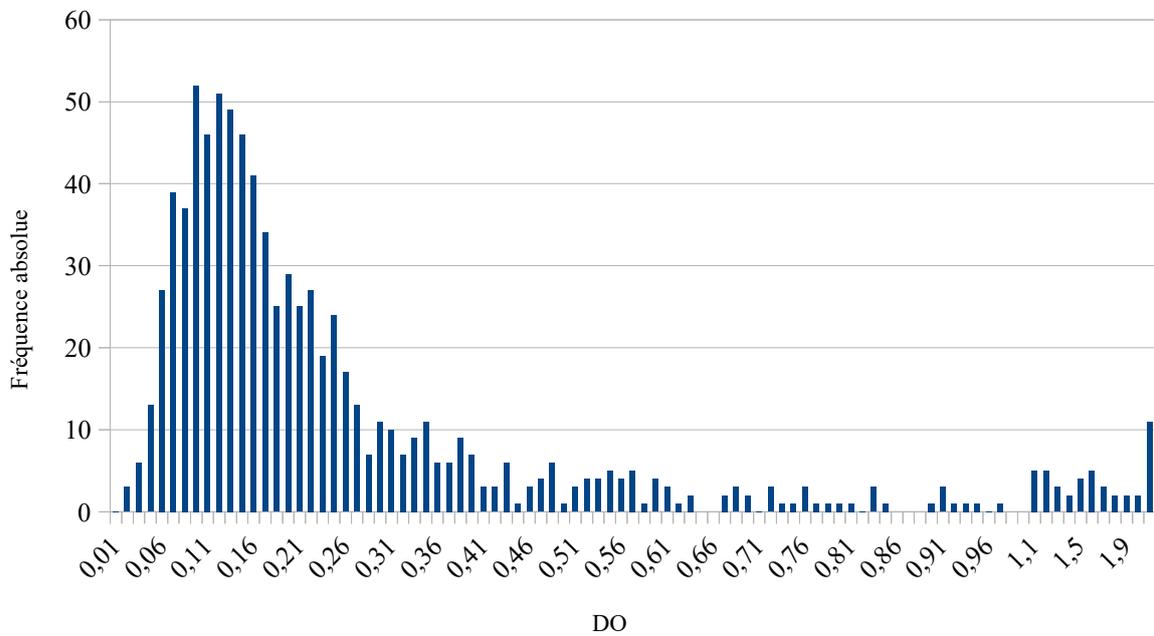


Figure 33: Distribution de fréquences des DO mesurées pour le BuV3 pour l'ensemble des échantillons (en abscisse, changement d'échelle à partir de 1 ; la dernière classe correspond aux valeurs >2)

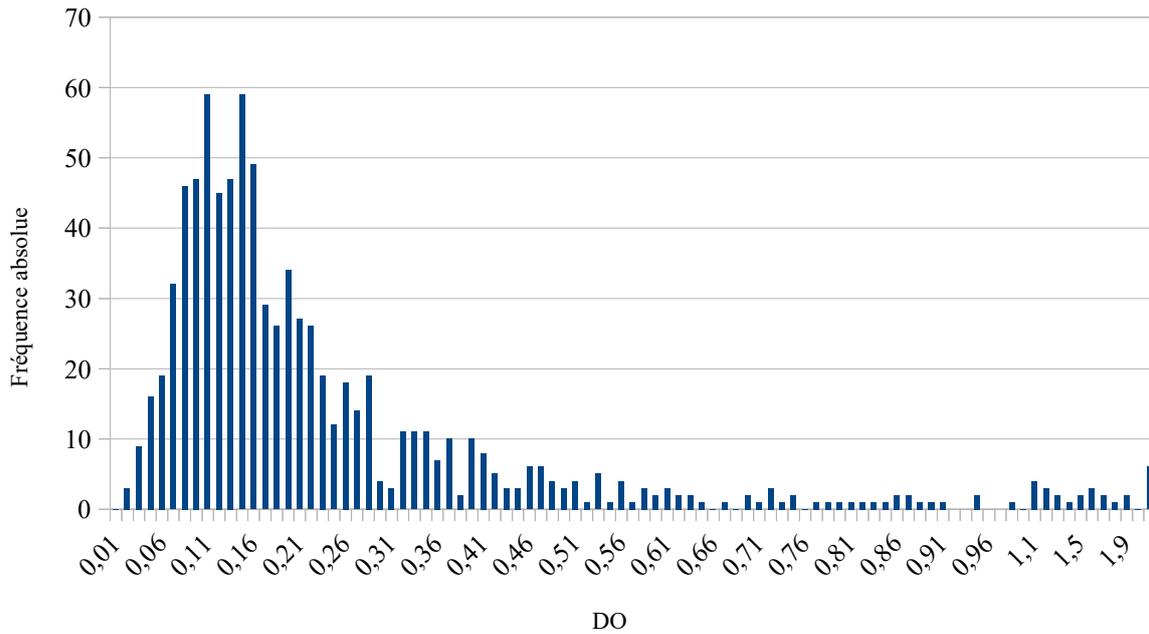


Figure 34: Distribution de fréquences des DO mesurées pour le TuV pour l'ensemble des échantillons (en abscisse, changement d'échelle à partir de 1 ; la dernière classe correspond aux valeurs >2)

Il apparaît ainsi que les distributions de fréquences des DO obtenues pour chaque type de VLP ont, dans leur partie gauche (et donc pour des valeurs de DO plus faibles), une allure gaussienne, comprenant la majorité des valeurs mesurées. Par ailleurs, les distributions s'étalent dans leur partie droite, jusqu'à des valeurs de DO atteignant 2, voire plus pour certains échantillons. Il pourrait donc être considéré que les échantillons ayant les valeurs de DO classées à gauche de ces distributions de fréquences soient négatifs, et nous pourrions définir un seuil à partir de chacune de ces figures au dessus duquel un échantillon sera considéré séropositif au virus concerné.

Cependant, l'observation de la distribution de fréquences des DO mesurées vis-à-vis du lysat cellulaire témoin représentée sur la **Figure 35** montre que celle-ci est similaire à celles des DO obtenues pour les VLP, avec une allure gaussienne en partie gauche et un étalement en partie droite jusqu'à des valeurs aussi élevées que celles observées pour les différentes VLP. Certains échantillons présentent donc une réactivité élevée vis-à-vis de ce lysat cellulaire témoin. Par ailleurs, ces échantillons présentent également une forte réactivité vis-à-vis des différentes VLP,

comme on peut l'observer dans le **Tableau 6**, qui reprend l'ensemble des DO mesurées pour quelques échantillons ayant une forte réactivité vis-à-vis du lysat cellulaire témoin.

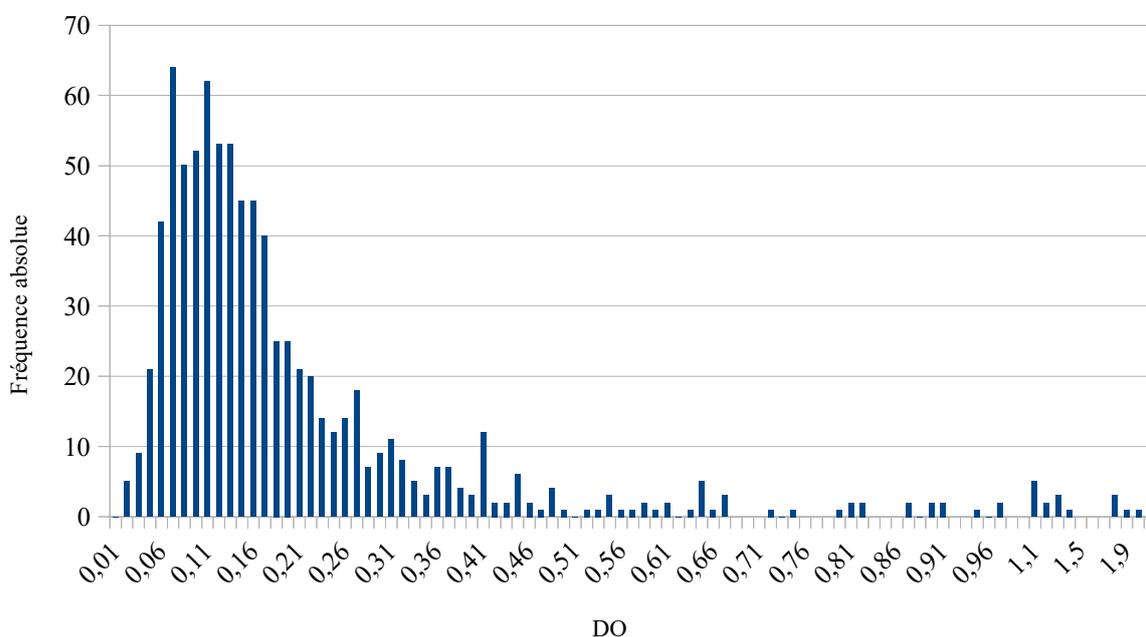


Figure 35: Distribution de fréquences des DO mesurées pour le lysat cellulaire témoin pour l'ensemble des échantillons (en abscisse, changement d'échelle à partir de 1 ; la dernière classe correspond aux valeurs >2)

Tableau 6: Exemples de DO mesurées pour quelques échantillons avec une forte réactivité vis-à-vis du lysat cellulaire témoin

Échantillon	DO BuV1	DO BuV2	DO BuV3	DO TuV	DO WT
H12-2	2,550	2,725	2,194	2,317	2,723
D1-4	2,693	3,019	2,592	2,990	2,686
C10-4	2,347	2,393	2,473	2,614	2,454
H4-6	2,774	3,137	3,043	2,533	2,362
G4-5	1,750	1,436	2,158	2,064	2,303

Rappelons ici que le lysat cellulaire témoin (WT) ne contient pas de VLP de bufavirus ni de VLP de tusavirus, et qu'il est issu de l'infection d'une lignée cellulaire Hi5 par un baculovirus sauvage. Il se compose donc pour l'essentiel de protéines de cellules d'insecte et de protéines produites par un baculovirus sauvage (à l'exception de la polyhédrine). Les suspensions de VLP,

quant à elles, malgré l'étape de purification par ultracentrifugation sur coussin de saccharose qu'elles ont subie, comprennent toujours quelques protéines résiduelles de cellules d'insecte et de baculovirus en sus, comme en témoignent les électrophorèses SDS-PAGE réalisées à partir de ces suspensions (**Figure 15**). Ainsi, la réactivité importante vis-à-vis des différentes VLP des échantillons tels que ceux donnés en exemple dans le **Tableau 6** est très certainement due aux protéines autres que les VLP contenues dans les suspensions utilisées comme source d'antigène, et il serait donc inexact de les considérer séropositifs à bufavirus ou à tusavirus.

La nature et le mode d'obtention du lysat cellulaire témoin et des différentes VLP n'étant pas identiques, la réalisation d'une simple soustraction de la DO mesurée pour le lysat cellulaire témoin aux DO mesurées pour les VLP serait impropre. Nous proposons donc de calculer, pour chaque échantillon, quatre rapports nommés $rapport_{BuV1}$, $rapport_{BuV2}$, $rapport_{BuV3}$ et $rapport_{TuV}$ tels que :

$$rapport_{BuV1} = \frac{DO_{BuV1}}{DO_{\text{lysate cellulaire témoin}}}$$

$$rapport_{BuV2} = \frac{DO_{BuV2}}{DO_{\text{lysate cellulaire témoin}}}$$

$$rapport_{BuV3} = \frac{DO_{BuV3}}{DO_{\text{lysate cellulaire témoin}}}$$

$$rapport_{TuV} = \frac{DO_{TuV}}{DO_{\text{lysate cellulaire témoin}}}$$

Observons désormais sur les **Figures 36 à 39** les distributions de fréquences de ces quatre nouvelles grandeurs. Les allures de ces distributions sont semblables à celles représentées précédemment à partir des données brutes de DO. Cependant, les échantillons correspondant aux valeurs situées le plus à droite sont ceux pour lesquels le rapport entre les DO mesurées vis-à-vis d'un type de VLP et la DO mesurée pour le lysat cellulaire témoin est le plus grand, et les rapports des échantillons tels que ceux donnés en exemple dans le **Tableau 6** se retrouvent désormais dans la partie gauche de ces distributions de fréquence, étant donné que tous leurs rapports sont inférieurs à 2. Nous pouvons supposer que l'ensemble des échantillons figurant dans la partie gauche de ce graphique forment la population des échantillons séronégatifs vis-à-vis du virus considéré.

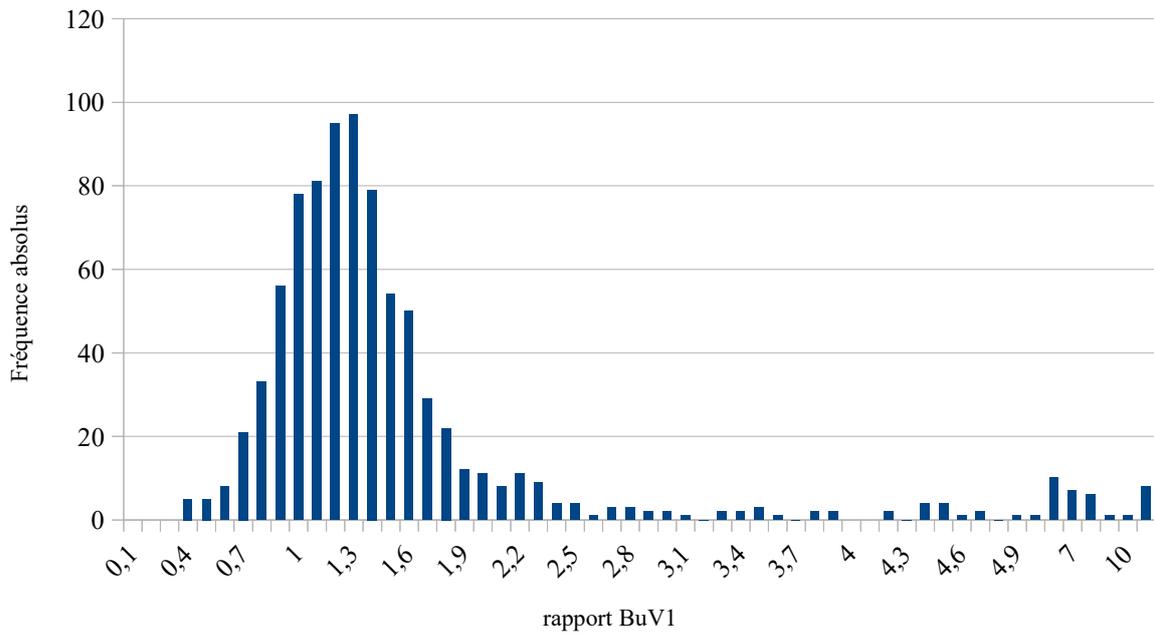


Figure 36: Distribution de fréquences des rapports BuV1 pour l'ensemble des échantillons (en abscisse, rupture d'échelle à partir de 5 ; la dernière classe correspond aux valeurs >10)

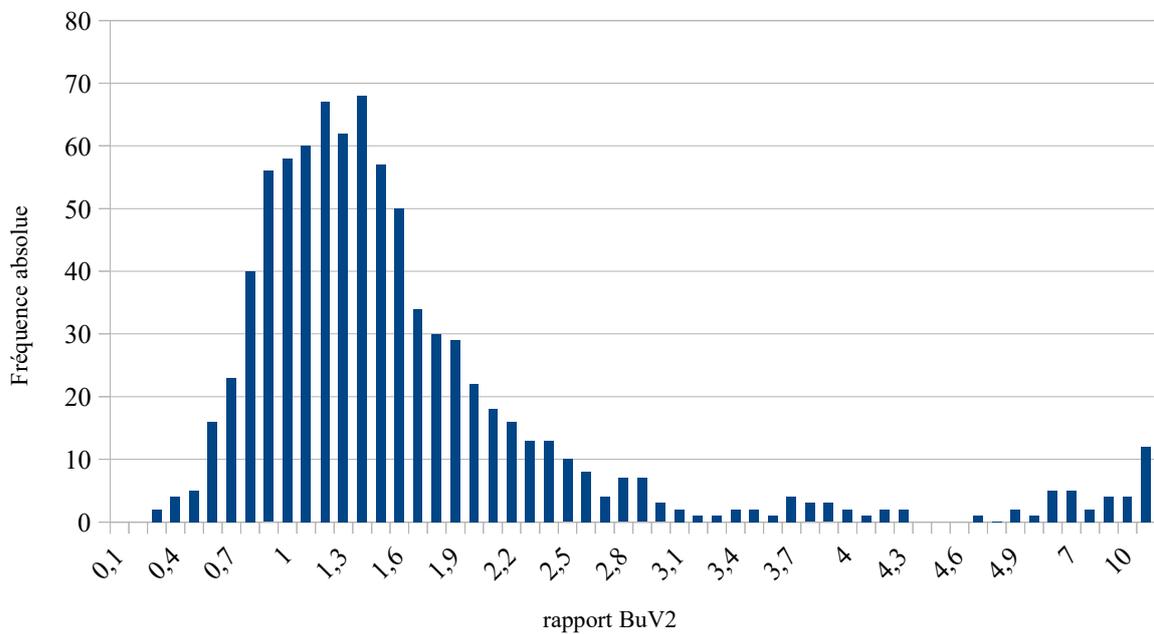


Figure 37: Distribution de fréquences des rapports BuV2 pour l'ensemble des échantillons (en abscisse, rupture d'échelle à partir de 5 ; la dernière classe correspond aux valeurs >10)

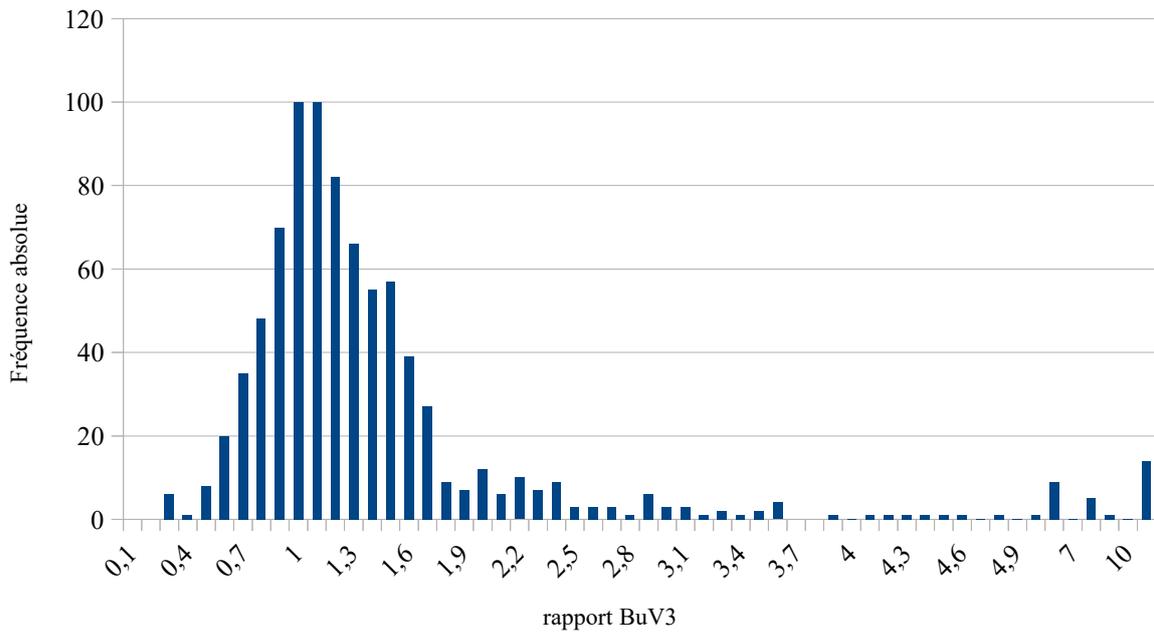


Figure 38: Distribution de fréquences des rapports BuV3 pour l'ensemble des échantillons (en abscisse, rupture d'échelle à partir de 5 ; la dernière classe correspond aux valeurs >10)

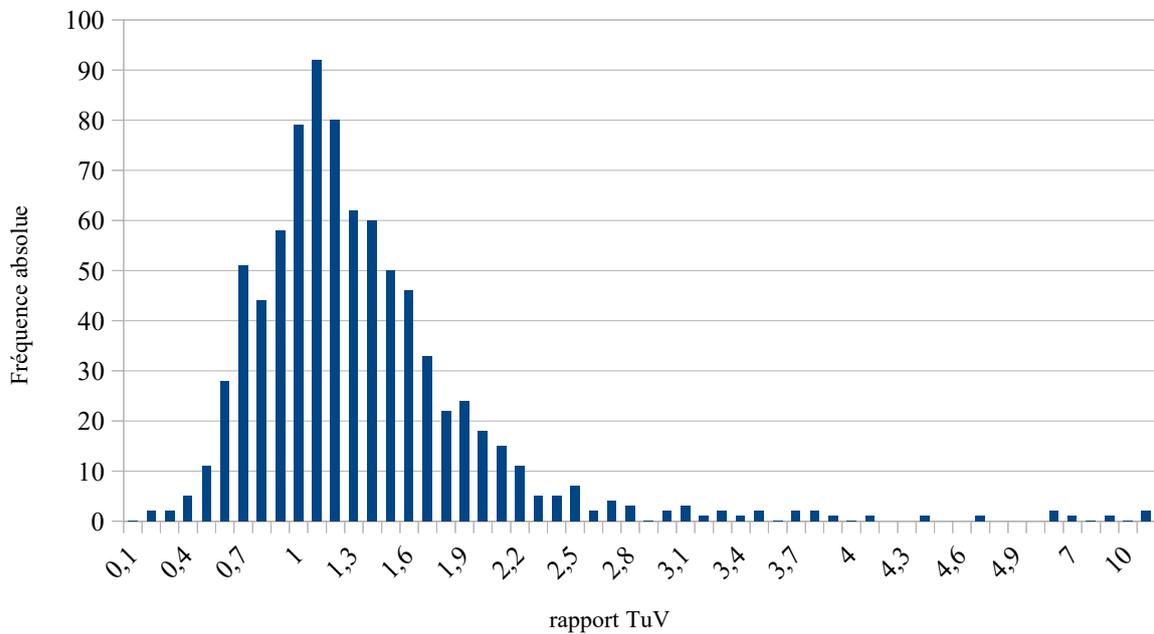


Figure 39: Distribution de fréquences des rapports TuV pour l'ensemble des échantillons (en abscisse, rupture d'échelle à partir de 5 ; la dernière classe correspond aux valeurs >10)

Nous nous attendons donc à ce que les échantillons séropositifs à l'un des quatre virus testés ait un rapport élevé. La problématique de la détection d'échantillons séropositifs peut donc s'assimiler à celle de la détection de valeurs aberrantes au sein de la distribution des rapports, c'est-à-dire des rapports anormalement élevés. Afin d'établir un seuil au-delà duquel un rapport sera considéré comme traduisant la séropositivité de l'échantillon auquel il se réfère vis-à-vis du virus testé, nous avons utilisé comme indicateurs de dispersion des séries statistiques considérées la médiane et la déviation absolue médiane. En effet, ces deux indicateurs sont peu impactés par la présence de valeurs extrêmes au sein d'une série statistique comme peuvent l'être la moyenne et l'écart-type.

Pour rappel, la médiane est définie comme la valeur séparant une série statistique en deux parties égales, autrement dit par la valeur pour laquelle 50 % des valeurs de la série statistique lui sont inférieures et 50 % lui sont supérieures.

La déviation absolue médiane (DAM) d'une distribution statistique peut être définie comme la médiane des écarts en valeur absolue de chaque valeur de la distribution à la médiane de cette distribution, multipliée par un facteur k . La valeur du facteur k est établie à 1,4826, dans le cas général d'une distribution suivant une loi normale.

L'ensemble des 844 échantillons a été passé en dix séries. Afin de limiter l'impact d'éventuelles variations expérimentales inter-séries pouvant impacter les valeurs finalement obtenues, nous avons déterminé pour chaque série d'échantillons analysés les médianes des rapports et les DAM plutôt que de calculer ces paramètres pour l'ensemble des échantillons.

Nous pouvons ensuite calculer, pour chaque échantillon, 4 nouvelles grandeurs, notées z_{BuV1} , z_{BuV2} , z_{BuV3} et z_{TuV} à partir des rapports déjà calculés, correspondant à la différence en valeur absolue entre ces rapports et la médiane des rapports de la série, divisée par la DAM de la série, que l'on pourrait traduire par l'écart à la médiane en nombre de DAM.

$$z_{BuV1} = \frac{|\text{rapport}_{BuV1} - \text{médiane rapports}_{BuV1}|}{DAM_{BuV1}}$$

$$z_{BuV2} = \frac{|rapport_{BuV2} - médiane\ rapports_{BuV2}|}{DAM_{BuV2}}$$

$$z_{BuV3} = \frac{|rapport_{BuV3} - médiane\ rapports_{BuV3}|}{DAM_{BuV3}}$$

$$z_{TuV} = \frac{|rapport_{TuV} - médiane\ rapports_{TuV}|}{DAM_{TuV}}$$

Plusieurs seuils ont été proposés pour considérer une valeur supérieure à ceux-ci comme aberrante et pouvant être rejetée de la distribution considérée, ce qui, dans notre cas, nous conduirait à rejeter l'échantillon de la population des séronégatifs pour le considérer séropositif. Le choix d'un tel seuil revêt évidemment une part de subjectivité et il dépend de la situation concernée. Certains auteurs ont proposé des seuils compris entre 2 et 3 (45). Pour minimiser le risque de considérer à tort un échantillon séropositif, nous avons décidé de fixer ce seuil à 5, en supposant que les échantillons véritablement séropositifs conduisent à des valeurs de z élevées.

b) RÉSULTATS DÉFINITIFS

1) RÉSULTATS GLOBAUX

Ainsi, comme nous l'avons établi, est considéré séropositif à un virus tout échantillon ayant une valeur de z relative à ce virus supérieure ou égale à 5. Le **Tableau 7** présente et fait la synthèse des résultats globaux obtenus pour les trois génotypes de bufavirus, et le **Tableau 8** présente les résultats obtenus pour tusavirus.

Tableau 7: Résultats de séroprévalence de bufavirus

	0-9 ans	10-19 ans	20-29 ans	30-39 ans	40-49 ans	50-59 ans	60-69 ans	70-79 ans	80-89 ans	90-99 ans	Total
Échantillons positifs au BuV, quel que soit le génotype	15 (14,4 %)	11 (17,2 %)	6 (5,3 %)	7 (8,1 %)	14 (15,7 %)	14 (14,9 %)	13 (16,0 %)	15 (15,8 %)	12 (15,2 %)	4 (10,3 %)	111 (13,2 %)
Échantillons positifs au BuV1	9 (8,7 %)	6 (9,4 %)	2 (1,8 %)	3 (3,5 %)	9 (10,1 %)	6 (6,4 %)	7 (8,6 %)	9 (9,5 %)	9 (11,4 %)	1 (2,6 %)	61 (7,2 %)
Échantillons positifs au BuV2	8 (7,7 %)	5 (7,8 %)	1 (0,9 %)	3 (3,5 %)	8 (9,0 %)	5 (5,3 %)	4 (4,9 %)	6 (6,3 %)	4 (5,1 %)	3 (7,7 %)	47 (5,6 %)
Échantillons positifs au BuV3	9 (8,7 %)	6 (9,4 %)	5 (4,4 %)	2 (2,3 %)	6 (6,7 %)	7 (7,4 %)	7 (8,6 %)	9 (9,5 %)	5 (6,3 %)	2 (5,1 %)	58 (6,9 %)
Échantillons positifs au BuV1 seulement	4 (3,8 %)	3 (4,7 %)	1 (0,9 %)	2 (2,3 %)	4 (4,5 %)	3 (3,2 %)	2 (2,5 %)	3 (3,2 %)	5 (6,3 %)	0	27 (3,2 %)
Échantillons positifs au BuV2 seulement	1 (1,0 %)	1 (1,6 %)	0	2 (2,3 %)	3 (3,4 %)	3 (3,2 %)	3 (3,7 %)	2 (2,1 %)	2 (2,5 %)	2 (5,1 %)	19 (2,3 %)
Échantillons positifs au BuV3 seulement	2 (1,9 %)	3 (4,7 %)	4 (3,5 %)	2 (2,3 %)	2 (2,2 %)	5 (5,3 %)	3 (3,7 %)	4 (4,2 %)	1 (1,3 %)	1 (2,6 %)	27 (3,2 %)
Échantillons positifs au BuV1 et au BuV2	1 (1,0 %)	1 (1,6 %)	0	1 (1,2 %)	2 (2,2 %)	1 (1,1 %)	0	1 (1,1 %)	0	0	7 (0,8 %)
Échantillons positifs au BuV1 et au BuV3	1 (1,0 %)	0	0	0	0	1 (1,1 %)	4 (4,9 %)	2 (2,1 %)	2 (2,5 %)	0	10 (1,2 %)
Échantillons positifs au BuV2 et au BuV3	3 (2,9 %)	1 (1,6 %)	0	0	0	0	0	0	0	0	4 (0,5 %)
Échantillons positifs au BuV1, au BuV2 et au BuV3	3 (2,9 %)	2 (3,1 %)	1 (0,9 %)	0	3 (3,4 %)	1 (1,1 %)	1 (1,2 %)	3 (3,2 %)	2 (2,5 %)	1 (2,6 %)	17 (2,0 %)
Échantillons négatifs	89 (85,6 %)	53 (82,8 %)	107 (94,7 %)	79 (91,9 %)	75 (84,3 %)	80 (85,1 %)	68 (84,0 %)	80 (84,2 %)	67 (84,8 %)	35 (89,7 %)	733 (86,8 %)

Tableau 8: Résultats de séroprévalence de tusavirus (entre parenthèses et en italique sont indiqués les pourcentages correspondants)

	0-9 ans	10-19 ans	20-29 ans	30-39 ans	40-49 ans	50-59 ans	60-69 ans	70-79 ans	80-89 ans	90-99 ans	Total
Total d'échantillons positifs à TuV	5 <i>(4,8)</i>	3 <i>(4,7)</i>	2 <i>(1,8)</i>	1 <i>(1,2)</i>	2 <i>(2,2)</i>	2 <i>(2,1)</i>	1 <i>(1,2)</i>	3 <i>(3,2)</i>	3 <i>(3,8)</i>	0	22 <i>(2,6)</i>
Échantillons positifs à TuV seul	1 <i>(1,0)</i>	1 <i>(1,6)</i>	0	1 <i>(1,2)</i>	0	0	0	0	0	0	3 <i>(0,4)</i>
Échantillons positifs à TuV et à BuV	4 <i>(3,8)</i>	2 <i>(3,1)</i>	2 <i>(1,8)</i>	0	2 <i>(2,2)</i>	2 <i>(2,2)</i>	1 <i>(1,2)</i>	3 <i>(3,2)</i>	3 <i>(3,8)</i>	0	19 <i>(2,3)</i>
Échantillons négatifs	99 <i>(98,0)</i>	61 <i>(95,3)</i>	111 <i>(98,2)</i>	85 <i>(98,8)</i>	87 <i>(97,8)</i>	92 <i>(97,9)</i>	80 <i>(98,8)</i>	92 <i>(96,8)</i>	76 <i>(96,2)</i>	39 <i>(100,0)</i>	822 <i>(97,4)</i>

2) RÉSULTATS PAR TRANCHE D'ÂGE

Sur la **Figure 40** sont également représentées les séroprévalences de bufavirus en fonction de l'âge des individus, avec les intervalles de confiance à 95 % calculés selon la méthode de Wilson avec correction de continuité.

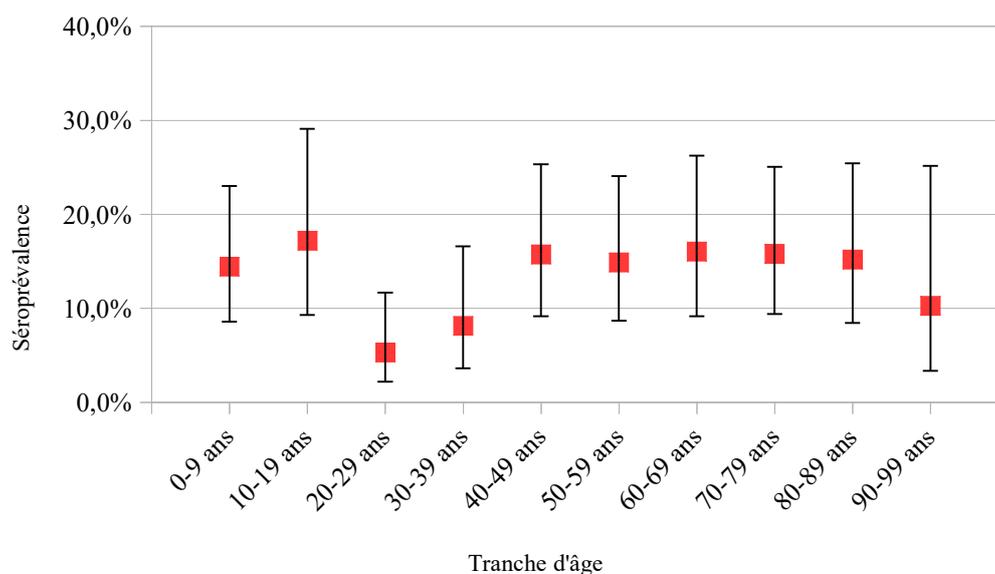


Figure 40: Séroprévalence de bufavirus (tous génotypes confondus) en fonction de la tranche d'âge des individus, avec intervalle de confiance à 95 %

Nous pouvons observer que les séroprévalences sont relativement constantes et comprises entre 10 et 20 % pour chaque tranche d'âge, exceptées celles correspondant aux individus âgés de 20 à 39 ans, pour lesquels la séroprévalence semble plus réduite, bien que les intervalles de confiance se recourent.

Observons maintenant, selon les mêmes modalités, les séroprévalences du BuV1 en **Figure 41**, du BuV2 en **Figure 42**, et enfin du BuV3 en **Figure 43**.

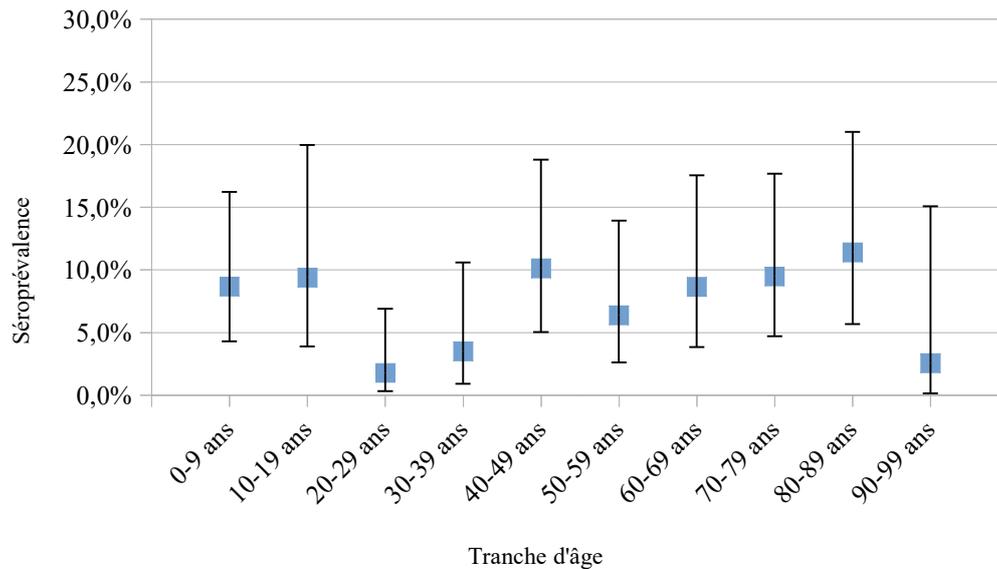


Figure 41: Séroprévalence du BuV1 en fonction de la tranche d'âge des individus, avec intervalle de confiance à 95 %

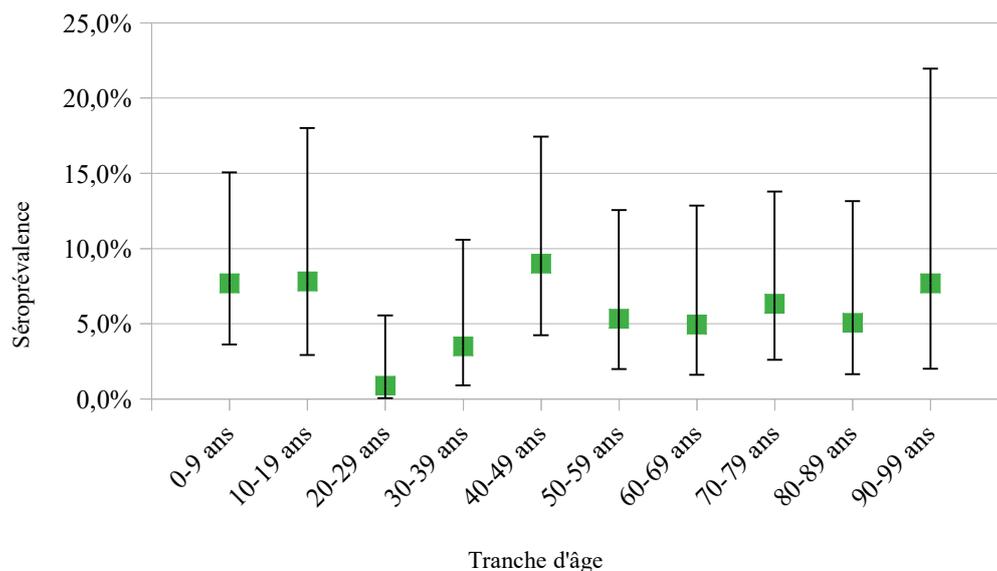


Figure 42: Séroprévalence du BuV2 en fonction de la tranche d'âge des individus, avec intervalle de confiance à 95 %

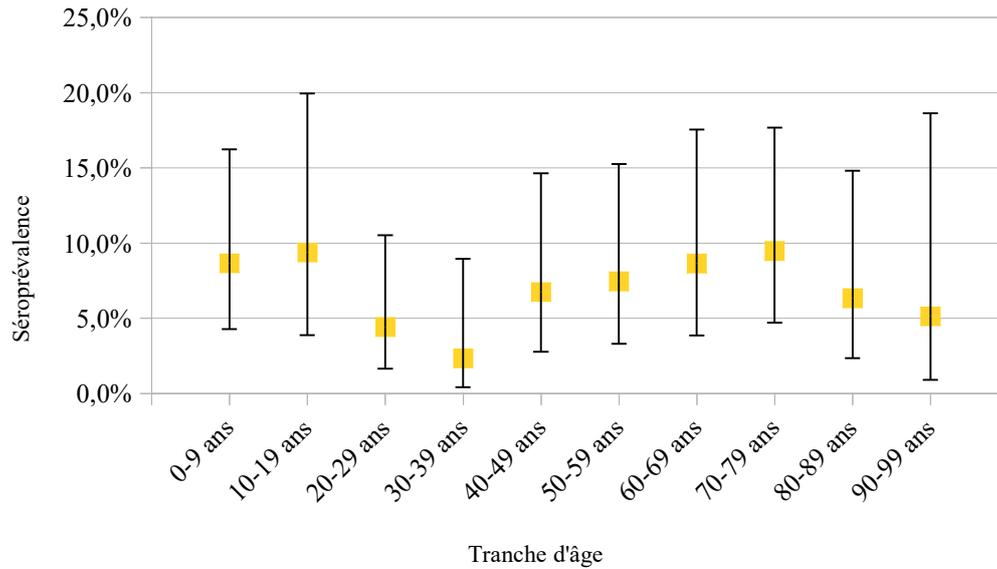


Figure 43: Séroprévalence du BuV3 en fonction de la tranche d'âge des individus, avec intervalle de confiance à 95 %

Nous n'observons pas de différences qualitatives notables dans les séroprévalences du BuV1, du BuV2 et du BuV3 en fonction de la tranche d'âge des individus, et la plus faible proportion apparente d'individus possédant des anticorps contre bufavirus quel qu'en soit le génotype dans les tranches d'âge 20-29 ans et 30-39 ans se constate également pour les 3 génotypes considérés individuellement. Cependant, ici encore, la part d'incertitude représentée par les intervalle de confiance à 95 % ne permet pas de conclure à une réelle différence significative de séroprévalence en fonction de l'âge.

La séroprévalence de tusavirus en fonction de la tranche d'âge des individus est représentée sur la **Figure 44**, et ici encore, aucune tendance nette ne se dégage. L'absence d'échantillons séropositifs à tusavirus dans la tranche d'âge 90-99 ans peut s'expliquer par le plus faible effectif de celle-ci par rapport aux autres et de la séroprévalence faible attendue compte tenu de celles observées en général, ou bien par la perte liée à l'âge d'anticorps autrefois présents.

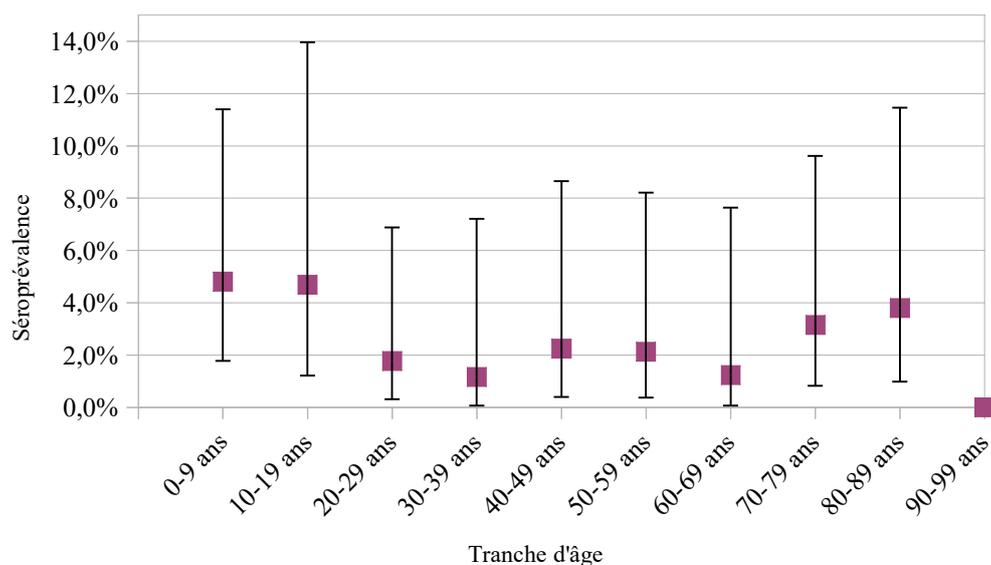


Figure 44: Séroprévalence du TuV en fonction de la tranche d'âge des individus, avec intervalle de confiance à 95 %

3) SYNTHÈSE DES RÉSULTATS

Enfin, le **Tableau 9** reprend les chiffres de séroprévalence globaux de bufavirus et de tusavirus et indique leurs intervalles de confiance à 95 %, calculés ici encore par la méthode de Wilson avec correction de continuité.

Tableau 9: Séroprévalences globales de bufavirus et de tusavirus avec intervalles de confiance

Virus	Échantillons positifs	Séroprévalence calculée	IC ₉₅ %
BuV, tous génotypes	111 / 844	13,2 %	[11,0 ; 15,7] %
BuV1	61 / 844	7,2 %	[5,6 ; 9,2] %
BuV2	47 / 844	5,6 %	[4,2 ; 7,4] %
BuV3	58 / 844	6,9 %	[5,3 ; 8,8] %
TuV	22 / 844	2,6 %	[1,7 ; 4,0] %

Compte tenu de l'ensemble de ces résultats, nous pouvons constater que la séroprévalence globale de bufavirus est supérieure à celle de tusavirus en Bourgogne, et qu'il n'y a pas de différence significative entre les séroprévalences des trois génotypes de bufavirus ici étudiés. Par

ailleurs, sur les 22 échantillons séropositifs à tusavirus, seuls 3 d'entre eux, soit 13,6 %, sont séronégatifs à bufavirus. Ainsi, malgré les faibles séroprévalences globales de ces deux virus, il semble plus probable d'avoir été infecté par tusavirus et bufavirus que par tusavirus seul.

D'autre part, parmi les 111 échantillons séropositifs à bufavirus, 73 d'entre eux, soit 65,8 %, n'étaient séropositifs qu'à un seul des trois génotypes.

II - DÉTERMINATION DE LA LIAISON DE BUFAVIRUS AUX ANTIGÈNES TISSULAIRES DE GROUPE SANGUIN

Pour rappel, et afin de réaliser ces expérimentations, nous avons sélectionné quatre échantillons parmi ceux analysés précédemment. Les DO mesurées alors pour l'ensemble des VLP testées et pour le lysat cellulaire témoin sont indiquées dans le **Tableau 10**.

Tableau 10: DO initialement obtenues pour les quatre échantillons sélectionnés vis-à-vis des différents types de VLP et du lysat cellulaire témoin

Échantillon	DO BuV1	DO BuV2	DO BuV3	DO TuV	DO WT
A5-5	1,055	0,272	0,147	0,162	0,137
H1-2	0,215	1,619	0,188	0,148	0,177
E1-5	0,161	0,133	1,099	0,153	0,153
A10-2	0,098	0,074	0,053	0,062	0,110

Comme nous l'avons exposé précédemment, chacun de ces quatre échantillons a d'abord été testé de nouveau dans les mêmes conditions afin de confirmer leur séropositivité ou leur séronégativité vis-à-vis des VLP de BuV1, de BuV2 et de BuV3. Les résultats de cette vérification figurent dans le **Tableau 11**.

Tableau 11: DO obtenues vis-à-vis des VLP de BuV1, BuV2 et BuV3 après repassage des échantillons sélectionnés

Échantillon	DO BuV1	DO BuV2	DO BuV3	DO WT
A5-5	2,792	0,823	0,690	0,699
H1-2	0,293	1,610	0,277	0,274
E1-5	0,357	0,394	2,642	0,650
A10-2	0,116	0,119	0,168	0,141

Bien que l'intensité des signaux mesurés et du bruit de fond soit différente pour chaque échantillon que lors des premières analyses, la réactivité des sérums vis-à-vis des VLP est bien retrouvée.

La mesure des DO vis-à-vis des VLP a ensuite été obtenue après avoir incubé ces quatre échantillons de sérum une nuit à température ambiante avec un mélange des échantillons salivaires sélectionnés, afin de vérifier que cette opération n'aboutisse pas à la disparition de la réactivité et à la perte des anticorps anti-bufavirus. Les résultats de ces mesures sont présentés dans le **Tableau 12**.

Tableau 12: DO obtenues vis-à-vis des VLP de BuV1, BuV2 et BuV3 après incubation des sérums avec un mélange d'échantillons salivaires

Échantillon	DO BuV1	DO BuV2	DO BuV3	DO WT
A5-5	1,847	0,359	0,230	0,255
H1-2	0,170	1,383	0,215	0,200
E1-5	0,224	0,208	2,037	0,295
A10-2	0,141	0,113	0,118	0,134

Ces résultats montrent que les échantillons ont conservé leur réactivité vis-à-vis des VLP et que l'incubation des échantillons de sérum avec les salives n'a pas conduit à la perte des anticorps anti-bufavirus.

Après avoir vérifié la bonne conservation de la réactivité des sérums, chacun d'entre eux a pu être analysé sur les puits recouverts d'antigènes tissulaires de groupe sanguin, avec ou sans VLP les recouvrant, selon les modalités exposées précédemment. Les données obtenues pour les échantillons A5-5, H1-2, E1-5 et A10-2 sont représentées sur les **Figures 45, 46, 47 et 48**, respectivement. Pour chaque paire de puits identiques, la moyenne des deux valeurs de DO obtenues a été calculée et cette valeur a été prise en compte dans la représentation graphique des résultats.

Dans l'ensemble, on ne constate pas de réelle différence entre les DO mesurées pour les échantillons incubées au contact de puits recouverts de salives et de VLP par rapport aux DO mesurées pour ces mêmes échantillons au contact de puits recouverts de salives seules. Ces résultats ne sont donc *a priori* pas en faveur d'une capacité de bufavirus à se lier aux antigènes tissulaires de groupe sanguin.

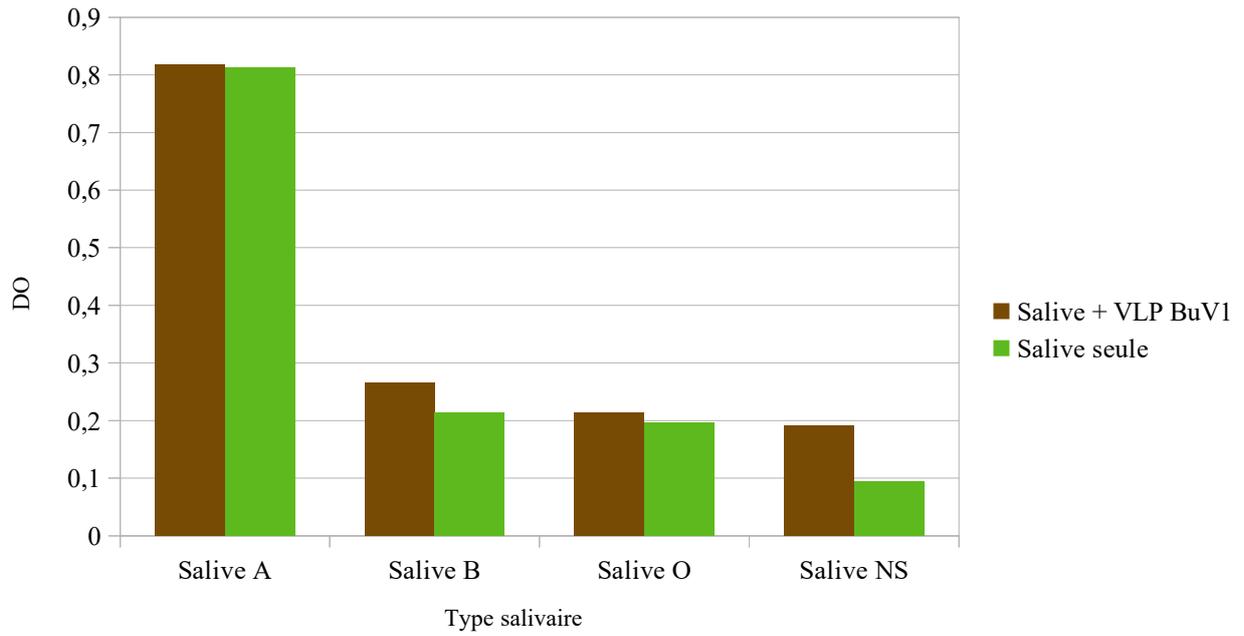


Figure 45: DO mesurées pour l'échantillon A5-5 sur différents types salivaires avec ou sans VLP de BuV1

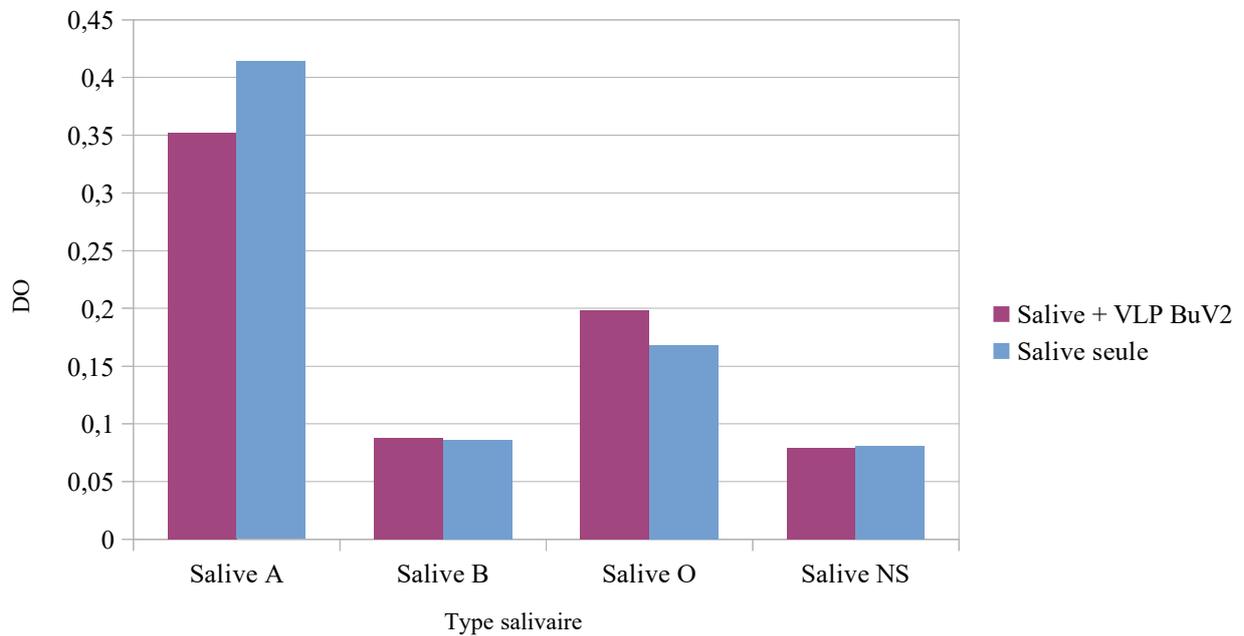


Figure 46: DO mesurées pour l'échantillon H1-2 sur différents types salivaires avec ou sans VLP de BuV2

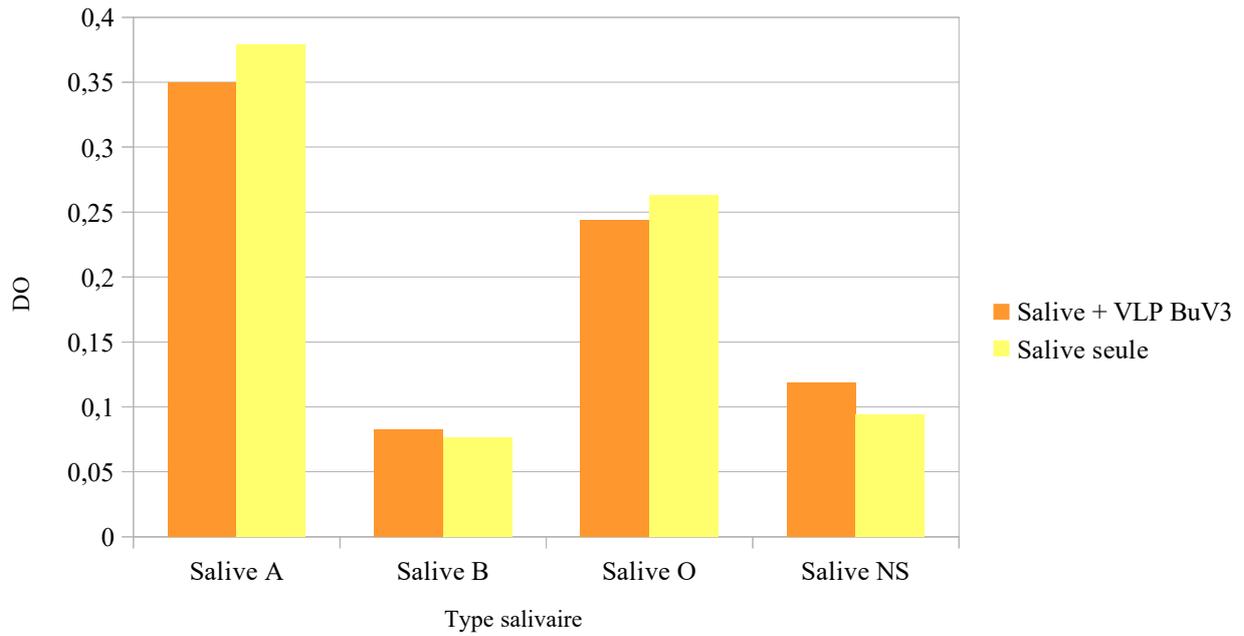


Figure 47: DO mesurées pour l'échantillon E1-5 sur différents types salivaires avec ou sans VLP de BuV3

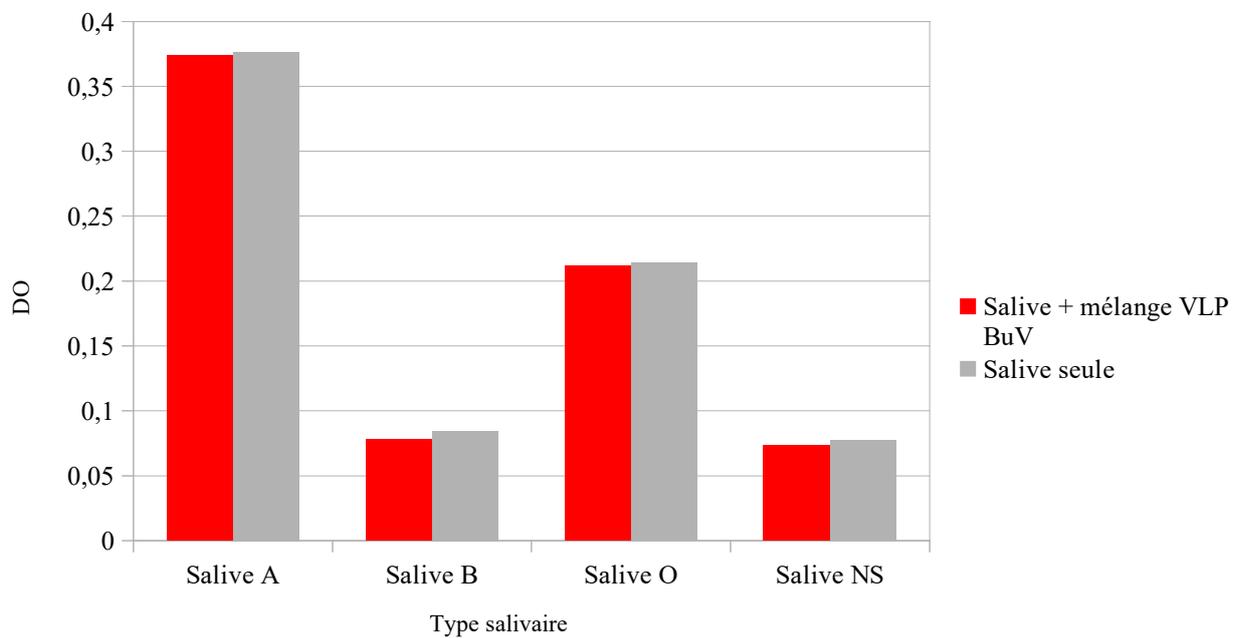


Figure 48: DO mesurées pour l'échantillon A10-2 sur différents types salivaires avec ou sans mélange de VLP de BuV

D. DISCUSSION

I - VALIDITÉ DES RÉSULTATS OBTENUS

a) CONTRAINTES ET DIFFICULTÉS RENCONTRÉES

Nous avons, dans cette étude, développé et mis au point un test ELISA indirect afin de rechercher des anticorps anti-bufavirus et anti-tusavirus au sein d'échantillons de sérum, en tâchant d'établir les conditions analytiques les plus adéquates.

Cependant, nous n'avions pas à notre disposition de témoins séropositifs ou séronégatifs pour ces deux virus qui auraient pu nous permettre d'établir des seuils de positivité et de négativité, et de choisir les conditions analytiques permettant la meilleure discrimination entre les échantillons séropositifs et les échantillons séronégatifs. Nous avons donc été contraints de faire appel à des méthodes statistiques nous ayant conduits à identifier les échantillons dont la DO vis-à-vis d'un virus testé s'éloignait le plus de la DO vis-à-vis d'un lysat cellulaire témoin, constitué de protéines issues de cellules d'insecte et d'un baculovirus sauvage (WT), et dénué de VLP de bufavirus et de tusavirus, en supposant que de tels échantillons soient positifs au virus testé.

b) MANQUE DE SENSIBILITÉ

Les résultats ainsi obtenus doivent donc être interprétés avec prudence. En effet, il est possible que le test que nous avons développé manque de sensibilité, et que nous ayons donc considéré d'authentiques échantillons séropositifs comme séronégatifs. Les causes de ces éventuels faux négatifs pourraient être, par exemple, des critères de positivité trop élevés, qui nous auraient certes permis d'identifier les échantillons fortement positifs, mais pas les échantillons moyennement ou faiblement positifs. En effet, la fixation arbitraire du seuil de positivité à 5 pour les valeurs de z pourrait ne pas permettre de détecter de tels échantillons. Cependant, en l'absence de test de confirmation réalisable sur les échantillons détectés positifs, nous avons opté pour un seuil de positivité élevé. Il aurait également été possible d'établir une zone d'incertitude, et de considérer un résultat « douteux » pour des valeurs de z intermédiaires, entre 2 et 5 par exemple.

Une autre cause envisageable est l'important facteur de dilution appliqué aux échantillons de sérum que nous avons décidé d'utiliser (dilution au 1/800), qui a pu rendre le signal d'un échantillon faiblement positif semblable à celui d'un réel échantillon négatif ou pas assez différent de celui-ci pour être détecté avec nos méthodes statistiques.

D'autre part, rappelons que les VLP de bufavirus et de tusavirus que nous avons produites ne sont constituées que de la protéine de capsid majoritaire VP2. Or, bufavirus et tusavirus comprennent, comme nous l'avons exposé en introduction de cette étude, une protéine de capsid minoritaire supplémentaire nommée VP1. Cette protéine VP1 est identique à la protéine VP2, à l'exception de sa portion N-terminale appelée VP1u. Cette structure de capsid et la nature des protéines qui la constituent sont identiques pour les autres virus appartenant à la famille *Parvoviridae*, dont parvovirus B19, qui en est le représentant le plus étudié. Il a d'ailleurs été montré, lors d'études ayant étudié la réponse immunitaire humorale développée par les individus infectés par parvovirus B19, que les anticorps retrouvés dans leur sérum à distance de l'infection étaient majoritairement dirigés contre la protéine VP1, et non contre VP2. La séquence de VP1u semble donc, pour parvovirus B19, être le déterminant antigénique principal (46,47,48). Nous pouvons donc faire l'hypothèse qu'il en soit de même pour bufavirus et tusavirus, et si tel est le cas, nous pourrions avoir sous-estimé la séroprévalence de ces deux virus par l'absence de VP1u dans les VLP produites. Cependant, compte tenu de l'activité phospholipase A2 de VP1u, il se peut que la séquence de VP1u soit plus conservée entre les virus de la famille *Parvoviridae* et soit à l'origine de réactions croisées entre ceux-ci, et ces réactions croisées auraient gêné notre interprétation des résultats. Des études complémentaires permettraient d'élucider ce point.

Enfin, si les premières études de séroprévalence réalisées ont démontré que les anticorps anti-bufavirus persistaient au moins 6 ans dans le sérum et restaient détectables par des tests ELISA (34), nous ignorons si ces anticorps persistent au-delà. Ainsi, il ne peut être exclu que les patients les plus âgés de notre population d'étude aient perdu leurs anticorps ou que ceux-ci soient trop faiblement présents pour être détectés, ce qui nous aurait conduit à sous-estimer la part de la population ayant effectivement rencontré ces virus.

c) MANQUE DE SPÉCIFICITÉ

À l'inverse, un manque de spécificité du test ELISA mis au point pourrait nous avoir conduit à surestimer la proportion d'individus ayant réellement rencontré bufavirus et tusavirus. En effet, nous n'avons pas pu confirmer la spécificité antigénique des échantillons que nous avons

identifiés comme positifs, et l'éventualité de réactions croisées n'a pas pu être écartée. Il est possible que ces réactions croisées aient entraîné une réaction positive d'un échantillon vis-à-vis de deux, de trois voire des quatre virus ici testés alors qu'il n'était en réalité positif que pour un seul d'entre eux. Cependant, lors des précédentes études de séroprévalence de bufavirus et de tusavirus réalisées, il n'avait pas été noté de réactions croisées entre les différents génotypes de bufavirus ni entre bufavirus et tusavirus (15). Il est également envisageable qu'un échantillon détecté positif ne le soit à cause de la présence d'anticorps dirigés contre d'autres déterminants antigéniques, tels que ceux d'un autre virus de la famille *Parvoviridae*. Là encore, aucun exemple n'a pu étayer cette hypothèse dans les études précédentes.

d) CAS DES ÉCHANTILLONS HYPER-RÉACTIFS VIS-À-VIS DU LYSAT CELLULAIRE TÉMOIN (WT)

Parmi les nombreux échantillons analysés dans le cadre de cette étude, certains ont présenté une forte réactivité vis-à-vis du lysat cellulaire témoin, et lorsque c'était le cas, la réactivité était également forte vis-à-vis des quatre VLP testées. Cette réactivité non spécifique serait peut-être plus faible si la purification des VLP était plus importante. On peut en effet observer sur les pistes électrophorétiques obtenues après la séparation de l'ensemble des protéines purifiées la présence de nombreuses protéines non spécifiques (Figure 15). Il est possible qu'une purification par ultracentrifugation en gradient de chlorure de césium, à la place de celle réalisée sur coussin de saccharose, permette d'éliminer une partie de ces protéines et ainsi réduire le signal non spécifique observé.

Cependant, pour de tels échantillons, la méthode statistique ici retenue pour déterminer la séropositivité d'un échantillon et basée sur le calcul du rapport entre la DO mesurée vis-à-vis des VLP et la DO mesurée pour un lysat cellulaire témoin ne conviendrait pas, puisqu'ils resteraient fortement réactifs vis-à-vis du lysat cellulaire témoin (WT).

Au total, ces échantillons sont assez minoritaires puisque sur l'ensemble des 844 échantillons analysés, la DO mesurée pour le lysat cellulaire témoin était supérieure à 1,000 pour 22 d'entre eux, soit 2,6 %, et elle était supérieure à 0,500 pour 60 d'entre eux, soit 7,1 %.

II - DISCUSSION DES RÉSULTATS DE SÉROPRÉVALENCE

Bufavirus et tusavirus sont deux nouveaux *Protoparvovirus* récemment identifiés dans des échantillons de selles grâce aux progrès des techniques de séquençage à haut débit de nouvelle génération. La réalisation d'études sérologiques est importante pour mieux comprendre leur épidémiologie et leur implication dans les épisodes de gastro-entérites aiguës, et de les comparer avec les études similaires déjà réalisées dans d'autres pays.

La séroprévalence de bufavirus en Bourgogne déterminée dans cette étude est estimée à 13,2 % (IC₉₅ % : [11,0 ; 15,7] %). Cette proportion d'individus ayant rencontré bufavirus est supérieure à celle observée en Finlande et aux États-Unis (où elle était comprise entre 1,9 % et 5,6 %), mais demeure très inférieure aux séroprévalences observées en Afrique et en Asie, qui atteignent 72,3 % et 84,8 %, respectivement (**Tableau 3**). Cependant, l'étude que nous avons réalisée se distingue par le grand nombre d'échantillons analysés (844), alors que les séroprévalences déterminées dans d'autres pays ont été estimées à partir d'un nombre d'échantillons plus restreint. De plus, nos échantillons proviennent à la fois d'enfants et d'adultes de tous âges, nous permettant de constater l'absence de variation significative de la séroprévalence en fonction de la tranche d'âge des individus, contrairement à ce qui a pu être observé au Kenya, où elle augmentait significativement avec l'âge (**38**). La faible séroprévalence globale couplée à cette absence de variation en fonction de l'âge pourrait indiquer une apparition récente de bufavirus et de tusavirus en France. La réalisation d'une étude complémentaire à partir d'échantillons de sérum plus récents permettrait de comparer les niveaux de séroprévalence de ces nouveaux *Protoparvovirus* dans le temps.

Par ailleurs, il n'existe pas de différence significative de séroprévalence entre les trois génotypes de bufavirus testés. Ces trois génotypes semblent donc circuler dans des proportions similaires, ce qui n'était pas le cas en Asie, où les anticorps des individus séropositifs à bufavirus étaient en majorité dirigés contre le génotype 1 (**38**).

D'après les résultats de cette étude, la séroprévalence globale de tusavirus en Bourgogne est quant à elle estimée à 2,6 % (IC₉₅ % : [1,7 ; 4,0] %). Elle est donc inférieure à celle de bufavirus. Avant de réaliser cette étude, il n'avait été détecté qu'un seul individu séropositif à tusavirus, et il s'agissait d'un enfant en Finlande (**Tableau 4**). Sur les 22 échantillons séropositifs à tusavirus, seuls 3 d'entre eux n'étaient pas séropositifs à bufavirus. Cette association étroite entre tusavirus et bufavirus doit nous interroger, et pourrait trouver plusieurs explications, outre leur mode de

transmission commun. Si l'éventualité de réactions croisées est improbable compte tenu des précédentes études n'en ayant pas mises en évidence (34), nous n'avons pas écarté cette hypothèse dans notre étude, et des tests de compétition permettraient de confirmer ou d'infirmer la séropositivité des échantillons considérés. Il est aussi possible que des facteurs de prédisposition ou de susceptibilité d'hôte communs à ces deux nouveaux virus appartenant à la même famille expliquent cette association.

Bien que nous ayons réalisé cette étude à partir d'un grand nombre d'échantillons répartis dans toutes les classes d'âge, cette population d'étude n'est pas totalement représentative de la population française, et une extrapolation des résultats obtenus ici à l'ensemble de celle-ci risque d'être inexacte. En effet, il existe un biais de sélection car les échantillons sélectionnés proviennent tous d'une sérothèque constituée au laboratoire de virologie du CHU de Dijon à partir d'individus ayant été hospitalisés et pour lesquels il a reçu un prélèvement de sérum durant leur épisode de soins.

Par ailleurs, les échantillons de sérum que nous avons analysés ont tous été prélevés durant l'année 2007, et conservés depuis lors à -20°C . Or, bufavirus et tusavirus ont tous deux été découverts en 2012 et 2014 respectivement, soit entre 5 et 7 ans plus tard. Il est donc possible qu'en 2007, la circulation de bufavirus et de tusavirus fût plus faible qu'aujourd'hui, et que leurs séroprévalences aient augmenté depuis. Là encore, la réalisation d'une étude complémentaire à partir d'échantillons de sérum plus récents, mais également plus anciens, permettrait d'apprécier une éventuelle variation de séroprévalence en fonction du temps.

En France, mais également dans d'autres pays dans lesquels elle a été déterminée, tels que la Finlande ou les États-Unis, les séroprévalences de bufavirus et de tusavirus diffèrent très fortement de celles d'autres virus associés aux gastro-entérites. Ainsi, par exemple, la séroprévalence du virus Aichi en population française s'élève à plus de 80 % chez les individus de plus de 40 ans (37), alors que la séroprévalence de sapovirus aux États-Unis atteint 100 % chez les individus de plus de 4 ans (49).

La séroprévalence de bufavirus connaît également d'importantes variations géographiques. Comme nous l'avons exposé en introduction, celle-ci est faible en Finlande et aux États-Unis par exemple, mais bien plus élevée en Afrique ou en Asie. Plusieurs hypothèses peuvent être formulées pour expliquer ces différences géographiques, et les différences constatées avec d'autres virus associés aux gastro-entérites. Comme pour expliquer l'association étroite entre la

séropositivité à tusavirus et celle à bufavirus, il est possible qu'un facteur de prédisposition génétique explique ces disparités, et rende certaines populations sensibles à une infection par bufavirus quand d'autres y seraient naturellement résistantes. Cette variation génétique pourrait se traduire par la présence ou l'absence du récepteur du virus à la surface des cellules-hôtes. Une autre explication des différences constatées pourrait provenir de la capacité de bufavirus à résister dans l'environnement et aux différents traitements physico-chimiques appliqués aux eaux usées et à garder son pouvoir infectieux une fois éliminé par les selles dans le milieu extérieur.

Si les virus de la famille *Parvoviridae* sont décrits comme très résistants dans le milieu extérieur et pouvant conserver leur pouvoir infectieux pendant plusieurs mois ou années par l'ICTV, il est possible que bufavirus le soit moins, ou qu'il soit plus facilement inactivé ou dégradé par les traitements physico-chimiques, et ne soit donc transmis que lors d'un contact direct avec un individu infecté ayant les mains souillées, contrairement à d'autres virus associés aux gastro-entérites qui peuvent se transmettre selon un mode épidémique à partir d'une origine alimentaire ou environnementale commune contaminée, comme le norovirus par exemple (**Figure 4**). D'autres études seront nécessaires pour élucider ces questions.

Au total, bufavirus et tusavirus sont les premiers virus de la famille *Parvoviridae* associés aux gastro-entérites chez l'Homme, et viennent donc augmenter le nombre et la diversité déjà conséquents des virus capables d'entraîner de telles symptomatologies. L'état des connaissances actuelles ne permet pas d'expliquer les différences géographiques de séoprévalence de bufavirus, ni d'expliquer la plus faible proportion d'individus ayant rencontré ces deux nouveaux Protoparvovirus par rapport aux proportions observées pour d'autres virus associés aux GEA dans les régions d'Europe et d'Amérique du Nord. Quoi qu'il en soit, la prévention des gastro-entérites aiguës reste la même pour toutes les GEA d'origine infectieuse et repose sur des règles d'hygiène universelles telles que le lavage des mains au savon, la collecte et l'assainissement des eaux usées, l'accès à l'eau potable, l'utilisation de toilettes.

III - DISCUSSION DES RÉSULTATS DE LA DÉTERMINATION DE LA LIAISON DE BUFAVIRUS AUX HBGA

Nous n'avons pas mis en évidence d'accroche spécifique entre bufavirus et les HBGA, contrairement à ce qui a pu être démontré dans le cas du norovirus (39,40). Cependant, nous n'avons utilisé pour ces essais qu'un faible nombre d'échantillons salivaires, et il pourrait être nécessaire de réitérer ces expérimentations avec un panel d'échantillons salivaires plus large, et en disposant d'anticorps anti-buavirus purifiés qui ne réagiraient pas avec les antigènes salivaires natifs. À ce jour, le récepteur cellulaire à l'origine de l'accroche et de la pénétration de bufavirus à l'intérieur de ses cellules-hôtes reste donc inconnu.

MÉMOIRE DE D.E.S. SOUTENU PAR M. AUFFRET NICOLAS

CONCLUSIONS

A l'aide de pseudo-particules virales, nous avons déterminé la séroprévalence de bufavirus et de tusavirus, deux *Protoparvovirus* récemment identifiés et associés aux gastro-entérites aiguës chez l'Homme. Après avoir analysé 844 échantillons, nous avons établi que la séroprévalence de bufavirus en Bourgogne s'élevait à 13,2 % (IC₉₅ % : [11,0 ; 15,7] %), et que celle de tusavirus était de 2,6 % (IC₉₅ % : [1,7 ; 4,0] %), sans tendance nette à l'augmentation en fonction de l'âge. Ces résultats montrent une circulation plus importante de ces virus dans la population française qu'en Finlande ou aux États-Unis, mais bien moindre qu'en Afrique ou en Asie.

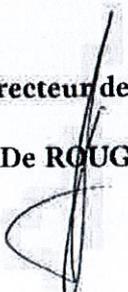
Les séroprévalences de bufavirus et de tusavirus en Bourgogne sont donc beaucoup plus faibles que celles des autres virus entériques actuellement connus, pour lesquels on observe habituellement une immunisation de la majorité de la population après quelques années de vie. Comparativement à ces derniers, la circulation et l'implication de ces deux *Protoparvovirus* dans les pathologies gastro-intestinales semblent donc de moindre importance, mais nos résultats pourraient justifier l'inclusion de bufavirus et de tusavirus dans les virus recherchés dans les selles de patients diarrhéiques, à la fois à des fins diagnostiques mais également épidémiologiques.

A noter que notre étude de l'accroche des bufavirus sur les antigènes tissulaires de groupe sanguin (HBGA) n'a pas permis de mettre en évidence de capacité de liaison de bufavirus aux antigènes A, B et H, comme cela a pu être démontré pour norovirus, un agent pathogène majeur impliqué dans les gastro-entérites aiguës chez l'Homme.

Enfin, beaucoup d'autres choses restent encore à découvrir de ces deux virus et d'autres études seront donc nécessaires pour déterminer leurs cellules-hôtes, leurs récepteurs cellulaires, leur cycle de réplication ainsi que leur capacité de résister dans le milieu extérieur et aux agents physico-chimiques de traitement des eaux.

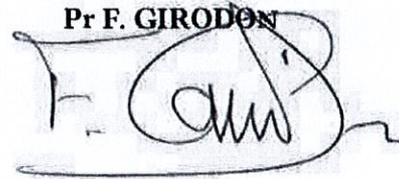
Le Directeur de thèse,

Pr A. De ROUGEMONT



Le Président,

Pr F. GIRODON



Vu pour l'autorisation de
soutenance

Dijon, le 24/11/2020

Le Vice-Doyen,

Pr C. MARIE



RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. GBD 2016 Diarrhoeal Disease Collaborators. Estimates of the global, regional, and national morbidity, mortality, and aetiologies of diarrhoea in 195 countries: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Infect Dis.* 2018;18(11):1211-28.
2. Van Cauteren D, De Valk H, Vaux S, Le Strat Y, Vaillant V. Burden of acute gastroenteritis and healthcare-seeking behaviour in France: a population-based study. *Epidemiol Infect.* avr 2012;140(4):697-705.
3. Fourquet F, Desenclos JC, Maurage C, Baron S. [Acute gastro-enteritis in children in France: estimates of disease burden through national hospital discharge data]. *Arch Pediatr Organe Off Soc Francaise Pediatr.* oct 2003;10(10):861-8.
4. Mathers C, Fat DM, Boerma JT, World Health Organization, éditeurs. The global burden of disease: 2004 update. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2008. 146 p.
5. Munos MK, Walker CLF, Black RE. The effect of oral rehydration solution and recommended home fluids on diarrhoea mortality. *Int J Epidemiol.* avr 2010;39 Suppl 1:i75-87.
6. Adam RD. Biology of *Giardia lamblia*. *Clin Microbiol Rev.* 1 juill 2001;14(3):447-75.
7. Lippi D, Gotuzzo E. The greatest steps towards the discovery of *Vibrio cholerae*. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis.* mars 2014;20(3):191-5.
8. Kapikian AZ, Wyatt RG, Dolin R, Thornhill TS, Kalica AR, Chanock RM. Visualization by Immune Electron Microscopy of a 27-nm Particle Associated with Acute Infectious Nonbacterial Gastroenteritis. *J Virol.* nov 1972;10(5):1075-81.
9. Bishop R. Discovery of rotavirus: Implications for child health. *J Gastroenterol Hepatol.* oct 2009;24 Suppl 3:S81-85.
10. Bosch A, Pintó RM, Guix S. Human Astroviruses. *Clin Microbiol Rev.* oct 2014;27(4):1048-74.
11. Chiba S, Sakuma Y, Kogasaka R, Akihara M, Horino K, Nakao T, et al. An outbreak of gastroenteritis associated with calicivirus in an infant home. *J Med Virol.* 1979;4(4):249-54.
12. Yamashita T, Kobayashi S, Sakae K, Nakata S, Chiba S, Ishihara Y, et al. Isolation of cytopathic small round viruses with BS-C-1 cells from patients with gastroenteritis. *J Infect Dis.* nov 1991;164(5):954-7.
13. Phan TG, Vo NP, Bonkougou IJO, Kapoor A, Barro N, O’Ryan M, et al. Acute diarrhea in West African children: diverse enteric viruses and a novel parvovirus genus. *J Virol.* oct 2012;86(20):11 024-30.
14. Phan TG, Sdiri-Loulizi K, Aouni M, Ambert-Balay K, Pothier P, Deng X, et al. New parvovirus in child with unexplained diarrhea, Tunisia. *Emerg Infect Dis.* nov 2014;20(11):1911-3.
15. Väisänen E, Fu Y, Hedman K, Söderlund-Venermo M. Human Protoparvoviruses. *Viruses.* 22 2017;9(11).

16. Genus: Protoparvovirus - Parvoviridae - ssDNA Viruses [Internet]. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). [cité 28 août 2020]. Disponible sur: https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/ssdna-viruses/w/parvoviridae/1045/genus-protoparvovirus
17. Qiu J, Söderlund-Venermo M, Young NS. Human Parvoviruses. *Clin Microbiol Rev.* janv 2017;30(1):43-113.
18. Kishore J, Kishore D. Clinical impact & pathogenic mechanisms of human parvovirus B19: A multiorgan disease inflictor incognito. *Indian J Med Res.* oct 2018;148(4):373-84.
19. Hastie E, Samulski RJ. Adeno-Associated Virus at 50: A Golden Anniversary of Discovery, Research, and Gene Therapy Success—A Personal Perspective. *Hum Gene Ther.* 1 mai 2015;26(5):257-65.
20. Naso MF, Tomkowicz B, Perry WL, Strohl WR. Adeno-Associated Virus (AAV) as a Vector for Gene Therapy. *Biodrugs.* 2017;31(4):317-34.
21. Allander T, Tammi MT, Eriksson M, Bjerkner A, Tiveljung-Lindell A, Andersson B. Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 6 sept 2005;102(36):12891-6.
22. Jartti T, Hedman K, Jartti L, Ruuskanen O, Allander T, Söderlund-Venermo M. Human bocavirus-the first 5 years. *Rev Med Virol.* janv 2012;22(1):46-64.
23. Yahiro T, Wangchuk S, Tshering K, Bandhari P, Zangmo S, Dorji T, et al. Novel human bufavirus genotype 3 in children with severe diarrhea, Bhutan. *Emerg Infect Dis.* juin 2014;20(6):1037-9.
24. Ilyas M, Mietzsch M, Kailasan S, Väisänen E, Luo M, Chipman P, et al. Atomic Resolution Structures of Human Bufaviruses Determined by Cryo-Electron Microscopy. *Viruses.* 04 2018;10(1).
25. Zádori Z, Szelei J, Lacoste M-C, Li Y, Gariépy S, Raymond P, et al. A Viral Phospholipase A2 Is Required for Parvovirus Infectivity. *Dev Cell.* août 2001;1(2):291-302.
26. Chieochansin T, Vutithanachot V, Theamboonlers A, Poovorawan Y. Bufavirus in fecal specimens of patients with and without diarrhea in Thailand. *Arch Virol.* juill 2015;160(7):1781-4.
27. Smits SL, Schapendonk CME, van Beek J, Vennema H, Schürch AC, Schipper D, et al. New viruses in idiopathic human diarrhea cases, the Netherlands. *Emerg Infect Dis.* juill 2014;20(7):1218-22.
28. Mohammad HA, Madi NM, Al-Nakib W. Analysis of viral diversity in stool samples from infants and children with acute gastroenteritis in Kuwait using Metagenomics approach. *Virol J.* 30 janv 2020;17(1):10.
29. Huang D-D, Wang W, Lu Q-B, Zhao J, Guo C-T, Wang H-Y, et al. Identification of Bufavirus-1 and Bufavirus-3 in Feces of Patients with Acute Diarrhea, China. *Sci Rep.* 19 août 2015;5:13272.

30. Yahiro T, Wangchuk S, Tshering K, Bandhari P, Zangmo S, Dorji T, et al. Novel Human Bufavirus Genotype 3 in Children with Severe Diarrhea, Bhutan. *Emerg Infect Dis.* juin 2014;20(6):1037-9.
31. Väisänen E, Kuisma I, Phan TG, Delwart E, Lappalainen M, Tarkka E, et al. Bufavirus in feces of patients with gastroenteritis, Finland. *Emerg Infect Dis.* juin 2014;20(6):1077-9.
32. Ayouni S, Estienney M, Hammami S, Neji Guediche M, Pothier P, Aouni M, et al. Cosavirus, Salivirus and Bufavirus in Diarrheal Tunisian Infants. *PloS One.* 2016;11(9):e0162255.
33. Altay A, Yahiro T, Bozdayi G, Matsumoto T, Sahin F, Ozkan S, et al. Bufavirus genotype 3 in Turkish children with severe diarrhoea. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis.* oct 2015;21(10):965.e1-4.
34. Väisänen E, Paloniemi M, Kuisma I, Lithovius V, Kumar A, Franssila R, et al. Epidemiology of two human protoparvoviruses, bufavirus and tusavirus. *Sci Rep.* 14 2016;6:39267.
35. Altan E, Del Valle Mendoza J, Deng X, Phan TG, Sadeghi M, Delwart EL. Small Circular Rep-Encoding Single-Stranded DNA Genomes in Peruvian Diarrhea Virome. *Genome Announc.* 21 sept 2017;5(38):e00822-17, e00822-17.
36. Okitsu S, Khamrin P, Takanashi S, Thongprachum A, Hoque SA, Takeuchi H, et al. Molecular detection of enteric viruses in the stool samples of children without diarrhea in Bangladesh. *Infect Genet Evol.* janv 2020;77:104055.
37. Goyer M, Aho L-S, Bour J-B, Ambert-Balay K, Pothier P. Seroprevalence distribution of Aichi virus among a French population in 2006-2007. *Arch Virol.* 2008;153(6):1171-4.
38. Väisänen E, Mohanraj U, Kinnunen PM, Jokelainen P, Al-Hello H, Barakat AM, et al. Global Distribution of Human Protoparvoviruses. *Emerg Infect Dis.* 2018;24(7):1292-9.
39. Hutson AM, Atmar RL, Graham DY, Estes MK. Norwalk Virus Infection and Disease Is Associated with ABO Histo-Blood Group Type. *J Infect Dis.* mai 2002;185(9):1335-7.
40. Marionneau S, Ruvoën N, Le Moullac-Vaidye B, Clement M, Cailleau-Thomas A, Ruiz-Palacois G, et al. Norwalk virus binds to histo-blood group antigens present on gastroduodenal epithelial cells of secretor individuals. *Gastroenterology.* juin 2002;122(7):1967-77.
41. Smith GE, Summers MD, Fraser MJ. Production of human beta interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector. *Mol Cell Biol.* déc 1983;3(12):2156-65.
42. Jiang X, Wang M, Graham DY, Estes MK. Expression, self-assembly, and antigenicity of the Norwalk virus capsid protein. *J Virol.* 1992;66(11):6527-32.
43. Abdoli A, Soleimanjahi H, Fotouhi F, Teimoori A, Pour Beiranvand S, Kianmehr Z. Human Papillomavirus Type16- L1 VLP Production in Insect Cells. *Iran J Basic Med Sci.* août 2013;16(8):891-5.
44. Engvall E, Perlmann P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry.* sept 1971;8(9):871-4.

45. Leys C, Ley C, Klein O, Bernard P, Licata L. Detecting outliers: Do not use standard deviation around the mean, use absolute deviation around the median. *J Exp Soc Psychol.* 1 juill 2013;49(4):764-6.
46. Anderson S, Momoeda M, Kawase M, Kajigaya S, Young NS. Peptides derived from the unique region of B19 parvovirus minor capsid protein elicit neutralizing antibodies in rabbits. *Virology.* janv 1995;206(1):626-32.
47. Kurtzman GJ, Cohen BJ, Field AM, Oseas R, Blaese RM, Young NS. Immune response to B19 parvovirus and an antibody defect in persistent viral infection. *J Clin Invest.* 1 oct 1989;84(4):1114-23.
48. Schwarz TF, Roggendorf M, Deinhardt F. Human parvovirus B19: ELISA and immunoblot assays. *J Virol Methods.* juin 1988;20(2):155-68.
49. Nakata S, Estes MK, Chiba S. Detection of human calicivirus antigen and antibody by enzyme-linked immunosorbent assays. *J Clin Microbiol.* oct 1988;26(10):2001-5.
50. Williams T, Bergoin M, van Oers MM. Diversity of large DNA viruses of invertebrates. *J Invertebr Pathol.* juill 2017;147:4-22.
51. Chateigner A, Bézier A, Labrousse C, Jiolle D, Barbe V, Herniou E. Ultra Deep Sequencing of a Baculovirus Population Reveals Widespread Genomic Variations. *Viruses.* 7 juill 2015;7(7):3625-46.
52. Cotmore SF, Tattersall P. Parvoviruses: Small Does Not Mean Simple. *Annu Rev Virol.* 3 nov 2014;1(1):517-37.
53. Cotmore SF, Agbandje-McKenna M, Chiorini JA, Mukha DV, Pintel DJ, Qiu J, et al. The family Parvoviridae. *Arch Virol.* mai 2014;159(5):1239-47.

ANNEXES

Résultats bruts pour les tests ELISA indirects :

Échantillon	Série	DO BuV1	DO BuV2	DO BuV3	DO TuV	DO WT
A1 6	6	0,600	0,694	0,601	0,559	0,649
A2 6	6	0,355	0,324	0,307	0,277	0,273
A3 6	6	0,379	0,305	0,252	0,202	0,252
A4 6	6	0,181	0,168	0,121	0,139	0,124
A5 6	6	0,056	0,059	0,046	0,048	0,033
A8 6	6	0,113	0,169	0,152	0,101	0,097
A9 6	6	1,997	0,993	0,807	0,553	0,791
A10 6	6	1,182	1,293	1,386	1,095	1,225
A11 6	6	1,636	1,721	1,378	1,407	1,201
A12 6	6	1,578	1,642	1,608	1,599	1,798
B1 6	6	1,930	1,845	1,679	1,559	1,108
B2 6	6	1,005	1,009	0,915	0,831	1,005
B3 6	6	0,272	0,352	0,212	0,190	0,052
B4 6	6	0,215	0,272	0,180	0,198	0,169
B5 6	6	0,893	1,205	0,697	0,721	0,330
B6 6	6	1,975	2,743	1,825	1,881	1,979
B7 6	6	1,570	1,328	1,492	1,147	1,303
B8 6	6	0,295	0,283	0,362	0,217	0,135
B9 6	6	0,056	0,235	1,210	0,061	0,025
B10 6	6	0,414	0,570	0,367	0,388	0,406
B11 6	6	0,622	0,958	0,608	0,740	0,385
B12 6	6	0,404	0,355	0,310	0,270	0,306
C1 6	6	0,046	0,053	0,034	0,034	0,035
C2 6	6	0,106	0,121	0,109	0,074	0,071
C3 6	6	0,055	0,049	0,039	0,025	0,035
C4 6	6	0,882	0,928	0,383	0,851	0,820
C5 6	6	0,730	0,927	0,562	0,612	0,608
C7 6	6	1,327	1,780	1,551	1,496	0,907
C8 6	6	0,577	0,515	0,478	0,391	0,270
C9 6	6	1,333	2,006	1,461	1,388	1,810
C10 6	6	0,280	0,395	0,246	0,259	0,362
C11 6	6	0,136	0,123	0,131	0,184	0,018
C12 6	6	1,385	0,242	0,207	0,162	0,120
D1 6	6	0,611	0,620	0,599	0,458	0,271
D3 6	6	1,328	0,241	0,333	0,206	0,108
D4 6	6	0,965	0,945	0,722	0,616	0,888
D5 6	6	0,029	0,069	0,025	0,020	0,021
D6 6	6	0,481	0,456	0,324	0,349	0,409
D7 6	6	0,780	0,286	0,252	0,224	0,149
D8 6	6	0,123	0,123	0,092	0,095	0,078
D9 6	6	0,348	0,397	0,277	0,305	0,301
D10 6	6	0,039	0,035	0,100	0,034	0,032
D11 6	6	0,498	0,466	0,302	0,389	0,374
D12 6	6	0,111	0,114	0,109	0,121	0,108
E1 6	6	1,224	0,978	0,836	0,782	0,865
E2 6	6	0,698	0,773	0,761	0,507	0,673
E3 6	6	0,117	0,223	0,190	0,143	0,081

Échantillon	Série	DO BuV1	DO BuV2	DO BuV3	DO TuV	DO WT
E4 6	6	0,143	0,152	0,094	0,076	0,066
E6 6	6	1,330	1,113	1,035	1,001	1,047
E7 6	6	0,258	0,347	0,218	0,216	0,039
E8 6	6	1,212	1,954	0,889	1,642	1,046
E9 6	6	0,118	0,135	0,104	0,097	0,089
E11 6	6	0,970	1,244	1,167	1,087	0,907
E12 6	6	1,725	2,070	1,714	1,780	2,093
F1 6	6	0,289	0,312	0,196	0,231	0,203
F2 6	6	0,177	0,152	0,137	0,085	0,097
F5 6	6	0,529	0,641	0,438	0,317	0,341
F8 6	6	1,492	1,695	1,260	1,130	1,032
F9 6	6	0,120	0,194	0,144	0,111	0,137
F10 6	6	0,203	0,247	0,178	0,215	0,152
F11 6	6	0,123	0,093	0,098	0,113	0,088
G1 6	6	0,149	0,222	0,169	0,166	0,078
G2 6	6	0,869	1,126	0,784	0,811	0,809
G3 6	6	0,052	0,067	0,052	0,039	0,043
G4 6	6	0,412	0,423	0,317	0,406	0,377
G5 6	6	0,762	0,365	0,268	0,280	0,220
G6 6	6	0,212	0,264	0,164	0,191	0,177
G7 6	6	0,471	0,501	0,527	0,465	0,403
G8 6	6	0,438	0,617	0,521	0,410	0,356
G9 6	6	0,596	0,879	0,567	0,719	0,642
G11 6	6	0,079	0,077	0,080	0,062	0,055
H1 6	6	0,245	0,263	0,316	0,240	0,228
H2 6	6	0,068	0,055	0,051	0,036	0,040
H3 6	6	0,124	0,131	0,104	0,117	0,051
H4 6	6	2,774	3,137	3,043	2,533	2,362
H5 6	6	1,676	1,480	1,171	1,247	1,073
H6 6	6	0,316	0,343	0,362	0,326	0,360
H7 6	6	0,470	0,389	0,368	0,323	0,291
H10 6	6	0,251	0,287	0,239	0,284	0,132
H11 6	6	1,828	1,893	1,986	1,875	1,731
H12 6	6	0,252	0,371	0,204	0,253	0,187
A1 5	5	0,079	0,081	0,082	0,074	0,072
A2 5	5	0,231	0,221	0,339	0,287	0,219
A3 5	5	0,365	0,245	0,366	0,456	0,275
A4 5	5	0,168	0,144	0,110	0,160	0,109
A5 5	5	1,055	0,272	0,147	0,162	0,137
A6 5	5	0,833	1,851	0,358	0,392	0,157
A7 5	5	0,140	0,181	0,167	0,177	0,150
A9 5	5	0,088	0,095	0,070	0,081	0,083
A10 5	5	0,244	0,202	0,261	0,249	0,224
A11 5	5	0,205	0,206	0,411	0,342	0,427
A12 5	5	0,166	0,201	0,156	0,422	0,154
B1 5	5	0,691	0,744	0,826	0,774	0,233
B2 5	5	0,230	1,798	1,575	0,158	0,139
B3 5	5	0,086	0,064	0,087	0,107	0,075
B4 5	5	0,351	0,297	0,384	0,431	0,309
B5 5	5	0,788	0,661	0,547	0,568	0,634
B6 5	5	0,089	0,317	0,113	0,132	0,106
B7 5	5	0,233	0,248	0,188	0,196	0,174

Échantillon	Série	DO BuV1	DO BuV2	DO BuV3	DO TuV	DO WT
B8 5	5	0,535	0,971	0,678	0,869	0,199
B9 5	5	1,538	1,385	1,457	2,028	1,757
B10 5	5	0,275	0,362	0,366	0,475	0,406
B11 5	5	0,283	1,201	0,164	0,159	0,068
C1 5	5	0,129	0,146	0,112	0,149	0,089
C2 5	5	0,206	0,269	0,183	0,363	0,117
C3 5	5	0,614	0,752	0,632	0,793	0,403
C4 5	5	0,189	0,202	0,335	0,346	0,289
C5 5	5	0,386	0,305	0,288	0,331	0,370
C6 5	5	0,155	0,155	0,122	0,122	0,136
C7 5	5	0,429	0,942	0,349	0,395	0,335
C8 5	5	0,106	0,135	0,093	0,105	0,058
C9 5	5	0,161	0,202	0,261	0,301	0,288
C10 5	5	0,825	0,631	1,130	1,248	1,247
C11 5	5	0,407	0,521	0,430	0,508	0,435
C12 5	5	0,079	0,103	0,057	0,091	0,077
D1 5	5	0,074	0,073	0,069	0,064	0,071
D2 5	5	0,307	0,315	0,840	0,345	0,217
D3 5	5	0,175	0,146	0,133	0,176	0,160
D4 5	5	0,189	0,184	0,188	0,218	0,129
D5 5	5	0,284	0,233	0,265	0,242	0,200
D6 5	5	0,463	0,257	0,163	0,181	0,165
D7 5	5	0,170	0,231	0,162	0,199	0,153
D8 5	5	0,133	0,112	0,173	0,146	0,123
D10 5	5	0,536	0,167	0,140	0,135	0,130
D12 5	5	0,252	0,387	0,462	0,557	0,482
E1 5	5	0,161	0,133	1,099	0,153	0,153
E2 5	5	0,250	0,168	0,381	0,277	0,198
E3 5	5	0,104	0,083	0,071	0,079	0,059
E4 5	5	0,217	0,183	0,754	0,269	0,172
E5 5	5	0,773	2,494	1,548	0,327	0,154
E6 5	5	0,084	0,100	0,116	0,105	0,075
E7 5	5	0,332	0,266	0,166	0,321	0,278
E8 5	5	0,204	0,141	0,171	0,169	0,107
E10 5	5	0,136	0,192	0,129	0,162	0,125
E12 5	5	0,192	0,253	0,146	0,193	0,066
F1 5	5	0,305	0,335	0,296	0,339	0,113
F2 5	5	0,425	0,316	0,901	0,943	0,572
F3 5	5	0,144	0,138	0,117	0,140	0,101
F5 5	5	0,102	0,099	0,087	0,084	0,077
F8 5	5	0,121	0,163	0,088	0,106	0,057
F9 5	5	0,086	0,112	0,086	0,092	0,087
F10 5	5	0,358	0,441	0,385	0,478	0,415
F11 5	5	0,285	0,421	0,241	0,257	0,144
F12 5	5	0,135	0,236	0,164	0,203	0,111
G1 5	5	0,489	0,367	0,575	0,478	0,439
G2 5	5	0,260	0,219	0,389	0,390	0,263
G3 5	5	0,583	0,466	0,571	0,527	0,547
G4 5	5	1,750	1,436	2,158	2,064	2,303
G5 5	5	0,298	0,262	0,225	0,264	0,165
G6 5	5	0,236	0,375	0,253	0,329	0,205
G7 5	5	0,186	0,196	0,203	0,192	0,204

Échantillon	Série	DO BuV1	DO BuV2	DO BuV3	DO TuV	DO WT
G8 5	5	0,163	0,172	0,168	0,172	0,154
G10 5	5	1,019	1,051	0,942	1,110	1,173
G11 5	5	0,173	1,017	0,377	0,150	0,113
H1 5	5	0,263	0,207	0,519	0,415	0,324
H5 5	5	0,071	0,076	0,119	0,115	0,098
H8 5	5	0,118	0,134	0,151	0,174	0,104
H9 5	5	0,132	0,129	0,265	0,208	0,246
H10 5	5	0,217	0,250	0,213	0,248	0,248
H12 5	5	0,175	0,206	0,203	0,245	0,191
A1 4	4	0,515	0,525	0,478	0,646	0,376
A2 4	4	0,218	0,229	0,247	0,281	0,169
A3 4	4	0,116	0,090	0,093	0,075	0,081
A4 4	4	0,159	0,149	0,151	0,138	0,167
A5 4	4	0,204	0,191	0,156	0,178	0,192
A6 4	4	0,136	0,140	0,129	0,147	0,077
A7 4	4	0,286	0,224	0,189	0,356	0,201
A8 4	4	0,379	0,437	0,503	0,508	0,251
A9 4	4	0,458	0,457	0,404	0,509	0,403
A10 4	4	0,186	0,230	0,129	0,159	0,175
A11 4	4	0,413	0,291	0,258	0,220	0,210
A12 4	4	0,307	0,462	1,574	0,368	0,201
B1 4	4	0,410	0,447	0,455	0,590	0,452
B2 4	4	0,662	0,722	0,742	1,020	0,126
B3 4	4	0,173	0,183	0,140	0,147	0,149
B4 4	4	0,236	0,234	0,216	0,242	0,200
B5 4	4	0,158	0,157	0,128	0,154	0,156
B6 4	4	0,118	0,118	0,106	0,122	0,087
B7 4	4	0,103	0,100	0,104	0,097	0,144
B8 4	4	0,295	0,491	0,317	0,334	0,307
B9 4	4	0,168	0,218	0,225	0,223	0,104
B10 4	4	0,199	0,235	0,203	0,184	0,169
B11 4	4	0,718	0,691	0,557	0,673	0,651
B12 4	4	0,361	0,400	0,245	0,379	0,389
C1 4	4	0,326	0,379	0,293	0,283	0,245
C2 4	4	0,261	0,227	0,223	0,169	0,317
C3 4	4	0,172	0,175	0,218	0,187	0,174
C4 4	4	0,170	0,192	0,160	0,159	0,140
C5 4	4	0,035	0,039	0,039	0,027	0,036
C6 4	4	0,183	0,201	0,162	0,190	0,190
C7 4	4	0,132	0,160	0,187	0,170	0,065
C8 4	4	0,371	0,402	0,291	0,300	0,323
C9 4	4	0,202	0,229	0,150	0,199	0,220
C10 4	4	2,347	2,393	2,473	2,614	2,454
C11 4	4	0,293	0,182	0,090	0,079	0,087
C12 4	4	0,224	0,247	0,175	0,193	0,323
D1 4	4	2,693	3,019	2,592	2,993	2,686
D2 4	4	0,245	0,374	0,273	0,279	0,241
D3 4	4	0,313	0,529	0,310	0,483	0,254
D4 4	4	0,095	0,136	0,087	0,102	0,066
D5 4	4	0,086	0,142	0,090	0,100	0,082
D6 4	4	0,293	0,354	0,280	0,278	0,187
D7 4	4	0,143	0,178	0,114	0,113	0,106

Échantillon	Série	DO BuV1	DO BuV2	DO BuV3	DO TuV	DO WT
D8 4	4	0,142	0,177	0,137	0,145	0,121
D9 4	4	0,171	0,156	0,143	0,129	0,274
D10 4	4	0,175	0,235	0,134	0,216	0,171
D11 4	4	0,293	0,318	0,227	0,325	0,281
D12 4	4	0,147	0,165	0,133	0,144	0,130
E1 4	4	0,203	0,220	0,235	0,219	0,147
E2 4	4	0,076	0,071	0,076	0,048	0,058
E3 4	4	0,112	0,132	0,079	0,126	0,276
E5 4	4	0,173	0,202	0,124	0,140	0,128
E6 4	4	0,241	0,260	0,253	0,292	0,149
E7 4	4	0,493	0,597	0,718	0,552	0,150
E9 4	4	0,238	0,334	0,205	0,287	0,304
E10 4	4	0,353	0,378	0,290	0,345	0,304
E11 4	4	0,163	0,182	0,127	0,151	0,157
E12 4	4	0,228	0,272	0,215	0,267	0,145
F1 4	4	0,136	0,165	0,120	0,125	0,148
F2 4	4	0,118	0,135	0,123	0,129	0,106
F3 4	4	0,171	0,210	0,182	0,168	0,171
F4 4	4	1,285	0,449	0,392	0,420	0,179
F6 4	4	0,153	0,168	0,145	0,126	0,101
F7 4	4	0,205	0,262	0,208	0,361	0,270
F8 4	4	0,162	0,237	0,172	0,236	0,131
F9 4	4	0,088	0,115	0,069	0,097	0,071
F11 4	4	0,119	0,121	0,088	0,097	0,107
G1 4	4	0,124	0,275	0,122	0,143	0,111
G2 4	4	0,401	0,277	0,254	0,253	0,165
G4 4	4	0,388	0,441	0,474	0,583	0,438
G5 4	4	0,570	0,712	0,527	0,630	0,315
G6 4	4	0,178	0,181	0,165	0,145	0,150
G7 4	4	0,139	0,168	0,145	0,147	0,132
G8 4	4	0,230	0,267	0,178	0,230	0,208
G9 4	4	0,130	0,137	0,106	0,098	0,124
G10 4	4	0,776	0,863	0,571	0,742	0,561
G11 4	4	0,186	0,200	0,137	0,235	0,161
G12 4	4	0,223	0,281	0,207	0,255	0,164
H1 4	4	0,103	0,115	0,093	0,101	0,090
H2 4	4	0,220	0,286	0,296	0,333	0,258
H3 4	4	0,366	0,386	0,425	0,483	0,298
H4 4	4	0,482	0,490	0,513	0,733	0,638
H5 4	4	0,231	0,202	0,113	0,092	0,076
H6 4	4	0,436	0,539	0,477	0,531	0,356
H7 4	4	0,119	0,112	0,081	0,078	0,089
H8 4	4	0,119	0,098	0,094	0,089	0,073
H9 4	4	0,178	0,223	0,135	0,196	0,166
H10 4	4	0,145	0,146	0,128	0,136	0,116
H11 4	4	0,309	0,328	0,264	0,251	0,361
H12 4	4	0,153	0,163	0,134	0,150	0,151
A1 2	2	0,257	0,235	0,205	0,148	0,806
A2 2	2	0,138	0,168	0,131	0,105	0,190
A3 2	2	0,174	0,190	0,158	0,106	0,101
A4 2	2	0,372	0,344	0,423	0,243	0,487
A5 2	2	0,218	0,238	0,244	0,186	0,174

Échantillon	Série	DO BuV1	DO BuV2	DO BuV3	DO TuV	DO WT
A6 2	2	0,191	0,163	0,121	0,110	0,296
A7 2	2	0,200	0,170	0,148	0,128	0,269
A8 2	2	0,106	0,071	0,062	0,075	0,122
A9 2	2	0,128	0,130	0,121	0,084	0,129
A10 2	2	0,098	0,074	0,053	0,062	0,110
A11 2	2	0,719	0,712	0,596	0,317	0,301
A12 2	2	0,404	0,438	0,216	0,203	0,297
B1 2	2	0,148	0,210	0,118	0,111	0,130
B2 2	2	0,147	0,139	0,117	0,111	0,126
B3 2	2	0,171	0,175	0,169	0,146	0,274
B4 2	2	0,527	0,514	0,579	0,370	0,549
B5 2	2	0,078	0,081	0,067	0,075	0,242
B6 2	2	0,115	0,095	0,090	0,085	0,095
B7 2	2	0,194	0,131	0,106	0,091	0,115
B8 2	2	0,140	0,133	0,175	0,122	0,183
B9 2	2	0,150	0,130	0,099	0,139	0,181
B10 2	2	0,183	0,142	0,122	0,103	0,184
B11 2	2	0,141	0,101	0,086	0,075	0,233
B12 2	2	0,361	0,255	0,236	0,202	0,271
C1 2	2	0,108	0,092	0,109	0,087	0,177
C2 2	2	0,117	0,118	0,112	0,234	0,125
C3 2	2	0,139	0,172	0,125	0,111	0,107
C4 2	2	0,210	0,250	0,201	0,123	0,101
C5 2	2	0,152	0,110	0,105	0,107	0,107
C6 2	2	0,448	0,149	1,061	0,118	0,190
C8 2	2	0,142	0,134	0,139	0,102	0,118
C9 2	2	0,256	0,228	0,237	0,202	0,223
C10 2	2	0,262	0,324	0,236	0,215	0,160
C11 2	2	0,224	0,218	0,160	0,133	0,192
C12 2	2	0,121	0,089	0,074	0,085	0,128
D1 2	2	0,110	0,106	0,072	0,078	0,088
D2 2	2	3,307	0,436	0,468	0,335	0,476
D3 2	2	0,161	0,151	0,128	0,127	0,137
D4 2	2	0,069	0,068	0,054	0,060	0,085
D5 2	2	0,282	0,229	0,188	0,156	0,866
D6 2	2	0,788	2,673	0,249	0,230	0,246
D7 2	2	0,297	0,192	2,466	0,136	0,159
D8 2	2	0,165	0,172	0,228	0,132	0,266
D9 2	2	0,177	0,170	0,123	0,161	0,192
D10 2	2	0,938	0,311	0,097	0,120	0,179
D11 2	2	0,098	0,080	0,065	0,073	0,137
D12 2	2	0,381	0,315	0,249	0,204	0,406
E1 2	2	0,146	0,146	0,140	0,119	0,185
E2 2	2	0,140	0,111	0,092	0,109	0,120
E3 2	2	0,188	0,283	0,135	0,145	0,156
E4 2	2	0,067	0,071	0,048	0,062	0,080
E5 2	2	0,160	0,129	0,112	0,106	0,154
E6 2	2	0,550	0,565	0,511	0,462	0,642
E7 2	2	0,178	0,156	0,133	0,125	0,191
E8 2	2	0,276	0,200	0,287	0,203	0,358
E9 2	2	0,174	0,193	0,165	0,167	0,236
E10 2	2	0,173	0,123	0,087	0,094	0,369

Échantillon	Série	DO BuV1	DO BuV2	DO BuV3	DO TuV	DO WT
E11 2	2	0,113	0,098	0,084	0,092	0,142
E12 2	2	0,330	0,212	0,217	0,141	0,189
F1 2	2	0,518	0,440	0,377	0,355	0,389
F2 2	2	0,065	0,057	0,047	0,061	0,068
F3 2	2	0,184	0,299	0,167	0,210	0,226
F4 2	2	0,114	0,110	0,083	0,099	0,150
F5 2	2	0,455	0,550	0,428	0,614	0,601
F6 2	2	0,081	0,062	0,286	0,054	0,087
F7 2	2	0,122	0,100	0,099	0,098	0,180
F8 2	2	0,105	0,117	0,120	0,092	0,097
F9 2	2	0,149	0,155	0,097	0,114	0,116
F10 2	2	0,242	0,151	0,108	0,133	0,222
F11 2	2	0,117	0,125	0,092	0,093	0,129
F12 2	2	0,154	0,144	0,102	0,109	0,245
G1 2	2	0,187	0,193	0,155	0,141	0,172
G3 2	2	0,148	0,201	0,138	0,157	0,150
G4 2	2	0,405	0,440	0,389	0,405	0,597
G5 2	2	0,168	0,549	0,158	0,154	0,195
G6 2	2	0,168	0,183	0,161	0,161	0,206
G8 2	2	0,105	0,100	0,114	0,086	0,255
G9 2	2	0,192	0,221	0,190	0,151	0,145
G10 2	2	0,143	0,183	0,151	0,132	0,205
G11 2	2	0,139	0,148	0,102	0,104	0,233
G12 2	2	0,311	0,635	0,217	0,200	0,314
H1 2	2	0,215	1,619	0,188	0,148	0,177
H2 2	2	0,149	0,128	0,130	0,115	0,153
H3 2	2	0,204	0,216	0,222	0,200	0,233
H4 2	2	0,164	0,154	0,154	0,147	0,213
H5 2	2	0,099	0,093	0,086	0,084	0,141
H6 2	2	0,554	0,612	0,561	0,450	0,718
H7 2	2	0,129	0,106	0,092	0,093	0,102
H8 2	2	0,176	0,179	0,161	0,144	0,141
H9 2	2	0,209	0,236	0,189	0,227	0,261
H10 2	2	0,121	0,081	1,964	0,074	0,123
H12 2	2	2,547	2,725	2,194	2,317	2,723
A1 3	3	0,137	0,094	0,118	0,091	0,130
A2 3	3	0,067	0,321	0,060	0,042	0,043
A3 3	3	0,190	0,437	0,245	0,221	0,177
A4 3	3	0,148	0,115	0,117	0,081	0,128
A5 3	3	0,108	0,087	0,096	0,079	0,102
A6 3	3	0,173	0,138	1,606	0,147	0,138
A7 3	3	0,295	0,239	0,310	0,269	0,425
A8 3	3	0,209	0,228	0,238	0,179	0,168
A9 3	3	0,164	0,188	0,187	0,143	0,130
A10 3	3	0,136	0,145	0,127	0,106	0,097
A11 3	3	0,187	0,190	0,185	0,159	0,145
A12 3	3	0,146	0,166	0,196	0,147	0,119
B1 3	3	0,117	0,101	0,130	0,116	0,111
B3 3	3	0,160	0,144	0,139	0,156	0,106
B5 3	3	0,305	0,277	0,244	0,254	0,235
B5 3	3	0,136	0,145	0,123	0,139	0,103
B7 3	3	0,266	0,280	0,232	0,215	0,152

Échantillon	Série	DO BuV1	DO BuV2	DO BuV3	DO TuV	DO WT
B8 3	3	0,099	0,076	0,072	0,071	0,066
B9 3	3	0,224	0,110	0,183	0,103	0,102
B10 3	3	0,185	0,183	0,188	0,142	0,127
C1 3	3	0,217	0,202	0,217	0,187	0,141
C2 3	3	0,531	0,661	0,073	0,058	0,068
C3 3	3	0,115	0,086	0,094	0,082	0,079
C4 3	3	0,210	0,189	0,160	0,157	0,130
C5 3	3	0,409	0,464	0,368	0,370	0,579
C6 3	3	0,539	0,097	0,085	0,069	0,082
C7 3	3	0,137	0,145	0,127	0,102	0,124
C8 3	3	0,573	0,680	0,674	0,474	0,123
C9 3	3	0,189	0,193	0,188	0,141	0,203
C10 3	3	0,208	0,196	0,191	0,181	0,174
C11 3	3	0,514	0,635	0,593	0,475	0,402
C12 3	3	0,170	0,217	0,229	0,188	0,154
D1 3	3	0,547	0,606	0,540	0,466	0,443
D2 3	3	0,136	0,110	0,133	0,150	0,127
D3 3	3	0,076	0,086	0,096	0,091	0,097
D4 3	3	0,454	0,424	0,519	0,397	0,301
D5 3	3	0,458	0,488	0,433	0,412	0,272
D6 3	3	0,224	0,250	0,185	0,213	0,170
D7 3	3	0,411	0,498	0,539	0,401	0,108
D8 3	3	0,106	0,143	0,107	0,087	0,089
D9 3	3	0,178	0,133	0,142	0,144	0,142
D10 3	3	0,125	0,104	0,126	0,106	0,101
D11 3	3	1,510	1,767	0,664	0,141	0,127
D12 3	3	0,856	0,224	0,234	0,173	0,144
E1 3	3	0,180	0,156	0,171	0,149	0,131
E2 3	3	0,364	1,974	0,145	0,128	0,098
E3 3	3	0,126	0,094	0,111	0,088	0,105
E4 3	3	0,120	0,094	0,097	0,095	0,100
E5 3	3	0,169	0,166	0,133	0,133	0,113
E6 3	3	0,135	0,134	0,129	0,113	0,091
E7 3	3	0,209	0,206	0,172	0,158	0,145
E8 3	3	0,163	0,199	0,144	0,150	0,120
E9 3	3	0,148	0,147	0,144	0,135	0,092
E10 3	3	0,222	0,317	0,270	0,243	0,145
E11 3	3	0,471	0,436	0,452	0,431	0,406
E12 3	3	0,195	0,244	0,259	0,195	0,160
F1 3	3	0,090	0,084	0,111	0,076	0,085
F2 3	3	0,200	0,153	0,203	0,196	0,205
F3 3	3	0,683	0,205	0,228	0,184	0,085
F4 3	3	0,099	0,095	0,077	0,087	0,300
F5 3	3	0,528	0,127	0,062	0,058	0,074
F6 3	3	0,548	0,576	0,424	0,584	0,401
F7 3	3	0,148	0,147	0,136	0,155	0,107
F8 3	3	0,316	0,293	0,311	0,281	0,272
F9 3	3	0,276	0,368	0,216	0,189	0,155
F10 3	3	0,138	0,116	0,110	0,102	0,094
F11 3	3	0,119	0,109	0,114	0,076	0,086
G1 3	3	0,082	0,068	0,093	0,078	0,068
G2 3	3	0,336	0,244	0,341	0,240	0,343

Échantillon	Série	DO BuV1	DO BuV2	DO BuV3	DO TuV	DO WT
G3 3	3	0,098	0,074	0,235	0,082	0,087
G4 3	3	0,203	0,174	0,143	0,187	0,206
G5 3	3	0,130	0,126	0,094	0,101	0,158
G6 3	3	0,246	0,194	0,186	0,219	0,240
G8 3	3	0,085	0,175	0,080	0,082	0,068
G9 3	3	0,226	0,248	0,218	0,220	0,125
G10 3	3	0,233	0,192	0,205	0,179	0,183
G11 3	3	0,093	0,084	0,097	0,086	0,076
G12 3	3	0,223	0,242	0,291	0,205	0,179
H2 3	3	0,123	0,112	0,122	0,123	0,104
H3 3	3	0,204	0,185	0,474	0,163	0,135
H5 3	3	0,134	0,100	0,106	0,102	0,112
H6 3	3	0,133	0,130	0,121	0,132	0,129
H7 3	3	0,234	0,273	0,268	0,261	0,179
H8 3	3	0,376	0,555	0,380	0,300	0,317
H9 3	3	0,107	0,124	0,116	0,106	0,061
H10 3	3	0,204	0,169	0,221	0,173	0,202
H11 3	3	0,404	0,369	0,396	0,410	0,300
H12 3	3	0,137	0,135	0,160	0,126	0,123
A1 1	1	0,102	0,127	0,081	0,112	0,060
A2 1	1	0,093	0,199	0,098	0,105	0,041
A3 1	1	0,580	0,517	0,400	0,399	0,357
A4 1	1	0,095	0,123	0,089	0,104	0,057
A5 1	1	0,181	0,211	0,145	0,207	0,103
A6 1	1	0,221	0,324	0,223	0,315	0,150
A7 1	1	0,068	0,068	0,061	0,092	0,044
A8 1	1	0,107	0,126	0,094	0,118	0,078
A9 1	1	0,089	0,148	0,095	0,120	0,069
A10 1	1	0,084	0,121	0,098	0,123	0,066
A11 1	1	0,161	0,767	0,153	0,225	0,183
A12 1	1	0,250	0,322	0,340	0,473	0,391
B1 1	1	0,071	0,117	0,074	0,088	0,056
B2 1	1	0,357	0,190	0,077	0,105	0,066
B3 1	1	0,093	0,115	0,128	0,124	0,105
B4 1	1	0,100	0,128	0,082	0,134	0,085
B5 1	1	0,090	0,172	0,103	0,163	0,063
B7 1	1	0,160	0,221	0,170	0,198	0,146
B8 1	1	0,070	0,081	0,066	0,103	0,045
B9 1	1	0,073	0,095	0,076	0,085	0,065
B10 1	1	0,054	0,072	0,093	0,079	0,058
B11 1	1	0,093	0,113	0,101	0,147	0,090
B12 1	1	0,048	0,051	0,044	0,065	0,051
C1 1	1	0,224	0,351	0,248	0,208	0,125
C2 1	1	0,263	0,487	0,312	0,459	0,327
C4 1	1	0,147	0,204	0,158	0,183	0,056
C5 1	1	0,167	0,214	0,210	0,224	0,130
C6 1	1	0,221	0,305	0,257	0,304	0,089
C7 1	1	0,164	0,182	0,159	0,212	0,120
C8 1	1	0,027	0,032	0,025	0,039	0,025
C9 1	1	0,201	0,259	0,244	0,265	0,188
C10 1	1	0,087	0,099	0,077	0,112	0,071
C11 1	1	0,267	0,324	0,332	0,365	0,306

Échantillon	Série	DO BuV1	DO BuV2	DO BuV3	DO TuV	DO WT
C12 1	1	0,176	0,433	0,147	0,200	0,195
D1 1	1	0,116	0,138	0,093	0,126	0,058
D2 1	1	0,144	0,167	0,100	0,164	0,066
D4 1	1	0,122	0,158	0,108	0,155	0,089
D5 1	1	0,730	1,021	0,909	0,825	0,045
D6 1	1	0,223	0,266	0,160	0,205	0,142
D7 1	1	0,214	0,223	0,162	0,274	0,167
D8 1	1	0,375	0,451	0,431	0,408	0,166
D9 1	1	0,152	0,173	0,162	0,217	0,164
D10 1	1	0,156	0,198	0,193	0,215	0,111
D11 1	1	0,094	0,141	0,141	0,204	0,114
D12 1	1	0,721	0,220	0,197	0,236	0,142
E1 1	1	0,318	0,472	0,477	0,454	0,446
E2 1	1	0,075	0,110	0,038	0,089	0,071
E4 1	1	0,694	0,803	0,634	0,716	0,577
E5 1	1	0,065	0,090	0,052	0,085	0,053
E6 1	1	0,124	0,207	0,133	0,153	0,144
E7 1	1	0,126	0,127	0,088	0,126	0,060
E8 1	1	0,298	0,303	0,215	0,425	0,213
E9 1	1	0,117	0,143	0,128	0,159	0,118
E10 1	1	0,076	0,103	0,092	0,098	0,062
E11 1	1	0,066	0,078	0,066	0,106	0,065
E12 1	1	0,081	0,081	0,072	0,100	0,083
F1 1	1	0,084	0,106	0,060	0,088	0,045
F2 1	1	0,368	0,424	0,231	0,353	0,219
F3 1	1	0,050	0,061	0,054	0,079	0,041
F4 1	1	0,314	0,512	0,278	0,434	0,304
F5 1	1	0,213	0,269	0,183	0,286	0,077
F6 1	1	0,073	0,102	0,066	0,072	0,049
F7 1	1	0,090	0,109	0,073	0,109	0,064
F8 1	1	0,373	0,412	0,305	0,341	0,196
F9 1	1	0,081	0,102	0,070	0,107	0,069
F10 1	1	0,054	0,213	0,055	0,079	0,055
F11 1	1	0,139	0,191	0,196	0,260	0,130
F12 1	1	0,236	0,284	0,255	0,249	0,119
G1 1	1	0,126	0,149	0,156	0,131	0,076
G2 1	1	0,545	0,491	0,607	0,528	0,950
G3 1	1	0,115	0,157	0,124	0,137	0,065
G4 1	1	0,130	0,199	0,140	0,159	0,059
G5 1	1	0,280	0,384	0,241	0,340	0,181
G6 1	1	0,061	0,079	0,053	0,069	0,050
G7 1	1	0,098	0,109	0,078	0,111	0,064
G8 1	1	0,245	0,248	0,206	0,276	0,186
G9 1	1	0,174	0,178	0,215	0,256	0,204
G10 1	1	0,109	0,566	0,104	0,160	0,068
G11 1	1	0,176	0,242	0,240	0,279	0,129
G12 1	1	0,061	0,068	0,059	0,086	0,042
H1 1	1	0,073	0,114	0,150	0,088	0,059
H2 1	1	0,229	0,395	0,242	0,285	0,104
H4 1	1	0,157	0,176	0,186	0,226	0,175
H5 1	1	0,171	0,270	0,153	0,230	0,102
H6 1	1	0,126	0,128	0,906	0,093	0,034

Échantillon	Série	DO BuV1	DO BuV2	DO BuV3	DO TuV	DO WT
H8 1	1	0,193	0,147	0,129	0,184	0,090
H9 1	1	0,158	0,734	0,142	0,136	0,112
H11 1	1	0,409	0,443	0,389	0,693	0,371
H12 1	1	0,356	0,496	0,828	0,695	0,489
A1 7	7	0,321	0,407	0,302	0,352	0,261
A2 7	7	0,201	0,226	0,189	0,188	0,168
A3 7	7	0,384	0,346	0,289	0,324	0,304
A4 7	7	0,176	0,160	0,183	0,150	0,155
A5 7	7	1,546	1,517	1,452	1,571	0,670
A6 7	7	0,123	0,091	0,099	0,091	0,104
A7 7	7	0,269	0,214	0,201	0,202	0,188
A8 7	7	0,316	0,268	0,243	0,289	0,279
A9 7	7	0,352	0,386	0,313	0,276	0,252
A10 7	7	0,038	0,027	0,032	0,032	0,032
A11 7	7	0,142	0,165	0,158	0,126	0,127
A12 7	7	0,109	0,111	0,095	0,078	0,087
B1 7	7	0,197	0,266	0,161	0,156	0,156
B2 7	7	0,147	0,147	0,131	0,146	0,107
B3 7	7	1,208	0,877	0,800	0,860	0,265
B4 7	7	0,853	0,739	1,206	0,494	0,521
B5 7	7	0,062	0,054	0,050	0,051	0,052
B6 7	7	0,146	0,177	0,119	0,124	0,101
B7 7	7	0,202	0,384	0,144	0,194	0,137
B8 7	7	0,176	0,162	0,147	0,152	0,147
B9 7	7	0,208	0,201	0,196	0,179	0,153
B10 7	7	0,650	2,320	2,246	0,906	0,151
B11 7	7	0,173	0,193	0,175	0,165	0,149
B12 7	7	0,146	0,202	0,168	0,149	0,112
C1 7	7	0,276	0,258	0,210	0,198	0,214
C2 7	7	0,208	0,296	0,231	0,193	0,137
C3 7	7	0,121	0,114	0,101	0,109	0,092
C5 7	7	0,188	0,199	0,329	0,156	0,117
C6 7	7	0,199	0,185	0,204	0,194	0,109
C7 7	7	0,126	0,109	0,088	0,116	0,081
C8 7	7	0,120	0,216	0,095	0,109	0,070
C9 7	7	0,267	0,249	0,236	0,175	0,097
C10 7	7	0,143	0,152	2,179	0,125	0,082
C11 7	7	0,128	0,132	0,540	0,129	0,096
D1 7	7	0,190	0,228	0,169	0,168	0,140
D2 7	7	0,484	1,485	0,435	0,452	0,222
D3 7	7	0,257	0,272	0,228	0,225	0,172
D4 7	7	0,110	0,089	0,072	0,087	0,080
D5 7	7	0,156	0,134	0,114	0,136	0,114
D6 7	7	0,163	0,113	0,157	0,148	0,095
D7 7	7	0,293	0,281	0,251	0,248	0,184
D8 7	7	0,428	0,092	0,345	0,070	0,061
D9 7	7	0,083	0,088	0,085	0,073	0,055
D10 7	7	0,687	0,652	0,697	0,608	0,460
D12 7	7	1,305	1,317	0,120	0,155	0,111
E1 7	7	0,223	0,173	0,161	0,170	0,155
E2 7	7	0,485	0,986	2,654	0,364	0,363
E3 7	7	0,137	0,134	0,109	0,127	0,118

Échantillon	Série	DO BuV1	DO BuV2	DO BuV3	DO TuV	DO WT
E4 7	7	0,155	0,161	0,115	0,161	0,101
E5 7	7	0,353	0,280	0,241	0,314	0,223
E6 7	7	0,179	0,106	0,157	0,137	0,110
E7 7	7	0,104	0,087	0,177	0,082	0,060
E8 7	7	0,110	0,092	0,087	0,093	0,059
E9 7	7	0,112	0,098	0,089	0,090	0,075
E10 7	7	0,227	0,242	0,258	0,201	0,167
E11 7	7	0,186	0,232	0,186	0,175	0,117
E12 7	7	0,140	0,147	0,135	0,127	0,086
F1 7	7	0,784	0,360	0,347	0,258	0,178
F2 7	7	0,280	0,283	0,220	0,233	0,224
F3 7	7	1,975	0,208	1,520	0,186	0,122
F4 7	7	0,092	0,078	0,067	0,080	0,061
F6 7	7	0,132	0,097	0,105	0,101	0,086
F7 7	7	0,124	0,109	0,103	0,110	0,088
F8 7	7	0,205	0,195	0,152	0,135	0,158
F9 7	7	0,173	0,156	0,151	0,162	0,113
F10 7	7	0,110	0,093	0,075	0,102	0,066
F12 7	7	0,560	0,694	0,567	0,635	0,473
G1 7	7	0,352	0,462	0,395	0,341	0,261
G2 7	7	0,141	0,098	0,113	0,110	0,132
G3 7	7	0,138	1,034	0,107	0,111	0,117
G4 7	7	0,170	0,142	0,138	0,156	0,114
G6 7	7	0,819	0,196	0,162	0,159	0,133
G7 7	7	0,106	0,077	0,077	0,088	0,066
G8 7	7	1,029	1,065	0,972	0,946	0,969
G9 7	7	0,220	0,243	0,207	0,224	0,156
G10 7	7	0,358	0,128	0,107	0,098	0,082
G11 7	7	0,211	0,241	0,185	0,208	0,162
G12 7	7	0,269	0,350	0,684	0,205	0,194
H1 7	7	0,212	0,219	0,194	0,193	0,181
H2 7	7	0,076	0,071	0,063	0,067	0,091
H3 7	7	1,078	0,379	2,615	0,212	0,243
H4 7	7	0,156	1,071	0,122	0,123	0,097
H6 7	7	0,187	0,172	0,173	0,194	0,137
H9 7	7	0,318	0,358	0,261	0,318	0,158
H10 7	7	0,061	0,067	0,055	0,056	0,051
H12 7	7	0,200	0,314	1,134	0,217	0,160
A1 8	8	0,069	0,069	0,058	0,072	0,089
A2 8	8	0,411	0,394	0,328	0,277	0,330
A3 8	8	0,079	0,293	0,075	0,041	0,071
A4 8	8	0,059	0,050	0,055	0,037	0,068
A5 8	8	0,138	0,131	0,124	0,089	0,160
A6 8	8	0,111	0,097	0,089	0,069	0,131
A7 8	8	0,108	0,123	0,107	0,065	0,124
A8 8	8	0,154	0,197	0,341	0,098	0,119
A10 8	8	0,256	0,199	0,203	0,164	0,220
A11 8	8	0,102	0,099	0,063	0,073	0,125
A12 8	8	0,655	0,651	0,595	0,608	0,813
B1 8	8	0,113	0,114	1,060	0,083	0,120
B2 8	8	0,260	0,241	0,177	0,137	0,175
B3 8	8	0,085	0,085	0,069	0,068	0,090

Échantillon	Série	DO BuV1	DO BuV2	DO BuV3	DO TuV	DO WT
B4 8	8	0,158	0,157	0,133	0,124	0,158
B5 8	8	0,087	0,071	0,055	0,042	0,084
B6 8	8	0,105	0,079	0,159	0,039	0,053
B7 8	8	0,089	0,069	0,065	0,060	0,099
B8 8	8	0,236	0,214	0,173	0,157	0,152
B9 8	8	0,225	0,162	0,217	0,141	0,375
B10 8	8	0,067	0,060	0,072	0,051	0,067
B11 8	8	0,654	0,609	0,493	0,592	0,531
B12 8	8	0,230	0,227	0,205	0,184	0,274
C1 8	8	0,180	0,127	0,146	0,105	0,136
C2 8	8	0,290	0,234	0,213	0,195	0,283
C3 8	8	0,076	0,074	0,064	0,057	0,068
C4 8	8	0,191	0,215	0,169	0,134	0,093
C5 8	8	0,252	0,202	0,092	0,098	0,073
C7 8	8	0,207	0,134	0,136	0,139	0,115
C8 8	8	0,042	0,042	0,036	0,027	0,043
C9 8	8	0,420	0,346	0,320	0,268	0,346
C10 8	8	0,061	0,046	0,045	0,041	0,063
C11 8	8	0,097	0,080	0,066	0,069	0,106
C12 8	8	0,157	0,137	0,129	0,109	0,166
D1 8	8	0,129	0,530	0,121	0,097	0,135
D2 8	8	0,101	0,085	0,056	0,059	0,099
D3 8	8	0,256	0,269	0,243	0,159	0,206
D4 8	8	0,083	0,077	0,062	0,055	0,074
D5 8	8	0,148	0,135	0,126	0,102	0,174
D6 8	8	0,226	0,270	0,204	0,194	0,172
D7 8	8	0,229	0,209	0,185	0,158	0,152
D8 8	8	0,307	0,372	0,313	0,251	0,247
D9 8	8	0,192	0,151	0,150	0,123	0,187
D10 8	8	0,204	0,206	0,176	0,155	0,162
D11 8	8	0,246	0,587	0,225	0,232	0,227
D12 8	8	0,230	0,184	0,153	0,146	0,245
E1 8	8	0,186	0,175	0,147	0,147	0,170
E2 8	8	0,185	0,183	0,127	0,149	0,187
E3 8	8	0,207	0,206	0,193	0,170	0,144
E5 8	8	0,111	0,133	0,109	0,101	0,056
E6 8	8	0,184	0,196	0,125	0,120	0,133
E8 8	8	0,051	0,045	0,043	0,038	0,061
E10 8	8	0,177	0,148	0,130	0,110	0,158
E12 8	8	0,456	0,727	0,406	0,388	0,371
F1 8	8	0,813	0,796	0,733	0,490	0,160
F2 8	8	0,084	0,081	0,064	0,056	0,091
F3 8	8	0,196	0,158	0,193	0,160	0,115
F4 8	8	0,390	0,353	0,288	0,273	0,251
F5 8	8	0,459	0,392	0,330	0,253	0,259
F6 8	8	0,079	0,070	0,066	0,048	0,087
F7 8	8	0,289	0,142	0,144	0,205	0,229
F8 8	8	0,056	0,097	0,051	0,035	0,055
F9 8	8	0,189	0,585	0,163	0,124	0,164
F10 8	8	0,227	0,239	0,196	0,159	0,184
F11 8	8	0,199	0,158	0,141	0,131	0,159
F12 8	8	0,612	0,574	0,471	0,370	0,484

Échantillon	Série	DO BuV1	DO BuV2	DO BuV3	DO TuV	DO WT
G1 8	8	0,099	0,103	0,085	0,080	0,136
G2 8	8	0,343	0,230	0,341	0,158	0,172
G3 8	8	0,100	0,073	0,083	0,078	0,086
G4 8	8	0,157	0,083	0,087	0,063	0,103
G5 8	8	0,051	0,036	0,034	0,031	0,044
G6 8	8	0,083	0,066	0,064	0,047	0,085
G7 8	8	0,068	0,590	0,053	0,104	0,063
G8 8	8	0,429	0,155	0,117	0,222	0,152
G9 8	8	0,342	0,264	0,762	0,200	0,258
G10 8	8	0,255	0,232	0,166	0,173	0,235
G11 8	8	0,674	0,198	0,173	0,145	0,155
G12 8	8	0,948	0,829	0,773	0,849	0,745
H1 8	8	1,008	0,387	0,487	0,228	0,215
H2 8	8	0,167	0,114	0,117	0,100	0,167
H4 8	8	0,176	0,192	0,145	0,127	0,203
H5 8	8	0,114	0,113	0,105	0,085	0,168
H6 8	8	2,071	2,042	1,757	1,626	0,538
H7 8	8	0,216	0,222	0,198	0,136	0,194
H8 8	8	0,095	0,105	0,084	0,077	0,101
A1 9	9	0,699	0,599	0,360	0,367	0,162
A2 9	9	0,116	0,148	0,111	0,124	0,074
A3 9	9	0,069	0,100	0,071	0,080	0,053
A4 9	9	0,167	0,201	0,168	0,200	0,075
A5 9	9	0,136	0,184	0,134	0,180	0,158
A6 9	9	0,153	0,177	0,124	0,174	0,099
A8 9	9	0,152	0,235	0,176	0,190	0,124
A9 9	9	0,590	2,130	1,838	0,143	0,094
A10 9	9	0,216	0,280	0,234	0,259	0,107
A11 9	9	0,090	0,095	0,126	0,101	0,077
A12 9	9	0,330	0,389	0,428	0,447	0,097
B1 9	9	0,155	0,307	0,150	0,156	0,102
B2 9	9	0,175	0,236	0,208	0,180	0,095
B3 9	9	0,123	0,200	0,144	0,159	0,090
B4 9	9	0,089	0,125	0,113	0,134	0,083
B5 9	9	0,424	0,615	0,534	0,494	0,319
B6 9	9	0,100	0,129	0,097	0,118	0,087
B7 9	9	0,425	0,154	0,246	0,143	0,070
B8 9	9	0,200	0,238	0,190	0,241	0,127
B9 9	9	0,219	0,282	0,230	0,231	0,164
B10 9	9	0,107	0,184	0,136	0,145	0,105
B11 9	9	0,136	0,202	0,146	0,174	0,137
B12 9	9	0,458	0,525	0,512	0,516	0,381
C1 9	9	0,152	0,167	0,126	0,165	0,104
C2 9	9	0,175	0,252	0,193	0,186	0,131
C3 9	9	0,338	0,368	0,355	0,331	0,262
C4 9	9	0,751	0,108	0,103	0,101	0,054
C5 9	9	0,329	0,440	0,344	0,347	0,222
C6 9	9	0,124	0,179	0,142	0,186	0,106
C7 9	9	1,025	0,260	0,267	0,226	0,207
C8 9	9	0,158	0,206	0,269	0,193	0,443
C9 9	9	0,143	0,205	0,154	0,191	0,138
C10 9	9	0,205	0,536	0,243	0,534	0,273

Échantillon	Série	DO BuV1	DO BuV2	DO BuV3	DO TuV	DO WT
C11 9	9	0,133	0,176	0,094	0,140	0,065
C12 9	9	0,140	0,162	0,149	0,174	0,112
D1 9	9	0,195	0,233	0,265	0,220	0,169
D2 9	9	0,192	0,271	0,249	0,230	0,134
D3 9	9	0,246	0,256	0,240	0,269	0,139
D4 9	9	0,322	0,286	0,219	0,207	0,199
D5 9	9	0,295	0,331	0,369	0,352	0,087
D6 9	9	0,192	0,238	0,208	0,259	0,142
D8 9	9	0,096	0,155	0,104	0,127	0,069
D9 9	9	0,552	0,762	0,720	0,864	0,125
D10 9	9	0,165	0,200	0,174	0,201	0,082
D11 9	9	0,502	1,195	0,486	0,894	0,442
D12 9	9	0,100	0,137	0,111	0,128	0,088
E1 9	9	0,104	0,127	0,193	0,116	0,235
E2 9	9	1,074	0,254	0,243	0,223	0,108
E3 9	9	0,123	0,183	0,145	0,146	0,091
E4 9	9	0,065	0,100	0,083	0,083	0,075
E5 9	9	0,140	0,181	0,131	0,154	0,081
E6 9	9	0,423	0,613	0,532	0,538	0,247
E7 9	9	0,173	0,632	0,262	0,207	0,110
E8 9	9	0,109	0,189	0,161	0,163	0,101
E9 9	9	0,153	0,306	0,254	0,226	0,150
E10 9	9	0,169	0,219	0,191	0,212	0,131
E11 9	9	0,078	0,115	0,081	0,114	0,062
E12 9	9	0,121	0,175	0,133	0,148	0,092
F1 9	9	0,158	0,246	0,168	0,158	0,067
F2 9	9	0,089	0,121	0,116	0,097	0,048
F3 9	9	0,351	0,487	1,199	0,438	0,210
F4 9	9	0,143	0,229	0,184	0,179	0,123
F5 9	9	0,208	0,308	0,332	0,316	0,164
F6 9	9	0,292	0,394	0,345	0,363	0,230
F7 9	9	0,983	0,350	0,326	0,363	0,159
F8 9	9	0,126	0,197	0,171	0,167	0,113
F9 9	9	0,111	0,165	0,137	0,151	0,091
F10 9	9	0,390	0,656	0,562	0,703	0,406
F11 9	9	0,190	0,284	0,184	0,261	0,132
F12 9	9	0,091	0,125	0,089	0,116	0,076
G1 9	9	0,130	0,155	0,137	0,136	0,106
G2 9	9	0,063	0,096	0,072	0,070	0,048
G3 9	9	0,103	0,160	0,156	0,121	0,067
G4 9	9	0,116	0,152	0,118	0,126	0,097
G5 9	9	0,129	0,185	0,146	0,158	0,099
G6 9	9	0,196	0,242	0,206	0,264	0,204
G7 9	9	0,414	0,477	0,539	0,360	0,290
G8 9	9	0,087	0,144	0,103	0,113	0,071
G9 9	9	0,075	0,105	0,084	0,089	0,055
G12 9	9	0,482	0,231	0,141	0,183	0,108
H1 9	9	0,213	0,293	0,228	0,260	0,212
H2 9	9	0,095	0,137	0,121	0,115	0,072
H3 9	9	0,123	0,161	0,148	0,135	0,113
H4 9	9	0,264	0,178	0,191	0,187	0,122
H5 9	9	0,079	0,125	0,098	0,093	0,055

Échantillon	Série	DO BuV1	DO BuV2	DO BuV3	DO TuV	DO WT
H6 9	9	0,088	0,121	0,124	0,117	0,087
H7 9	9	0,090	0,107	0,094	0,092	0,070
H8 9	9	0,328	0,406	0,376	0,402	0,266
H9 9	9	0,278	0,290	0,296	0,330	0,126
H10 9	9	0,087	0,104	0,106	0,109	0,071
H11 9	9	0,278	0,268	0,279	0,320	0,191
H12 9	9	0,153	0,177	0,149	0,216	0,139
A1 10	10	0,247	0,066	0,084	0,104	0,114
A2 10	10	0,120	0,112	0,116	0,125	0,100
A3 10	10	0,019	0,021	0,018	0,023	0,017
A4 10	10	0,163	0,132	0,121	0,150	0,145
A5 10	10	0,032	0,025	0,027	0,048	0,033
A6 10	10	0,360	0,556	0,353	0,348	0,101
A7 10	10	0,162	0,134	0,151	0,125	0,072
A8 10	10	0,161	0,189	0,187	0,226	0,201
A9 10	10	0,187	0,256	0,223	0,255	0,220
A10 10	10	0,060	0,059	0,057	0,070	0,044
A11 10	10	0,056	0,054	0,051	0,073	0,040
A12 10	10	0,238	0,289	0,344	0,279	0,113
B1 10	10	0,128	0,125	0,142	0,136	0,200
B2 10	10	0,089	0,240	0,085	0,096	0,057
B3 10	10	0,063	0,069	0,066	0,065	0,071
B4 10	10	0,278	0,252	0,220	0,274	0,284
B5 10	10	0,070	0,325	0,058	0,075	0,062
B6 10	10	0,265	0,306	0,273	0,273	0,140
B7 10	10	0,044	0,041	0,041	0,044	0,029
B8 10	10	0,076	0,067	0,071	0,073	0,054
B9 10	10	0,093	0,511	0,096	0,106	0,072
B10 10	10	0,127	0,113	0,117	0,118	0,094
B11 10	10	0,553	0,610	0,685	0,585	0,671
B12 10	10	0,079	0,093	0,121	0,132	0,137
C1 10	10	0,050	0,042	0,038	0,051	0,067
C4 10	10	0,156	0,209	0,154	0,142	0,128
C6 10	10	0,605	0,624	0,623	0,533	0,638
C7 10	10	1,646	0,143	2,403	0,087	0,065
C8 10	10	0,105	0,121	0,106	0,109	0,066
C11 10	10	0,059	0,051	0,071	0,072	0,069
C12 10	10	0,045	0,050	0,059	0,059	0,050
D2 10	10	0,134	0,125	0,105	0,138	0,107
D4 10	10	0,065	0,078	0,075	0,084	0,099
D6 10	10	0,209	0,277	0,227	0,331	0,214
D7 10	10	0,317	0,473	0,275	0,417	0,228
D8 10	10	0,108	0,139	0,119	0,165	0,120
D9 10	10	0,092	0,101	0,098	0,113	0,076
D10 10	10	0,091	0,089	0,083	0,095	0,143
D11 10	10	0,207	0,234	0,173	0,169	0,329
D12 10	10	1,273	1,087	0,933	0,987	0,972
E1 10	10	0,332	0,293	0,289	0,208	0,069
E2 10	10	0,048	0,047	0,037	0,049	0,049
E3 10	10	0,100	0,102	0,101	0,102	0,096
E5 10	10	0,128	0,095	0,108	0,126	0,087
E6 10	10	0,545	0,295	0,265	0,331	0,223

Échantillon	Série	DO BuV1	DO BuV2	DO BuV3	DO TuV	DO WT
E7 10	10	0,436	0,472	0,383	0,396	0,283
E8 10	10	0,088	0,124	0,257	0,113	0,090
E10 10	10	0,293	0,231	0,215	0,234	0,192
E11 10	10	0,950	0,704	1,016	0,878	0,888
E12 10	10	0,123	0,136	0,127	0,139	0,111
F1 10	10	0,143	0,124	0,089	0,146	0,132
F2 10	10	0,152	0,143	0,140	0,153	0,163
F7 10	10	0,089	0,076	0,070	0,075	0,061
F8 10	10	0,232	0,246	0,191	0,198	0,149
F10 10	10	0,112	0,090	0,107	0,127	0,145
F11 10	10	0,296	0,406	0,277	0,277	0,270
F12 10	10	0,257	0,249	0,312	0,263	0,262
G1 10	10	0,378	0,391	0,335	0,384	0,410
G2 10	10	0,084	0,099	0,072	0,085	0,086
G3 10	10	0,063	0,069	0,077	0,080	0,125
G4 10	10	0,044	0,051	0,042	0,041	0,060
G9 10	10	0,155	0,190	0,186	0,150	0,188

TITRE DE LA THÈSE :

Détermination des séroprévalences de bufavirus et de tusavirus, deux nouveaux *Protoparvovirus*, en Bourgogne

AUTEUR :

AUFFRET NICOLAS

RÉSUMÉ :

Les gastro-entérites aiguës, le plus souvent d'origine virale, sont encore aujourd'hui responsables de plus d'un million et demi de décès chaque année dans le monde, dont plus de 400.000 concernent des enfants de moins de cinq ans. Bufavirus et tusavirus, deux virus appartenant à la famille *Parvoviridae*, ont récemment été identifiés comme pathogènes associés aux diarrhées. L'objectif de cette étude a consisté à déterminer les séroprévalences de ces deux virus en Bourgogne, par la mise au point d'un test ELISA indirect réalisé à partir de pseudo-particules virales produites en système baculovirus-cellules d'insectes, en analysant un total de 844 échantillons de sérum. Les résultats de cette étude indiquent que dans l'ensemble, la séroprévalence de bufavirus est de 13,2 % (IC₉₅ % : [11,0 ; 15,7] %), et celle de tusavirus de 2,6 % (IC₉₅ % : [1,7 ; 4,0] %). Ces résultats montrent une circulation plus importante de ces virus dans la population française qu'en Finlande ou aux États-Unis, mais bien moindre qu'en Afrique ou en Asie. Beaucoup de choses restent à découvrir de ces deux nouveaux virus.

MOTS-CLÉS :

Gastro-entérite aiguë, bufavirus, tusavirus, *Protoparvovirus*, séroprévalence