

ANNÉE 2014

N° 023

**MÉMOIRE
DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES DE
BIOLOGIE MEDICALE**

Soutenu devant le jury interrégional

Le 14 mai 2014

Par Mathilde DUPÉ

Conformément aux dispositions du Décret n° 2012-172 du 3 février

**THÈSE
POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

**Résistance génétique à l'infection
par certaines souches de *Rotavirus* du groupe A :
impact du polymorphisme du gène humain *FUT2*.**

Président : Mme le Pr. Virginie FERRÉ, PU-PH et Doyen de l'UFR des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Laboratoire de Virologie, Nantes

Membres du jury : Mme le Pr. Berthe-Marie IMBERT, Directrice de Thèse, PU-PH, Chef de service du laboratoire de Virologie, UFR des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Nantes

Mme le Pr. Christèle GRAS-LE GUEN, PU-PH, Chef de service de Médecine Pédiatrique, UFR de Médecine, Nantes

M. Jacques LE PENDU, Directeur de Recherche, INSERM U892, Nantes

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier

Madame le Professeur Virginie Ferré,

Pour avoir accepté de présider ce jury,
Pour m'avoir fait aimer la virologie dès mes premières années d'études,
Veuillez trouver ici l'expression de ma reconnaissance.

Madame le Professeur Berthe-Marie Imbert,

Pour m'avoir confié ce travail et permis de le mener à bien,
Pour votre disponibilité et vos conseils,
Veuillez trouver ici le témoignage de ma profonde gratitude.

Monsieur le Docteur Jacques Le Pendu,

Pour avoir accepté de faire partie de ce jury de thèse,
Pour votre collaboration et votre expertise au cours de cette étude,
Veuillez trouver ici l'assurance de mes sincères remerciements.

Madame le Professeur Christèle Gras-Le Guen,

Pour l'honneur que vous me faites de juger ce travail,
Je vous témoigne ma très vive reconnaissance.

L'équipe du laboratoire de Virologie,

Pour vos compétences, votre gentillesse et votre bonne humeur.
Un grand merci tout particulier à Bernard Besse, Cécile Peltier, Marina Illiaquer ainsi qu'à l'équipe de l'Institut de Recherche en Santé de Nantes pour votre participation à ce travail.

A ma famille à qui je dédie cette thèse

A mes parents et à ma sœur,

Que je remercie avec émotion pour votre irremplaçable et inconditionnel soutien.

A Nicolas,

Qui durant toutes ces années a partagé mes doutes mais aussi mes joies,

Ta présence m'est indispensable.

A Emilie, Renan, Marie-Claire et Serge,

Qui m'ont toujours encouragé,

Eh oui, le « yop » a beaucoup grandi.

A mes amis

A Sophie, Florence, Emilande et Clémentine,

Pour votre joie de vivre et votre ouverture d'esprit,

Même à l'autre bout du monde, votre amitié m'est très précieuse.

A Marion,

Pour ton sourire et tes précieux conseils.

A tous mes co-internes,

Pour ces belles années d'internat passées ensemble.

A tous mes amis Redonnais et Rennais.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABRÉVIATIONS	1
LISTE DES TABLEAUX	4
INTRODUCTION.....	5
Première partie	
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	7
A. Rotavirus A : définition et caractéristiques virologiques.....	8
1. Structure de la particule virale.....	8
2. Taxonomie et génotypes.....	10
B. Infection à Rotavirus du groupe A.....	11
1. Manifestations cliniques	11
2. Physiopathologie.....	12
3. Mode de transmission	14
4. Diagnostic biologique.....	14
5. Traitement	15
6. Prévention : hygiène et vaccination	15
C. Épidémiologie.....	18
1. Prévalence et incidence de l'infection à Rotavirus.....	18
2. Répartition des génotypes P des Rotavirus en fonction de l'hôte	19
3. Répartition géographique des génotypes.....	20
4. Impact de la vaccination	22
D. Les « récepteurs » du Rotavirus A.....	25
1. Les antigènes tissulaires de groupes sanguins humains.....	25
2. La découverte des ligands cellulaires des Norovirus	29
3. Etude <i>in vitro</i> du profil de reconnaissance des HBGA par les Rotavirus	35

Deuxième partie

MATÉRIEL & MÉTHODES.....	42
A. Matériel : préparation des échantillons	43
1. Prélèvements biologiques utilisés	43
2. Extraction de l'ADN et de l'ARN des échantillons de selles.....	43
3. Vérification de la qualité des extraits par PCR albumine.....	44
B. Outils et méthodes permettant l'étude du <i>Rotavirus</i>	46
1. Mise au point et réalisation de l'amplification du gène codant pour VP8* (RT-PCR)	46
2. Séquençage de VP8*	49
3. Etude phylogénétique.....	52
C. Outils et méthodes permettant l'étude du gène humain <i>FUT2</i>	53
1. Première méthode : amplification et séquençage du gène <i>hFUT2</i>	53
2. Deuxième méthode : amplification et analyse des fragments de restriction du gène <i>hFUT2</i>	55
D. Analyse statistique	57
E. Annexes	58

Troisième partie

RÉSULTATS	60
A. Populations étudiées.....	61
1. Sélection des échantillons : population « cas » et population « témoin ».....	61
2. Caractéristiques des deux populations.....	62
B. Répartition des souches de <i>Rotavirus</i> isolées	64
1. Résultats de la RT-PCR <i>Rotavirus</i> dans les deux populations étudiées	64
2. Phylogénie des souches de <i>Rotavirus</i> isolées dans la population « cas »	64
C. Polymorphisme du gène <i>hFUT2</i>	66
1. Population « cas »	66
2. Population « témoin »	66
3. Comparaison des deux populations.....	67
D. Etude d'une épidémie dans le service de Néphrologie du CHU de Nantes.....	68
DISCUSSION et PERSPECTIVES	72
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	79
PUBLICATION CONNEXE	86

LISTE DES ABRÉVIATIONS

aa	acide(s) aminé(s)	HCSP	Haut Conseil en Santé Publique
ADN	acide désoxyribonucléique	HDJ	hôpital de jour
ADNc	acide désoxyribonucléique complémentaire	HuNoV	<i>Norovirus</i> humains
ARN	acide ribonucléique	IIA	invagination intestinale aiguë
ARNm	acide ribonucléique messenger	LCR	liquide céphalo-rachidien
CHO	<i>Chinese Hamster Ovary</i>	LDV	<i>Lordsdale-like virus</i>
Ct	<i>Cycle threshold</i>	Le	groupe sanguin Lewis
ddNTP	didésoxyribonucléotide	NoV	<i>Norovirus</i>
DLP	particule virale à double couche protéique	NSP	protéine non structurale
dNTP	désoxyribonucléotide	OMS	Organisation Mondiale de la Santé
DSB	disaccharide de base	ORF	cadre ouvert de lecture (<i>open reading frame</i>)
EIA	test immunoenzymatique (<i>enzyme immuno-assay</i>)	pb	paire de base
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>	PCR	réaction en chaîne de polymérase (<i>polymerase chain reaction</i>)
Fuc	fucose	RMN	résonance magnétique nucléaire
FUT2	α -1,2-fucosyltransférase	RT-PCR	transcriptase inverse – PCR (<i>reverse transcription polymerase chain reaction</i>)
FUT3	α -1,3-fucosyltransférase	RV1	Rotarix®
GalNAc	N-acétylgalactosamine	RV5	Rotateq®
GEA	gastroentérite aiguë	SGLT1	co-transporteur glucose-sodium dépendant intestinal
GERV	gastro-entérite à <i>Rotavirus</i> du groupe A	SNE	système nerveux entérique
GlcNAc	N-acétylglucosamine	SRO	solutés de réhydratation orale
HAS	Haute Autorité de Santé	TLP	particule virale à triple couche protéique
HBGA	antigène tissulaire de groupes sanguins (<i>histo-blood group antigens</i>)	VLP	particule virale de synthèse (<i>virus-like particle</i>)
		VP	protéine de structure

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1.	SCHEMA DE LA PARTICULE VIRALE DU <i>ROTAVIRUS</i>	8
FIGURE 2.	PRESENTATION CLINIQUE INITIALE LORS DE L'ADMISSION A L'HOPITAL DE 234 ENFANTS AVEC UNE RECHERCHE DE <i>ROTAVIRUS</i> POSITIVE DANS LES SELLES	11
FIGURE 3.	MODELE DE LA PHYSIOPATHOLOGIE DE LA DIARRHEE A <i>ROTAVIRUS</i>	13
FIGURE 4.	REPARTITION DU NOMBRE DE CAS DE GERV DETECTES PAR MOIS ENTRE JANVIER 2006 ET JANVIER 2009 A PARIS ET EN PROVINCE	19
FIGURE 5.	DISTRIBUTION MONDIALE DES GENOTYPES G ET P DES <i>ROTAVIRUS</i> HUMAINS DU GROUPE A AVANT L'INTRODUCTION DE LA VACCINATION	20
FIGURE 6.	REPARTITION DES GENOTYPES A NANTES ET A PARIS DURANT LES EPIDEMIES HIVERNALES DE 2006-07, 2007-08 ET 2008-09	21
FIGURE 7.	BIOSYNTHESE DES ANTIGENES TISSULAIRES ABH ET LEWIS ET DETERMINATION DU PHENOTYPE SECRETEUR OU NON SECRETEUR	27
FIGURE 8.	GENOME ET STRUCTURE DE LA CAPSIDE DES <i>NOROVIRUS</i>	29
FIGURE 9.	PROFIL D'INTERACTION ENTRE UN DIMERE DE VP1 DE TROIS SOUCHES DIFFERENTES DE <i>NOROVIRUS</i> ET DES HBGA	33
FIGURE 10.	REPRESENTATION 3D DE VP4 APRES CLIVAGE ENZYMATIQUE	35
FIGURE 11.	CYCLE DE REPLICATION DU <i>ROTAVIRUS</i>	36
FIGURE 12.	REARRANGEMENTS CONFORMATIONNELS DE LA SPICULE DU <i>ROTAVIRUS</i> DURANT LA PHASE DE PENETRATION CELLULAIRE	36
FIGURE 13.	STRUCTURE DES GANGLIOSIDES UTILISES DANS L'ETUDE DE HASELHORST ET AL.	38
FIGURE 14.	ARBRE PHYLOGENIQUE DES <i>ROTAVIRUS</i> BASE SUR LA COMPARAISON DES SEQUENCES CODANT POUR VP8* DE PLUS DE 71 SOUCHES VIRALES	40
FIGURE 15.	PHOTO DU GEL D'ACRYLAMIDE REALISE AFIN DE TESTER DEUX COUPLES D'AMORCES DIFFERENTS	47

FIGURE 16.	ARBRE PHYLOGENETIQUE DES SOUCHES DE ROTAVIRUS ISOLEES DES SELLES DE LA POPULATION « CAS »	65
FIGURE 17.	DISTRIBUTION DES GENOTYPES DU GENE <i>HFUT2</i> DANS LA POPULATION PRESENTANT UNE INFECTION A <i>ROTAVIRUS</i>	66
FIGURE 18.	DISTRIBUTION DES GENOTYPES DU GENE <i>HFUT2</i> DANS LA POPULATION NE PRESENTANT PAS D'INFECTION A <i>ROTAVIRUS</i>	66
FIGURE 19.	TABLEAU SYNOPTIQUE DES CAS DE GERV DECLAREES DANS LE SERVICE DE NEPHROLOGIE DU CHU DE NANTES ENTRE MARS 2013 ET AVRIL 2013	70
FIGURE 20.	ARBRE PHYLOGENETIQUE DES SOUCHES DE <i>ROTAVIRUS</i> ISOLEES DES ECHANTILLONS DE SELLES DES PATIENTS HOSPITALISES DANS LE SERVICE DE NEPHROLOGIE DU CHU DE NANTES ENTRE MARS 2013 ET AVRIL 2013	71

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1.	PRINCIPALES PROPRIETES DES PROTEINES DU ROTAVIRUS A	9
TABLEAU 2.	DISTRIBUTION DES HOTES DU <i>ROTAVIRUS</i> EN FONCTION DU GENOTYPE P	19
TABLEAU 3.	TAUX DE PROTECTION (EN %) VIS-A-VIS DES GASTRO-ENTERITES SEVERES A <i>ROTAVIRUS</i> , A 1 AN ET A 2 ANS APRES LA VACCINATION PAR RV1 OU PAR RV5	22
TABLEAU 4.	PROPRIETES DE TROIS FUCOSYLTRANSFERASES	26
TABLEAU 5.	RESUME DES PROFILS DE LIAISON AUX HBGA DE DIFFERENTES SOUCHES DE <i>NOV</i>	32
TABLEAU 6.	AMORCES ET SONDE UTILISEES POUR LA PCR ALBUMINE	44
TABLEAU 7.	AMORCES UTILISEES POUR LA RT-PCR <i>ROTAVIRUS</i>	46
TABLEAU 8.	AMORCES UTILISEES POUR LA PCR <i>HFUT2</i> (1ERE METHODE)	53
TABLEAU 9.	AMORCES UTILISEES POUR L'ETAPE DE SEQUENÇAGE DE <i>HFUT2</i>	55
TABLEAU 10.	AMORCES UTILISEES POUR L'AMPLIFICATION DU GENE <i>HFUT2</i> (2EME METHODE)	55
TABLEAU 11.	REPARTITION DE LA POPULATION « CAS » ET DE LA POPULATION « TEMOIN » EN FONCTION DU SERVICE D'HOSPITALISATION	62
TABLEAU 12.	REPARTITION DE LA POPULATION « CAS » ET DE LA POPULATION « TEMOIN » EN FONCTION DE L'AGE	63
TABLEAU 13.	DISTRIBUTION DES GENOTYPES DE <i>FUT2</i> DANS LA POPULATION CAS, LA POPULATION TEMOIN ET DANS LA POPULATION CONSTITUEE DE 95 ADULTES SAINS	67

INTRODUCTION

Le *Rotavirus* du groupe A, appartenant à la famille des *Reoviridae*, est l'agent étiologique principal des gastroentérites aiguës (GEA) chez l'enfant de moins de cinq ans. En 2008, l'OMS estimait à 453 000 le nombre de décès annuels liés à ce pathogène, majoritairement dans les pays avec un niveau socio-économique faible.

Une des principales évolutions dans la lutte contre les rotaviroses a été l'introduction de la vaccination anti-*Rotavirus* dans le calendrier vaccinal de nombreux pays. Les deux vaccins commercialisés, le Rotarix® et le Rotateq®, ont permis une nette diminution du nombre d'hospitalisations et de décès dans les pays recommandant cette vaccination. Le taux de protection post-vaccinal contre les rotaviroses sévères est important, atteignant 87 % dans les pays à niveau socio-économique élevé. C'est pourquoi, selon l'avis du Haut Conseil de Santé Publique français (HCSP) du 29 novembre 2013, la vaccination anti-*Rotavirus* est recommandée pour les nourrissons âgés de moins de six mois.

Structurellement, le *Rotavirus* est un virus nu dont le génome est composé de 11 fragments d'ARN double brin entourés d'une capsidie, elle-même formée par trois couches protéiques. L'analyse moléculaire de VP4 et de VP7, constituants principaux de la couche externe de la capsidie, a permis de classer les *Rotavirus* en différents génotypes. 27 génotypes G et 35 génotypes P ont ainsi été identifiés, sur la base des séquences codantes de VP7 et de VP4. La majorité des souches infectant l'homme présentent les combinaisons génotypiques suivantes : G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8] et G9P[8].

Le mécanisme à l'origine de l'attachement et de la pénétration virale dans le cytoplasme de l'entérocyte n'est pas encore totalement élucidé. Le *Rotavirus* s'attache à son récepteur cellulaire via la protéine de spicule VP8*, obtenue après clivage trypsinique de VP4 dans la lumière intestinale. Dans ce travail, nous nous sommes particulièrement intéressés à VP4 (définissant le génotype P) car c'est via cette protéine que le *Rotavirus* va entrer en interaction avec son récepteur cellulaire. Depuis de nombreuses années, les souches de *Rotavirus* infectant l'homme comme P[8] et P[4] étaient classées dans la catégorie des souches « sialidase-indépendantes » car leur fixation n'était pas entravée par

l'action préalable d'une sialidase, contrairement à certaines souches animales. Jusqu'en 2012, le récepteur des souches humaines P[4], P[6], P[8], P[9], P[11], P[14] et P[25] n'était pas connu. De récentes études réalisées *in vitro* ont prouvé que ces souches se fixaient aux antigènes tissulaires de groupes sanguins (HBGA = *histo-blood group antigens*). Les HBGA sont des glycanes présents sur les muqueuses digestive, pulmonaire et génitale ainsi que dans les sécrétions telles que le lait ou la salive. Le rôle de ces oligosaccharides comme récepteur entérique des *Norovirus* a déjà bien été décrit : le type d'HBGA reconnu varie en fonction de la souche de *Norovirus* étudiée. Le profil de reconnaissance des HBGA semble également varier selon le génotype P du *Rotavirus*. Par exemple, les souches P[4] et P[8] reconnaissent l'antigène H de type 1 et Lewis b, tandis que les souches P[14] ou P[9] reconnaissent l'antigène A. Une étape essentielle de la synthèse des HBGA repose sur l'action d'une α -1,2-fucosyltransférase, enzyme codée par le gène *FUT2*, catalysant la production de l'antigène H1 sur les cellules intestinales. Lorsque que des mutations sur le gène *FUT2* rend l' α -1,2-fucosyltransférase non fonctionnelle, l'antigène H1 est absent des muqueuses digestives ainsi que des sécrétions. Les individus présentant ce phénotype, appelé non sécréteur, représentent environ 20 % de la population caucasienne. A ce jour, la résistance à l'infection des individus non sécréteurs a été prouvée chez les *Norovirus* mais jamais chez les *Rotavirus*. C'est pourquoi, au vu des découvertes *in vitro* sur la liaison possible entre HBGA et *Rotavirus*, l'équipe de Virologie du CHU de Nantes ainsi que l'équipe de l'Institut de Recherche en Santé de l'Université de Nantes (unité 892) se sont associées pour déterminer si le phénotype non sécréteur d'un individu est relié à la résistance clinique au *Rotavirus*. Pour cela, une étude rétrospective sur des patients hospitalisés présentant une recherche de *Rotavirus* A positive dans les selles a été réalisée. Dans un premier temps, une technique de RT-PCR permettant une détection sensible et spécifique du gène codant pour la protéine VP8* a été développée. Puis, le séquençage de ce gène a été réalisé afin de déterminer le génotype P du *Rotavirus* de chaque échantillon. La recherche du phénotype sécréteur ou non sécréteur du patient a été effectuée par PCR et séquençage du gène *FUT2*.

Première partie

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

A. Rotavirus : définition et caractéristiques virologiques

- 1. Structure de la particule virale*
- 2. Taxonomie et génotypes*

B. Infection à Rotavirus du groupe A

- 1. Manifestations cliniques*
- 2. Physiopathologie*
- 3. Mode de transmission*
- 4. Diagnostic biologique*
- 5. Traitement*
- 6. Prévention : hygiène et vaccination*

C. Épidémiologie

- 1. Prévalence et incidence de l'infection à Rotavirus*
- 2. Répartition des génotypes P en fonction de l'hôte*
- 3. Répartition géographique des génotypes*
- 4. Impact de la vaccination*

D. Les « récepteurs » du Rotavirus A

- 1. Les antigènes tissulaires de groupes sanguins ABH*
- 2. La découverte des ligands cellulaires des Norovirus*
- 3. Etude in vitro du profil de reconnaissance des HBGA par les Rotavirus*

A. Rotavirus A : définition et caractéristiques virologiques

1. Structure de la particule virale

Le *Rotavirus* est un virus nu, dont le génome est constitué de 11 fragments d'ARN double brin. Ce dernier code pour six protéines structurales (VP1 à VP6) et six protéines non structurales (NSP1 à NSP6). La capside icosaédrique, d'une taille de 100 nm, est formée d'une triple couche protéique. En microscopie électronique, le virus présente une forme de roue (à l'origine de son nom).

○ **Structure de la capside**

La capside virale (**Figure 1**), constituée d'une triple couche protéique, est composée de quatre protéines appelées VP2, VP6, VP7 et VP4.

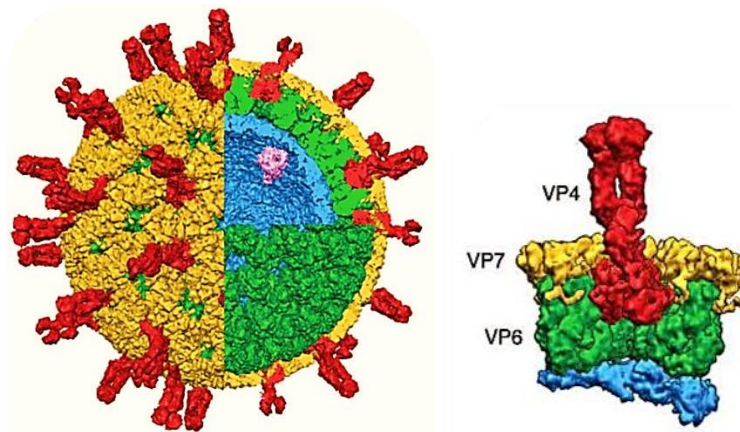


Figure 1. Schéma de la particule virale du *Rotavirus* (1). Les protéines VP4, VP7, VP6 et VP2 sont représentées respectivement en rouge, en jaune, en vert et en bleu.

La couche interne (*core*), formée par VP2, renferme le génome viral ainsi que les protéines, VP1 et VP3, impliquées dans la synthèse des ARN viraux. VP2 a la capacité de se lier aux acides nucléiques et détient également un rôle dans l'assemblage de VP6. VP6 forme la couche intermédiaire. Bien que très antigénique, elle n'induit pas la production d'anticorps neutralisants. Cette protéine permet de définir sept groupes antigéniques (A à G) au sein des *Rotavirus*. Les souches pathogènes pour l'homme sont principalement des souches du groupe A. Dans la suite de ce travail, sauf mention contraire, la désignation du *Rotavirus* du

groupe A a été simplifiée par le terme *Rotavirus*. Enfin, la partie externe de la capsid est constituée d'une couche de glycoprotéines (VP7) et de spicules (VP4). Des anticorps neutralisants sont synthétisés contre l'antigène VP7 et contre l'antigène VP4. VP4 est clivée dans le tube digestif par la trypsine en VP5* (rôle dans la pénétration du virus) et en VP8* (rôle dans la liaison au récepteur). Les principales propriétés des protéines du *Rotavirus* du groupe A sont résumées dans le **Tableau 1**.

Tableau 1. Principales propriétés des protéines du *Rotavirus A* (2).

Nom	Gène	Propriétés
VP1	1	ARN polymérase ARN dépendante virale
VP2	2	Compose la couche interne de la capsid - Fixe les acides nucléiques - Interagit avec VP1 - Rôle dans la transcription et la réplication
VP3	3	Guanyltransférase qui ajoute une coiffe en 5' aux ARNm
VP4	4	Compose les spicules insérés dans la couche externe de la capsid - Induit des anticorps neutralisants - Est clivée en VP5*et VP8* par la trypsine - Est impliquée dans l'attachement du virus aux cellules hôtes
VP6	6	Protéine majoritaire - Compose la couche intermédiaire de la capsid - Antigénique mais n'induit pas d'anticorps neutralisants- Interagit directement avec VP2 - Permet de définir des groupes au sein des <i>Rotavirus</i> (A à G)
VP7	9	Compose la couche externe de la capsid - Induit des anticorps neutralisants
NSP1	5	Interagit avec les ARNm viraux
NSP2	8	ATPase
NSP3	7	Fixe les ARNm viraux sur la séquence consensus 3'
NSP4	10	Glycoprotéine - Entérotoxine virale
NSP5	11	Protéine kinase (réplication du génome)
NSP6	11	Interagit avec NSP5

- **Organisation du génome viral**

Chaque fragment d'ARN double brin code pour une protéine (**Tableau 1, page 9**), excepté le fragment 11 qui code à la fois pour les protéines NSP5 et NSP6. La nature segmentée du génome rend possible le réassortiment génétique : lors d'une co-infection par deux souches différentes, les virus peuvent s'échanger des fragments conduisant à la formation d'un virus réassorti. Le réassortiment n'est possible qu'entre virus génétiquement proches. Par exemple, les *Rotavirus* du groupe A ne peuvent se réassortir qu'entre eux. La réplication du virus se déroule au sein du cytoplasme de la cellule infectée. Le cycle de multiplication cellulaire ne sera pas abordé dans ce travail. Seule la phase de pénétration du virus sera développée dans la partie **Généralités D.3 (page 35 à 37)**.

2. Taxonomie et génotypes

Le *Rotavirus* humain appartient à la famille des *Reoviridae* et à la sous-famille des *Sedoreovirinae*. Cette sous-famille est elle-même divisée en six genres dont le genre *Rotavirus*. Ce dernier regroupe cinq espèces, de A à E (**3**). Le *Rotavirus* du groupe A est la principale espèce pathogène pour l'homme, impliquée dans les GEA de l'enfant. Le phénomène de réassortiment est à l'origine d'une grande variabilité au sein des *Rotavirus*. La classification actuelle des *Rotavirus* du groupe A est basée sur la caractérisation moléculaire de deux segments du génome viral : le segment 9 et le segment 4. Le fragment 9 (codant pour VP7) définit 27 génotypes appelés G (**4**). De même, le fragment 4 (codant pour VP4) détermine 35 génotypes P (**4**). Les génotypes G et P les plus fréquents chez l'homme sont G1, G2, G3, G4, G9, P[8] et P[4]. La nomenclature des *Rotavirus* A associe le génotype G et le génotype P (exemple : G1P[8]). Dans ce travail, nous nous intéresserons particulièrement au génotype P. En effet, VP4 est la protéine qui se lie au récepteur cellulaire de l'entérocyte (**5**).

B. Infection à *Rotavirus* du groupe A

1. Manifestations cliniques

Le *Rotavirus* est le principal agent des GEA de l'enfant de moins de cinq ans. La population cible du virus est le nourrisson de six mois à deux ans. Dans cette population, l'infection est symptomatique dans la moitié des cas. Après une incubation d'un à trois jours, l'enfant présente une GEA de début brutal. Une équipe américaine a étudié la présentation clinique de 234 enfants, présentant des selles positives à *Rotavirus*, au moment de leur admission à l'hôpital (6) (Figure 2).

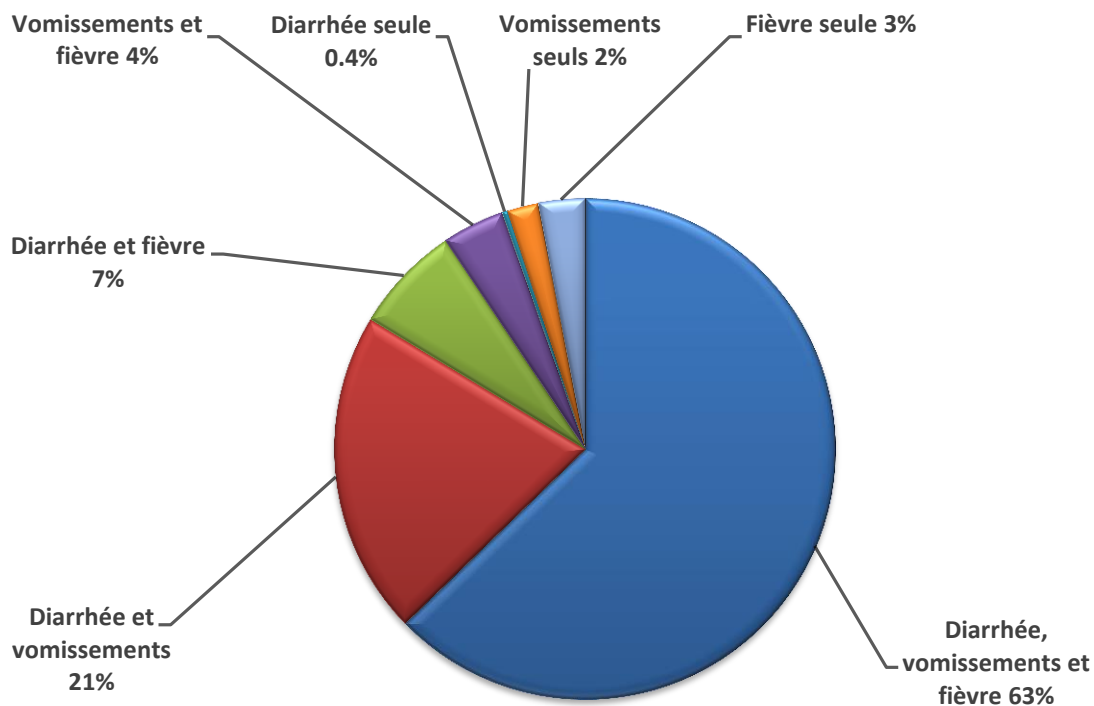


Figure 2. Présentation clinique initiale lors de l'admission à l'hôpital de 234 enfants avec une recherche de *Rotavirus* positive dans les selles (6).

Les signes de GEA (vomissements, fièvre, diarrhée aqueuse) étaient le plus souvent associés (63 % des cas). 97 % des enfants présentaient au moins de la diarrhée et/ou des vomissements au moment de leur admission. L'hospitalisation représente le principal biais de cette étude car la clinique d'une infection à *Rotavirus* chez des enfants se présentant aux

urgences est généralement plus marquée que celle d'enfants consultant en ville. D'autres symptômes comme des douleurs abdominales, des malaises et de l'asthénie sont également rapportés. La principale complication de la GEA à *Rotavirus* (GERV) est la déshydratation aiguë consécutive à l'infection pouvant mettre en jeu le pronostic vital de l'enfant. Les formes sévères ont généralement lieu lors de la primo-infection puis l'expression clinique diminue avec le nombre d'infections, grâce notamment à la sécrétion d'immunoglobulines A au niveau des muqueuses. La GERV est généralement plus sévère que les GEA induites par d'autres virus (7). La gravité de l'infection ne semble pas liée aux génotypes P ou G de la souche (8). Les infections symptomatiques à *Rotavirus* touchent essentiellement les nourrissons de six mois à deux ans. Avant cet âge, les nourrissons semblent protégés des formes sévères (9). Des GERV sévères et une excrétion chronique du virus avec des diarrhées intermittentes ont été décrites chez des sujets immunodéprimés.

Des complications extra-digestives ont pu être observées dans de rares cas : atteinte hépatique avec élévation des transaminases ou manifestations neurologiques (convulsions) (9). Le mécanisme à l'origine des troubles neurologiques n'a pas encore été élucidé. De l'ARN du virus a déjà été retrouvé dans des prélèvements de LCR. L'infection à *Rotavirus* sauvage ne semble pas être liée à un risque d'invagination intestinale aiguë (IIA) (10).

2. Physiopathologie

Les mécanismes physiopathologiques à l'origine de la diarrhée lors de l'infection sont complexes et multifactoriels. Deux revues de la littérature de 2005 (11) et de 2012 (12) résument les effets directs et indirects du virus et de sa protéine NSP4 sur la muqueuse intestinale (Figure 3, page 13). Les cellules cibles du *Rotavirus* sont les entérocytes matures du sommet des villosités de l'intestin grêle. Le virus se multiplie au sein des entérocytes, ce qui conduit à la lyse de ces derniers. L'atrophie des villosités engendre une diminution de la surface de digestion et d'absorption intestinale à l'origine d'une diarrhée de malabsorption. Deux autres mécanismes s'associent : l'hyperosmolarité intestinale et l'augmentation de la sécrétion intestinale. La diarrhée osmotique est liée à :

- une diminution de la digestion par inhibition de l'activité des dissaccharidases (lactase, maltase et saccharase isomaltase) ;

- une diminution du transport du glucose et de la leucine par inhibition des transports intestinaux (ex : symport SGLT1) ;
- une augmentation de la perméabilité paracellulaire (ouverture des jonctions serrées de l'épithélium).

La diarrhée sécrétoire est due :

- à une sécrétion nette de chlore dans la lumière intestinale induite en partie par NSP4, protéine virale, en augmentant le calcium intracellulaire ;
- à une sécrétion d'eau et d'électrolytes déclenchée par une stimulation du système nerveux entérique (SNE) via des médiateurs de l'inflammation.

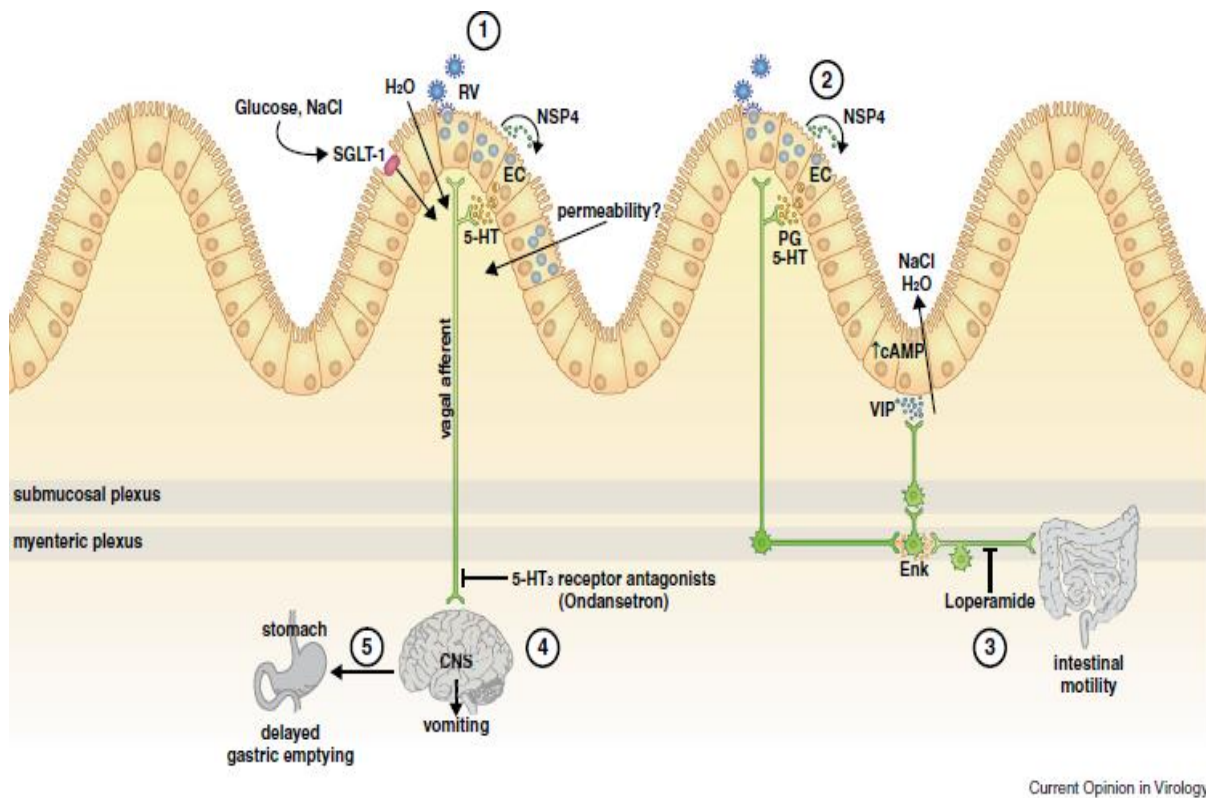


Figure 3. Modèle de la physiopathologie de la diarrhée à *Rotavirus*. Le schéma résume les effets directs du virus et de NSP4 sur l'épithélium intestinal (12).

NSP4 est la première entérotoxine virale mise en évidence. Elle est capable d'inhiber de manière non compétitive SGLT1 et de ce fait, tient également un rôle dans la diarrhée osmotique.

3. Mode de transmission

La transmission du *Rotavirus* s'effectue par voie féco-orale directe de personne à personne ou indirectement par des surfaces souillées ou par ingestion d'eau ou d'aliments contaminés. L'absence d'enveloppe confère aux *Reovoridae* la propriété d'être résistants dans le milieu extérieur. La particule virale est capable de persister intacte plusieurs jours à plusieurs semaines dans l'environnement (13). Un chauffage d'au moins une demi-heure à 50 °C est nécessaire à son inactivation. Elle est sensible aux désinfectants, cependant la décontamination des surfaces impose un temps de contact prolongé. Le *Rotavirus* est excrété massivement dans les selles d'un individu infecté (10^9 à 10^{10} particules virales/g de selles). Cette excrétion précède les symptômes et dure 4 jours en moyenne. De ce fait, c'est un agent d'infections nosocomiales (incidence hivernale d'environ 14 % chez des enfants hospitalisés de moins de deux ans à Paris malgré des mesures d'isolement) (14).

4. Diagnostic biologique

En pratique courante, le diagnostic virologique est effectué seulement en cas de GEA sévère du nourrisson, d'épisodes de diarrhées survenant chez un patient immunodéprimé ainsi que dans le cadre du diagnostic et de la prévention des gastro-entérites nosocomiales. Le diagnostic est basé sur la recherche directe de la protéine de capsid VP6 (*Rotavirus* du groupe A) à l'aide d'anticorps spécifiques, à partir d'un échantillon de selles. Pour rechercher cette protéine, trois types de techniques sont utilisées :

1. Immunoenzymatique (EIA) type ELISA ;
2. Immunochromatographique sur bandelette ;
3. Agglutination de particules de latex sensibilisées.

L'ordre des techniques est indiqué en fonction de leur sensibilité (de la sensibilité la plus élevée à la plus faible) (15,16).

D'autres techniques existent mais elles sont très peu utilisées en routine. Il est possible de rechercher le virus par microscopie électronique (technique de référence) ou le génome viral par technique moléculaire (études épidémiologiques). La culture du virus *in*

vitro est difficile et peu réalisée en pratique. Les cellules épithéliales d'origine rénale (MA104) sont les plus permissives.

5. Traitement

Il n'existe actuellement aucun traitement spécifique. La stratégie thérapeutique consiste à prévenir la déshydratation. Les solutés de réhydratation orale (SRO) à osmolarité réduite permettent de compenser les pertes hydro-électrolytiques. Selon un avis de la Haute Autorité de Santé (HAS) de 2002 (17), ces solutés doivent être proposés à volonté pendant les premières heures : toutes les 5 à 10 minutes au début puis toutes les 15 à 30 minutes. La quantité à administrer sera alors d'au moins 10 mL/kg après chaque selle liquide. L'allaitement maternel sera poursuivi autant que possible. Concernant les autres types d'alimentation, ils peuvent être repris progressivement après 4 heures de réhydratation orale exclusive (18). Selon les cas, l'alimentation réintroduite sera soit un lait artificiel identique à celui utilisé avant l'épisode de diarrhée (diarrhée d'intensité faible à modérée chez des enfants sans antécédent), soit une préparation sans lactose à base de lait de vache ou à base de soja pendant une à deux semaines (diarrhées sévères, longues, récidivantes). En cas de vomissements importants ou de déshydratation sévère (perte de poids supérieure ou égale à 8 %), la réhydratation par voie veineuse doit être utilisée en première intention.

Les médicaments anti-diarrhéiques, lorsqu'ils sont indiqués, sont à administrer en complément de la réhydratation par voie orale. Le racécadotril (Tiorfan®) est le traitement le plus approprié dans ce cas (19).

6. Prévention : hygiène et vaccination

Les mesures d'hygiène classiques (hygiène des mains, hygiène des sanitaires, isolement de la personne contaminée) doivent être effectuées en cas de GERV afin d'éviter la diffusion de l'épidémie. L'hygiène représente le meilleur moyen de prévenir la transmission des rotaviroses. Ces mesures sont primordiales notamment dans les structures collectives comme les crèches, les services d'hospitalisation pédiatrique ou les services accueillant des sujets immunodéprimés.

Depuis quelques années, un nouvel outil de prévention est disponible : la vaccination. Deux vaccins oraux vivants atténués sont disponibles dans le monde. Le vaccin monovalent (RV1), Rotarix® (GlaxoSmithKline Biologicals, Rixensart, Belgique), est composé d'une souche humaine G1P[8] atténuée sur culture cellulaire et le vaccin pentavalent (RV5), RotaTeq® (Merck & Co. Inc., Whitehouse Station, NJ, Etats-Unis), est composé de cinq souches de *Rotavirus* obtenues après réassortiment entre des souches bovines et des souches humaines. Les souches réassorties présentes dans RV5 sont G1P[5], G6P[8], G2P[5], G3P[5] et G4P[5]. L'administration du vaccin par voie orale s'effectue à deux et trois mois de vie pour RV1 et à deux, trois et quatre mois de vie pour RV5. Les principales contre-indications à l'utilisation de ces vaccins sont une immunodépression sévère ou une hypersensibilité à l'un de leurs constituants. Les antécédents d'IIA, les malformations intestinales, une affection gastro-intestinale chronique ou une maladie aiguë sévère sont des précautions d'emploi à l'utilisation de ces vaccins. La vaccination est à différer en cas de GEA en cours ou de fièvre. L'effet indésirable principal reste l'IIA et c'est en partie pourquoi la vaccination systématique contre le *Rotavirus* des nourrissons âgés de moins de six mois n'avait pas été recommandée en France, selon l'avis du 28 mai 2010 du HCSP (20). L'incidence annuelle des IIA toutes causes confondues est d'environ 25 cas pour 100 000 naissances au Royaume-Uni (21). Une étude australienne estime à 2,2 à 3,1 le nombre d'épisodes d'IIA pour 10 000 enfants de moins d'un an, principale tranche d'âge touchée (22). Selon les études réalisées, l'augmentation du risque d'IIA lié à la vaccination contre les rotaviroses est nul ou faible (10). Une étude réalisée au Mexique et parue dans *The New England Journal of Medicine* (23) estime entre 1,7 et 2,6 le risque supplémentaire d'IIA dans les 7 jours post-vaccination par RV1 (1^{ère} dose). Par contre, au Brésil, il n'y aurait pas d'augmentation du risque d'IIA selon cette même étude. Après l'utilisation de 800 000 doses de RV5 aux Etats-Unis dont 300 000 premières doses, aucune augmentation du risque d'IIA n'a été détectée (24). Un travail sur le rapport bénéfice/risque de la vaccination anti-*Rotavirus* aux Etats-Unis (25) a estimé à 0,2 le nombre de décès, à 45 le nombre d'hospitalisations et à 13 le nombre de recours aux urgences sans hospitalisation (sur la base de 4,3 millions d'enfants) imputables à une IIA induite par la vaccination. Enfin, une étude américaine publiée en janvier 2014 (26), estime l'excès du nombre de cas d'IIA induites par la vaccination à 1,5 pour 100 000 premières doses de RV5 administrées. Pour conclure, une augmentation du risque d'IIA dans les 7 jours après l'administration de la première dose vaccinale semble exister mais le niveau de risque reste faible et ne remet donc pas en cause la vaccination. Ainsi, l'avis du HCSP du

29 novembre 2013, recommande désormais la vaccination anti-*Rotavirus* pour les nourrissons âgés de moins de six mois.

C. Épidémiologie

1. Prévalence et incidence de l'infection à *Rotavirus*

○ Dans le monde

Chaque année, les infections à *Rotavirus* sont à l'origine de deux millions d'hospitalisations, 25 millions de consultations médicales et 111 millions d'épisodes de GEA traitées à domicile (27). L'OMS estime à 453 000 le nombre de décès d'enfants liés à des GERV en 2008 (28). La plupart des décès (environ 90 %) surviennent dans les pays à faible niveau socio-économique d'Afrique et d'Asie (malnutrition fréquente, co-infections intestinales bactériennes ou parasitaires, prise en charge absente ou retardée). En moyenne, 40 % des hospitalisations pour diarrhée chez les enfants de moins de 5 ans sont liées à une GERV (Réseau de surveillance des *Rotavirus* de l'OMS composé d'hôpitaux sentinelles situés dans 35 pays différents) (29).

Dans les pays tempérés, les GERV surviennent préférentiellement sur un mode épidémique saisonnier (période hivernale). Dans les autres pays, les épidémies ont lieu principalement pendant les mois les plus froids ou durant la saison des pluies.

○ En France

En France, selon une étude de 2005 (30), le nombre de GERV chez l'enfant de moins de cinq ans est estimé à 300 000 cas par an, à l'origine de 140 000 consultations, 18 000 hospitalisations et environ 14 décès par an. L'incidence des GERV donnant lieu à une consultation en médecine de ville est de 1357 cas pour 100 000 sujets-années (31). Le coût annuel est estimé à 28 millions d'euros. Le taux de couverture vaccinale en France est évalué à 7 % en 2010 (32). Cette faible couverture vaccinale s'explique par l'absence de recommandations en faveur d'une vaccination généralisée jusqu'en 2013.

L'épidémie de GERV se déroule durant la période hivernale (pays tempéré). Le pic d'incidence est plus tardif en province, avec un décalage d'environ un à deux mois par rapport à Paris. La Figure 4 (page 19), extraite de l'étude de De Rougemont *et al.* (8), est une

représentation graphique du déroulement des épidémies de GERV à Paris et en province entre janvier 2006 et janvier 2009.

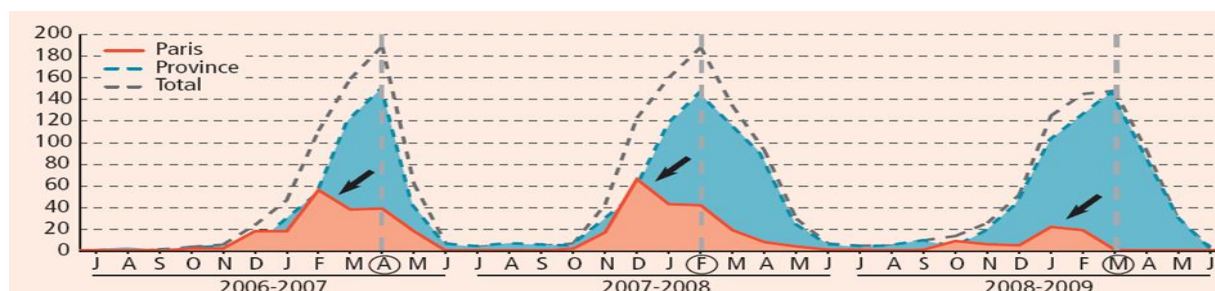


Figure 4. Répartition du nombre de cas de GERV détectés par mois entre janvier 2006 et janvier 2009 à Paris et en province (Figure extraite de l'étude de De Rougemont *et al.* (8)).

2. Répartition des génotypes P des Rotavirus en fonction de l'hôte

La majorité des génotypes P présente une spécificité d'hôte. Par exemple, P[4], P[8] et P[6] sont presque exclusivement retrouvés chez l'homme tandis que P[13] est présent chez le porc, P[12] chez le cheval. Cependant, certaines souches touchent plusieurs espèces comme P[9], qui peut infecter à la fois l'homme, le chat et le chien. Le **Tableau 2** (pages 19-20), extrait de l'étude de Liu *et al.* (33), reprend l'ensemble des génotypes P ainsi que leur affinité d'hôte.

Tableau 2. Distribution des hôtes du Rotavirus en fonction du génotype P (33).

Génotype P	Hôte par ordre de fréquence
P[1]	Bovin > Humain > Porcin > Singe > Caprin > Equin > Camélidés
P[2]	Singe > Humain
P[3]	Canins > Humain > Félin > Singe > Bovin > Caprin
P[5]	Bovin
P[7]	Porcin > Bovin > Humain
P[10]	Humain
P[12]	Equin
P[13]	Porcin
P[15]	Ovin > Bovin
P[16]	Murin
P[18]	Equin
P[20]	Murin
P[21]	Bovin
P[22]	Loup
P[23]	Porcin
P[24]	Singe
P[26]	Porcin
P[27]	Porcin
P[28]	Humain
P[29]	Bovin
P[32]	Porcin

P[33]	Bovin
P[34]	Porcin
P[4]	Humain
P[6]	Humain > Porcin
P[8]	Humain
P[19]	Porcin > Humain
P[9]	Humain > Félin > Canin
P[14]	Humain > Bovin > Loup > Caprin
P[25]	Humain
P[11]	Bovin > Humain
P[17]	Aviaire (poulet) > Bovin
P[30]	Aviaire (poulet)
P[31]	Aviaire (poulet)
P[35]	Aviaire (dinde)

3. Répartition géographique des génotypes

○ Dans le monde

Entre 1973 et 2003 (période pré-vaccinale), selon un résumé de 124 études réalisées dans 52 pays (34), 91,2 % des infections à *Rotavirus* A étaient dues à des souches présentant les combinaisons G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8] et G9P[8]. La distribution des combinaisons génotypiques est détaillée dans la Figure 5.

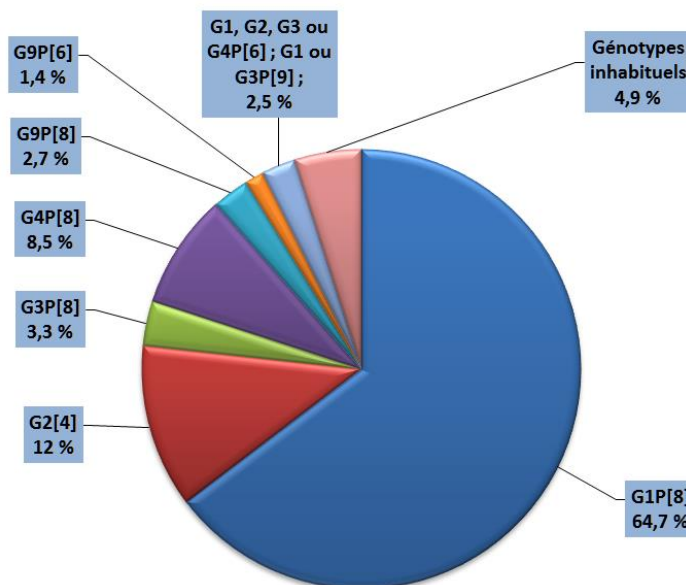


Figure 5. Distribution mondiale des génotypes G et P des *Rotavirus* humains du groupe A avant l'introduction de la vaccination (n = 16 474), d'après Santos et al. (34).

G1P[8] représente au moins 70 % des souches de *Rotavirus* isolées en Amérique du Nord, en Europe et en Australie mais seulement 30 % de celles isolées en Afrique et en Asie. G9P[8] est une combinaison apparue à Philadelphie en 1983. Après une absence de circulation d'environ 12 ans, elle réapparaît en 1995 et devient commune voire majoritaire dans certains pays dont la France. G5, G6, G8, G10 et G12 sont des génotypes émergents notamment dans les pays à bas et moyen niveau de développement socio-économique. Ils correspondent à des virus réassortis entre des souches humaines et animales.

○ **En France**

La répartition des différents génotypes à Nantes et à Paris en fonction des hivers (2006-07, 2007-08 et 2008-09) est présentée sur la **Figure 6**. Les souches ayant la combinaison génotypique G1P[8] sont prédominantes en France, comme dans tous les autres pays d'Europe. Par contre, la combinaison G9P[8] est la deuxième combinaison majoritaire en France ce qui n'est pas le cas dans le reste de l'Europe.

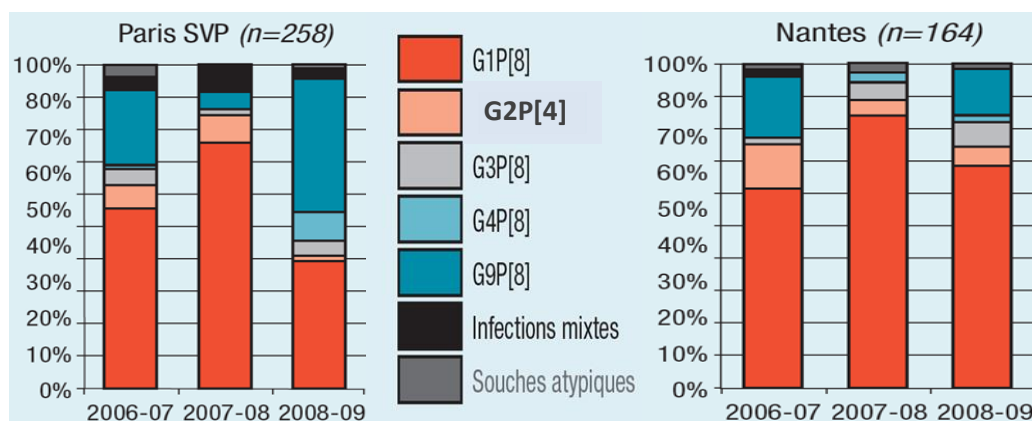


Figure 6. Répartition des génotypes à Nantes et à Paris durant les épidémies hivernales de 2006-07, 2007-08 et 2008-09 (Figure extraite de l'étude de De Rougemont *et al.* (8)).

4. Impact de la vaccination

- **Efficacité et performance de la vaccination anti-*Rotavirus***

En 2012, Soares-Weiser et *al.* (35) ont comparé l'efficacité de RV1 et de RV5 contre les gastroentérites sévères à *Rotavirus* dans les pays à faible ou à très faible mortalité *versus* les pays à forte ou à très forte mortalité infantile. Ils ont analysés les résultats de 29 essais randomisés portant sur RV1 et 12 essais randomisés portant sur RV5 et leur résumé est présenté dans le **Tableau 3**.

Tableau 3. Taux de protection (en %) contre les gastro-entérites sévères à *Rotavirus*, à 1 an et à 2 ans après la vaccination par RV1 ou par RV5 (35).

		RV1	RV5
Pays à faible ou très faible mortalité	Suivi à 1 an	86 %	87 %
	Suivi à 2 ans	85 %	82 %
Pays à forte ou très forte mortalité	Suivi à 1 an	63 %	57 %
	Suivi à 2 ans	42 %	41 %

L'efficacité de la vaccination, en termes de taux de protection, est plus faible dans les pays à forte mortalité que dans les pays à faible mortalité infantile. Une des explications possibles serait la différence de distribution des génotypes entre ces deux catégories de pays. Par exemple, le génotype P[6], pourtant relativement fréquent en Afrique, n'est présent dans aucun des deux vaccins commercialisés actuellement. Cependant, la vaccination contre le *Rotavirus* dans les pays à faible niveau socio-économique est recommandée par l'OMS car, bien que le taux de protection induit par cette vaccination soit moindre, elle diminue de façon considérable le nombre de décès liés aux GERV.

Au Mexique, selon l'étude de Richardson et *al.* de 2010 (36), la mortalité liée à des diarrhées chez les enfants de moins de 5 ans est passée de 1793 décès par an (médiane annuelle entre 2003 et 2006) en période pré-vaccinale à 1118 décès en 2008 (période post-vaccinale par RV1). Le pourcentage d'enfants ayant reçu au moins une dose était d'environ 74 % et le pourcentage d'enfants ayant reçu les deux doses était d'environ 51 %. Des résultats similaires ont été décrits au Brésil (37). Une étude américaine s'est penchée sur l'efficacité d'une vaccination incomplète par RV5 (38). L'efficacité était évaluée en

comparant le nombre de recours aux urgences entre une population recevant une dose de RV5 (ou deux doses) et une population témoin (absence de vaccination). L'efficacité était de 88 % dans la population ne recevant qu'une seule dose de vaccin. Lorsque les enfants recevaient deux doses de vaccin, l'efficacité atteignait à 94 %. Des résultats similaires ont été trouvés par une étude de Payne et *al.* aux Etats-Unis entre 2009 et 2011 (39). En France, une réduction de 98 % du nombre d'hospitalisations a été observée dans le cadre d'une étude brestoise, chez des enfants ayant eu un schéma vaccinal complet par le Rotateq® (40).

De plus, une diminution des GERV dans les tranches d'âge non ciblées par la vaccination a également été mise en évidence. Les hypothèses avancées pour expliquer cette immunité « populationnelle » sont :

- la diminution globale de la circulation du virus au sein de la population (41) ;

et/ou

- la possibilité de transmission de souches vaccinales entre individus (des souches vaccinales ont été retrouvées dans des selles de sujets vaccinés (42) et dans les selles d'individus non vaccinés dont le jumeau avait été vacciné (43)).

○ **Impact sur la distribution des génotypes**

Au Brésil, six ans après l'introduction du vaccin RV1, une augmentation de la prévalence de G2P[4] a été mise en évidence (44). De même, en Australie, les souches de type G2P[4] et G3P[8] ont été plus fréquemment isolées après l'introduction respective de RV1 et de RV5 (45). Cependant, aucun nouveau génotype émergent n'a été décrit dans le cadre de la surveillance active post-vaccinale.

L'impact direct de la vaccination sur l'épidémiologie sera difficile à distinguer des fluctuations naturelles des souches de *Rotavirus*. La caractérisation des génotypes circulants doit continuer à être effectuée afin de détecter une éventuelle pression de sélection induite par l'introduction dans le calendrier vaccinal de RV1 et de RV5.

○ **Recommandations**

Depuis déjà quelques années, le *Rotavirus* a fait l'objet d'un grand nombre de travaux. La plupart d'entre eux ont porté sur l'impact de la vaccination par le Rotateq® et le Rotarix® et ont conclu à un intérêt majeur de celle-ci en Santé Publique, tant au niveau de la diminution de la mortalité infantile dans les pays à niveau socio-économique faible qu'en termes de diminution des coûts dans les pays à niveau socio-économique plus élevé. Le risque d'IIA induit par la vaccination est l'élément principal ayant freiné la mise en place de la vaccination obligatoire. En effet, le premier vaccin anti-*Rotavirus* commercialisé, le RotaShield® (Wyeth Lederle), avait été retiré du marché car le risque supplémentaire d'IIA avait été estimé à un cas pour 10 000 enfants vaccinés. L'éditorial du 6 février 2014 de *The New England Journal of Medicine* a tenté de faire le point sur la balance bénéfice/risque de l'utilisation à grande échelle du Rotateq® et du Rotarix® (46). Leurs conclusions, basées notamment sur deux grandes études américaines, ont été qu'en effet la vaccination augmente le risque d'IIA mais que ce risque supplémentaire est faible, de l'ordre de 1 à 5 cas pour 100 000 enfants vaccinés. Selon ce même éditorial, ce faible risque d'IIA ne remet pas en cause la vaccination vu que les bénéfices sont jugés plus importants. Par exemple, aux Etats-Unis, sur une cohorte de 4,5 millions d'enfants nés chaque année, la vaccination engendrerait 45 à 213 cas d'IIA mais éviterait 53 000 hospitalisations et 170 000 recours aux urgences. L'OMS recommande d'intégrer cette vaccination dans tous les programmes nationaux de vaccination et d'en faire une priorité notamment dans les pays avec un taux de mortalité par GERV élevé (c'est-à-dire les pays dont les décès par diarrhée représentent au moins 10 % de la mortalité chez les enfants de moins de 5 ans). De nombreux pays ont déjà adopté cette vaccination dont le Mexique, le Brésil, les Etats-Unis d'Amérique, l'Australie, la Belgique, l'Autriche, la Finlande. Depuis novembre 2013 (47), le HCSP a décidé de recommander la vaccination en France pour les nourrissons de moins de six mois. Deux réserves ont cependant été émises :

- les prix des vaccins doivent être raisonnables afin de conduire à un ratio coût/efficacité acceptable ;
- les parents doivent être informés des risques d'IIA post-vaccinal et être sensibilisés à ces premiers symptômes.

D. Les « récepteurs » du *Rotavirus A*

L'étape initiale de l'infection par le *Rotavirus* nécessite l'attachement de sa protéine VP8* à un récepteur présent à la surface des entérocytes. Les souches de *Rotavirus* ont rapidement été classées en souches sialidase-dépendantes et sialidase-indépendantes, en partant du constat que la fixation sur l'entérocyte de certaines souches était inhibée par l'action préalable d'une sialidase tandis que pour d'autres souches, notamment les souches humaines, ce n'était pas le cas. Le récepteur des *Rotavirus* humains n'était pas connu jusqu'en 2009. De récents travaux étudiant la liaison de VP8*, issus de souches humaines (P[8], P[4]...), aux glycanes ont permis d'identifier les antigènes tissulaires de groupes sanguins humains (HBGA) comme récepteur pour VP8*. Après avoir rappelé la définition et la synthèse des HBGA, nous aborderons un autre exemple de virus se liant aux HBGA, les *Norovirus*. En effet, grâce à plus de dix ans d'étude, la connaissance de l'interaction entre les différents HBGA et les nombreuses souches de *Norovirus* est déjà relativement avancée. Enfin, la découverte des récepteurs du *Rotavirus* sera décrite étape par étape.

1. Les antigènes tissulaires de groupes sanguins humains

Deux systèmes de groupes sanguins seront abordés dans ce travail : le système ABO et le système Lewis. Le système ABO est à la fois un système sanguin et un système tissulaire. C'est-à-dire qu'il dépend soit de l'expression du gène *FUT1* à l'origine de sa synthèse au niveau érythrocytaire, soit de l'expression du gène *FUT2* à l'origine de sa synthèse au niveau tissulaire. Le système Lewis, quant à lui, est un système exclusivement tissulaire car les antigènes Lewis ne peuvent pas être synthétisés au niveau des érythrocytes. Cependant, une source cellulaire non caractérisée est capable de synthétiser des antigènes Lewis retrouvés dans le plasma sous forme glycolipidique, qui peuvent secondairement être adsorbés à la surface des globules rouges. Dans ce travail, seule la partie tissulaire du système ABO et Lewis sera abordée. La partie tissulaire de ces deux systèmes sera définie par le terme HBGA correspondant aux antigènes tissulaires de groupes sanguins humains.

Les HBGA sont des sucres complexes exprimés à la surface de nombreux types cellulaires et présents aux extrémités externes des N- et O-glycannes ou glycolipides. Ils sont présents à la surface des tissus épithéliaux humains (muqueuses génitale, respiratoire et digestive) ainsi que sous forme libre dans les sécrétions comme la salive ou le lait. La synthèse de ces antigènes est sous la dépendance de plusieurs gènes codant pour des glycosyltransférases. Par définition, les glycosyltransférases, dont l'expression est tissu-dépendante, sont des enzymes qui catalysent le transfert d'un monosaccharide sur des glycolipides ou des glycoprotéines. Le **tableau 4**, résume les propriétés de trois fucosyltransférases.

Tableau 4. Propriétés de trois fucosyltransférases.

Gène	Nature du précurseur	Expression tissulaire	Système concerné
FUT1 ou H (allèle silencieux h)	Disaccharide de base (DSB) de type 2 (Galβ1,4GlcNac)	Ectoderme Mésoderme (Moelle osseuse, érythroblastes, endothélium vasculaire)	Système ABO
FUT2 ou SE (allèle silencieux se)	DSB de type 1 (Galβ1,3GlcNac)	Endoderme (muqueuse digestive, respiratoire, glandes salivaires)	Système ABO et Lewis
FUT3 ou LE (allèle silencieux le)	DSB de type 1 ou 2 et antigène H de type 1 ou 2	Tissulaire seulement Adsorbé sur les érythrocytes	Système Lewis

L'un des précurseurs des HBGA est appelé précurseur de type 1. Il correspond à un DSB de type 1 (Galβ1,3GlcNac) fixé à un glycolipide ou une glycoprotéine transmembranaire présent au niveau de l'endoderme. A partir de ce précurseur est synthétisé l'antigène H de type 1 sous la dépendance du gène *FUT 2* (chromosome 19). *FUT2* code pour une α-1,2-fucosyltransférase qui transfère un résidu fucose sur le galactose terminal du précurseur. Deux allèles silencieux (*se/se*) sur le gène *FUT2* déterminent un phénotype appelé « non sécréteur ». A l'inverse, la présence d'au moins un allèle non silencieux *SE* (*SE/se* ou *SE/SE*) induit un phénotype « sécréteur ». Les antigènes du système Lewis sont déterminés par la présence de la fucosyltransférase 3 (gène *FUT3*) qui additionne un L-fucose sur :

- Un précurseur de type 1, générant ainsi l'antigène Lewis a ;
- Un antigène H de type 1, générant ainsi l'antigène Lewis b.

Les glycosyltransférases A et B (système ABO) interviennent sur l'antigène H de type 1 :

- L'action de l' α -1,3-N-acétylgalactosaminyltransférase, codé par l'allèle A du gène *ABO*, génère l'antigène A ;
- L'action de l' α -1,3-galactosyltransférase, codé par l'allèle B du gène *ABO*, génère l'antigène B.

Le phénotype d'un individu est donc dépendant de l'action combinée des différentes enzymes. Les différentes possibilités sont présentées sur la Figure 7.

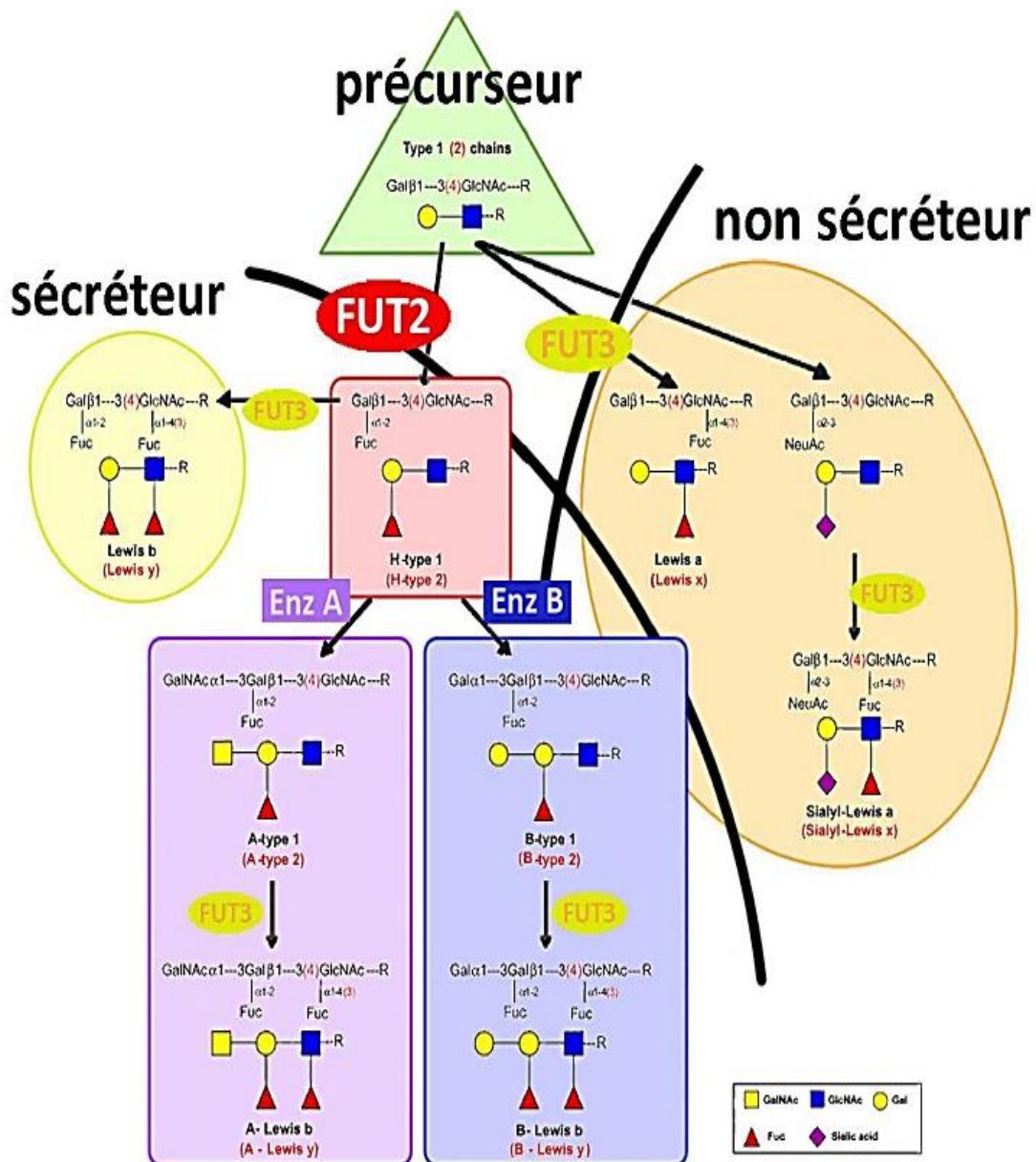


Figure 7. Biosynthèse des antigènes tissulaires ABH et Lewis et détermination du phénotype sécréteur ou non sécréteur (Figure extraite de la thèse de A. de Rougemont (48)). Les caractères en rouge désignent les antigènes obtenus à partir du précurseur de type 2. Au niveau de la jonction gastroduodénale, le précurseur de type 1 est présent à la surface de l'épithélium tandis que le précurseur de type 2 est préférentiellement retrouvé au niveau glandulaire. L'antigène Sialyl-Le x est présent sur les cellules épithéliales en cas de cancer.

Un allèle se est définit par la présence de mutation(s) ponctuelle(s) au niveau du gène *FUT2* induisant la synthèse d'une enzyme non fonctionnelle. Les mutations **(49,50)** les plus fréquentes sont :

- La mutation non-sens G428A présente essentiellement dans la population caucasienne et africaine (représentant 95 % des phénotypes non sécréteurs de la population caucasienne) ;
- La mutation faux-sens A385T présente dans la population d'Asie du Sud-Est.

Les sujets non sécréteurs représentent environ 20 % de la population caucasienne et nord-américaine **(51)**. Les individus non sécréteurs peuvent présenter à la surface de leur muqueuse digestive des antigènes Lewis a et/ou sialyl-Lewis a à condition que l'enzyme FUT3 et/ou la sialyl-transférase soient fonctionnelles.

2. La découverte des ligands cellulaires des *Norovirus*

○ **Caractéristiques virologiques des *Norovirus***

Le genre *Norovirus* (*NoV*) fait partie de la famille des *Caliciviridae* (3). Ce sont de petits virus (27 à 30 nm de diamètre) nus à capsidre icosaédrique renfermant un seul ARN simple brin de polarité positive. Ce dernier, d'environ 7,5 kb, comprend trois cadres de lecture appelés ORF (*open reading frame*), allant de ORF 1 à 3, codant respectivement pour les protéines non structurales, la protéine de capsidre VP1 et la protéine structurale VP2. Les *Norovirus* sont divisés en cinq génogroupes (basés sur l'analyse d'ORF2). Les souches humaines sont majoritairement présentes dans les génogroupes GI et GII. Des sous-groupes (ou génotypes) sont présents au sein de ces génogroupes. Une grande variabilité génétique existe au sein des *NoV* grâce à la fréquence des mutations ainsi qu'à leur capacité de recombinaison. VP1, la protéine de capsidre, comprend trois domaines dont le domaine P qui est exposé à la surface de la capsidre, lui-même divisé en deux sous-domaines, P1 et P2 (Figure 8). P2 constitue le site de fixation du virus à son récepteur cellulaire (52) et correspond à la région hypervariable de la capsidre.

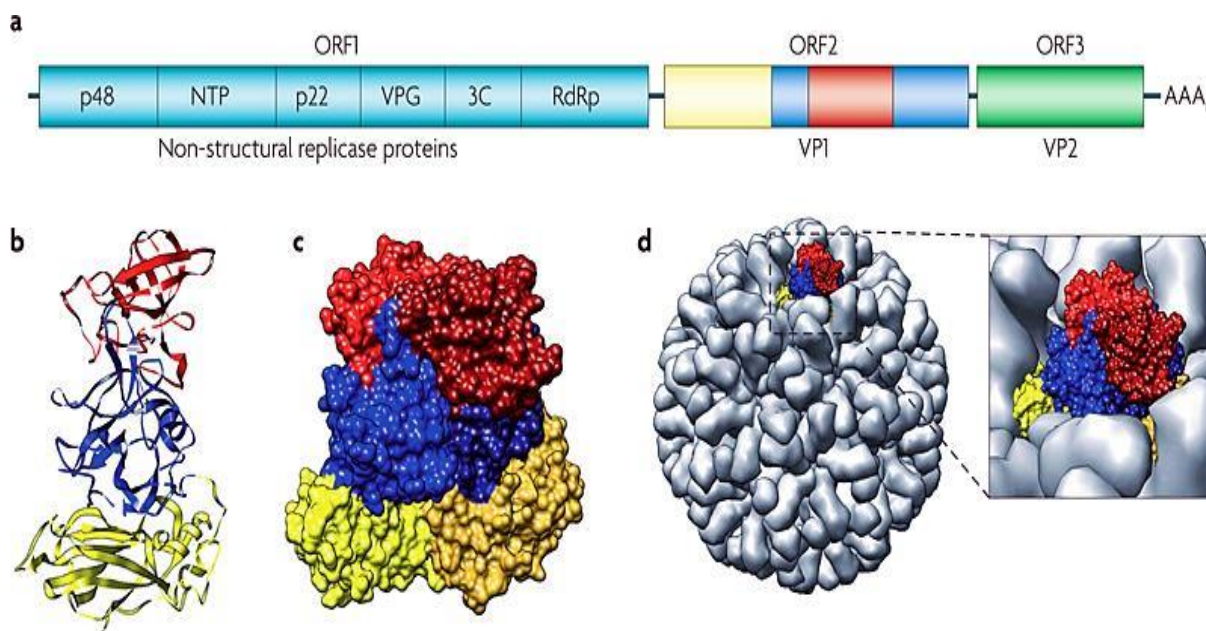


Figure 8. Génome et structure de la capsidre des *Norovirus* (Figure extraite de Nat Rev Microbiol. (53)). **a.** Génome du genre *NoV* (5' → 3') avec ses trois cadres de lecture (de ORF1 à ORF3). **b.** Structure de la protéine de capsidre VP1 (monomère). Les unités P2, P1 et S-N sont représentées respectivement en rouge, en bleu et en jaune. **c.** Dimère de protéines VP1. **d.** Structure de la capsidre virale formée de 180 monomères de VP1.

Les *Norovirus* humains (*HuNoV*) sont des agents fréquents de GEA. Ils sont la première cause de GEA chez l'adulte et l'adolescent et la deuxième cause chez l'enfant de moins de cinq ans. Ils représentent environ 18 % des GEA communautaires aux Pays-Bas durant la période hivernale (54). C'est le pathogène le plus fréquemment responsable de toxi-infections d'origine alimentaire (environ 58 % de l'ensemble des TIAC aux Etats-Unis (55)). Le virus se transmet sur un mode féco-oral : soit de personne à personne ou via des surfaces souillées, soit par ingestion d'aliments ou d'eau contaminés. La résistance de la particule virale, la faible dose de virus nécessaire à l'infection et l'excrétion persistante du virus après la fin des symptômes expliquent la bonne diffusion de ce virus (56). Les principaux signes cliniques, lors d'une infection symptomatique, sont des nausées, des vomissements, des douleurs abdominales parfois associés à des diarrhées, des frissons et/ou de la fièvre (56). Les patients âgés ou immunodéprimés sont les patients les plus à risque de diarrhée sévère et de déshydratation. Après un à trois jours d'incubation, l'épisode clinique dure généralement deux à trois jours. Les *HuNoV* sont à l'origine de cas sporadiques ainsi que d'épidémies dont l'origine est le plus souvent alimentaire, hydrique ou manuportée au sein de structures collectives (57). Les souches GII.4 sont prédominantes lors d'épidémies (représentant environ 62 % des épidémies à *NoV*) (58). Afin d'éviter des épidémies liées à l'alimentation, il est recommandé d'effectuer des contrôles au niveau des points critiques de la production alimentaire, d'exclure le personnel malade et de respecter de façon stricte les mesures d'hygiène (dont la décontamination des surfaces à l'hypochlorite de sodium). Pour limiter le manuportage du virus dans les structures collectives, les précautions de type « contact » doivent être appliquées (elles sont identiques à celles indiquées pour la prévention des GERV).

Le diagnostic virologique est rarement réalisé mais lorsqu'il est demandé, il s'effectue à partir d'échantillon de selles grâce à des techniques de biologie moléculaire (RT-PCR : *reverse transcription polymerase chain reaction*). Une RT-PCR en temps réel va permettre d'amplifier, si le génome du virus est présent, la région codant pour la polymérase des *NoV* (région relativement conservée). En cas de positivité, le génogroupe et le génotype sont déterminés par RT-PCR puis séquençage de la région ORF2. D'autres possibilités existent afin de déterminer plus rapidement le génogroupe. Par exemple, lors d'une recherche de *NoV* au laboratoire de Virologie du CHU de Nantes, une RT-PCR quantitative en temps réel amplifiant une région conservée de la jonction ORF1-ORF2 permet de déterminer en même

temps la présence du virus et le génogroupe de ce dernier grâce à l'utilisation de deux couples d'amorces spécifiques de GI ou GII (59).

○ **Susceptibilité de l'hôte à l'infection par les *Norovirus***

Il y a encore quelques années, de nombreuses questions se posaient sur la « résistance » de certains individus à développer une infection par un *NoV*. Une étude de 1990 sur des volontaires sains (60), indiquait que sur 30 volontaires présentant un taux faible d'anticorps vis-à-vis du virus de Norwalk (ou GI.1-NV), seulement 19 développaient une GEA ou une augmentation de leur titre d'anticorps après *challenge* (ingestion de GI.1-NV). De plus, on savait que l'infection par un *NoV* ne conférait qu'une immunité homotypique à court terme. Les premiers éléments de réponse ont été apportés dans les années 2000 par une étude de Lindesmith et *al.* qui relia cliniquement le polymorphisme du gène *FUT2* à la résistance à l'infection par le virus de Norwalk (61). Environ 20 % de la population volontaire étudiée présentait un phénotype non sécréteur vis-à-vis de *FUT2*. Après *challenge* (ingestion de GI.1-NV), cette population ne contractait pas de GEA et ne développait pas de réponse immunitaire. Les individus sécréteurs, quant à eux, se divisaient en deux groupes :

- 45 % développaient une GEA et une réponse immunitaire tardive. Du virus était retrouvé dans leurs selles ;
- 35 % ne présentaient aucun symptôme, ni excrétion virale dans les selles mais produisaient des immunoglobulines A spécifiques de façon précoce.

La principale difficulté rencontrée lors de l'étude des *HuNoV* fut l'incapacité à les cultiver. C'est pourquoi, des *virus-like particles* (VLP), correspondant à un système leurre, ont été utilisées afin de comprendre la liaison des *NoV* à leurs récepteurs entériques. Les VLP sont des particules virales de synthèse qui ont les mêmes propriétés antigéniques et structurales que la capsid externe du virus natif. Grâce à des VLP de GI.1-NV, Marionneau et *al.* ont prouvé la fixation de *HuNoV*-VLP sur des coupes histologiques de la jonction gastro-intestinale de donneurs présentant un phénotype sécréteur alors que cette fixation était nulle chez des donneurs de phénotype non sécréteur (62). Plus précisément, les auteurs ont pu mettre en évidence l'existence d'une fixation spécifique des VLP de GI.1-NV aux antigènes H de type 1 et 3. Par la suite, une étude suédoise a démontré la relation entre

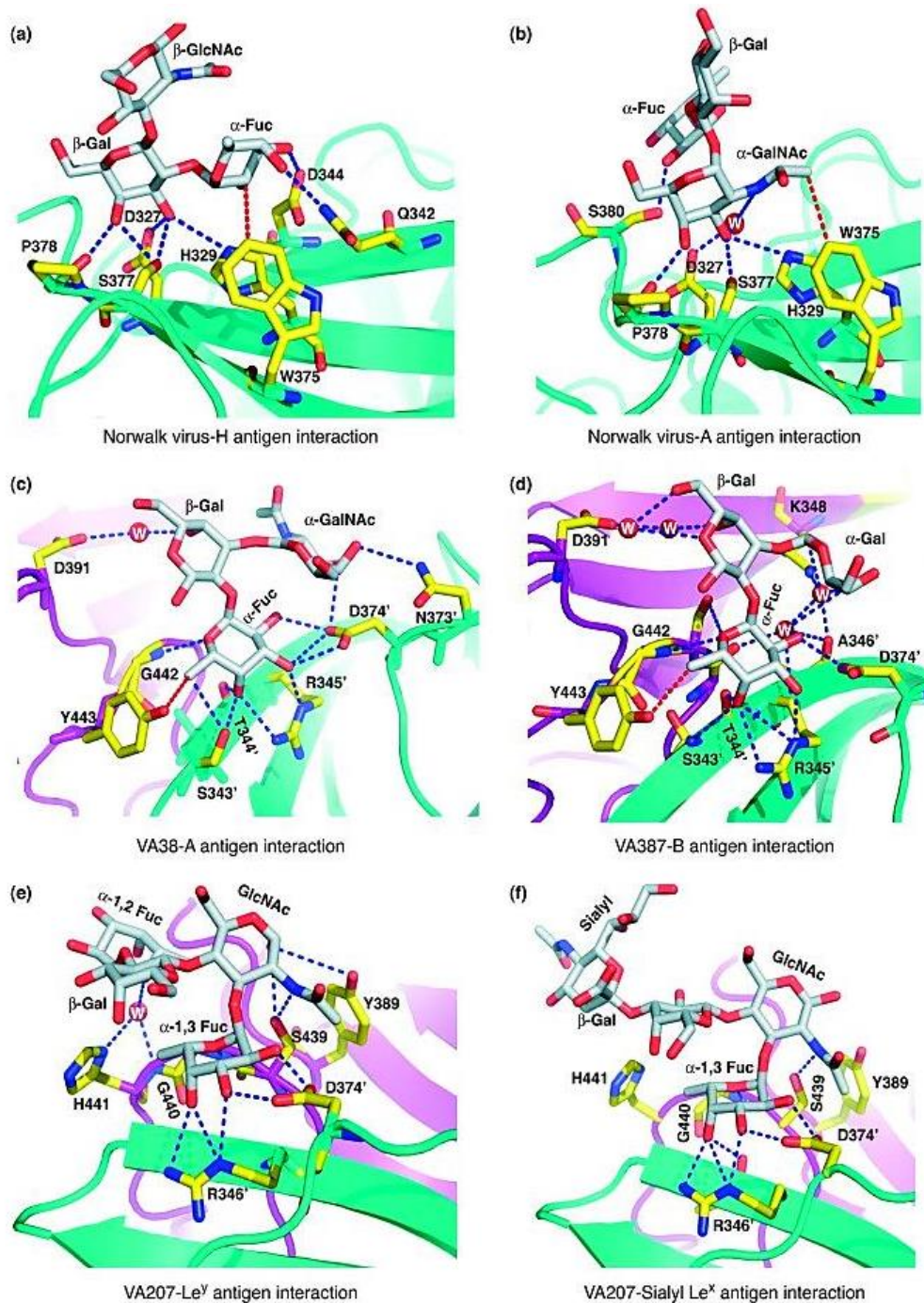
le phénotype non sécréteur (environ 20 % de la population suédoise) et l'absence d'infection par un autre NoV, le LDV (*Lordsdale-like virus*), appartenant au génogroupe GII (63). Puis de nombreuses études se sont penchées sur l'interaction entre les HBGA et la protéine VP1 en utilisant des VLP de différents NoV ainsi que différents sucres de synthèse. Le **Tableau 5** (extrait d'une revue de la littérature de 2010 (53)) résume les profils d'affinité entre les principaux NoV retrouvés chez l'homme et les HBGA. Ce tableau nous éclaire sur le fait que l'infection par un NoV est dépendante à la fois du profil d'expression des HBGA du sujet (résultat de l'expression ou non de différentes enzymes : FUT2, FUT3 et les glycosyltransférases A et B) ainsi que de la souche de NoV. L'apparition de nouveaux variants dans le groupe GII.4 environ tous les deux à trois ans est observée. Cette variabilité importante s'explique par la plus grande capacité de réplication ainsi que par le taux de mutations plus élevé, notamment dans le sous-domaine P2, décrits dans ce groupe. Certaines souches du génogroupe GII peuvent infecter des individus non sécréteurs en se liant aux antigènes Le a et/ou Le x.

Tableau 5. Résumé des profils de liaison aux HBGA de différentes souches de NoV (tableau extrait de (53))

Génogroupe et génotype	Nom de la souche virale utilisée pour produire le VLP	Année de découverte	Profil de liaison aux HBGA de synthèse
I.1	Norwalk	1968	A, H1 et H3
	West Chester	2001	A, H1 et H3
I.2	Southampton	1999	A, H3 et Le ^A
I.3	Desert Shield	1999	Le ^A
I.4	Chiba	2000	A, Le ^A et Le ^X
II.1	Hawaii	1971	A
	Weisbaden	2001	Aucun
II.2	Snow Mountain	1976	H3
	Buds	2002	Aucun
	Ina	2002	Aucun
II.3	Toronto	1999	A et H3
II.4	GII.4.1987	1987	H3 et Le ^Y
	GII.4.1987_D393G	2007*	B et H3
	GII.4.1997	1997	A, B, H3, Le ^B et Le ^Y
	GII.4.2002a	2002	A, Le ^A et Le ^X
	GII.4.2002	2004	H3 et Le ^Y
	GII.4.2004	2004	Aucun
	GII.4.2005	2005	Aucun
GII.4.2006	2006	A, B et H3	

Deux études moléculaires, de Lindesmith et *al.* (64) et de de Rougemont et *al.* (65), confirment l'absence de variation de différentes souches de GII.4 au niveau des acides

aminés (aa) interagissant avec le récepteur glycanne cellulaire. Tandis que le reste des aa subit de nombreuses variations permettant ainsi à des variants d'acquérir de nouvelles capacités, dont la possibilité de liaisons avec de nouveaux HBGA.



TRENDS in Microbiology

Figure 9. Profil d'interaction entre un dimère de VP1 de trois souches différentes (Norwalk virus, VA387 et VA207) et des HBGA (Figure extraite de (66)). Chaque monomère est représenté en bleu et en violet. Les liaisons hydrogènes sont indiquées par un trait pointillé bleu. Les liaisons cation- π (a, b) et *van der Waals* (c, d) sont indiquées par un trait pointillé rouge. Les ronds rouges contenant un W représentent un pont avec une molécule d'eau.

La cristallographie a permis de modéliser le site de fixation des HBGA aux NoV. Deux sites de fixation complètement différents entre le génogroupe I et le génogroupe II ont été mis en évidence. Ils ne partagent aucun acide aminé en commun. Ceci suggère que l'introduction de ces deux génogroupes chez l'homme n'a pas la même origine. L'interface de liaison du virus de Norwalk (GI-1) contient sept acides aminés importants (D327, H329, Q342, D344, W375, S377, P388 et S380) déterminant six à sept liaisons hydrogènes et une liaison ionique cation- π avec les antigènes A et H (**Figure 9, page 33**) (66). Le NoV VA 387 (GII.4) a 10 acides aminés importants (S343, T344, R345, A346, K348, N373, D374, D391, G442 et Y443) dans son site de liaison à l'origine de 12 liaisons hydrogènes et d'une liaison de *van der Waals* avec les antigènes A et B. Cette poche d'interaction est proche de celle du VA207 (GII.9) confirmant une localisation identique de la poche de liaison entre les souches du génogroupe II mais différente de celles du génogroupe I.

Le panel des récepteurs possibles, pour la majorité des souches GI.4, est vaste. Elles peuvent ainsi se fixer sur les muqueuses des individus sécrétant de groupe sanguin O, A, B et AB. La population touchée est alors importante permettant une plus grande réplication du virus et ainsi l'émergence de souches pandémiques.

3. Etude *in vitro* du profil de reconnaissance des HBGA par les *Rotavirus*

○ Attachement cellulaire du *Rotavirus*

La particule virale infectieuse du *Rotavirus* se compose de trois couches protéiques (TLP = *triple layered particle*) dont la couche la plus externe, formée par VP4 et VP7. Du point de vue structural, trois protéines VP4 sont enfouies dans une poche laissée libre par VP6. Des glycoprotéines trimériques de VP7 recouvrent la particule virale et bloquent les spicules de VP4 dans cette poche. La trimérisation de VP7 est stabilisée par des ions calciques. Pour être infectieuse, VP4 doit être clivée dans la lumière intestinale par des protéases semblables à la trypsine. Ce clivage déclenche une réorganisation de VP4 et génère deux fragments, VP8* et VP5*, associés entre eux par des liaisons non covalentes conduisant à une rigidification de VP4 (1). La partie proximale du spicule est constituée de trois copies de VP5*. Plus exactement, avant la protéolyse, les trois unités VP5* correspondent à la base du spicule et sont enchâssées dans les couches de VP6 et de VP7. Grâce à l'action de l'enzyme, deux unités VP5* se dimérisent alors que la troisième unité (VP5*C) se positionne asymétriquement à la base du spicule, à plat, près de la surface de la particule virale (Figure 10).

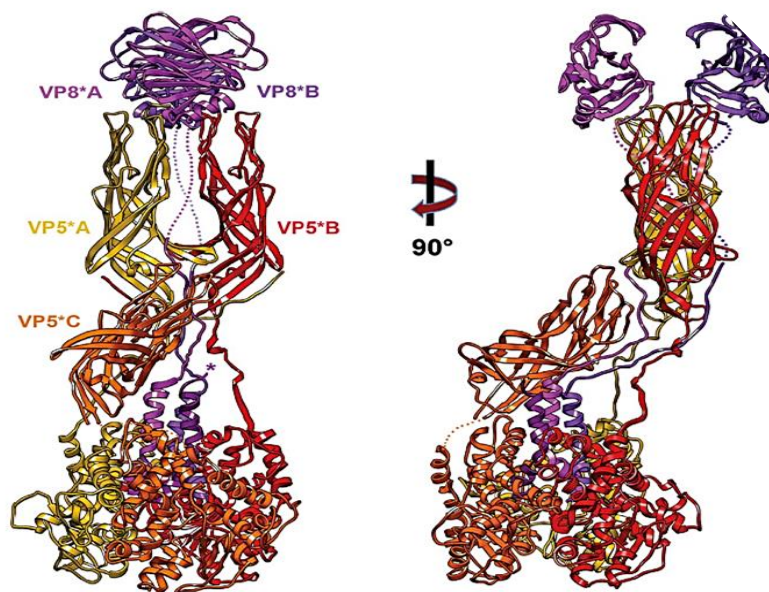
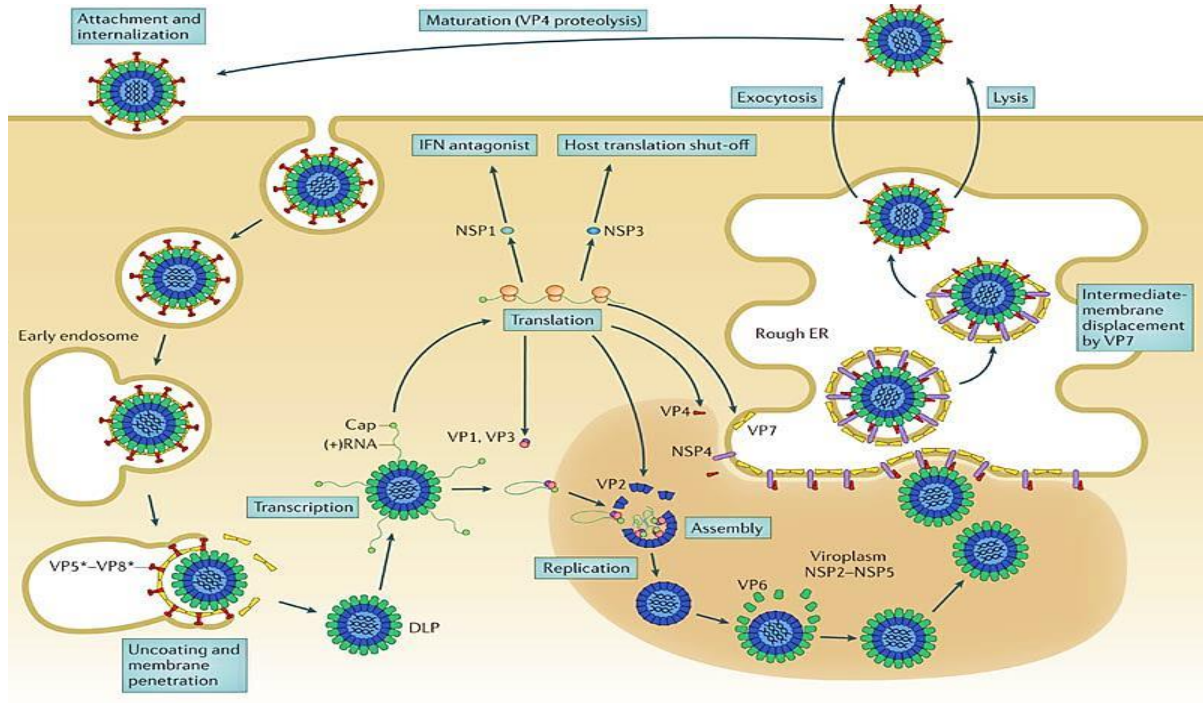


Figure 10. Représentation 3D de VP4 après clivage enzymatique. Le spicule est formé par deux sous-unités VP8* (en violet) et trois sous-unités VP5* (VP5*A, en jaune, VP5*B, en rouge et VP5*C en orange) (Figure extraite de (5)).

Les deux molécules VP8* émergent du côté distale des unités VP5*A et VP5*B, tout en projetant leurs extrémités N-terminales au niveau de la base du spicule (67). Les deux fragments VP8* correspondent au site de fixation du *Rotavirus* à son récepteur glycanne.



Nature Reviews | Microbiology

Figure 11. Cycle de réplication du *Rotavirus* (Figure extraite de (67)).

La première étape de la pénétration cellulaire du *Rotavirus* correspond à l'attachement de VP8* à son récepteur. La particule virale entière (TLP) est ensuite internalisée par endocytose (Figure 11).

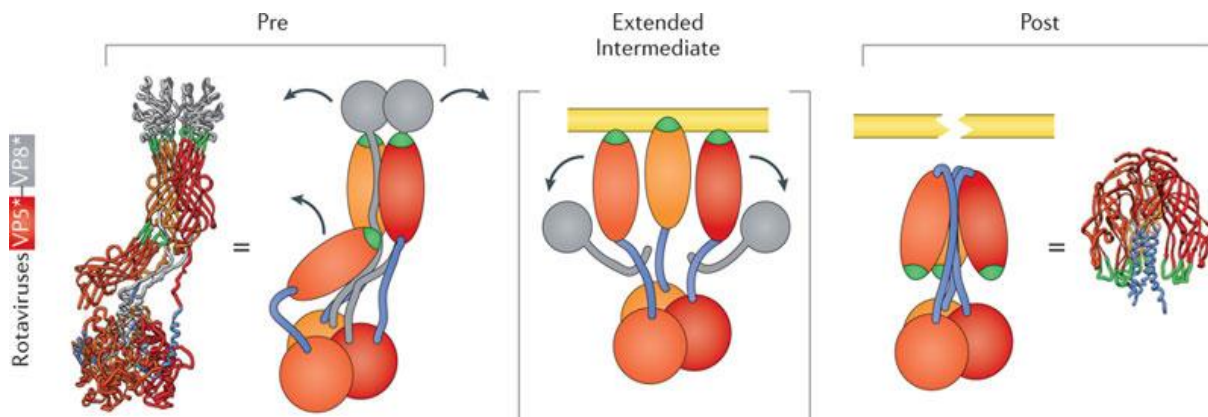


Figure 12. Réarrangements conformationnels de la spicule du *Rotavirus* durant la phase de pénétration cellulaire (Figure extraite de (67)). Les boucles hydrophobes de VP5* et la membrane endosomiale sont représentées respectivement en vert et en jaune.

La protéine VP7 stabilise le spicule VP8*-VP5* obtenu après le clivage enzymatique. La diminution de la concentration calcique endosomiale, après internalisation de la particule, va engendrer une désorganisation de VP7 et par conséquent, un réarrangement du spicule (comme présenté dans le **Figure 12, page 36**). Ce réarrangement va permettre, via les parties hydrophobes de VP5*, la libération de la *DLP* (*DLP = double layered particle*) dans le cytoplasme cellulaire.

○ ***Rotavirus* sialidase-dépendants et sialidase-indépendants ?**

La protéine VP8* de certaines souches de *Rotavirus* infectant les animaux présente un domaine galectine permettant la liaison à des molécules d'acide sialique (**68–70**). La liaison au récepteur cellulaire de ces souches est donc inhibée par l'action préalable d'une sialidase. A l'inverse, l'action de cette enzyme n'affecte en rien la fixation d'autres souches dont les souches humaines. C'est pourquoi les souches de *Rotavirus* ont été classées en deux catégories : les souches sialidase-dépendantes et les souches sialidase-indépendantes. Des études cristallographiques (**69,71**) ont confirmé l'incapacité de certaines souches humaines (Wa, génotype P[8]) à se lier à l'acide sialique. L'étude d'une souche sialidase-dépendante (CRW-8, génotype P[7], infectant le porc) a révélé une poche supplémentaire à l'intérieur d'une fente, pouvant être un site possible de liaison des souches sialidase-indépendantes à des oligosaccharides (**69**). Cette hypothèse a été confirmée par l'analyse structurale de VP8* d'une souche sialidase-indépendante, DS-1 (génotype P[4]), qui a mis également en évidence cette fente (**71**).

Une étude Australienne de 2009 a nuancé l'idée selon laquelle l'acide N-acétylneuraminique (acide sialique humain) ne jouerait aucun rôle dans la reconnaissance des souches sialidase-indépendantes (**68**). Ce travail a d'abord confirmé la différence de récepteur entre les souches Wa et CRW-8 en mesurant le pouvoir infectieux de la souche suite à un test de compétition entre la souche virale (particule virale entière) et la protéine VP8*. En effet, le pouvoir infectieux de Wa sur les cellules MA104 a été réduit de 38 % lorsque la souche était en compétition avec la protéine VP8*-Wa alors qu'il n'a pas été réduit lorsqu'elle était en compétition avec la protéine VP8*-CRW-8. D'autre part, Haselhorst et *al.* ont utilisé des gangliosides (molécule constituée d'au moins deux résidus

osidiques dont l'un est estérifié par l'acide sialique) et la spectroscopie RMN (Résonance Magnétique Nucléaire) afin d'analyser l'interaction de VP8* à son récepteur. La souche CRW-8 s'est liée au ganglioside acéramido-G_{D1a} tandis que la souche Wa s'est liée au ganglioside acéramido-G_{M1}. Ces deux gangliosides sont présentés sur la **Figure 13**.

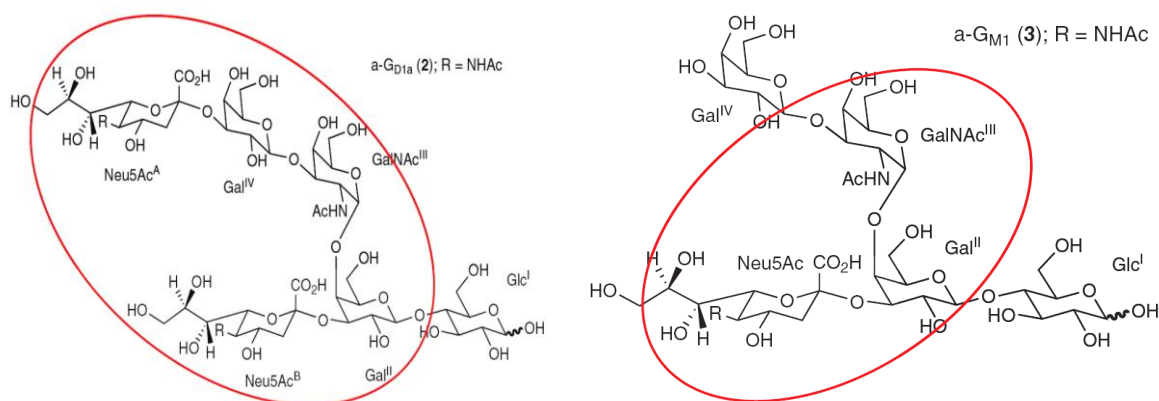


Figure 13. Structure des gangliosides utilisés dans l'étude de Haselhorst et *al.* (68).

Cette observation traduit à la fois la nécessité de l'acide N-acétylneuraminique terminale (Neu5Ac^A) pour l'interaction entre CRW-8 et son récepteur ainsi que la gène engendrée par ce dernier pour l'interaction entre Wa et son récepteur. Wa se fixe au ganglioside G_{M1} car l'accès à un acide N-acétylneuraminique interne (Neu5Ac^B) est rendu possible par l'absence d'acide N-acétylneuraminique terminale (Neu5Ac^A). Afin de confirmer cette analyse, le pourcentage de liaison cellulaire (MA104) et le pouvoir infectieux du *Rotavirus* après plusieurs tests ont été mesurés. Par exemple, l'action d'une sialidase sur les cellules MA104 a augmenté le pourcentage de liaison du *Rotavirus* Wa confirmant l'hypothèse que le retrait de l'acide N-acétylneuraminique par la sialidase révèle de nouveaux sites de liaison. Les conclusions de cette étude étaient :

- Le classement des *Rotavirus* en deux groupes (souches sialidase-dépendantes et sialidase-indépendantes) ne correspond pas à l'interaction exacte entre VP8* et son récepteur ;
- Le ganglioside G_{M1} doit faire partie du récepteur cellulaire de la souche Wa. Cette souche n'est donc pas acide sialique indépendante et aurait besoin d'un acide sialique interne pour la reconnaissance cellulaire ;

- La nécessité d'effectuer d'autres études structurales pour créer une nouvelle classification des souches de *Rotavirus*.

- **HBGA et récepteurs des *Rotavirus* humains**

Suite à ce travail, le but fut de déterminer si toutes les souches sialidase-indépendantes reconnaissent un acide sialique interne.

Une première étude s'est penchée sur la souche HAL1166, appartenant au génotype G8P[14], majoritairement retrouvée chez l'homme mais également présente chez les bovins (72). L'analyse cristallographique de VP8*P[14] a montré une fissure plus étroite que celle des VP8* d'autres souches humaines, rendant impossible la liaison au ganglioside G_{M1}. Cette fissure était de la même largeur que celle de souches animales déjà étudiées. Cependant, les autres caractéristiques de VP8*P[14] ont éliminé la possibilité d'une liaison à un acide sialique terminale. Au vu de ce double constat, la liaison de VP8*P[14] avec 511 glycanes différents a été testée. Aucun des glycanes possédant un acide sialique terminal ou interne ne s'est lié à VP8* P[14]. Par contre, l'HBGA de type A s'est lié spécifiquement à VP8* P[14]. L'inhibition du pouvoir infectieux de la souche sur les cellules HT-29 par des anticorps anti-HBGA de type A a conforté cette hypothèse. Des cellules CHO (*Chinese Hamster Ovary*) modifiées génétiquement afin d'augmenter l'expression de l'antigène A ont été plus infectées que des cellules CHO non modifiées. Ce fut la première description du lien entre HBGA et le récepteur des *Rotavirus*.

Partie de l'idée que les souches sialidase-indépendantes pouvaient peut-être reconnaître les mêmes récepteurs que les *Norovirus*, une étude américaine a prouvé que les souches de génotypes P[4] et P[8] reconnaissent les antigènes Lewis b et l'antigène H1 tandis que les souches P[6] reconnaissent seulement l'antigène H1 (73). L'importance du phénotype Lewis b dans la population caucasienne (environ 70 % des individus) pourrait expliquer pourquoi P[8] et P[4] sont des génotypes prédominants chez l'homme. Par contre, cette découverte n'explique pas le résultat de l'étude de Haselhorst et *al.* indiquant un lien entre VP8*-Wa et un acide sialique sub-terminal.

Dans un deuxième travail, cette même équipe a comparé les séquences codant pour VP8* de 71 souches de *Rotavirus*, choisissant la séquence de VP4 allant de l'acide aminé 46 à

l'acide aminé 231 (33). Cette comparaison a permis de grouper les *Rotavirus* en cinq génogroupes P (de P[I] à P[V]).

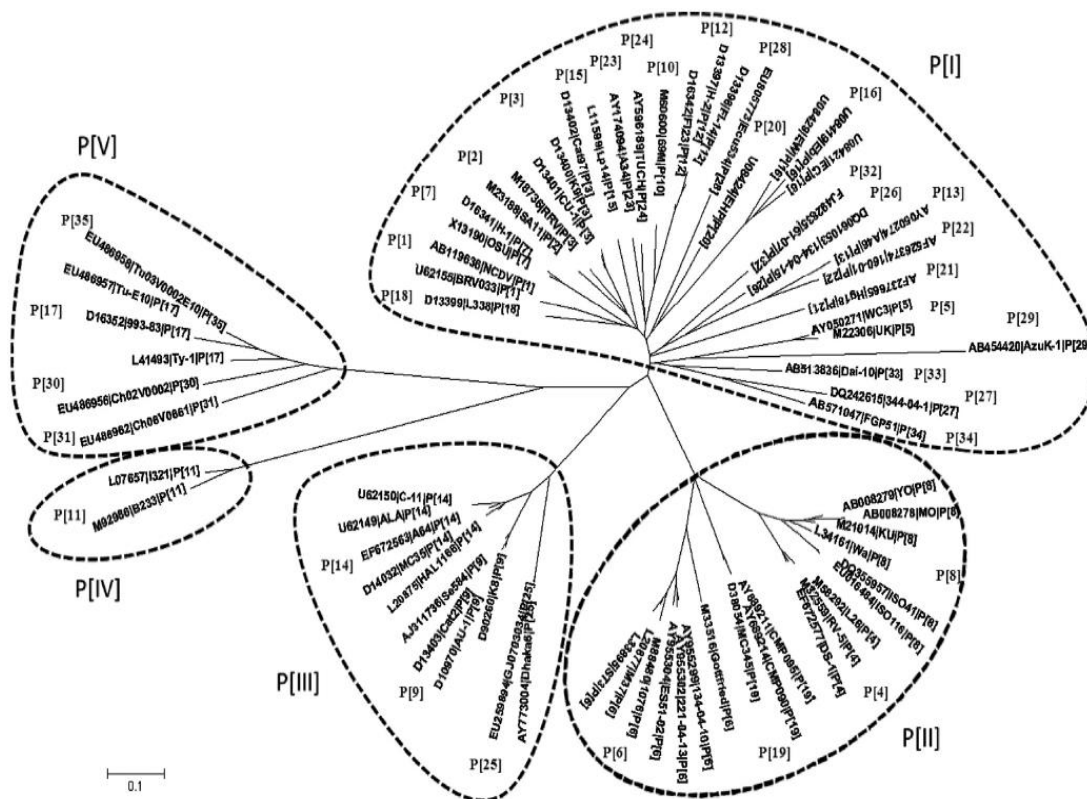


Figure 14. Arbre phylogénétique des *Rotavirus* basé sur la comparaison des séquences codant pour VP8* de plus de 71 souches virales (Figure extraite de (33)).

Le génogroupe P[II] est constitué de génotypes P infectant seulement l'homme comme P[4], P[8] et P[6] tandis que le génogroupe P[III] comprend des génotypes infectant à la fois l'homme et les animaux tels que P[14], P[9] et P[25]. Les trois autres génogroupes contiennent principalement des souches présentes dans le monde animal (Figure 14). En se penchant sur les souches du groupe P[III], Liu et *al.* ont démontré qu'elles se liaient spécifiquement à l'antigène A. La VP8* du groupe P[III] semble également se lier aux mucines bovines et porcines plaçant l'antigène A comme lien possible dans la transmission inter-espèces.

Toutes ces conclusions ont été démontrées à partir de tests réalisées *in vitro*. Il est donc nécessaire de comprendre l'impact clinique des HBGA sur le pouvoir pathogène des

souches de *Rotavirus* humaines. C'est dans ce cadre que s'inscrit notre projet ayant pour but de confirmer l'absence d'infection chez les patients ne présentant pas d'HBGA sur leurs entérocytes, c'est-à-dire les patients de phénotype non sécréteur.

Deuxième partie

MATÉRIEL & MÉTHODES

A. Matériel : préparation des échantillons

- 1. Prélèvements biologiques utilisés*
- 2. Extraction des échantillons de selles*
- 3. Vérification de la qualité des extraits par PCR albumine*

B. Outils et méthodes permettant l'étude du Rotavirus

- 1. Mise au point et réalisation de l'amplification du gène codant pour VP8* (RT-PCR)*
- 2. Séquençage du gène VP8**
- 3. Etude phylogénétique*

C. Outils et méthodes permettant l'étude du gène humain FUT2

- 1. Première méthode : amplification et séquençage du gène hFUT2*
- 2. Deuxième méthode : amplification et analyse des fragments de restriction du gène hFUT2*

D. Analyse statistique

A. Matériel : préparation des échantillons

1. Prélèvements biologiques utilisés

L'étude a été réalisée rétrospectivement sur des échantillons de selles prélevés chez des patients hospitalisés entre janvier 2011 et mars 2013 au CHU de Nantes et présentant des symptômes de gastro-entérite. Les échantillons de selles pures ont été analysés après accord du comité d'éthique médicale. Les prélèvements primaires étaient congelés à -80 °C.

Deux populations ont été définies pour l'étude :

- une population « **cas** » (population présentant une infection à *Rotavirus*). Les échantillons choisis devaient présenter un test rapide positif vis-à-vis du *Rotavirus* du groupe A (test immunochromatographique sur bandelette, Rapid Strip ROTA-ADENO®, Meridian Bioscience Europe, Villa Cortese, Italy).
- une population « **témoin** » (population ne présentant pas d'infection à *Rotavirus*). Les échantillons choisis devaient avoir un test rapide négatif vis-à-vis du *Rotavirus* du groupe A. Les échantillons présentant une infection à d'autres virus fréquemment responsables de GEA ont été écartés.

2. Extraction de l'ADN et de l'ARN des échantillons de selles

Nous avons utilisé le kit Nucleospin RNA virus® (Macherey-Nagel, Düren, Allemagne) permettant d'extraire en même temps les molécules d'ADN et d'ARN. Les extraits ont ainsi pu être utilisés à la fois pour l'étude du *Rotavirus* et pour l'étude du gène humain *FUT2*.

La première étape de l'extraction avait pour but de dégrader les protéines. Elle s'est déroulée dans un laboratoire de type 2. L'échantillon de selles décongelé a été dilué au $1/10^{\text{ème}}$ (prise d'essai d'environ 100 mg) dans du tampon TE, puis vortexé. Un volume de 150 μL de cette suspension a été mis en présence avec 600 μL de tampon de lyse (RAV1) et 20 μL de protéinase K. L'ensemble (solution S1) a été vortexé pendant 30 secondes. Cette étape a permis de lyser les cellules par rupture de leurs membranes et de dénaturer les protéines

grâce à l'action combinée d'un agent chimique, le GITC (thiocyanate de guanidine) et d'une enzyme : la protéinase K.

La deuxième étape concernait l'extraction des acides nucléiques proprement dites (dans une salle dédiée à l'extraction). La solution S1 a été incubée à 70 °C pendant 5 minutes puis centrifugée pendant 3 minutes à 5000 tours/min afin de clarifier la suspension. Le surnageant a été mis en contact avec 600 µL d'éthanol et homogénéisé par une succession d'aspiration-refoulement de la pipette. Le mélange a ensuite été déposé sur une colonne de silice permettant la fixation des acides nucléiques sur la silice. Les débris cellulaires résiduels, protéines dégradées et molécules indésirables ont été élués par une succession de lavages grâce à des tampons à base d'éthanol (RAW et RAV3). Les colonnes ont été placées à 70 °C afin d'évaporer les traces d'éthanol. Enfin, les acides nucléiques ont été élués par un tampon de basse force ionique (tampon RE, 50 µL). L'éluât a ensuite été congelé à -80 °C par aliquote d'environ 15 µL.

3. Vérification de la qualité des extraits par PCR albumine

Une PCR albumine en temps réel de type Taqman, utilisée de façon routinière au laboratoire de virologie du CHU de Nantes, a été réalisée afin de vérifier la qualité et la quantité d'ADN présent dans l'extrait de selles. Les séquences des amorces et de la sonde sont présentées dans le **Tableau 6**.

Tableau 6. Amorces et sonde utilisées pour la PCR albumine.

Nom	Séquence	Position*
Amorce sens ALBRG1	5' GCTGTCATCTCTTGTGGGCTGT 3'	16283-16304
Amorce anti-sens ALBRG2	5' AAACATCATGGGAGCTGCTGGTT 3'	16423-16402
Sonde ALBSRG	5' FAM-CCTGTCATGCCACACAAATCTCTCC-BHQ 3'	16340-16365

**position sur la séquence de référence du gène de l'albumine (Genbank accession n° M12523).*

Les extraits dont le Ct (*Cycle threshold*) était supérieur à 35 ont été exclus : au-delà de ce seuil la quantité d'ADN dans l'échantillon aurait été trop faible pour permettre l'étude du gène *FUT2*. La PCR a été réalisée à l'aide du kit TaqMan Gene Expression® (APPLERA). Un témoin positif et un témoin négatif (eau distillée) ont été inclus dans chaque série afin de valider la technique.

B. Outils et méthodes permettant l'étude du *Rotavirus*

1. Mise au point et réalisation de l'amplification du gène codant pour VP8* (RT-PCR)

En ce qui concerne l'étude du *Rotavirus*, la première étape consistait à mettre au point une RT-PCR permettant d'amplifier la séquence codant pour VP8*. Les tests réalisés pour cette mise au point ont été effectués à partir d'extraits de selles de patients ayant une recherche de *Rotavirus* positive dans leur prélèvement (détection par le test Rapid Strip ROTA-ADENO®). Ces témoins positifs ont été extraits en utilisant l'automate d'extraction I Prep Invitrogen® et le kit iPrep™ PureLink® *Virus Kit* Invitrogen®. Cette méthode d'extraction est celle utilisée au laboratoire de virologie du CHU de Nantes pour la recherche des virus entériques de type *Norovirus* et *Astrovirus* à partir d'échantillons de selles. Dans un deuxième temps, une fois la RT-PCR mise au point, les mêmes échantillons de selles ont été extraits par la technique d'extraction sur colonne (kit Nucleospin RNA virus®, **Partie A.2**) puis amplifiés. Ceci a permis de valider notre méthode d'extraction par rapport à l'étude du génome viral.

Des séquences codant pour VP8* de plusieurs souches de *Rotavirus* (appartenant à des souches des groupes [PII] et [PIII]) (**33**) ont été alignées sur le logiciel d'analyse des séquences SeqScape®. Puis, deux zones consensus et conservées entre ces différentes souches ont été sélectionnées. Les amorces spécifiques sens et anti-sens choisies avaient des tailles différentes, respectivement 22 et 25 pb (**Tableau 7**).

Tableau 7. Amorces utilisées pour la RT-PCR *Rotavirus*.

Nom	Séquence	Position*
Amorce sens	5'- <u>TG</u> TAAAACGACGGCCAGT <u>GCTCCAGT</u> NAATTGGRGWCAYG-3'	136-157
ROTA-PII-PIII-1F		
Amorce anti-sens	5'-CAGGAAACAGCTATGACCYATTTCTNGTATTYGAATTGGTGG-3'	694-670
ROTA-PII-PIII-2R		

*position sur la séquence codant pour la protéine VP4 de la souche KU, de type G1P[8] (Genbank accession n° AB222784 (**71**)). Les séquences M13F et M13R sont soulignées.

**N, R, W et Y correspondent aux noms donnés aux oligonucléotides présents au niveau de positions "dégénérées" soit N = G ou A ou T ou C ; R = G ou A ; W = A ou T ; Y = T ou C.

Ces séquences étaient « dégénérées » (constituée de plusieurs bases possibles à certaines positions) afin d'amplifier le plus grand nombre de souches de génotypes P différents. Ces dernières ont été combinées à des amorces universelles, respectivement M13F pour l'amorce sens et M13R pour l'amorce anti-sens. Cette combinaison avait pour objectifs de stabiliser l'hybridation entre les amorces et la matrice et de faciliter ultérieurement le séquençage. Grâce à l'utilisation de ces amorces, la séquence amplifiée comprenait la séquence codant pour la zone de VP8* interagissant avec le récepteur intestinal. La séquence amplifiée présentait une taille de 559 pb par rapport à la séquence de la souche KU codant pour VP4 (*Genbank accession n° AB222784*) (71). La souche KU est classée dans les souches de génotype P[8] et la taille de son gène codant pour VP4 est de 2327 pb.

Une amorce anti-sens (ROTA-PII-PIII-1R) avait également été testée dans un premier temps. Cependant les produits d'amplification étaient présents en plus faible quantité par rapport aux produits d'amplification obtenus avec la deuxième amorce anti-sens (ROTA-PII-PIII-2R) (Figure 15).

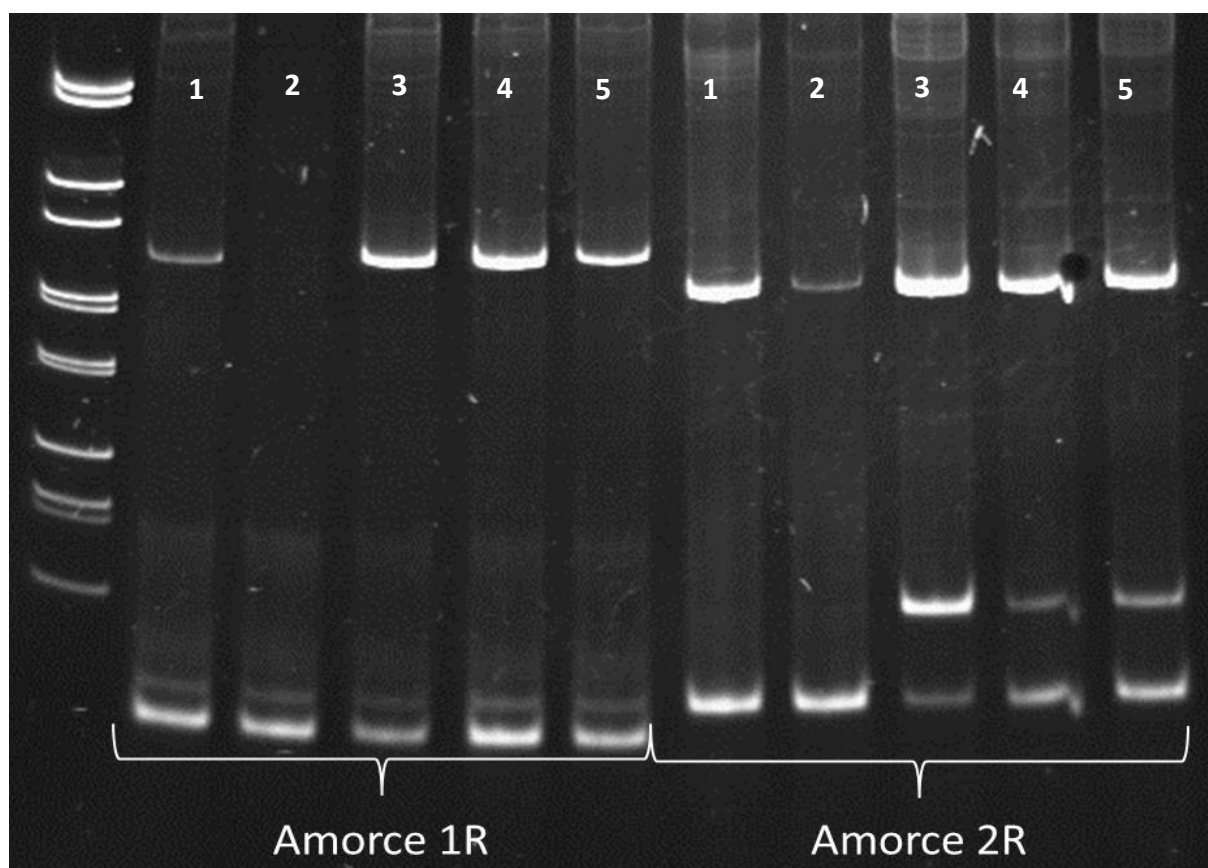


Figure 15. Photo du gel d'acrylamide réalisé afin de tester deux couples d'amorces différents (ROTA-PII-PIII-1F/ROTA-PII-PIII-1R et ROTA-PII-PIII-1F/ROTA-PII-PIII-2R). Cinq extraits différents ont été testés en parallèle pour chaque couple d'amorces (le numéro des extraits est précisé en haut du gel).

Le mélange réactionnel a été préparé extemporanément en fonction du nombre d'extraits à amplifier. La RT-PCR a été réalisée à l'aide du kit One Step PrimeScript® (TaKaRa, Japon). Un témoin négatif (eau distillée) et un témoin positif (extrait connu positif) ont été inclus dans chaque série afin de valider la technique. La préparation du mélange réactionnel a été effectuée afin d'avoir un volume final de 20 µL par tube :

- Tampon One Step Takara 2X : 10 µL ;
- 20 µM de chacune des amorces ROTA-1F et ROTA-2F : 0,8µL ;
- 2,5 U/µl de Taq polymérase (Takara Ex Taq TM HS) : 0,4 µL ;
- Rétro-transcriptase (*Reverse Transcriptase* Prime Script RT) : 0,4 µL ;
- Eau distillée stérile : 3,4 µL ;
- Extrait (préalablement chauffé à 65 °C pour dénaturer les superstructures formées sur l'ARN) : 5 µL.

La RT-PCR s'est déroulée dans un thermocycleur ThermalCycler T100® (Bio-Rad, États-Unis). Les conditions d'amplification ont été définies après plusieurs essais, notamment afin de trouver la meilleure température d'hybridation des amorces. Un gradient de température au moment de la phase d'hybridation des amorces, allant de 55°C à 65 °C (soit 55,0 ; 55,7 ; 56,9 ; 58,8 ; 61,1 ; 63,0 ; 64,3 et 65,0 °C), a été testé sur un extrait. La température de 58,8 °C s'est révélée être la température d'hybridation avec laquelle les produits de RT-PCR étaient présents en plus grande quantité. Au final, les étapes ont été réalisées comme indiqué ci-dessous :

1. 5 minutes à 42 °C (étape de retro-transcription) ;
2. 3 minutes à 94 °C (étape de destruction de la reverse-transcriptase et de dénaturation de l'ADNc) ;
3. 15 secondes à 94 °C (étape de dénaturation de l'ADN) ;
4. 30 secondes à 59 °C (étape d'hybridation des amorces) ;
5. 1 minute à 72 °C (étape d'élongation par la Taq polymérase).

Les étapes de 3 à 5 ont été répétées 45 fois. Enfin les produits de PCR ont été conservés à + 4 °C.

Après amplification, les produits de PCR ont été séparés par électrophorèse sur gel d'acrylamide-bisacrylamide 37,5-1 à 9 % à une tension de 180 Volts, et visualisés sous

rayonnement ultraviolet après passage dans un bain de bromure d'éthidium à 0,5 mg/L. Le marqueur de taille VI (Roche) a été déposé en même temps que les échantillons.

2. Séquençage de VP8*

Après avoir vérifié la présence du produit d'amplification par électrophorèse, une étape de purification a été effectuée. Un volume de 5 µL du produit de PCR a été incubé avec 1 µL de mélange enzymatique (ExoSAP-IT[®] ; SAP=*Shrimp Alkaline Phosphatase*). Ce mélange comprend une 5'-exonucléase permettant de digérer les simples brins et une 5'-phosphatase permettant d'inactiver les désoxynucléotides résiduels. L'ensemble a été placé dans le thermocycleur ThermalCycler T100[®] : 15 minutes à 37 °C (étape d'action des enzymes) puis 15 minutes à 80 °C (étape de dénaturation des enzymes).

La réaction de séquence a ensuite été effectuée en utilisant le kit Big Dye[®] Terminator version 1.1 (Applied Biosystems) suivant la technique de Sanger adaptée avec de la fluorescence. Elle permet la réaction de séquence du brin sens et du brin antisens en utilisant les amorces sens et antisens universelles M13. L'élongation de chaque brin néosynthétisé est stoppée par l'incorporation d'un ddNTP spécifique de la séquence du brin matrice. Chaque ddNTP (ddATP, ddTTP, ddCTP, ddGTP) est marqué par un fluorochrome différent dont le spectre d'émission est spécifique. Pour chaque produit d'amplification, deux réactions avec un volume final de 10 µL ont été réalisées :

- 2 µL de l'amorce sens M13F pour l'une des réactions et 2 µL de l'amorce antisens M13R pour l'autre réaction (à 1 µM) ;
- 5 µL de produit de PCR purifié dilué (selon l'intensité de la bande sur l'électrophorèse) ;
- 1 µL de mélange réactionnel BigDye contenant notamment les ddNTP fluorescents et la TAQ-polymérase ;
- 2 µL de Tampon 5X.

La réaction s'est déroulée dans un thermocycleur ThermalCycler T100®. Les étapes ont été réalisées comme indiqué ci-dessous :

1. 15 secondes à 96 °C (étape de dénaturation de l'ADN) ;
2. 5 secondes à 50 °C (étape d'hybridation de l'amorce M13F ou M13R) ;
3. 2 minutes à 60 °C (étape d'élongation par la Taq polymérase).

Les étapes de 1 à 3 ont été répétées 25 fois.

Une chromatographie d'exclusion sur colonne de Sephadex®G-50 a été réalisée sur une plaque MultiScreen® (Millipore) permettant ainsi une purification des produits de séquençage. En effet, les ddNTP libres non incorporés lors de la réaction de séquence peuvent parasiter les signaux de fluorescence spécifiques. Pour cela, les billes de G-50 sont perforées de trous d'un diamètre de 20 à 50 µm. Les petites molécules de diamètre inférieur à ceux-ci entrent et restent piégées dans ces billes. Les grosses molécules quant à elles passent autour des billes et sont éluées rapidement. Les produits de séquence purifiés ont été mis en contact de formamide (10 µL) afin de concentrer le produit et de garder les brins sous forme linéaire.

Enfin, une électrophorèse capillaire en conditions dénaturantes a été effectuée sur un automate ABI3730® (Applied Biosystem). Il a permis de séparer les produits purifiés de la réaction de séquence. Une analyse spectrale va différencier les fluorochromes et y associer la base correspondante permettant de définir la séquence nucléotidique du brin d'ADN initial. La technologie Big Dye® Terminator utilise un système de transfert d'énergie par résonance (FRET) entre deux fluorochromes reliés entre eux par un linker. Le premier est une fluorescéine appelée donneur, commun aux quatre ddNTP. Le second est une dichlororhodamine qui joue le rôle d'accepteur. Le fluorochrome donneur est excité par un rayon laser à argon émettant à 488 nm et 514,5 nm. Son énergie de fluorescence émise (515-520 nm) est captée intégralement par le fluorochrome accepteur qui est alors excité à son tour. Le fluorochrome accepteur ou dichlororhodamine est différent pour chaque type de ddNTP. Le spectre de fluorescence réémise sera ainsi spécifique de chaque type de ddNTP. L'enregistrement et l'analyse spectrale de la fluorescence spécifique du ddNTP permet alors d'assigner la base correspondante et de déterminer la séquence nucléotidique du brin matrice.

Le logiciel Seqscape[®] a permis d'analyser les séquences de nucléotides, en comparant la séquence de VP8* obtenue pour la souche de *Rotavirus* du patient à celle d'une souche de référence (AB222784). D'éventuelles substitutions ont pu ainsi être mises en évidence.

3. Etude phylogénétique

L'arbre phylogénétique a été construit grâce au logiciel MEGA, version 5, en utilisant l'algorithme de « neighbor-joining ». Les souches ont été classées selon l'analyse de da Silva et *al.* (74) qui divise le génotype P[8] en trois *clusters* (P[8]-1, P[8]-2 et P[8]-3) ainsi qu'en six sous-*clusters* au sein de P[8]-3 (P[8]-3.1, P[8]-3.2, etc...). La construction de l'arbre a été effectuée grâce aux séquences nucléotidiques des VP8* (nucléotides 193 à 671) obtenues dans notre étude ainsi que celles de 12 souches de référence utilisées dans l'étude de da Silva et *al.* (P[8]-1 : JX406750, P[8]-2 : EF672623, P[8]-3 : JQ410048, HQ738605, GQ117014, DQ498143, JN377715, DQ146652, DQ005111, FN179480, JF490368, DQ857916). La robustesse de l'arbre a été estimée par le test du bootstrap sur 1000 répliquas. Il consiste à recréer un grand nombre de jeux de données (1000) par ré-échantillonnage numérique à partir du jeu de données réel : les colonnes des alignements sont choisies au hasard pour recréer un nouvel alignement de même longueur. Un arbre phylogénétique est réalisé pour chaque jeu de données, on dénombre ensuite la proportion des arbres obtenus qui montrent une branche identique. Ce chiffre est reporté au nœud des branches.

C. Outils et méthodes permettant l'étude du gène *hFUT2*

Cette partie de l'étude a été menée par l'équipe de Dr. Le Pendu (unité 892) de l'Institut de Recherche en Santé de l'Université de Nantes. Deux techniques différentes ont été utilisées pour caractériser le phénotype sécréteur ou non sécréteur du patient. N'ayant pas réalisé moi-même cette partie, les techniques relatives à l'étude du gène *hFUT2* ne seront pas développées en détails.

Voici les définitions qui ont été utilisées :

- **Caractère sécréteur** correspondant à la présence d'un ou de deux allèles *SE* au niveau du gène *hFUT2* (individus *SE/SE* ou *SE/se*).
- **Caractère non sécréteur** correspondant à l'absence d'allèle *SE* au niveau du gène *hFUT2* (individus *se/se*).
- **L'allèle *SE*** est caractérisé par l'absence des mutations G428A et A385T sur sa séquence.

1. Première méthode : amplification et séquençage du gène humain *FUT2*

- ***Amplification du gène *FUT2* à partir d'ADN présent dans les extraits de selles***

Un fragment du gène *hFUT2* allant de la 152^{ème} pb à la 543^{ème} pb a été étudié. Deux amorces avec des séquences de taille différente ont été utilisées (**Tableau 8**).

Tableau 8. Amorces utilisées pour la PCR *hFUT2* (1ère méthode).

Nom	Séquence	Position*
Amorce sens hFut2 152F	5'-GGATGTGGACGATCAATGCAATA-3'	152-175
Amorce anti-sens hFut2 543R	5'-CGGCCGGCTCCCGTTCA-3'	543-526

*Position sur la séquence de référence du gène humain *FUT2* (Genbank accession : NG007511, position indiquée à partir du nucléotide 7020).

La PCR a été réalisée à l'aide du kit Brilliant II SYBR Green QPCR master mix® (Agilent Technologies). Un témoin positif (ADN à 2 ng/μL) a été inclus dans la série pour valider la technique. La préparation du mélange réactionnel a été effectuée afin d'avoir un volume final de 20 μL par tube :

- Master Mix SYBR green 2X : 10 μL ;
- 5 mM de chacune des amorces hFut2 152F et hFut2 543R : 0,8 μL ;
- 2 μM de ROX : 0,3 μL ;
- Extrait : 2 μL (ou contrôle : 1 μL) ;
- Eau distillée stérile qsp 20 μL.

Les conditions d'amplification, réalisées sur l'automate Mx3005P® (Agilent Technologies), ont été les suivantes :

1. 10 minutes à 95 °C (étape de dénaturation) ;
2. 30 secondes à 95 °C (étape de dénaturation) ;
3. 30 secondes à 65 °C (étape d'hybridation des amorces) ;
4. 30 secondes à 72 °C (étape d'élongation) ;
Les étapes de 2 à 4 ont été répétées 40 fois.
5. 1 minute à 95 °C (dernière étape de dénaturation avant le processus nécessaire à la courbe de fusion) ;
6. 55 °C à 95 °C (étape permettant d'obtenir la courbe de fusion afin de vérifier qu'il n'y a qu'un seul produit de PCR amplifié).

Enfin les produits de PCR ont été conservés à - 20 °C.

○ **Séquençage du gène *hFUT2* et analyse des mutations**

Avant le séquençage, une purification enzymatique des produits de PCR a été effectuée grâce au kit ExoSAP-IT® (GE Healthcare). Pour la réaction de séquence, les amorces définies dans le **Tableau 9 (page 54)** ont été utilisées. La réaction de séquence a été réalisée au niveau de la plateforme génomique Biogeneouest de Nantes, sur l'automate ABI3730® (Applied Biosystem). Les séquences ont été analysées sur le logiciel BioEdit Sequence Alignment®. Deux mutations ont été recherchées : la mutation G428A, la plus fréquente

dans la population africaine et caucasienne ainsi que la mutation A385T, la plus fréquente dans la population asiatique.

Tableau 9. Amorces utilisées pour l'étape de séquençage de *hFUT2*.

Nom	Séquence	Position*
Amorce sens hFut2 199F	5'-GAGTACGCCACACTGTACG-3'	152-175
Amorce anti-sens hFut2 543R	5'-CGGCCGGCTCCCGTTCA-3'	543-526

*Position sur la séquence de référence du gène humain *FUT2* (Genbank accession : NG007511, position indiquée à partir du nucléotide 7020).

2. Deuxième méthode : amplification et analyse des fragments de restriction du gène *hFUT2*

- ***Amplification du gène *FUT2* à partir d'ADN présent dans les extraits de selles***

A partir de chaque extrait, une amplification a été effectuée avec un couple d'amorces différent de celui utilisé pour la première méthode (**Tableau 10**), conduisant à un fragment de 195 pb.

Tableau 10. Amorces utilisées pour l'amplification du gène *hFUT2* (2ème méthode).

Nom	Séquence	Position*
Amorce sens hFut2 369F	5'-GAGGAATACCGCCACATCCCGGGGGAGTAC -3'	369-399
Amorce anti-sens hFut2 564R	5'-ATGGACCCCTACAAAGGTGCCCGGCCGGCT-3'	564-534

*Position sur la séquence de référence du gène humain *FUT2* (Genbank accession : NG007511, position indiquée à partir du nucléotide 7020).

La préparation du mélange réactionnel a été effectuée afin d'avoir un volume final de 50 µL par tube :

- 10 mM de chacun des dNTPs : 1 µL ;
- 10 µM de chacune des amorces hFut2 369F et hFut2 564R : 1 µL ;
- 50 mM de MgCl₂ : 2 µL ;
- 5 U/µL Taq polymérase Invitrogen : 0,5 µL ;

- Tampon Invitrogen 10X : 5 µL ;
- Extrait : 2 µL ;
- Eau distillée stérile qsp 50 µL.

Les conditions d'amplification, réalisées sur le thermocycleur PTC200® (MJ Research) ont été les suivantes :

1. 3 minutes à 95 °C (étape de dénaturation) ;
2. 30 secondes à 95 °C (étape de dénaturation) ;
3. 1 minute à 72 °C (étape d'hybridation des amorces et d'élongation) ;

Les étapes 2 et 3 ont été répétées 40 fois.

○ **Analyse des fragments de restriction du gène *hFUT2***

Les produits d'amplification obtenus ont été digérés par l'enzyme AVAII (site de restriction : G[^]GWCC), dont le site de restriction est supprimé par la mutation G428A. Pendant une heure et demie, les produits suivants ont été incubés à 37 °C :

- 20 µL de produits de PCR ;
- 2 µL de tampon NEB (N-ethylbuphedrone) n°4 ;
- 2 µL d'enzyme AVAII (BioLabs®).

Puis, les produits de PCR après digestion ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose 2 %, réalisée à 100 V dans un tampon de migration TAE1X (Tris, Acétate, EDTA).

Chaque migration a été interprétée de la façon suivante :

- Présence d'un seul fragment de 195 pb, synonyme d'un génotype *se/se* (phénotype non sécréteur) ;
- Présence de deux fragments de 58 et 137 pb, synonymes d'un génotype *SE/SE* (phénotype sécréteur) ;
- Présence de trois fragments de 58, 137 et 195 pb, synonymes d'un génotype *SE/se* (phénotype sécréteur).

D. Analyse statistique

La distribution des génotypes du gène *FUT2* ainsi que la proportion de phénotype non sécréteur entre la population « cas » et la population « témoin » ont été comparées en utilisant le test exact de Fischer. La différence a été jugée significative si la valeur de la *p-value* était inférieure à 0,05.

E. Annexes

1. Séquence du gène *hFUT2*

(Genbank accession : NG007511, du nucléotide 7020 au nucléotide 8018)

5'ATGGCCCACTTCATCCTCTTTGTCTTTACGGTTTCCAATATATTTACGTTTACGAGCGGCTAGCGAAGATT
CAAGCCATGTGGGAGTTACCGGTGCAGATACCAGTGCTAGCCTCAACATCAAAGGCACTGGGACCCAGCC
AGCTCAGGGGGATGTGGACGATCAATGCAATAGGCCGCCTGGGGAACCAGATGGGCGAGTACGCCACAC
TGTACGCCCTGGCCAAGATGAACGGGCGGCCGCCTTCATCCCGGCCAGATGCACAGCACCTGGCCCCC
ATCTTCAGAATCACCTGCCGGTGTGCACAGCGCCACGGCCAGCAGGATCCCCTGGCAGAACTACCACCT
GAACGACTGGATGGAGG**GAGGAATACCGCCACaTCCCGGGGGAGTACGTCCGCTTACCGGCTACCCCTGC**
TCCTgGACCTTCTACCACCACCTCCGCCAGGAGATCCTCCAGGAGTTCACCCTGCACGACCACGTGCGGGA
GGAGGCCCAGAAGTTCCTGCGGGGCCTGCAGGTGAACGGGAGCCGGCCGGGCACCTTTGTAGGGGTCC
ATGTTCCGCCGAGGGGACTATGTCCATGTCATGCCAAAAGTGTGGAAGGGGGTGGTGGCCGACCGGCGAT
ACCTACAGCAGGCCCTGGACTGGTTCGAGCTCGCTACAGCTCCCTCATCTTCGTGGTCACCAGTAATGGC
ATGGCCTGGTGTGCGGAGAACATTGACACCTCCACGGTGATGTGGTGTGTTGCTGGCGATGGCATTGAGG
GCTCACCTGCCAAAGATTTTGCTCTACTCACACAGTGTAACCACACCATCATGACCATTGGGACGTTCCGGGA
TCTGGGCCGCATACCTCACGGGCGGAGACACCATCTACCTGGCCAATTACACCTCCCCGACTCCCCTTTCC
TCAAAATCTTTAAGCCAGAGGCAGCCTTCTGCCGGAGTGGACAGGGATTGCCGCAGACCTGTCCCCCTTA
CTC AAGCACTAA3'

En caractère gras : amplicon après utilisation des amorces 369F et 564R

En caractère minuscule : position des mutations A385T et G428A

En caractère surligné : site de restriction de l'enzyme AVaII

2. Numéros attribués aux séquences codant pour VP8* des souches de Rotavirus isolées durant l'étude et déposées dans GenBank

Les séquences codant pour VP8* des souches isolées durant l'étude ont été incrémentées dans GenBank du numéro KF727632 au numéro KF727686.

Voici un exemple d'une des séquences amplifiées déposée dans GenBank (*Genbank accession n° KF727632*) :

```
1 ttagatggtc cttatcaacc tactacattt acaccaccta ctgattattg gatacttatt
61 acctcaaata caaatggagt agtatacgag agtacaata atagtgactt ttggactgca
121 gtcattgctg ttgaaccgca cgtcaatcca gtagatagac aatatagtgt atttggtgaa
181 aataaacaat ttaatgtaag aaatgattca gataaatgga agtttttaga aatgtttaga
241 ggcagtagtc aaaatgactt ttataatagg cgtacactaa cttctgatac tagactcgtg
301 ggaatattaa aatatggtgg aagagtatgg acatttcatg gtgaaacacc gagggctacc
361 actgatagtt caaacactgc aaatttgac ggtatatcaa ttacaattca ttcagaattt
421 tatattattc caaggtccca agagtctaag tgtaatgaat atattaacaa cggctctgcc
```


Troisième partie

RÉSULTATS

A. Populations étudiées

1. *Sélection des échantillons : population « cas » et population « témoin »*
2. *Caractéristiques des deux populations*

B. Répartition des souches de Rotavirus isolées

1. *Résultats de la RT-PCR Rotavirus dans les deux populations étudiées*
2. *Phylogénie des souches de Rotavirus isolées dans la population « cas »*

C. Polymorphisme du gène FUT2

1. *Population « cas »*
2. *Population « témoin »*
3. *Comparaison des deux populations*

D. Etude d'une épidémie dans le service de Néphrologie du CHU de Nantes

A. Populations étudiées

1. Sélection des échantillons : population « cas » et population « témoin »

Dans un premier temps, via la base de données du laboratoire de virologie, 94 échantillons présentant une recherche positive vis-à-vis du *Rotavirus* (test rapide) ont été sélectionnés. Au final, 51 échantillons ont été inclus. Les 46 autres prélèvements ont été exclus car ils présentaient :

- une trop faible quantité d'ADN humain dans l'extrait de selles (n = 32) ;
- ou une absence de détection du gène *FUT2* (n = 5) ;
- ou une absence de détection de l'ARN du *Rotavirus* (n = 5) ;
- ou une détection d'un *Rotavirus* de type P[3] (proche d'un *Rotavirus* de type canin) (n = 1). Ce patient était immunodéprimé.

Dans un deuxième temps, une population « témoin » a été étudiée. Des échantillons de selles avec un test immunochromatographique négatif vis-à-vis du *Rotavirus* du groupe A ont été choisis. L'absence de *Rotavirus* a été vérifiée par une seconde technique (PCR *Rotavirus*, méthode détaillée dans **Matériel et Méthodes B.1**). A partir des 130 échantillons sélectionnés, 43 échantillons ont pu être évalués. Les autres échantillons ont été exclus car ils présentaient une quantité d'ADN non suffisante dans l'extrait de selles (PCR albumine et/ou PCR *hFUT2* faiblement positive ou négative).

Pour l'ensemble des échantillons inclus dans l'étude (groupe « cas » et groupe « témoin »), la recherche des autres étiologies virales (*Adénovirus* par test immunochromatographique sur bandelette ainsi que *Norovirus* et *Astrovirus* par PCR) était négative.

2. Caractéristiques des deux populations

Dans la mesure du possible, la population « témoin » a été sélectionnée de façon à être proche, en termes d'âge, de service d'hospitalisation et de date de prélèvement, de la population « cas ».

Les échantillons de selles ont été prélevés sur des patients hospitalisés dans différents services du CHU de Nantes durant les hivers 2010-11 (n = 13 pour la population « cas » *versus* n = 18 pour la population « témoin »), 2011-12 (n = 29 pour la population « cas » *versus* n = 14 pour la population « témoin ») et 2012-13 (n = 9 pour la population « cas » *versus* n = 11 pour la population « témoin »).

Le **Tableau 11** représente la répartition de la population « cas » et de la population « témoin » en fonction du service d'hospitalisation des patients.

Tableau 11. Répartition de la population « cas » et de la population « témoin » en fonction du service d'hospitalisation.

Service d'hospitalisation	Population « Cas »	Population « Témoin »
	Patients avec une infection à <i>Rotavirus A</i> (n = 51)	Patients sans infection à <i>Rotavirus A</i> (n = 43)
Unité d'hospitalisation pédiatrique de courte durée	16	6
Clinique médicale pédiatrique médecine	14	13
Urgences pédiatriques	8	10
Service de chirurgie viscérale pédiatrique	5	3
Service de réanimation pédiatrique et néonatalogique (+ soins intensifs)	3	4
Service pédiatrique des brûlés	1	1
Service d'oncologie pédiatrique (HDJ)	1	0
Clinique médicale pédiatrique cardiologie	1	4
Service de maladies infectieuses et tropicales	1	0
Service de néphrologie	1	1
Service d'hématologie adulte (HDJ)	0	1

Le **Tableau 12** résume la répartition des deux populations par tranche d'âge. Les moyennes d'âge étaient identiques entre les deux populations, soit 3 ans et 7 mois.

Tableau 12. Répartition de la population « cas » et de la population « témoin » par tranche d'âge.

Tranche d'âge	<u>Population « Cas »</u>	<u>Population « Témoin »</u>
	Patients avec une infection à <i>Rotavirus A</i> (n = 51)	Patients sans infection à <i>Rotavirus A</i> (n = 43)
âge < 6 mois	15	27
6 mois ≤ âge < 1 an	15	3
1 an ≤ âge < 2 ans	15	4
2 ans ≤ âge < 18 ans	4	7
âge ≥ 18 ans	2	2

L'âge médian de la population « cas » était d'environ huit mois tandis que l'âge médian de la population « témoin » était d'environ quatre mois. Environ 60 % de la population « cas » avait entre six mois et deux ans, tranche d'âge cible du *Rotavirus*. Les nourrissons de moins de six mois représentaient environ 30 % de la population « cas ». Dans la population infectée, cinq patients étaient âgés de plus de cinq ans dont deux de plus de 18 ans. Les deux adultes présentaient un terrain d'immunodépression sévère : une infection à VIH-1 depuis plus de vingt ans pour l'un et une transplantation rénale depuis moins de trois mois pour l'autre. Les trois enfants âgés respectivement de 7, 8 et 10 ans ne présentaient aucun terrain particulier.

B. Répartition des souches de *Rotavirus* isolées

1. Résultats de la RT-PCR *Rotavirus* dans les deux populations étudiées

○ Population « témoin »

La RT-PCR *Rotavirus* était négative pour l'ensemble des échantillons de la population « témoin ». Chaque série a été validée par un témoin positif.

○ Population « cas »

Sur les 57 échantillons testés de la population « cas » par RT-PCR *Rotavirus*, 52 présentaient une recherche positive. L'absence d'inhibiteur pour les cinq extraits négatifs a été vérifiée par analyse de l'extrait dilué.

2. Phylogénie des souches de *Rotavirus* isolées dans la population « cas »

Toutes les souches analysées appartenaient au génotype P[8], exceptée une souche de génotype P[3] (génotype canin). Le patient infecté par la souche P[3], immunodéprimé par une greffe de moelle osseuse, a été exclu de l'étude. Les séquences codant pour VP8* des souches de *Rotavirus* étudiées ont été déposées dans GenBank (**Annexe 2 (page 59)**). L'arbre phylogénétique, présenté sur la **Figure 16 (page 65)**, a révélé que toutes les souches, exceptée une dont la séquence était incomplète, appartenaient au *cluster* P[8]-3 et que la majorité d'entre-elles (n = 37) étaient associées au sous-*cluster* P[8]-3.6. Cinq souches appartenaient au sous-*cluster* P[8]-3.3 et 8 souches n'ont pas pu être affiliées à un sous-*cluster* en particulier.

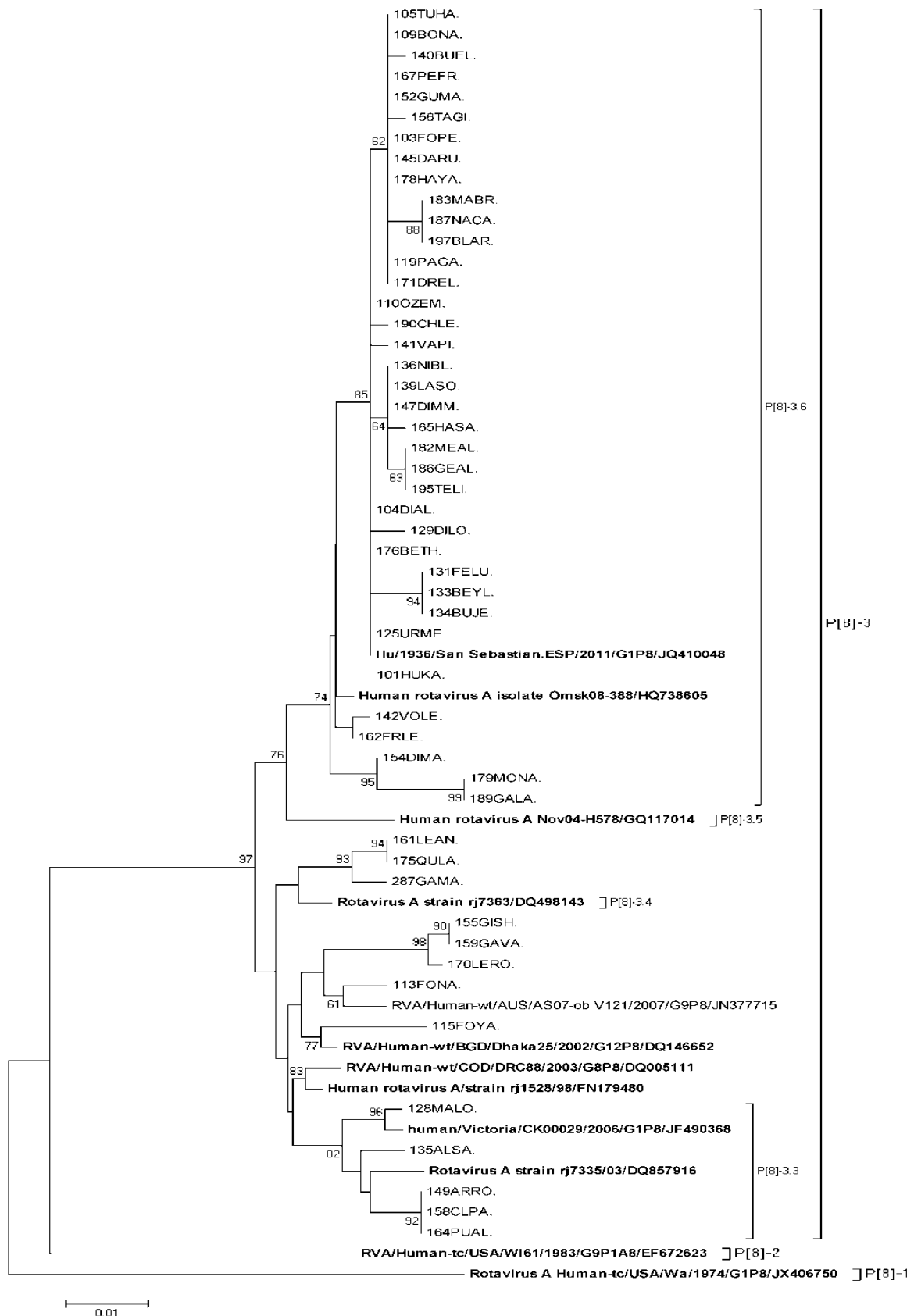


Figure 16. Arbre phylogénétique des souches de *Rotavirus* isolées des échantillons de selles de la population « cas ». La dénomination des souches de l'étude est formée de trois chiffres suivis de quatre lettres (ex : 135ALSA). Les souches inscrites en gras sont les 12 souches de référence de l'étude de da Silva et al. (74) ayant servi à construire l'arbre.

C. Polymorphisme du gène *hFUT2*

1. Population « cas »

L'ensemble des 51 patients de la population « cas » présentaient un phénotype sécréteur. Le génotype *SE/SE* et le génotype *SE/se* représentaient respectivement 35 % et 65 % des patients (Figure 17). Les allèles *se* retrouvés étaient porteurs de la mutation G428A.

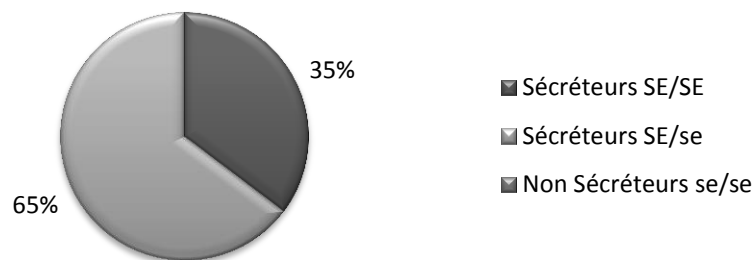


Figure 17. Distribution des génotypes du gène *hFUT2* dans la population présentant une infection à *Rotavirus* (population « cas », n = 51).

2. Population « témoin »

14 % de la population « témoin » présentait un phénotype non sécréteur (génotype *se/se*). Les allèles *se* retrouvés étaient porteurs de la mutation G428A. Le génotype *SE/SE* et le génotype *SE/se* représentaient respectivement 26 % et 60 % des patients de la population témoin (Figure 18).

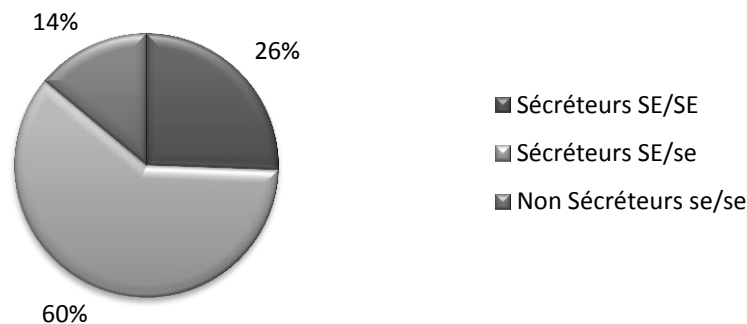


Figure 18. Distribution des génotypes du gène *hFUT2* dans la population ne présentant pas d'infection à *Rotavirus* (population « témoin », n = 43).

Dans une seconde étude réalisée par l'équipe du Dr Le Pendu (*Institutional review board study* N ° BRD02/2-P), la salive de 95 adultes sains a été collectée. Le phénotype non sécréteur représentait 19 % de la population étudiée. Le phénotype sécréteur se divisait en génotype *SE/SE* (22 %) et en génotype *SE/se* (59 %).

3. Comparaison des deux populations

La distribution des génotypes des différentes populations est présentée dans le **Tableau 13**. Le phénotype non sécréteur représentait 14 % de la population « témoin » et 0 % de la population « cas ». Cette différence était significative selon le test exact de Fischer (p value = 0,007) indiquant une probable résistance génétique de ces individus à une infection à *Rotavirus* de génotype P[8]. La comparaison des phénotypes entre notre population cas et les 95 individus sains a confirmé ce constat (p value = 0,0003). La distribution des génotypes entre les groupes contrôles (la population « témoin » et la population de 95 adultes sains respectivement) et le groupe « cas » était également significativement différente (p -value < 0,0007 et p -value = 0.016).

Tableau 13. Distribution des génotypes de *FUT2* dans la population cas, la population témoin et dans la population constituée de 95 adultes sains.

	<i>SE/SE</i>	<i>SE/se</i> ⁴²⁸	<i>se</i> ⁴²⁸ / <i>se</i> ⁴²⁸
Population « Cas » (n = 51)	18 (35 %)	33 (65 %)	0 (0 %)
Population « Témoin » (n = 43)	11 (26 %)	26 (60 %)	6 (14 %)
Population « individus sains » (n = 95)	21 (22 %)	56 (59 %)	18 (19 %)

D. Étude d'une épidémie dans le service de Néphrologie du CHU de Nantes

La mise au point de la RT-PCR et du séquençage du gène codant pour VP8* peut également permettre de réaliser une analyse épidémiologique en cas d'épidémies dans certains services du CHU, notamment dans les services accueillant des patients immunodéprimés.

Au cours des mois de mars et d'avril 2013, six patients (nommés de X1 à X6) ont présenté des épisodes de diarrhées à *Rotavirus* au sein du service de Néphrologie du CHU de Nantes. Une comparaison des différentes souches de *Rotavirus* isolées au cours de cette période a alors été effectuée. L'objectif était de déterminer si une ou plusieurs souches circulaient au sein du service et, si possible, d'identifier la source de contamination. Pour cela, l'ARN des échantillons de selles de ces six patients, dont la recherche de *Rotavirus* par bandelette était positive, a été extrait. Puis, le gène codant pour VP8* a été amplifié et séquencé selon les mêmes techniques que celles développées dans la partie Matériel et Méthodes. Les caractéristiques de chaque cas (numéro de chambre, période d'hospitalisation, date du prélèvement de selles, génotype P de la souche isolée) sont résumées dans la **Figure 19 (page 70)**.

L'analyse phylogénétique (**Figure 20, page 71**) a mis en évidence la circulation de trois souches différentes pendant ces deux mois :

- Une souche de génotype P[4] retrouvée dans les échantillons de selles des patients X1, X2, X3 et X4. Les séquences de VP8* étaient strictement identiques entre-elles confirmant la transmission probable de cette souche entre ces quatre patients. Deux patients (X1 et X4) ont été hospitalisés dans la même chambre (chambre 41) et les deux autres patients (X2 et X3) étaient hospitalisés respectivement dans les chambres 58 et 56.
- Une souche de génotype P[8]** présente chez un seul patient (X6).
- Une souche de génotype P[8]* isolée chez deux patients différents (X3 et X5) à quelques jours d'intervalle. Ces patients étaient hospitalisés respectivement dans les chambres 56 et 57.

Le patient X3 était donc co-infecté par deux souches de *Rotavirus* différentes de génotypes P[8] et P[4]. Pour quatre patients (X2, X3, X4 et X5), l'infection était de type nosocomial. Les chambres 56, 57 et 58 étaient côte à côte, tandis que la chambre 41 se situait face à ces dernières. Ces quatre chambres étaient donc relativement proches. Le même personnel soignant s'occupait des chambres 41, 57 et 58 alors qu'il était différent pour la chambre 56.

Sur l'ensemble de ces arguments, les conclusions ont été :

- L'infection du patient X6 est un cas sporadique. Le patient a été hospitalisé dans ce service dans le cadre d'une déshydratation aiguë induite par une diarrhée ;
- La souche P[4] a sans doute été apportée dans le service par le patient X1 (hospitalisation pour déshydratation induite par une diarrhée) puis diffusée, probablement de façon manuportée, aux autres chambres ;
- La souche de génotype P[8]* a été transmise du patient X5 au patient X3. Par contre, l'origine de la contamination du patient X5 n'a pas été mise en évidence.

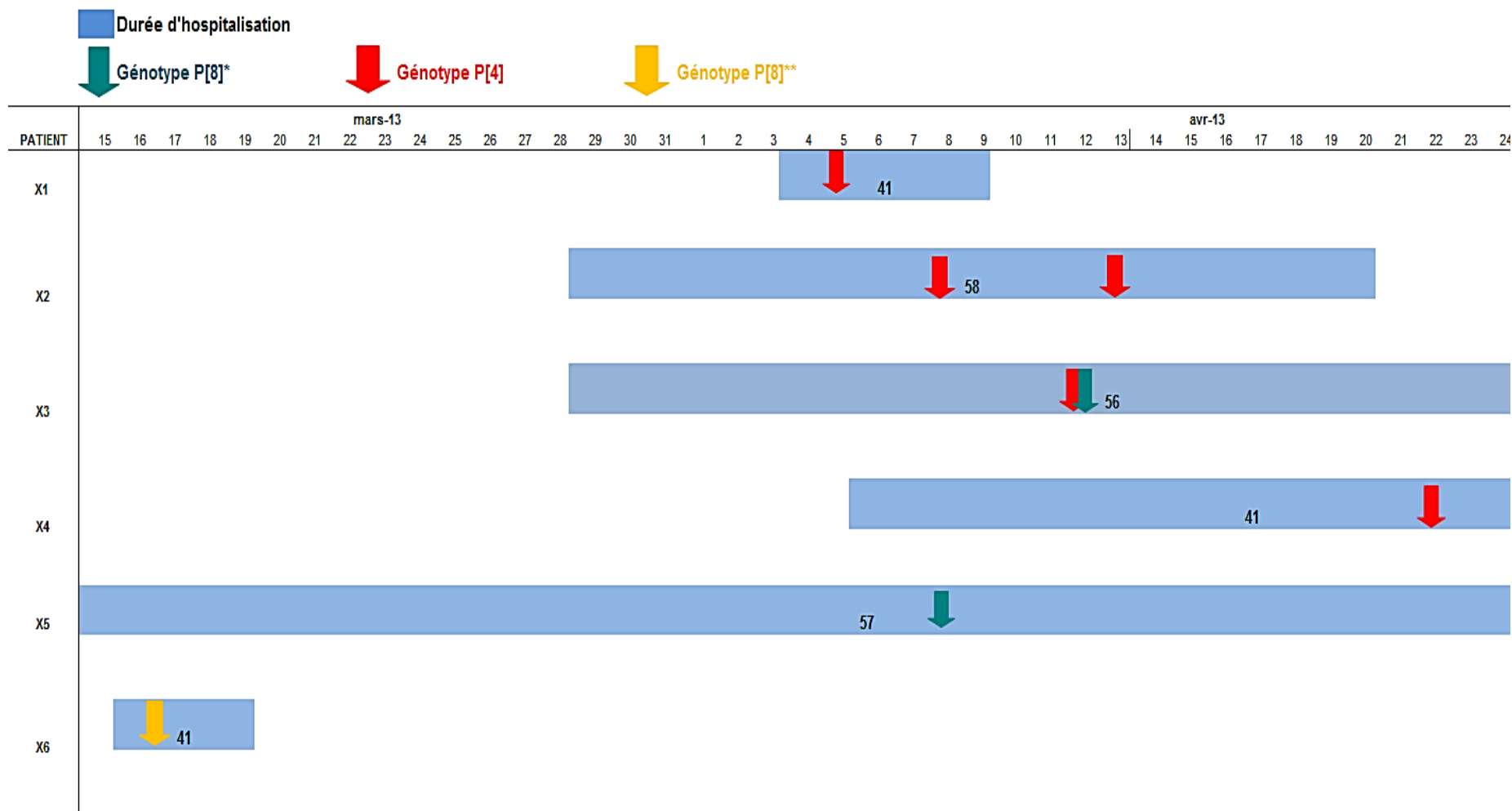


Figure 19. Tableau synoptique des cas de GERV hospitalisés dans le service de Néphrologie du CHU de Nantes entre mars 2013 et avril 2013. Les numéros de chambre sont indiqués en noir sur les zones bleues. Les flèches vertes, rouges et jaunes (selon le génotype) correspondent à la date du prélèvement de selles dans lequel la souche de *Rotavirus* a été isolée.

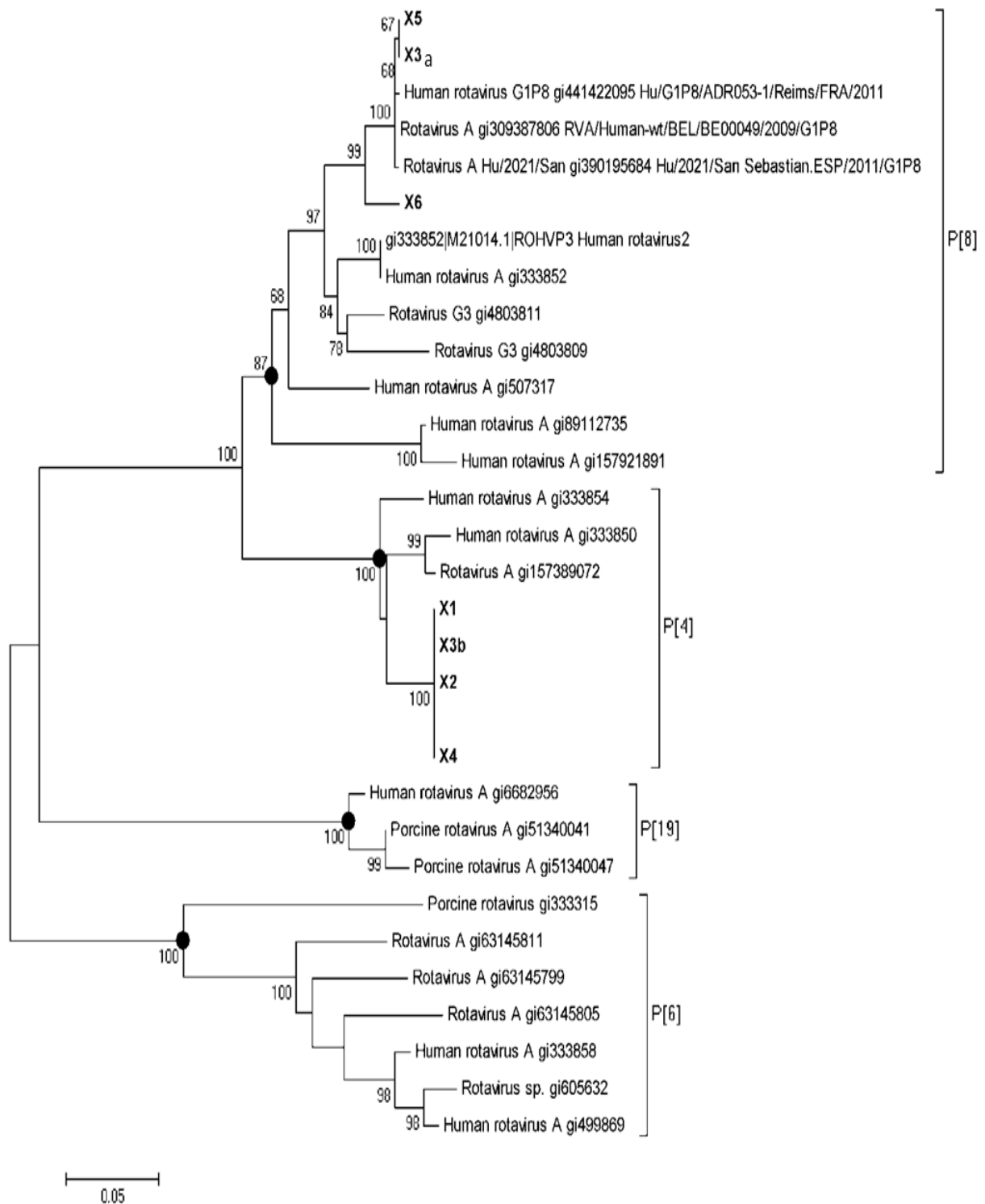


Figure 20. Arbre phylogénétique des souches de *Rotavirus* isolées des échantillons de selles des patients (identifiés de X1 à X6) hospitalisés dans le service de Néphrologie du CHU de Nantes entre mars 2013 et avril 2013. Lorsque deux souches différentes ont été isolées dans les selles d'un même patient, le nom du patient est suivi de la lettre a pour l'une des souches et de la lettre b pour l'autre souche.

DISCUSSION et PERSPECTIVES

Le *Rotavirus A* est la première cause mondiale de GEA sévères dans la population infantile de moins de cinq ans. Le poids médico-économique des GERV est considérable avec une incidence annuelle d'environ 100 millions de cas et d'environ 450 000 décès. La fixation du *Rotavirus* à son récepteur est réalisée par la protéine de capsid externe, VP4, et plus précisément par le sous-domaine VP8*. L'attachement de certains génotypes présents chez l'animal à un acide sialique terminal a été la première interaction à avoir été décrite pour ce virus. L'interaction de la protéine VP8* des souches humaines aux antigènes tissulaires de groupes sanguins (HBGA) n'a été mise en évidence que très récemment, sur la base de tests réalisés *in vitro*. Les HBGA sont des carbohydrates fixés à l'extrémité terminale d'une chaîne glycanique, elle-même présente à la surface des muqueuses. Le génotype P[8], principal génotype mondial, reconnaît les antigènes H1 et Le^b *in vitro*. En suivant l'hypothèse que les antigènes H1 et Le^b sont les récepteurs intestinaux des souches de génotype P[8], alors les individus n'exprimant pas ces antigènes sur leur muqueuse devraient être résistants à l'infection par ces mêmes souches. L'absence d' α -1,2-fucosyltransférase, enzyme codée par le gène *FUT2*, interdit la synthèse des antigènes tissulaires Le^b, H1, A et B à l'origine d'un phénotype appelé non sécréteur. L'objectif de notre travail a été de montrer que les individus non sécréteurs sont résistants à l'infection par les *Rotavirus* de génotype P[8], en utilisant des échantillons de selles prélevés dans le cadre de signes de GEA chez des patients hospitalisés ou consultant au service des urgences.

La population a été sélectionnée de façon rétrospective à l'aide de la base de données du laboratoire de Virologie du CHU de Nantes. Des échantillons de selles positifs pour la recherche de *Rotavirus A* ont été sélectionnés afin de constituer une population appelée « cas ». En parallèle, une population « témoin » a été formée avec des échantillons de selles pour lesquels la recherche des principaux virus entériques était négative. Les effectifs des deux populations étaient relativement restreints : 51 patients pour la population « cas » et 43 patients pour la population « témoin ». 60 % de la population « cas » se situait dans la tranche d'âge cible du virus (six mois à deux ans) et 30 % dans la

tranche d'âge des moins de six mois. Ces résultats sont proches de ceux observés dans une étude de 521 cas de GERV hospitalisés ou pris en charge aux urgences en France (31). Dans cette étude, 20 % des cas avaient moins de six mois et 70 % avaient entre six mois et deux ans. La plupart des prélèvements de notre étude ont été réalisés dans des services d'hospitalisation (plus de 80 % des cas) et non dans le service des urgences pédiatriques tandis que, dans l'étude Parez et al. (31), les GERV prises en charge aux urgences sans hospitalisation représentaient 38 % des cas. En réalité, un prélèvement de selles n'est pas réalisé de façon systématique lorsqu'un enfant est pris en charge dans le service des urgences pour des symptômes de GEA. A l'inverse, dans l'étude citée précédemment, l'ensemble des patients avec des signes de GEA ont eu systématiquement un prélèvement de selles à la recherche de *Rotavirus*.

Afin de s'assurer de la positivité et de la négativité des échantillons de selles ainsi que pour déterminer le génotype des souches de *Rotavirus* isolées au cours de notre étude, une technique d'extraction mixte ARN/ADN puis une méthode d'amplification et de séquençage du gène codant pour VP8* ont été mises au point. La technique d'extraction choisie s'est révélée être le principal obstacle rencontré durant ce travail. En effet, la quantité d'ADN génomique servant à étudier le gène *FUT2* du patient était très faible dans de nombreux extraits. C'est pourquoi, une partie des échantillons ont été exclus de l'étude notamment dans la population ne présentant pas d'infection à *Rotavirus* (67 % des échantillons de la population non infectée ont été exclus versus 39 % dans la population infectée). Une des explications possibles serait que la lyse des entérocytes lors d'une infection à *Rotavirus* augmente la présence d'ADN humain dans les selles. Cependant, aucun autre kit d'extraction n'a été testé parallèlement. Avant d'étudier le gène *FUT2*, une PCR très sensible amplifiant le gène humain de l'albumine a été effectuée en première intention afin de vérifier que la quantité d'ADN dans les extraits était suffisante. C'est pourquoi, les effectifs finaux des populations « cas » et « témoin » ont été inférieurs à ceux escomptés au début de l'étude. De plus, un des objectifs initiaux de l'étude était également de déterminer le groupe sanguin ABO du patient en utilisant l'ADN extrait à partir des échantillons de selles, mais la quantité et la qualité de l'ADN extrait n'ont pas rendu possible la réalisation de cette PCR (essai sur environ 10 échantillons aboutissant à des résultats non concluants). A l'inverse, l'extraction de l'ARN viral n'a pas posé de problème particulier. En effet, lors d'une infection à *Rotavirus*,

le nombre de particules virales (et donc d'ARN) par gramme de selles est très important. De même, aucun problème particulier n'a été rencontré lors des mises au point de la RT-PCR et du séquençage de la région VP8*. Les amorces universelles sélectionnées ont permis une bonne amplification de la séquence voulue dès les premiers essais. Une des deux amorces anti-sens construites a montré une supériorité en termes de rendement d'amplification. La température optimale d'hybridation des amorces a été déterminée facilement avec une nette augmentation de la quantité d'amplicons pour une température d'hybridation fixée à 59 °C. La négativité de la RT-PCR-VP8* pour cinq échantillons, dont le test immunochromatographique sur bandelette était positif, pourrait être expliquée par les caractéristiques du test Rapid Strip ROTA-ADENO® et non par un manque de sensibilité de la RT-PCR. En effet, selon la fiche technique de ce test diagnostique, la valeur prédictive positive de ce test est de 85,7 %, c'est-à-dire que sur 100 échantillons rendus positifs environ 14 tests sont faussement positifs. Les génotypes P isolés dans notre étude étaient tous des génotypes de type P[8], et plus précisément des sous-génotypes P[8]-3 (excepté un). En France, entre 2006 et 2009, le taux moyen d'infections à *Rotavirus* de génotype P[8] était de 92,9 % ce qui est cohérent avec nos résultats (8). Dans notre étude, aucune évolution particulière n'a pu être mise en évidence pendant ces trois années de suivi, excepté que toutes les souches isolées en 2013 appartenaient au sous-cluster P[8]-3.6 (n = 9). L'absence d'affiliation de certaines souches (n = 8) est probablement liée au fait que les sous-clusters ont été définis sur des séquences de souches isolées entre 1986 et 2011 au Brésil. Ces dernières ne sont donc pas forcément représentatives des souches circulant en France depuis 2010. Par exemple, le sous-cluster P[8]-3.2 est constitué de souches isolées au Brésil dans les années 1980-1990. La découverte d'autres génotypes comme P[3] et P[4] (ce dernier a été isolé dans l'étude réalisée dans le service de Néphrologie) a permis de s'assurer de l'absence de sélectivité de nos amorces pour le génotype P[8]. Le *Rotavirus* de type P[3] est rarement isolé chez l'homme et fait partie des souches sialidase dépendantes infectant principalement les canidés. L'isolement de ce type de génotype est rare lors d'une GERV chez l'enfant (1 cas sur 1947 souches isolées selon l'étude réalisée en France par De Rougemont et al. entre 2006 et 2009). Seule une immunodépression importante, comme celle présentée par le patient de l'étude (greffé de moelle osseuse), semble faciliter la pathogénicité de cette souche chez l'homme. Concernant l'étude du gène humain *FUT2*, certains résultats d'échantillons se sont révélés délicats à interpréter. Par exemple, pour certains échantillons le séquençage était douteux et la méthode par analyse des fragments

de restriction était ininterprétable. Ces échantillons ont donc été ré-analysés, ce qui a permis dans la majorité des cas, sur la base du profil des fragments de restriction le plus souvent, de conclure sur le phénotype du patient (non sécréteur, sécréteur ou sécréteur partiel).

Les conclusions de notre travail sont en accord avec les résultats des études déjà réalisées *in vitro* (33,72,73). En effet aucun phénotype non sécréteur n'a été identifié dans la population des 51 individus présentant une infection à *Rotavirus* de génotype P[8] alors que dans la population « témoin », le phénotype non sécréteur était représenté à hauteur de 14 %. Ces données sont statistiquement significatives et montrent que les « faibles » effectifs analysés sont néanmoins suffisants. La présence d'un gène *FUT2* fonctionnel est donc nécessaire à l'infection car son rôle est essentiel à la synthèse de certains HBGA sur la muqueuse digestive. Cette étude est la première à mettre en évidence cliniquement une susceptibilité génétique aux rotaviroses. Environ trois mois après la publication de notre article (75), un travail réalisé au Vietnam par Nguyen et *al.* est venu conforter nos résultats (76). Entre septembre 2011 et septembre 2012, 260 enfants hospitalisés pour une diarrhée ont été inclus dans cette étude. Les phénotypes étaient répartis de la façon suivante : 12 % de phénotype non sécréteur (Le^{a-b-}), 61 % de phénotype sécréteur (Le^{a-b+}) et 27 % de phénotype sécréteur partiel (Le^{a+b+}). Sur ces 260 enfants, 85 enfants avaient une recherche de *Rotavirus* positive dans leurs échantillons de selles (74 génotypes P[8], 5 génotypes P[4] et 6 génotypes P[6]) mais aucun d'entre eux ne présentait un phénotype non sécréteur. L'absence de α -1,2-fucosylcarbohydre à la surface de la muqueuse intestinale est donc associée à une résistance clinique à l'infection par les *Rotavirus*, au moins pour les souches de génotype P[8] et probablement pour d'autres génotypes P. Les études réalisées *in vitro* ont permis de « classer » les différents génotypes présents chez l'homme selon le type d'HBGA reconnu :

- les génotypes P[8] et P[4] et les HBGA de type Le^b et H1 ;
- le génotype P[6] et l'HBGA de type H1 ;
- les génotypes P[9], P[14] et P[25] et l'HBGA de type A.

Ce « classement » permet d'émettre quelques hypothèses et de tirer quelques conclusions. Par exemple, les génotypes P[8] et P[4] reconnaissent les HBGA les plus répandus dans la population, ce qui est cohérent avec la prédominance de ces mêmes génotypes au niveau

mondial. En effet, les génotypes P[8] et P[4] représentent plus de 90 % des cas de GERV dans de nombreux pays et depuis de nombreuses années (34). Le profil de reconnaissance du génotype P[6] soulève également une hypothèse intéressante. Ce génotype est principalement retrouvé dans les pays africains (77). Des données (non publiées) concernant la population Afro-Américaine ont montré une prévalence plus élevée de patients porteurs d'un gène *FUT3* non fonctionnel, c'est-à-dire ne présentant ni l'antigène Le^b ni l'antigène Le^a sur leur surface intestinale. La quantité d'antigène H1 présentée sur la muqueuse est alors plus importante et favorise ainsi l'implantation du génotype P[6] dans la population africaine par rapport aux autres populations (73). Cependant, des études à grande échelle seraient nécessaires afin de découvrir de façon exacte la distribution des HBGA dans les différentes ethnies mondiales. L'étude phylogénétique de Liu et al. (33), basée sur la comparaison de séquences codant pour la partie VP8* (Figure 14, page 40), a démontré que les souches se liant à l'acide sialique terminale formaient un sous-cluster particulier au sein des *Rotavirus*, confortant l'idée que cette liaison est fonction du type de VP4 et non du type d'hôte (espèce). Les souches du génogroupe P[II] (P[8], P[4] et P[6]) reconnaissent au minimum l'antigène H tandis que les souches du génogroupe P[III] (P[9], P[14] et P[25]) reconnaissent l'antigène A. Les souches de *Rotavirus* au sein d'un même génogroupe semblent donc partager un profil de liaison très proche voir identique. De plus, le type d'HBGA reconnu est également cohérent avec le profil d'espèces infectées par un génotype particulier. Par exemple, l'antigène A est présent dans de nombreuses espèces dont l'homme, ce qui pourrait expliquer pourquoi les souches de génotypes P[9] et P[14] peuvent infecter plusieurs espèces. Ce récepteur commun est sans doute la base de la transmission inter-espèces. Les deux génotypes P[9] et P[14] ne sont pas prédominants chez l'homme, probablement car l'antigène A n'est présent que dans une partie de la population (environ 30 %). Un autre travail publié en juillet 2013 s'est penché sur le génotype P[11], génotype bovin retrouvé dans quelques cas d'infections en néonatalogie, le plus souvent asymptomatiques (78). Ce travail a prouvé que *in vitro* ce génotype se liait spécifiquement aux glycanes avec le motif Gal β 1-4GlcNAc formant la base des glycanes de type II correspondant au précurseur de l'antigène H de type II. La modification des glycanes pendant le développement néonatal pourrait ainsi expliquer la restriction de ces souches aux nouveau-nés. A l'inverse, la symptomatologie peu marquée des nourrissons de moins de six mois lors d'une infection par des souches plus courantes (comme P[8] et P[4]) pourrait être liée à une immaturité dans l'expression des HBGA au niveau de la muqueuse digestive.

Les prématurés sont plus rarement infectés que les enfants nés à terme, ce qui est également en faveur de cette hypothèse. D'autres causes peuvent cependant expliquer cette relative protection des enfants de moins de six mois : immaturité de l'activité de la trypsinase, immaturité potentielle des récepteurs de NSP4, présence d'immunoglobulines A dans le lait maternel, contact moindre avec les personnes extérieures... De nouvelles perspectives d'études afin d'améliorer la compréhension du *Rotavirus* sont aujourd'hui nécessaires, études qui seront éclairées par la bonne connaissance de l'interaction de certains pathogènes avec les HBGA, tels que les *NoV*.

Le *Rotavirus* n'est pas le premier pathogène entérique pour lequel une interaction avec les glycanes des entérocytes représente une étape clé de l'infection. D'autres agents infectieux se servent également des HBGA comme moyen d'adhérence ou comme récepteur cellulaire. Un des premiers liens décrit entre HBGA et infection a été l'association entre l'ulcère gastro-intestinal et le groupe sanguin O. Des études ont démontré qu'une souche sud-américaine de *Helicobacter pylori* se liait à l'antigène Le^b seul et non à l'antigène A-Le^b au niveau de l'épithélium gastrique, prédisposant les patients sécréteurs de groupe sanguin O à un ulcère (79). La capacité d'autres souches de *H. pylori* isolées dans le reste du monde à se lier à l'antigène Le^b seul ainsi qu'à l'antigène A-Le^b a également été décrite, indiquant qu'il existe une différence du panel d'HBGA reconnu selon les souches. Bien que le développement d'un ulcère soit multifactoriel, de nouvelles études explorent la voie de stratégies thérapeutiques alternatives basées sur l'inhibition de l'adhésion bactérienne (80). De même, l'infection par les *Norovirus* a été reliée *in vitro* et *in vivo* à l'expression des HBGA sur la muqueuse intestinale (81). Les patients de phénotype non sécréteur sont le plus souvent résistants à l'infection par un *NoV*. Lors d'une épidémie, seule une fraction de la population est sensible à l'infection, c'est-à-dire présentant le bon récepteur sur sa muqueuse intestinale. La diversité des souches de *NoV* fait qu'*in fine* l'ensemble de la population peut être touchée. Les souches capables de reconnaître le plus grand nombre d'individus seront cependant favorisées. Bien évidemment, la capacité à échapper à la pression immunitaire par glissement antigénique, grâce notamment à un taux de mutation supérieur et/ou une répllication plus efficace, joue également un rôle majeur sur la prédominance ou non d'une souche.

Notre étude est la première à avoir mis en évidence cliniquement une affinité des *Rotavirus* de génotype P[8] pour les HBGA. De nombreuses perspectives sont possibles pour donner suite à ce travail. Afin d'augmenter la robustesse de l'étude, les effectifs devront être augmentés grâce notamment à l'inclusion de patients de manière prospective. La réalisation de prélèvements salivaires effectués parallèlement aux prélèvements de selles permettra de s'affranchir du biais de sélection lié aux difficultés d'extraction de l'ADN à partir des selles. Cette approche sera plus lourde à mettre en place car elle nécessitera de réaliser des prélèvements de salive sur tous les enfants avec des signes GEA au CHU et pour lesquels un diagnostic virologique sera demandé. Cette méthodologie se rapproche de celle utilisée dans l'étude de Nguyen et *al.* et permettra de définir plus facilement le phénotype sécréteur ou non sécréteur (basé sur l'analyse du système Lewis). De plus, ces échantillons salivaires rendront possible la détermination du phénotype ABO du patient. Ainsi, des conclusions pourront être tirées quant à l'impact du phénotype ABO sur le pouvoir infectieux d'un génotype de *Rotavirus*.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Trask SD, Ogden KM, Patton JT. Interactions among capsid proteins orchestrate rotavirus particle functions. *Curr Opin Virol.* août 2012;2(4):373-379.
2. Pesavento JB, Crawford SE, Estes MK, Prasad BVV. Rotavirus proteins: structure and assembly. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2006;309:189-219.
3. ICTV Virus Taxonomy 2012 [Internet]. [cité 15 déc 2013]. Disponible sur: <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>
4. Matthijnssens J, Ciarlet M, McDonald SM, Attoui H, Bányai K, Brister JR, et al. Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG). *Arch Virol.* 20 mai 2011;156(8):1397-1413.
5. Settembre EC, Chen JZ, Dormitzer PR, Grigorieff N, Harrison SC. Atomic model of an infectious rotavirus particle. *EMBO J.* 2010;30(2):408-16.
6. Staat MA, Azimi PH, Berke T, Roberts N, Bernstein DI, Ward RL, et al. Clinical presentations of rotavirus infection among hospitalized children. *Pediatr Infect Dis J.* mars 2002;21(3):221-227.
7. Huet F, Chouchane M, Cremillieux C, Aubert M, Caulin E, Pothier P, et al. Étude épidémiologique prospective de la gastroentérite à rotavirus en Europe (étude REVEAL). Résultats de la zone d'étude française. *Arch Pédiatrie.* 2008;15(4):362-74.
8. De Rougemont A, Kaplon J, Pillet S, Mory O, Gagneur A, Minoui-Tran A, et al. Molecular and clinical characterization of rotavirus from diarrheal infants admitted to pediatric emergency units in France. *Pediatr Infect Dis J.* 2011;30(2):118-24.
9. Haas H. Expression clinique de l'infection à rotavirus de l'enfant et de l'adulte. *Médecine Thérapeutique Pédiatrie.* 2006;9(1):17-20.
10. Shaw AR. The Rotavirus Saga Revisited. *Annu Rev Med.* 14 janv 2013;64(1):165-174.
11. Lorrot M, Benhamadouche-Casari H, Vasseur M. Physiopathologie de la diarrhée à rotavirus. *Virologie.* 2005;9(1):9-18.
12. Hagbom M, Sharma S, Lundgren O, Svensson L. Towards a human rotavirus disease model. *Curr Opin Virol.* août 2012;2(4):408-418.
13. Dennehy PH. Transmission of rotavirus and other enteric pathogens in the home. *Pediatr Infect Dis J.* 2000;19(10):S103-S105.

14. Marc E, Biscardi S, Soulier M, Lebon P, Gendrel D. Infections nosocomiales à rotavirus dans un service de pédiatrie générale: surveillance au cours de quatre hivers successifs. *Médecine Mal Infect.* janv 2007;37(1):61-66.
15. Bon F, Kaplon J, Metzger M-H, Pothier P. Évaluation de sept réactifs d'immunochromatographie pour détecter les rotavirus humains dans les selles. *Pathol Biol.* avr 2007;55(3-4):149-153.
16. Regagnon C, Chambon M, Archimbaud C, Charbonné F, Demeocq F, Labbé A, et al. Diagnostic rapide des infections à rotavirus : étude prospective comparative de deux techniques de détection d'antigènes dans les selles. *Pathol Biol.* juill 2006;54(6):343-346.
17. Haute Autorité de Santé - Solutés de réhydratation orale (SRO) [Internet]. [cité 16 déc 2013]. Disponible sur: http://www.has-sante.fr/portail/jcms/c_398439/fr/solutes-de-rehydratation-orale-sro
18. Bocquet A, Bresson JL, Briend A, Chouraqui JP, Darmaun D, Dupont C, et al. Traitement nutritionnel des diarrhées aiguës du nourrisson et du jeune enfant. *Arch Pédiatrie.* 2002;9(6):610-9.
19. Cézard JP, Chouraqui JP, Girardet JP, Gottrand F. Traitement médicamenteux des diarrhées aiguës infectieuses du nourrisson et de l'enfant. *Arch Pédiatrie.* 2002;9(6):620-8.
20. Avis et rapports du HCSP [Internet]. [cité 16 déc 2013]. Disponible sur: <http://www.hcsp.fr/Explore.cgi/AvisRapports>
21. Samad L, Cortina-Borja M, Bashir HE, Sutcliffe AG, Marven S, Cameron JC, et al. Intussusception incidence among infants in the UK and Republic of Ireland: A pre-rotavirus vaccine prospective surveillance study. *Vaccine.* août 2013;31(38):4098-4102.
22. Lloyd-Johnsen C, Justice F, Donath S, Bines JE. Retrospective hospital based surveillance of intussusception in children in a sentinel paediatric hospital: Benefits and pitfalls for use in post-marketing surveillance of rotavirus vaccines. *Vaccine.* avr 2012;30:A190-A195.
23. Patel MM, López-Collada VR, Bulhões MM, De Oliveira LH, Márquez AB, Flannery B, et al. Intussusception risk and health benefits of rotavirus vaccination in Mexico and Brazil. *N Engl J Med.* 2011;364(24):2283-92.
24. Shui IM, Baggs J, Patel M, Parashar UD, Rett M, Belongia EA, et al. Risk of intussusception following administration of a pentavalent rotavirus vaccine in US infants. *JAMA J Am Med Assoc.* 2012;307(6):598-604.
25. Desai R, Cortese MM, Meltzer MI, Shankar M, Tate JE, Yen C, et al. Potential intussusception risk versus benefits of rotavirus vaccination in the United States. *Pediatr Infect Dis J.* 2013;32(1):1-7.

26. Yih WK, Lieu TA, Kulldorff M, Martin D, McMahon-Walraven CN, Platt R, et al. Intussusception Risk after Rotavirus Vaccination in U.S. Infants. *N Engl J Med*. 14 janv 2014;140114060045003.
27. Parashar UD, Hummelman EG, Bresee JS, Miller MA, Glass RI. Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. *Emerg Infect Dis*. 2003;9(5):565.
28. WHO | Immunization surveillance, assessment and monitoring [Internet]. WHO. [cité 16 déc 2013]. Disponible sur: http://who.int/immunization/monitoring_surveillance/en/
29. WHO | 21 November 2008, vol. 83, 47 (pp 421–428) [Internet]. WHO. [cité 16 déc 2013]. Disponible sur: <http://www.who.int/wer/2008/wer8347/en/>
30. Melliez H, Boelle P-Y, Baron S, Mouton Y, Yazdanpanah Y. Morbidité et coût des infections à rotavirus en France. *Médecine Mal Infect*. oct 2005;35(10):492-499.
31. Parez N, Pozzetto B, Texier N, Mory O, Garbarg-Chenon A, Téhard B. Incidence of rotavirus gastroenteritis among children under 5 years consulting a paediatrician or a general practitioner in France. *Pathol Biol (Paris)* [Internet]. 2012 [cité 16 déc 2013]; Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22445056>
32. Giaquinto C, Jackson AEM, Vesikari T. Report of the Second European Expert Meeting on Rotavirus Vaccination. *Vaccine*. mars 2012;30(13):2237-2244.
33. Liu Y, Huang P, Tan M, Liu Y, Biesiada J, Meller J, et al. Rotavirus VP8*: Phylogeny, Host Range, and Interaction with Histo-Blood Group Antigens. *J Virol*. 3 juill 2012;86(18):9899-9910.
34. Santos N, Hoshino Y. Global distribution of rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine. *Rev Med Virol*. janv 2005;15(1):29-56.
35. Soares-Weiser K, Macle hose H, Bergman H, Ben-Aharon I, Nagpal S, Goldberg E, et al. Vaccines for preventing rotavirus diarrhoea: vaccines in use. *Cochrane Database Syst Rev*. 2012;11:CD008521.
36. Richardson V, Hernandez-Pichardo J, Quintanar-Solares M, Esparza-Aguilar M, Johnson B, Gomez-Altamirano CM, et al. Effect of rotavirus vaccination on death from childhood diarrhea in Mexico. *N Engl J Med*. 2010;362(4):299-305.
37. Do Carmo GMI, Yen C, Cortes J, Siqueira AA, de Oliveira WK, Cortez-Escalante JJ, et al. Decline in Diarrhea Mortality and Admissions after Routine Childhood Rotavirus Immunization in Brazil: A Time-Series Analysis. von Seidlein L, éditeur. *PLoS Med*. 19 avr 2011;8(4):e1001024.
38. Wang FT, Mast TC, Glass RJ, Loughlin J, Seeger JD. Effectiveness of an Incomplete RotaTeq (RV5) Vaccination Regimen in Preventing Rotavirus Gastroenteritis in the United States. *Pediatr Infect Dis J*. 2013;32(3):278-83.

39. Payne DC, Boom JA, Staat MA, Edwards KM, Szilagyi PG, Klein EJ, et al. Effectiveness of Pentavalent and Monovalent Rotavirus Vaccines in Concurrent Use Among US Children <5 Years of Age, 2009-2011. *Clin Infect Dis*. 13 mars 2013;57(1):13-20.
40. Gagneur A, Nowak E, Lemaitre T, Segura J-F, Delaperrière N, Abalea L, et al. Impact of rotavirus vaccination on hospitalizations for rotavirus diarrhea: The IVANHOE study. *Vaccine*. mai 2011;29(21):3753-3759.
41. Anderson EJ, Shippee DB, Weinrobe MH, Davila MD, Katz BZ, Reddy S, et al. Indirect Protection of Adults From Rotavirus by Pediatric Rotavirus Vaccination. *Clin Infect Dis*. 23 janv 2013;56(6):755-760.
42. Donato CM, Ch'ng LS, Boniface KF, Crawford NW, BATTERY JP, Lyon M, et al. Identification of Strains of RotaTeq Rotavirus Vaccine in Infants With Gastroenteritis Following Routine Vaccination. *J Infect Dis*. 21 mai 2012;206(3):377-383.
43. Rivera L, Peña LM, Stainier I, Gillard P, Chevart B, Smolenov I, et al. Horizontal transmission of a human rotavirus vaccine strain—A randomized, placebo-controlled study in twins. *Vaccine*. nov 2011;29(51):9508-9513.
44. Luchs A, Cilli A, Morillo SG, de Cassia Compagnoli Carmona R, do Carmo Sampaio Tavares Timenetsky M. Rotavirus in adults, Brazil, 2004–2011: G2P[4] dominance and potential impact on vaccination. *Braz J Infect Dis [Internet]*. sept 2013 [cité 3 janv 2014]; Disponible sur: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1413867013002201>
45. Kirkwood CD, Boniface K, Barnes GL, Bishop RF. Distribution of Rotavirus Genotypes After Introduction of Rotavirus Vaccines, Rotarix® and RotaTeq®, into the National Immunization Program of Australia: *Pediatr Infect Dis J*. janv 2011;30:S48-S53.
46. Glass RI, Parashar UD. Rotavirus Vaccines—Balancing Intussusception Risks and Health Benefits. *N Engl J Med [Internet]*. 2014 [cité 13 févr 2014]; Disponible sur: <http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMe1315836>
47. Vaccination des nourrissons contre les infections à rotavirus. Recommandations [Internet]. [cité 18 févr 2014]. Disponible sur: <http://www.hcsp.fr/Explore.cgi/avisrapportsdomaine?clefr=405>
48. De Rougemont A. Rôle des antigènes tissulaires de groupes sanguins humains A, B, H et Lewis dans l'évolution des Norovirus GII. 4 [Internet]. Université de Bourgogne; 2011 [cité 15 déc 2013]. Disponible sur: <http://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00739334/>
49. Koda Y, Soejima M, Kimura H. The polymorphisms of fucosyltransferases. *Leg Med*. 2001;3(1):2-14.
50. Soejima M, Fujimoto R, Agusa T, Iwata H, Fujihara J, Takeshita H, et al. Genetic variation of FUT2 in a Vietnamese population: identification of two novel Se enzyme-inactivating mutations: FUT2 IN VIETNAM. *Transfusion (Paris)*. juin 2012;52(6):1268-1275.
51. Marionneau S, Cailleau-Thomas A, Rocher J, Le Moullac-Vaidye B, Ruvoën N, Clément M, et al. ABH and Lewis histo-blood group antigens, a model for the meaning of oligosaccharide diversity in the face of a changing world. *Biochimie*. 2001;83(7):565-73.

52. Tan M, Huang P, Meller J, Zhong W, Farkas T, Jiang X. Mutations within the P2 Domain of Norovirus Capsid Affect Binding to Human Histo-Blood Group Antigens: Evidence for a Binding Pocket. *J Virol.* 10 nov 2003;77(23):12562-12571.
53. Donaldson EF, Lindesmith LC, LoBue AD, Baric RS. Viral shape-shifting: norovirus evasion of the human immune system. *Nat Rev Microbiol.* 2 févr 2010;8(3):231-241.
54. Koopmans M, Vinjé J, de Wit M, Leenen I, van der Poel W, van Duynhoven Y. Molecular epidemiology of human enteric caliciviruses in The Netherlands. *J Infect Dis.* 2000;181(Supplement 2):S262-S269.
55. Scallan E, Hoekstra RM, Angulo FJ, Tauxe RV, Widdowson M-A, Roy SL, et al. Foodborne Illness Acquired in the United States—Major Pathogens. *Emerg Infect Dis.* janv 2011;17(1):7-15.
56. Rockx B, de Wit M, Vennema H, Vinjé J, de Bruin E, van Duynhoven Y, et al. Natural history of human calicivirus infection: a prospective cohort study. *Clin Infect Dis.* 2002;35(3):246-53.
57. De Rougemont A, Ambert-Balay K, Belliot G, Pothier P. Actualités sur les norovirus. *médecine/sciences.* 15 janv 2010;26(1):73-78.
58. Siebenga JJ, Vennema H, Zheng D, Vinjé J, Lee BE, Pang X, et al. Norovirus Illness Is a Global Problem: Emergence and Spread of Norovirus GII.4 Variants, 2001–2007. *J Infect Dis.* sept 2009;200(5):802-812.
59. Kageyama T, Kojima S, Shinohara M, Uchida K, Fukushi S, Hoshino FB, et al. Broadly Reactive and Highly Sensitive Assay for Norwalk-Like Viruses Based on Real-Time Quantitative Reverse Transcription-PCR. *J Clin Microbiol.* 1 avr 2003;41(4):1548-1557.
60. Johnson PC, Mathewson JJ, DuPont HL, Greenberg HB. Multiple-challenge study of host susceptibility to Norwalk gastroenteritis in US adults. *J Infect Dis.* janv 1990;161(1):18-21.
61. Lindesmith L, Moe C, Marionneau S, Ruvoen N, Jiang X, Lindblad L, et al. Human susceptibility and resistance to Norwalk virus infection. *Nat Med.* mai 2003;9(5):548-553.
62. 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):1967-1977.
63. Thorven M, Grahn A, Hedlund K-O, Johansson H, Wahlfrid C, Larson G, et al. A Homozygous Nonsense Mutation (428G>A) in the Human Secretor (FUT2) Gene Provides Resistance to Symptomatic Norovirus (GGII) Infections. *J Virol.* 23 nov 2005;79(24):15351-15355.
64. Lindesmith LC, Donaldson EF, LoBue AD, Cannon JL, Zheng D-P, Vinje J, et al. Mechanisms of GII.4 Norovirus Persistence in Human Populations. *PLoS Med.* 2008;5(2):e31.

65. De Rougemont A, Ruvoen-Clouet N, Simon B, Estienney M, Elie-Caille C, Aho S, et al. Qualitative and Quantitative Analysis of the Binding of GII.4 Norovirus Variants onto Human Blood Group Antigens. *J Virol*. 23 févr 2011;85(9):4057-4070.
66. Tan M, Jiang X. Norovirus–host interaction: Multi-selections by human histo-blood group antigens. *Trends Microbiol*. août 2011;19(8):382-388.
67. Trask SD, McDonald SM, Patton JT. Structural insights into the coupling of virion assembly and rotavirus replication. *Nat Rev Microbiol*. 23 janv 2012;10(3):165-177.
68. Haselhorst T, Fleming FE, Dyason JC, Hartnell RD, Yu X, Holloway G, et al. Sialic acid dependence in rotavirus host cell invasion. *Nat Chem Biol*. 21 déc 2008;5(2):91-93.
69. Blanchard H, Yu X, Coulson BS, von Itzstein M. Insight into Host Cell Carbohydrate-recognition by Human and Porcine Rotavirus from Crystal Structures of the Virion Spike Associated Carbohydrate-binding Domain (VP8*). *J Mol Biol*. avr 2007;367(4):1215-1226.
70. Isa P, Arias CF, López S. Role of sialic acids in rotavirus infection. *Glycoconj J*. févr 2006;23(1-2):27-37.
71. Monnier N, Higo-Moriguchi K, Sun Z-YJ, Prasad BVV, Taniguchi K, Dormitzer PR. High-Resolution Molecular and Antigen Structure of the VP8* Core of a Sialic Acid-Independent Human Rotavirus Strain. *J Virol*. 13 janv 2006;80(3):1513-1523.
72. Hu L, Crawford SE, Czako R, Cortes-Penfield NW, Smith DF, Le Pendu J, et al. Cell attachment protein VP8* of a human rotavirus specifically interacts with A-type histo-blood group antigen. *Nature*. 15 avr 2012;485(7397):256-259.
73. Huang P, Xia M, Tan M, Zhong W, Wei C, Wang L, et al. Spike Protein VP8* of Human Rotavirus Recognizes Histo-Blood Group Antigens in a Type-Specific Manner. *J Virol*. 15 févr 2012;86(9):4833-4843.
74. Da Silva MFM, Gómez MM, Rose TL, Volotão E de M, Carvalho-Costa FA, Bello G, et al. VP8*P[8] lineages of group A rotaviruses circulating over 20years in Brazil: Proposal of six different sub-lineages for P[8]-3 clade. *Infect Genet Evol*. juin 2013;16:200-205.
75. Imbert-Marcille B-M, Barbé L, Dupé M, Moullac-Vaidye BL, Besse B, Peltier C, et al. A FUT2 gene common polymorphism determines resistance to rotavirus A of the P[8] genotype. *J Infect Dis*. 25 nov 2013;jit655.
76. Trang NV, Vu HT, Le NT, Huang P, Jiang X, Anh DD. ASSOCIATION BETWEEN NOROVIRUS AND ROTAVIRUS INFECTION AND HISTO-BLOOD GROUP ANTIGEN TYPES IN VIETNAMESE CHILDREN. *J Clin Microbiol* [Internet]. 12 févr 2014 [cité 22 févr 2014]; Disponible sur: <http://jcm.asm.org/cgi/doi/10.1128/JCM.02927-13>
77. Todd S, Page NA, Duncan Steele A, Peenze I, Cunliffe NA. Rotavirus Strain Types Circulating in Africa: Review of Studies Published during 1997–2006. *J Infect Dis*. sept 2010;202(S1):S34-S42.

78. Ramani S, Cortes-Penfield NW, Hu L, Crawford SE, Czako R, Smith DF, et al. The VP8* Domain of Neonatal Rotavirus Strain G10P[11] Binds to Type II Precursor Glycans. *J Virol.* 24 avr 2013;87(13):7255-7264.
79. Anstee DJ. The relationship between blood groups and disease. *Blood.* 22 mars 2010;115(23):4635-4643.
80. Magalhães A, Reis CA. Helicobacter pylori adhesion to gastric epithelial cells is mediated by glycan receptors. *Braz J Med Biol Res.* juill 2010;43(7):611-618.
81. Ruvoën-Clouet N, Belliot G, Le Pendu J. Noroviruses and histo-blood groups: the impact of common host genetic polymorphisms on virus transmission and evolution: Noroviruses and herd innate protection. *Rev Med Virol.* nov 2013;23(6):355-366.

Nom - Prénoms : DUPÉ Mathilde, Aline

Titre de la thèse :

Résistance génétique à l'infection
par certaines souches de *Rotavirus* du groupe A :
impact du polymorphisme du gène humain *FUT2*.

Résumé de la thèse :

L'attachement des souches de *Rotavirus* humaines aux antigènes tissulaires de groupes sanguins a récemment été décrit. Leur synthèse dépend de la présence de l'enzyme α -1,2-fucosyltransférase, appelée FUT2. Le pourcentage d'individus non sécréteurs, c'est-à-dire synthétisant une enzyme FUT2 non fonctionnelle, est d'environ 20 % dans la population caucasienne. Ces individus, ne présentant pas d'antigènes tissulaires de groupes sanguins sur leur surface intestinale, n'ont donc pas de récepteur pour le *Rotavirus*. Ils devraient alors être résistants à l'infection. L'absence d'individu non sécréteur, sur les 51 patients inclus dans ce travail et présentant une diarrhée à *Rotavirus*, vient confirmer cette hypothèse.

Mots-clés :

ROTAVIRUS – PHÉNOTYPE SÉCRÉTEUR – FUT2 – ANTIGÈNES TISSULAIRES
DE GROUPES SANGUINS – RÉCEPTEUR

JURY

PRÉSIDENT : Mme Virginie FERRÉ, PU-PH et Doyen de l'UFR des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Laboratoire de Virologie - Nantes

ASSESEURS : Mme le Pr. Berthe-Marie IMBERT, Directrice de Thèse, PU-PH, Chef de service du laboratoire de Virologie, UFR des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Nantes
Mme le Pr. Christèle GRAS-LE GUEN, PU-PH, Chef de service de Médecine Pédiatrique, UFR de Médecine, Nantes
M. Jacques LE PENDU, Directeur de Recherche, INSERM U892, Nantes

Adresse de l'auteur :

Bâtiment F1, 20 rue des six aqueducs 44100 Nantes