

UNIVERSITE DE YAOUNDE I  
Yaoundé

CENTRE DE RECHERCHE ET DE  
FORMATION DOCTORALE EN SCIENCES  
DE LA VIE, SANTE ET ENVIRONNEMENT

UNITE DE RECHERCHE ET DE  
FORMATION DOCTORALE EN SCIENCES  
DE LA VIE

DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE



THE UNIVERSITY OF YAOUNDE I  
\*\*\*\*\*

CENTRE FOR RESEARCH AND  
GRADUATE STUDIES IN LIFE, HEALTH  
AND ENVIRONMENTAL SCIENCES

RESEARCH AND DOCTORATE  
TRAINING UNIT IN LIFE  
SCIENCES

DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY

LABORATOIRE DE MICROBIOLOGIE  
LABORATORY OF MICROBIOLOGY

# CARACTERISATION MOLECULAIRE DES SOUCHES DE ROTAVIRUS A HUMAIN ET ANIMAL DANS LA REGION DU LITTORAL DU CAMEROUN

THESE

Présentée et soutenue comme requis partiel en vue de l'obtention du Doctorat / Ph.D en  
Biochimie

Option : Microbiologie

Par

**GHAPOUTSA NKANDI Rahinatou**

Matricule : 06R340

Master en Biochimie

Sous la direction de :

**ETOA François-Xavier**

**Professeur**



ANNEE ACADEMIQUE : 2023-2024

REPUBLIQUE DU CAMEROUN  
UNIVERSITE DE YAOUNDE I  
FACULTE DE SCIENCES  
DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE  
BP : 812 YAOUNDE



REPUBLIC OF CAMEROON  
UNIVERSITY OF YAOUNDE I  
FACULTY OF SCIENCE  
DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY  
PO BOX : 812 YAOUNDE

### ATTESTATION DE CORRECTION

Nous soussignés, Pr. TORIMIRO Judith, Pr. MBOPPI KEOU François-Xavier, Pr. KORO KORO Francioli et Pr. MBACHAM FON Wilfried respectivement Membres et Président du jury de Thèse de Doctorat /Ph.D en Biochimie option Microbiologie, soutenue par Madame GHAPOUTSA NKANDI Rahinatou (Matricule 06R340) le 03 Novembre 2023 à 10 heures dans la salle Multimédia de la Faculté des Sciences de l'Université de Yaoundé I, sous le thème : « *Caractérisation moléculaire des souches de Rotavirus A humain et animal dans la région du Littoral du Cameroun* », attestons que la candidate a effectué les corrections conformément aux exigences du jury.

En foi de quoi, la présente attestation lui est délivrée pour servir et valoir ce que de droit.

Fait à Yaoundé, le : **01.FEV. 2024** .....

Membres

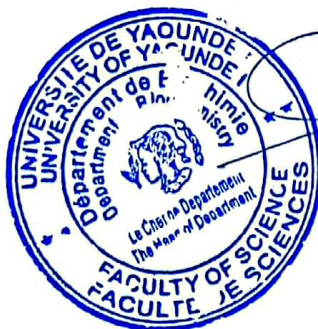
*[Handwritten signatures]*  
Pr. Mboppi Keou FX  
12/01/24  
Pr. Koro Koro F

Président du Jury

*[Handwritten signature]*  
Pr. Mbacham Wilfried F.  
12/01/24

Chef de Département

*[Handwritten signature]*  
Professor Judith Ndongo TORIMIRO  
12 Jan. 2024



*[Handwritten signature]*  
Paul F. MOUNDIPA  
Professor  
Enzymology & Toxicology

UNIVERSITE DE YAOUNDE I

\*\*\*\*\*

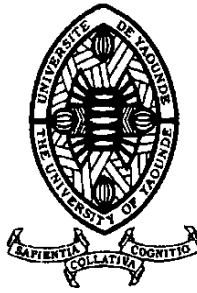
CENTRE DE RECHERCHE ET DE  
FORMATION DOCTORALE EN SCIENCES  
DE LA VIE, SANTE ET ENVIRONNEMENT

\*\*\*\*\*

UNITE DE RECHERCHE ET DE  
FORMATION DOCTORALE EN SCIENCES  
DE LA VIE

\*\*\*\*\*

DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE



THE UNIVERSITY OF YAOUNDE I

\*\*\*\*\*

CENTRE FOR RESEARCH AND  
GRADUATE STUDIES IN LIFE, HEALTH  
AND ENVIRONMENTAL SCIENCES

\*\*\*\*\*

RESEARCH AND DOCTORATE  
TRAINING UNIT IN LIFE  
SCIENCES

\*\*\*\*\*

DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY

LABORATOIRE DE MICROBIOLOGIE  
LABORATORY OF MICROBIOLOGY

**CARACTERISATION MOLECULAIRE DES SOUCHES  
DE ROTAVIRUS A HUMAIN ET ANIMAL DANS LA  
REGION DU LITTORAL DU CAMEROUN**

**THESE**

Présentée et soutenue comme requis partiel en vue de l'obtention du Doctorat / Ph.D en  
Biochimie

Option : Microbiologie

Par

**GHAPOUTSA NKANDI Rahinatou**

**Matricule : 06R340**

**Master en Biochimie**

Sous la direction de :

**ETOA François-Xavier**

**Professeur**

**ANNEE ACADEMIQUE : 2023-2024**

---

# LISTE PROTOCOLAIRE DES ENSEIGNANTS PERMANENTS DE LA FACULTE DES SCIENCES DE L'UNIVERSITE DE YAOUNDE I

ANNEE ACADEMIQUE 2023/2024

(Par Département et par Grade)

DATE D'ACTUALISATION 31 Mai 2023

## ADMINISTRATION

**DOYEN :** TCHOUANKEU Jean- Claude, *Maître de Conférences*

**VICE-DOYEN / DPSAA :** ATCHADE Alex de Théodore, *Professeur*

**VICE-DOYEN / DSSE :** NYEGUE Maximilienne Ascension, *Professeur*

**VICE-DOYEN / DRC :** ABOSSOLO ANGUE Monique, *Maître de Conférences*

**Chef Division Administrative et Financière :** NDOYE FOE Florentine Marie Chantal, *Maître de Conférences*

**Chef Division des Affaires Académiques, de la Recherche et de la Scolarité DAARS :**  
AJEAGAH Gideon AGHAINDUM, *Professeur*

### 1- DÉPARTEMENT DE BIOCHIMIE (BC) (43)

N°	NOMS ET PRÉNOMS	GRADE	OBSERVATIONS
1.	BIGOGA DAIGA Jude	Professeur	En poste
2.	FEKAM BOYOM Fabrice	Professeur	En poste
3.	KANSCI Germain	Professeur	En poste
4.	MBACHAM FON Wilfred	Professeur	En poste
5.	MOUNDIPA FEWOU Paul	Professeur	<i>Chef de Département</i>
6.	NGUEFACK Julienne	Professeur	En poste
7.	NJAYOU Frédéric Nico	Professeur	En poste
8.	OBEN Julius ENYONG	Professeur	En poste

9.	ACHU Merci BIH	Maître de Conférences	En poste
10	ATOGHO Barbara MMA	Maître de Conférences	En poste
11	AZANTSA KINGUE GABIN BORIS	Maître de Conférences	En poste
12	BELINGA née NDOYE FOE F. M. C.	Maître de Conférences	<i>Chef DAF / FS</i>
13	DJUIDJE NGOUNOUE Marceline	Maître de Conférences	En poste
14	DJUIKWO NKONGA Ruth Viviane	Maître de Conférences	En poste
15	EFFA ONOMO Pierre	Maître de Conférences	<i>VD/FS/Univ Ebwa</i>

16	EWANE Cécile Annie	Maître de Conférences	En poste
17	KOTUE TAPTUE Charles	Maître de Conférences	En poste
18	LUNGA Paul KEILAH	Maître de Conférences	En poste
19	MBONG ANGIE M. Mary Anne	Maître de Conférences	En poste
20	MOFOR née TEUGWA Clotilde	Maître de Conférences	<i>Doyen FS / UDs</i>
21	NANA Louise épouse WAKAM	Maître de Conférences	En poste
22	NGONDI Judith Laure	Maître de Conférences	En poste
23	TCHANA KOUATCHOUA Angèle	Maître de Conférences	En poste

24.	AKINDEH MBUH NJI	Chargé de Cours	En poste
25.	BEBEE Fadimatou	Chargé de Cours	En poste
26.	BEBOY EDJENGUELE Sara Nathalie	Chargé de Cours	En poste
27.	DAKOLE DABOY Charles	Chargé de Cours	En poste
28.	DONGMO LEKAGNE Joseph Blaise	Chargé de Cours	En poste
29.	FONKOUA Martin	Chargé de Cours	En poste
30.	FOUPOUAPOUOGNIGNI Yacouba	Chargé de Cours	En poste
31.	KOUOH ELOMBO Ferdinand	Chargé de Cours	En poste
32.	MANANGA Marlyse Joséphine	Chargé de Cours	En poste
33.	OWONA AYISSI Vincent Brice	Chargé de Cours	En poste
34.	Palmer MASUMBE NETONGO	Chargé de Cours	En poste
35.	PECHANGOU NSANGOU Sylvain	Chargé de Cours	En poste
36.	WILFRED ANGIE ABIA	Chargé de Cours	En poste

37.	BAKWO BASSOGOG Christian Bernard	Assistant	En Poste
38.	ELLA Fils Armand	Assistant	En Poste
39.	EYENGA Eliane Flore	Assistant	En Poste
40.	MADIESSE KEMGNE Eugenie Aimée	Assistant	En Poste
41.	MANJIA NJIKAM Jacqueline	Assistant	En Poste
42.	MBOUCHE FANMOE Marceline Joëlle	Assistant	En poste
43.	WOGUIA Alice Louise	Assistant	En Poste

## 2- DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE ANIMALES (BPA) (52)

1.	AJEAGAH Gideon AGHAINDUM	Professeur	<i>DAARS/FS</i>
2.	BILONG BILONG Charles-Félix	Professeur	<i>Chef de Département</i>
3.	DIMO Théophile	Professeur	En Poste
4.	DJIETO LORDON Champlain	Professeur	En Poste
5.	DZEUFJET DJOMENI Paul Désiré	Professeur	En Poste
6.	ESSOMBA née NTSAMA MBALA	Professeur	<i>CD et Vice Doyen/FMSB/UIYI</i>
7.	FOMENA Abraham	Professeur	En Poste
8.	KEKEUNOU Sévilor	Professeur	En poste
9.	NJAMEN Dieudonné	Professeur	En poste
10.	NJIOKOU Flobert	Professeur	En Poste
11.	NOLA Moïse	Professeur	En poste
12.	TAN Paul VERNYUY	Professeur	En poste
13.	TCHUEM TCHUENTE Louis Albert	Professeur	<i>Inspecteur de service / Coord.Progr./MINSANTE</i>
14.	ZEBAZE TOGOUET Serge Hubert	Professeur	En poste

15.	ALENE Désirée Chantal	Maître de Conférences	<i>Vice Doyen/ Uté Ebwa</i>
16.	BILANDA Danielle Claude	Maître de Conférences	En poste
17.	DJIOGUE Séfirin	Maître de Conférences	En poste
18.	GOUNOUE KAMKUMO Raceline épse FOTSING	Maître de Conférences	En poste
19.	JATSA BOUKENG Hermine épse MEGAPTCHÉ	Maître de Conférences	En Poste
20.	LEKEUFACK FOLEFACK Guy B.	Maître de Conférences	En poste
21.	MAHOB Raymond Joseph	Maître de Conférences	En poste
22.	MBENOUN MASSE Paul Serge	Maître de Conférences	En poste
23.	MEGNEKOU Rosette	Maître de Conférences	En poste
24.	MOUNGANG Luciane Marlyse	Maître de Conférences	En poste
25.	NOAH EWOTI Olive Vivien	Maître de Conférences	En poste
26.	MONY Ruth épse NTONE	Maître de Conférences	En Poste
27.	NGUEGUIM TSOFAK Florence	Maître de Conférences	En poste

28.	NGUEMBOCK	Maître de Conférences	En poste
29.	TAMSA ARFAO Antoine	Maître de Conférences	En poste
30.	TOMBI Jeannette	Maître de Conférences	En poste

31.	ATSAMO Albert Donatien	Chargé de Cours	En poste
32.	BASSOCK BAYIHA Etienne Didier	Chargé de Cours	En poste
33.	ETEME ENAMA Serge	Chargé de Cours	En poste
34.	FEUGANG YOUNSSI François	Chargé de Cours	En poste
35.	FOKAM Alvine Christelle Epse KENGNE	Chargé de Cours	En poste
36.	GONWOUO NONO Legrand	Chargé de Cours	En poste
37.	KANDEDA KAVAYE Antoine	Chargé de Cours	En poste
38.	KOGA MANG DOBARA	Chargé de Cours	En poste
39.	LEME BANOCK Lucie	Chargé de Cours	En poste
40.	MAPON NSANGO Indou	Chargé de Cours	En poste
41.	METCHI DONFACK MIREILLE FLAURE EPSE GHOUMO	Chargé de Cours	En poste
42.	MVEYO NDANKEU Yves Patrick	Chargé de Cours	En poste
43.	NGOUATEU KENFACK Omer Bébé	Chargé de Cours	En poste
44.	NJUA Clarisse YAFI	Chargé de Cours	<i>Chef Div. Uté Bamenda</i>
45.	NWANE Philippe Bienvenu	Chargé de Cours	En poste
46.	TADU Zephyrin	Chargé de Cours	En poste
47.	YEDE	Chargé de Cours	En poste
48.	YOUNOUSSA LAME	Chargé de Cours	En poste

49	AMBADA NDZENGUE GEORGIA ELNA	Assistant	En poste
50	KODJOM WANCHE Jacgy Joyce	Assistant	En poste
51	NDENGUE Jean De Matha	Assistant	En poste
52	ZEMO GAMO Franklin	Assistant	En poste

### **3- DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE VÉGÉTALES (BPV) (34)**

1.	AMBANG Zachée	Professeur	<i>Chef de Département</i>
2.	DJOCGOUE Pierre François	Professeur	En poste
3.	MBOLO Marie	Professeur	En poste
4.	MOSSEBO Dominique Claude	Professeur	En poste
5.	YOUNBI Emmanuel	Professeur	En poste
6.	ZAPFACK Louis	Professeur	En poste

7.	ANGONI Hyacinthe	Maître de Conférences	En poste
8.	BIYE Elvire Hortense	Maître de Conférences	En poste
9.	MAHBOU SOMO TOUKAM. Gabriel	Maître de Conférences	En poste
10.	MALA Armand William	Maître de Conférences	En poste
11.	MBARGA BINDZI Marie Alain	Maître de Conférences	<i>DAAC /UDla</i>
12.	NDONGO BEKOLO	Maître de Conférences	En poste
13.	NGALLE Hermine BILLE	Maître de Conférences	En poste
14.	NGODO MELINGUI Jean Baptiste	Maître de Conférences	En poste
15.	NGONKEU MAGAPTCHE Eddy L.	Maître de Conférences	<i>CT / MINRESI</i>
16.	TONFACK Libert Brice	Maître de Conférences	En poste
17.	TSOATA Esaïe	Maître de Conférences	En poste
18.	ONANA JEAN MICHEL	Maître de Conférences	En poste

19.	DJEUANI Astride Carole	Chargé de Cours	En poste
20.	GONMADGE CHRISTELLE	Chargé de Cours	En poste
21.	MAFFO MAFFO Nicole Liliane	Chargé de Cours	En poste
22.	NNANGA MEBENGA Ruth Laure	Chargé de Cours	En poste
23.	NOUKEU KOUAKAM Armelle	Chargé de Cours	En poste
24.	NSOM ZAMBO EPSE PIAL ANNIE CLAUDE	Chargé de Cours	<i>En détachement/UNESCO MALI</i>
25.	GODSWILL NTSOMBOH NTSEFONG	Chargé de Cours	En poste
26.	KABELONG BANAHOU Louis-Paul-Roger	Chargé de Cours	En poste
27.	KONO Léon Dieudonné	Chargé de Cours	En poste
28.	LIBALAH Moses BAKONCK	Chargé de Cours	En poste
29.	LIKENG-LI-NGUE Benoit C	Chargé de Cours	En poste
30.	TAEDOUNG Evariste Hermann	Chargé de Cours	En poste
31.	TEMEGNE NONO Carine	Chargé de Cours	En poste
32.	MANGA NDJAGA JUDE	Assistant	En poste
33.	DIDA LONTSI Sylvere Landry	Assistant	En poste
34.	METSEBING Blondo-Pascal	Assistant	En poste



**4- DÉPARTEMENT DE CHIMIE INORGANIQUE (CI) (28)**

1.	GHOGOMU Paul MINGO	Professeur	<i>Ministre Chargé de Mission PR</i>
2.	NANSEU NJIKI Charles Péguy	Professeur	En poste
3.	NDIFON Peter TEKE	Professeur	<i>CT MINRESI</i>
4.	NENWA Justin	Professeur	En poste
5.	NGAMENI Emmanuel	Professeur	<i>Doyen FS Univ.Ngaoundere</i>
6.	NGOMO Horace MANGA	Professeur	<i>Vice Chancellor/UB</i>
7.	NJOYA Dayirou	Professeur	En poste

8.	ACAYANKA Elie	Maître de Conférences	En poste
9.	EMADAK Alphonse	Maître de Conférences	En poste
10.	KAMGANG YOUBI Georges	Maître de Conférences	En poste
11.	KEMMEGNE MBOUGUEM Jean C.	Maître de Conférences	En poste
12.	KENNE DEDZO GUSTAVE	Maître de Conférences	En poste
13.	MBEY Jean Aime	Maître de Conférences	En poste
14.	NDI NSAMI Julius	Maître de Conférences	<i>Chef de Département</i>
15.	NEBAH Née NDOSIRI Bridget NDOYE	Maître de Conférences	<i>Sénatrice/SENAT</i>
16.	NJIOMOU C. épouse DJANGANG	Maître de Conférences	En poste
17.	NYAMEN Linda Dyorisse	Maître de Conférences	En poste
18.	PABOUDAM GBAMBIE AWAWOU	Maître de Conférences	En poste
19.	TCHAKOUTE KOUAMO Hervé	Maître de Conférences	En poste
20.	BELIBI BELIBI Placide Désiré	Maître de Conférences	<i>Chef Service/ ENS Bertoua</i>
21.	CHEUMANI YONA Arnaud M.	Maître de Conférences	En poste
22.	KOUOTOU DAOUDA	Maître de Conférences	En poste

23.	MAKON Thomas Beauregard	Chargé de Cours	En poste
24.	NCHIMI NONO KATIA	Chargé de Cours	En poste
25.	NJANKWA NJABONG N. Eric	Chargé de Cours	En poste
26.	PATOUOSSA ISSOFA	Chargé de Cours	En poste
27.	SIEWE Jean Mermoz	Chargé de Cours	En Poste

28.	BOYOM TATCHEMO Franck W.	Assistant	En Poste
-----	--------------------------	-----------	----------

<b>5- DÉPARTEMENT DE CHIMIE ORGANIQUE (CO) (37)</b>			
1.	Alex de Théodore ATCHADE	Professeur	<i>Vice-Doyen / DPSAA</i>
2.	DONGO Etienne	Professeur	<i>Vice-Doyen/FSE/UIYI</i>
3.	NGOUELA Silvère Augustin	Professeur	<i>Chef de Département UDS</i>
4.	PEGNYEMB Dieudonné Emmanuel	Professeur	<i>Directeur/ MINESUP/ Chef de Département</i>
5.	WANDJI Jean	Professeur	En poste
6.	MBAZOA née DJAMA Céline	Professeur	En poste

7.	AMBASSA Pantaléon	Maître de Conférences	En poste
8.	EYONG Kenneth OBEN	Maître de Conférences	En poste
9.	FOTSO WABO Ghislain	Maître de Conférences	En poste
10.	KAMTO Eutrophe Le Doux	Maître de Conférences	En poste
11.	KENMOGNE Marguerite	Maître de Conférences	En poste
12.	KEUMEDJIO Félix	Maître de Conférences	En poste
13.	KOUAM Jacques	Maître de Conférences	En poste
14.	MKOUNGA Pierre	Maître de Conférences	En poste
15.	MVOT AKAK CARINE	Maître de Conférences	En poste
16.	NGO MBING Joséphine	Maître de Conférences	<i>Chef de Cellule MINRESI</i>
17.	NGONO BIKOBO Dominique Serge	Maître de Conférences	<i>C.E.A/ MINESUP</i>
18.	NOTE LOUGBOT Olivier Placide	Maître de Conférences	<i>DAAC/Uté Bertoua</i>
19.	NOUNGOUE TCHAMO Diderot	Maître de Conférences	En poste
20.	TABOPDA KUATE Turibio	Maître de Conférences	En poste
21.	TAGATSING FOTSING Maurice	Maître de Conférences	En poste
22.	TCHOUANKEU Jean-Claude	Maître de Conférences	<i>Doyen /FS/ UYI</i>
23.	YANKEP Emmanuel	Maître de Conférences	En poste
24.	ZONDEGOUMBA Ernestine	Maître de Conférences	En poste

25.	MESSI Angélique Nicolas	Chargé de Cours	En poste
26.	NGNINTEDO Dominique	Chargé de Cours	En poste
27.	NGOMO Orléans	Chargé de Cours	En poste
28.	NONO NONO Éric Carly	Chargé de Cours	En poste
29.	OUAHOUE WACHE Blandine M.	Chargé de Cours	En poste

30	OUETE NANTCHOUANG Judith Laure	Chargé de Cours	En poste
31	SIELINOU TEDJON Valérie	Chargé de Cours	En poste
32	TCHAMGOUE Joseph	Chargé de Cours	En poste
33	TSAFFACK Maurice	Chargé de Cours	En poste
34	TSAMO TONTSA Armelle	Chargé de Cours	En poste
35	TSEMEUGNE Joseph	Chargé de Cours	En poste

36	MUNVERA MFIFEN Aristide	Assistant	En poste
37	NDOGO ETEME Olivier	Assistant	En poste

### 6- DÉPARTEMENT D'INFORMATIQUE (IN) (22)

1.	ATSA ETOUNDI Roger	Professeur	<i>Chef de Division MINESUP</i>
2.	FOUDA NDJODO Marcel Laurent	Professeur	<i>Inspecteur Général/ MINESUP</i>

3.	NDOUNDAM René	Maître de Conférences	En poste
4.	TSOPZE Norbert	Maître de Conférences	En poste

5.	ABESSOLO ALO'O Gislain	Chargé de Cours	<i>Chef de Cellule MINFOPRA</i>
6.	AMINOU HALIDOU	Chargé de Cours	<i>Chef de Département</i>
7.	DJAM Xaviera YOUH - KIMBI	Chargé de Cours	En Poste
8.	DOMGA KOMGUEM Rodrigue	Chargé de Cours	En poste
9.	EBELE Serge Alain	Chargé de Cours	En poste
10	HAMZA Adamou	Chargé de Cours	En poste
11	JIOMEKONG AZANZI Fidel	Chargé de Cours	En poste
12	KOUOKAM KOUOKAM E. A.	Chargé de Cours	En poste
13	MELATAGIA YONTA Paulin	Chargé de Cours	En poste
14	MESSI NGUELE Thomas	Chargé de Cours	En poste
15	MONTHÉ DJIADEU Valery M.	Chargé de Cours	En poste
16	NZEKON NZEKO'O ARMEL JACQUES	Chargé de Cours	En poste
17	OLLE OLLE Daniel Claude Georges Delort	Chargé de Cours	<i>Sous-Directeur ENSET Ebolowa</i>
18	TAPAMO Hyppolite	Chargé de Cours	En poste

19	BAYEM Jacques Narcisse	Assistant	En poste
----	------------------------	-----------	----------

20	EKODECK Stéphane Gaël Raymond	Assistant	En poste
21	MAKEMBE. S . Oswald	Assistant	<i>Directeur CUTI</i>
22	NKONDOCK. MI. BAHANACK.N.	Assistant	En poste

### 7- DÉPARTEMENT DE MATHÉMATIQUES (MA) (33)

1.	AYISSI Raoult Domingo	Professeur	<i>Chef de Département</i>
----	-----------------------	------------	----------------------------

2.	KIANPI Maurice	Maître de Conférences	En poste
3.	MBANG Joseph	Maître de Conférences	En poste
4.	MBEHOU Mohamed	Maître de Conférences	En poste
5.	MBELE BIDIMA Martin Ledoux	Maître de Conférences	En poste
6.	NOUNDJEU Pierre	Maître de Conférences	<i>Chef Service des Programmes &amp; Diplômes/FS/UYI</i>
7.	TAKAM SOH Patrice	Maître de Conférences	En poste
8.	TCHAPNDA NJABO Sophonie B.	Maître de Conférences	<i>Directeur/AIMS Rwanda</i>
9.	TCHOUNDJA Edgar Landry	Maître de Conférences	En poste

10	AGHOUKENG JIOFACK Jean Gérard	Chargé de Cours	<i>Chef Cellule MINEPAT</i>
11	BOGSO ANTOINE Marie	Chargé de Cours	En poste
12	CHENDJOU Gilbert	Chargé de Cours	En poste
13	DJIADEU NGAHA Michel	Chargé de Cours	En poste
14	DOUANLA YONTA Herman	Chargé de Cours	En poste
15	KIKI Maxime Armand	Chargé de Cours	En poste
16	LOUMNGAM KAMGA Victor	Chargé de Cours	En poste
17	MBAKOP Guy Merlin	Chargé de Cours	En poste
18	MBATAKOU Salomon Joseph	Chargé de Cours	En poste
19	MENGUE MENGUE David Joël	Chargé de Cours	<i>Chef Dpt /ENS Université d'Ebolowa</i>
20	MBIAKOP Hilaire George	Chargé de Cours	En poste
21	NGUEFACK Bernard	Chargé de Cours	En poste
22	NIMPA PEFOUKEU Romain	Chargé de Cours	En poste
23	OGADOA AMASSAYOGA	Chargé de Cours	En poste

24	POLA DOUNDOU Emmanuel	Chargé de Cours	<i>En stage</i>
25	TCHEUTIA Daniel Duviol	Chargé de Cours	En poste
26	TETSADJIO TCHILEPECK M. Eric.	Chargé de Cours	En poste

27	BITYE MVONDO Esther Claudine	Assistant	En poste
28	FOKAM Jean Marcel	Assistant	En poste
29	GUIDZAVAI KOUCHERE Albert	Assistant	En poste
30	MANN MANYOMBE Martin Luther	Assistant	En poste
31	MEFENZA NOUNTU Thiery	Assistant	En poste
32	NYOUMBI DLEUNA Christelle	Assistant	En poste
33	TENKEU JEUFACK Yannick Léa	Assistant	En poste

#### 8- DÉPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE (MIB) (24)

1.	ESSIA NGANG Jean Justin	Professeur	<i>Chef de Département</i>
2.	NYEGUE Maximilienne Ascension	Professeur	<i>VICE-DOYEN / DSSE</i>

3.	ASSAM ASSAM Jean Paul	Maître de Conférences	En poste
4.	BOUGNOM Blaise Pascal	Maître de Conférences	En poste
5.	BOYOMO ONANA	Maître de Conférences	En poste
6.	KOUITCHEU MABEKU Epse KOUAM Laure Brigitte	Maître de Conférences	En poste
7.	RIWOM Sara Honorine	Maître de Conférences	En poste
8.	NJIKI BIKOÏ Jacky	Maître de Conférences	En poste
9.	SADO KAMDEM Sylvain Leroy	Maître de Conférences	En poste

10	ESSONO Damien Marie	Chargé de Cours	En poste
11	LAMYE Glory MOH	Chargé de Cours	En poste
12	MEYIN A EBONG Solange	Chargé de Cours	En poste
13	MONI NDEDI Esther Del Florence	Chargé de Cours	En poste

14	NKOUDOU ZE Nardis	Chargé de Cours	En poste
15	TAMATCHO KWEYANG Blandine Pulchérie	Chargé de Cours	En poste
16	TCHIKOUA Roger	Chargé de Cours	<i>Chef de Service de la Scolarité</i>
17	TOBOLBAÏ Richard	Chargé de Cours	En poste

18	NKOUÉ TONG Abraham	Assistant	En poste
19	SAKE NGANE Carole Stéphanie	Assistant	En poste
20	EZO'O MENGO Fabrice Téléstor	Assistant	En poste
21	EHETH Jean Samuel	Assistant	En poste
22	MAYI Marie Paule Audrey	Assistant	En poste
23	NGOUE NAM Romial Joël	Assistant	En poste
24	NJAPNDOUNKE Bilkissou	Assistant	En poste

### 9. DEPARTEMENT DE PYSIQUE(PHY) (43)

1.	BEN- BOLIE Germain Hubert	Professeur	En poste
2.	DJUIDJE KENMOE épouse ALOYEM	Professeur	En poste
3.	EKOBENA FOU DA Henri Paul	Professeur	<i>Vice-Recteur. Uté Ngaoundéré</i>
4.	ESSIMBI ZOBO Bernard	Professeur	En poste
5.	HONA Jacques	Professeur	En poste
6.	NANA ENGO Serge Guy	Professeur	En poste
7.	NANA NBENDJO Blaise	Professeur	En poste
8.	NDJAKA Jean Marie Bienvenu	Professeur	<i>Chef de Département</i>
9.	NJANDJOCK NOUCK Philippe	Professeur	En poste
10.	NOUAYOU Robert	Professeur	En poste
11.	SAIDOU	Professeur	<i>Chef de centre/IRGM/MINRESI</i>
12.	TABOD Charles TABOD	Professeur	<i>Doyen FSUniv/Bda</i>
13.	TCHAWOUA Clément	Professeur	En poste
14.	WOAFO Paul	Professeur	En poste
15.	ZEKENG Serge Sylvain	Professeur	En poste
16.	BIYA MOTTO Frédéric	Maître de Conférences	<i>DG/HYDRO Mekin</i>
17.	BODO Bertrand	Maître de Conférences	En poste

18.	ENYEGUE A NYAM épouse BELINGA	Maître de Conférences	En poste
19.	EYEBE FOU DA Jean sire	Maître de Conférences	En poste
20.	FEWO Serge Ibraïd	Maître de Conférences	En poste
21.	MBINACK Clément	Maître de Conférences	En poste
22.	MBONO SAMBA Yves Christian U.	Maître de Conférences	En poste
23.	MELI'I Joelle Larissa	Maître de Conférences	En poste
24.	MVOGO ALAIN	Maître de Conférences	En poste
25.	NDOP Joseph	Maître de Conférences	En poste
26.	SIEWE SIEWE Martin	Maître de Conférences	En poste
27.	SIMO Elie	Maître de Conférences	En poste
28.	VONDOU Derbetini Appolinaire	Maître de Conférences	En poste
29.	WAKATA née BEYA Annie Sylvie	Maître de Conférences	<i>Directeur/ENS/UYI</i>
30.	WOULACHE Rosalie Laure	Maître de Conférence	<i>En stage depuis février 2023</i>
31.	ABDOURAHIMI	Chargé de Cours	En poste
32.	AYISSI EYEBE Guy François Valérie	Chargé de Cours	En poste
33.	CHAMANI Roméo	Chargé de Cours	En poste
34.	DJIOTANG TCHOTCHOU Lucie Angennes	Chargé de Cours	En poste
35.	EDONGUE HERVAIS	Chargé de Cours	En poste
36.	FOUEJIO David	Chargé de Cours	<i>Chef Cell. MINADER</i>
37.	KAMENI NEMATCHOUA Modeste	Chargé de Cours	En poste
38.	LAMARA Maurice	Chargé de Cours	En poste
39.	OTTOU ABE Martin Thierry	Chargé de Cours	Directeur Unité de production des réactifs/IMPM
40.	TEYOU NGOUPPO Ariel	Chargé de Cours	En poste
41.	WANDJI NYAMSI William	Chargé de Cours	En poste
42.	NGA ONGODO Dieudonné	Assistant	En poste
43.	SOUFFO TAGUEU Merimé	Assistant	En poste

**10- DÉPARTEMENT DE SCIENCES DE LA TERRE (ST) (42)**

1.	BITOM Dieudonné-Lucien	Professeur	<i>Doyen / FASA /UDs</i>
2.	NDAM NGOUPAYOU Jules-Remy	Professeur	En poste
3.	NDJIGUI Paul-Désiré	Professeur	<i>Chef de Département</i>
4.	NGOS III Simon	Professeur	En poste
5.	NKOUMBOU Charles	Professeur	En poste
6.	NZENTI Jean-Paul	Professeur	En poste
7.	ONANA Vincent Laurent	Professeur	<i>Chef de Département/Uté. Eb.</i>
8.	YENE ATANGANA Joseph Q.	Professeur	<i>Chef Div. /MINTP</i>

9.	ABOSSOLO née ANGUE Monique	Maître de Conférences	<i>Vice-Doyen / DRC</i>
10.	BISSO Dieudonné	Maître de Conférences	En poste
11.	EKOMANE Emile	Maître de Conférences	<i>Chef Div./Uté Ebolowa</i>
12.	Elisé SABABA	Maître de Conférences	En poste
13.	FUH Calistus Gentry	Maître de Conférences	<i>Sec. d'Etat/MINMIDT</i>
14.	GANNO Sylvestre	Maître de Conférences	En poste
15.	GHOGOMU Richard TANWI	Maître de Conférences	<i>Chef de Div. /Uté Bertoua</i>
16.	MBIDA YEM	Maître de Conférences	En poste
17.	MOUNDI Amidou	Maître de Conférences	<i>CT/MINIMDT</i>
18.	NGO BIDJECK Louise Marie	Maître de Conférences	En poste
19.	NGUEUTCHOUA Gabriel	Maître de Conférences	<i>CEA/MINRESI</i>
20.	NJILAH Isaac KONFOR	Maître de Conférences	En poste
21.	NYECK Bruno	Maître de Conférences	En poste
22.	TCHAKOUNTE Jacqueline épouse NUMBEM	Maître de Conférences	<i>Chef. Cell /MINRESI</i>
23.	TCHOUANKOUE Jean-Pierre	Maître de Conférences	En poste
24.	TEMGA Jean Pierre	Maître de Conférences	En poste
25.	ZO'O ZAME Philémon	Maître de Conférences	<i>DG/ART</i>

26.	ANABA ONANA Achille Basile	Chargé de Cours	En poste
27.	BEKOA Etienne	Chargé de Cours	En poste
28.	ESSONO Jean	Chargé de Cours	En poste
29.	EYONG John TAKEM	Chargé de Cours	En poste
30.	MAMDEM TAMTO Lionelle Estelle, épouse BITOM	Chargé de Cours	En poste
31.	MBESSE Cécile Olive	Chargé de Cours	En poste
32.	METANG Victor	Chargé de Cours	En poste
33.	MINYEM Dieudonné	Chargé de Cours	<i>Chef Serv./Uté Maroua</i>
34.	NGO BELNOUN Rose Noël	Chargé de Cours	En poste
35.	NOMO NEGUE Emmanuel	Chargé de Cours	En poste
36.	NTSAMA ATANGANA Jacqueline	Chargé de Cours	En poste
37.	TCHAPTCHET TCHATO De P.	Chargé de Cours	En poste



38.	TEHNA Nathanaël	Chargé de Cours	En poste
39.	FEUMBA Roger	Chargé de Cours	En poste
40.	MBANGA NYOBE Jules	Chargé de Cours	En poste

41.	KOAH NA LEBOGO Serge Parfait	Assistant	En poste
42.	NGO'O ZE ARNAUD	Assistant	En poste
43.	TENE DJOUKAM Joëlle Flore, épouse KOUANKAP NONO	Assistant	En poste

### Répartition chiffrée des Enseignants de la Faculté des Sciences de l'Université de Yaoundé I

NOMBRE D'ENSEIGNANTS					
DÉPARTEMENT	Professeurs	Maîtres de Conférences	Chargés de Cours	Assistants	Total
BCH	8 (01)	15 (11)	13 (03)	7 (05)	<b>43 (20)</b>
BPA	14 (01)	16 (09)	18 (04)	4 (02)	<b>52 (16)</b>
BPV	6 (01)	12 (02)	13 (07)	3 (00)	<b>34 (10)</b>
CI	7 (01)	15 (04)	5 (01)	1 (00)	<b>28 (06)</b>
CO	6 (01)	18 (04)	11 (04)	2 (00)	<b>37 (09)</b>
IN	2 (00)	2 (00)	14 (01)	4 (00)	<b>22 (01)</b>
MAT	1 (00)	8 (00)	17 (01)	7 (02)	<b>33 (03)</b>
MIB	2 (01)	7 (03)	8 (04)	7 (02)	<b>24 (10)</b>
PHY	15 (01)	15 (04)	11 (01)	2 (00)	<b>43 (06)</b>
ST	8 (00)	17 (03)	15 (04)	3 (01)	<b>43 (08)</b>
<b>Total</b>	<b>69 (07)</b>	<b>125 (40)</b>	<b>125 (30)</b>	<b>40 (12)</b>	<b>359 (89)</b>

Soit un total de **359 (89)** dont :

- Professeurs **69 (07)**
- Maîtres de Conférences **125 (40)**
- Chargés de Cours **125 (30)**
- Assistants **40 (12)**

( ) = Nombre de Femmes **89**

---

## **DEDICACE**

A mes parents,

Mon père NKANDI Hermann et ma mère Limi Mémounati.

---

## REMERCIEMENTS

Le présent travail a été réalisé avec la collaboration du Laboratoire de Biologie Moléculaire (Laboratoire de Réoviridae) de l'hôpital Laquintinie, du Laboratoire de Virologie du Centre mère et enfant de la Fondation Chantal Biya de Yaoundé (Projet SURVAC), et du Laboratoire de Surveillance du Rotavirus de l'Unité des Maladies Virales du CDC- Atlanta, (Centers for Disease Control and Prevention) aux Etats Unis d'Amérique. Sa réalisation n'a été aussi possible que grâce à la générosité et au soutien indéfectible de nombreuses personnes que j'ai l'honneur et le plaisir de remercier ici. Je pense notamment :

Au Professeur **ETOA François-Xavier**, qui malgré ses multiples occupations académiques et administratives, a accepté de superviser ce travail et en plus m'a donné de son temps en me conseillant lorsque les difficultés semblaient prendre le dessus.

Au Docteur **BODA Maurice**, qui m'a donné l'opportunité de faire cette recherche et a consacré du temps pour son suivi jusqu'à son aboutissement. Il m'a offert la chance de travailler dans le domaine qui m'intéresse. Trouvez ici le témoignage de ma reconnaissance et de toute ma gratitude.

Au Professeur **KOKI Ndombo Paul**, Directeur du Centre Mère et Enfant de la Fondation Chantal Biya de Yaoundé, qui nous a garanti un accès inconditionnel au laboratoire de Virologie pour la réalisation de notre travail.

Au Docteur **DISSONGO Jean II**, Directeur de l'hôpital Laquintinie, qui nous a garanti un accès inconditionnel aux différents services sollicités et des facilités pour la réalisation de notre travail.

Au Docteur **NDZE NGUM Valentin** pour son accueil et son suivi en guide de mes premiers pas sur la paillasse de biologie moléculaire, recevez toute notre profonde gratitude.

Au Docteur **ESONA Mathiew** pour le suivi quotidien, les nombreux conseils et toute l'attention accordée à ce travail, recevez toute notre profonde gratitude.

Au Docteur **Bowen Michael** et son équipe pour leur aide précieuse dans la réalisation du séquençage des souches du virus et la synthèse des amorces nécessaires à la réalisation de ce travail. Veuillez trouver ici l'expression de ma plus haute considération.

Au Professeur **NJIKI Bikoi Jacky**, qui a contribué à la réalisation de ce travail. Je lui suis reconnaissante de la disponibilité et de la collaboration dont elle a su faire preuve.

---

Au Docteur **AKINDEH** pour son aide dans l'analyse statistique des résultats de ce travail.

Au Docteur **TCHAMBA Gertrude**, pour ses conseils, ses encouragements et son assistance dans la réalisation de ce travail. Trouvez ici toute ma reconnaissance et mon amitié.

A madame **MOKEBA Gladys**, major du Laboratoire de Biologie Moléculaire (Laboratoire de Réovirideaé) pour l'accueil au sein de son laboratoire. Notre collaboration a été très fructueuse, me donnant ainsi l'occasion d'approfondir les techniques de diagnostic moléculaire.

À tous les enseignants du Département de Biochimie et de Microbiologie, pour toutes les connaissances que j'ai acquises au cours de leurs enseignements.

À tout le personnel des services de pédiatrie des hôpitaux régionaux d'Edéa et de Nkongsamba, des hôpitaux de district de Déido, de Bonassama et de Laquintinie de Douala pour leur collaboration.

Au vétérinaire et personnel de l'abattoir de Bonandalé pour leur collaboration.

A mes frères et sœurs **Mariama, Jouhéretou, Abdou rahaman et Soulémane NKANDI**, pour leur soutien financier et moral.

A mon oncle **NTEDAP Amadou**, pour son soutien et ses précieux conseils.

À tous mes aînés et camarades de laboratoire de Microbiologie, qui par leur bonne humeur, leurs conseils et encouragements m'ont réservé un cadre de travail agréable.

A mes amis **KOUCTCHEP Mavis, AKONO Adrien, YOUNGA Manuella, ZOA Monique, NGAH Carine, BEBE Sandrine** et **NJANKOUO NDAM Youchahou** pour leur bonne humeur, leur soutien, leur encouragement et les moments inoubliables que nous avons partagés.

Il me faut aussi remercier tous ceux qui font partie de ma vie ou qui l'on traversée au fil des années. Comme ils ne sont pas tous susceptibles de lire ces pages un jour, je ferai en sorte de les remercier en personne. Mais je veux ici souligner l'influence de personnes qui me sont chères. Merci à mes grands-mères, de m'avoir donné tout ce qu'elles pouvaient et surtout de m'avoir encouragé à poursuivre mes études dans une région où très peu de femmes envisagent de poursuivre des études supérieures.

Enfin, que tous ceux qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail et qui n'ont pu être cités, trouvent ici l'expression de ma profonde gratitude.

---

## TABLE DE MATIERES

<b>LISTE PROTOCOLAIRE DES ENSEIGNANTS PERMANENTS DE LA FACULTE DES SCIENCES DE L'UNIVERSITE DE YAOUNDE I .....</b>	<b>i</b>
<b>DEDICACE.....</b>	<b>xv</b>
<b>REMERCIEMENTS.....</b>	<b>xvi</b>
<b>TABLE DE MATIERES .....</b>	<b>xviii</b>
<b>LISTE DES ABREVIATIONS ET ACRONYMES .....</b>	<b>xxi</b>
<b>LISTE DES FIGURES.....</b>	<b>xxii</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX .....</b>	<b>xxiii</b>
<b>RESUME.....</b>	<b>xxiv</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>xxiv</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
Questions de recherche : .....	4
Hypothèses : .....	4
Objectifs.....	4
<b>CHAPITRE I : REVUE DE LITTERATURE .....</b>	<b>6</b>
I.1 Généralités sur le Rotavirus A .....	7
I.1.1 Historique et morphologie du virus .....	7
I.1.2 Classification et Nomenclature.....	8
I.1.3 Structure et Organisation du génome .....	9
I.1.4 Mécanisme de réplication du Rotavirus A.....	17
I.1.5 Diversité génétique et le potentiel zoonotique des Rotavirus A.....	20
I.2 Les infections à Rotavirus du groupe A .....	26
I.2.1 Répartition géographique et incidence du Rotavirus A dans le monde.....	26
I.2.2 Transmission des Rotavirus A et Physiopathologie des diarrhées à Rotavirus A ....	27
I.2.3 Activation du système immunitaire face aux infections à Rotavirus A.....	30

I.2.4 Diagnostic de Rotavirus A.....	32
I.2.5 Traitement et prévention.....	39
<b>CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES .....</b>	<b>43</b>
II.1 Cadre et population d'étude .....	44
II.1.1 Cadre de l'étude.....	44
II.1.2 Population de l'étude.....	44
II.2 Collecte des échantillons.....	45
II.2.1 Echantillons humains .....	45
II.2.2 Echantillons des bovins et caprins .....	45
II.2.3 Transport et conservation des échantillons de selles.....	45
II.3 Analyses biologiques .....	45
II.3.1 Détection de la protéine VP6 du RVA par ELISA.....	45
II.3.2 Extraction de l'ARN viral total .....	46
II.3.3 Détection du gène VP6 par RT-PCR suivi de l'électrophorèse sur gel d'agarose ..	47
II.3.4 Détection du gène NSP3 par la PCR en temps réel en une étape.....	48
II.3.5 Typage génétique du Rotavirus A.....	49
II.4 Analyse phylogénétique.....	61
II.5 Analyse statistique .....	61
II.6 Considération éthique .....	62
<b>CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION .....</b>	<b>63</b>
III.1 Résultats.....	64
III.1.1 Détermination de la fréquence des gastroenterites causées par RVA chez les enfants de moins de cinq ans, les bovins et les caprins.....	64
Première conclusion partielle : .....	67
III.1.2 Identification des variants génétiques de Rotavirus A chez les humains, les bovins et les caprins.....	68
Deuxième conclusion partielle : .....	71

---

III.1.3 Détermination des relations phylogéniques entre les souches humaines de RVA en circulation dans la région du Littoral et celles provenant de GenBank. ....	72
Troisième conclusion partielle : .....	80
<b>III.2 Discussion générale.....</b>	<b>81</b>
<b>CONCLUSION GENERALE .....</b>	<b>95</b>
<b>PERSPECTIVES.....</b>	<b>97</b>
<b>RECOMMANDATIONS.....</b>	<b>98</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>99</b>
<b>ANNEXES.....</b>	<b>119</b>

---

## LISTE DES ABREVIATIONS ET ACRONYMES

<b>ARN :</b>	Acide Ribonueclique
<b>ADN :</b>	Acide Désoxyribonucléique
<b>CDC:</b>	<i>Center for Disease Control and Prevention</i>
<b>DLP:</b>	<i>Double layered particle</i>
<b>dNTP:</b>	Désoxyribonucleotide triphosphate
<b>dsRNA:</b>	<i>Double stranded Ribonucleic acid</i>
<b>EDTA:</b>	Ethylene diamine tetra acetic acid
<b>ELISA:</b>	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
<b>EM:</b>	<i>Electron microscope</i>
<b>EPE:</b>	<i>Expended Program on Immunization</i>
<b>E.coli :</b>	<i>Escherichia coli</i>
<b>Ig A:</b>	Immunoglobuline A
<b>MS2:</b>	<i>Emesvirus zinderi</i>
<b>NGS:</b>	<i>Next generation sequencing</i>
<b>NSP:</b>	<i>Non-structural protein</i>
<b>NTC:</b>	<i>Non-technical control</i>
<b>OD:</b>	<i>Optical density</i>
<b>RT-PCR:</b>	<i>Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i>
<b>RVA:</b>	Rotavirus A
<b>RVGE:</b>	<i>Rotavirus gastroenteritis</i>
<b>TBE:</b>	Tris borate EDTA
<b>TLP:</b>	<i>Triple layered particle</i>
<b>TMB:</b>	Tétramethylbenzidine
<b>VP :</b>	<i>Viral protein</i>



---

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1:</b> Rotavirus vu par microscopie électronique à transmission en coloration négative... 8	8
<b>Figure 2 :</b> Arbre phylogénétique de la famille de Reoviridae..... 9	9
<b>Figure 3 :</b> Représentation schématique en coupe transversale d'un virion de Rotavirus..... 12	12
<b>Figure 4:</b> Structure du génome de Rotavirus et Cryo- EM reconstruction du virus..... 16	16
<b>Figure 5:</b> Etapes du cycle de réplication du Rotavirus A..... 19	19
<b>Figure 6:</b> Distribution des génotypes de RVA en Europe et en Afrique..... 21	21
<b>Figure 7:</b> Répartition géographique de la mortalité infantile due à l'infection à RVA en 2016 ..... 27	27
<b>Figure 8:</b> Présentation schématique des possibilités de transmission du Rotavirus A..... 28	28
<b>Figure 9 :</b> Schéma résumant la physiopathologie de la diarrhée à RVA ..... 30	30
<b>Figure 10:</b> Description du principe de la méthode d'ELISA sandwich..... 33	33
<b>Figure 11:</b> Représentation d'un test d'immunochromatographie..... 34	34
<b>Figure 12:</b> Description du principe de la RT-PCR en temps réel..... 36	36
<b>Figure 13:</b> Graphe décrivant la détermination de la valeur du cycle seuil ou « cycle Threshold (CT) » et la quantité d'ADN ..... 37	37
<b>Figure 14:</b> Différents génotypes G et P de RVA identifiés pendant la période pré-vaccinale au Cameroun..... 42	42
<b>Figure 2 :</b> Thermocycleurs ABI 9700 ..... 54	54
<b>Figure 16:</b> A gauche, une cuve d'électrophorèse couplée à un générateur et à droite, une course électrophorétique des acides nucléiques du RVA sur gel d'agarose (Invitrogen) à 1%..... 55	55
<b>Figure 17:</b> Analyseur génétique des séquences ABI PRISM 3130..... 57	57
<b>Figure 18 :</b> Distribution des cas positifs au RVA par tranche d'âge. .... 66	66
<b>Figure 19:</b> Gel présentant les produits de RT-PCR du gène VP6..... 66	66
<b>Figure 20:</b> Analyse phylogénétique des séquences du gène VP7 ..... 74	74
<b>Figure 21 :</b> Analyse phylogénétique des séquences du gène VP4 ..... 78	78

---

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau 1</b> : Principaux gènes, leurs propriétés et les différents génotypes des RVA.....	15
<b>Tableau 2</b> : Différents génotypes de Rotavirus décrits chez les animaux.....	22
<b>Tableau 3</b> : Distribution des génotypes P de RVA par hôte et par ordre de fréquence.....	22
<b>Tableau 4</b> : Caractéristique des vaccins Rotarix et Rotateq .....	40
<b>Tableau 5</b> : Amorces et sondes utilisées pour l'amplification du gène NSP3 .....	48
<b>Tableau 6</b> : Cycles pour l'amplification du gène codant NSP3 par RT-PCR en temps réel ....	49
<b>Tableau 7</b> : Eléments recherchés dans les différents puits .....	50
<b>Tableau 8</b> : Amorces utilisées pour le typage par la qRT-PCR multiplex. ....	50
<b>Tableau 9</b> : Mélange réactionnel pour l'amplification du puits 1 .....	51
<b>Tableau 10</b> : Mélange réactionnel pour l'amplification du puits 2.....	51
<b>Tableau 11</b> : Mélange réactionnel pour l'amplification du puits 3.....	52
<b>Tableau 12</b> : Mélange réactionnel pour l'amplification du puits 4.....	52
<b>Tableau 13</b> : Cycles pour l'amplification par qRT-PCR multiplex .....	53
<b>Tableau 14</b> : Les amorces pour la première PCR I .....	58
<b>Tableau 15</b> : les cycles d'amplification de la PCR I.....	58
<b>Tableau 16</b> : Les amorces de la PCR II.....	58
<b>Tableau 17</b> : Les conditions d'amplification de la PCR II. ....	59
<b>Tableau 18</b> : Résultats d'ELISA répartis en fonction du statut vaccinal .....	65
<b>Tableau 19</b> : Résultats d'ELISA répartis en fonction du mode d'allaitement .....	65
<b>Tableau 20</b> : Distribution des génotypes G et P circulants dans la région du Littoral du Cameroun .....	68
<b>Tableau 21</b> : Distribution de combinaisons génotypiques de RVA circulant chez les enfants de moins de cinq dans la région du Littoral du Cameroun.....	69
<b>Tableau 22</b> : Différents génotypes provenant d'échantillons animaux après NSG. ....	69

---

## RESUME

L'existence de souches circulantes du Rotavirus A (RVA) génétiquement divergentes par rapport à la souche vaccinale est une des principales causes de la faible efficacité vaccinale observée dans les pays à faible revenu. L'introduction du vaccin Rotarix contre le RVA au Cameroun en mars 2014, n'a pas été précédé d'une étude nationale décrivant les souches circulantes de RVA au Cameroun. La présente étude vise à déterminer les variants génétiques du RVA humain et animal circulant dans la région du Littoral du Cameroun et leurs phylogénies après introduction du Rotarix. Durant la période allant de mai 2015 à avril 2016, des échantillons de selles d'enfants âgés de moins de 5 ans hospitalisés pour gastroentérite, ainsi que des échantillons de fèces de bovins et de caprins souffrants de gastroentérite ont été prélevés dans la région du Littoral du Cameroun. La recherche de l'antigène de RVA s'est faite par ELISA et la présence du RVA a été confirmée par RT-PCR en temps réel ciblant le gène NSP3. L'ensemble d'échantillons positifs confirmés ont ensuite été génotypés successivement par (1) la méthode RT-PCR multiplex en temps réel ciblant les gènes VP4, VP7 et les souches vaccinales, (2) RT-PCR conventionnelle ciblant des gènes VP7 et VP4 suivie d'une révélation par électrophorèse puis d'un séquençage de Sanger, (3) nested RT-PCR suivie d'une électrophorèse ou par (4) séquençage de nouvelle génération. L'analyse phylogénétique des séquences VP7 et VP4 a été réalisée par la méthode de « Maximun likelihood » en utilisant le logiciel MEGA 7.0.26. Pour les échantillons humains, le test ELISA a détecté l'antigène du RVA dans 54,6% (71/130) de cas, dont 78,8 % (56/71) cas positifs ont été confirmés par RT-PCR en temps réel. Les combinaisons génotypiques les plus prédominantes étaient G3P[8] (21,4%) suivi de G2P[4] (20%), G1P[8] (14,3%) et G3P[6] (14,3%) avec la présence d'une combinaison mixte atypique G2P[4]P[8] (3,6%). Chez les animaux, 44% (59/134) de positifs ont été détectés par RT-PCR en temps réel. Aucun génotype n'a pu être déterminé par les différentes méthodes de RT-PCR réalisées. Le séquençage de nouvelle génération a déterminé les combinaisons de génotypes suivantes G10P[11] (20%), G1P[8] (40%) et G2P[4] (40%). L'analyse des arbres phylogénétiques a révélé que la majorité des souches identifiées avaient une grande similitude de nucléotides avec les souches locales mais différent de la souche vaccinale. Cependant, quatre souches n'étaient pas alignées et pourraient être des cas suspects de transmission zoonotique. Cette étude post-vaccinale révèle les variants génétiques du RVA non couvert par Rotarix chez les enfants âgés de moins de cinq ans, ainsi que chez les bovins et les caprins dans la région du Littoral du Cameroun. La découverte de souches animales connues chez l'homme suggère la possibilité d'une transmission inter-espèce du virus.

---

## ABSTRACT :

The existence of circulating strains of Group A Rotavirus (RVA) genetically divergent from the vaccine strain is one of the main causes of low vaccine effectiveness observed in low-income countries. The introduction of the Rotarix vaccine against RVA in Cameroon in March 2014, was not preceded by a national study describing the circulating strains of RVA in Cameroon. The present study aims to determine the genetic variant of human and animal Rotavirus A circulating in the Littoral region of Cameroon and their phylogeny after the introduction of the Rotarix vaccine. From May 2015 to April 2016, diarrheal stool samples and socio-demographic data, including vaccination and breastfeeding status, were collected from children under five years old, hospitalised in five hospitals and from animals (cattle and goats) with acute gastroenteritis in the Littoral region of Cameroon. Human samples were tested for RVA antigen by ELISA. ELISA positive samples and animal samples were analysed by real-time RT-PCR targeting the NSP3 gene. Confirmed positive samples were then sequentially genotyped by (1) the multiplex real-time RT-PCR method targeting the VP4, VP7 gene and the vaccine strains, (2) gel-based RT-PCR of the VP7 and VP4 genes followed by the Sanger sequencing, (3) gel based nested RT-PCR or by (4) next-generation sequencing. Phylogenetic analysis of VP7 and VP4 sequences was determined by MEGA 7.0.26 using the Maximum likelihood method to determine relationship between the different strains. For human samples, the ELISA test detected 54.6% (71/130) of cases, of which 78% (56/71) positive cases were confirmed by real-time RT-PCR targeting the NSP3 gene. The most predominant genotypic combinations circulating were G3P[8] (21.4%) followed by G2P[4] (20%), G1P[8] (14.3%) and G3P[6] (14.3%) with the presence of an atypical recombinant genotype G2P[4]P[8] (3.6%). For animal samples, 44% (59/134) of positives were detected by real-time RT-PCR targeting the gene NSP3. Genotyping by different RT-PCR was unsuccessful. The circulating genotypes were determined by NGS, were G10P[11] (20%), G1P[8] (40%) and G2P[4] (40%). Analysis of the phylogenetic trees showed that the majority of the identified strains had a high nucleotide similarity with the local strains. However, four strains did not match known human strains and were suspected to result from zoonotic transmission. This post-vaccination study reveals non-vaccine matching genetic variants of Rotavirus A among circulating in children under the age of five, as well as in cattle and goats in the Littoral region of Cameroon. The finding of known animal strains among humans, suggests the possibility of inter-species transmission of the virus.

---

# INTRODUCTION

---

Les gastro-enterites infectieuses aiguës représentent une cause importante de mortalité et de morbidité infantile dans le monde et les virus sont de plus en plus identifiés en tant que facteurs causaux prédominants (Lestari *et al.*, 2020). Parmi eux, le Rotavirus du groupe A (RVA) est le principal pathogène responsable de diarrhées sévères et mortelles chez les nourrissons et les enfants âgés de moins de cinq ans en particulier dans les pays à faible revenu (Troeger *et al.*, 2018, Lestari *et al.*, 2020). Les gastroentérites sévères causées par les rotavirus A représentent un problème de santé publique qui coûte chaque année la vie à 128.500 enfants de moins de cinq ans (Clark *et al.*, 2017). En effet l'Afrique subsaharienne compte à elle seule 104.733 décès et avec près de 600.000 hospitalisations chaque année (Troeger *et al.*, 2018 ; Shah *et al.*, 2017).

La pratique d'une bonne hygiène limite les complications liées aux infections avec d'autres pathogènes diarrhéiques, mais la vaccination reste la méthode de prévention la plus efficace et sa mise en œuvre a été recommandée par l'OMS à partir de 2006. Ainsi le déploiement de quatre vaccins oraux approuvés (RotaTeq, Rotarix®, ROTAVAC, Rotasiil), a considérablement réduit le taux de mortalité et de morbidité associées aux RVA (Burnett *et al.*, 2018 ; Giri *et al.*, 2020). Aux États-Unis et au Canada, le nombre d'hospitalisations liées au RVA a considérablement diminué, pour atteindre environ 70 000, avec pas plus de 60 décès par an. Malgré l'utilisation des vaccins, le fardeau lié aux infections à RVA reste élevé en Afrique subsaharienne (Than *et al.*, 2014). L'hypothèse proposée pour une efficacité vaccinale réduite serait que le vaccin appliqué ne puisse induire une protection contre les souches en circulation pour plusieurs raisons telles que la présence des souches inhabituelles, le niveau élevé d'infections mixtes et la présence des souches ne pouvant pas être typées. Ajouté à cela la malnutrition, les méthodes d'hygiène réduite et le manque de moyen de diagnostic adéquat ont contribué à l'expansion de cette pathologie (Burnett *et al.*, 2016 ; Tate *et al.*, 2016).

L'application du vaccin anti RVA est devenue effective en Afrique en 2009. Des lors, le nombre de décès et de morbidité liés aux RVA a diminué dans certains pays suite à l'introduction des vaccins contre les RVA (Madhi *et al.*, 2010 ; Magagula *et al.*, 2015 ; De Deus *et al.*, 2017). Entre 2015 et 2016, la prévalence des diarrhées dues aux RVA est passée de 38,3% à 12,2% au Mozambique et de 50,8% à 29% au Swaziland entre 2013 et 2016. En Afrique du Sud, le taux d'hospitalisation a baissé d'un tiers au cours de la même période (Msimang *et al.*, 2013 ; Maphalala *et al.*, 2018). Au Togo, l'introduction de Rotarix en juin 2014 a induit une baisse remarquable (53%) du taux d'hospitalisations liées au RVA au cours des dernières années (Tsolenyanu *et al.*, 2018).

---

Une bonne application des mesures de prévention, de même que l'impact positif de l'application du vaccin ne peuvent être faite qu'à travers une surveillance effective de l'infection. De ce fait, la surveillance des infections au Rotavirus A en Afrique a été mise sur pied depuis deux décennies maintenant et des rapports réguliers de la prévalence sont faits dans des pays comme Egypte, Nigeria, Ghana, Ethiopie, Uganda, Kenya, et Afrique du Sud (Tate *et al.*, 2016 ; ROTA Council, 2016 ; Troeger *et al.*, 2018).

Certaines souches de RVA affectent également de nombreuses espèces animales (bovins, porcs, caprins, chiens, chevaux, oiseaux ainsi que la faune sauvage) causant ainsi d'importantes pertes économiques, quand il s'agit d'animaux domestiques ou des productions animales à grande échelle (Papp *et al.*, 2013). La transmission du virus entre les espèces favoriserait l'émergence de nouvelles souches pouvant présenter les caractéristiques inconnues notamment, une virulence élevée et/ou la résistance au vaccin (Matthijnsses *et al.*, 2011 ; Choudhary *et al.*, 2017). De plus, de nombreuses souches recombinées de RVA entre l'homme et l'animal ont été identifiées, ce qui fait du RVA, l'un des principaux agents pathogènes zoonotiques émergents. (Midgley *et al.*, 2011 ; Valiakos *et al.*, 2018). En effet, des études ont mis en évidence dans des parties du globe des souches de RVA d'origine animale dans des cas de gastroentérites humaines, et vice versa, les animaux les plus impliqués étant les bovins, caprins et porcins. (Cook *et al.*, 2004 ; Valiakos *et al.*, 2018 ; Alkan *et al.*, 2012 ; Choudhary *et al.*, 2017). La surveillance des réassortiments potentiels entre souches humaines et animales doit être régulièrement entreprises afin d'assurer l'efficacité des différentes formules vaccinales disponibles (Midgley *et al.*, 2011 ; Burnet *et al.*, 2018) et envisager la mise au point d'un nouveau vaccin.

Depuis 2007 au Cameroun, grâce aux efforts conjoints de la CDC-Atlanta (Centres de contrôle et la prévention des maladies) et du gouvernement camerounais, à travers le projet SURVAC (Projet de Renforcement de la Surveillance en Afrique Centrale), des efforts ont été faits pour déterminer des paramètres épidémiologiques nationaux des infections à RVA. Les données recueillies pendant des années de surveillance, ont confirmé l'étiologie du RVA dans les gastroentérites infectieuses chez les enfants de moins de 5 ans, au Cameroun. L'épidémiologie moléculaire des souches isolées de RVA a ensuite été étudiée dans certaines régions (Le Nord-Ouest, l'Extrême- Nord, Sud-Ouest et le Centre) (Esona *et al.*, 2003 ; Mbuh *et al.*, 2012 ; Ndze *et al.*, 2012 ; Boula *et al.*, 2014). Cette opération a contribué à l'adoption du vaccin Rotarix par le Cameroun et son introduction dans le Programme Elargi de Vaccination (PEV), le 28 Mars 2014 (PATH, 2014).

---

De plus, ces études menées antérieurement au Cameroun démontrent la présence des génotypes rares et une diversité génotypique en fonction des régions (Esona *et al.*, 2004 ; Esona *et al.*, 2009 ; Esona *et al.*, 2010 ; Ndzé *et al.*, 2013 ; Boula *et al.*, 2014). Pour cette raison, l'introduction du vaccin associée aux spécificités génotypiques locales du virus soulignent l'importance de disposer de nouvelles données épidémiologiques du virus afin de contribuer à élargir la carte génotypique des RVA, d'élaborer des traitements antirotavirus efficaces à long terme, tant au niveau de la prise en charge des personnes infectées qu'au niveau préventif.

### **Questions de recherche :**

- Quelle est la fréquence des gastroentérites causées par le RVA chez les enfants de moins de cinq ans, les bovins et les caprins dans la région du Littoral ?
- Quelles sont les différentes souches de RVA en circulation chez les humains, les bovins et les caprins dans la région du Littoral ?
- Existe-t-il une transmission zoonotique de souches de RVA dans la zone d'étude ?

### **Hypothèses :**

- Le RVA est responsable des gastroentérites chez les enfants de moins de cinq ans, les bovins et les caprins dans la région du Littoral.
- Il existe une diversité de souches de RVA en circulation chez les humains, les bovins et les caprins dans la région du Littoral du Cameroun.
- Il y a transmission zoonotique des souches de RVA dans la zone d'étude.

### **Objectifs**

L'objectif général de ce travail consiste à déterminer les variants génétiques de RVA circulant chez les humains, les bovins et les caprins dans la région du Littoral du Cameroun et leurs relations phylogénétiques.

Il s'agit plus spécifiquement de :

- Déterminer la fréquence des gastroentérites causées par le RVA chez les enfants de moins de cinq, les bovins et les caprins.
- Identifier les variants génétiques de RVA en circulation chez les humains, les bovins et les caprins.



- 
- Déterminer les relations phylogénétiques entre les souches humaines de RVA en circulation dans la région du Littoral et celles provenant de Genbank.

---

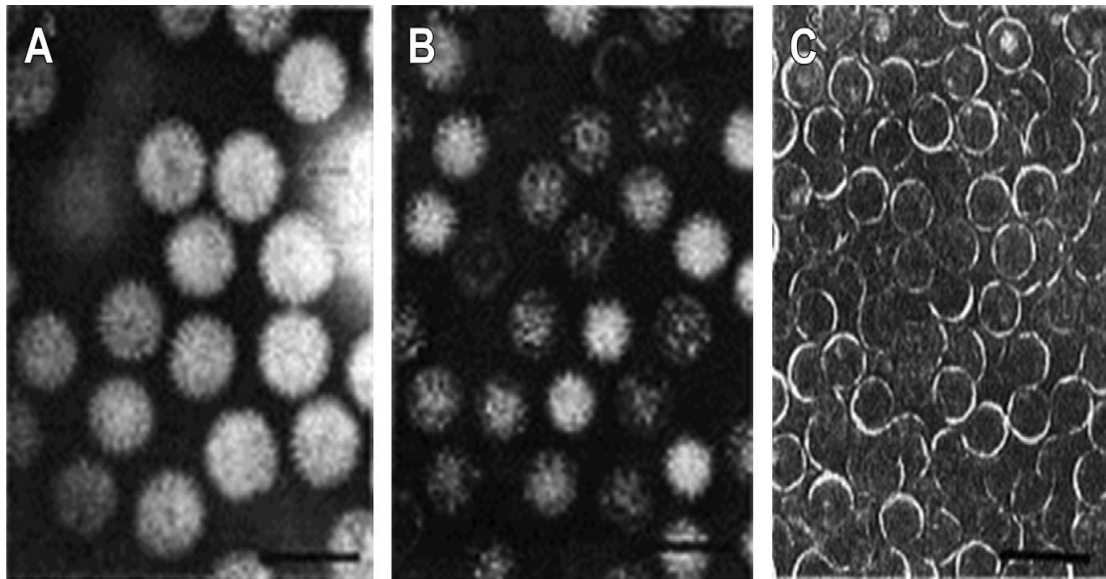
# **CHAPITRE I : REVUE DE LITTERATURE**

---

## I.1 Généralités sur le Rotavirus A

### I.1.1 Historique et morphologie du virus

Le premier groupe de Rotavirus isolé en culture cellulaire provenait de veaux souffrant de diarrhée en 1969 (Anderson et Weber, 2004). Peu après, en 1973, les Rotavirus ont été découverts chez l'humain par l'équipe de Ruth Bishop à Melbourne qui a visualisé des particules virales par microscopie électronique à transmission dans des biopsies duodénales d'enfants atteints de diarrhée (Desselberger, 2014 ; Gautam et Esona, 2015). Flewett montre que ces virus possèdent des caractéristiques antigéniques et morphologiques communes aux reovirus. En microscopie électronique, il a la forme de roue d'où l'origine de son nom (Gautam et Esona, 2015). Le Rotavirus est rependu chez les jeunes mammifères et les oiseaux mais ce sont les RVA qui sont les plus investigués à ce jour (Matthijnsens *et al.*, 2011). En effet, les RVA sont reconnus comme le groupe de Rotavirus le plus important, notamment en lien avec sa prévalence et sa pathogénicité élevée chez l'espèce humaine. D'ailleurs, Il est l'agent causal majeur de sévères diarrhées infantiles dans le monde (Tate *et al.*, 2016 ; Clark *et al.*, 2017). Le Rotavirus est un virus à ARN double brin d'environ 100 nm. Sa capsidie icosaédrique est constituée de trois couches protéiques (Figure 1). La couche interne ou core est constituée de 60 dimères de VP2, renfermant le génome viral ainsi que les protéines VP1 et VP3, qui interviennent dans la transcription et la réplication virale (Li *et al.*, 2009 ; Estes et Greenberg, 2013). La couche intermédiaire ou capsidie interne est constituée de VP6 qui est la protéine majeure et la plus immunogène du virus. Elle est le déterminant de différents groupes de Rotavirus. La couche externe de la capsidie est constituée de 260 trimères de VP7 et 60 trimères de spicules de VP4 (Estes et Kapikian, 2007 ; Than *et al.*, 2014).



**Figure 1:** Rotavirus vu par microscopie électronique à transmission en coloration négative (Gautam et Esona, 2015)

**Légende :** A : Particules virales à triple couche ; B : particules virales à double couche ; C : particules virales à une seule couche

### I.1.2 Classification et Nomenclature

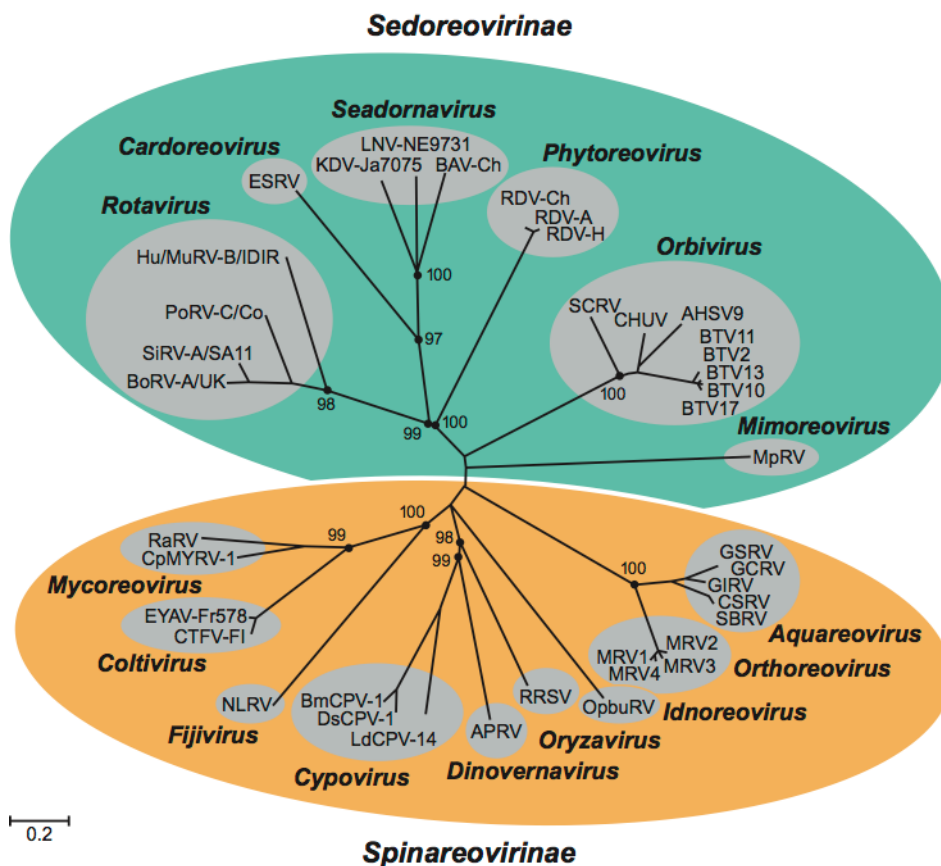
Le Rotavirus appartient à la famille des Réoviridae et à la sous famille des Sedoreovirinae. Cette sous famille est elle-même divisée en six genres : Cardoreovirus, Mimoreovirus, Orbivirus, Phytoreovirus, Seadornavirus, Rotavirus (Figure 2). Ce virus appartient au groupe III de la classification de Baltimore (King *et al.*, 2012 ; Desselberger, 2014). Le genre Rotavirus présente une grande diversité de souches qui ont pu être classées en groupes ou sérogroupes par réactions croisées à l'aide d'anticorps polyclonaux. Dix groupes différents d'A à J ont été décrits à ce jour (Crawford *et al.*, 2017). Les virus du groupe A, B, C ou H infecteraient l'homme et les animaux, alors que les virus du groupe D, E, F, G ou J sont retrouvés uniquement chez les animaux (Estes et Greenberg, 2013 ; Crawford *et al.*, 2017).

Le RVA est responsable de plus de 90% des infections chez les humains. La classification actuelle de RVA est basée sur la caractérisation moléculaire de deux segments du génome viral (segment 9 et segment 7). Le fragment 9 codant pour le gène VP7 définit 36 génotypes appelés G. De même le fragment 4 codant pour VP4 détermine 51 génotypes P (Crawford *et al.*, 2017 ; Sadiq *et al.*, 2019). Dans le cas des types G, les sérotypes et les génotypes sont synonymes. En revanche, l'analyse du gène 4 codant VP4 (génotype P) a abouti à une classification différente des sérotypes en distinguant plusieurs génotypes de type P. Il en résulte une double nomenclature pour le type P où les sérotypes sont désignés par des numéros

arabes et les génotypes par des numéros arabes à l'intérieur de crochets carrés (ex. : la souche P1A[8] fait référence au sérotype 1A et au génotype 8) P (Crawford *et al.*, 2017 ; Sadiq *et al.*, 2019). Néanmoins, les types P sont principalement identifiés par les génotypes. Au total, la caractérisation complète d'une souche de Rotavirus comprend l'origine animale, le groupe, le sérotype ou le génotype G, le sérotype P et le génotype P. Ainsi, la souche de Rotavirus humain Wa est décrite comme : Hu, A, G1, P1A [8] (Estes et Greenberg, 2013).

Le séquençage complet du génome de Rotavirus a permis d'établir une nouvelle classification qui est basée sur l'identité de la séquence du nucléotide pour chacun des onze segments. Cette nouvelle classification est définie comme suit :

Gx-P[x]-Ix-Rx-Cx-Mx-Ax-Nx-Tx-Ex-Hx pour VP7-VP4-VP6-VP1-VP2-VP3-NSP1-NSP2-NSP3-NSP4-NSP5/6 (Desselberger, 2014 ; Esona et Gautam, 2015). De nos jours 36 G, 51 P, 26 I, 22 R, 20 C, 20 M, 31 A, 22 N, 22 T, 27 E et 22 H génotypes sont identifiés chez les humains et les animaux (Matthijnssens *et al.*, 2008, Gautam et Esona, 2015).



**Figure 2 :** Arbre phylogénétique de la famille de Reoviridae (King *et al.*, 2012)

### I.1.3 Structure et Organisation du génome

Le Rotavirus est un virus nu dont le génome est constitué de 11 segments d'ARN double brin (dsARN) dont six qui codent pour les protéines structurales dénommées protéines virales

---

ou « VP » suivis d'un chiffre désignant le rang de poids moléculaire (VP1-VP4, VP6 et VP7) (Figure 3) et cinq qui codent pour six protéines non structurales désignés « NSP » suivis d'un chiffre représentant approximativement le rang de poids moléculaire (NSP1-NSP6). À l'exception du segment 11 qui code pour deux différentes protéines NSP5 et NSP6, tous les gènes de Rotavirus sont monocistroniques (Estes et Kapikian, 2007 ; Li *et al.*, 2009). Les protéines structurales VP4 (Codée par le segment 4) et VP7 (codée par le segment 9) portent des déterminants antigéniques et induisent la synthèse d'anticorps neutralisants (Li *et al.*, 2009 ; Estes et Greenberg, 2013). La glycoprotéine VP7, porteuse de l'antigène G, représente la protéine la plus abondante du virus après VP6 et elle est le constituant principal de la capsid externe. C'est une glycoprotéine qui est stabilisée par les ions calcium (Estes et Kapikian, 2007). La protéine VP4 est une protéine dimérique non glycosylée qui forme des spicules à la surface du virus et porte les déterminants antigéniques de type P (sensible aux protéases) (Li *et al.*, 2009, Esona et Gautam, 2015). Bien que VP4 ne représente qu'un constituant mineur de la capsid externe, elle possède plusieurs propriétés fondamentales. C'est la protéine d'attachement du virus au récepteur cellulaire et l'hémagglutinine de certaines souches de Rotavirus (Estes et Kapikian, 2007 ; Li *et al.*, 2009). Elle est aussi impliquée dans la virulence. Le clivage protéasique de VP4 produit deux protéines VP5\* et VP8\*. Cette dernière porte les épitopes de neutralisation de VP4 (Li *et al.*, 2009 ; Desselberger *et al.*, 2014). Trois des six protéines de structure (VP4, VP6 et VP7) possèdent des propriétés antigéniques qui jouent un rôle important dans la réponse immunitaire de l'hôte et dans le développement des vaccins (Figure 3) (Estes *et al.*, 2013 ; Than *et al.*, 2014).

### **I.1.3.1 Protéines structurales**

#### **I.1.3.1.1 VP1, l'ARN polymérase ARN dépendante**

La protéine VP1 est codée par le premier segment des 11 segments génétiques qui constituent le génome viral (Figure 4). L'existence de quatre motifs communs aux séquences d'ARN polymérase, laisse penser que la protéine VP1 dispose d'une fonction ARN-polymérase. En effet, l'interaction covalente de VP1 avec un analogue structural de nucléotide photo-activable, induit l'inhibition de cette activité (Estes et Greenberg, 2013 ; Gautam et Esona, 2015).

#### **I.1.3.1.2 VP2, protéine de structure**

La protéine VP2 est exprimée à partir du segment 2 (Figure 4). Elle est la composante majoritaire du core formé par l'association de 60 dimères (VP2A et VP2B). Les propriétés

---

hydrophiles du domaine N-terminal de dix protéines VP2 assurent la liaison des ARN des protéines VP3 et des protéines VP1, qui sont encapsulées au sein de cette couche interne. Douze copies de VP1 et VP3 sont incorporées sous forme d'hétérodimères, ancrés à la surface intérieure de VP2, entourées par le génome (ARN) partiellement ordonné et répartis au niveau des sommets des 12 canaux de type I formés par un pentamère de VP2A. Ces canaux relativement petits sont bordés de résidus hautement conservés et ils comportent également des boucles flexibles qui forment une barrière interne et qui sont nécessaires pour le passage de l'ARNm néo-transcrit (Estes et Greenberg, 2013).

#### **I.1.3.1.3. VP3, la guanyltransférase**

La protéine VP3 est une protéine du core viral, codée par le segment 3 (Figure 4). Elle possède une activité guanyltransférase qui lui permet d'ajouter une coiffe en 5' des ARNm (Estes et Greenberg, 2013) et elle possède une activité méthyltransférase lui permettant d'induire la méthylation des ARN exogènes (Gautam et Esona, 2015).

#### **I.1.3.1.4 VP4, la protéine de spicules**

La protéine de la capsid externe VP4 est codée par le segment 4 (Figure 4). Elle est constituée de 60 spicules ancrés au niveau des canaux de type II, qui jaillissent à partir de la surface de la capsid. Cette protéine est sensible aux protéases, de plus elle subit une série de réarrangements structuraux uniques à partir d'un état désordonné, avant clivage par la trypsine, vers une forme trimérique requise pour l'entrée du virus, en passant par le dimère apparent issu de la maturation par la trypsine (Trask *et al.*, 2012). Au cours de l'infection, pendant la protéolyse, les molécules de VP4 sont clivées dans le tube digestif, un environnement riche en protéases, en VP8\* et VP5\* (Estes et Greenberg, 2013). L'entrée du virus impliquant la protéine VP4, s'effectue en plusieurs étapes. Ce processus est initié par l'interaction du domaine globulaire VP8\* avec l'acide sialique. Il en résulte ainsi des changements conformationnels induisant le détachement de VP8\* du squelette de VP5\*, tandis que son domaine N-terminal reste attaché à la base du trimère de VP5\*. VP5\* peut ainsi favoriser l'entrée du virus (Dormitzer *et al.*, 2004).

#### **I.1.3.1.5 VP6, la protéine de la capsid intermédiaire**

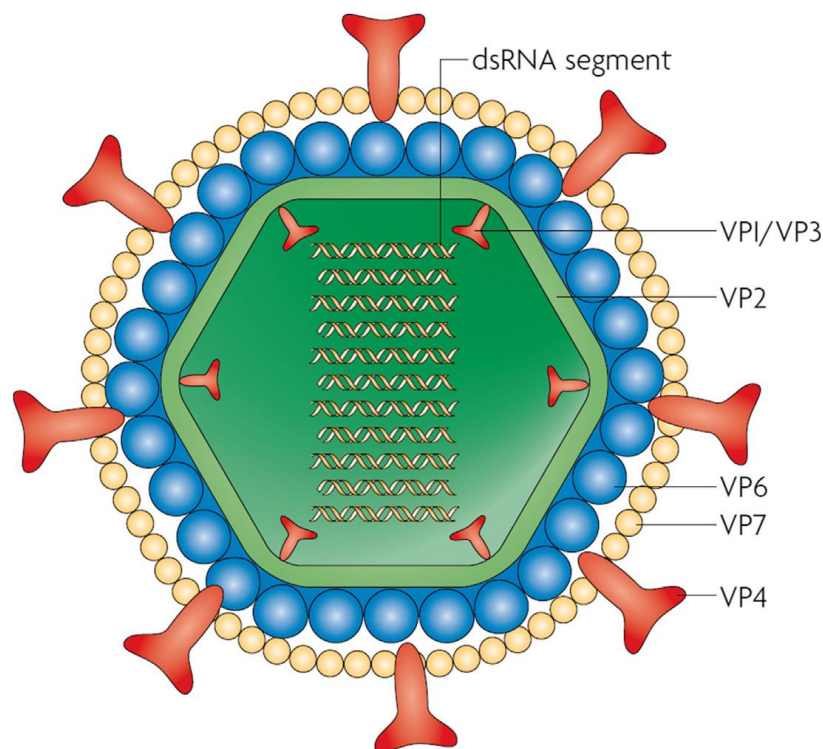
La protéine VP6 représente plus de la moitié (51%) de la masse totale des particules virales (Figure 3). Codée par le segment 6, cette protéine est constituée par un domaine B et un domaine H. Le domaine H intervient dans la formation et la stabilisation des trimères de VP6

---

par le biais d'interactions hydrophobes. D'autre part, il permet également l'interaction avec les protéines VP7 et VP4 (Li *et al.*, 2009).

### I.1.3.1.6 VP7, la glycoprotéine externe

La glycoprotéine majeure externe de la capside VP7, est codée par le segment 9. L'insertion et la rétention de protéine membranaire intégrale VP7 dans la membrane du RE se fait par le biais d'une séquence signal, clivée par la suite au niveau du site de clivage (Gautam et Esona, 2015). Il est important à noter, que l'interaction de VP7 avec les différents récepteurs intégrines est une étape importante pour l'entrée du virus dans la cellule hôte (Figure 3). En plus de la séquence signal, la protéine VP7 contient trois régions majeures antigéniques nommées A, B et C. VP7 comporte également trois motifs tripeptidiques de liaison aux intégrines (Estes et Greenberg, 2013).



**Figure 3** : Représentation schématique en coupe transversale d'un virion de Rotavirus (Crawford *et al.*, 2017).

VP2 : la couche de la capside interne. VP6 : la couche de capside intermédiaire. VP7 : la couche de la capside externe décorée par des spécules VP4. Les enzymes (VP1 et VP3), VP2 et le génome viral composent le noyau.



---

### **I.1.3.2 Protéines non structurales**

#### **I.1.3.2.1 NSP1, interagit avec les ARNm viraux**

La protéine non structurale NSP1 est exprimée très tôt au cours du cycle viral à partir du gène 5. Elle est la moins conservée des protéines virales. D'autre part, le domaine N-terminal de la protéine comporte une séquence riche en cystéines, qui adopte une structure dite « en doigt de zinc », essentielle pour l'interaction avec l'ARNm. Dans le cas du Rotavirus, c'est la protéine NSP1 qui induit la dégradation protéasome-dépendante du facteur de réponse aux interférons (IRF3, IRF5 et IRF7) (Estes et Greenberg, 2013).

#### **I.1.3.2.2 NSP2, une ATPase**

La protéine NSP2 exprimée à partir du gène 8 et d'un poids moléculaire moyen de l'ordre de 36,7 KDa est très conservée. Localisée dans les viroplasmes, inclusions virales, siège de la réplication virale, cette protéine ayant une conformation en anneau octamérique possède une forte affinité pour les ARN double-brin (ARNdb) et les ARN simple-brin (ARNsb) (Li *et al.*, 2009). Cette protéine est également essentielle pour la formation des viroplasmes. Elle interagit avec la protéine NSP5 pour former des structures comparables aux viroplasmes. Une activité NTPase (RNA nucleosidetriphosphatases), Mg<sup>2+</sup> dépendante, a été également associée à la protéine NSP2. Certains auteurs suggèrent que NSP2 pourrait agir comme « un moteur moléculaire » facilitant l'encapsidation des ARNm (Li *et al.*, 2009).

#### **I.1.3.2.3 NSP3, induit l'inhibition de la synthèse des protéines cellulaires**

Détectée durant les premières heures de l'infection au Rotavirus, la protéine NSP3 est présente en grande quantité dans les cellules infectées. Cette protéine exprimée par le segment 7 est constituée de deux domaines fonctionnels (Figure 4). Le premier domaine correspond au domaine de liaison à l'extrémité 3' des ARNm viraux permettant ainsi à la protéine d'assurer son rôle dans le transport spécifique des ARNm vers les sites d'encapsidation et de réplication (Li *et al.*, 2009 ; Gautam et Esona, 2015). Le second domaine fonctionnel, permet la fixation du facteur d'initiation de la traduction eucaryote (eIF4GI). De plus, Il a été démontré que l'interaction de NSP3 avec eIF4GI, induit le déplacement de la polyA binding protein (PAPB) du complexe d'initiation de la traduction (Li *et al.*, 2009).

#### **I.1.3.2.4 NSP4, un récepteur pour la particule virale**

La glycoprotéine NSP4 est produite par le segment 10 sous forme d'un précurseur qui devient mature après sa glycosylation au niveau des arginines 8 et 18 (Figure 4). Cette protéine

---

possède trois domaines hydrophobes N-terminaux et une séquence signal qui assure son ancrage dans la membrane du réticulum endoplasmique tandis que, le domaine C-terminal hydrophile est cytoplasmique (Li *et al.*, 2009). De plus, trois sites de fixation au calcium ont également été identifiés, deux d'entre eux sont localisés dans la partie C-terminale et le troisième est situé dans la partie N-terminale (Li *et al.*, 2009).

D'autre part, de par son implication dans la maturation des particules virales, la protéine NSP4 intervient également dans la distribution des protéines structurales et non structurales, dans la maturation des viroplasmes et dans la régulation de la synthèse des ARNm. Une autre fonction, l'activité entérotoxique, a été également attribuée à la protéine NSP4 (Li *et al.*, 2009). En effet, la protéine NSP4 induit une perturbation des membranes plasmiques, qui entraîne un influx du calcium extracellulaire dans les cellules, par activation du récepteur à la phospholipase C et la production d'inositoltrisphosphate (IP3) (Desselberger, 2014).

#### **I.1.3.2.5 NSP5, une protéine kinase**

La protéine NSP5 est codée par le segment biscistronique 11 et détectée dans les viroplasmes. Cette autokinase existe sous différents états de phosphorylation qui pourraient être à l'origine du processus de sélection des ARN viraux, conduisant à l'encapsidation des ARN génomiques dans les particules virales (Li *et al.*, 2009). En effet, l'inhibition de l'expression de la protéine NSP5 induit une chute de la synthèse des ARN viraux simple et double brin. Un autre rôle est également associé à la protéine NSP5, celui d'une activité ATPase spécifique, magnésium (Mg<sup>2+</sup>) dépendante. Cette activité a été corrélée à un faible niveau déphosphorylation de la protéine NSP5, suggérant ainsi un lien possible entre l'hydrolyse d'ATP et l'activité autokinase (Pesavento *et al.*, 2006).

#### **I.1.3.2.6 NSP6, protéine d'interaction avec les acides nucléiques**

NSP6 est la protéine localisée dans les viroplasmes et codée par la deuxième phase de lecture du segment 11. Les expériences de double-hybride montrent que la protéine NSP6 semble interagir avec la protéine NSP5. De plus, il s'avère que NSP6 est une protéine de liaison aux acides nucléiques, séquence indépendante, avec des affinités similaires pour les ARN simple brin et double brin (Pesavento *et al.*, 2006 ; Gautam et Esona, 2015).

Grâce aux informations obtenues par des essais *in vitro*, par séquençage de l'ARNdb ou par des procédures de cristallographie aux rayons X, les structures anatomiques et fonctions de plusieurs protéines de rotavirus sont mieux comprises.

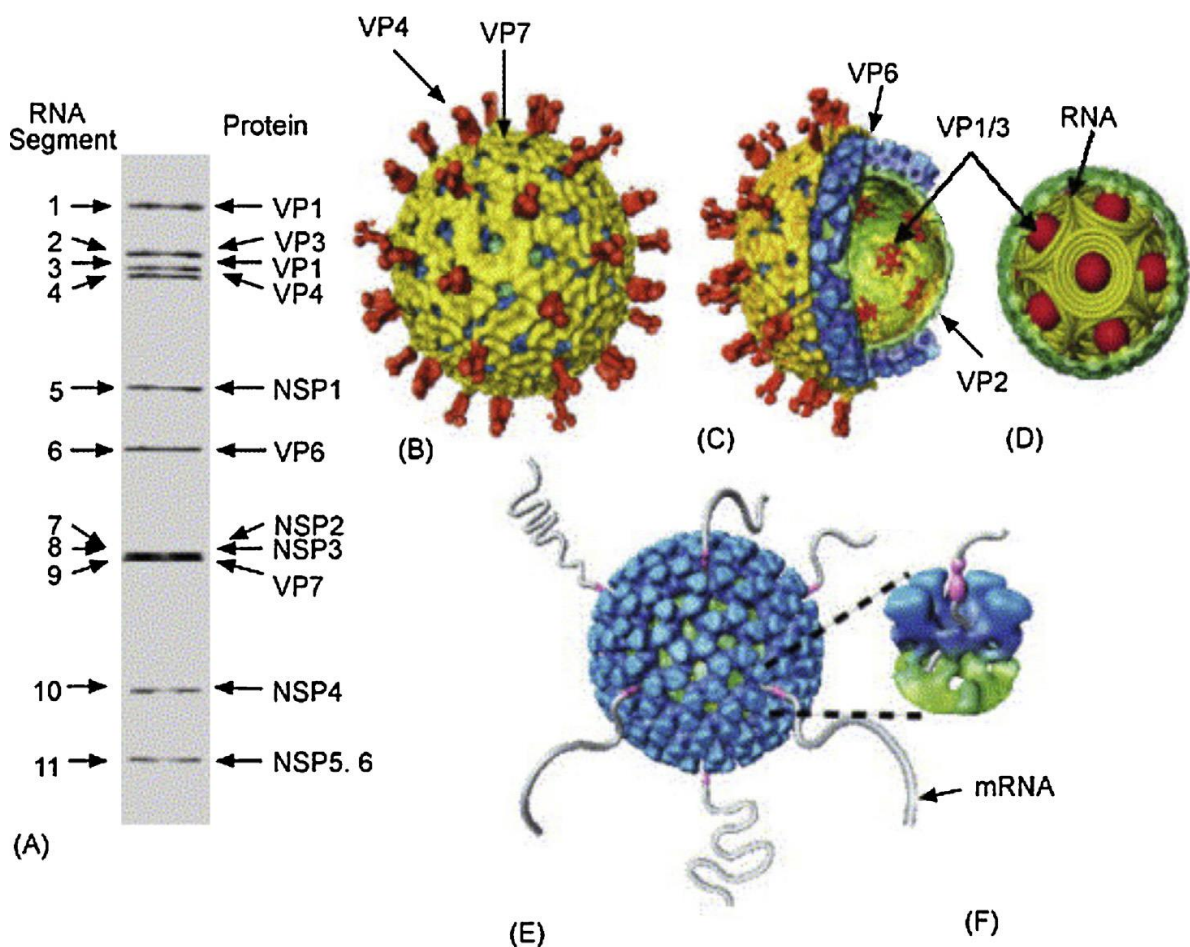
Un résumé descriptif des protéines de rotavirus codées par les segments génomiques est présenté dans le Tableau 1.

**Tableau 1** : les principales protéines, leurs propriétés et les différents génotypes du RVA et (Gautam et Esona, 2015)

Protéines	Génotypes	Longueur du gène (nt)	Propriétés
VP7	27G	1051-1067	Réponse d'antigènes neutralisants (anticorps protecteurs), Glycoprotéine calcium-dépendante
VP4	35P	2349-2368	Protéase-sensible (clive VP4 en VP5* et VP8*), Hémagglutinine, Attachement du virus à la cellule, Réponse d'antigènes neutralisants (anticorps protecteurs), virulence
VP6	16I	1347-1362	Transcription, Réponse d'antigènes pour le groupe et sous-groupe de rotavirus, Anticorps partiellement protecteurs
VP1	9R	3302-3305	ARN Polymérase ARN dépendante, lie l'ARNsb, forme un complexe avec VP3
VP2	9C	2684-2753	Protéine interne, lie l'ARN, requise pour l'activité réplacase de VP1
VP3	8M	2582-2592	Guanylyltransférase, Méthyltransférase, lie l'ARNsb, forme un complexe avec VP1
NSP1	16A	1564-2122	Antagoniste à l'interféron, Spécificité d'hôte, lie l'ARN
NSP2	9N	1042-1059	NTPase, forme les viroplasmes avec NSP5, emmagasinage de l'ARN polarité +
NSP3	12T	1064-1105	Traduction (lie l'extrémité 3' des ARNm), inhibe la traduction de l'hôte
NSP4	14E	727-753	Entérotoxine, Viroporine, Modulateur du calcium intracellulaire, récepteur intracellulaire pour DLPs, virulence
NSP5/NSP6	11H	663-820	Phosphoprotéine, Protéine kinase, forme les viroplasmes avec NSP2
			Interagit avec NSP5, présent dans les viroplasmes

Le génome fragmenté du Rotavirus représente au total 18 522 paires de base, tous les segments sont riches en bases A et T (58% à 67 % d'A+T) (Gautam et Esona, 2015). Le séquençage nucléotidique des segments de Rotavirus a permis de définir les principales caractéristiques pour chacun des gènes. Chaque segment commence par une guanidine en 5' suivie d'une séquence conservée qui représente une partie de l'extrémité non codante puis d'un cadre de lecture ouvert (open reading frame) (Estes et Greenberg, 2013). La plupart des

segments portent un seul cadre de lecture excepté les gènes 7, 9 et 11, mais pour ces gènes un seul cadre de lecture serait utilisé. Le segment se termine par une seconde partie non codante qui contient différentes séquences conservées. Le dernier nucléotide à l'extrémité 3' est toujours une cytidine (Estes et Greenberg, 2013). La taille des séquences non codantes en 3' et 5' varie d'un segment à l'autre, mais la longueur est conservée pour chaque segment d'une souche à une autre à l'exception de l'extrémité 3' du segment 7 et 10. On ne retrouve pas de signal de polyadénylation à l'extrémité 3' des gènes. Par contre, les séquences conservées contiennent des signaux qui seraient nécessaires à la transcription, réplication et probablement à l'encapsidation du génome (Estes et Greenberg, 2013).



**Figure 4:** Structure du génome de Rotavirus et Cryo-EM reconstruction du virus (Desselberger, 2014).

(A) : Structure du Rotavirus montrant les protéines des 11 segments d'ARN génomique séparées sur un gel polyacrylamide. Les segments de gène sont numérotés à gauche et les protéines à droite. (B) Reconstitution Cryo-EM de la particule à trois couches de rotavirus. La protéine de pointe VP4 est colorée en orange et la couche VP7 en jaune. (C) une vue en coupe des particules à trois couches du rotavirus montrant les couches intérieures VP6 en bleu, VP2 en vert et les enzymes transcriptionnelles en rouge ancrées à l'intérieur de la couche VP2. (D) Représentation schématique de l'organisation du génome dans le rotavirus. (E et F) Modèle de reconstruction Cryo-EM de la transcription des particules à double couche.

---

#### I.1.4 Mécanisme de réplication du Rotavirus A

La réplication des Rotavirus A s'effectue dans les viroplasmes retrouvés exclusivement dans le cytoplasme des entérocytes matures (Knipe et Howley, 2013). Elle se déroule suivant un cycle typique de réplication virale où s'enchaînent l'attachement des virus infectieux à des récepteurs cellulaires, la pénétration et la décapsidation des virus dans la cellule, la synthèse de l'ARN viral avec réplication du génome, l'assemblage des virions, la maturation et la libération des virions (Desselberger, 2014). Un grand nombre d'études sur la réplication des Rotavirus a été effectué sur la lignée cellulaire MA104 avec la souche de Rotavirus simienne (Knipe et Howley, 2013 ; Trask *et al.*, 2012). La réplication des Rotavirus A diffère en fonction de la lignée cellulaire. Les flux de calcium entre les compartiments cellulaires jouent un rôle prépondérant durant le cycle viral, en particulier lors des étapes de décapsidation et dans la morphogénèse des particules de Rotavirus A (Bugarcic et Taylor, 2006).

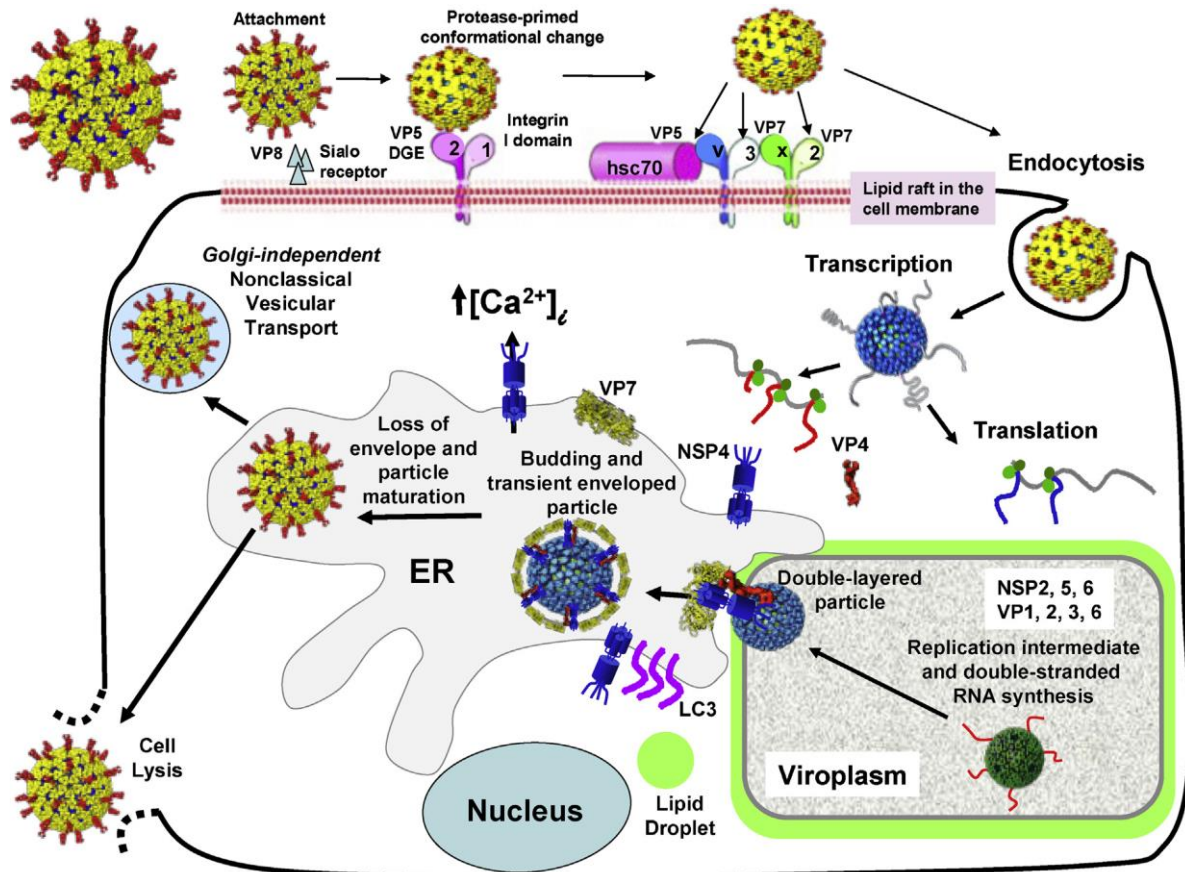
L'attachement du virus se fait par le biais de la protéine VP4. D'abord, lors de leur arrivée dans le système intestinal, les Rotavirus A sont exposés aux protéases intestinales, telles que la trypsine, qui engendrent le clivage de la protéine VP4 constituant les projections situées sur la capsid externe du virus (Benureau *et al.*, 2005). Cette étape permet à la protéine flexible VP4 de se soumettre à des changements de conformation et d'exposer ses domaines N-terminal VP8\* et C-terminal VP5\* qui demeurent associés au virus. L'exposition dans l'intestin des particules virales permettrait aux protéases de cliver la protéine VP4 en VP5\* et VP8\*. Suivant cette étape de clivage protéolytique, l'attachement des Rotavirus A serait médié par le domaine VP8\*, qui se lie avec des récepteurs cellulaires contenant l'acide sialique (Dormitzer, 2002). Le domaine correspondant à VP8\* permet la reconnaissance des ligands. Cependant les travaux effectués *in vitro* sur plusieurs lignées cellulaires sensibles au Rotavirus A suggèrent que l'acide sialique, les intégrines (Haselhorst *et al.*, 2009 ; Seo *et al.*, 2008) et les antigènes de groupe sanguin sont des ligands du Rotavirus A intervenant lors de la phase d'attachement (Hu *et al.*, 2012 ; Nordgren *et al.*, 2014). Après l'étape d'attachement, la pénétration du virus peut se faire par endocytose, médiée par la protéine VP5\*, ou par pénétration directe de la particule dans la cellule (Wolf *et al.*, 2011). Enfin, selon la souche de RVA, les voies d'endocytose sont différentes (Gutiérrez *et al.*, 2010). La diminution des concentrations en ions Ca<sup>2+</sup> dans l'endosome entraîne une décapsidation partielle du Rotavirus A avec la perte de la couche externe constituée de VP7, VP5\* et VP8\*. La disparition des membranes endosomales entraînent la libération des particules virales double couche (Core ; VP1-3 et couche intermédiaire VP6) dans le cytoplasme (Desselberger, 2014).

---

La transcription et la traduction du génome viral ont ensuite lieu dans le cytoplasme de la cellule. La synthèse des nouveaux ARN viraux résulte de l'activité des protéines structurales VP1 (l'ARN polymérase ARN-dépendante) et VP3 (l'enzyme coiffante ayant des activités phosphodiesterase, guanylyltransférase et méthylase) à l'intérieur des complexes de réplication que sont les viroplasmes. Produits en grande quantité, les ARN de polarité positive nouvellement synthétisés servent de messagers au début du cycle infectieux alors qu'à la fin du cycle de réplication, ils restent dans le core où ils servent de matrice pour la synthèse des brins complémentaires et ainsi former de nouveaux génomes viraux double brin (Desselberger, 2014). Au début du cycle de réplication, l'emphase est mise sur la traduction de l'ARN viral afin de permettre aux différentes protéines virales de remplir leurs fonctions spécifiques dans la suite du processus de réplication. Dans le but de prioriser la traduction de l'ARN viral, la protéine NSP3 aurait pour fonction de se lier à l'extrémité 3' des ARN viraux et d'expulser la protéine liant le polyA des ARN messagers cellulaires (Jayaram *et al.*, 2004). La traduction des ARN messagers cellulaires serait donc inhibée alors que celle des ARN viraux en serait amplifiée. L'assemblage des particules virales se fait au niveau des viroplasmes. Ces structures contiennent plusieurs protéines virales (VP1, VP2, VP3, VP6, NSP2, NSP5 et NSP6 chez certaines souches), mais leur formation est dépendante de la présence des protéines non structurales NSP2 et NSP5 et de gouttelettes lipidiques cellulaires. Une fois intégrés dans les viroplasmes via la protéine NSP2, les ARN<sup>+</sup> servent alors de gabarit pour la synthèse d'ARN- et la formation de l'ARN<sup>db</sup> à l'aide du complexe de réplication formé par VP1/VP3 (Jayaram *et al.*, 2004). Des unités d'assemblage initial se forment ensuite à partir des complexes VP1/VP3/ARN viral joints aux dimères de VP2. Lorsque douze de ces unités s'assemblent et encapsident les segments génomiques, ils forment alors les noyaux des particules virales (Berois *et al.*, 2003). Une fois formés, les noyaux de particules virales sont rapidement enrobés par la protéine VP6, formant ainsi de nouvelles DLPs qui sortiront alors des viroplasmes par bourgeonnement à travers le réticulum endoplasmique en vue de la maturation (Desselberger, 2014).

La protéine NSP4 joue un rôle clé dans la maturation des particules virales (Silvestri *et al.*, 2005). Elle est localisée au niveau du réticulum endoplasmique et interagit avec la protéine VP6 (Estes et Greenberg., 2013). De plus, elle tient le rôle de « viroporine » en augmentant les taux intracellulaires d'ions de calcium nécessaires à la stabilisation de la capsid externe (VP7) des TLPs. Cette action fait donc de la protéine NSP4 un élément essentiel au processus de maturation des particules de Rotavirus qui s'avère être calcium-dépendant. À l'intérieur du réticulum endoplasmique, les particules de Rotavirus sont transitoirement enveloppées jusqu'à

l'acquisition de la couche externe (Desselberger, 2014). Cette enveloppe disparaît dans le réticulum endoplasmique sans que le mécanisme en soit élucidé, il coïncide avec le greffage aux DLP des trimères de protéine VP4. A l'intérieur du réticulum endoplasmique, la maturation des capsides s'achève par l'addition des protéines VP7. Le virus est libéré dans la lumière intestinale après la lyse des entérocytes (Figure 5) (Desselberger, 2014).



**Figure 5:** Etapes du cycle de réplication du Rotavirus A (Desselberger, 2014).

Les particules à trois couches de Rotavirus (TLP) se fixent d'abord aux sialo-glycanes à la surface de la cellule hôte. Le virus pénètre par endocytose médiée par le récepteur. L'élimination de la couche externe, déclenchée par la faible teneur en calcium, entraîne la libération de particules à double (DLP) transcriptionnellement actives dans le cytoplasme. Les DLP commencent la transcription des ARNm qui sont traduits en protéines virales. Une fois que suffisamment de protéines virales sont fabriquées, le génome de l'ARN est répliqué et conditionné dans les DLP nouvellement fabriqués dans les viroplasmes. Les nouveaux DLP se lient à NSP4 qui sert de récepteur du réticulum endoplasmique. NSP4 agit comme une viroporine pour libérer des ions calcium des réserves intracellulaires. Les membranes transitoires sont éliminées au fur et à mesure que les protéines VP4 et VP7 s'assemblent, ce qui entraîne la maturation des TLP. Les virions sont libérés par lyse cellulaire.

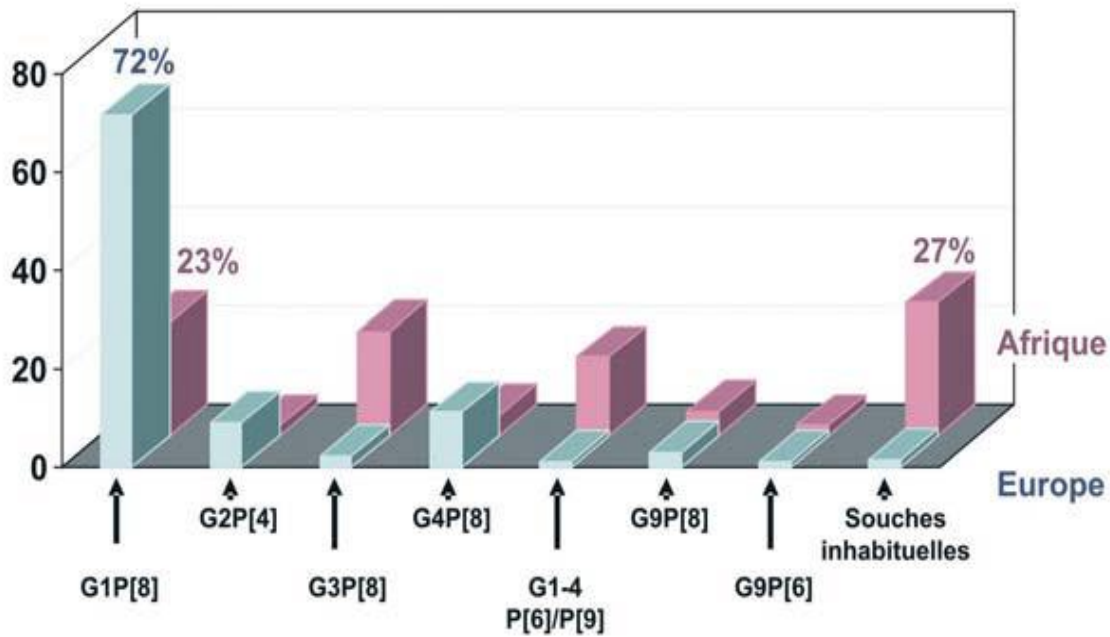
---

## I.1.5 Diversité génétique et le potentiel zoonotique des Rotavirus A

### I.1.5.1 La distribution des génotypes de Rotavirus A chez les humains

Ces dernières années, de nombreuses études d'épidémiologie moléculaire ont pu définir les sérotypes et/ou les génotypes des souches de Rotavirus A impliquées dans les infections humaines. Les données disponibles quant à la distribution des souches de Rotavirus A sont principalement concentrées sur les gènes VP7 et VP4 de la capsid externe qui fournissent des informations intéressantes (Matthijnsens *et al.*, 2008). En effet, ces gènes produisent indépendamment les anticorps neutralisants, ce qui les rend pertinent en termes de protection immunitaire et de développement de vaccins. En plus, ils sont associés à une grande diversité de souches (Matthijnsens *et al.*, 2008 ; Estes et Greenberg, 2013). Les sérotypes et génotypes les plus fréquemment retrouvés sont les types G1 à G4 (plus de 90 % des souches) et les types P[4] et P[8]. Les associations les plus répandues sont G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8], G9P[8] et G12P[8] (Esona *et al.*, 2009 ; Matthijnsens *et al.*, 2009). Toutefois, les RVA de type G1-G4 ne sont pas les seuls retrouvés chez l'homme (Matthijnsens *et al.*, 2009). Les type G5, G6, G8, G10 ou de type P[6], P[9], P[11], P[13], P[14] ou P[19] ont été isolés dans différentes régions du monde. Ces souches de type G ou P inhabituels sont surtout localisées géographiquement dans les pays en développement (Mwenda *et al.*, 2010 ; Esona *et al.*, 2010). Les souches les plus courantes en Europe et aux USA sont : G1P[8], G2P[4], G4P[8], G3P[8] et G9P[8] (Figure 6). D'autres souches sont observées dans certains pays : G5P[8] au Brésil; G8P[8], G5P[7], G4P[6] en Afrique et G10P[11] ou G12P[4]/P[6] en Inde (Gentsch *et al.*, 2005 ; Banyai *et al.*, 2012 ).





**Figure 6:** Distribution des génotypes de RVA en Europe et en Afrique (Pothier et Agnello, 2012)

### I.1.5.2 La distribution des génotypes de Rotavirus A chez les animaux

Le principal réservoir de Rotavirus sérogroupes A, B et C est l'homme ; néanmoins, des cas d'infection par des RVA chez des veaux, des porcs, des poulains, des chats, des chiens et certains oiseaux ont été signalés. Les RVA observés chez les animaux semblent très étroitement apparentés aux souches infectant l'homme. Ces animaux sont donc également considérés comme des réservoirs importants de Rotavirus humains (Matthijnsens *et al.*, 2011 ; Valiakos *et al.*, 2018). De ce fait, il existe un réel risque de réassortiment génique et de transmission inter espèces qui conduirait à l'émergence de nouveaux génotypes. Le RVA est en constante évolution, ainsi des souches inhabituelles G5, G6, G8, G9, G10 ou de type P[6], P[3], P[11], P[14] ont récemment émergé dans de nombreux pays (Mwenda *et al.*, 2010 ; Esona *et al.*, 2010 ; Banyai *et al.*, 2012). Les types G5 et P[6] sont retrouvés chez le porc et le cheval, G8, G6, G10 et P[11] chez les bovins et P[3] chez les chiens et les chats (Tableau 2). La majorité des génotypes P présente une spécificité de l'hôte par exemple P[4], P[8], P[6] sont presque exclusivement retrouvés chez l'homme tandis que P[13] est présent chez le porc et P[12] chez le cheval (Tableau 3) (Liu *et al.*, 2012).

L'émergence de ces génotypes inhabituels chez l'homme semble liée à des réassortiments naturels entre des souches humaines et des souches animales. En effet, la nature

segmentée du génome du RVA favorise les échanges de segments d'ARN (réassortiments) lors de la co-infection d'un homme ou d'un animal par deux souches différentes de Rotavirus (humaines et/ou animales) (Matthijssens *et al.*, 2011). Ce réassortiment naturel a conduit à la genèse de nouveaux virus.

**Tableau 2** : Différents génotypes de Rotavirus décrits chez les animaux (Pothier et Agnello, 2012)

<b>Animaux de compagnies</b>	<b>Génotypes de Rotavirus</b>
Felins et canins	G3
Bovins	G6P[5] , G8P[1] , G10P[11] et G12P[6]
Porcs	G9P[19]
Lapins	G3P[14]
Equins	Les sous types G5 et G10
Moutons	Les sous types G6 et G10
Caprins	Les sous types G6

**Tableau 3** : Distribution des génotypes P de RVA par hôte et par ordre de fréquence (Trask *et al.*, 2012)

<b>Génotype P</b>	<b>Hôte par ordre de fréquence</b>
P1	Bovin > Humain > Porcin > Singe > Caprin > Equin > Camélidés
P2	Singe > Humain
P3	Canins > Humain > Félin > Singe > Bovin > Caprin
P5	Bovin
P7	Porcin > Bovin > Humain
P10	Humain
P12	Equin
P13	Porcin
P15	Ovin > Bovin
P16	Murin
P18	Equin
P20	Murin
P21	Bovin
P22	Loup
P23	Porcin
P24	Singe
P26	Porcin
P27	Porcin
P28	Humain
P29	Bovin
P32	Porcin
P33	Bovin

P34	Porcin
P4	Humain
P6	Humain > Porcin
P8	Humain
P19	Porcin > Humain
P9	Humain > Félin > canin
P14	Humain > Bovin > loup > Caprin
P25	Humain
P11	Bovin > Humain
P17	Aviaire (poulet) > Bovin
P30	Aviaire (poulet)
P31	Aviaire (poulet)
P35	Aviaire (poulet)

Légende : > plus fréquent chez

### I.1.5.3 Les mécanismes viraux associés à l'évolution et la diversité génétique des Rotavirus

#### A

Plusieurs mécanismes génétiques sont à l'origine de l'évolution des Rotavirus principalement de souches humaines notamment l'accumulation de mutations ponctuelles, le réassortiment du génome et le réarrangement du génome (Gómara *et al.*,2003).

#### ➤ L'accumulation de mutations ponctuelles

Lors du cycle de réplication virale, des erreurs de transcription des acides nucléiques par l'enzyme polymérase ont lieu inévitablement et engendrent des mutations. La plupart des mutations impliquent des changements d'un nucléotide unique (réfèrent au terme « mutations ponctuelles »), quoique des phénomènes d'insertion et de délétion de nucléotides contigus surviennent également (Sanjuán et Domingo-Calap, 2016). Le taux d'erreur des transcriptions des acides nucléiques par l'enzyme polymérase de Rotavirus est élevé, notamment en lien avec l'absence de mécanismes cellulaires de correction de lecture ou « proofreading » lors de la réplication de l'ARN viral. Ainsi, ce taux a été estimé à  $5 \times 10^{-5}$  mutations par base répliquée, à partir d'études sur le segment 11 (NSP5) d'une souche de Rotavirus *in vitro*. En tenant compte du génome entier de Rotavirus, ce taux représente au moins une mutation par cycle de réplication (Jenkins *et al.*,2002).

#### ➤ Le réassortiment du génome

Lorsqu'une cellule est co-infectée par deux souches différentes d'un même groupe de Rotavirus, les deux génomes subiront alors une transcription en parallèle et leurs segments d'ARNdb peuvent être assemblés (réassortis) dans un même virion (Papp *et al.*, 2013). Ce phénomène de réassortiment est également connu sous le terme de cassure antigénique «

---

antigenic shift ». Toutefois, il semble que le mécanisme de réassortiment ne soit pas aléatoire et sa fréquence varierait selon plusieurs facteurs liés à la cellule infectée et aux souches virales impliquées (Park *et al.*, 2011). Lors d'un réassortiment de génomes, le taux d'événements dépend de la fréquence de co-infections de Rotavirus dans la population étudiée. Par exemple, un taux élevé de co-infections de RVA chez les humains a été noté dans les pays tropicaux, ce qui serait relié à un taux plus élevé de réassortiments et donc une plus grande diversité génétique (Banyai *et al.*, 2012). Des phénomènes de réassortiments ont été décrits à partir de souches de Rotavirus provenant d'une même espèce hôte, mais également entre souches de Rotavirus ayant une origine multi-espèce (incluant les humains et plusieurs espèces animales, telles que le porc et le bovin (Park *et al.*, 2011, Valiakos *et al.*, 2018).

➤ **Le réarrangement du génome (ou recombinaison)**

Le phénomène de recombinaison implique l'échange de séquences nucléotidiques entre des Rotavirus différents (mais habituellement étroitement reliés) lors de la réplication virale à l'intérieur d'une même cellule infectée (Parra *et al.*, 2004). Dans la plupart des cas, les réarrangements sont le résultat d'une duplication qui survient en aval de la séquence normale de l'ORF (Estes et Greenberg, 2013). Ce type de réarrangement permet aux gènes d'exprimer leur produit protéique normal. Chez les virus segmentés comme les Rotavirus, la recombinaison peut être intra-segmentaire (recombinaison entre des segments génomiques apparentés provenant de deux souches) ou inter-segmentaire (recombinaison entre des segments de gènes non apparentés) (Parra *et al.*, 2004). La recombinaison intra-segmentaire est beaucoup plus fréquente et, dans la plupart des cas, la duplication partielle des segments génomiques se produit lors de la synthèse des ARN à brin positif (Matthijnssens *et al.*, 2006 ; Matthijnssens et Desselberger, 2012). Ainsi, les souches réassorties ont le potentiel d'émerger en compétitionnant avec les autres souches.

- **Le potentiel zoonotique des Rotavirus A**

De plus en plus d'évidences tendent à démontrer le potentiel de transmission zoonotique des Rotavirus, notamment en ce qui concerne les RVA (Martella *et al.*, 2010). De plus, des analyses phylogénétiques de génomes entiers de RVA détectés chez l'humain ainsi qu'une variété d'espèces animales ont permis de révéler une grande proximité, en termes d'évolution génétique, entre les souches humaines de type « Wa » et les souches porcines ainsi qu'entre les souches humaines et les souches bovines (Matthijnssens *et al.*, 2008). Une origine commune a donc été suggérée pour ces souches. Bien que les génotypes G et P de RVA soient généralement

---

spécifiques à une seule espèce, un certain nombre de génotypes a été détecté chez plusieurs espèces animales, y compris l'humain (Martella *et al.*, 2010). Une histoire évolutive commune jumelée potentiellement à une transmission inter-espèces serait possible. D'ailleurs, plusieurs espèces animales sont considérées comme de potentiels réservoirs pour des RVA zoonotiques. Parmi ces espèces, on retrouve les porcs mais aussi les bovins, les ovins, les félins et les canins (Martella *et al.*, 2010, Midgley *et al.*, 2012). Plusieurs études ont suggéré une origine animale des segments VP7 et/ou VP4 (appartenant aux génotypes G3, G4, G5, G9, P[6] ou P[7]) détectés à partir d'échantillons cliniques humains (Papp *et al.*, 2013). Plus précisément, chez l'espèce humaine, un total de 10 génotypes G et 7 génotypes P d'origine porcine ont été identifiés (Vlasova *et al.*, 2017). L'émergence mondiale des souches G9 et G12 dans la population humaine serait d'ailleurs le résultat de phénomènes de réassortiment entre souches porcines et humaines (Rahman *et al.*, 2007). Le contact inter-espèces et la contamination d'hôtes par des virus de diverses origines peuvent favoriser l'adaptation de ces micro-organismes à de nouvelles espèces et causer des transmissions directes inter-espèces et/ou zoonotiques. Ces souches humaines réassorties peuvent alors potentiellement circuler dans la population humaine, comme il a été démontré pour les souches G9P[8], G12P[6]/P[8], G10P[11] ayant des origines porcines ou bovines (Rahman *et al.*, 2007). Récemment, des souches de Rotavirus contenant un génome entièrement d'origine animale (porcine, bovine) ont été retrouvées à partir de cas cliniques humains, suggérant des transmissions zoonotiques directes (Komoto *et al.*, 2013). Toutefois, les liens épidémiologiques inter-espèces sont souvent manquants. Certaines études rapportent une preuve limitée de contact indirect ou de cohabitation entre des patients positifs pour les RVA et des porcs ou bovins (Doro *et al.*, 2015). Les pays en voie de développement détectent plus fréquemment des cas d'infections humaines associées à une transmission zoonotique de RVA comparativement aux pays industrialisés (Doro *et al.*, 2015). Ce portrait semble suggérer que le contexte socio-culturel (proximité avec les populations animales, problèmes d'hygiène et d'approvisionnement en eau propre, un taux d'infection élevé avec de multiples souches de RVA) a probablement un impact sur la pression de sélection des souches réassorties et/ou zoonotiques (Cook *et al.*, 2004). Contrairement aux RVA, il existe très peu de données quant à la transmission inter-espèces des souches virales appartenant aux autres groupes de Rotavirus. Néanmoins, malgré l'accumulation de données moléculaires reliant des souches de Rotavirus multi-espèces, des études épidémiologiques décrivant les événements réels de transmission inter-espèces sont manquantes. Pour le moment, les évidences zoonotiques semblent seulement indiquer des cas isolés.

---

## **I.2 Les infections à Rotavirus du groupe A**

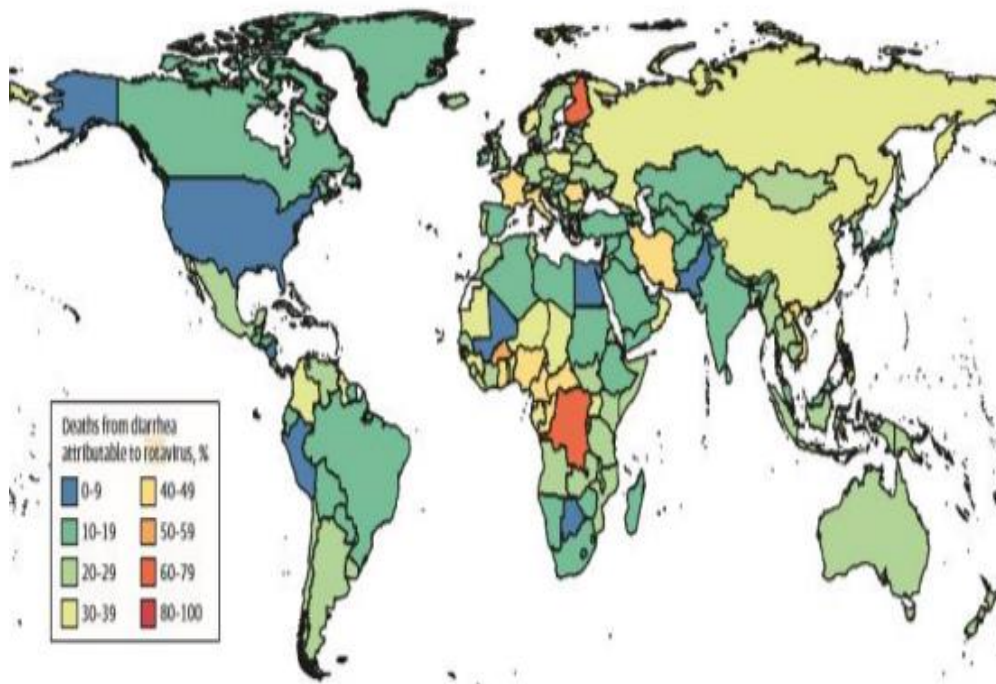
A l'ère de la pré- vaccination, les estimations du CDC (*Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta*), indiquaient que le RVA était l'origine de 111 millions d'épisodes de gastroentérites traitées en ambulatoire, 25 millions de consultations médicales, 2 millions d'hospitalisations chaque année. A l'échelle mondiale, les diarrhées dues aux RVA causaient environ 453.000 décès par an chez les enfants de moins de 5 ans, la majorité ayant cours dans les pays à faible revenu (Tate *et al.*, 2012). Au niveau mondial, le RV est le troisième agent pathogène associé à la mortalité chez les enfants de moins de 5 ans, derrière le paludisme (517000 décès) et *Streptococcus pneumoniae* (359000 décès) (GBD, 2017)

### **I.2.1 Répartition géographique et incidence du Rotavirus A dans le monde**

Avant l'adoption obligatoire du vaccin anti-rotavirus dans les pays développés à l'instar des Etats-Unis, le Rotavirus était responsable de 30 à 50% des gastro-entérites chez les enfants de moins de 5 ans et de 30 à 50% des cas les plus graves nécessitant une intervention médicale (Estes et Greenberg, 2013). Les infections à RVA représentaient ainsi 3 millions de cas, 500.000 consultations médicales, 70 à 80.000 hospitalisations et 20 à 40 décès par an. En Europe, les chiffres étaient de même grandeur avec toutefois un nombre supérieur d'hospitalisations (N=90.000) et plus de 200 décès par an sur le continent. En France avant 2005, les infections à Rotavirus sont responsables chaque année de 18.000 hospitalisations et de 6 à 12 décès (Melliez *et al.*, 2005). Avant l'introduction de la vaccination contre le Rotavirus, on a estimé aux Etats-Unis que chaque année les infections à Rotavirus coutaient à la société 1,4 milliard de dollar dont 400 millions de frais médicaux (Estes et Greenberg, 2013). Dans les pays développés, l'introduction du vaccin contre le Rotavirus a permis de réduire considérablement la mortalité et surtout la morbidité associée au Rotavirus comme l'atteste l'étude multi-centrique à grande échelle menée par le CDC entre 2000 et 2014 aux Etats-Unis (Aliabadi *et al.*, 2015). Dans les pays en voie de développement, morbidité et mortalité associées aux infections à Rotavirus, sont importantes. Il y a environ 100 millions de cas de gastro-entérites par an chez les enfants de moins de 5 ans et dans un cas sur 5, l'infection entraîne la consultation d'un médecin (Tate *et al.*, 2012). A cause de différents facteurs comme l'absence d'hygiène ou la malnutrition, la mortalité due au RVA est bien supérieure. Durant cette dernière décennie, on estime à près de 123.000 millions le nombre de décès causé par la diarrhée à Rotavirus en Afrique et la prévalence de l'infection à Rotavirus est estimée à 39% dans ce continent après introduction du vaccin par certains pays (Shah *et al.*, 2017). On estime récemment près de 128500 décès par an

---

et 258 millions d'épisodes de diarrhée chez les enfants de moins de cinq ans (Figure 7) (Troeger *et al.*, 2018).

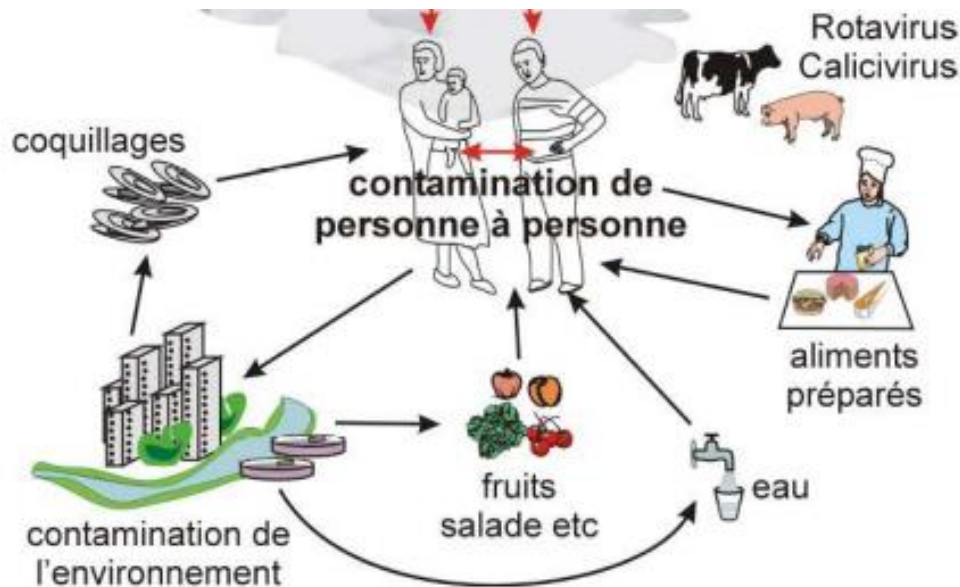


**Figure 7:** Répartition géographique de la mortalité infantile due à l'infection à RVA en 2016 (Troeger *et al.*, 2018)

### I.2.2 Transmission des Rotavirus A et Physiopathologie des diarrhées à Rotavirus A

Le virus se transmet par voie oro-fécale de personne à personne ou par l'intermédiaire d'objets contaminés par des fèces ou des vomissures (Figure 8) (Estes et Greenberg, 2013). La charge virale élevée et la durée de l'excrétion virale dans les selles sont les facteurs favorisant la transmission du RVA. Les particules virales, en demeurant très infectieuses, sont excrétées en grande quantité dans les matières fécales dès le 3<sup>ème</sup> jour après l'infection. L'excrétion se prolonge en moyenne jusqu'à 10 jours après l'apparition des symptômes (Patel *et al.*, 2013). Lors de la phase aiguë de la maladie, les patients peuvent excréter jusqu'à  $10^{12}$  particules virales par gramme de selle. Le RVA peut être détecté dans les selles de personnes immunodéprimées pendant plus de 30 jours après l'infection. La propagation dans les familles, les institutions, les hôpitaux et les milieux de garde est courante (Dennhy, 2000). En revanche, la contamination par l'eau semble moins importante compte tenu de l'infectiosité de RVA en milieu très humide mais ils peuvent être retrouvés dans l'eau du robinet pendant plus de 64 jours à 20°C (Dennhy, 2000). Les RVA infectent un grand nombre de mammifères et d'oiseaux. Par conséquent le risque de co-infection existe. Dans la nature, l'analyse phylogénétique des différents segments

génomiques du RVA montre que ces segments peuvent provenir de différentes espèces. Donc la contamination par des animaux présentant une diarrhée à RVA reste un événement rare. Néanmoins, des cas de transmission inter-espèces ont été enregistrés avec les bovins, les porcins dans plusieurs régions du monde et ont été à l'origine de réassortants entre l'Homme et l'animal (Cook *et al.*, 2004, Doro *et al.*, 2015 ; Choudhary *et al.*, 2017)



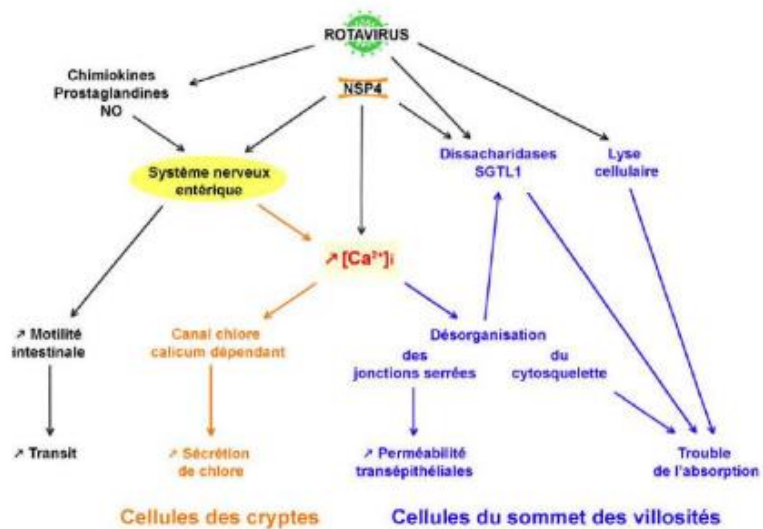
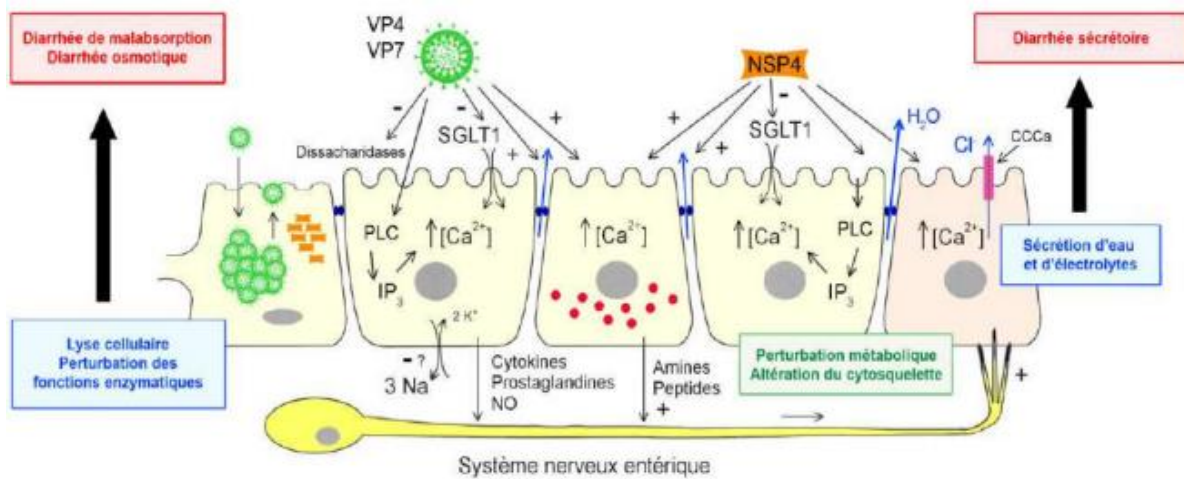
**Figure 8:** Présentation schématique des possibilités de transmission du Rotavirus A (Denny, 2000)

Les RVA infectent les entérocytes de l'intestin grêle et provoquent une diarrhée multifactorielle associant une malabsorption et une composante sécrétoire (Ramig, 2004). L'infection virale, le virus lui-même et sa protéine NSP4 sont responsables, directement ou via un messageur, d'une activation du système nerveux entérique (SNE) et d'une augmentation du calcium intracellulaire ( $Ca^{2+}$ ) provoquant une succession d'évènements conduisant à une fuite de chlore, une désorganisation de l'architecture de la cellule et à sa lyse. La malabsorption touche essentiellement les entérocytes du sommet des villosités. Les entérocytes détruits sont remplacés par des cellules cryptiques immatures et les fonctions d'absorption des villosités s'en trouvent altérées (Lorrot et Vasseur, 2007). Cependant, il y a une dissociation entre les lésions histologiques et l'apparition de la symptomatologie ; ce qui suggère que ce phénomène de lyse cellulaire n'est probablement pas l'élément majeur de la diarrhée. Les altérations fonctionnelles de la digestion jouent certainement un rôle plus important. L'infection virale provoque en effet une diminution de l'activité enzymatique des dissacharridases et peptidases de la bordure en



---

brosse de la muqueuse intestinale (Hagbom *et al.*, 2012). Ces altérations s'accompagnent d'une diminution de l'activité des systèmes de transport, notamment des co-transporteurs sodium glucose (SGLT1) et sodium-leucine qui pourraient être liés directement au virus et/ou à sa protéine NSP4. Il en résulte une absence de digestion des nutriments et une diminution de leur absorption avec comme conséquence une diarrhée de type osmotique. Le virus et la protéine NSP4, directement ou via l'augmentation du calcium intracellulaire, désorganisent l'architecture cellulaire en agissant sur les protéines du cytosquelette (F-actine, villine et tubuline) et également altèrent les jonctions serrées (Lorrot et Vasseur, 2007 ; Estes *et al.*, 2009). Il en résulte une augmentation de la perméabilité trans-épithéliale aux macromolécules. Par ailleurs, la protéine virale non structurale NSP4, véritable entérotoxine virale, participe aux mécanismes sécrétoires de la diarrhée. Cette protéine se lie à un récepteur membranaire au niveau des cellules des cryptes qui par une cascade d'activation impliquant la phospholipase C puis l'inositol triphosphate (IP3) induit une augmentation du calcium intracellulaire. Un des résultats est l'ouverture d'un canal chlore calcium dépendant responsable d'une fuite d'ions Chlores et d'eau (Estes *et al.*, 2009). Lors d'infection à RVA, le système nerveux entérique serait activé par différents médiateurs, tels que la 5-hydroxytryptamine ou sérotonine libérée par les myofibroblastes et des cellules inflammatoires lors de l'infection de l'intestin (Lorrot et Vasseur, 2007). Cette activation contribue davantage à la diarrhée sécrétoire et augmente la motilité intestinale. De plus, la production de sérotonine activerait les nerfs vagues afférents et stimulerait les structures du tronc cérébral qui contrôlent le vomissement (Figure 9) (Hagbom *et al.*, 2012). Suivant le clivage tryptique de la protéine VP4, le domaine VP8\* altérerait la localisation de plusieurs protéines (claudine-3, occludine). Ce phénomène engendre alors une perturbation de l'intégrité des jonctions serrées intercellulaires, conjointement aux effets de la protéine NSP4 (figure 8). L'infection par les RVA résulte ultimement en la destruction des entérocytes intestinaux matures accompagnée de vacuolisation. Ces changements génèrent une atrophie des villosités, une hyperplasie des cryptes et une infiltration de cellules mononucléaires au niveau de la lamina propria (Estes *et al.*, 2009, Pothier et Agnello, 2012).



**Figure 9 :** Schéma résumant la physiopathologie de la diarrhée à RVA (Hagbom *et al.*, 2012)

L'augmentation des ions calcium intracellulaire est l'élément pivot expliquant les modifications au niveau des entérocytes des villosités et des cellules des cryptes. La protéine NSP4 qui est une enterotoxine, est impliquée dans l'hypersécrétion modérée du chlore dans la lumière intestinale suite à une augmentation du calcium intracellulaire responsable de l'activation de pompes membranaires. Le système nerveux entérique est un principal inducteur de la composante sécrétoire de la diarrhée.

### I.2.3 Activation du système immunitaire face aux infections à Rotavirus A

Le système immunitaire de la muqueuse digestive représente la première barrière de défense de l'hôte contre les pathogènes entériques. En effet, ce système immunitaire contient plus de  $10^{12}$  cellules lymphocytaires et il forme le tissu ayant la plus grande concentration d'anticorps (Bailey *et al.*, 2005). Sur une période d'environ six semaines, il se développe graduellement une expansion des cellules immunitaires (les lymphocytes T et les lymphocytes B) qui est notée dans la lamina propria, l'épithélium et les cryptes intestinales pour former ce qui sera connu comme le tissu lymphoïde associé au tube digestif (« gut-associated lymphoid

---

tissu » ou « GALT ») (Bailey *et al.*, 2005). En dehors de ces cellules, le système immunitaire de la muqueuse digestive est également composé de cellules épithéliales qui aident à la reconnaissance d'antigènes ainsi qu'à la modulation immunitaire. De plus, ce tapis cellulaire est recouvert d'une couche de mucus composé d'eau, d'ions, de mucines et de molécules du système immunitaire tels que des immunoglobulines A (IgA) et des peptides anti-microbiens (Deplancke et Gaskins, 2001). La couche de mucus lui confère ainsi des rôles de défense (contre des irritants endogènes et exogènes ou contre l'attachement et l'invasion microbienne) et de transport nutritif. Les cellules à gobelet, présentes tout au long du tractus gastro-intestinal, sont responsables de la production et la préservation du mucus dont l'ingrédient protecteur clé est la mucine. Cette grosse glycoprotéine est considérée comme l'une des premières molécules à interagir avec les pathogènes entériques, ce qui limiterait leur liaison à d'autres glycoprotéines et causerait leur neutralisation (Deplancke et Gaskins, 2001).

Face à une infection au RVA, l'activation du système immunitaire débute suite à la pénétration des virions dans les cellules épithéliales. Les entérocytes infectés sécrètent des chémokines CCL20 et CCL9 ainsi que de l'interleukine-8 qui recrutent les leucocytes puis initient le signal pro-inflammatoire (Casola *et al.*, 2002). Certaines particules et antigènes rotaviraux dans la lumière gastro-intestinale sont également absorbés au niveau des plaques de Peyer iléales ou jéjunales via un processus de transport actif assuré par les cellules « microplis ». Sous l'épithélium associé au follicule, les antigènes viraux sont phagocytés par les cellules dendritiques immatures via des mécanismes de reconnaissance non spécifiques diversifiés. Le système immunitaire s'active initialement via les cellules présentatrices d'antigènes qui reconnaissent des patrons moléculaires associés aux microbes. Cette reconnaissance des antigènes viraux s'effectue via différents récepteurs « toll-like » ; le TLR3 lie l'ARN double-brin du génome viral et le TLR9 reconnaît l'ADN non-méthylé également retrouvé dans les génomes viraux (Wen *et al.*, 2009). *In vivo*, les récepteurs « toll-like » TLR3 et TLR9 jouent un rôle crucial dans la défense contre l'infection au RVA et assurent le lien entre l'immunité innée et adaptative. Leurs ligands induisent la production des cytokines IL-1, IL-6, IL-8, TNF $\alpha$ , IFN $\alpha$ , CCL5 et CCL20 qui recrutent les granulocytes et les cellules dendritiques (Wen *et al.*, 2009). Les cellules dendritiques activées migrent alors vers les follicules associés à la muqueuse et les organes lymphoïdes secondaires où elles expriment plus de molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). La présentation des épitopes viraux aux cellules T stimule entre autres les cellules-auxiliaires T CD4<sup>+</sup> naïves à sécréter des cytokines. La réponse de cytokine stimule à son tour l'expansion clonale des lymphocytes T cytotoxiques spécifiques au RVA (Narvaez *et al.*, 2005 ; Azevedo *et al.*, 2006).

---

Chez les humains infectés par le RVA, la quantité importante de cytokines dans l'intestin révèle l'importance de l'immunité humorale pour une protection contre les symptômes du RVA. Au niveau fonctionnel, les cytokines TH2 modulent la production d'immunoglobulines (Ig) neutralisantes de types IgG, IgA et IgE. Les plasmocytes spécifiques au RVA produisent principalement des IGA classiques et sécrétoires SIgA. Les SIgA constituent la première ligne de défense de la muqueuse et favorisent l'élimination spécifique des pathogènes avant le début de l'infection. Le RVA induit également la production locale indépendante de SIgA 48h après l'infection (Blutt *et al.*, 2004). Le transport des SIgA dans la lumière intestinale s'effectue majoritairement via les cellules « microplis ». Sur les cellules myéloïdes, c'est le récepteur Fc $\alpha$ RI qui module les réponses immunes et d'inflammation face aux particules marquées par les IgA. Pour la réponse des cellules B naïves, c'est IL-10 qui induit la production des IgA (Azevedo *et al.*, 2006).

#### **I.2.4 Diagnostic de Rotavirus A**

La détection d'une infection à RVA est importante pour le contrôle des épidémies et la prévention (Feeney *et al.*, 2011). Son diagnostic ne peut se faire en se basant uniquement sur les signes cliniques (diarrhées, température élevée, vomissement). Les premiers tests de détection reposaient sur la microscopie électronique (EM) qui a permis la découverte du virus en 1973. Cependant, cette méthode manque de sensibilité (le seuil minimal de détection virale serait d'environ 10<sup>5</sup> virions par grammes de fèces), relativement compliquée, coûteuse, difficile à mettre en place pour un diagnostic de masse, nécessitant des équipements et du personnel qualifié (Jothikumar *et al.*, 2009 ; Zhang *et al.*, 2013). Par la suite les techniques d'analyse basées sur la recherche d'anticorps spécifiques ou d'antigènes ont été développées. Ce sont des trousse de détection rapide basées sur des dosages immuno-enzymatiques, d'abord par agglutination au latex puis plus tard par immunochromatographie, technique plus simple et plus rapide (Jothikumar *et al.*, 2009 ; Nordgren *et al.*, 2010). Mais elles sont insuffisantes pour le diagnostic des infections asymptomatiques. Les techniques de PCR sont très utiles pour la détection des porteurs asymptomatiques qui sont clés dans la diffusion du virus dans la population (Gautam *et al.*, 2013).

##### **I.2.4.1 Analyses immunologiques**

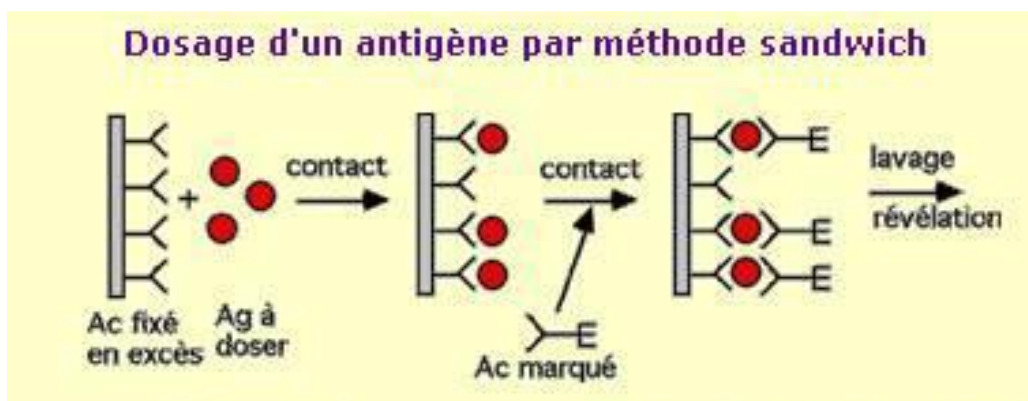
Les méthodes immunologiques sont basées sur la réaction spécifique entre un anticorps et un antigène. La bonne affinité de l'anticorps pour son antigène viral explique que ces interactions soient hautement spécifiques. Cette liaison peut être révélée par agglutination, par

coloration enzymatique ou par fluorescence. Contrairement à la biologie moléculaire, ces techniques ne permettent pas de distinguer les sérotypes viraux (OMS, 2009 ; Esona et Gautam, 2015).

#### a) ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

La technique ELISA est particulièrement utilisée en routine en virologie clinique pour les diagnostics directs comme indirects. ELISA est une technique immunoenzymatique de détection qui permet de visualiser une réaction antigène - anticorps grâce à une réaction colorée produit par l'action sur un substrat d'une enzyme préalablement fixée à l'anticorps (Figure 10) (Hnasko, 2015).

Habituellement, les tests ELISA pour la détection des Rotavirus empruntent des anticorps spécifiques de type IgA et IgG (dirigés principalement contre la protéine virale VP6) qui distinguent les sérotypes/groupes de Rotavirus à partir d'échantillons cliniques (Soltan *et al.*, 2016). Ces méthodes sont généralement reconnues pour être sensibles, spécifiques, simples, standardisées (usage de contrôles internes), performantes (analyse de plusieurs échantillons à la fois) et peu coûteuses. Ce qui explique leur usage commun dans les laboratoires de diagnostic et de recherche. Plusieurs kits commerciaux de type ELISA ont été développés pour les RVA. Toutefois, un désavantage des tests ELISA est l'absence d'une caractérisation génétique des souches de Rotavirus (Hnasko, 2015).



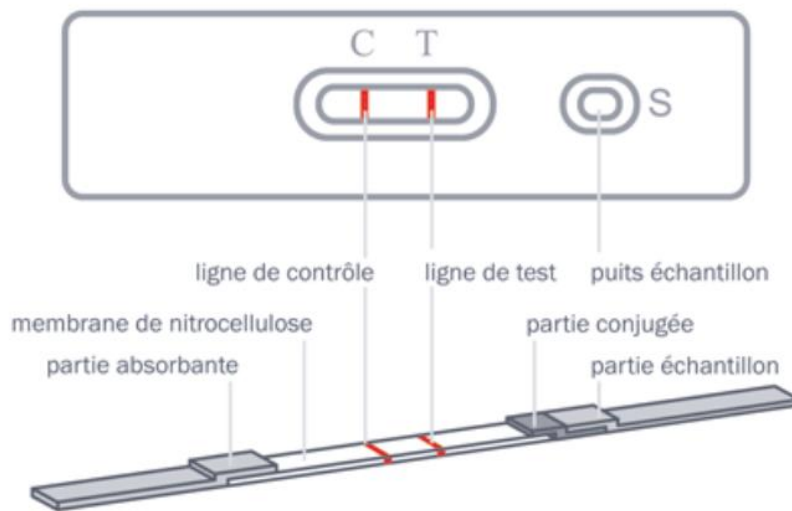
**Figure 10:** Description du principe de la méthode d'ELISA sandwich (Hnasko, 2015)

E : Enzyme ; AC : Anticorps ; AG : Antigène

#### b) Test immunochromatographique

Généralement Sous forme de bandelette (Figure 11), le test fait intervenir deux anticorps spécifiques de l'antigène recherché. Mis en contact avec l'échantillon, le premier anticorps

forme un complexe antigène-anticorps migrant le long d'une membrane de nitrocellulose par capillarité. Quand ce complexe antigène-anticorps atteint la zone test, il est capturé par le second anticorps fixé à la membrane, dans ce cas une bande colorée apparaît dans la zone test. Pour s'assurer que la migration s'est faite correctement, un contrôle témoin est intégré au test (Bon *et al.*, 2007).



**Figure 11:** Représentation d'un test d'immunochromatographie (Bon *et al.*, 2007)

C : Bande de Contrôle ; T : bande test ; S : Puits échantillon

#### I.2.4.2 Méthodes de détection du génome viral

L'ARN viral est présent dans les selles des patients infectés et les PCR sont les plus performantes des techniques disponibles pour détecter les virus de gastro-entérites. Ces méthodes sont plus sensibles et plus rapides que les méthodes traditionnelles (microscopie, immunologie). Elle a pour principe d'amplifier *in vitro* une séquence d'ADN ou d'ARN spécifique à partir d'une faible quantité d'acides nucléiques, de l'ordre de quelques picogrammes (Poitras et Houde, 2002 ; Zeng *et al.*, 2008). De plus, cette technique permet aussi de séquencer le génome du fragment amplifié et d'identifier les différents sérotypes et / ou génotypes viraux. Elle a permis de mieux connaître l'épidémiologie et la variabilité génétique des Rotavirus en particulier mais aussi des autres virus (Poitras et Houde, 2002 ; OMS, 2009).

##### a) Les techniques de PCR (Polymerase Chain Reaction)

###### ➤ PCR conventionnelle

La PCR classique, qui a été largement adoptée par les laboratoires, consiste à détecter en point final les séquences d'ADN particulières amplifiées par électrophorèse et dont

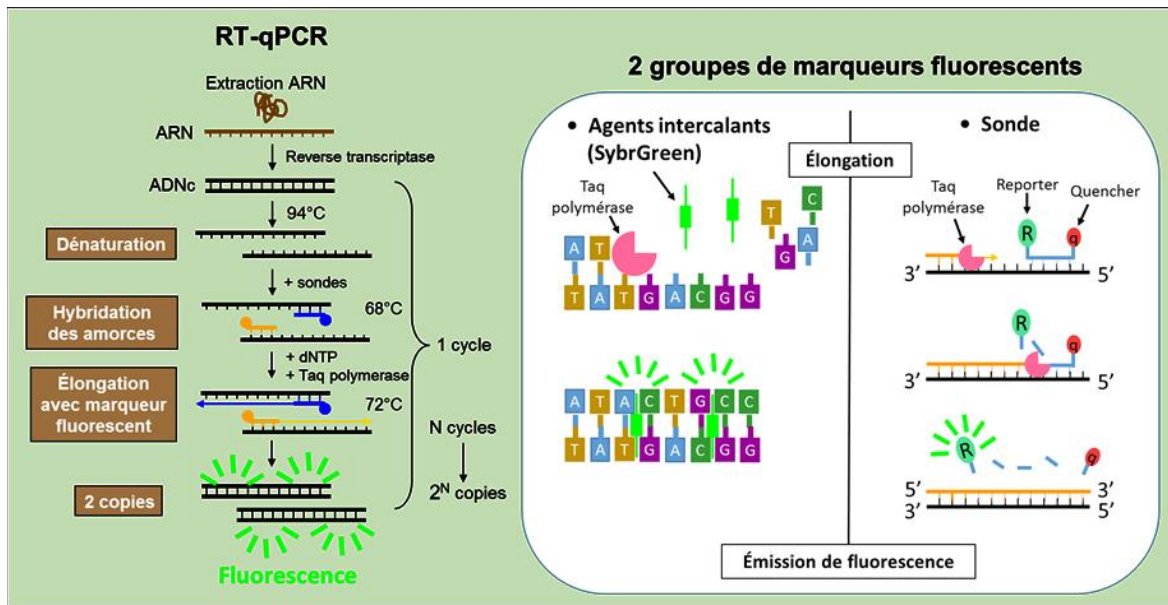
---

l'identification peut ensuite être confirmée par Southern Blot. Ce qui accroît le temps de l'analyse, le nombre de manipulations après PCR, ainsi que le risque de contamination au sein des laboratoires (Poitras et Houde, 2002).

➤ PCR quantitative en temps réel (qPCR / RT-qPCR)

La technologie de la PCR en temps réel est basée sur la détection et la quantification d'un « reporter » fluorescent pendant le processus d'amplification et l'augmentation du signal fluorescent est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés durant la réaction de PCR (Poitras et Houde, 2002).

Elle permet de coupler la réaction de PCR avec une mesure en temps réel des séquences amplifiées (augmentation exponentielle). La détection des amplicons générés à chaque cycle d'amplification nécessite l'utilisation d'agents intercalants se fixant sur les doubles brins d'ADN (par exemple le Sybr Green) ou l'utilisation de sondes fluorescentes s'hybridant sur l'amplicon de manière spécifique (Figure 12) (Tse et Capeau, 2003). La quantification de l'ADN est obtenue grâce à la valeur de Ct (Cycle Threshold" ou cycle seuil), qui correspond au nombre de cycles PCR nécessaires pour que la fluorescence soit détectée par l'appareil dans l'échantillon. Cette valeur de Ct peut être liée à une quantité d'ADN grâce à l'utilisation d'une gamme étalon ou être comparée à celle d'un gène de référence. La qPCR est très reproductible, permet de quantifier l'échantillon et d'éviter toutes les étapes après PCR (telles que l'électrophorèse, Southern Blot) et limite ainsi le risque de contaminations par les produits d'amplification au sein du laboratoire ainsi que le temps nécessaire à l'analyse (Tse et Capeau, 2003). La RT-qPCR est utilisée lorsque le matériel génétique à analyser est de l'ARN. Une étape de rétrotranscription, en amont de la PCR classique est alors nécessaire. Elle est réalisée par la reverse transcriptase (RT) qui est une enzyme provenant de rétrovirus ou de rétrotransposons qui l'utilisent pour transcrire l'ARN en ADN afin de pouvoir s'intégrer au génome de l'hôte. En RT-qPCR, cette enzyme permet la synthèse d'un brin d'ADN complémentaire à partir d'une matrice d'ARN. L'ADN est ensuite soumis à l'amplification (Tse et Capeau, 2003).

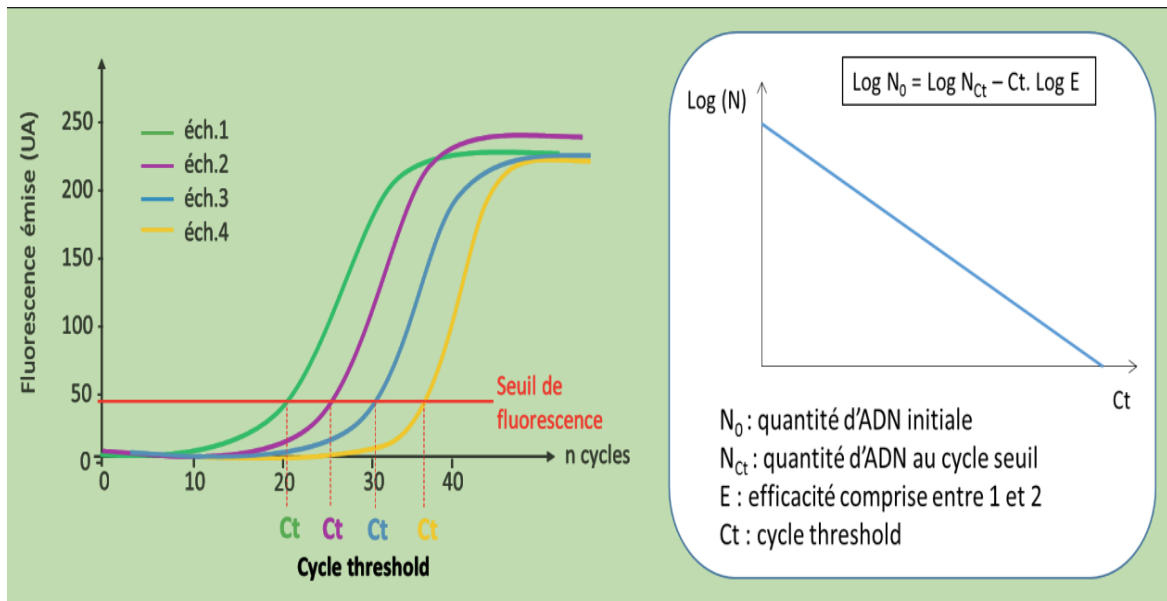


**Figure 12:** Description du principe de la RT-PCR en temps réel (Tse et Capeau, 2003)

Durant l'étape de dénaturation, la sonde est libre en solution. À la température d'appariement, la sonde et les amorces s'hybrident à leurs séquences cibles respectives et la proximité des fluorochromes permet l'inhibition de la fluorescence. La polymérisation débute. La polymérase déplace et hydrolyse la sonde. Le fluorochrome émetteur est libéré de l'environnement du suppresseur permettant ainsi l'émission de la fluorescence.

Afin de recueillir des données quantitatives avec précision, l'analyse doit se faire dans la phase exponentielle d'amplification qui est la phase la plus reproductible de la réaction de PCR. Plus le nombre de copies du génome de départ est faible et plus le nombre de cycles doit être important pour atteindre une quantité d'amplicons suffisante pour obtenir un signal fluorescent exploitable. Le cycle seuil ou cycle threshold (Ct) est le nombre de cycle à partir duquel le signal fluorescent dépasse le bruit de fond (Figure 13). Etabli à partir de la région exponentielle des courbes cinétiques de l'amplification génique, il est reproductible et permet d'établir une équation pour connaître la quantité initiale d'ADN de l'échantillon. En effet, le Ct est inversement proportionnel au Log de la quantité initiale  $N_0$ , il s'agit d'une donnée semi-quantitative (Tse et Capeau, 2003).





**Figure 13:** Graphe décrivant la détermination de la valeur du cycle seuil ou « cycle Threshold (CT) » et la quantité d'ADN (Tse et Capeau, 2003)

L'intensité de la fluorescence à chaque cycle est proportionnelle à la concentration d'amplicons, le cycle seuil (Ct) représente le nombre de cycles requis où le signal d'émission de fluorescence est statistiquement et significativement plus élevé que la ligne de base.

La technique de qPCR multiplex est utilisée lorsque qu'il y a plusieurs cibles à détecter dans un même échantillon et consiste à analyser les différentes cibles dans une même réaction en ajoutant les différents sets d'amorces et sondes en même temps. Ce qui permet de réduire ainsi le volume de l'échantillon utilisé pour les analyses d'une part et de réaliser des analyses sur un plus grand nombre d'échantillons permettant ainsi un gain de temps et de moyens. En RT- qPCR, le multiplexage est possible en présence d'agents intercalants (SybrGreen) ou en présence de sondes (sondes TaqMan) qui sont marquées par des fluorophores différents. La limite théorique du nombre de cibles détectées par multiplex est alors fixée par la limite des canaux de lecture de l'appareil ; en pratique il faut également prendre en compte que la sensibilité de la détection ne doit pas être modifiée par la présence de différents modèles moléculaires (non spécificité, appariement d'amorces) (Poitras et Houde, 2002 ; Tse et Capeau, 2003).

#### **b) Les techniques de séquençage**

Le séquençage consiste à déterminer l'enchaînement linéaire des nucléotides d'un fragment d'ADN dans le but d'étudier l'information biologique contenue par ce dernier. Les deux premières techniques de séquençage de l'ADN, celle de Walter Gilbert aux États-Unis et celle de Frederick Sanger au Royaume-Uni ont été décrites en 1977. Le séquençage de Sanger

---

constitue la méthode de choix pour une caractérisation approfondie des souches virales dans les laboratoires (Heather et Chain, 2016).

➤ **Séquençage de Sanger**

La méthode de séquençage Sanger repose sur la terminaison de l'élongation de la chaîne au cours de l'amplification grâce à l'ajout dans le milieu réactionnel des ddNTPs (didéoxyribonucléotides triphosphates). Les ddNTP ne possèdent pas de groupe hydroxy 3' ; ce qui empêche l'ajout de nucléotides additionnels suite à la liaison d'un ddNTP à la chaîne existante (Heather et Chain, 2016). La chaîne se termine donc par le ddNTP, qui est doté d'un marqueur fluorescent différent selon la base (A, T, C ou G) qu'il porte. Au moment où les cycles sont terminés, il devrait y avoir eu incorporation d'un ddNTP à chaque position de l'ADN cible. Un détecteur sera donc en mesure de construire un chromatogramme caractérisé par une série de pics d'intensité de fluorescence représentant la séquence d'ADN (Heather et Chain, 2016). Cette approche a été largement utilisée pour caractériser les gènes VP7 et VP4 de rotavirus et a contribué à l'élaboration du système de classification des RVA (Matthijssens *et al.*, 2011). Depuis quelques années, le séquençage de Sanger a été automatisé. Les premières machines utilisant les gels de polyacrylamide ont rapidement été supplantées par les séquenceurs capillaires. Pour des projets d'envergure impliquant le séquençage de génomes entiers, la méthode Sanger est coûteuse et peu efficace. Par conséquent d'autres technologies ont donc été développées pour améliorer le rendement, la rapidité et le coût du séquençage. Il s'agit des techniques de séquençage à haut débit (Heather et Chain, 2016).

➤ **Séquençage de seconde génération**

Depuis 2005, l'émergence d'une nouvelle génération de séquençages (NGS : Next Generation Sequencing) a permis de séquencer avec grand débit des génomes entiers. Comparativement au séquençage Sanger, le séquençage à haut débit implique la construction de fragments d'ADN contenant une séquence synthétique reconnue comme « adaptateur » universel spécifique à chaque plateforme appelé « banque d'ADN » (Mardis, 2013). Il existe plusieurs technologies de séquençage de nouvelle génération, les plus utilisées partagent en commun cinq étapes principales : (1) La fragmentation des deux brins d'ADN (ou d'ARN) qui consiste à procéder à une amplification aléatoire par PCR de fragments d'environ 200bp pour constituer la banque d'ADN ; (2) la liaison des fragments ADN de la banque aux adaptateurs par une réaction A-tailing suivie d'une ligation enzymatique. Chaque adaptateur est muni d'un code barre lui conférant une identification unique ; ce qui permet de ne pas confondre (ou

---

perdre) les séquences répétitives du génome ; (3) la normalisation des différentes banques d'ADN à une même concentration ; (4) le séquençage en plusieurs copies de chaque ADN de la banque ; et (5) l'assemblage du génome. Plusieurs méthodes de séquençage à haut débit ont été développées, présentant chacune différentes caractéristiques, quant aux longueurs de séquences obtenus (fragments d'ADN), le débit par réaction, le coût, la durée d'une réaction et les types d'erreurs (Goodwin *et al.*, 2016).

## **I.2.5 Traitement et prévention**

### **I.2.5.1 Traitement**

La prise en charge des gastro-entérites s'est améliorée avec l'introduction de la thérapie par réhydratation orale (TRO). Elle permet de traiter ou de prévenir la déshydratation au moyen de sels de réhydratation orale (SRO). Les SRO sont une solution d'eau pure, de sel et de sucre. Ces composés sont rapidement absorbés par l'intestin grêle et compensent les pertes hydriques et électrolytiques causées par la diarrhée et les vomissements ((Patel *et al.*, 2012). Elle est administrée par voie intraveineuse en cas de déshydratation sévère ou de choc. Son introduction en 1978 a été un véritable succès puisque les SRO ont permis de réduire considérablement le taux de mortalité des gastro-entérites. La mortalité des enfants âgés de moins de 5 ans atteints de diarrhée aiguë est passée de 4,5 millions à 1,8 million annuellement. Depuis 2003, une nouvelle formule avec des teneurs en glucose et en sodium plus faibles est recommandée ; il s'agit de SRO à osmolarité réduite. Cette nouvelle formule diminue la durée de la diarrhée et le besoin de perfusions intraveineuses (Dalgic *et al.*, 2011).

L'alimentation et une supplémentation en zinc interviennent également dans le traitement de la diarrhée aiguë. Il a été démontré qu'un apport en zinc réduit la durée de 25% et la sévérité de l'épisode diarrhéique avec une réduction du volume des selles de 30%. Il réduit aussi l'incidence de la diarrhée dans les 2-3 mois suivant le traitement. L'apport recommandé est de 20 mg de zinc (10 mg pour les enfants de moins de 6 mois) pendant 10 à 14 jours (Dalgic *et al.*, 2011). Une alimentation riche en nutriments, dont l'allaitement maternel, doit être maintenue. Elle favorise la rémission des jeunes enfants.

### **I.2.5.2 Prévention**

Le RVA cause environ 600.000 hospitalisations et 104.000 décès chaque année chez les enfants de moins de cinq ans en Afrique (Tate *et al.*, 2016 ; Shah *et al.*, 2017). Des études menées en Afrique ont montré que la vaccination contre le RVA était un moyen sûr et efficace

de se protéger contre les infections sévères de ce virus et sont rentables (Path, 2014). En 2016, on a prévenu environ 135.000 hospitalisations et 21.000 décès dus au RVA dans 29 pays où le vaccin était introduit avant 2015 (Shah *et al.*, 2017). Actuellement, quatre vaccins oraux sont disponibles sur le marché (RotaTeq, Rotarix, ROTAVAC et Rotasiil) (Burnett *et al.*, 2018) (Tableau 4). Le vaccin RotaTeq contient cinq souches de Rotavirus réassortis atténuées développées à partir d'une souche bovine dans laquelle on a remplacé le gène codant la protéine VP7 ou VP4 par un gène de Rotavirus humain codant pour l'un des génotypes suivants : G1, G2, G3, G4 et P[8] (ou sérotype P1A) (Burnett *et al.*, 2018). Il est administré en 3 doses par voie orale. Le vaccin Rotarix est formulé à partir d'une souche atténuée de Rotavirus humain. Deux doses suffisent pour la vaccination. Elles sont également administrées par voie orale (tableau 4) (Lopman *et al.*, 2012).

Le vaccin ROTAVAC a été lancé en Inde en 2014 et a été autorisé exclusivement dans ce pays. Ce vaccin est un vaccin oral monovalent contre G9P[11](116 E) dérivé d'une souche néonatale humaine naturellement atténuée qui contient un segment de souche bovine. Trois doses sont nécessaires pour la vaccination (Bhandari *et al.*, 2014).

Le vaccin Rotasiil est le tout dernier vaccin antirotavirus étant requalifié par l'OMS en 2018. Il est sous forme lyophilisé et administré par voie orale. Il est composé des souches de RVA réassorti bovin-humain (G1, G2, G3, G4 et G9). Trois doses sont nécessaires pour la vaccination. Ce vaccin est retrouvé en Inde, au Niger et tout dernièrement en République Démocratique du Congo (Burnett *et al.*, 2018).

**Tableau 4:** Caractéristique des vaccins Rotarix et Rotateq (Lopman *et al.*, 2012)

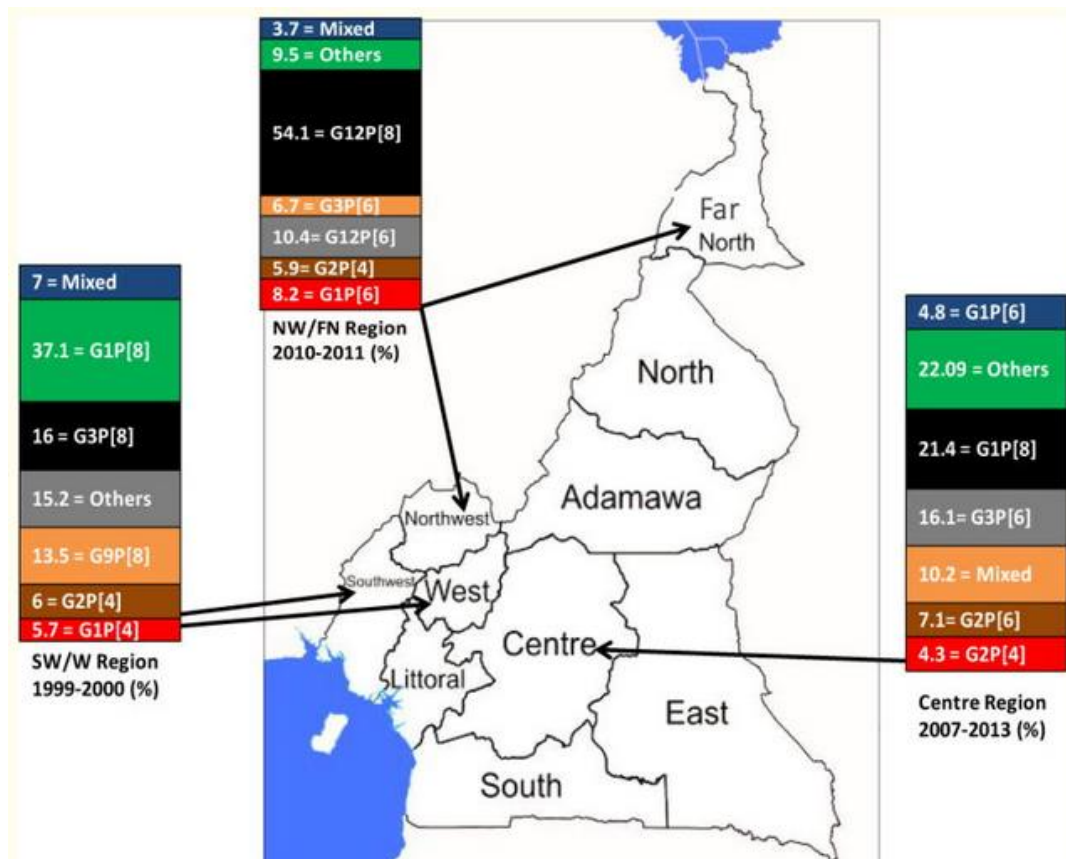
	RotaTeq	Rotarix
Nombre de dose	3	2
Conception	le pentavalent oral	Humain vivant atténué
Composition antigénique	G1, G2, G3, G4, P1A : souches ressortant provenant d'une souche bovine WC3 (type G6P7 [5]).	G1P1A provenant de la souche humaine.
Calendrier de vaccination	La première dose doit être administrée entre 6 et 12 semaines d'âge et la dernière dose de 6 mois d'âge, avec au moins 4 semaines entre les deux doses.	La première dose doit être administrée entre 6 et 12 semaines d'âge et la dernière dose de 6 mois d'âge, avec au moins 4 semaines entre les deux doses.

---

Les essais cliniques ont montré leur innocuité et leur efficacité dans la protection des diarrhées sévères à Rotavirus. Les vaccins monovalent (Rotarix) et pentavalent (RotaTeq) ont montré une efficacité similaire. Dans les pays à revenu élevé, l'efficacité est comprise entre 74 et 87% contre tout type de diarrhée et entre 85 et 98% contre les diarrhées sévères. Elle varie selon les génotypes de RVA. Cependant, l'efficacité de la vaccination est moins élevée dans les pays à faible revenu, surtout dans les pays présentant un taux de mortalité élevé. L'efficacité est estimée entre 50 et 64% (Madhi *et al.* 2010, Cunliffe *et al.*, 2012). Les bénéfices apportés en santé publique par ce type de vaccin ont motivé l'OMS à donner un avis favorable global pour la vaccination contre le RVA, en particulier en Afrique et en Asie (OMS, 2013). Semblable aux résultats des essais cliniques de RotaTeq et Rotarix, l'efficacité du vaccin ROTAVAC contre les hospitalisations pour diarrhée à RVA était de 54% dans un essai clinique en Inde et celui de de Rotasiil était de 67% dans un essai clinique au Niger et 39% en Inde (Burnett *et al.*, 2018).

#### **I.2.6 Infections à Rotavirus A au Cameroun**

La diarrhée est l'une des maladies infantiles les plus meurtrières au Cameroun. Elle est responsable d'environ 13 pour cent des décès d'enfants de moins de cinq ans (Path, 2014). Le RVA tue chaque année plus de 5 800 enfants de moins de cinq ans et est responsable d'environ 33 pour cent de toutes les hospitalisations dues aux diarrhées chez les moins de cinq ans au Cameroun (OMS, 2013 ; Path, 2014). Le 28 Mars 2014, le Cameroun introduit les vaccins antirotavirus dans son programme national de vaccination. La première étude épidémiologique sur la diarrhée à RVA fait dans la région de l'Ouest fut publiée en 2003 révélant une prévalence de 21,9 % (Esona *et al.*, 2003). Les études récentes dans le Nord-Ouest, le Nord et le Centre révèlent que la prévalence de l'infection à RVA est de 28,7%, 42,8% et 41% respectivement (Figure 14) (Mbuh *et al.*, 2012 ; Ndzé *et al.*, 2012 ; Boula *et al.*, 2014).



**Figure 14:** Différents génotypes G et P de RVA identifiés pendant la période pré-vaccinale au Cameroun (Ndombo *et al.*, 2017).

---

## **CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES**

---

## **II.1 Cadre et population d'étude**

### **II.1.1 Cadre de l'étude**

Cette étude descriptive a été menée sur une période de 12 mois de mai 2015 à avril 2016 dans la région du Littoral du Cameroun. Cette région est située dans le sud-ouest du pays à 4° 00' Nord et 10° 00' Est dont son chef lieu est Douala, la capitale économique. La collecte des échantillons a été effectuée précisément dans les services de pédiatrie de cinq hôpitaux de référence de cette région, à savoir l'Hôpital Laquintinie, les hôpitaux de district de Bonassama et Deido, les hôpitaux régionaux d'Edéa et Nkongsamba pour les prélèvements humains d'une part. D'autre part les prélèvements animaux ont été collectés à l'abattoir de Bonendalé et sur les points de ventes (marché de moutons et chèvres situé au maché central de Douala). Les analyses se sont déroulées au laboratoire de virologie du CME-FCB et au laboratoire de surveillance des Rotavirus du CDC à Atlanta, aux Etats Unis.

### **II.1.2 Population de l'étude**

La population d'étude a été constituée des enfants âgés de moins de 5 ans hospitalisés pour cause de diarrhées dans les services pédiatriques des hôpitaux sus-cités, des bovins et des caprins ayant une diarrhée.

#### **❖ Critères d'inclusion et d'exclusion**

Pour cette étude, les critères d'inclusion ont été les suivantes :

- Enfant âgé de moins de cinq ans vacciné ou pas et hospitalisé pendant plus de 48 h au plus pour cause de diarrhée dans les hôpitaux sus-cités.
- L'assentiment parental à participer à l'étude.
- Les bovins et caprins ayant une diarrhée sur le site de l'étude.

Les enfants âgés ayant une diarrhée sanglante et les animaux ne souffrant pas diarrhée ont été exclus de l'étude.

#### **❖ Critères de non inclusion**

Pour cette étude, les critères de non inclusion ont été les suivantes :

- Tout enfant âgé de plus de cinq ans
- Tout enfant souffrant de gastroentérite acquise au cours d'une hospitalisation due à un motif.
- Tout enfant dont le parent a refusé sa participation à l'étude.



---

## **II.2 Collecte des échantillons**

### **II.2.1 Echantillons humains**

Un assentiment parental a été préalablement obtenu des patients inclus dans l'étude. Pour chaque échantillon collecté, une fiche d'enquête (Annexe 3) a été remplie, indiquant les informations suivantes : l'âge, le sexe, le statut vaccinal et le type d'allaitement. Pour chaque enfant, environ 5 ml ou 5 mg de selles ont été recueillis de manière aseptique dans un pot à selles stérile à l'aide d'une spatule stérile, puis étiquetés (en mentionnant le code du patient et la date de collecte de l'échantillon) (OMS, 2009).

### **II.2.2 Echantillons des bovins et des caprins**

Pour chaque échantillon des bovins, environ 5 ml de fèces ont été collectés au niveau de l'aval du gros intestin dans un pot stérile à l'aide d'une spatule stérile après abatage de l'animal à l'abattoir de Bonendalé puis étiquetés (en mentionnant le code de l'échantillon et la date de collecte de l'échantillon).

Les échantillons des caprins ont été collectés aux différents points de vente à Douala (marché de mouton et des chèvres situé au marché central de Douala). En effet, pour chaque échantillon de caprin, 5ml ou 5mg de fèces frais ont été recueillis au niveau de l'anus de l'animal dans un pot à selle stérile puis étiquetés (en mentionnant le code de l'échantillon et la date de collecte de l'échantillon).

### **II.2.3 Transport et conservation des échantillons de selles**

Ces échantillons collectés ont été transportés au laboratoire de Reoviridaé de l'hôpital Laquintinie dans des glacières (entre 4°C et 8°C) puis conservés pendant 2 semaines à - 20°C jusqu'à être transporté au laboratoire de virologie du CME – FCB où ont été faites les analyses immunologiques et moléculaires. Les suspensions de 10% (v/v) destinée à l'extraction de l'ARN total ont été préparées pour chaque échantillon en utilisant l'eau distillée dépourvue de nucléase comme diluant ou 0,01M de solution saline tamponnée au phosphate (PBS). Ensuite les suspensions ont été conservés à - 80°C avant les analyses. Les selles positives au RVA et leurs extraits d'ARN ont été expédiés à la CDC pour caractérisation approfondie (séquençage).

## **II.3 Analyses biologiques**

### **II.3.1 Détection de la protéine VP6 du RVA par ELISA**

Une suspension de 10% (v/v) de chaque échantillon de selle a été préparée en utilisant le sérum physiologique tamponné comme diluant fourni dans le kit. La protéine VP6 du RVA

---

a été détectée par le kit ELISA de marque ProSpecT™ N°1320283 (Thermo Scientific, Oxoid, UK) (Gautam *et al.*, 2013).

Les suspensions ont été vortexées pendant 30 sec puis centrifugées à 10.000 tr pendant 5 min. Les surnageants des suspensions à tester et les contrôles ont été ajoutés dans les puits respectifs de la microplaque précotée. Une préparation standardisée de la peroxydase de raifort (HRP) avec l'anticorps (conjugué) a été ajoutée dans chaque puits afin de créer le "sandwich" avec le complexe antigène-anticorps, puis, les microplaques ont été incubées à température ambiante pendant 1h. Ensuite les puits ont été lavés afin d'éliminer tous les anticorps non consolidés au conjugué. Le TMB (3,3,5,5'-tetramethyl-benzidine), qui est la solution de substrat, a été rajouté dans chaque puits. L'enzyme (HRP) et le substrat ont alors interagi sur une courte période d'incubation. Seuls les puits contenant des anticorps et l'enzyme conjugué ont présenté un changement de couleur. Enfin la réaction enzymatique a été stoppée par l'addition d'une solution d'acide sulfurique et la densité optique a été mesurée à l'aide spectrophotomètre à une longueur d'onde de 450nm. L'échantillon est considéré comme positif si la valeur de sa DO a été supérieure ou égale à la DO du control négatif + 0,2 (Gautam *et al.*, 2013).

### **II.3.2 Extraction de l'ARN viral total**

L'extraction de l'ARN a été faite en utilisant QIAamp RNA mini spin (Qiagen, Hilden, Germany) recommandé par le fabricant des lots N°142339540 et N°1450474777 (QIAamp, 2010).

#### **- Préparation des réactifs de travail**

Les réactifs de travail ont été préparés conformément aux recommandations du fabricant suivant les proportions de mélange indiquées ci- dessous :

Le tampon AVL/ carrier RNA a été préparé en ajoutant 31 ml de solution AVL dans le tube de carrier RNA lyophilisé (310 µL). Le tampon AW1 a été préparé en ajoutant 125 ml d'éthanol absolu dans 95 ml d'AW1 concentré retrouvé dans le kit Qiagen. Le tampon AW2 a été préparé en ajoutant 160 ml d'éthanol absolu dans 66 ml d'AW2 concentré retrouvé dans le kit Qiagen.

#### **- Extraction de l'ARN viral**

Les suspensions de selles décongelées ont été vortexées pendant 15 sec puis centrifugées à 8000 tr pendant 5 min. Un volume de 140 µL de surnageant de cette suspension a été prélevé et ajouté à 560 µL de tampon de lyse couplé par le porteur d'ARN (AVL/carrier RNA). Le mélange a été incubé à température ambiante pendant 10 min puis centrifugé brièvement. 560 µL d'éthanol absolu a été ajouté au mélange et le tout a été homogénéisé puis centrifugé

---

brièvement. Ensuite 630 µL du mélange a été déposé sur une colonne de filtration livrée par le fabricant puis centrifugé à 8000tr / min ainsi le filtrat a été rejeté. Cette étape a été répétée à nouveau. Une succession de deux lavages en utilisant les tampons à base d'éthanol (AW1 et AW2) a été effectuée en transférant 500 µL de chaque tampon dans la colonne puis centrifugée respectivement à 8000tr/ min pendant une minute et à 14000tr pendant 3min. Après les étapes de lavages, les colonnes ont été placées dans de nouveaux microtubes stériles. L'étape d'élution a été faite en introduisant 60 µL de tampon d'élution (AVE) dans la colonne en prenant les précautions d'éviter de toucher la membrane et en laissant tomber le tampon au bon milieu de la membrane filtrante. Après incubation à température ambiante pendant une minute, la colonne a été centrifugée à 8000 tr/min pendant une minute. L'extrait d'ARN (environ 56 µL) ainsi obtenu a été conservé à - 80°C.

Dans chaque série, deux contrôles sont inclus ; un contrôle positif (sérum présentant une charge virale élevée) pour valider la réaction et un contrôle négatif (eau stérile) pour détecter les éventuelles contaminations.

### **II.3.3 Détection du gène VP6 par RT-PCR suivi de l'électrophorèse sur gel d'agarose**

Afin de confirmer la présence du RVA d'origine humaine dans les échantillons, une RT-PCR ciblant le gène VP6 suivi de l'électrophorèse sur gel d'agarose (Qiagen, Inc., Valencia, CA, USA) a été réalisée en utilisant les amorces : VP6F (nt 747 - 766) 5' GACGGVGCRACTACATGGT 3' et VP6R (nt 1126 - 1106) 5' GTCCAATTCATNCCTGGTGG 3' (Iturriza Gomara *et al.*, 2002).

L'extrait d'ARN (4µL) a été ajouté à 3µL du mélange d'amorces (20µM) dans un tube/puits de PCR. Le tout a été mélangé au vortex et centrifugé à 8000tr / min pendant 10 sec puis dénaturé à 97°C pendant 4 min et refroidi rapidement dans de la glace pendant 1 min. Le mélange a été centrifugé brièvement puis remplacé dans de la glace et 23µL du master mix (composé de 16µL d'eau dépourvue de nucléase ; 5µL de tampon 5X de Qiagen One step ; 1µL de dNTP (10Mm) et 1µL d'enzyme RT-PCR de Qiagen One step) ont été ajoutés ensuite dans le tube. Le mélange a été amplifié à l'aide d'un thermocycleur ABI 9700 (Applied Biosystems) dans les conditions suivantes : 42°C, 30 min ; 95°C, 15 min ; 30 cycles de (94°C 30sec, 42°C 30sec, 72°C 45sec) ; un cycle final de 7 min à 72°C puis 4°C jusqu'à utilisation. (Ndze *et al.*, 2012)

Après amplification, les produits de PCR ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose (Invitrogen) de 2% contenant 10µL de gel rouge (Biotium) sous une tension de 120 volts pendant 1h. Les bandes ont été visualisées sous UV à l'aide d'un illuminateur Gel Doc

(Bio-Rad). La taille des bandes a été vérifiée en se référant à un marqueur de taille de 100 pb (Invitrogen).

### II.3.4 Détection du gène NSP3 par la PCR en temps réel en une étape

Pour confirmer la présence du RVA d'origine humaine et animale dans les échantillons positifs à ELISA, la détection du gène NSP3 du RVA a été effectuée par « One Step RT-PCR » en temps réel (Qiagen, Inc. Valencia, CA). Cette technique était basée sur la détection et la quantification d'un émetteur fluorescent pendant le processus d'amplification et l'augmentation du signal d'émission fluorescence est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons produits durant la réaction (Mijatovic-Rustempasic *et al.*, 2013).

Dans cette étude, la détection du NSP3 consistait à amplifier le fragment génétique conservé du gène de la NSP3 compris entre 962 pb et 1050 pb en utilisant le FAM qui a été le marqueur de fluorescence de la sonde, l'eau dépourvue de nucléase comme NTC et deux échantillons positifs comme control positif interne. L'amplification a été effectuée en utilisant les amorces et la sonde Taqman représentées dans le tableau 5 ci-dessous.

**Tableau 5:** Amorces et sondes utilisées pour l'amplification du gène NSP3 (Mijatovic-Rustempasic *et al.*, 2013)

Noms		Séquences	Zone
Amorces	NSP3- F	5' ACC ATC TWC ACR TRA CCC TC 3'	963-982
	NSP3-R	5' GGT CAC ATA ACG CCC CTA TA 3'	1030-1049
Sondes	NSP3-P	5' AT GAG CAC AAT AGT TAA AAG CTA ACA CTG TAC A 3'	984- 1016

La RT-PCR a été réalisée dans un volume réactionnel de 25µL contenant 2µL d'extrait ARN ou de contrôle d'ARN et 23µL du Master mix PCR. Le mix PCR est constitué de 5µL de tampon 5X, 0,3125µL de chacune des 2 amorces à 10µM, 2,5µL de MnAOc2 à 25mM, 6µL de dNTP à 20mM, 1µL de RTth polymerase, 0,375 de sonde Taqman à 10µM, 0,5µL des amorces Xenon à 40 µM, 0,25µL de sonde Xenon à 10µM, et 6,75µL d'eau stérile.

Un contrôle négatif et deux contrôles positifs ont été intégrés dans chaque exécution pour que la manipulation soit valide. Les tubes ont été ensuite placés dans un thermocycleur ABI 7500 (Life Technologies, United States) dans les conditions retrouvées dans le tableau 6 :

**Tableau 6:** Cycles pour l'amplification du gène codant NSP3 par RT-PCR en temps réel (Mijatovic-Rustempasic *et al.*, 2013).

Etapes	Dénaturation d'ARN	RT	Dénaturation d'ADNc	Amplification
Paramètres	95°C, 5 min	50°C, 30 min	95°C, 5 min	95°C, 15 sec 60°C, 60 sec
Nombre de Cycles	1	1	1	45

Légende : RT : Reverse Transcription

Un échantillon était considéré positif, si une courbe d'amplification sigmoïde franchissait le seuil avant 45 cycles et si et seulement si les réactions des témoins positifs et négatifs donnaient les résultats attendus. Les extraits des ARN positifs au NSP3 ont été sélectionnés pour la suite des tests.

### II.3.5 Typage génétique du Rotavirus A

Les tests de typage génétique de RVA ont été réalisés successivement par la méthode RT-PCR en temps réel multiplex à quatre puits (Gautam *et al.*, 2016) et par RT-PCR conventionnelle ciblant des gènes VP7 et VP4 suivi d'une révélation par électrophorèse et du séquençage par la méthode de Sanger dans les échantillons de selles des enfants âgés de moins de cinq ans. Dans les échantillons de fèces des animaux, la détermination de génotype de RVA s'est fait par RT-PCR en temps réel multiplex, par RT-PCR conventionnelle des gènes VP7 et VP4 ou par séquençage nouvelle génération. Les échantillons positifs à l'électrophorèse mais pour lesquelles le séquençage de Sanger n'a pas conduit à une détermination de génotype, ont subi une nouvelle amplification des gènes VP7 et VP4 par la méthode de Nested RT-PCR suivi d'une révélation par électrophorèse (Mijatovic-Rustempasic *et al.*, 2016). En cas d'échec de cette méthode, les échantillons en question ont subi une étape de purification par ExoSap-It avant le séquençage de Sanger.

#### a) Typage par RT-PCR Multiplex en temps réel à quatre puits

Cette méthode avait permis de détecter rapidement et génotyper les souches de Rotavirus A et les souches vaccinales (Rotarix et RotaTeq) en présence d'un contrôle interne (Bactériophage MS2). Elle repose principalement sur la détection des marqueurs génétiques spécifiques retrouvés sur les gènes VP7 et VP4 caractérisant les génotypes G1, G2, G3, G4, G9, G12, P4, P6, P8, Rotarix, Rotateq (Gautam *et al.*, 2016). Les différents puits ont été

constitués tel qu'indiqué dans le tableau 7 et les amorces utilisées ont été représentées dans le tableau 8 ci-dessous.

**Tableau 7:** Eléments recherchés dans les différents puits (Gautam *et al.*, 2016).

N° de puits	1	2	3	4
Génotype	Rotarix, RotaTeq, G12	G4, G9,	G1, G3, P4	G2, P6, P8
Contrôles	MS2	NSP3		

**Tableau 8:** Amorces utilisées pour le typage par la qRT-PCR multiplex.

Amorces	Séquences 5' - 3'	Taille de l'amplicon (pb)
G1-R	ACA TTA GAR CCA CCA ACT TGT AT	849
G2-R	CAT TAT AAT CAC AAT ACA GTT G	146
G3-R	CGT CAG TAA TYA CTA RTT TYT CAG CTG	732
G4-R	GAG CAT TCG MTA ATA MTG ATA ATA C	198
G9-R	CAG AGT ATY YTT CCA TTC HGT ATC TCC	353
G12-R	GAA GTC ATA AAA YTY TCT TGT TG	283
P [4]-R	GCA TYC CTA CAA GTC TAT TAY TAG	497
P [6]-R	ACC ATC GAG TAC TGG YTC TAT YGT TG	199
P [8]-R	GYG GTT CAA YAG CAA CKA CT	339

*Légende* : F= sens ; R= anti-sens ; H= A,C ou T ; M= A ou C ; R= A ou G ; Y= C ou T ; K= G ou T ; Y= C ou T ; V= A, C ou G

Pour l'amplification, Le mélange réactionnel a été préparé en fonction du nombre d'extraits à amplifier et en fonction des puits. Un contrôle a été inclus dans chaque série afin de valider la technique. La préparation du mélange réactionnel a été effectuée afin d'avoir un volume 25 µL par puits (tableaux 9, 10, 11 et 12).

**Tableau 9:** Mélange réactionnel pour l'amplification du puits 1 (Gautam *et al.*, 2016)

Réactifs	Quantité/ réaction en µl
H <sub>2</sub> O dépourvue de nucléase	5.25
Tampon 5X	5
Mélange de dNTPs (2,4 uM)	6
rTth polymerase (2,5 U/ul)	1
Mn(OC) <sub>2</sub> (2,5 mM)	2,5
RotaTeq VP6® Forward primer (40 uM)	0,125
RotaTeq VP6®Reverse primer (40 uM)	0,125
RotaTeq VP6®Probe - Hex (10 uM)	0,25
Xeno Forward primer (40 uM)	0 ,25
Xeno Reverse primer (40 uM)	0,25
Xeno Probe - Tr (10 uM)	0,25
Rotarix® Forward primer (40 uM)	0,25
Rotarix® Reverse primer (40 uM)	0,25
Rotarix® Probe – cys (10 uM)	0,5
Extrait d'ARN	2
<b>Total</b>	<b>25</b>

**Tableau 10:** Mélange réactionnel pour l'amplification du puits 2 (Gautam *et al.*, 2016)

Réactifs	Quantité/ réaction en µl
H <sub>2</sub> O dépourvue de nucléase	5.25
Tampon 5X	5
Mélange de dNTPs (2,4 uM)	6
rTth polymerase (2,5 U/ul)	1
Mn(OC) <sub>2</sub> (2,5 mM)	2.5
G-F primer (40 uM)	0.375
G9-R primer (40 uM)	0.375
G9-HEX Probe (10 uM)	0.5
NSP3-F primer (40 uM)	0.25
NSP3-R primer (40 uM)	0.25
NSP3 TR Probe (10 uM)	0.25
G-F primer (40 uM)	0.375
G4-R primer (40 uM)	0.375
G4-FAM Probe (10 uM)	0.5
Extrait d'ARN	2
<b>Total</b>	<b>25</b>

**Tableau 11:** Mélange réactionnel pour l'amplification du puits 3 (Gautam *et al.*, 2016).

Réactifs	Quantité/ réaction en $\mu$ l
H <sub>2</sub> O dépourvue de nucléase	6.25
Tampon 5X	5
Mélange de dNTPs (2,4 uM)	6
rTth polymerase (2,5 U/ul)	1
Mn(OC) <sub>2</sub> (2,5 mM)	2.5
G-Forward primer (40 uM)	0.25
G1-Reverse primer (40 uM)	0.25
G1-HEX Probe (10 uM)	0.25
P-Forward primer (40 uM)	0.25
P4-Reverse primer (40 uM)	0.25
P4-TR Probe (10 uM)	0.25
G-Forward primer (40 uM)	0.25
G3-Reverse primer (40 uM)	0.25
G3-Cy5 Probe (10 uM)	0.25
Extrait d'ARN	2
<b>Total</b>	<b>25</b>

**Tableau 12:** Mélange réactionnel pour l'amplification du puits 4 (Gautam *et al.*, 2016).

Réactifs	Quantité/ réaction en $\mu$ l
H <sub>2</sub> O dépourvue de nucléase	5
Tampon 5X	5
Mélange de dNTPs (2,4 uM)	6
rTth polymerase (2,5 U/ul)	2
Mn(OC) <sub>2</sub> (2,5 mM)	2,5
P-Forward primer (40 uM)	0,25
P6-Reverse primer (40 uM)	0,25
P6-FAM Probe (10 uM)	0,5
G-Forward primer (40 uM)	0,125
G2-Reverse primer (40 uM)	0,125
G2-TR Probe (10 uM)	0,25
P-Forward primer (40 uM)	0,25
PB-Reverse primer (40 uM)	0,25
P8-Cy5 Probe (10 uM)	0,5
Extrait d'ARN	2
<b>Total</b>	<b>25</b>

Le mélange a été amplifié dans un thermocycleur ABI 7500 Real- Time (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) dans les conditions suivantes (Tableau 13) :



**Tableau 13:** Cycles pour l'amplification par qRT-PCR multiplex (Gautam *et al.*, 2016)

Etapes	Dénaturation	RT	Dénaturation d'ADNc	Amplification
Paramètres	95°C, 5 min	50°C, 30 min	95°C, 1 min	95°C, 15 sec 60°C, 60 sec
cycles	1	1	1	45

Légende : RT : Reverse transcription

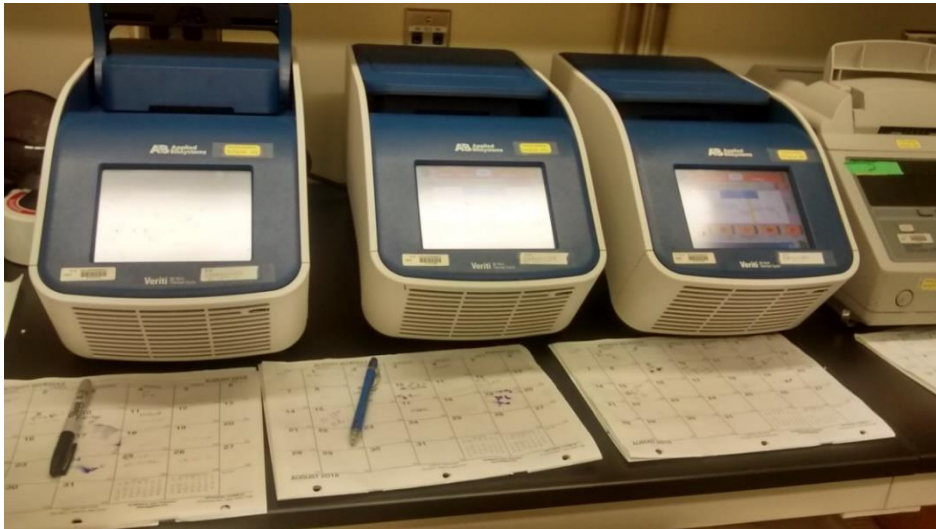
#### **b) RT-PCR conventionnelle des gènes VP7 et VP4**

Pour déterminer les génotypes G et P des souches de RVA présents dans les échantillons positifs à la RT-PCR ciblant le gène NSP3, la RT-PCR a été réalisée à l'aide du kit RT-PCR One Step (Qiagen, Inc.Valencia, CA). Elle a permis d'amplifier les fragments de gène VP7 et VP4 en utilisant les amorces Beg9 et End9 pour VP7 et VP4\_1-17F et Con2Deg pour VP4 (Simmonds *et al.*, 2008). Pour l'amplification, le mélange réactionnel a été préparé en fonction du nombre d'extraits à amplifier. Un témoin négatif, un témoin positif et contrôle sans cible de PCR ont été inclus dans chaque série d'amplification afin de valider la technique.

Avant la phase d'amplification, un mélange de 4µL d'ARN et 3µL d'amorces (10µM) a été préparé préalablement pour chaque tube et centrifugé à 8000 tr/ min pendant 10 sec. Après le mélange a été dénaturé à 97°C pendant 4 min puis rapidement refroidis pendant 1 min dans la glace. Le mélange a été ensuite centrifugé brièvement pour tasser toutes les gouttelettes puis replacé dans la glace. La RT-PCR a été réalisée dans un volume réactionnel de 30 µL par tube contenant 7µL d'ARN plus amorces dénaturés et 23µL du mix PCR. Le mix PCR était constitué de 5µL de tampon 5x, 1µL de dNTP à 20mM, 1µL de RTth polymérase et 16µL d'eau stérile (Simmonds *et al.*, 2008).

Le mélange réactionnel ainsi préparé a été centrifugé brièvement à 8000 tr/min pendant 10 sec. Ce mélange a été amplifié dans un thermocycleur ABI 9700 (Figure 15) dans les conditions suivantes : RT de 42°C à 30min ; activation de la polymérase à 95°C pendant 15min ; 30 cycles d'amplification de 94°C pour 30sec, 50°C pour 30sec, 72°C pour 45sec, puis une extension finale de 7min à 72°C et enfin 4°C jusqu'à utilisation pour les analyses en aval (Simmonds *et al.*, 2008).

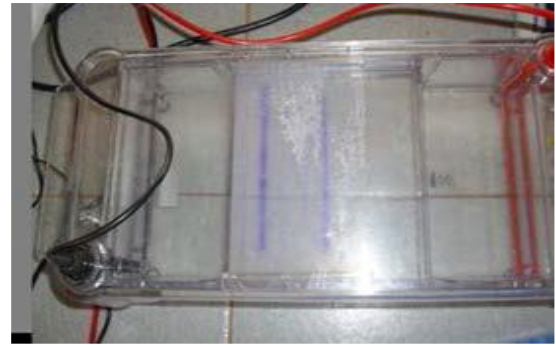
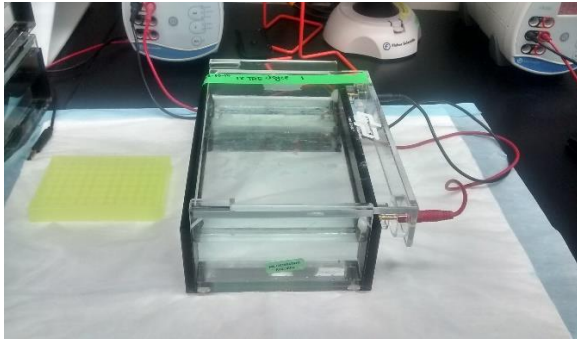
Après amplification, les produits de PCR ont été révélés par électrophorèse sur gel d'agarose 1% (Invitrogen) sous une tension de 120 volts pendant 1h et visualisés sous lumière UV.



**Figure 2 :** Thermocycleurs ABI 9700 (Ghapoutsa, 2018)

### ❖ Révélation des produits amplifiés

L'électrophorèse des acides nucléiques a été basée sur la migration des molécules chargées à travers un champ électrique dans les mailles d'une couche de gel d'agarose. Le gel d'agarose 1% a été préparé en dissolvant 1g d'agarose (Invitrogen) dans 100 ml de tampon Tris Acétate EDTA 1X (TAE). Le mélange a été chauffé au four à microonde pendant 2min. Ensuite 10 $\mu$ L de gel rouge (Biotium) ont été ajoutés au gel puis homogénéisés avant d'être coulés délicatement. Après solidification à température ambiante pendant 15 min, le gel a été placé dans les cuves d'électrophorèse contenant le tampon TAE 1X. Chaque produit de PCR (12 $\mu$ L) a été mélangé à 3 $\mu$ L de tampon de charge (Qiagen 5X loading dye) sur un papier paraffine. Ainsi 10 $\mu$ L de ce mélange ont été déposés dans les puits du gel. Le marqueur de poids moléculaire a été déposé dans les puits des extrémités du gel. Les échantillons ont migré sous une tension de 120 volts pendant 1h (Figure 16). Le gel est ensuite placé dans Trans - illuminateur d'UV (Biorad Moléculaire Imagen Gel Doc) et le gel rouge intercalé entre les bases des acides nucléiques va émettre une fluorescence révélatrice des bandes d'amplification. La taille des bandes a été vérifiée en se référant à un marqueur de taille allant de 100 à 1000 pb (Invitrogen) (Simmonds *et al.*, 2008).



**Figure 16:** A gauche, une cuve d'électrophorèse couplée à un générateur et à droite, une course électrophorétique des acides nucléiques du RVA sur gel d'agarose (Invitrogen) à 1% (Ghapoutsas, 2018)

### c) Séquençage des extraits des ADNc

#### ❖ Extraction et purification des produits amplifiés

Cette étape vise à éliminer certains produits généralement présents dans les tubes réactionnels et qui peuvent gêner la réaction de séquençage : nucléotides libres, enzymes, sels. La méthode d'extraction utilise le kit commercial « Qiaquick Gel Extraction » (Qiagen, Venlo, Netherlands) basée sur l'utilisation de colonnes de filtration contenant des billes de sephadex selon les recommandations du fabricant. Les membranes des colonnes vont permettre la fixation des composants réactionnels de l'amplification et l'élution de l'ADN après centrifugation (Essona *et al.*, 2015).

Cette méthode a consisté à mettre 500µl de tampon Qiaquick Gel Extraction dans chaque tube contenant du gel. Le mélange a été porté sur une plaque préchauffée à 50°C pendant 10 min ou jusqu'à dissolution complète du gel puis vortexé brièvement. Ensuite le mélange a été transféré dans une colonne de filtration livrée par le fabricant puis centrifugé à 13000 tr / min pendant une minute puis le filtrat a été jeté. Un volume de 750µl de tampon (PE) a été introduit dans la colonne de filtration et centrifugé à 13000 tr / min pendant une minute. Une seconde centrifugation a été réalisée pour éliminer toute trace de tampon (PE). Après centrifugation, la colonne de filtration a été placée dans de nouveaux tubes de collection stériles. Pour l'étape d'élution, 30µl de tampon d'élution (EB) ont été introduits dans la colonne en prenant les précautions d'éviter que l'embout ne touche la membrane filtrante. La colonne a été incubée à température ambiante pendant une minute puis centrifugée à 13000 tr/min pendant une minute. L'ADNc ainsi obtenu a été utilisé pour le séquençage.

---

## ❖ Séquençage de nucléotides

Les amplicons ont été séquencés à l'aide de la technique de Sanger adaptée avec fluorescence en utilisant le Kit Big Dye Terminator version 3.1 (Applied Biosystems, USA) pour une caractérisation moléculaire plus poussée. Les paires d'amorces utilisées ont été 9con1-L/VP7 et con3/con2 correspondant respectivement aux gènes VP7 et VP4 (Matthijssens *et al.*, 2010). Cette méthode de séquençage est basée sur la détermination des séquences de nucléotides d'un fragment d'ADN en utilisant les amorces spécifiques. L'élongation de chaque brin néosynthétisé a été stoppée par l'incorporation d'un ddNTP de la séquence du brin matrice. Chaque ddNTP (ddATP, ddTTP, ddCTP, ddGTP) a été marqué par un fluorochrome différent dont le spectre d'émission était spécifique.

Chaque réaction a été réalisée pour les quatre amorces dans les conditions suivantes :

Dans un mélange réactionnel total de 10 $\mu$ L, 2 $\mu$ L d'ADN purifié ont été mélangés avec 2 $\mu$ L de chaque amorce préparée à une concentration de 3,5 $\mu$ M, 2 $\mu$ L du mélange réactionnel Big Dye terminator (ddNTP fluorescents et Taq polymerase), 2 $\mu$ L de tampon 5X et 2 $\mu$ L d'eau stérile. Le mélange réactionnel était dénaturé à 95°C pendant 3 min puis soumis à 25 cycles d'amplification contenant chacun une dénaturation de 10 sec à 95°C, suivie d'une hybridation de 5 sec à 50°C, d'une élongation de 4 min à 60°C et d'un refroidissement à 4°C à l'infini. Les produits de séquençage étaient ensuite purifiés avec le kit Big Dye X Terminator (Applied Biosystems, USA) pour éliminer l'excès de BigDye qui risque de perturber le signal de lecture. Les produits de séquençage purifiés sont ensuite injectés dans le séquenceur ABI PRISM 3130 (Applied Biosystem, USA) pour subir une migration sur gel de polyacrylamide le long des capillaires (Figure 17). Les fluorochromes sont repérés et les signaux sont convertis en résultats informatisés sous forme d'électrophorégramme. Les séquences téléchargées ont été analysées et traitées par un logiciel *Sequencher*. Les séquences finales obtenues sont alignées par la méthode BLAST sur la base des données de la NCBI pour déterminer le génotype (Matthijssens *et al.*, 2013).



**Figure 17:** Analyseur génétique des séquences ABI PRISM 3130 (Applied Biosystem) (Ghapoutsas, 2019).

#### **d) Typage par Nested RT- PCR**

En cas de résultats négatifs par séquençage de Sanger après typage des gènes VP7 et VP4 par RT-PCR conventionnelle, les extraits concernés ont subi une nouvelle amplification des gènes VP7 et VP4 par la méthode de Nested RT-PCR à l'aide du kit Qiagen One-Step RT-PCR (Qiagen, Inc. Valencia, CA) (Mijatovic-Rustempasic *et al.*, 2016). Cette méthode consiste à amplifier un fragment du gènes VP7 ou VP4 par deux RT-PCR conventionnelles successives, la deuxième PCR utilisant le produit de la première PCR comme échantillon (en utilisant deux paires d'amorces successivement) et à séparer le produit d'amplification par électrophorèse sur gel d'agarose (Mijactovic-Rustempasic *et al.*, 2016).

#### **❖ PCR I**

L'ADNc a été amplifié en présence d'amorces spécifiques des gènes VP7 et VP4. L'amplification du fragment de 333 pb pour VP7 et du fragment de 257 pb pour VP4 a été réalisée en utilisant le couple d'amorces suivant (Tableau 14):

**Tableau 14** : Les amorces pour la première PCR I (Mijactovic-Rustempasic *et al.*, 2016).

Amorces	Séquences (5' - 3')
N-VP7F37	5'TAG CTC CTT TTR ATG TAT GGT A 3'
N-VP7R370	5'GTY GGC CAT CCT TTR GT 3'
N-VP4F1 (1-20)	5'GGC TAT AAA ATG GYT TCN YT 3'
N-VP4R1 (236-257)	5'ARY ADC CAR TAA TCR NYD RGT G 3'

La RT-PCR a été réalisée dans un volume réactionnel de 30 µL contenant 4µL d'extrait ARN ou de contrôle d'ARN et 26 µL du mix PCR. Le mix PCR était constitué de 6µL de tampon 5X, 1,5µL de chacune des 2 amorces à 10µM, 1µL de dNTP à 20mM, 1µL d'enzyme One Step RT-PCR, 15µL d'eau dépourvue de nucléase.

Après dénaturation de l'ARNdb (97°C pendant 5 min), le mélange réactionnel a été ajouté et amplifié dans un thermocycleur ABI 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) dans les conditions indiquées dans le tableau 15.

**Tableau 15** : les cycles d'amplification de la PCR I (Mijactovic-Rustempasic *et al.*, 2016).

Etapes	RT	Activation de la polymérase	Amplification			Elongation Finale
			dénaturation	hybridation	élongation	
Paramètres	50°C x 30 min	95°C x 15 min	95°C x 30 sec	50°C x 30 sec	72°C x 45 sec	72°C x 7 min
Cycles	1	1	30 – 35			1

## ❖ PCR II

La seconde PCR utilise les amorces situées à l'intérieur du premier fragment amplifié augmentant ainsi la sensibilité et la détection des faibles quantités d'ADN. Les produits de la première PCR obtenus ont été amplifiés par des amorces internes et spécifiques en utilisant les couples d'amorces suivant (Tableau 16):

**Tableau 16**: Les amorces de la PCR II (Mijactovic-Rustempasic *et al.*, 2016).

Amorces	Séquences (5' - 3')
N-VP7F49	5'ATG TAT GGT ATT GAA TAT ACC AC 3'
N-VP7R172	5'GTR TCC ATD GAT CCA GTN ATT GG 3'
N-VP4F2 (12-32)	5'GGY TTC NYT MAT TA TAG ACA- 3'
N-VP4R2 (204-224)	5'GNT GGY TGA TAW GGA CCR TCK A- 3'

La PCR II a été réalisée dans un volume réactionnel de 50 µL par tube contenant 2µL d'amplicons de la PCR I et 48 µL du mix PCR II. Le mix PCR II était constitué de 5µL de tampon II (10X), 1µL de chacune des 2 amorces à 10µM, 8µL de dNTP à 10mM, 0,5µL d'ADN polymérase Amplitaq, 28,5µL d'eau dépourvue de nucléase et 4µL de MgCl<sub>2</sub> à 25 mM. Les conditions d'amplification sont regroupées dans le tableau 17.

**Tableau 17** : Les conditions d'amplification de la PCR II (Mijactovic-Rustempasic *et al.*, 2016).

Etapas	Amplification			Elongation
	Dénaturation	Hybridation	Elongation	
Paramètres	94°C x 45 sec	42°C x 30 sec	72°C x 60 sec	72°C x 7 min
Cycles	30			1

La révélation des produits d'amplification issus de la PCR II s'est faite par électrophorèse sur gel d'agarose (Seakem) (Lonza Rockland, Inc) de 3% en présence du gel rouge (Biotium) avec un marqueur de poids moléculaire et la visualisation sous UV décrite plus haut. Les bandes d'intérêt ont été excisées du gel à l'aide d'un scalpel puis purifiées en utilisant le kit EXosap-it™ (Termofischer Scientific, USA) avant d'être séquencées à nouveau par la méthode de Sanger. Le génotypage de P ou G a été rendu « non typables » quand les produits de Nested RT-PCR ont été négatifs.

#### ➤ Purification des produits de PCR

Une étape de purification a été effectuée sur les produits de la seconde amplification de la Nested RT-PCR en utilisant le kit EXosap it™ (Termofischer Scientific, USA). Ce produit de nettoyage enzymatique fait appel à deux enzymes : la 5' exonucléase I permettant de digérer les simples brins et la 5' phosphatase alcaline de crevette permettant d'inactiver les désoxyribonucléotides résiduels.

En effet, un volume de 5ul du produit de PCR a été incubé avec 1ul de mélange enzymatique. L'ensemble a été placé dans le thermocycleur pendant 15 min à 37°C (activation des enzymes) puis 15 min à 80°C (dénaturation des enzymes) (Bonica *et al.*, 2015). Les produits purifiés ont été séquencés et les séquences obtenues ont subi un alignement sur BLAST afin de déterminer les génotypes.

---

### e) Séquençage de nouvelle génération

Le séquençage du génome partiel a été effectué sur cinq échantillons animaux non génotypés par les techniques de RT-PCR afin de déterminer le génotype. Nous avons utilisé un séquenceur de bureau MiSeq (Illumina, San Diego, Californie, Etats-Unis) en utilisant le kit MiSeq Nano Reagent Kit v2 (500 cycles). Les Contig obtenus ont été comparés à des séquences précédemment publiées dans la base de GenBank, en utilisant BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) ( Djikeng *et al.*, 2008 ; Kamoto *et al.*, 2016).

#### ❖ Préparation de la banque Illumina

L'ARN a été transcrit inversement et amplifié en une seule étape en utilisant les amorces suivantes :

FR26RV-N:GCCGGAGCTCTGCAGATATCNNNNNN

FR20RV: GCCGGAGCTCTGCAGATATC

5µL d'ARN ont été mélangés avec 1µL d'amorce FR26V-N (10 µM), 1µL de dNTP (10 Mm) et 6µL d'eau sans RNase. Le mélange a été chauffé à 65°C pendant 5 min et placé dans de la glace avant d'ajouter un Master mix constitué de : 1 pl (40U) de RNase OUT (Thermo Fisher Scientific), 1µL (200U) de transcriptase inverse Superscript III (Thermo Fisher Scientific), 4 µL de tampon de réaction 5X Superscript III et 1µL de 0,1M de dithiothreitol pour donner un volume final de 20µL. Le mélange a été incubé dans un thermocycleur à 25°C pendant 5 min, suivi de 50min à 50°C. La réaction a été arrêtée par chauffage à 94°C pendant 3 min, puis refroidie à 4°C. La synthèse d'ADNc du deuxième brin a été réalisée en ajoutant 0,5 pi (2,5U) de grand fragment de Klenow (New England Biolabs) à chaque réaction et en incubant à 37°C pendant 60 min suivi de 75°C pendant 10 min pour inactiver l'enzyme.

L'amplification SISPA (amplification à une seule amorce indépendante de la séquence et transcription inverse) a été réalisée en double pour chaque échantillon en utilisant le mélange réactionnel d'ADNc une fois. Le mélange réactionnel final était composé de 5 µL d'ADNc, 2µL d'amorce FR20RV (10µM), 1µL de dNTP (10Mm), 0,5µL d'ADN polymérase de Phusion (Thermo Fisher Scientific), 10µL de 5X de tampon Phusion et 31,5µL d'eau exemptée de nucléase. La réaction de PCR a été réalisée par chauffage à 98°C pendant 30sec suivi de 15 cycles de 98°C pendant 10 sec, 62°C pendant 30°C, 72°C pendant 120 sec suivi d'une extension finale à 72°C pendant 10 min. L'ADN amplifié a été purifié en utilisant AMPure XP beads (Beckman Coulter) (Djikeng *et al.*, 2008)



---

L'ADN a été fragmenté à une longueur moyenne de 400 pb par sonication (microTUBEs, Covaris) et des banques de séquençage Illumina indexées ont été préparées à partir de l'ADN fragmenté en utilisant le kit de préparation de banque d'ADN NEBNext ULTRA II (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA), préparé selon les instructions du fabricant. La qualité de la banque d'ADNc purifiée a été évaluée sur un bioanalyseur Agilent 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) (Djikeng *et al.*, 2008 ; Kamoto *et al.*, 2016).

#### ❖ Séquençage nucléotidique et analyse des données de séquences

Le séquençage des nucléotides a été réalisé sur un séquenceur Illumina MiSeq (Illumina, San Diego, CA, USA) en utilisant un kit de réactifs MiSeq v2 (Illumina) pour générer 151 lectures à paires appariées. L'analyse des données a été réalisée en utilisant CLC Genomics Workbench v8.0.1 (CLC Bio, Cambridge, MA, USA). Les contigs ont été assemblés à partir des lectures de séquence obtenues par assemblage de novo. En utilisant les contigs assemblés comme séquences, l'outil de recherche d'alignement local de base (BLAST) dans une base de données de nucléotides non redondante a été recherché pour obtenir la séquence nucléotidique partielle de chaque segment de gène de cinq échantillons. Les séquences nucléotidiques obtenues ont été analysées par bioinformatique afin de les comparer avec les bases de données de référence (Djikeng *et al.*, 2008 ; Kamoto *et al.*, 2016).

### II.4 Analyse phylogénétique

Les séquences ont été alignées en utilisant la méthode ClustalW, disponible dans le logiciel MEGA version 7.0.26. Les arbres phylogénétiques ont été construits en utilisant l'algorithme de « Maximun likelihood » avec le modèle de Kimura-2 paramètres dans MEGA (Molecular Evolutionary Genetic Analysis) version 7.0.26 (Tamura *et al.* 2016). La construction des arbres a été effectuée grâce aux séquences nucléotidiques de VP4 et VP7 obtenues dans notre étude, des souches isolées au Cameroun (Ndze *et al.*, 2014) et des souches de référence d'origine humaine extraites de GenBank. La fiabilité statistique a été vérifiée à l'aide de 1000 replicats bootstrap. Les distances des nucléotides ont été calculées à l'aide du modèle de p. distance (pairwise distance).

### II.5 Analyse statistique

Toutes les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel SPSS 26.0. Les distributions statistiques ont été comparées en utilisant le test de chi carré, ou le test exact de

---

Fisher, avec un intervalle de confiance de 95% et la signification statistique a été considérée pour une valeur de  $p < 0,05$ .

## **II.6 Considération éthique**

Une clairance éthique a été obtenue du Comité National d'Ethique de la Recherche pour la Santé Humaine sous N°2016/01/696/CNERSH/SP (Annexe 1). Une autorisation de Recherche a été obtenue de la délégation Régionale de Santé Publique du Littoral sous N°1684/AR/MINSANTE/DRSPL/BCASS (Annexe 2).

---

## **CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION**

---

## **III.1 Résultats**

Au cours de cette étude, 130 échantillons de selles diarrhéiques d'enfants de moins de 5 ans hospitalisés pour gastroentérite sévère et 134 échantillons de fèces d'animaux (bovins et caprins) atteints de gastro-entérite ont été prélevés dans la région du Littoral du Cameroun. Parmi les 130 participants inclus dans cette étude, 54,7% (71/130) étaient de sexe féminin et 45,3% (59/130) étaient de sexe masculin. L'âge moyen des enfants était de  $13,12 \pm 9,19$  mois.

### **III.1.1 Détermination de la fréquence des gastroenterites causées par RVA chez les enfants de moins de cinq ans, les bovins et les caprins.**

#### **III.1.1.1 Détermination de fréquence des gastroenterites causées par le RVA chez les enfants de moins de cinq ans.**

Les échantillons de selles diarrhéiques ont été prélevés chez 130 enfants des deux sexes, hospitalisés pour une diarrhée sévère dans la région du Littoral du Cameroun. Soixante-dix-neuf soit 60,8% de ces enfants avaient reçu les deux doses de vaccin Rotarix, tandis que 20% (26/130) seulement n'étaient pas vaccinés et 19,2% (25/130) avaient un statut vaccinal inconnu.

Le rotavirus A a été diagnostiqué dans 54,6% (71/130) des échantillons de selles diarrhéiques par la technique ELISA dont 54,9% (39/71) provenaient de filles et 45,1% (32/71) de garçons ( $p = 0,000$ ).

63,4% (45/71) des cas positifs à ELISA étaient confirmés par RT-PCR tandis que 78,9% (56/71) des cas positifs à ELISA étaient confirmés par RT-PCR en temps réel. Au cours de cette étude, 63,4% (45/71) échantillons étaient positifs par les trois méthodes ELISA, RT-PCR et RT-PCR en temps réel.

#### **a) Identification de la protéine VP6 en fonction du statut vaccinal et du mode d'allaitement**

Le test ELISA a détecté la présence d'antigène du RVA dans 54,6% (71/130) des échantillons de selles diarrhéiques. La plupart des enfants positifs au RVA (57,8%) avaient reçu deux doses de vaccin Rotarix. Aucune différence significative n'a été observée entre le statut vaccinal et la survenue de l'infection à RVA ( $p = 0,786$ ) (Tableau 18).

**Tableau 18:** Résultats d'ELISA répartis en fonction du statut vaccinal

		Statut vaccinal			Total
		Vacciné	Non vacciné	Inconnu	
ELISA	Positif	41	15	15	71
	Négatif	38	11	10	59
	Total	79	26	25	130
	P value	p= 0,786			

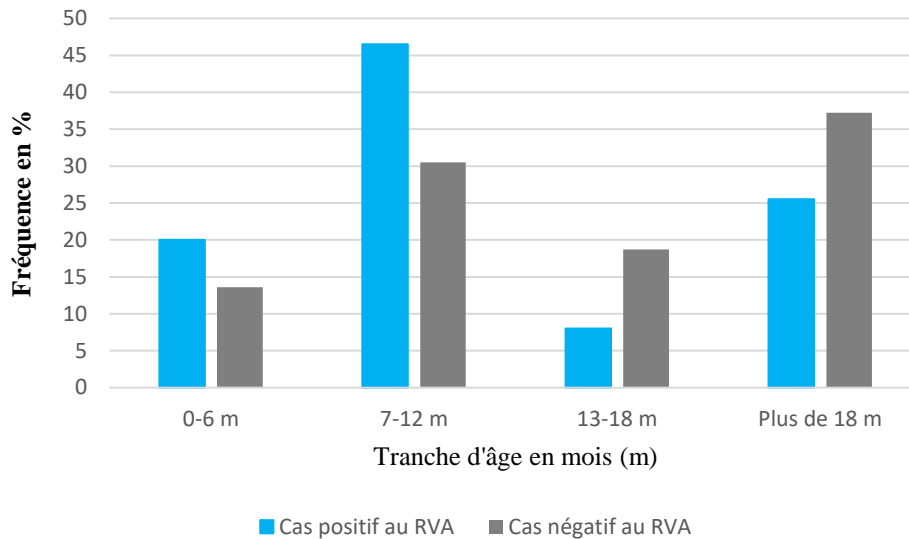
L'antigène du RVA a été détecté à la fois chez les enfants ayant reçu l'allaitement mixte et chez les enfants ayant été allaités uniquement au sein. Il n'avait pas d'association statistiquement significative entre le mode d'allaitement et la survenue de l'infection à RVA ( $p = 0,76$ ) (Tableau 19).

**Tableau 19:** Résultats d'ELISA répartis en fonction du mode d'allaitement

		Mode d'allaitement		Total	P value
		Maternal	Mixte		
ELISA	Positif	32	39	71	p=0,76
	Négatif	26	33	59	
	Total	58	72	130	

#### **b) Répartition des cas positifs au RVA par ELISA en fonction des tranches d'âges**

Toutes les tranches d'âge ont été touchées par l'infection à RVA mais les enfants âgés de 7 à 12 mois étaient les plus touchés avec 46, 5% (33/71) de cas positifs ( $p = 0,62$ ) (Figure 18). Les enfants étaient regroupés par tranche d'âge de 6 mois.

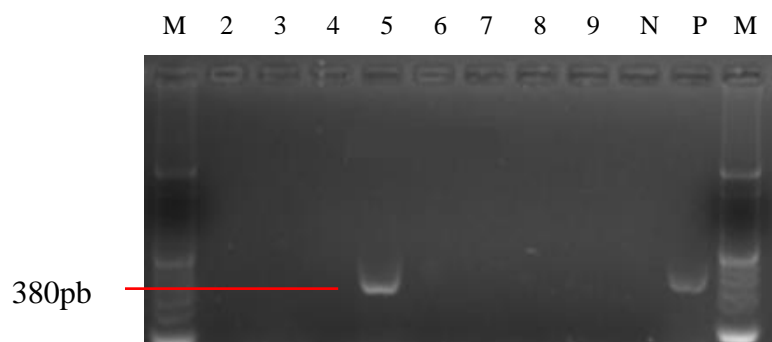


**Figure 18 :** Distribution des cas positifs au RVA par ELISA en fonction des tranches d'âge.

### III.1.1.2 Détermination de fréquence des gastroenterites causées par le RVA chez les bovins et les caprins

Sur les 134 échantillons fécaux prélevés, 100 échantillons provenaient des bovins de la race de *Zébus Mbororo* âgés de 3 à 12 mois et de 34 des caprins de la race de *Djallonké* âgés de 3 à 9 mois. Le RVA a été détecté dans 28,4% (38/134) échantillons animaux par la RT-PCR ciblant le gène VP6 soient 25% (25/100) de positivité chez les bovins et 38,2% (13/34) chez les caprins (Figure 19).

44% (59/134) échantillons animaux ont été positifs pour la présence d'ARN du RVA par RT-PCR en temps réel ciblant le gène NSP3. Soient 36% (36/100) d'échantillons de bovins et 67,6% (23/100) d'échantillons de caprins positifs.



**Figure 19:** Gel présentant les produits de RT-PCR du gène VP6

Lignes 2-9 : échantillons. Ligne M : 100pb du marqueur du poids moléculaire (100pb).  
Ligne N : Contrôle négatif. Ligne P : Contrôle Positif

---

### **Première conclusion partielle :**

Cet objectif a permis de mettre en évidence que le RVA est toujours un pathogène important chez les enfants âgés de moins de cinq ans souffrant de gastroentérite préalablement vaccinés. La fréquence des gastroenterites causées par le RVA chez les enfants âgés de moins de cinq ans était de 54,6% en utilisant la technique de routine ELISA et de 78,9% en utilisant la RT-PCR en temps réel. Il n'y avait pas de différence statistiquement significative dans la détection du RVA chez les enfants allaités ou pas et parmi les enfants vaccinés ou pas. Chez les animaux, la fréquence d'infection au RVA trouvée est de 44% dans cette étude.

### III.1.2 Identification des variants génétiques de Rotavirus A chez les humains, les bovins et les caprins.

#### III.1.2.1 Détermination des variants génétiques de Rotavirus A chez les humains

Tous les échantillons humains positifs au RVA confirmés par RT-PCR en temps réel ont été caractérisés selon leurs spécificités G ou P par des techniques de RT-PCR via l'amplification des gènes VP7 et VP4 en utilisant des amorces spécifiques pour chaque segment. En raison du fait que certains génotypes ne pouvaient pas être typés par ces techniques, ces échantillons ont été réamplifiés en utilisant des amorces consensus, purifiés puis séquencés. Les génotypes P et G ont été déterminés en utilisant BLAST. Sur les 56 échantillons des enfants positifs par la RT-PCR en temps réel, seuls 50% (28/56) échantillons ont été complètement typés.

Parmi les génotypes P, les souches P[8] (50%) représentaient la grande majorité des cas, suivies des souches P[6] (21,4%), P[4] (17,9%) et de souches mixtes P[4]P[8] (3,6%). Le génotype P[nt] n'a pu être déterminé pour 7,1% d'isolats associés aux génotypes G2 (Tableau 20).

Parmi les génotypes G, la souche G2 était la plus répandue (46,4%), suivi de G3 (35,7%), G1 (14,3%) et de G9 (3,6%) (Tableau 20).

**Tableau 20:** Distribution des génotypes G et P circulants dans la région du Littoral du Cameroun

Génotypes	Fréquence (%) (Nombre)	<i>p</i> – value
<b>Génotypes G</b>		
G1	14,3 (4)	<b>&lt;0,001</b>
G2	46,4 (13)	
G3	35,7 (10)	
G9	3,6 (1)	
<b>Génotypes P</b>		
P[4]	17,9 (5)	<b>&lt;0,001</b>
P[4]P[8]	3,6 (1)	
P[6]	21,4 (6)	
P[8]	50,0 (14)	
P[nt]	7,1 (2)	

Légende : nt : non typé

La combinaison de génotype la plus courante était G3P[8] (21,4%), suivie de G2[P4] (17,9%), G1P[8] (14,3%) et G3P[6] (14,3%). Tandis que les combinaisons de génotypes les



moins répandues étaient G2P[8] (10,7%), G2P[6] (7,1%) et G9P[8] (3,6%) avec la présence d'une combinaison rare, G2P[4]P[8] (3,6%) ainsi que des combinaisons génotypiques partiellement déterminées G2P[nt] (7,1%) (Tableau 21).

**Tableau 21:** Distribution de combinaisons génotypiques de RVA circulant chez les enfants de moins de cinq dans la région du Littoral du Cameroun.

Combinaisons de génotypes	Fréquence (%) (Nombre)	<i>p</i> – value
G1P[8]	14,3 (4)	<b>&lt;0,001</b>
G2P[4]	17,9 (5)	
G2P[4] P[4]P[8]	3,6 (1)	
G2P[6]	7,1 (2)	
G2P[8]	10,7 (3)	
G2P[nt]	7,1 (2)	
G3P[6]	14,3 (4)	
G3P[8]	21,4 (6)	
G9P[8]	3,6 (1)	

### III.1.2.2 Determination des variants génétiques de RVA chez les bovins et les caprins.

Les extraits d'ARN positif par RT-PCR en temps réel ont été analysés par plusieurs techniques moléculaires de manière séquentielle selon que la méthode permettait de déterminer le génotype ou pas. Aucun génotype de RVA n'a pu être déterminé par les différentes techniques de RT-PCR réalisés au cours de cette étude.

Après séquençage de nouvelle génération, les génotypes suivants ont été déterminés G10P[11] (20%), G1P[8] (40%) et G2P[4] (40%) dans quelques échantillons des animaux. Les échantillons M1 et M11 ont eu des séquences similaires aux génotypes humains et bovins avec 92 % d'identité chacun ; tandis que les souches isolées de M16, M19 et BF22 partageaient des séquences nucléotides avec les souches G2[P4] et G1[P8] humaines présentant une similitude nucléotidique de 82% à 97% (Tableau 22).

**Tableau 22:** Différents génotypes provenant d'échantillons animaux après NSG.

<b>Echantillons</b>	<b>Contig</b>	<b>% d'identité</b>	<b>Genotypes</b>	<b>Origine du RVA</b>
<b>M1</b>	144	92	G10P[11]	Humaine et Bovine
<b>M11</b>	079	92	G1P[8]	Humaine et Bovine
<b>M16</b>	67	91	G2P[4]	Humaine
<b>M19</b>	053 et 114	82 et 87	G2P[4]	Humaine
<b>BF22</b>	25 et 37	96 et 97	G1P[8]	Humaine

---

## **Deuxième conclusion partielle :**

Notre étude est la première à décrire les différents génotypes présents dans la région du Littoral du Cameroun. Cette partie de l'étude a révélé la prédominance chez les humains des génotypes G3P[8] (21,4%), G2P[4] (17,9%), G1P[8] (14,3%) et G3P[6] (14,3%), avec la présence d'une combinaison rare, G2P[4]P[8] (3,6%), ainsi qu'une souche d'origine animale, G9P[8] (3,6%). Chez les animaux, les génotypes déterminés par le séquençage nouvelle génération ont été G10P[11] (20%), G1P[8] (40%) et G2P[4] (40%). La présence des génotypes G1P[8] (40%) et G2P[4] (40%) dans les échantillons animaux serait une évidence potentielle de transmission du RVA de l'homme aux animaux.

---

### III.1.3 Détermination des relations phylogéniques entre les souches humaines de RVA en circulation dans la région du Littoral et celles provenant de GenBank.

Les arbres phylogénétiques ont été construits avec des souches de RVA sélectionnées sur la base de séquences de référence partielles des gènes VP4 et VP7.

Pour la construction de l'arbre phylogénétique regroupant le segment du gène codant VP7, le nombre total des séquences nucléotidiques obtenues pour les génotypes VP7 : G1, G2, G3 et G9 était respectivement de 4, 13, 10 et 1 (Figure 20).

G1 : la section de l'arbre G1-VP7 a été construite à partir de 4 souches camerounaises G1 séquencées dans cette étude. Ces 4 souches sont étroitement liées les unes aux autres et regroupées dans la lignée II. Cette lignée contenait également les souches G1 provenant du vaccin Rotarix et de la souche du Venezuela isolée en 2003 (RVA/Human-wt/VEN/VCE19063/2003/G1P[8]) avec des similitudes de nucléotides élevées (95-99,2%). Les autres souches G1 du Nord- Cameroun, regroupées avec une souche signalée en Belgique étaient de la lignée I avec une similitude de nucléotide de 97,2- 99,6%.

G2 : la section de l'arbre G2-VP7 a été construite à partir de 13 souches camerounaises G2 séquencées dans cette étude. 11 souches camerounaises isolées de cette étude étaient regroupées dans la lignée IV en formant deux sous-clusters avec une similarité de nucléotide de 97,6 à 99,5%. Le 1<sup>er</sup> sous- clusters contenait cinq souches de notre étude (RVA / Human-wt / CMR/H43 / 2016 / G2Pnt, RVA / Human-wt / CMR / H44 / 2016 / G2Pnt, RVA / Human-wt / CMR / H71 / 2016 / G2P4, RVA / Human-wt / CMR/ H39 /2016/ G2P8 et RVA / Human-wt / CMR/H22 / 2016 / G2P6) qui étaient étroitement liées entre elles. Elles étaient également liées à une souche G2 belge isolée en 2009, une souche G2 du Mozambique et une souche G2 du Brésil. Le 2<sup>e</sup> sous- cluster contenait six souches de notre étude qui étaient étroitement liées les unes aux autres et aussi aux souches camerounaises détectées dans l'étude antérieure menée au Nord et Nord-Ouest entre 2010- 2011 (Ndze et *al.*, 2012). Toutes les souches G2 camerounaises étaient distinctes des souches vaccinales G2 de RotaTeq. Les deux autres souches G2 isolées dans cette étude (RVA/Human-wt/CMR/H2/2016/G2P8 et RVA/Human-wt/CMR/H69/2016/G2P4P4P8) incluses dans l'arbre divergent considérablement de toutes les souches G2 sélectionnées pour la construction de cet arbre (Figure 20).

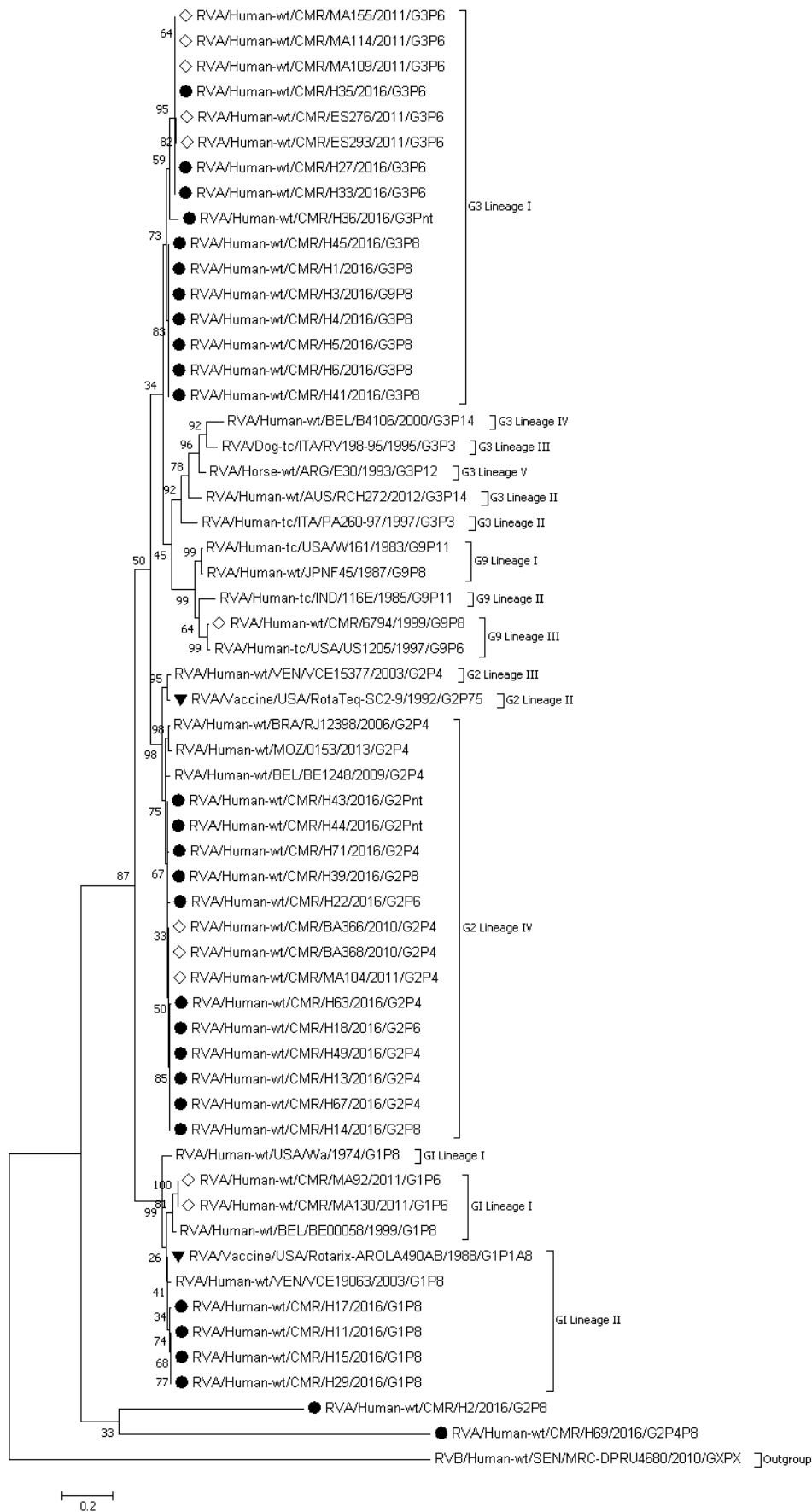
G3 : un total de 10 souches camerounaises G3 séquencées dans cette étude a été sélectionné pour une analyse phylogénétique du génotype G3. Toutes les souches G3 camerounaises y compris celles isolées précédemment au Nord et Nord-Ouest du pays sont étroitement liées les

---

unes aux autres avec une similarité nucléotidique de 98,2 à 99,8 % et regroupées dans la lignée I.

G9 : une seule souche G9 a été identifiée dans notre étude. Cette souche (RVA/Human-wt/CMR/H3/2016/G9P8) est étroitement liée aux souches G3 de notre étude (similarité de nucléotide de 98,9%).

Toutes les souches G1, G2, G3, G9, c'est-à-dire les souches de référence, les souches isolées dans cette étude et les souches identifiées dans les études antérieures incluses dans l'arbre divergent considérablement de la souche RVB/Human-wt/SEN/MRC-DPRU4680/2010/GXPX utilisée comme exogroupe.



**Figure 20:** Analyse phylogénétique des séquences du gène VP7 (Ghapoutsa, 2021)

---

Légende : les séquences nucléotidiques des souches représentatives de Rotavirus G1, G2, G3 et G9 circulant dans la région du Littoral du Cameroun [marquées d'un cercle plein (●)] ont été comparées aux séquences G1, G2, G3 et G9 des études antérieures réalisées avant l'introduction du vaccin [indiquées par un losange vide (◇)], aux souches vaccinales Rotarix et Rotateq disponibles dans le commerce [marquées d'un triangle plein] et des souches de Rotavirus de référence prises dans la base de données GenBank. La nomenclature des Rotavirus a été utilisée conformément au groupe de travail sur la classification des Rotavirus. Pour chaque souche (le cas échéant), l'espèce hôte, le pays d'origine, l'année d'isolement et le génotype GP sont indiqués. Les arbres ont été construits à l'aide de la méthode de Maximum likelihood et du modèle à 2 paramètres de Kimura. La barre d'échelle indique la distance génétique.

---

Un arbre a été construit pour des souches de RVA sélectionnées sur la base des séquences génomiques partielles du segment du gène codant VP4. Le nombre total des séquences nucléotidiques obtenues pour les génotypes VP4 : P8, P4 et P6 était respectivement de 13, 6 et 5 (Figure 21).

P[8] : la section de l'arbre P[8]-VP4 a été construite à partir de 13 souches camerounaises P[8] séquencées dans cette étude. 11 souches P[8] de notre étude étaient regroupées dans la lignée III en formant 2 sous clusters avec une similarité nucléotidique (98,2-100%). Un sous cluster qui regroupe 3 souches P[8] de notre étude étroitement liées entre elles et un autre sous cluster qui regroupe 8 souches P[8] de notre étude liées les unes aux autres. Cette lignée contenait également les souches P[8] détectées dans les études antérieures menées au Nord et Nord-Ouest du Cameroun (Ndze *et al.*, 2012), celles de l'Ouest et Sud-Ouest du Cameroun (Esona *et al.*, 2010), des souches du Mozambique et une souche belge isolée en 2008.

Une souche de notre étude (RVA/Human-wt/CMR/H41/2016/G3P[8]) était étroitement liée à la souche vaccinale P[8] de RotaTeq avec des similitudes de nucléotides très élevées (99,2%). Cette souche et celle du vaccin RotaTeq étaient regroupées dans la lignée II.

Une souche [P8] isolée de notre étude (RVA/Human-wt/CMR/H29/2016/G1P8) incluse dans l'arbre diverge considérablement de toutes les souches [P8] utilisées pour la construction de cet arbre (Figure 21).

[P4] : un total de 6 souches camerounaises séquencées dans cette étude a été sélectionné pour une analyse phylogénétique du génotype [P4]. Cinq souches [P4] camerounaises de notre étude y compris celles isolées précédemment au Nord et Nord-Ouest du pays sont regroupées dans la lignée III avec une similarité de nucléotide de 95-97,5%. Quatre de nos souches [P4] étaient étroitement liées entre elles et formaient un groupe. Une de nos souches [P4] (RVA/Human-wt/CMR/H69/2016/G2P4P4P8) était étroitement liée à une souche philippine, à une souche belge et aux souches camerounaises [P4] des études antérieures.

Une souche [P4] isolée de notre étude (RVA/Human-wt/CMR/H67/2016/G2P4) incluse dans l'arbre diverge considérablement de toutes les souches [P4] utilisées pour la construction de cet arbre (Figure 21).

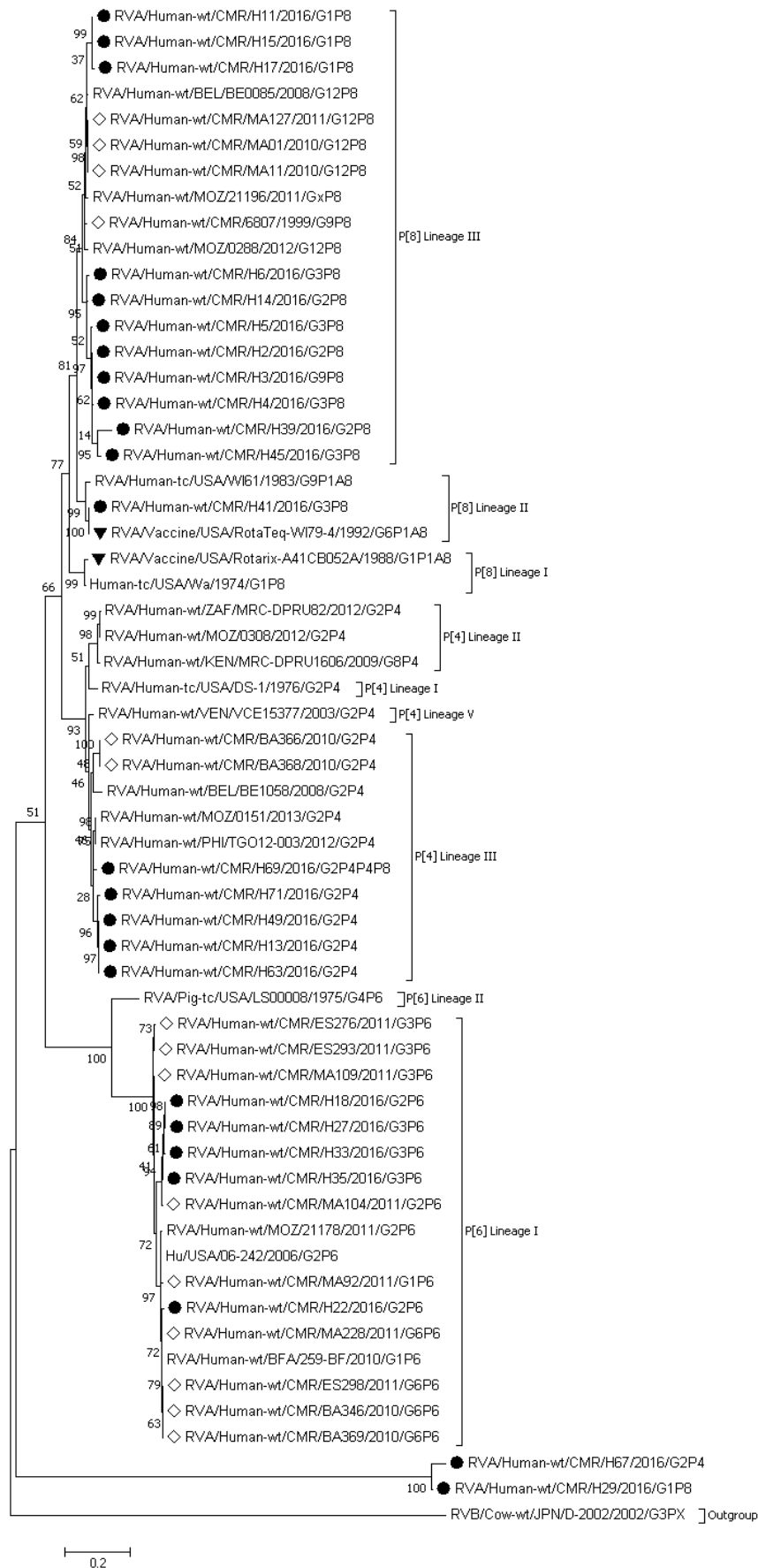
[P6] : la section de l'arbre P[6]-VP4 a été construite à partir de cinq souches camerounaises [P6] séquencées dans notre étude. Toutes les souches [P6] camerounaises isolées de cette étude et des études antérieures étaient regroupées dans la lignée I en formant deux sous-clusters. Le 1<sup>er</sup> sous-cluster contenait quatre souches de notre étude (RVA/Human-wt / CMR / H18/



---

2016/G2P6, RVA/Human-wt/CMR/H27/2016/G3P6, RVA/Human-wt/CMR/H33/2016/G3P6 et RVA/Human-wt/CMR/H35/2016/G3P6) qui étaient étroitement liées entre elles. Le 2<sup>e</sup> sous-cluster contenait une souche (RVA/Human-wt/CMR/H18/2016/G2P6) de notre étude qui était étroitement liée aux souches camerounaises détectées dans l'étude antérieure menée à l'Extreme - Nord et Nord - Ouest en 2010- 2011 (Ndze *et al.*, 2012). On note une similarité nucléotidique de 97,4 à 100% entre ses différentes souches.

Toutes les souches [P8], [P4] et [P6] c'est-à-dire les souches de référence, les souches isolées de cette étude et les souches identifiées dans les études antérieures incluses dans l'arbre divergent considérablement de la souche RVB/Cow-wt/JPN/D-2002/2003/G3PX comme exogroupe.



**Figure 21** : Analyse phylogénétique des séquences du gène VP4

---

Légende : les séquences nucléotidiques des géotypes représentatives de Rotavirus P[8], P[4] et P[6] circulant dans la région du Littoral du Cameroun [marquées d'un cercle plein (●)] ont été comparées aux séquences P[8], P[4] et P[6] des études antérieures réalisées avant l'introduction du vaccin [indiquées par un losange vide (◇)], aux souches vaccinales Rotarix et Rotateq disponibles dans le commerce [marquées d'un triangle plein] et des souches de Rotavirus de référence prises dans la base de données GenBank. La nomenclature des Rotavirus a été utilisée conformément au groupe de travail sur la classification des Rotavirus. Pour chaque souche (le cas échéant), l'espèce hôte, le pays d'origine, l'année d'isolement et le géotype GP sont indiqués. Les arbres ont été construits à l'aide de la méthode de Maximum likelihood et du modèle à 2 paramètres de Kimura. La barre d'échelle indique la distance génétique.

---

### **Troisième conclusion partielle :**

D'après l'analyse phylogénétique de l'arbre VP7, les souches G2 appartenaient à la lignée IV et les souches G3 à lignée I. Les souches G1 étaient liées à la souche vaccinale G1-Rotarix se regroupant dans la lignée II. Sur la base de l'analyse phylogénétique de l'arbre VP4, la majorité des souches P[8] étaient de la lignée III, les souches P[6] de la lignée I et les souches P[4] de lignée III. Une souche P[8] identifiée dans notre étude était étroitement liée à la souche vaccinale P[8] de RotaTeq se regroupant ainsi dans la lignée II. La majorité des souches identifiées avaient une grande similitude de nucléotides avec les souches locales. Ce qui traduirait la circulation des mêmes souches au Cameroun malgré l'introduction du vaccin Rotarix. Cependant quatre souches n'étaient pas alignées et pourraient marquer la présence des cas suspects de transmission zoonotique ou la présence des souches recombinantes. De ce fait le séquençage complet du génome des souches serait nécessaire pour déterminer le degré de réassortiment.

---

## III.2 Discussion générale

Lorsque le Cameroun a introduit le vaccin Rotarix dans le PEV, aucune donnée moléculaire et information sur les souches circulantes de RVA chez les humains et les animaux dans la région du Littoral, Sud, Est, Adamaoua et Nord n'étaient disponibles. La présente étude réalisée après l'introduction du vaccin est la première enquête sur l'infection à RVA dans la région du Littoral.

### ❖ **Fréquence des gastroentérites causées par RVA chez les enfants de moins de cinq, les bovins et les caprins.**

Cette partie de l'étude fournit une mise à jour de l'épidémiologie du RVA au Cameroun après l'introduction du vaccin antirotavirus dans la population humaine.

En utilisant la détection d'antigène par ELISA, 54,6% des enfants échantillonnés ont été testés positifs au RVA. Cette fréquence est supérieure à la proportion mondiale de cas de diarrhée attribué au RVA et également supérieure aux prévalences de 42,8% et 41% de RVA précédemment obtenues au Cameroun, respectivement, dans les régions de l'extrême Nord et du Nord-Ouest en 2012 (Ndze *et al.*, 2012) et dans la ville de Yaoundé, région du Centre en 2014 (Boula *et al.*, 2014). Une observation frappante à faire est que, la prévalence antérieure inférieure dans les autres parties du pays, représente la prévalence de l'infection à RVA avant l'introduction du vaccin Rotarix contre le RVA (Ndze *et al.*, 2012 ; Boula *et al.*, 2014). Bien que la fréquence de RVA pendant la période pré-vaccinale et post-vaccinale soit restée presque similaire, le nombre absolu de cas et d'hospitalisations pour diarrhée au RVA peut avoir diminué et des données supplémentaires devront être collectées pour enquêter sur ce constat. La fréquence de RVA par ELISA élevée rapportée dans cette étude peut être attribuée à des résultats ELISA faux positifs. Ye et son équipe en 2013 ont observé un écart entre l'ELISA et la RT-PCR en Australie, et des réactions ELISA faussement positives ont été révélées comme cause. Ils ont noté que vingt-cinq échantillons positifs par ELISA étaient négatifs pour la détection de VP6 par RT-PCR suivie d'une électrophorese (Ye *et al.*, 2013). L'écart observé pourrait tout aussi bien résulter des inhibiteurs de la PCR, d'une faible charge virale dans les échantillons en raison des cycles de congélation – décongélation, mais avec suffisamment de protéine VP6 pour être détectée par ELISA. Des écarts d'ordre similaire entre ELISA et RT-PCR ciblant le gène VP6 ont également été observés récemment par McAuliffe et ses collaborateurs (2018, 2019) en Nouvelle-Zélande (McAuliffe *et al.*, 2018 ; McAuliffe *et al.*, 2019).

---

La forte fréquence de l'infection à RVA au Cameroun (> 41%) peut s'expliquer en partie par un certain nombre de conditions socio-environnementales, notamment un accès difficile à l'eau potable, et la mauvaise situation économique du pays qui ont un impact négatif sur le niveau de vie et les conditions sanitaires, aggravées par une mauvaise hygiène et la malnutrition. En effet, il existe un gradient d'efficacité du vaccin RVA entre les pays à revenu élevé, moyen et faible. L'efficacité des vaccins est généralement meilleure dans les pays à revenu élevé et plus faible dans les pays à faible revenu (Shah *et al.*, 2017 ; Brunett *et al.*, 2018). La malnutrition, une condition liée à la pauvreté dans les pays à faible revenu, a été identifiée comme un facteur contribuant à la réduction de l'efficacité des vaccins. En effet, il a été prouvé expérimentalement que la malnutrition altère la réponse immunitaire adaptative à l'infection par RVA chez les porcelets gnotobiotiques (Fischer *et al.*, 2017). Par conséquent, la malnutrition peut entraîner une altération du développement des réponses immunitaires protectrices après la vaccination et augmenter la sensibilité de l'hôte à l'infection à RVA. De plus, de mauvaises conditions sanitaires et le manque d'eau potable augmentent l'exposition à d'autres pathogènes entériques, une condition connue pour inhiber la réponse immunitaire au vaccin à RVA (Wang *et al.*, 2012).

Les résultats de RT-PCR en temps réel ont confirmé 78,9% (56/71) des cas ELISA positifs. La RT-PCR en temps réel, utilisée au cours de cette étude, est un test de détection d'acide nucléique avec une sensibilité élevée (une copie/ $\mu$ L) et une spécificité (100%) pour les cibles du gène NSP3 de RVA. La RT-PCR en temps réel permet de détecter des amplicons d'ADN inférieur à 10 ng (Laurell *et al.*, 2012). De ce fait, la RT-PCR en réel est considérée comme la méthode la plus fiable et la plus sensible pour le dépistage de l'infection à RVA (Zeng *et al.*, 2008 ; Leva *et al.*, 2016). Cependant, de nombreux pays africains utilisent ELISA pour dépister l'infection à RVA et évaluer les progrès et l'impact des vaccins antitrotavirus (De Deus *et al.*, 2017 ; Maphalala *et al.*, 2018 ; Tsolenyanu *et al.*, 2018).

D'autre part, la fréquence élevée de l'infection du RVA dans cette étude pourrait être liée à la présence de co-infection entre le RVA et d'autres pathogènes entériques. Les cas de RVA co-infectés avec d'autres pathogènes entériques (*E.coli*, *Salmonella* spp, *Shigella* spp, Norovirus, Adenovirus et *Entamoeba histolytica*) sont fréquents chez les enfants de moins de cinq ans dans les pays à faible revenu (Bhavnani *et al.*, 2017 ; Moyo *et al.*, 2017 ). Une étude récente réalisée au Niger par Langendorf et ses collaborateurs en 2015, a révélé un taux de co-infection de 10,3% des cas de RVA avec d'autres pathogènes entériques (Langendorf *et al.*, 2015). En outre, l'infection par RVA prédispose les entérocytes à une adhérence et invasion

---

accrue par d'autres pathogènes entériques et la présence de pathogènes co-infectants augmente la réplication du RVA dans l'intestin de l'hôte (Bhavnani *et al.*, 2017). La co-infection par *Shigella*, ETEC, Adenovirus et *Campylobacter* est susceptible d'augmenter la gravité de la diarrhée et peut entraîner une augmentation des décès liés à la diarrhée chez les enfants âgés de moins de cinq ans, augmentant ainsi le fardeau de la diarrhée (Shrivastata *et al.*, 2017). De plus, les processus pathogéniques des agents pathogènes co-infectants peuvent agir en synergie pour aggraver l'état du patient, entraînant une charge lourde de l'infection (Bhavnani *et al.*, 2017). Les infections au RVA diminuent l'absorption des nutriments par épuisement des entérocytes mais n'induisent pas d'inflammation intestinale. *Shigella* spp provoque des diarrhées inflammatoires et invasives tandis que l'ETEC altère l'intégrité épithéliale intestinale (Hodges et Gill, 2010 ; Moyo *et al.*, 2017). Ces effets combinés peuvent déclencher plusieurs mécanismes cellulaires qui exacerberaient les maladies diarrhéiques.

Bien qu'il n'existe aucune association statistiquement significative entre l'infection à RVA et le statut vaccinal (Tableau 18), on aurait pu s'attendre à observer une prévalence réduite de l'infection à RVA dans la zone d'étude actuelle où il existe une vaccination de routine contre le RVA, même si le nombre d'hospitalisation pour diarrhée a diminué. De plus, lorsque les résultats actuels sont comparés à ceux de l'ère pré-vaccinale au Cameroun (PATH, 2014 ; Ndombo *et al.*, 2017), il est difficile de confirmer que le fardeau de l'infection à RVA s'est considérablement réduit avec l'introduction du vaccin. Cependant, le nombre de positifs dans une population vaccinée est suffisamment élevé pour attirer l'attention sur l'efficacité de la réponse vaccinale ou sa bonne application sur le terrain, ou même des enquêtes sur d'autres conditions connues pour altérer la réponse immunitaire adaptative rapide et le développement d'une protection après la vaccination. En outre, il est fort possible que certains des RVA détectés dans les échantillons soient des souches vaccinales de Rotarix.

Dans une population non vaccinée, l'allaitement maternel exclusif pendant les six premiers mois de la vie offre un avantage substantiel dans la prévention de la diarrhée induite par le RVA chez les enfants. Cela est dû à la présence d'immunoglobulines A sécrétées dans le lait maternel (Krawczyk *et al.*, 2016). Inversement, l'allaitement maternel nuit potentiellement au développement de l'immunité adaptative induite par le vaccin contre l'infection à RVA (Bautista-Marquez *et al.*, 2016), réduisant ainsi l'effet protecteur de la vaccination. Des études post-vaccinales récentes en Zambie et en Afrique du Sud ont suggéré qu'une immunogénicité plus faible du vaccin Rotarix pourrait s'expliquer en partie par une exposition à des titres élevés d'anticorps dans le lait maternel (Chilengi *et al.*, 2016 ; Moon *et*

---

*al.*, 2016). Cependant, nos résultats ont confirmé l'hypothèse présentée par une étude récente en Angola (Gasparinho *et al.*, 2017) dans laquelle aucun effet protecteur statistiquement significatif contre l'infection à RVA ne pouvait être associé au mode d'allaitement. D'autres études évaluant l'impact de l'allaitement maternel sur les bénéfices de la vaccination sont encore nécessaires.

Dans cette étude, l'infection à RVA survient principalement chez les enfants âgés de moins d'un an avec un taux maximal des cas positifs chez les enfants de 7 à 12 mois (46,5%) (Figure 18). La prédominance des gastroentérites à RVA dans cette tranche d'âge pourrait être due à une grande susceptibilité de l'enfant aux agents infectieux à travers la diversification alimentaire qui est faite généralement à partir de six mois. Si la diversification alimentaire est mal faite, elle entraîne généralement à une malnutrition pouvant aboutir à une gastroentérite. Par ailleurs, le taux d'infection à RVA élevé dans cette tranche d'âge pourrait être dû au fait que le système immunitaire de l'enfant serait en train de se mettre en place. Raison pour laquelle les adultes ne sont pas affectés par cette infection (Ramani *et al.*, 2013). Des observations similaires sur la distribution des gastroentérites à RVA en fonction de l'âge des enfants ont été faites dans les autres régions du pays (Mbuh *et al.*, 2012 ; Ndzé *et al.*, 2012).

Les études sur les infections au RVA et les souches en circulation chez les animaux ont été un domaine de recherche négligé jusqu'à ce que le suivi des souches circulant de RVA dans la population humaine révèle la présence de plusieurs génotypes rares. L'enquête sur les souches animales de RVA a permis de découvrir que la RVA affecte une grande variété d'animaux, provoquant la mort chez les jeunes animaux et les animaux adultes servant de réservoir du virus (Estes *et al.*, 2007 ; Greenberg et Estes 2009). La nécessité d'étudier l'infection à RVA chez les animaux est devenue impérative car cela pourrait guider les chercheurs pour développer un vaccin efficace pour contrôler la maladie.

En utilisant la RT-PCR ciblant le gène VP6, le taux de détection de RVA était de 28,4% chez les animaux. Le RVA était détecté dans 44% de fèces par RT-PCR en temps réel ciblant le gène NSP3. Cet écart pourrait être dû à des systèmes de détection différents dans les deux techniques entraînant ainsi à des résultats faussement négatifs. La prévalence de la RVA chez les bovins au cours de cette étude était de 25% par RT-PCR et de 36% par RT-PCR en temps réel. Le taux de détection de RVA était plus élevé aux taux enregistrés dans d'autres pays tels que l'Inde (15,5%), la France (15%) et la Tunisie (15,4%) (Beg *et al.*, 2010 ; Midgley *et al.*, 2012 ; Hassine-Zaafraane *et al.*, 2014). Cependant, une fréquence plus élevée d'infections à RVA chez les bovins a également été signalée en Inde, au Danemark et en Iran de l'ordre de 37,1%,



---

46% et 49,4% respectivement (Sharma *et al.*, 2013 ; Midgley *et al.* 2012 ; Pourasgari *et al.*, 2016). Il peut y avoir plusieurs raisons à ces différences de prévalence observées, telles qu'un plan d'étude différent, le type de procédures de diagnostic utilisées, la présence de co-infections avec d'autres groupes de Rotavirus. La faible prévalence est observée lorsque les animaux sont asymptomatiques et élevée lorsque les animaux font la diarrhée. Seuls 34 échantillons de caprins ont pu être collectés et testés pour cette étude. La faible taille de l'échantillon pourrait être justifiée par les mauvaises pratiques agricoles envers le bétail caprin dans cette région du Cameroun qui est presque toujours à petite échelle, et par le fait que les animaux malades ne sont pas souvent mis sur le marché. Pourtant, 38,2% d'échantillons de caprins ont été trouvés positifs par RT-PCR et 67,6% par RT-PCR en temps réel. Cela nous amène à penser que les caprins sont plus sensibles au RVA que les bovins, mais des investigations supplémentaires sont nécessaires pour confirmer cette sensibilité apparente élevée de RVA chez les caprins.

❖ **Identification des variants génétiques de RVA en circulation chez les humains, les bovins et les caprins.**

Seuls 50% (28/56) échantillons positifs au RVA ont été typés avec succès. La configuration du génotype VP7 a montré un dynamisme et une instabilité dans toutes les régions du monde. En amplifiant le gène VP7, les génotypes identifiés ont été G1, G2, G3 et G9 représentant respectivement 14,3%, 46,4%, 35,7% et 3,6% de l'infection à RVA. Le génotype G2 a été majoritaire dans cette région du pays durant toute la période de l'étude et a été suivi du génotype G3 qui est également isolé chez les espèces canines et félines. On a noté également la prédominance du génotype G2 après l'introduction du vaccin au Malawi (Bar-Zeev *et al.*, 2015).

Les génotypes P sont ceux qui sont relativement stables dans le monde et leur répartition est presque uniforme selon la région. Les génotypes P identifiés ont été P[8], P[6], P[4], le génotype mixte P[4]P[8] et le génotype indéterminé P[nt] qui ont représenté respectivement 50%, 21,4% , 17,9%, 3,6% et 7,1%. Le génotype P[6] infecterait les espèces animales (Liu *et al.*, 2012). Après l'introduction des vaccins à RVA dans les pays africains, P[6] est détecté de plus en plus sur tout le continent (Gasparinho *et al.*, 2017), fait que nos résultats semblent corroborer. En Afrique, l'infection à P[6] du RVA a été associée à des facteurs génétiques de l'hôte, infectant apparemment plus fréquemment les enfants au phénotype de Lewis négatif. Le phénotype de Lewis négatif s'est également avéré plus commun dans de nombreuses populations africaines, et donc ce fait pourrait expliquer l'augmentation du taux de détection de

---

cette souche en Afrique (Gasparinho *et al.*, 2017). La forte prévalence des génotypes à fort potentiel zoonotique G3 et P[6], aurait un lien avec l'élevage domestique des bovins et des porcs en Afrique (Luchs *et al.*, 2016).

Parmi les échantillons positifs soumis pour génotypage, 7,1% du génotype P ont été des souches non typées. La présence de tensions non typables n'est pas une question courante mais elle a été souvent observée dans pays à faible revenu (Banyai *et al.*, 2012). Ainsi Esona et son équipe en 2010, ont démontré que la majorité de tensions non typables rencontrées en Afrique peut être génotypé, si on utilise les amorces spécifiques ou qu'on améliore les techniques de génotypages. Dans cette étude, c'est possible que certains des génotypes du RVA rares soient présents parmi les tensions non typables. Pour confirmer ceci, les recherches supplémentaires doivent être faites en utilisant des amorces plus spécifiques qui permettront de génotyper des tensions rares ou des nouvelles souches. Au cours de l'étude, nous avons détecté également une infection mixte. Ces souches mettent en évidence des événements de réassortiment provenant de souches locales en co-circulation. Le séquençage complet du génome des souches serait nécessaire pour la caractérisation approfondie et la détermination du degré de réassortiment naturel.

A l'échelle mondiale, les combinaisons génotypiques prédominantes sont G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8] et G9P[8] (Santos et Hoshino, 2005 ; Bánya *et al.*, 2012). Notre étude montre que les génotypes G3P[8], G2P[4], G3P[6] et G1P[8] ont été majoritaires dans la région du Littoral et qu'ils représentaient 67,9% des infections. Cependant, G3P[8] (21,4%) a été la combinaison génotypique la plus isolée dans notre étude contrairement à l'échelle mondiale et d'autres études effectuées au Cameroun avant l'introduction du vaccin. Dans la région du Centre, la combinaison génotypique G1P[8] (44%) a été la plus répandue en 2014 dans les études de Boula et collaborateurs. Cette même souche a été majoritairement isolée dans les régions du Sud -Ouest et Ouest du Cameroun (Esona *et al.*, 2010). Par contre la souche G12P[8] a été isolé en majorité au Nord-Ouest et à l'Extrême- Nord (Ndzé *et al.*, 2012). Toutefois, la présence importante de G3P[8] pourrait être liée à sa composition antigénique différente de celle du vaccin qui lui permettrait d'échapper à une pression immunitaire notamment vaccinale puisque cette souche a été prise en compte dans la conception et l'expérimentation du vaccin Rotarix (Lorrot *et al.*, 2012). Nos résultats confirment également l'émergence des souches G2P[4] (17,9%) et G3P[6] (14,3%) qui sont devenues mondialement importantes . La prévalence de G2P[4] obtenue dans cette étude a été plus élevée que toutes celles observées au Cameroun par le passé (Ndzé *et al.*, 2012, Boula *et al.*, 2014). Par ailleurs, il convient de

---

souligner que l'utilisation exclusive de vaccin monovalent Rotarix en Belgique et au Brésil aurait induit l'augmentation des tensions G2P[4] (Lorrot *et al.* 2012 ; Luchs *et al.*, 2016). En revanche la souche G1P[8] qui a été la souche prédominante dans les autres régions du pays pendant la période pré-vaccinale, a un taux d'apparition faible après introduction du vaccin. L'expression de ces souches hétérotopiques pourrait être le fait d'une pression sélective liée à la vaccination, d'une fluctuation normale dans la distribution génotypique du virus ou alors de l'amélioration des techniques diagnostics (Heylen *et al.*, 2013 ; Da Silva Soares *et al.*, 2014). En Afrique, quelques études ont signalé avoir changé la dominance dans la distribution des souches de RVA suite à l'introduction du vaccin. Au Ghana, G1P[8] qui prédominait dans les années pré-vaccinales, a été remplacé par G12[P8] comme la souche la plus commune, suivie G12P[6], G2P[4] et G3P[6] (Armah *et al.*, 2016). De même, au cours des deux premières années après l'introduction du vaccin à RVA au Kenya, une recrudescence de G2P[4], G3P[8] et G3P[6] a été notée (Wandara *et al.*, 2017).

Quelques études ont montré que les vaccins actuellement mis sur le marché mondial sont protecteurs contre une variété de tensions circulantes (G1 à G4, G9 et P8). Les essais d'efficacité conduits en Europe ont confirmé les résultats obtenus aux États-Unis et en Amérique latine montrant ainsi pour chacun de ces vaccins, une efficacité protectrice élevée contre les formes sévères d'infection au RVA du nourrisson. L'efficacité vaccinale dans ces pays est estimée à 85-100% de protection (Payne *et al.*, 2013) et varie entre 20-60% en Afrique (Madhi *et al.*, 2010 ; Cunliffe *et al.*, 2012). Toutefois, Rotarix est le vaccin monovalent humain atténué à partir de la souche de type P[8] et G1 administré au Cameroun. Le génotype P[8] est le plus répandu parmi les souches circulantes humaines et est généralement associé aux types G1, G3, G4 et G9. Ce qui conférerait ainsi une protection croisée avec ces souches grâce à cet épitope neutralisant commun (Burnett *et al.*, 2016). La présence des souches G2P[4], G3P[6] et G2P[6] isolées chez les enfants qui ont reçu une dose complète de Rotarix dans notre étude pourrait être expliquée par le fait que ces tensions ne partagent aucun génotype G et/ ou P spécifique avec les tensions de Rotarix (G1P[8]). Cette hypothèse est en accord avec les études qui ont été menées pendant la vaccination de masse menée par endroits avec le vaccin Rotarix notamment en Amérique latine, Australie et Europe où les tensions G2P [4] ont dominé d'autres tensions sur plusieurs saisons du RVA consécutives (Carvalho-Costa *et al.*, 2011 ; Hull *et al.*, 2011 ; Kirkwood *et al.*, 2011). Cependant, les experts pensent que la possibilité de réapparition élevée de G2P[4] pourrait être le résultat de la variation naturelle de tensions du Rotavirus (Matthijnsens *et al.*, 2009). En d'autres termes, ces enfants qui avaient reçu une dose complète

---

de Rotarix ont été protégés plutôt contre les tensions ayant une combinaison avec l'un de génotypes retrouvés dans le vaccin mais pourraient être vulnérables aux autres génotypes, bien que les théories récentes suggèrent que l'échec du vaccin ne peut pas être une conséquence directe de la circulation de souches rares de RVA dans les pays africains (Cunliffe *et al.*, 2012).

Nos résultats montrent que le statut vaccinal n'empêche pas la survenue de l'infection à RVA chez les enfants vaccinés ou non vaccinés (Tableau 1). La présence des souches G1 ou P[8] chez les enfants ayant reçu les deux doses du vaccin Rotavirx dans notre étude pourrait être expliquée par le fait que ces souches partageraient des séquences différentes de celles de la souche vaccinale. Récemment, des modèles mathématiques ont estimé que l'immunité dérivée du vaccin Rotarix est élevée contre les souches complètement homotypiques et très faible contre les souches entièrement hétérotypiques, avec une immunité intermédiaire entre les souches partiellement hétérotypiques (Pitzer *et al.*, 2015). Par contre il est possible que certaines souches G1 ou P[8] détectées dans les échantillons des enfants vaccinés soient des souches vaccinales excrétées; une analyse phylogénétique est nécessaire pour confirmer cette hypothèse.

La diversité génotypique du RVA varie d'un pays à un autre en fonction du statut socio-économique et des conditions environnementales (Durmaz *et al.*, 2014). Nous avons observé une détection accrue de la souche G2P[4] dans notre étude. Ce qui n'était pas le cas avant l'introduction du vaccin. La même tendance a été observée au Brésil et en Belgique (Lorrot *et al.*, 2012). Certains auteurs ont suggéré que cette prévalence serait associée à la pression du vaccin et à l'introduction d'un vaccin monovalent contre le G1P[8] qui aurait pu créer les conditions permettant à la souche G2P[4] d'acquérir des avantages par rapport aux autres souches (qui partagent le génotype P[8]) en compétition pour l'infection des hôtes sensibles (Lush *et al.*, 2016). Cependant, d'autres souches continuent de circuler de façon marginale dans le temps.

La circulation prédominante et soutenue des souches G1P[8] a été observée plusieurs années de suite, avant l'introduction du vaccin notamment dans les études d' Esona et ses collaborateurs, où nous avons enregistré 37,1% de souches G1P[8] ; ensuite dans l'étude de Boula et son équipe où nous avons relevé un taux de 44% de souches G1P[8]. Cette souche est également prédominante en république Centrafricaine où 37% de souches G1P[8] ont été signalées (Mouré *et al.*, 2018). Cependant le taux de détection des souches G1P[8] a progressivement diminué après introduction du vaccin. Comme prévu, en raison des taux élevés de couverture vaccinale dans le pays, les souches G1P[8] ont été détectées avec une fréquence de 14,3% dans notre étude.

---

La fréquence de détection des souches G9P[8] a notamment diminué après l'introduction du vaccin. En revanche, la souche G3P[8] qui a rarement été détectée dans les régions du Sud -Ouest et Ouest du pays , a progressivement augmenté et a été la souche prédominante dans notre étude. De même la souche, G3P[6] qui a été rarement isolée dans la région du Centre (Boula *et al.* , 2014) et dans la ville de Maroua (Ndzé *et al.*, 2012) a été retrouvée régulièrement dans la région du Littoral. Par contre, nous avons pas détecté la souche G12P[8] qui était la souche prédominante de l'étude de Ndzé et ses collaborateurs en 2012 à l'Extreme-Nord et au Nord-Ouest. La base épidémiologique du cycle génotypique observé des RVA n'est toujours pas claire. On pense que le changement saisonnier des souches de RVA pourrait être un mécanisme utilisé par ce virus pour échapper à l'immunité de groupe acquise lors d'infections précédentes et persistant dans la population humaine (Luchs *et al.*, 2016).

Enfin, il est intéressant de noter que la plupart des pays africains, dont le Cameroun, a mis en place Rotarix dans leurs programmes nationaux de vaccination malgré que des études ont montré que Rotarix protège contre une variété de souches de RVA. La baisse de l'immunité face aux souches partiellement ou totalement hétérotypiques peuvent être une préoccupation dans ces milieux pauvres où la diversité génotypique est commune, caractérisée par de hautes fréquences de génotypes inhabituels (Leshem *et al.*, 2014). Ainsi, il sera perspicace d'évaluer l'efficacité du vaccin contre les génotypes inhabituels.

Les RVA sont connus pour leur diversité génétique en raison de mécanismes tels que les mutations ponctuelles et la recombinaison attribuable à leur génome segmenté (Matthijnssens et Desselberger, 2012 ; Desselberger, 2014). Avec l'avènement de la vaccination contre les RVA humains, couplé à des études de surveillance à grande échelle de souches humaines et animales, il existe maintenant des évidences de la transmission zoonotique de souches de RVA recombinantes ou entièrement d'origine animale (Martella *et al.*, 2010 ; Doro *et al.*, 2015). La recombinaison de souches de RVA provenant de différentes espèces peut provoquer l'émergence de nouvelles souches portant des propriétés dérivées des lignées parentales (Matthijnssens *et al.*, 2010 ; Papp *et al.*, 2013). Raison pour laquelle il y'a une mise sur le marché du vaccin Rotateq qui est un vaccin pentavalent dérivant de la souche bovine WC3. (Desselberger, 2014). Cependant, on sait très peu de choses sur la diversité génétique du RVA chez les animaux et le potentiel zoonotique des souches au Cameroun. Par conséquent, cette partie de l'étude visait à caractériser les souches d'origine animale afin d'identifier l'interaction entre les souches de RVA animaux et humains.

---

Sur les échantillons animaux positifs par RT-PCR en temps réel, aucune souche n'a pu être typée par RT-PCR multiplex et RT-PCR suivi d'électrophorèse. Les raisons possibles de l'échec du génotypage pourraient être liées à la spécificité des amorces en raison de la grande variabilité du virus lorsqu'il passe de l'animal à l'homme. Les amorces utilisées au cours de cette étude étaient des amorces adaptées pour l'amplification des souches de RVA humain. Cependant toute combinaison de types G et P peut se produire et les génotypes non typables peuvent représenter d'autres types G ou P existants ou nouveaux. Ces types G ou P peuvent échapper à la classification s'il n'y a pas de réactifs de diagnostic appropriés disponibles. De ce fait, il faudrait d'autres amorces adaptées et des recherches sont actuellement en cours pour trouver des amorces capables de tenir en compte la variation liée au polymorphisme de nucléotides (Hassine-Zaafraane *et al.*, 2014, Pourasgari *et al.*, 2016). Certains auteurs ont signalé l'échec de génotypage des RVA (Fukai *et al.*, 2002) causés par la coprécipitation des substances inhibitrices présentes dans les échantillons qui interfèrent lors de l'amplification. D'autres facteurs causaux possibles sont la présence des rotavirus n'appartenant pas au groupe A (Fukai *et al.*, 2002).

Les résultats de NSG ont révélé une grande diversité génétique des RVA en circulation chez les animaux. En fait, nous avons noté la présence de la souche G10P[11] qui a été isolée à partir d'un échantillon de caprin, mais cette souche de RVA est d'origine bovine. Cette combinaison génotypique est fréquemment rencontrée chez les bovins dans différentes parties du globe. Au Cachemire en Inde, la souche G10P[11] a été rapportée comme le génotype le plus commun chez les bovins (80,64%) (Beg *et al.*, 2010).

Mais certaines études révèlent la présence de la souche G10P[11] chez plusieurs hôtes. A Pune, le génotype G10P[11] a été signalé chez des enfants infectés par le rotavirus (Paul *et al.*, 2014). De même, les études en Inde ont montré la prévalence du G10 chez l'homme, le bovin et le caprin indiquant la transmission interspécifique par le génotype G10 (Rajendran et Kang, 2014). Ramani et ses collègues ont révélé en 2009 que des segments génétiques ressortissants des gènes VP4 (P11) et VP7 (G10) d'une souche de nouveau-né humain (N155) infectée par le rotavirus, étaient d'origine animale G10P[11]. De même, ils ont identifié d'autres gènes d'origine humaine et animale du RVA par caractérisation plus poussée (Ramani *et al.*, 2009), bien que le potentiel zoonotique du génotype G10P[11] de la souche bovine ait été mis en évidence par sa transmission du bétail à l'homme et vice-versa (Iturriza-Gomara *et al.* 2004; Saravanan *et al.*, 2006). La propagation d'une telle souche au sein de la population humaine peut augmenter le fardeau de l'infection par le RVA car le vaccin (Rotarix) actuellement utilisé

---

au Cameroun ne protège pas contre cette souche. De plus, étant rare chez l'homme, l'immunité active naturelle contre cette souche peut faire défaut. La présence de souches d'origine humaine G1P[8] et G2P[4] a été notée chez les caprins et une souche G1P[8] dans un échantillon bovin. La détection de génotypes d'origine humaine chez les caprins et les bovins est une preuve de transmission directe de l'homme à l'animal, et la présence de génotypes d'origine bovine chez les caprins est indicative d'une transmission croisée entre bovin et caprin. En effet, il est courant de voir des éleveurs de bovins faire de l'élevage à petite échelle de moutons au milieu des bovins. Cette proximité peut expliquer la transmission possible du RVA du bovin au caprin ou de l'homme à l'animal. Des cas similaires de transmission directe en raison de la proximité ont été signalés par Zeller et ses collaborateurs en Belgique, du porc (G9P[6]) à l'homme, et par Doan et son équipe en 2013 en Israël, du veau (G6P[1]) à l'homme (Zeller *et al.*, 2012; Doan *et al.*, 2013). De même, une souche humaine G1P[8] a été isolée d'un mouton (Sheep 18) après séquençage dans l'étude de Choudhary et son équipe en 2017. Cette preuve du potentiel zoonotique de RVA pourrait être le résultat d'une co-infection et d'un réassortiment génétique. De plus, la littérature renforce l'idée que les segments des gènes VP7 et VP4 se séparent indépendamment dans la nature (Cook *et al.*, 2004 ; Matthijssens *et al.*, 2008a ; Martella *et al.*, 2010). A notre connaissance, ces différentes combinaisons de génotypes n'ont pas encore été décrites pour le RVA chez l'animal dans notre pays et cela réaffirme le potentiel de réassortiment du RVA entre les souches animales et aussi entre les souches humaines et animales. Ces échantillons d'animaux associés à des souches humaines peuvent provoquer la propagation des RVA avec de nouvelles occurrences et combinaisons G et P du bétail aux humains. Au fil du temps, ces nouveaux virus peuvent circuler dans la population et subir d'autres changements génétiques et créer un problème de santé publique.

Sur la base de ces faits, il existerait des interactions entre les RVA animaux et humains mais les études sur la transmission zoonotique sont limitées par la faible disponibilité des séquences du génome de RVA animale. Néanmoins les études sur la transmission zoonotique d'une souche de RVA particulière ne sont confirmées que sur les bases des preuves phylogénétiques (Luchs *et al.*, 2016).

---

❖ **Détermination des relations phylogénétiques entre les souches humaines de RVA en circulation dans la région du Littoral et celles extraites de GenBank.**

L'OMS a recommandé l'introduction des vaccins antirotavirus dans les programmes nationaux de vaccination, notamment dans les pays à faible revenu où la diarrhée est responsable d'un grand nombre de décès chez les enfants âgés de moins de cinq ans. Quatre vaccins sont actuellement homologués contre le RVA. Au Cameroun, le vaccin Rotarix a été lancé en début 2014. Cependant, étant donné que la majorité des vaccinations infantiles sont effectuées par le secteur public, les données sur la couverture vaccinale antirotavirus au Cameroun ne sont pas encore disponibles pour le moment.

Le mécanisme de protection contre le RVA après la vaccination n'est pas complètement compris. Cela a abouti à l'adoption de différentes approches pour le développement de vaccins à large protection. Le vaccin Rotarix (G1P[8]) repose sur la théorie selon laquelle une réponse immunitaire protectrice pourrait être stimulée par les épitopes des cellules présents sur toute la protéine virale ; ces épitopes pouvant être conservés entre différents génotypes VP7 et VP4 du virus (Ward *et al.*, 2010). Le succès des vaccins antirotavirus au Cameroun dépendra de leur capacité à assurer une protection contre les souches de RVA répandues dans le pays. Dans cette partie de l'étude, nous avons étudié les différences intragénotypiques entre les souches G1, G2, G3, G9, P[8], P[4] et P[6] de la région du Littoral, des souches isolées des autres régions du pays et les composants des vaccins Rotarix et Rotateq en comparant les séquences de VP7 et VP4.

L'analyse phylogénétique a suggéré que, les souches de RVA G1 circulant dans la région du Littoral appartenaient à G1-lignée II. Ces souches G1 sont regroupées avec celle du vaccin Rotarix mais elles diffèrent de la lignée des souches G1 isolées (lignée I) dans les régions de l'Extrême-Nord et Nord-Ouest du Cameroun (Ndzé *et al.*, 2014). Les différentes lignées G1 possèdent une variation antigénique à la fois au niveau des acides aminés et des nucléotides (Zeller *et al.*, 2012).

L'analyse phylogénétique a montré que toutes les souches G2 de notre étude étaient regroupées dans la lignée IV avec les souches G2 isolées en Belgique en 2009 et les souches circulant localement identifiées dans les études précédentes au Cameroun. Cela suggère qu'elles proviennent d'un ancêtre commun.

L'analyse phylogénétique a montré que toutes les souches G3 de notre étude étaient regroupées dans la lignée I avec les souches circulant localement identifiées dans les études



---

précédentes au Cameroun ainsi que la seule souche G9 de notre étude. Cela suggère également qu'elles proviennent d'un ancêtre commun et contemporaine.

La majorité des souches P[8] de notre étude sont de la même lignée que celles rencontrées dans les études post- vaccinales menées dans le région de l'Extrême-Nord, Nord - Ouest et Sud-Ouest du Cameroun (Ndzé *et al.*, 2014 ; Esona *et al.*, 2013) mais différentes de la souche vaccinale Rotarix. De plus nos souches P[8] ont été regroupés en deux groupes, un groupe très proche de la souche de RVA isolée en Belgique en 2018 et un autre groupe étroitement proche de la souche P[8] isolée au Mozambique en 2012. Mais une des souches P[8] de notre étude a été de la même lignée que la souche P[8] du vaccin Rotateq. Par conséquent ce sont les même souches locales P[8] qui continuent à circuler dans le pays et traduiraient ainsi un problème d'efficacité du vaccin. La différence entre les lignées d'une même souche pourrait être due à la variation d'acides aminés au niveau de sites de mutation de neutralisation connus au sein des épitopes antigéniques VP7 et VP4. De telles variations d'acides aminés entre les différentes lignées sous génotypiques justifient des recherches plus approfondies car elles pourraient affecter l'efficacité du vaccin, en particulier si la protection est principalement assurée par les réponses immunitaires spécifiques des génotypes VP7 et VP4 (Kulkarni *et al.*, 2014).

Des études menées dans différents pays ont révélé que les lignées sous-génotypiques G1 ou P8 incluses dans les vaccins (prévalences au moment de la mise au point du vaccin dans les années 1980) ne sont plus prédominantes aujourd'hui (Sadiq *et al.*, 2019 ; Giri *et al.*, 2020).

Les souches P[6], P[4] et G3 de la région du Littoral ont été regroupées sur l'arbre phylogénétique avec les souches isolées des autres régions du Cameroun avant l'introduction du vaccin. La différence entre les lignées pourrait être due à la substitution d'acides aminés dans les régions antigéniques pouvant induire des changements conformationnels de la protéine G et P des gènes VP7 et VP4 (Phan *et al.*, 2007). Par conséquent, d'autres recherches doivent être menées pour enquêter sur des preuves de la transmission interspèce de RVA.

---

Les limites de cette étude sont de deux ordres :

Comme limites d'ordre technique, l'approche méthodologique du génotypage par RT-PCR multiplex en temps réel, bien que recommandée par plusieurs publications ne nous a pas permis de déterminer les génotypes des souches isolées de nos échantillons humains et animaux. En plus, aucune des méthodes de génotypes conventionnelles (RT-PCR , qRT-PCR multiplex en une étape) n'a permis de déterminer les génotypes des souches retrouvées dans les échantillons animaux.

Plusieurs échantillons humains, n'ont pas été pris en compte dans cette étude à cause des difficultés d'accès aux dossiers médicaux de certains enfants hospitalisés et refus au consentement éclairé des mères ou responsables légaux de certains enfants hospitalisés. Ce qui a eu pour conséquence la réduction de la taille d'échantillon.

---

## **CONCLUSION GENERALE**

---

Depuis plusieurs années, l'impact économique et le fardeau de l'infection à RVA à l'échelle internationale justifie d'emblée le développement des vaccins et la mise en place de surveillance épidémiologique. Afin d'établir un référentiel épidémiologique permettant de suivre les tendances de la maladie, nous avons au cours de cette étude, déterminer les variants génétiques de RVA en circulation chez les humains et chez les animaux dans la région du Littoral du Cameroun et les relations phylogénétiques des souches de RVA humain. Il en ressort que :

- Le RVA est toujours un pathogène important chez les enfants de moins de cinq ans souffrant de gastroentérite avec une fréquence d'infection de 54,6% des cas positifs. La majorité des enfants souffrant de gastroentérite à RVA (57,8%), avaient reçu deux doses du vaccin Rotarix. La fréquence d'infection au RVA était de 44% chez les animaux dans cette étude.
- Chez les humains, les génotypes G3P[8] (21,4%), G2P[4] (17,9%), G1P[8] (14,3%) et G3P[6] (14,3%) étaient les plus répandus, avec la présence d'une combinaison rare, G2P[4]P[8] (3,6%), ainsi qu'une souche d'origine animale, G9P[8] (3,6%). Chez les animaux, les génotypes étaient G10P[11] (20%), G1P[8] (40%) et G2P[4] (40%). La présence des génotypes G1P[8] (40%) et G2P[4] (40%) serait une évidence de la transmission du RVA des humains aux animaux.
- La majorité des souches identifiées avaient une grande similitude de nucléotides avec les souches locales mais différentes de la souche vaccinale Rotarix. Cependant quatre souches de cette étude n'étaient pas alignées et pourraient être des cas suspects de transmissions zoonotiques.

Enfin, la transmission de virus entre espèces constitue un danger difficile à estimer mais qui doit être pris en compte. Seule la surveillance permet de détecter d'éventuels nouveaux variants du virus dans la population dans la perspective de mise au point d'un nouveau vaccin et de nouveaux tests de diagnostics.

---

## PERSPECTIVES

Les résultats de ce travail révèlent une fréquence élevée de l'infection au RVA dans une population vaccinée et la présence des souches non typées qui pourraient constituer des preuves de la présence des souches inhabituelles ; de même que les souches non alignées pourraient être issues d'un réassortiment entre les souches de RVA en co-circulation. C'est dans cette optique que nous envisageons.

- De déterminer le génome complet des souches identifiées de RVA humain, bovins et caprins et autres animaux.
- De déterminer les génotypes des souches non typables de cette étude.
- D'étendre ce type d'étude dans d'autres régions du pays afin d'établir une carte génotypique du RVA du pays.

---

## RECOMMANDATIONS

Ces résultats nous permettent de formuler les recommandations suivantes au ministère de la Santé Publique et au ministère de l'Élevage, des Pêches et des Industries animales :

- Mise en place d'un comité de surveillance et suivi continue des RVA chez les humains et chez les animaux domestiques.
- Ajout des moyens de diagnostic de RVA aux examens de routine pour gastroentérite afin d'éviter de soumettre une thérapie non adaptée.
- Le choix du vaccin RotaTeq qui est un vaccin pentavalent pouvant couvrir la majorité des souches locales en circulation au pays.

---

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aliabadi, N., Tate, J. E., Amber, K. H., and Umesh, D. P. (2015). Sustained Decrease in Laboratory Detection of Rotavirus after Implementation of Routine Vaccination - United States, 2000 - 2014. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 64(13), 337–342.
- Alkan, F., Gulyaz, V. M., Timurkan, O., Iyisan, S., Ozdemir, S., Turan, N., et al. (2012). A large outbreak of enteritis in goat flocks in Marmara, Turkey, by G8P[1] group A rotaviruses. *Archives of Virology* 157, 1183–1187.
- Anderson, E. J., and Weber, S. G. (2004). Rotavirus infection in adults. *Lancet Infectious Diseases* 4, 91-99.
- Armah, G., Pringle, K., Enweronu-Laryea, C. C., Ansong, D., Mwenda, J. M., Diamenu, S. K., et al. (2016). Impact and Effectiveness of Monovalent Rotavirus Vaccine Against Severe Rotavirus Diarrhea in Ghana. *Clinical Infectious Diseases* 62 Suppl 2, S200-207.
- Azevedo, M. S., Yuan, L., Pouly, S., Gonzales, A. M., Jeong, K. I., Nguyen, T. V., et al. (2006). Cytokine responses in gnotobiotic pigs after infection with virulent or attenuated human rotavirus. *Journal of Virol* 80, 372-382.
- Bailey, M., Haverson, K., Inman, C., Harris, C., Jones, P., Corfield, G., et al. (2005). The influence of environment on development of the mucosal immune system. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 108(1-2), 189-198.
- Bányai, K., Laszlo, B., Vojdani, J., Steel, A. D., Nelson, E. A. S., Gentch, J. R., et al. (2012). Systematic review of regional and temporal trends in the global rotavirus strain diversity in the pre rotavirus vaccine era: Insights for understanding the impact of rotavirus vaccination programs. *Vaccine* 30S, A122–A130.
- Bar-Zeev, N., Kapanda, L., Tate, J. E., Jere, K. C., Iturriza-Gomara, M., Nakagomi, O., et al. (2015). Effectiveness of a monovalent rotavirus vaccine in infants in Malawi after programmatic roll-out: an observational and case-control study. *Lancet Infectious Diseases* 15, 422–428.
- Bautista-Marquez, A., Velasquez, D. E., Esparza-Aguilar, M., Luna-Cruz, M., Ruiz-Moran, T., Sugata, K., et al. (2016). Breastfeeding linked to the reduction of both rotavirus

- 
- shedding and IgA levels after Rotarix® immunization in Mexican infants. *Vaccine* 34(44), 5284-5289. doi: 10.1016/j.vaccine.2016.09.006.
- Beg, S. A., Wani, S. A., Hussain, I., and Bhat, M., A. (2010). Determination of G and P type diversity of group A rotaviruses in faecal samples of diarrhoeic calves in Kashmir, India. *Applied. Microbiology* 51(5), 595 - 599.
- Benureau, Y., Huet, J.C., Charpilienne, A., Poncet, D., and Cohen, J. (2005). Trypsin is associated with the rotavirus capsid and is activated by solubilization of outer capsid proteins. *The Journal of general virology* 86(Pt 11), 3143-3151.
- Berois, M., Sapin, C., Erk, I., Poncet, D., and Cohen, J. (2003). Rotavirus nonstructural protein NSP5 interacts with major core protein VP2. *Journal of virology* 77(3), 1757-1763.
- Bhandari, N., Rongsen-Chandola, T., Bavdekar, A., John, J., Antony, K., Taneja, S., et al. (2014). India Rotavirus Vaccine Group Efficacy of a monovalent human-bovine (116E) rotavirus vaccine in Indian infants: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 383 (9935), 2136–2143. doi:10.1016/S0140- 6736(13)62630-6.
- Bhavnani, D., Goldstick, J. E., Cevallos, W., Trueba, G., and Eisenberg, J. N. S. (2012). Synergistic effects between rotavirus and coinfecting pathogens on diarrheal disease: evidence from a community-based study in northwestern Ecuador. *American Journal of Epidemiology* 176, 387–395. doi: 10.1093/aje/kws220.
- Blutt, S. E., Crawford, S. E., Warfield, K. L., Lewis, D. E., Estes, M. K., and Conner, M. E. (2004). The VP7 outer capsid protein of rotavirus induces polyclonal B-cell activation. *Journal of Virology* 78, 6974-6981
- Bon, F., Kaplon, J., Metzger, M. H., and Pothier, P. (2007). Evaluation of seven immunochromatographic assays for the rapid detection of human rotaviruses in fecal specimens. *Pathologie Biologie* 55, 149–153.
- Bonica, M., Zeller, M., Van Ranst, M., Matthijssens, J., and Heylen, E. (2015). Complete genome analysis of a rabbit rotavirus causing gastroenteritis in a human infant. *Viruses* 7(2), 844–856. doi:10.3390/v7020844.
- Boula, A., Kouomou, W. D., Kinkela, N. M., Esona, D. M., Kemajou, G., Mekontso, D., et al. (2014). Molecular surveillance of rotavirus strains circulating in Yaoundé,



- 
- Cameroon, September 2007–December 2012. *Infection, Genetics and Evolution* 28, 470-475.
- Bugaric, A., and Taylor, J. A. (2006). Rotavirus Nonstructural Glycoprotein NSP4 Is Secreted from the Apical Surfaces of Polarized Epithelial Cells. *Journal of virology* 80(24), 12343–49.
- Burnett, E., Parashar, U., and Tate, J. E. (2018). Rotavirus Vaccines: Effectiveness, safety, and future directions. *Paediatric Drugs* 20 (3), 223–233. doi:10.1007/s40272-018-0283-3.
- Burnett, E., Yen, C., Tate, J. E., and Parashar, U. D. (2016). Rotavirus vaccines: current global impact and future perspectives. *Future Virology* 11(10), 699-708. DOI:10.2217/fvl-2016-0082.
- Carvalho-Costa, F. A., Volotoa, E. M., De Assis, R. M., Fialho, A. M., De Andrade, J. S., Rocha, L. N., et al. (2011). Laboratory-based rotavirus surveillance during the introduction of a vaccination program, Brasil, 2005-2009. *Pediatric Infectious Disease* 30(1 Suppl), S35-S41.
- Casola, A., Garofalo, R. P., Crawford, S. E., Estes, M. K., Mercurio, F., Crowe, S. E., et al. (2002). Interleukin-8 gene regulation in intestinal epithelial cells infected with rotavirus: role of viral-induced IkappaB kinase activation. *Virology* 298, 8-19.
- Chilengi, R., Simuyandi, M., Beach, L., Mwila, K., Becker-Dreps, S., Emperador, D. M., et al. (2016). Association of Maternal Immunity with Rotavirus Vaccine Immunogenicity in Zambian Infants. *PLoS One* 11(3), e0150100.
- Choudhary, P., Minakshi, P., Ranjan, K., and Basanti, B. (2017). Zoonthropotic transmission of rotavirus in Haryana State of Northern India. *Acta virologica* 61, 77 – 85.
- Clark, A., Black, R., Tate, J. E., Roose, A., Kotloff, K., Lam, D., et al. (2017). Estimating global, regional, and national Rotavirus deaths in children aged <5 years: Current approaches, new analyses and proposed improvements. *PLoS ONE* 12(9), e0183392.
- Cook, N., Bridger, J., Kendall, K., Gomara, M. I., El-Attar, L., and Gray, J. (2004). The zoonotic potential of rotavirus. *Journal of Infectious diseases* 48(4), 289-302. doi 10.1016/j.jinf.2004.01.018.

- 
- Crawford, S. E., Ramani, S., Tate, J. E., Parashar, U. D., Svensson, L., Hagbom, M., et al. (2017). Rotavirus infection. *Nature Reviews Disease Primers* 3, 17083. Doi: 10.1038/nrdp.2017.83.
- Cunliffe, N. A., Witte, D., Ngwira, B. M., Todd, S., Bostock, N. J., Turner, A. M., et al. (2012). Efficacy of human rotavirus vaccine against severe gastroenteritis in Malawian children in the first two years of life: a randomized, double-blind, placebo controlled trial. *Vaccine* 30 Suppl 1 (01), A36-A43. doi 10.1016/j.vaccine.2011.09.120.
- Da Silva Soares, L., De Fatima Dos Santos, G. S., Do Socorro Lima, O. A, Da Silva, D. S. F., De Fatima Costa, M. E. M., Mascarenhas, J. D., et al. (2014). Diversity of rotavirus strains circulating in Northern Brazil after introduction of a rotavirus vaccine: high prevalence of G3P[6] genotype. *Journal of Medical Virology* 86(6), 1065-1072. doi: 10.1002/jmv.23797.
- Dalgic, N., Sancar, M., Bayraktar, B., Pullu, M., and Hasim, O. (2011). Probiotic, Zinc and lactose-free formula in children with rotavirus diarrhea: are they effective? *Pediatrics International* 53(5), 677-682. Doi: 10.1111/j.1442-200X.2011.03325.x.
- De Deus, N., Chilaúle, J. J., Cassocera, M., Bambo, M., Langa, J. S., Siteo. E., et al. 2017. Early impact of rotavirus vaccination in children less than five years of age in Mozambique. *Vaccine* 36(47), 7205-7209.
- Dennhy, P. H. (2000). Transmission of rotavirus and other enteric pathogens in the home. *Pediatric Infectious Disease Journal* 19 (10), S103-S105.
- Deplancke, B., and Gaskins, H. R. (2001). Microbial modulation of innate defense: goblet cells and the intestinal mucus layer. *American Journal of Clinical Nutrition* 73(6), 1131s-1141s.
- Desselberger, U. (2014). Rotaviruses. *Virus Research* 190, 75-96. doi: 10.1016/j.virusres.2014.06.016.
- Djikeng, A., Halpin, R., Kuzmickas, R., Depasse, J., Feldblyum, J., Sengamalay, N., et al. (2008). Viral genome sequencing by random priming methods. *BMC Genomics* 9, 5. doi: 10.1186/1471-2164-9-5.

- 
- Doan, Y. H., Nakagomi, T., Aboudy, Y., Silberstein, I., Behar-Novat, E., Nakagomi, O., et al. (2013). Identification by full-genome analysis of a bovine rotavirus transmitted directly to and causing diarrhea in a human child. *Journal of Clinical Microbiology* 51(1), 182-189.
- Dormitzer, P. R., Nason, E. B., Prasad, B. V., and Harrison, S. C. (2004). Structural rearrangements in the membrane penetration protein of a non-enveloped virus. *Nature* 430(7003), 1053-1058.
- Dormitzer, P. R., Sun, Z. Y., Blixt, O., Paulson, J. C., Wagner, G., and Harrison, S. C. (2002). Specificity and affinity of sialic acid binding by the rhesus rotavirus VP8\* core. *Journal of virology* 76(20), 10512-10517.
- Doro, R., Farkas, S. L., Martella, V., and Banyai, K. (2015). Zoonotic transmission of rotavirus: surveillance and control. *Expert Review of Anti-Infective Therapy* 13(11), 1337-1350. doi 10.1586/14787210.2015.1089171.
- Durmaz, R., Kalaycioglu, A. T., Acar, S., Bakkaloglu, Z., Karagoz, A., Korukluoglu, G., et al. (2014). Prevalence of rotavirus genotypes in children younger than 5 years of age before the introduction of a universal rotavirus vaccination program: report of rotavirus surveillance in Turkey. *PloS one* 9(12), e113674. doi: 10.1371/journal.pone.0113674.
- Esona, M. D., Armah, G. E., and Steele, A. D. (2003). Molecular epidemiology of rotavirus infection in Western Cameroon. *Journal of Tropical Pediatrics* 49(3), 160-163.
- Esona, M. D., Armah, G. E., Geyer, A., and Steele, A. D. (2004). Detection of an Unusual Human Rotavirus Strain with G5P[8] Specificity in a Cameroonian Child with Diarrhea. *Journal of Clinical Microbiology* 42(1), 441-444.
- Esona, M. D., Geyer, A., Banyai, K., Page, N., Aminu, M., Armah, G. E., et al. (2009). Novel Human Rotavirus Genotype G5P[7] from Child with Diarrhea, Cameroon. *Emerging Infectious Diseases* 15(1), 83-86.
- Esona, M. D., Steele, D., Kerin, T., Armah, G., Peenze, I., Geyer, A., et al. (2010). Determination of the G and P Types of Previously Nontypeable Rotavirus Strains

- 
- from the African Rotavirus Network, 1996–2004: Identification of Unusual G types. *Journal of infectious diseases suppl*: S49-S54. doi:10.1086/653552.
- Estes, M. K., and Greenberg, H. B. (2009). Rotaviruses: from pathogenesis to vaccination. *Gastroenterology* 136(6), 1939-1951. Doi: 10.1053/j.gastro.2009.02.076.
- Estes, M. K., and Greenberg, H. B. (2013). Rotaviruses. Knipe DM, Howley PM, et al, editors. *Fields virology*. Philadelphia: Kluwer/Lippincott, Williams and Wilkins, 1348–1401.
- Estes, M. K., and Kapikian, A. Z. (2007). Rotaviruses. *Fields virology*, 1917–1957.
- Feeney, S. A., Armstrong, V. J., Mitchell, S. J., Crawford, L., McCaughey, C., and Coyle, P. V. (2011). Development and Clinical Validation of Multiplex TaqMan® Assays for Rapid Diagnosis of Viral Gastroenteritis. *Journal of Medical Virology* 83(9), 1650–1656.
- Fischer, D. D., Kandasamy, S., Paim, F. C., Langel, S. N., Alhamo, M. A., Shao, L., et al. (2017). Protein Malnutrition Alters Tryptophan and Angiotensin-Converting Enzyme 2 Homeostasis and Adaptive Immune Responses in Human Rotavirus-Infected Gnotobiotic Pigs with Human Infant Fecal Microbiota Transplant. *Clinical and Vaccine Immunology* 24(8), e00172-17. DOI:10.1128/CVI.00172-17.
- Fukai, K., Maeda, Y., Fujimoto, K., Itou, T., and Sakai, T. (2002) Changes in the prevalence of rotavirus G and P types in diarrheic calves from the Kagoshima prefecture in Japan. *Veterinary Microbiology* 86, 343–349.
- Gasparinho, C., Piedade, J., Mirante, M. C., Mendes, C., Mayer, C., Nery, S. V., et al. (2017). Characterization of rotavirus infection in children with acute gastroenteritis in Bengo province, Northwestern Angola, prior to vaccine introduction. *PloS ONE* 12(4), e0176046. doi 10.1371/journal.pone.0176046.
- Gautam R, Mijatovic-Rustempasic S, Esona MD, Tam KI, Quaye O, Bowen MD. (2016). Onestep multiplex real-time RT-PCR assay for detecting and genotyping wild-type group A rotavirus strains and vaccine strains (Rotarix(R) and RotaTeq(R)) in stool samples. *PeerJ* 4(10), e1560. doi: 10.7717/peerj.1560.
- Gautam, R., and Esona, M. D. (2015). Rotavirus. *Clinics in Laboratory Medicine* (35), 363-391.

- 
- Gautam, R., Lyde, F., Esona, M. D., Quaye, O., and Bowen, M. D. (2013). Comparison of Premier™ Rotaclone®, ProSpec™, and RIDASCREEN® rotavirus enzyme immunoassay kits for detection of rotavirus antigen in stool specimens. *Journal of Clinical Virology* 58(1), 292-4.
- GBD. (2017). Causes of Death Collaborators. Global, regional, and national age-sex specific mortality for 264 causes of death, 1980-2016: asystematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet* 390(10100), 1151-1210. doi:10.1016/S0140-6736(17)32152-9.
- Gentsch, J. R., Laird, A. R., Bielfelt, B., Griffin, D. D., Bányai, K., Ramachandran, M., et al. (2005). Serotype diversity and reassortment between human and animal rotavirus strains: implications for rotavirus vaccine programs. *Journal of Infectious Diseases* 192(Supplement\_1), S146–159.
- Giri, S., Kumar, C.P.G., Khakha, S. A et al. Diversity of rotavirus genotypes circulating in children under 5years of age hospitalised for acute gastroenteritis in India from 2005 to 2016: analysis of temporal and regional genotypes variation. *BMC Infectious Disease* 20, 740. Doi.org/10.1186/s12879-020-05448-y.
- Gómara, M. I., Desselberger, U., and Gray, J. (2003). Molecular epidemiology of rotaviruses: Genetic mechanisms associated with diversity. *Perspectives in Medical Virology* (9), 317-344. doi.10.1016/S0168-7069(03)09019-0.
- Goodwin, S., McPherson, J. D., and McCombie, W. R. (2016). Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nature Reviews Genetics* 17(6), 333-51. doi 10.1038/nrg.2016.49.
- Gutiérrez, M., Isa, P., San Martin, S. C., Perez-Vargas, L., Espinosa, R., Arias, C.F., et al. (2010). Different rotavirus strains enter MA104 cells through different endocytic pathways: The role of clathrin-mediated endocytosis. *Journal of Virology* 84(18), 9161–9169.
- Hagbom, M., Sharma, S., Lundgren, O., and Svensson, L. (2012). Towards a human rotavirus disease model. *Current Opinion in Virology* 2(4), 408-418. doi 10.1016/j.coviro.2012.05.006.

- 
- Haselhorst, T., Fleming F. E., Dyason, J. C., Hartnell, R. D., Yu, X., Holloway, G., et al. (2009). Sialic acid dependence in rotavirus host cell invasion. *Nature chemical biology* 5(2), 91–93. doi: 10.1038/nchembio.134.
- Hassine-Zaafrane, M., Salem, I. B., Sdiri-Loulizi, K., Kaplon, L., Bouslama, Z., Aouni, Z., et al. (2014). Distribution of G(VP7) and P (VP4) geotypes of group A bovin rotaviruses from Tunisian calves with diarrhoea. *Journal of Applied Microbiology* 116 (6), 1387-1395. doi. 10.1111/jam.12469.
- Heather, J. M., and Chain, B. (2016). The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. *Genomics* 107(1), 1-8. doi .10.1016/j.ygeno.2015.11.003.
- Heylen, E., Zeller, M., Ciarlet, M., De Coster, S., Van Ranst, M., and Matthijnssens, J. (2013). Complete genetic characterization of human G2P[6] and G3P[6] rotavirus strains. *Infection, Genetics and Evolution* 13, 27–35. doi: 10.1016/j.meegid.2012.08.019.
- Hnasko, R. (2015). ELISA: Methods and Protocols. *Methods in Molecular Biology*, vol. 1318, doi 10.1007/978-1-4939-2742-5\_1.
- Hodges, K., and Gill, R. (2010). Infectious diarrhea: cellular and molecular mechanisms. *Gut Microbes* 1(1), 4-21. doi: 10.4161/gmic.1.1.11036.
- Hu, L., Crawford, S. E., Czako, R., Cortes-Penfield, N. W., Smith, D. F., Le Pendu, J., et al. (2012). Cell attachment protein VP8\* of a human rotavirus specifically interacts with a-type histo-blood group antigen. *Nature* 485(7397), 256–259. doi: 10.1038/nature10996.
- Iturriza Gómara, M., Wong, C., Blome, S., Desselberger, U., and Gray, J. (2002). Molecular characterization of VP6 genes of human rotavirus isolates: correlation of genogroups with subgroups and evidence of independent segregation. *Journal of virology* 76(13), 6596–6601. doi:10.1128/jvi.76.13.6596-6601.2002.
- Iturriza-Gomara, M., Kang, G., Mammen, A., Jana, A. K., Abraham, M., Desselberger, U., et al. (2004). Characterization of G10P[11] rotaviruses causing acute gastroenteritis in neonates and infants in Vellore, India. *Journal of Clinical Microbiology* 42, 2541–2547.

- 
- Jayaram, H., Estes, M. K., and Prasad, B. V. (2004). Emerging themes in rotavirus cell entry, genome organization, transcription and replication. *Virus Research* 101(1), 67-81. doi 10.1016/j.virusres.2003.12.007.
- Jenkins, G. M., Rambaut, A., Pybus, O. G., and Holmes, E. C. (2002). Rates of molecular evolution in RNA viruses: a quantitative phylogenetic analysis. *Journal of Molecular Evolution* 54(2), 156-165. doi 10.1007/s00239-001-0064-3.
- Jothikumar, N., Kang, G., and Hill, V. R. (2009). Broadly Reactive TaqMan® Assay for Real-Time RTPCR Detection of Rotavirus in Clinical and Environmental Samples. *Journal of Virological Methods* 155(2), 126–131.
- King, A. M. Q., Adams, M. J., Carstens, E. B., and Lefkowitz, E. J. (2012). Virus taxonomy classification and nomenclature of viruses. Ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Elvesier / Academic Press*, San Diego: i-viii, 1-1327.
- Knipe, D. M., and Howley, P. M. (2013). Fields Virology. In edit. Lippincott Williams & Wilkins, 1347 -1401.
- Komoto, S., Adah, M. I., Ide, T., Yoshikawa, T., and Taniguchi, K. (2016). Whole genomic analysis of human and bovine G8P[1] rotavirus strains isolated in Nigeria provides evidence for direct bovine-to-human interspecies transmission. *Infection, Genetics and Evolution* 43, 424– 433. doi: 10.1016/j.meegid.2016.06.023.
- Komoto, S., Maeno, Y., Tomita, M., Matsuoka, T., Ohfu, M., Yodoshi, T., et al. (2013). Whole genomic analysis of a porcine-like human G5P[6] rotavirus strain isolated from a child with diarrhea and encephalopathy in Japan. *Journal of general virology* 94(Pt7), 1568-1575 doi 10.1099/vir.0.051011-0.
- Krawczyk, A., Lewis, M. G., Venkatesh, B. T., and Nair, S. N. (2016). Effect of exclusive breastfeeding on rotavirus infection among children. *Indian Journal of Pediatrics* 83(3), 220-225. doi: 10.1007/s12098-015-1854-8.
- Kulkarni, R., Arora, R., and Chitambar, S. D. (2014). Sequence analysis of VP7 and VP4 genes of G1P[8] rotaviruses circulating among diarrhoeic children in Pune, India: a comparaisn with Rotarix and Rotateq vaccine strains. *Vaccine* 32 (supplement 1), A75-A83. doi: 10.1016/j.vaccine.2014.03.080.

- 
- Langendorf, C., LeHello, S., Moumouni, A., Gouali, M., Mamaty, A. A., Grais, R. F., et al. (2015). Enteric bacterial pathogens in children with diarrhea in niger: diversity and antimicrobial resistance. *PLoS ONE* 10(3), e0120275. doi: 10.1371/journal.pone.0120275.
- Laurell, H., Iacovoni, J. S., Abot, A., Svec, D., Maoret, J. J., Arnal, J. F., and Kubista, M. (2012). Correction of RT-qPCR data for genomic DNA-derived signals with valid prime. *Nucleic Acids Research* 40(7), e51. doi: 10.1093/nar/gkr1259.
- Leshem, E., Lopman, B., Glass, R., Gentsch, J., Bányai, K., Parashar, U., Patel, M. (2014). Distribution of rotavirus strains and strain-specific effectiveness of the rotavirus vaccine after its introduction: A systematic review and meta-analysis. *The Lancet Infectious Diseases* 14, 847–856.
- Lestari, F. B., Vongpunsawad, S., and Poovorawan, .Y. (2020). Rotavirus infection in children in Southeast Asia 2008-2018: Disease burden, genotype distribution, seasonality, and vaccination. *Journal Biomed science* 21, 27(1): 66. doi: 10.1186/s12929-02000649-8.
- Leva, A., Eibach, D., Krumkamp, R., Käsmaier, J., Rubbenstroth, D., Adu-Sarkodie, Y., et al., (2016). Diagnostic performance of the Luminex xTAG gastrointestinal pathogens panel to detect rotavirus in Ghanaian children with and without diarrhoea. *Virology Journal* 13, 132. <https://doi.org/10.1186/s12985-016-0588-1>.
- Li, Z., Baker, M. L., Jiang, W., Estes, M. K., and Prasad, B. V. (2009). Rotavirus architecture at subnanometer resolution. *Journal of Virology* 83(4), 1754-1766.
- Liu, L., Johnson, H. L., Cousens, S., Perin, J., Scott, S., Lawn, J. E., et al. (2012). Global, regional, and national causes of child mortality: an updated systematic analysis for 2010 with time trends since 2000. *Lancet* 379(9832), 2151-2161.
- Lopman, A. B., Pitzer, E. V., Sarkar, R., Gladstone, B., Patel, M., Glasser, J., et al. (2012). Understanding reduced rotavirus vaccine efficacy in low socio- economic settings. *Plos One* 7(8), e41720. Doi 10.1371/journal.pone.0041720.
- Lorrot, M., and Vasseur, M. (2007). Physiopathologie de la diarrhée à Rotavirus. *Archives of Pediatrics* 14(Supplement 3), S145 – S150.



- 
- Luchs, A., and Timenetsky, T. S. M. (2016). Group A rotavirus gastroenteritis: post-vaccine era, genotypes and zoonotic transmission. *Einstein (Sao paulo)* 14(2), 278-287. doi: 10.1590/S1679-45082016RB3582.
- Madhi, S. A., Cunliffe, N. A., Steele, D., Witte, D., Kirsten, M., Louw, C., et al. (2010). Effect of Human Rotavirus Vaccine on Severe Diarrhea in African Infants. *New England Journal of Medicine* 362(4), 289-298. doi: 10.1056/NEJMoa0904797.
- Maes, P., Matthijnsens, J., Rahman, M., Van Ranst, M. and RotaC. (2009). A web-based tool for the complete genome classification of group A rotaviruses. *BMC microbiology* 9(1), 238.
- Magagula, N. B., Esona, M. D., Nyaga, M. M., Karla, M., and Mphahlele, M. J. (2015). Whole Genome Analyses of G1P[8] Rotavirus Strains From Vaccinated and Non-Vaccinated South African Children Presenting With Diarrhea. *Journal of Medical Virology* 87(1), 79-101. doi: 10.1002/jmv.23971.
- Maphalala, G., Phungwayo, N., Masona, G., Lukhele, N., Tsegaye, G., Dube, N., et al. (2018). Early impact of rotavirus vaccine in under 5year old children hospitalized due to diarrhea, Swaziland. *Vaccine* 36(47), 7210-7214.
- Mardis, E. R. (2013). Next-generation sequencing platforms. *Annual Review of Analytical Chemistry* 6, 287-303. doi: 10.1146/annurev-anchem-062012-092628.
- Martella, V., Banyai, K., Matthijnsens, J., Buonavoglia, C., and Ciarlet, M. (2010). Zoonotic aspects of rotaviruses. *Veterinary Microbiology* 140(3-4), 246-55. doi 10.1016/j.vetmic.2009.08.028.
- Matthijnsens, J., and Desselberger, U. (2012). Genome diversity and evolution of rotaviruses. Genome plasticity and infectious diseases: *American Society of Microbiology* DOI doi:https://doi.org/10.1128/9781555817213.ch13.
- Matthijnsens, J., Bilcke, J., Ciarlet, M., Martella, V., Bányai, K., Rahman., et al. (2009). Rotavirus disease and vaccination: impact on genotype diversity. *Future Microbiology* 4, 1303-1316.

- 
- Matthijnssens, J., Ciarlet, M., McDonald, S. M., Attoui, H., Bányai, K., Brister, J. R., et al. (2011). Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG). *Archives of virology* 156, 1397-298.
- Matthijnssens, J., Ciarlet, M., Rahman, M., Attoui, H., Banyai, K., Estes, M. K., et al. (2008). Recommendations for the classification of group A rotaviruses using all 11 genomic RNA segments. *Archives of virology* 153, 1621-1629.
- Matthijnssens, J., Rahman, M., Yang, X., Delbeke, T., Arijs, I., Kabue, et al. (2006). G8 rotavirus strains isolated in the Democratic Republic of Congo belong to the DS-1-like genogroup. *Journal of Clinical Microbiology* 44,1801–1809.
- Matthijnssens, J., Ciarlet, M., Heiman, E., Arijs, I., McDonald, S. M., Palombo, E. A., et al. (2008a). Full genome-based classification of rotaviruses reveals a common origin between human DS-1-like and bovine rotavirus strains. *Journal of Virology* 82(7), 3204-3219. doi:10.1128/jv.02257-07.
- Mbuh, F. A., Armah, G. E., Omilabu, S. A., Ahmad, A., and Umoh, J. U. (2012). Molecular epidemiology of group A human rotavirus in North West region, Cameroon. *Pan African Medical Journal* 12(108). doi : 10.11604/pamj.2012.12.108.1698.
- McAuliffe, G. N., Taylor, S. L., Drinković, D., Roberts, S. A., Wilson, E. M., and Best, E. J. (2018). Rotavirus infection in the auckland region after the implementation of universal infant rotavirus vaccination: impact on hospitalizations and laboratory implications. *Pediatric Infectious Disease Journal* 37(1), e1–e5.
- McAuliffe, G. N., Taylor, S. L., Moore, S., Hewitt, J., Upton, A., Howe, A. S., et al. (2019). Suboptimal performance of rotavirus testing in a vaccinated community population should prompt laboratories to review their rotavirus testing algorithms in response to changes in disease prevalence. *Diagnostic Microbiology Infectious Disease* 93(3), 203-207.
- Melliez, H., Boelle, Y. P., Baron, S., Mouton, Y., and Yazdanpanah, Y. (2005). Morbidité et cout des infections à rotavirus en France. *Médecine et maladies infectieuses* 35(10), 492–499.

- 
- Midgley, S. E., Bányai, K., Buesa, J., Halaihel, N., Hjulsager, C.K., Jakab, F., et al. (2012). Diversity and zoonotic potential of rotaviruses in swine and cattle across Europe. *Veterinary Microbiology* 156, 238–245.
- Midgley, S. E., Hjulsager, C. K., Larsen, L. E., Falkenhorst, G., and BOTTIGER, B. (2011). Suspected zoonotic transmission of rotavirus group A in Danish adults. *Epidemiology and Infection* 140, 1013–1017.
- Mijatovic-Rustempasic, S., Esona, M. D., Williams, A. L., and Bowen, M. D. (2016). Sensitive and specific nested PCR assay for detection of rotavirus A in samples with a low viral load. *Journal of Virological Methods* 236, 41-46. doi: 10.1016/j.jviromet.2016.07.007.
- Mijatovic-Rustempasic, S., Tam, K. I., Kerin, T. K., Lewis, J. M., Gautam, R., Quaye, O., et al. (2013). Sensitive and Specific Quantitative Detection of Rotavirus A by One-Step Real-Time Reverse Transcription-PCR Assay without Antecedent Double-Stranded-RNA Denaturation. *Journal of Clinical Microbiology* 51(9), 3047-3054.
- Moon, S. S., Groome, M. J., Velasquez, D. E., Parashar, U. D., Jones, S., Koen, A., et al. (2016). Pre vaccination rotavirus serum igtg and iga are associated with lower immunogenicity of live, oral human rotavirus vaccine in South African infants. *Clinical Infectious Diseases* 62(2), 157-165.
- Mouré, E. A. U., Aymard, U., Banga-Mingo, V., Gody, C. J, Mwenda, M. M., Fandema, J., et al. (2016). Emergence of G12 and G9 rotavirus genotypes in the Central African Republic, January 2014 to February 2016. *BMC Res Notes* 11, 5. doi: 10.1186/s13104-017-3122-7.
- Moyo, S. J., Kommedal, O., Blomberg, B., Hanevik, K., Tellevik, M. G., Maselle, S. Y., et al. (2017). Comprehensive analysis of prevalence, epidemiologic characteristics, and clinical characteristics of monoinfection and coinfection in diarrheal diseases in children in Tanzania. *American Journal of Epidemiology* 186(9), 1074-1083. doi: 10.1093/aje/kwx173.
- Msimang, V. M., Page, N., Groome, M. J., Moyes, J., Cortese, M. M., Seheri, M., et al. (2013). Impact of rotavirus vaccine on childhood diarrheal hospitalization after introduction

- 
- into the South African public immunization program. *Pediatric Infectious Disease Journal* 32(12), 1359-64. 35.
- Mwenda, J. M., Ntoto, K. M., Abebe, A., Enweronu-Laryea, C., Amina, I., Mchomvu, J., et al. (2010). Burden and epidemiology of rotavirus diarrhea in selected African countries: preliminary results from the African Rotavirus Surveillance Network. *Journal of Infectious Diseases* 202, S5-S11.
- Narvaez, C. F., Angel, J., and Franco, M. A. (2005). Interaction of rotavirus with human myeloid dendritic cells. *Journal of Virology* 79, 14526-14535.
- Ndombo, P. K., Ndze, V. N., Fokunang, C., Ashukem, T. N., Boula, A., Kinkela, M. N. et al. Pre-vaccine circulating group A rotavirus strains in under 5 years children with acute diarrhea during 1999-2013 in Cameroon. *Virology (Lond)* 1(4), 10. doi:10.15761/VRR.1000120.
- Ndzé, V. N., Akum, A. E., Kamga, G. H., Enjema, L. E., Esona, M. D., Banyai, K., et al. (2012). Epidemiology of rotavirus diarrhea in children under 5 years in Northern Cameroon. *Pan African Medical Journal* 11(73). doi 10.11604/pamj.2012.11.73.1548.
- Ndzé, V. N., Esona, M. D., Achidi, E. A., Gonsu, K. H., Dóró, R., Marton, S., et al. (2014). Full genome characterization of human *rotavirus A* strains isolated in Cameroon, 2010-2011: Diverse combinations of the G and P genes and lack of reassortment of the backbone genes. *Infectious Genetics and Evolution* 28, 537-560.
- Ndzé, V. N., Papp, H., Achidi, E. A., Gonsu, K. H., László, B., Farkas, S., et al. (2013). One-year survey of human rotavirus strains suggests the emergence of genotype G12 in Cameroon. *Journal of Medical Virology* 85(8), 1485-1490.
- Nordgren, J., Bucardo, F., Svensson, L., and Lindgren, P. E. (2010). Novel light-upon-extension real-time PCR assay for simultaneous detection, quantification, and genogrouping of group A rotavirus. *Journal of Clinical Microbiology* 48(5), 1859-1865.
- Nordgren, J., Sharma, S., Bucardo, F., Nasir, W., Günaydin, G., Ouermi, D., et al. (2014). Both lewis and secretor status mediate susceptibility to rotavirus infections in a rotavirus genotype-dependent manner. *Infectious Diseases Society of America* 59(11), 1567–1573.

- 
- OMS. (2009). Les réseaux mondiaux de surveillance de la gastro-entérite à rotavirus, 2001-2008. *Enregistrement hebdomadaire épidémiologique* 47, 421-425.
- OMS. (2013). Statistiques sanitaires mondiales [http://www.who.int/gho/publications/world\\_health\\_statistics/2013/fr/](http://www.who.int/gho/publications/world_health_statistics/2013/fr/).
- Papp, H., Borzák, R., Farkas, S., Kiszfalvi, P., Lengyel, G., Molnár, P., et al. (2013). Zoonotic transmission of reassortant porcine G4P[6] rotaviruses in Hungarian pediatric patients identified sporadically over a 15 year period. *Infectious Genetics and Evolution* 19, 71-80. doi: 10.1016/j.meegid.2013.06.013.
- Park, S. I., Matthijssens, J., Saif, L. J., Kim, H. J., Park, J. G., Alfajaro, M. M., et al. (2011). Reassortment among bovine, porcine and human rotavirus strains results in G8P[7] and G6P[7] strains isolated from cattle in South Korea. *Veterinary Microbiology* 152(1-2), 55-66.
- Parra, G. I., Bok, K., Martinez, M., and Gomez, J. A. (2004). Evidence of rotavirus intragenic recombination between two sublineages of the same genotype. *The Journal of general virology* 85(Pt 6), 1713-1716. doi: 10.1099/vir.0.79851-0.
- Patel, H. D., Roberts, E. T., and Constenla, D. O. (2013). Cost-effectiveness of a new rotavirus vaccination program in Pakistan: a decision tree model. *Vaccine* 31(51), 6072-6078.
- Patel, M. M., Pitzer, V.E, Alonso, W. J., Vera, D., Lopman, B., Tate, J., et al. (2012). Les Rotavirus et leur prévention. *Médecine thérapeutique/pédiatrie* 150, 23-27.
- PATH. (2014). Infection à rotavirus et vaccins preventifs au Cameroun. Disponible à: [http://www.path.org/publications/files/IMM\\_solutions\\_global\\_killer.pdf](http://www.path.org/publications/files/IMM_solutions_global_killer.pdf). Consulté le 5 février 2015.
- Paul, A., Babji, S., Sowmyanarayanan, T. V., Dhingra, M. S., Ramani, S., Kattula, D., et al. (2014). Human and bovine rotavirus strain antigens for evaluation of immunogenicity in a randomized, double-blind, placebo-controlled trial of single dose live attenuated tetravalent, bovine-human-reassortant, oral rotavirus vaccine in Indian adults. *Vaccine* 32(25), 3094-3100. doi: 10.1016/j.vaccine.2014.03.013.

- 
- Payne, C. D., Boom, A. J., Staat, A. M., Edwards, M. K., Szilagyi, G. P., Klein, J. E., et al. (2013). Effectiveness of pentavalent and monovalent rotavirus vaccines in concurrent use among us children < 5 years of age, 2009-2011. *Clinical Infectious diseases* 57(1), 13-20.
- Pesavento, J. B., Crawford, S. E., Estes, M. K., and Prasad, B. V. V. (2006). Rotavirus proteins: Structure and assembly. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 309, 189-219.
- Phan, T. G., Trinh, G. D, Khamrin, P., Kaneshi, K., Ueda, Y., Nakaya, S., et al. (2007). Emergence of new variant rotavirus G3 among infants and children with acute gastroenteritis in Japan during 2003-2004. *Clinical Laboratory* 53(1-2), 41-48.
- Pitzer, V. E., Bilcke, J., Heylen, E., Crawford, F. W., De Smet, M. F., Van Ranst, M., et al. (2015). Did large-scale vaccination: Drive changes in the circulating rotavirus population in Belgium? *Scientific Reports* 5, 18585.
- Poitras, E., et Houde, A. (2002). La PCR en temps réel : Principes et applications. *Reviews in Biology and Biotechnology* 2(2), 2-11.
- Pothier, P., and Agnello, D. (2012). Cours de Virologie Grands Syndromes. <http://www.microbes.edu.org/etudiant/gastro-enterites.html> (consulté le 14.04.2015).
- Pourasgari, F., Kaplon, J., Karimi-Naghlani, S., Fremy, C., Otarod, V., Ambert-Balay, K., et al. (2016). The molecular epidemiology of bovine rotaviruses circulating in Iran: a two-year study. *Archives of Virology* 161(12), 3483-3494. Doi: 10.1007/s00705-016-3051-0.
- QIAamp. (2010). QIAamp® Viral RNA Mini Handbook. *QIAGEN®*, third Edition.
- Rahman, M., Matthijssens, J., Yang, X., Delbeke, T., Arijs, I., Taniguchi, K., et al. (2007). Evolutionary history and global spread of the emerging G12 human rotaviruses. *Journal of Virology* 81, 2382-2390.
- Rajendran, P., and Kang, G. (2014). Molecular epidemiology of rotavirus in children and animals and characterization of an unusual G10P[15] strain associated with bovine

- 
- diarrhea in south India. *Vaccine* 32 (1), A89-A94. doi : 10.1016/j.vaccine.2014.03.026.
- Ramani, S., Cortes-Penfield, N. W., Hu, L., Crawford, S. E., Czako, R., Smith, D. F., et al. (2013). The VP8\* Domain of Neonatal Rotavirus Strain G10P[11] Binds to Type II Precursor Glycans. *Journal of virology* 87(3), 7255–7264.
- Ramani, S., Iturriza-Gomara, M., Jana, A. K., Kuruvilla, K. A., Gray, J. J., Brown, D. W., et al. (2009). Whole genome characterization of reassortant G10P[11] strain (N155) from a neonate with symptomatic rotavirus infection: identification of genes of human and animal rotavirus origin. *Journal of Clinical Virology* 45, 237– 244. doi.10.1016/j.jcv.2009.05.003.
- Ramig, R. F. (2004). Pathogenesis of intestinal and systemic rotavirus infection. *Journal of Virology* 78(19):10213–10220.
- ROTA Council. (2016). Estimations mondiales, régionales et nationales de la mortalité liée au rotavirus chez l'enfant de moins de 5 ans entre 2000 et 2013. *Clinical Infectious Diseases* 62 Suppl 2, S96-S105.
- Sadiq, A., Bostan, N., Bokhari, H., Matthijnssens, J., Yinda, K. C., Raza, S., et al. (2019). Molecular characterization of human group A rotavirus genotypes circulating in Rawalpindi, Islamabad, Pakistan during 2015-2016. *PLoS One* 14(7), e0220387. doi: 10.1371/journal.pone.0220387.
- Sanjuán, R., and Domingo-Calap, P. (2016). Mechanisms of viral mutation. *Cellular and Molecular Life Sciences* 73(23), 4433-4448. doi: 10.1007/s00018-016-2299-6.
- Santos, N., and Hoshino, Y. (2005). Global distribution of rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine. *Reviews in medical virology* (1), 29-56. doi:10.1002/rmv.448.
- Saravanan, M., Parthiban, M., and Ramdass, P. (2006). Genotyping of rotavirus of neonatal calves by nested-multiplex PCR in India. *Veterinarski Arhiv* 76 (6), 497 - 505.
- Seo, N. S., Zeng, C. Q.Y., Hyser, J. M., Utama, B., Crawford, E. S., Kim, K. J., et al. (2008). Integrins alpha1beta1 and alpha2beta1 Are Receptors for the Rotavirus Enterotoxin.

---

*Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(26): 8811-8818. Doi : 10.1073/pnas.0803934105.

Shah, M. P., Tate, J. E., Mwenda, J. M., Steele, A. D., and Parashar, U. D. (2017). Estimated reductions in hospitalizations and deaths from childhood diarrhea following implementation of rotavirus vaccination in Africa. *Expert Review of Vaccines* 16:10, 987-995.

Sharma, R., Bora, D. P., Chakraborty, P., Das, S., and Barman, N. N. (2013). Circulation of group A rotaviruses among neonates of human, cow and pig: study from Assam, a north eastern state of India. *Indian Journal of Virology* 24(2), 250-55.

Shrivastava, A. K., Kumar, S., Mohakud, N. K., Suar, M., and Sahu, P. S. (2017). Multiple etiologies of infectious diarrhea and concurrent infections in a pediatric outpatient-based screening study in Odisha, India. *Gut Pathogens* 9, 16. doi : 10.1186/s13099-017-0166-0.

Silvestri, L. S., Tortorici, M. A., Vasquez-Del Carpio, R., and Patton, J. T. (2005). Rotavirus glycoprotein nsp4 is a modulator of viral transcription in the infected cell. *Journal of Virology* 79(24), 15165-15174. Doi: 10.1128/JVI.79.24.15174.2005.

Simmonds, M. K., Armah, G., Asmah, R., Banerjee, I., Damanka, S., Esona, M., et al. (2008). New oligonucleotide primers for P-typing of rotavirus strains: Strategies for typing previously untypeable strains. *Journal of Clinical Virology* 42(4), 368-373. doi: 10.1016/j.jcv.2008.02.011.

Soltan, M. A., Tsai, Y. L., Lee, P. Y., Tsai, C. F., Chang, H. F., Wang, H. T., et al. (2016). Comparison of electron microscopy, ELISA, real time RT-PCR and insulated isothermal RT-PCR for the detection of Rotavirus group A (RVA) in feces of different animal species. *Journal of Virological Methods* 235, 99-104. doi :10.1016/j.jviromet.2016.05.006.

Tamura, K., Stecher, G., and Kumar, S. (2016). MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular biology and evolution* 30(12), 1870-1874. 10.1093/molbev/msw054.

Tate, J. E., Burton, A. H., Boschi-Pinto, C., Parashar, U. D., Agocs, M., Serhan, F., et al. (2016). Global, regional, and national estimates of Rotavirus mortality in children <5 years



- 
- of age, 2000-2013. *Clinical Infectious Disease* 62 Suppl 2, S96-S105. PMID: 27059362/ cid / civ1013.
- Tate, J. E., Burton, A. H., Boschi-Pinto, C., Steele, A. D., Duque, J. and Parashar, U.D. (2012). 2008 estimate of worldwide rotavirus associated mortality in children younger than 5 years before the introduction of universal rotavirus vaccination programmes: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infectious Diseases* 12, 136–141.
- Than, V. T., Jeong, S., and Kim, W. A. (2014). Systematic review of genetic diversity of human rotavirus circulating in South Korea. *Infectious, Genetics and Evolution* 28, 462-469.
- Trask, S. D., McDonald, S. M., and Patton, J. T. (2012). Structural insights into the coupling of virion assembly and rotavirus replication. *Nature Reviews Microbiology* 10(3), 165-77.
- Troeger, C., Ibrahim, A. K., Puja, C. R., Shujin, C., Blacker, B. F., Tahmeed, A., et al. (2018). Rotavirus Vaccination and the Global Burden of Rotavirus Diarrhea Among Children Younger Than 5 Years. *JAMA Pediatrics* 172(10), 958-965. doi:10.1001/jamapediatrics.1960.
- Tse, C., and Capeau, J. (2003). Quantification des acides nucléiques par PCR quantitative en temps réel. *Annales de Biologie Clinique* 61(3), 279-293.
- Tsolenyanu, E., Djadou, K. E., Fiawoo, M., Akolly, D. A. E., Mwenda, J. M., Leshem, E., et al. (2018). Evidence of the impact of monovalent rotavirus vaccine on childhood acute gastroenteritis hospitalization in Togo. *Vaccine* 36(47), 7185-7191.
- Valiakos, G., Chatzopoulos, D. C., and Tsokana, C. N. (2018). Interspecies transmission of rotaviruses among ruminants, dogs and humans: current facts and remarks. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society* 68(2), 123–30.
- Vlasova, A. N., Amimo, J. O., and Saif, L. J. (2017). Porcine Rotaviruses: Epidemiology, Immune Responses and Control Strategies. *Viruses* 9(3). doi 10.3390/v9030048.
- Wandera, E., A., Mohammad, S., Komoto, S., Maeno, Y., Nyangao, J., Ide, T., et al. (2017). Molecular epidemiology of rotavirus gastroenteritis in Central Kenya before vaccine

- 
- introduction, 2009-2014. *Journal of Medical Virology*, 89(5), 809-817. doi 10.1002/jmv.24691.
- Wang, H., Moon, S., Wang, Y., and Jiang, B. (2012). Multiple virus infection alters rotavirus replication and expression of cytokines and Toll-like receptors in intestinal epithelial cells. *Virus Research* 167(1), 48–55.
- Ward, L. R., Clark, F. H., and Offit, A. P. (2010). Influence of potential protective mechanisms on the development of live rotavirus vaccines. *Journal of Infectious Diseases* 202(S1), S72-S79. doi: 10.1086/653549.
- Wen, K., Azevedo, M. S., Gonzalez, A., Zhang, W., Saif, L. J., Li, G., et al. (2009). Toll-like receptor and innate cytokine responses induced by lactobacilli colonization and human rotavirus infection in gnotobiotic pigs. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 127, 304-315.
- Wolf, M., Phuoc, T. V., and Greenberg, H. B. (2011). Rhesus Rotavirus Entry into a Polarized Epithelium Is Endocytosis Dependent and Involves Sequential VP4 Conformational Changes. *Journal of virology* 85(6), 2492–2503.
- Ye, S., Roczo-Farkas, S., Whiley, D., Lambert, S., Robson, J., Heney, C., et al. (2013). Evidence of false-positive results in a commercially available rotavirus assay in the vaccine era, Australia, 2011 to 2012. *Euro Surveillance* 18(21), 1-5.
- Zeller, M., Heylen, E., De Coster, S., Van Ranst, M., and Matthijnsens, J. (2012). Full genome characterization of a porcine-like human G9P[6] rotavirus strain isolated from an infant in Belgium. *Infectious, Genetics and Evolution* 12(7), 1492-1500. doi 10.1016/j.meegid.2012.03.002.
- Zeng, S. Q., Halkosalo, A., Salminen, M., Szakal, E. D., Puustinen, L., and Vesikari, T. (2008). One-step quantitative RT-PCR for the detection of rotavirus in acute gastroenteritis. *Journal of Virological Methods* 153, 238–240.
- Zhang, Q., Hu, R., Tang, X., Wu, C., He, Q., Zhao, Z., et al. (2013). Occurrence and investigation of enteric viral infections in pigs with diarrhea in China. *Archives of virology* 158(8), 1631-1636.

---

# **ANNEXES**

## Clairance éthique

### COMITE NATIONAL D'ETHIQUE DE LA RECHERCHE POUR LA SANTE HUMAINE

Arrêté N° 0977/A/MINSANTE/SESP/SG/DROS/ du 18 avril 2012 portant création, organisation et fonctionnement des comités d'éthique de la recherche pour la santé humaine au sein des structures relevant du Ministère en charge de la santé publique

N° 2016/01/---<sup>696</sup>/CE/CNERSH/SP

Yaoundé, 08 janvier 2016

[Cnethique\\_minsante@yahoo.fr](mailto:Cnethique_minsante@yahoo.fr)

#### CLAIRANCE ETHIQUE

Le Comité National d'Ethique de la Recherche pour la Santé Humaine (CNERSH), en sa session extraordinaire du 1<sup>er</sup> décembre 2015, a examiné le projet de recherche intitulé : «**Epidémiologie moléculaire de l'infection à rotavirus humain et animal dans la région du Littoral du Cameroun**» soumis par Mme **GHAPOUTSA NKANDI RAHINATOU**, Investigateur Principal, Faculté des Sciences, Université de Yaoundé I.

Le projet est d'un grand intérêt scientifique et social. L'objectif de cette étude est de déterminer les caractéristiques moléculaires et la prévalence de l'infection à rotavirus ainsi que les différents génotypes circulant chez les humains et les animaux dans la région du Littoral après l'introduction du vaccin. La procédure de l'étude est bien documentée et claire. Les risques liés à l'étude sont précisés ainsi que les mesures pour les éviter et les minimiser. La notice d'information et le formulaire de consentement, en français et en anglais, sont bien élaborés et simples à comprendre. Les mesures prises pour garantir la confidentialité des données collectées sont présentes dans le document. Les CVs des Investigateurs les décrivent comme des personnes compétentes, capables de mener à bien cette étude. Pour toutes ces raisons, le Comité National d'Ethique approuve pour une durée d'un an, la mise en œuvre de la présente version du protocole.

L'étudiante **GHAPOUTSA NKANDI RAHINATOU** est responsable du respect scrupuleux du protocole approuvé et ne devrait y apporter aucun amendement aussi mineur soit-il, sans avis favorable du CNERSH. L'investigateur est appelé à collaborer pour toute descente du CNERSH pour le suivi de la mise en œuvre du protocole approuvé. Le rapport final du projet devra être soumis au CNERSH et aux autorités sanitaires du Cameroun.

La présente clairance peut être retirée en cas de non respect de la réglementation en vigueur et des recommandations susmentionnées.

En foi de quoi, la présente clairance éthique est délivrée pour servir et valoir ce que de droit.

#### Ampliations

- MINSANTE



Le Président

Lazare KAPTUE

**N.B :** cette clairance éthique ne vous dispense pas de l'autorisation administrative de recherche (AAR), exigée pour mener cette étude sur le territoire camerounais. Cette dernière vous sera délivrée par le Ministère de la Santé Publique.

## Autorisation de la délégation Régionale de la Santé Publique du Littoral

REPUBLIQUE DU CAMEROUN  
PAIX-TRAVAIL-PATRIE  
MINISTERE DE LA SANTE PUBLIQUE  
DELEGATION REGIONALE  
DU LITTORAL



MINSANTE

B.P 106- DOUALA Tél : 33 42 44 34/ 33 42 29 66 /42.17.60  
Fax : 33 42.76.10

REPUBLIC OF CAMEROON  
PEACE - WORK - FATHERLAND  
MINISTRY OF PUBLIC HEALTH  
REGIONAL DELEGATION  
FOR THE LITTORAL

P.O. Box 106- DOUALA Tél : 33 42 44 34/ 33 42 29 66 /42.17.60  
Fax : 33 42.76.10

N° 1684 /AR/MINSANTE/DRSPL/BCASS

Douala, 15 SEPT 2015

Le Délégué Régional de la  
Santé Publique du Littoral

A

Mesdames/Messieurs les Directeurs de :

- L'Hôpital Laquintinie de Douala
- L'Hôpital Régional de Nkongsamba
- L'Hôpital Régional d'Edéa
- L'Hôpital de District de Bonassama
- L'Hôpital de District de Deido

**Objet : Autorisation de Recherche.**

Monsieur/Madame,

Madame **GHAPOUTSA NKANDE Rahinatou**, étudiante en Doctorat option Biochimie au Centre de Recherche et de Formation Doctorale en Sciences de la Vie, Santé et Environnement de l'Université de Yaoundé I sollicite effectuer ses travaux de recherche sur le thème « **Molecular Epidemiology of Human and Animal Rotavirus infection in the Littoral and Centre Regions of Cameroon** » dans le service de pédiatrie de votre Hôpital, pour une période non déterminée..

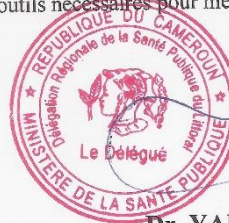
A cet effet, nous lui délivrons un accord de principe de recherche sous réserve de l'obtention d'une clairance éthique qui lui sera délivrée par le Comité National d'Ethique de la Recherche en Santé Humaine (CNERSH).

J'ai l'honneur de vous prier de bien vouloir l'accepter dans votre institution et aussi, de bien vouloir mettre à sa disposition des outils nécessaires pour mener cette recherche

Salutations distinguées.

**Ampliations :**

- Ministre de la Santé Publique
- Intéressée
- Archives/ Chronos



**Dr. YAMBA BEYAS Martin**

---

## Fiche technique

Nom de l'hôpital : ..... Numéro d'enregistrement : .....

Date d'admission : \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_

### Information sur le Patient :

Nom/Prénom : .....

Adresse ..... Ville..... Quartier.....

Age en mois..... Date de naissance \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_ Sexe : M\_ F\_

Elevage domestique : Oui..... Non.....

### Informations Cliniques :

Vomissement : OUI\_ NON\_ Nombre d'épisode/24H.....Durée (jour).....

Diarrhée : OUI\_ NON\_ Nombre d'épisode/24H.....Durée (jour).....

Léthargie/inconscient : Oui\_ Non\_ Yeux enfoncés : Oui\_ Non\_

Incapacité de boire : Oui\_ Non\_ Etat de Déshydratation : sévère\_ grave\_

Température : .....°C Traitement : IVF\_ SRO\_ Autres\_

### Informations pour le laboratoire :

Date de Collecte des Selles \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_ Date d'envoi \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_

Issue de la maladie : vivant \_ décédé \_ Date de sortie/transfert/décès \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_

Vaccin rota reçu : Oui\_ Non\_ Inconnu\_ Nombre de dose vaccin Rotavirus \_\_\_\_\_

### Résultats de laboratoire

Numéro d'enregistrement : ..... Date de réception au laboratoire \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_

Condition des selles : Adéquate\_ Inadéquate\_

Résultat ELISA : P=Positif N=Négatif U=inconnu

Génotype VP7 : Oui\_ Non\_ non typage \_ Génotype VP4 : Oui\_ Non\_ non typage \_

### Autres résultats de labo ou commentaires :

-----  
-----  
-----

---

## Notice d'Information

UNIVERSITE DE YAOUNDE I  
UNIVERSITY OF YAOUNDÉ I



FACULTE DES SCIENCES  
FACULTY OF SCIENCE

DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE  
DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY

### Notice d'Information du participant

**Titre de l'étude : Caractérisation moléculaire de l'infection à Rotavirus humain et animal dans la région du Littoral du Cameroun.**

**Nom d'investigateur principal : GHAPOUTSA Nkandi Rahinatou**

**Population cible : Environ 200 nourrissons et enfants de moins de cinq ans**

#### **À propos du formulaire :**

Veillez lire attentivement le présent formulaire. Il contient des informations importantes relatives à la participation à une étude. Si vous avez des questions sur l'étude ou sur un point de ce formulaire, n'hésitez pas à le faire savoir. Si vous acceptez de participer à cette étude nous vous demanderons de signer ce formulaire.

#### **Introduction**

Selon l'OMS, l'infection à Rotavirus est l'une des causes les plus fréquentes de diarrhées chez les nourrissons et les enfants âgés de moins de 5 ans avec une estimation de 527.000 décès par an. Ainsi, il est donc impérieux de déterminer la prévalence et caractéristiques moléculaires de l'infection. Notre étude, portant sur 200 nourrissons et enfants âgés de moins de Cinq ans, sera réalisée de Mai 2015 à Avril 2016 dans cinq hôpitaux de la région du Littoral.

#### **Objectifs**

Au cours de la présente étude, nous comptons déterminer la prévalence de l'infection et la répartition des génotypes, décrire les diversités génétiques afin de fournir des données statistiques sur les différentes souches rencontrés dans cette zone d'étude.

#### **Procédure**

---

Votre participation à cette enquête sera requise pour une rencontre d'environ 15 minutes. Ces rencontres auront lieu à l'hôpital, en fonction de vos disponibilités. Pendant ces entretiens, vous aurez à répondre à un questionnaire et 5g de selles seront prélevés de votre enfant.

### **Avantages et bénéfices pouvant découler de la participation**

Votre participation à ce projet de recherche vous apportera l'avantage de recevoir des informations particulières en matière de prévention contre l'infection à Rotavirus et une bouteille d'eau minérale vous sera offerte. À cela s'ajoute le fait qu'elle contribuera à l'avancement des connaissances entourant cette infection ; de plus l'analyse des données collectées pourraient permettre la mise en place d'une vraie politique de surveillance de l'infection.

### **Inconvénients et risques pouvant découler de la participation**

Votre participation à la recherche ne devrait pas comporter d'inconvénients significatifs, si ce n'est le fait de donner de votre temps et les échantillons de selles de votre enfants.

### **Droit de retrait sans préjudice de la participation**

Il est entendu que la participation de votre enfant à cette étude est tout à fait volontaire et qu'il reste libre, à tout moment, de mettre fin à sa participation sans avoir à motiver sa décision ni à subir de préjudice de quelque nature que ce soit. Toutefois, lorsque vous aurez rempli et retourné le questionnaire, il sera impossible de détruire les données puisqu'aucune information permettant d'identifier les répondants n'a été recueillie.

### **Durée de l'étude**

Cette collecte de données se fera pendant une durée d'un an, allant de Mai 2015 à Avril 2016.

### **Confidentialité, partage, surveillance et publications**

Les données seront conservées en lieu sûr et détruites à l'expiration de la période de conservation (maximum 5 ans). Aucun renseignement permettant d'identifier les personnes qui ont participé à l'étude n'apparaîtra dans aucune documentation. Les publications en rapport avec le projet porteront uniquement sur les résultats généraux de l'étude, garantissant ainsi la confidentialité des renseignements et des données et préservant l'anonymat des participants.

Pour toute question ou préoccupation sur la présente étude, bien vouloir contacter par email ou téléphone:

**GHAPOUTSA Nkandi Rahinatou : [rahinankandi@yahoo.fr](mailto:rahinankandi@yahoo.fr)/ 695 08 02 91**

Vous pouvez également contacter le Département de Biochimie via la Faculté des sciences de l'Université de Yaoundé 1 au : **22 22 13 20**

Ou encore joignez le Comité National d'Ethique de la Recherche pour la Santé humaine au **22 76 21 14** / [cnethique\\_minsante@yahoo.fr](mailto:cnethique_minsante@yahoo.fr)



---

## Information Notice

UNIVERSITE DE YAOUNDE I  
UNIVERSITY OF YAOUNDÉ I



FACULTE DES SCIENCES  
FACULTY OF SCIENCE

DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE  
DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY

### Information Notice

**Title of the study: Molecular characterization of human and animal Rotavirus infection in the Littoral region of Cameroon**

**Main investigator: GHAPOUTSA Nkandi Rahinatou**

**Targeted population: 200 infants and under five – year old children**

#### **About the Form**

Please carefully read the present form. It contains important pieces of information relating to a participation to a study. If you have any question about the study or aspect of this form, let us know. If you agree to participate to this study, you will be asked to sign this form.

#### **Introduction**

According to the WHO, the rotavirus infection is one of the most frequent causes of diarrhea of infants and under five year old children, with an estimation of 527.000 deaths per year. So, it becomes necessary to determine the prevalence et the molecular caractéristiques of the infection. Our study, that concerns 200 infants and under 5 year old children will be realized from May 2015 to April 2016 in 5 hospitals of the littoral region.

#### **Objectives**

During this study, we are going to determine the prevalence of the infection et the genotype repartition, to describe the genetic diversities in order to bring out statistical data on the different strains found in the study area.

#### **Procedure**

Your participation to this survey is needed for a 15 minutes meeting. These meeting will take place in the hospital, depending on your availabilities. During these meetings, you will have to answer to some questions and 5 g of sample stool will be taken possible

#### **Advantages and benefits to the participant**

---

Your participation to this research project will give you more peculiar info on the prevention of rotavirus infection and bottle of mineral water will be given. More, it will help the research on this infection to be improved on. The analysis of the data we have collected may help to put in place a real invigilation policy of the infection.

### **Possible disadvantages and risks**

There is no real disadvantage apart from giving your time and the stool of your child.

### **Right of withdrawal without damage of the participant**

It is agree that you child will freely participate to this study and that he is stile free, at any moment, to put and in to his participation; we not need to explain to motivation and not risk of damage. Never the less, once the questionnaire has been filled in and collected, it will be not possible to destroy the data since any information aiming at it identified the participant would have been collected.

### **Duration of the study**

This data collection will for one year, from May 2015 to April 2016

### **Confidentiality, share, invigilation and publications**

The data are going to be kept in a safe spot and they are going to be destroyed at the expiration date (maximum 5 years). After that period, the data will be destroyed. Any information that can help to identify the persons who look part to the study will appear somewhere. The publications related to the project will only focus on the general results of the study, in order to guaranty the confidentiality of the information and data and by so doing preserving the anonymity of the participants.

For any question or preoccupation, kindly mail or phone:

**GHAPOUTSA Rahinatou : [rahinankandi@yahoo.fr](mailto:rahinankandi@yahoo.fr)/ 695 08 02 91**

You can also contact the Department of Biochemistry try via the Faculty of Science of the University of Yaoundé I at: 22 22 13 20

Or mail or phone the National committee of research ethics for human health at **22 76 21 14 / [cnethique\\_minsante@yahoo.fr](mailto:cnethique_minsante@yahoo.fr)**

---

## Formulaire de consentement éclairé

UNIVERSITE DE YAOUNDE I  
UNIVERSITY OF YAOUNDÉ I



FACULTE DES SCIENCES  
FACULTY OF SCIENCE

DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE  
DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY

Cameroun

Code du Participant

[ ][ ][ ][ ]

---

### FORMULAIRE DE CONSENTEMENT ECLAIRE

Je soussigné (Nom du participant).....

Signature du Parent ou tuteur du participant.....

Avoir été invité à participer au travail de recherche intitulé « **Caractérisation moléculaire de souches de rotavirus humain et animal dans la région du Littoral du Cameroun** »

Dont l'investigateur principal s'appelle Ghapoutsa Nkandi Rahinatou, Adresse : 695080291

- J'ai bien compris la notice d'information qui m'a été remise concernant cette étude
- Ou bien on m'a lu et expliqué la notice d'information relative à cette étude
- j'accepte que mon enfant participe à cette étude. Toutes mes questions ont été répondues à ma satisfaction.
- Je comprends que mon enfant est entièrement libre de faire partie de cette étude et que ma décision qu'il participe ou non n'affectera pas la qualité des soins qu'il pourrait recevoir.
- Il est entendu qu'en signant ce formulaire, je ne renonce nullement à mes droits légitimes ni à ceux de mon enfant.

J'accepte librement de participer à cette étude dans les conditions précisées dans la notice de l'information, c'est-à-dire :

- De répondre aux questions d'enquête
- De donner 5g de selles

Je donne mon accord pour que le reste des échantillons prélevés pour cette étude soient utilisés dans les autres étude.

Date.....

Signature de l'investigateur

Signature du parent

---

**INFORMED CONSENT**

UNIVERSITY OF YAOUNDÉ I

FACULTY OF SCIENCE

**DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE**  
*DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY*

Cameroon

**Participant's code**

[ ][ ][ ][ ]

---

**INFORMED CONSENT**

I (Name of participant) .....

Signature of the participant's parents or garden) .....

Have been invited to participate to the research work intitled "Molecular epidemiology of human and animal Rotavirus infection in the Littoral region of Cameroon" whose main investigator is called Ghapoutsa Nkandi Rahinatou, address 695 08 02 91

- I have well understood the information notice related to the present study
- Or the information notice was read and well explained to me
- I agree that my child takes part to the study. All the questions I had have been answered with satisfaction
- I understand that my child is free to participate to this study and my decision to let him take to part to the study or not doesn't will affect the quality of care he may receive
- Of course, it is agreed that I' don't give up neither to my legitimate rights nor to my child's by signing this form

I freely agree to participate to this study, following the conditions stated on the information notice namely:

- To answer to the study questions
- To give 5g of stool


I also agree that the remaining samples from this study can be used for other studies.

Date.....

**Signature of the investigator**

**Signature of the parent**

## Autorisation de recherche à l'Abattoir de Bonendalé

<p>REPUBLIQUE DU CAMEROUN <i>Paix – Travail – Patrie</i></p> <p>SOCIETE DE DEVELOPPEMENT ET D'EXPLOITATION DES PRODUCTIONS ANIMALES</p> <p>ABATTOIR DOUALA</p>		<p>REPUBLIC OF CAMEROON <i>Peace – Work – Fatherland</i></p> <p>LIVESTOCK DEVELOPMENT AND HUSBANDRY CORPORATION</p> <p>DOUALA SLAUGHTER HOUSE</p>
--	---	---

---

N° \_\_\_\_\_ / 2015 / SODEPA / DU / SAF

### AUTORISATION DE RECHERCHE

**Mme GHAPOUTSA NKANDI Rahinatou**, étudiante en

Doctorat / PhD Biochimie au Centre de Recherche et formation Doctorale en sciences de la vie, Santé et Environnement de l'Université de Yaoundé I, est autorisée à effectuer une recherche de quatre (04) mois, pour la période allant du 20 Juin 2015 au 20 Octobre 2015, à la SODEPA Abattoir de Douala, sur le thème « **Molecular epidemiology of human and animal rotavirus infection in the Littoral and Centre regions of Cameroon** ».

Les travaux s'effectueront sous la supervision du Chef de Service de Production, dans le respect des normes en vigueur à l'abattoir.

En foi de quoi la présente autorisation de recherche est délivrée pour servir et valoir ce que de droit.

Fait à Douala... 07 MAI 2015



**Le Directeur**

ABATTOIR SODEPA DOUALA B.P. 2773 DOUALA – CAMEROUN  
TEL : (237) 243-15.86.-50 - EMAIL : sodepa.bonaberi@yahoo.fr  
NUMERO CONTRIBUTABLE : M037400008375 - S

## Autorisation de recherche au laboratoire de Virologie du CME- FCB



FONDATION CHANTAL BIYA

Centre Mère et Enfant

YAOUNDE

Yaoundé, le 27 juin 2015

### AUTORISATION DE RECHERCHE

Je soussigné, Directeur du Centre Mère et Enfant de la Fondation Chantal BIYA, autorise **Mademoiselle GHAPOUTSA NKANDI Rahinatou, étudiante en Doctorat /PhD au Centre de Recherche et de Formation Doctorales en Sciences de la Vie, Santé et Environnement de l'Université de Yaoundé I, à effectuer un travail de recherche au Centre Mère et Enfant de la Fondation Chantal BIYA, dont le thème est : «Molecular epidemiology of human and animal Rotavirus infection in the littoral and centre regions of Cameroon».**

Autorisation dûment établie en respect des exigences éthiques.

Le Directeur du Centre Mère et Enfant  
de la Fondation Chantal BIYA



Professeur Paul KOKI NDOMBO



UNIVERSITE DE YAOUNDE I  
FACULTE DE SCIENCES  
DEPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE



UNIVERSITY OF YAOUNDE I  
FACULTY OF SCIENCE  
DEPARTMENT MICROBIOLOGY

Ref : .....

Yaoundé le. 22.10.15.

A  
Dr Mintom Medjo Pierre (Directeur de  
l'Hôpital de district de Deido)

**Objet :** Demande de collaboration et  
d'autorisation de recherche

S/C le Chef de Service du Laboratoire

Docteur,

Mademoiselle **Ghapoutsa Nkandi Rahinatou**, Matricule N° : 06R340, est étudiante régulièrement inscrite en Doctorat / PhD au Centre de Recherche et de Formation Doctorale en Sciences de la Vie, Santé et Environnement de l'Université de Yaoundé I. Dans le cadre de ses travaux de recherche qui portent sur le thème « *Molecular epidemiology of human and animal Rotavirus infection in the Littoral and Centre regions of Cameroon* », elle aura besoin des prélèvements de selles dans le service de pédiatrie de votre institution.

Par la présente, nous sollicitons auprès de vous une autorisation de collecte de ces échantillons dans le service de laboratoire ainsi que la collecte des indications sémiologiques auprès des médecins consultants ou ceux en charge des patients admis dans votre institution. Cette démarche n'entraînera pas de frais supplémentaires. L'étudiante s'engage à respecter les normes de votre institution et toutes les considérations éthiques en rapport avec ce travail.

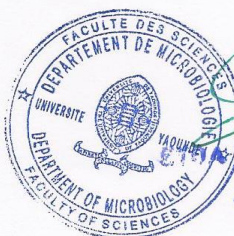
Veuillez trouver ci – joint ;

- Un exemplaire du Projet de Recherche
- Une Attestation de Recherche de la candidate
- Un engagement sur l'honneur de la candidate

Veuillez agréer, Monsieur le Directeur, l'expression de notre parfaite considération.

**Directeur :**

Pr ETOA François - Xavier



FRANÇOIS - XAVIER  
Professeur



24 AVR 2015

Dr. MINTOM MEDJO P.  
Cardiologue



MINISTERE DE LA SANTE PUBLIQUE  
-----  
DELEGATION REGIONALE DU LITTORAL  
-----  
HOPITAL REGIONAL DE NKONGSAMBA  
-----

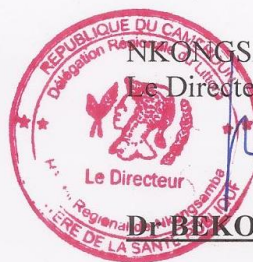
REPUBLIQUE DU CAMEROUN  
Paix – Travail – Patrie  
-----

N° 092/AR/MINSANTE/DRSPL/HR/NBA/15

### AUTORISATION DE RECHERCHE

Je soussigné, **Dr. BEKOULE Patrick Sylvestre**, Directeur de l'Hôpital Régional de NKONGSAMBA, autorise la nommée **GHAPOUTSA NKANDI Rahinatou** étudiante en Doctorat/PhD Biochimie au Centre de Recherche et de Formation Doctorale en Science de la vie, Santé et Environnement de l'Université de YAOUNDE I à effectuer les travaux de recherche dans le dit hôpital sur le thème : « *Molecular epidemiology of human and animal Rotavirus infection in the Littoral an Centre regions of Cameroon* ».

En foi de quoi la dite autorisation est délivrée pour servir et valoir ce que de droit.



NKONGSAMBA, le 15 Mai 2015

Le Directeur,

**Dr. BEKOULE Patrick S.**

REPUBLIQUE DU CAMEROUN  
Paix – Travail – Patrie  
-----  
MINISTERE DE LA SANTE PUBLIQUE  
-----  
DELEGATION REGIONALE DE LA SANTE DU LITTORAL  
-----  
HOPITAL REGIONAL ANNEXE D'EDEA  
-----



REPUBLIC OF CAMEROON  
Peace – Work - Fatherland  
-----  
MINISTRY OF PUBLIC HEALTH  
-----  
REGIONAL DELEGATION FOR THE LITTORAL  
-----  
EDEA REGIONAL HOSPITAL ANNEX  
-----

N° *564/15* /R/MINSANTE/DRSPL/HRE/CM ✓

Edéa, le 07 Juillet 2015

**MONSIEUR LE DIRECTEUR DE L'HOPITAL  
REGIONAL ANNEXE D'EDEA**

**A**

**Mademoiselle GHAPOUTSA NKANDI Rahinatou  
Etudiante en Doctorat/ Biochimie Yaoundé**

Objet : Autorisation de recherche

Mademoiselle,

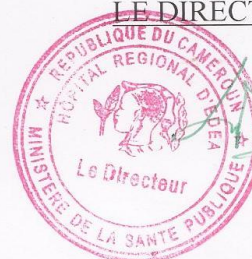
Par la présente, je marque un avis favorable pour votre demande dont l'objet est porté en marge.

Néanmoins, vous voudriez bien vous conformer aux règles de l'établissement et ne prendre aucune initiative sans l'avis d'un responsable de l'institution.

Dans l'intervalle,

Recevez, Mademoiselle, mes salutations distinguées.

LE DIRECTEUR



*Dr. Alfred Louis Richard*  
Agréé des Universités  
ORL et Chirurgie Cervico-Faciale

REPUBLIQUE DU CAMEROUN  
PAIX – TRAVAIL – PATRIE  
MINISTERE DE LA SANTE PUBLIQUE  
DIRECTION HOPITAL LAQUINTINIE

BP 4035 – DOUALA CAMEROUN  
TEL/FAX : (237) 33 42 15 40  
Email : [hopitalaquintinie@yahoo.fr](mailto:hopitalaquintinie@yahoo.fr)



REPUBLIC OF CAMEROON  
PEACE – WORK – FATHERLAND  
MINISTRY OF PUBLIC HEALTH

HEAD OFFICE OF THE  
LAQUINTINIE HOSPITAL  
BOX 4035 – DOUALA CAMEROUN  
TEL/FAX : (237) 33 42 15 40  
Email : [hopitalaquintinie@yahoo.fr](mailto:hopitalaquintinie@yahoo.fr)

N° 4603 /AS/MINSANTE/DHL/CM

## PROLONGATION DE RECHERCHE

Mme **GHAPOUTSA NKANDI RAHIMATOU**, étudiante en Doctorat/PHD Biochimie au Centre de Recherche et de Formation Doctorale en Sciences de la vie, Santé et Environnement de l'Université de Yaoundé I, est autorisée à prolongé sa Recherche de quatre (4) mois pour la période allant du **08 octobre 2015 au 08 février 2015** dans le Département de pédiatrie de l'Hôpital Laquintinie de Douala, sur le thème : <<**MOLECUR EPIDEMIOLOGY OF HUMAN AND ANIMAL ROTAVIRUS INFECTION IN THE LITTORAL AND CENTRE REGIONS OF CAMEROON**>>

Les travaux s'effectueront sous la supervision du **Dr KAYA Alexis**, Pédiatre Pédopsychiatre et Chef de Département, dans le respect du code d'éthique et de déontologie en vigueur à l'Hôpital Laquintinie de Douala.

Toute publication de ce travail devra préserver les intérêts de l'Hôpital et des personnels y ayant participé. Une copie sera transmise au Centre de Documentation pour archivage.

En foi de quoi la Présente Prolongation de Recherche est délivrée pour servir et valoir ce que de droit.

Douala, le **5 OCT 2015**

Le Directeur de l'Hôpital Laquintinie de Douala,

### AMPLIATIONS :

- CM
- SG/SGA
- CSP
- SUPERVISEUR
- MAJOR SCE C CERNE
- INTERESSE(E)
- CHRONO/ARCHIVES.-



**Dr DISSONGO Jean II**

REPUBLIQUE DU CAMEROUN  
PAIX – TRAVAIL – PATRIE  
MINISTERE DE LA SANTE PUBLIQUE  
DIRECTION HOPITAL LAQUINTINIE  
BP 4035 – DOUALA CAMEROUN  
TEL/FAX. : (237) 33 42 15 40  
Email : [hopitalaquintinie@yahoo.fr](mailto:hopitalaquintinie@yahoo.fr)



REPUBLIC OF CAMEROON  
PEACE – WORK – FATHERLAND  
MINISTRY OF PUBLIC HEALTH  
HEAD OFFICE OF THE  
LAQUINTINIE HOSPITAL  
BOX 4035 – DOUALA CAMEROON  
TEL/FAX. : (237) 33 42 15 40  
Email : [hopitalaquintinie@yahoo.fr](mailto:hopitalaquintinie@yahoo.fr)

N° 799 AR/MINSANTE/DHL/CM

## AUTORISATION DE RECHERCHE

Mme **GHAPOUTSA NKANDI Rahinatou**, Etudiante en Doctorat/PhD Biochimie au Centre de Recherche et de Formation Doctorale en Sciences de la vie, Santé et Environnement de l'Université de Yaoundé I, est autorisée à effectuer une recherche de six (06) mois pour la période allant du 1<sup>er</sup> avril au 30 septembre 2015 dans le département de Pédiatrie de l'Hôpital Laquintinie de Douala, sur le thème : «**Molecular epidemiology of human and animal Rotavirus infection in the Littoral and Centre regions of Cameroon**».

Les travaux s'effectueront sous la supervision du **Dr KAYA Alexis**, Pédiatre Pédopsychiatre et chef de département, dans le respect du code d'éthique et de déontologie en vigueur à l'Hôpital Laquintinie de Douala.

Toute publication de ce travail devra préserver les intérêts de l'Hôpital et des personnels y ayant participé. Une copie sera transmise au Centre de Documentation pour archivage.

En foi de quoi la présente Autorisation de Recherche est délivrée pour servir et valoir ce que de droit.

### **AMPLIATIONS :**

- CM
- SG/SGA Secteur
- CSP
- SUPERVISEUR(S)
- INTERESSE(E)
- CHRONO/ARCHIVE

Fait à Douala, le 07 MARS 2015

P. Le Directeur de l'Hôpital Laquintinie de Douala,  
P.O. Le Conseiller Médicale

**Dr MBANGUE Madeleine**

---

**PUBLICATION**

RESEARCH

Open Access



# Detection of diarrhoea associated rotavirus and co-infection with diarrhoeagenic pathogens in the Littoral region of Cameroon using ELISA, RT-PCR and Luminex xTAG GPP assays

Rahinatou N. Ghapoutsa<sup>1</sup>, Maurice Boda<sup>2\*</sup>, Rashi Gautam<sup>3</sup>, Valantine Ngum Ndze<sup>4</sup>, Akongnwi E. Mugyia<sup>5</sup>, Francois-Xavier Etoa<sup>2</sup>, Michael D. Bowen<sup>3</sup> and Mathew D. Esona<sup>3</sup>

## Abstract

**Background:** Despite the global roll-out of rotavirus vaccines (RotaTaq/Rotarix / ROTAVAC/Rotasiil), mortality and morbidity due to group A rotavirus (RVA) remains high in sub-Saharan Africa, causing 104,000 deaths and 600,000 hospitalizations yearly. In Cameroon, Rotarix™ was introduced in March 2014, but, routine laboratory diagnosis of rotavirus infection is not yet a common practice, and vaccine effectiveness studies to determine the impact of vaccine introduction have not been done. Thus, studies examining RVA prevalence post vaccine introduction are needed. The study aim was to determine RVA prevalence in severe diarrhoea cases in Littoral region, Cameroon and investigate the role of other diarrhoeagenic pathogens in RVA-positive cases.

**Methods:** We carried out a study among hospitalized children < 5 years of age, presenting with acute gastroenteritis in selected hospitals of the Littoral region of Cameroon, from May 2015 to April 2016. Diarrheic stool samples and socio-demographic data including immunization and breastfeeding status were collected from these participating children. Samples were screened by ELISA (ProSpec™ Rotavirus) for detection of RVA antigen and by gel-based RT-PCR for detection of the VP6 gene. Co-infection was assessed by multiplexed molecular detection of diarrheal pathogens using the Luminex xTAG GPP assay.

**Results:** The ELISA assay detected RVA antigen in 54.6% (71/130) of specimens, with 45, positive by VP6 RT-PCR and 54, positive using Luminex xTAG GPP. Luminex GPP was able to detect all 45 VP6 RT-PCR positive samples. Co-infections were found in 63.0% (34/54) of Luminex positive RVA infections, with *Shigella* (35.3%; 12/34) and *ETEC* (29.4%; 10/34) detected frequently. Of the 71 ELISA positive RVA cases, 57.8% (41/71) were fully vaccinated, receiving two doses of Rotarix.

\* Correspondence: [bodamaurice@gmail.com](mailto:bodamaurice@gmail.com)

<sup>2</sup>Department of Microbiology, Faculty of Science, The University of Yaoundé 1, Yaoundé, Cameroon

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2021 **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

**Conclusion:** This study provides insight on RVA prevalence in Cameroon, which could be useful for post-vaccine epidemiological studies, highlights higher than expected RVA prevalence in vaccinated children hospitalized for diarrhoea and provides the trend of RVA co-infection with other enteric pathogens. RVA genotyping is needed to determine circulating rotavirus genotypes in Cameroon, including those causing disease in vaccinated children.

**Keywords:** Cameroon, Rotavirus, Childhood diarrhoea, RT-PCR, Co-infection, Rotarix, xTAG GPP

## Background

Diarrhea is the second most common cause of childhood mortality worldwide, with Group A Rotavirus (RVA) recognized as a leading diarrhoeagenic agent, causing 38% of acute diarrhea among children aged five and below worldwide [1, 2]. RVA remains a major cause of diarrhea related deaths among children and infants aged  $\leq 5$  in Sub-Saharan Africa, accounting for 104,000 deaths and 600,000 hospitalizations yearly [3, 4]. The practice of good hygiene helps to limit the transmission of all diarrhoeal pathogens, vaccination remains the most effective method of RVA prevention. The roll-out of four oral vaccines, RotaTeq, Rotarix<sup>®</sup>, ROTAVAC, and Rotasiil, approved and recommended by WHO, has significantly reduced worldwide mortality and morbidity associated with RVA [5]. In the USA and in Canada, the number of RVA-related hospitalizations has decreased significantly, to about 70,000, with no more than 60 deaths per year [6, 7]. Compared to high income countries, alleviating RVA burden in sub-Saharan Africa with an efficacious vaccine is progressing slowly [6, 7]. The poor performance of vaccine may be explained in part by malnutrition, which has a negative impact on immunogenic development [3, 8], or the high level of RVA exposure associated with unhealthy hygienic conditions and contaminated drinking water supplies, or by the possibility that the vaccine used may not effectively protect against circulating strains [3, 8].

Since 2009 in low-income countries, the number of RVA related deaths and morbidity has dropped following the introduction of the RVA vaccines [9–11]. From 2015 to 2016, the prevalence of diarrhea due to RVA decreased from 38.3 to 12.2% in Mozambique and from 50.8 to 29% in Swaziland from 2013 to 2016. In South Africa, the hospitalization rate dropped by one third during the same period [12, 13]. In Togo, the introduction of Rotarix in June 2014 has already shown remarkable results over the past 2 years, with a 53% decrease in RVA related hospitalization [14].

On March 28th, 2014, Cameroon officially introduced Rotarix into its Expanded Program on Immunization (EPI) [15]. During the pre-vaccination period, RVA caused more than 5800 deaths yearly among children under 5 years of age in Cameroon and accounted for 33 to 38.1% of diarrhea-related hospitalizations in this age group [15, 16]. In addition, previous studies in

Cameroon showed the presence of rare genotypes and regional genotypic diversity [17–21]. The circulating strains in many regions of Cameroon including the Littoral, the East and South regions were still unknown both prior to and after vaccine introduction. The aim of this study was to establish an epidemiology update, useful for RVA infection follow up, for evolution and trend study, as well for the initiation of a vaccine impact study. It describes the frequency of RVA infection in the Littoral region of Cameroon among children aged five and under, hospitalized for severe diarrhea, in relation to their RVA vaccination status, co-infection with other enteric pathogens, as well as their feeding mode during the first 6 months of life.

## Methods

### Ethical and administrative considerations

Prior to conducting this study, ethical clearance (N°2016/01/696/CNERSH/SP) and research authorization were obtained from the Littoral regional delegation of Public Health (N°: 1684/AR/MINSANTE/DRSPL/BCASS). A signed informed consent was obtained from the parent or the legal guardian of all the patients sampled. The study protocol conformed to the ethical guidelines of the 1975 declaration of Helsinki was approved by the National Ethics Committee and the Ministry of Public Health of Cameroon.

### Study population, period and sample collection

From May 2015 to April 2016, we carried out a cross-sectional study among hospitalized children under 5 years of age, presenting with acute gastroenteritis in the following hospitals in the Littoral region of Cameroon; the Douala Laquintinie hospital, the district hospitals of Bonassama and Deido, and the regional hospitals of Edéa and Nkongsamba. A diarrheic stool sample was collected from each participating hospitalized child along with socio-demographic information including RVA immunization and breastfeeding status which were obtained from the patient medical record and/or from guardians. The stool specimens were transported in a cooler (4 °C to 8 °C) following recommended standard to the virology laboratory of the Mother and Child Centre of the Chantal Biya's Foundation, Yaoundé, and stored in aliquots of 1.5 mL at - 80 °C until analyzed. Prior to storage, a 10% (v/v) suspension to be used for

total RNA extraction was prepared for each sample using nuclease-free distilled water (Invitrogen™) as diluent, then stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until used.

#### RVA antigen screening by ELISA

RVA detection was done using the ProSpecT™ Rotavirus ELISA kit (Thermo Scientific, Oxoid, UK) following the manufacturer's protocol. All samples and reagents were brought to laboratory temperature before use. A 10% (v/v) dilution of each sample was prepared using the kit provided specimen dilution buffer. The dilution buffer served as a negative control (NC), while known laboratory positive and negative samples served respectively, as additional positive and negative controls.

Supernatants from test samples and controls (100  $\mu\text{L}$ ) were transferred into respective wells of the pre-coated microtiter plate, and the subsequent reaction steps were performed as per protocol [22]. The reading of the results after addition of TMB substrate was first done by visually observing the color change in the wells containing the positive samples and comparing with the NC well. Confirmation of the results was done by spectrophotometric reading at 450 nm after the reaction was stopped with a solution of 0.46 M sulfuric acid. Positive results were confirmed if optical density (OD) value was greater than or equal to negative control OD + 0.2 [22]. Only ELISA positive samples were selected for further downstream tests.

#### Molecular detection of the VP6 gene by RT-PCR

##### Extraction of total viral RNA

RNA extraction of 10% stool suspensions was manually performed using the QIAamp RNA mini spin kit (Qiagen, Hilden, Germany) following the manufacturer's instructions. The eluted RNA extract was stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until used.

##### One step RT-PCR

The extracted RNA was subjected to VP6 gene detection by gel-based RT-PCR [18, 23], (Qiagen, Inc., Valencia, CA, USA) using the primers:

VP6F (nt 747–766) 5' GACGGVGCRACTACATGGT 3' and 21.

74VP6R (nt 1126 to 1106) 5' GTCCAATTCATNCC TGGTGG 3' [24].

RNA sample (4  $\mu\text{L}$ ) was mixed with 3  $\mu\text{L}$  of primer mix (20  $\mu\text{M}$ ) in 0.5 ml PCR tube/well, vortexed and centrifuged at 8000 rpm for 10 s, then denatured at  $97^{\circ}\text{C}$  for 4 min and rapidly cooled for 1 min on ice. The mixture was centrifuged briefly then placed back on ice, and 23  $\mu\text{L}$  of master mix (made of  $\text{H}_2\text{O}$ , 16  $\mu\text{L}$ ; Qiagen One step RT-PCR buffer 5X, 5  $\mu\text{L}$ ; dNTP (10 mM), 1  $\mu\text{L}$ ; Qiagen One step RT-PCR enzyme, 1  $\mu\text{L}$ ) was added in the tube. The reaction was amplified using an ABI 9700

thermocycler under the following conditions:  $42^{\circ}\text{C}$ , 30 min;  $95^{\circ}\text{C}$ , 15 min; and 30 cycles of  $94^{\circ}\text{C}$  30s,  $42^{\circ}\text{C}$  30s,  $72^{\circ}\text{C}$  45s; with a final cycle of 7 min at  $72^{\circ}\text{C}$ , then  $4^{\circ}\text{C}$  on hold [18, 23]. The amplification products were separated on a 2% agarose gel (Invitrogen) containing 10  $\mu\text{L}$  of red gel (Biotium), with a 100 bp marker (Invitrogen), and the bands were visualized using a "Gel Doc TMXR +" illuminator (BIO-RAD).

#### Luminex xTAG GPP assay

Luminex xTAG GPP testing was performed in the Rotavirus Surveillance and Molecular Epidemiology Team Laboratory at the Centers for Disease Control and Prevention (CDC), Atlanta, USA. Total nucleic acid was extracted from 10% suspension (in nuclease free water) of stool samples using the MagMAX™ Total Nucleic Acid Isolation Kit (Ambion Life Technologies) as described previously [25]. MS2 bacteriophage served as internal process control for the extraction process and the purified total nucleic acid extract was tested with the xTAG GPP on MAGPix instrument (Luminex Corporation, Austin, TX) following the manufacturer's instructions for multiplex assay. The targeted gastrointestinal pathogens included *Cryptosporidium* spp., *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, *Campylobacter* spp., *Clostridium difficile* toxin A and B, Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) heat-labile (LT) and heat-stable (ST) toxins, *Escherichia coli* O157, Shiga toxin producing *Escherichia coli* (STEC), *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Vibrio cholerae*, *Yersinia enterocolitica*, Adenovirus 40/41, Norovirus and RVA (<https://www.luminexcorp.com/gastrointestinal-pathogen-panel/>).

#### Statistical analysis

All statistical analysis was performed using SPSS v26.0 software to look for associations between vaccination or breastfeeding and RVA infection. Statistical distributions were compared using the chi-square test, for categorical variables with a confidence interval of 95% and statistical significance was considered at a  $p \leq 0.05$ .

#### Results

From May 2015 to April 2016, diarrheic stool samples were collected from 130 children of both sexes, hospitalized for severe diarrhea in the Littoral region of Cameroon. Seventy-nine, representing 60.8% of these children had received the two doses of Rotarix vaccine, 20% (26/130) were not vaccinated, and 19.2% (25/130) had unknown vaccination status. The ELISA assay detected rotavirus antigen in 54.6% (71/130) of diarrheic stool specimens. There was no statistically significant difference in rotavirus detection among vaccinated (57.8% (41/71) RVA positive versus 64.4% (38/59) RVA negative), non-vaccinated (21.1% (15/71) RVA positive



versus 18.6% (11/59) RVA negative) and unknown vaccination status (21.1% (15/71) RVA positive versus 17.0% (10/59) RVA negative;  $p = 0.786$ ) groups.

All age groups were affected, but children aged 7–12 months were the most affected with 46,5% (33/71) positive cases (Fig. 1). No statistically significant difference was observed in RVA detection among the breastfed (45.1%, 32/71) RVA positive versus 44.1% (26/59) RVA negative) and mixed feeding (54.9% (39/71) RVA positive versus 55.9% (33/59) RVA negative) groups ( $p = 0.76$ ).

ELISA positive samples ( $n = 71$ ) were further subjected to VP6 gene detection by RT-PCR for confirmation. To assess co-infection, we chose the Luminex xTAG GPP assay, which also served as a second confirmation assay for RVA. A summarized in Tables 1, 63.4% (45/71) of cases were RVA positive by RT-PCR and 76.1% (54/71) were RVA positive using the xTAG GPP assay (Table 1).

The results of xTAG GPP assay revealed that 57.0% (31/54) were from Rotarix vaccinated children. The statistical analysis indicated no link between the feeding mode and RVA positivity determined by Luminex xTAG GPP ( $p = 0.864$ ).

The summary of the laboratory results shows that 45 samples were positive by all 3 methods, ELISA, GPP, RT-PCR. Seventeen ELISA positive samples tested negative for RVA with xTAG GPP assay, and 9 ELISA positive samples were RVA positive with xTAG GPP assay and negative VP6 gene by RT-PCR (Table 1).

The number of RVA co-infection with other gastroenteric pathogens was high 63.0% (34/54). We identified 13 co-infection patterns, 8 cases with more than two pathogens (Table 2). *Shigella* was the most frequent coinfecting pathogen 35.3% (12/34), followed by ETEC with 29.4% (10/34). Other co-infecting pathogens included, Adenovirus (20.6%), *Campylobacter* spp. (14.7%), Norovirus GI/GI (11.8%), *Cryptosporidium* (5.8%) and *Salmonella* spp. (5.9%). The GPP test showed 10 cases of infections or co-infections not involving rotavirus and 7 negative samples.

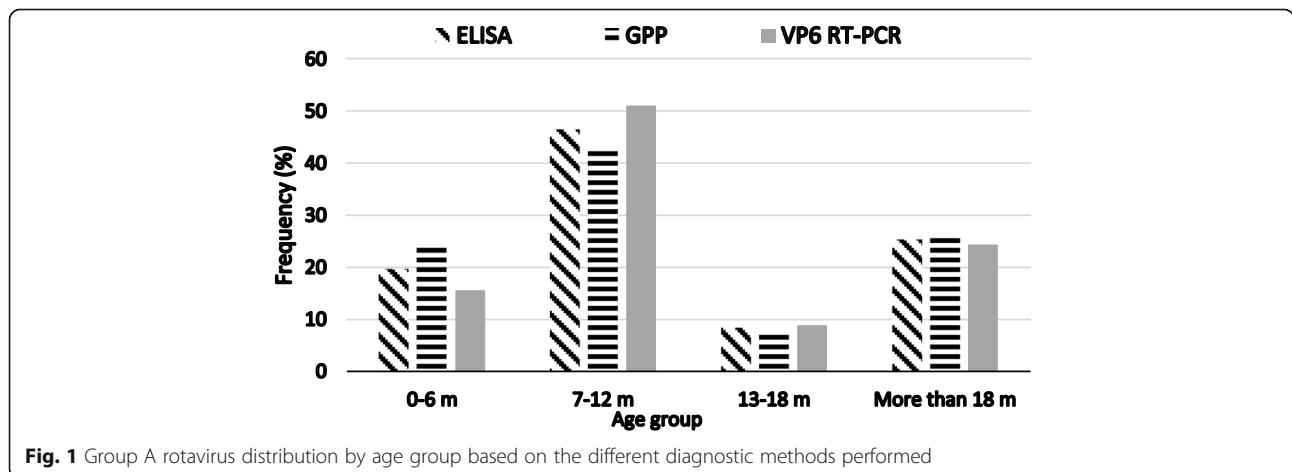
**Table 1** General features of the laboratory results

Test results			Number of cases
ELISA+	GPP+	PCR+	45
ELISA+	GPP+	PCR-	9
ELISA+	GPP-	PCR-	17
<b>Total</b>			71

Key: +: positive; -: negative;

**Discussion**

When Cameroon introduced Rotarix into the EPI [15], no epidemiological data and information on the circulating strains of RVA in the Littoral, the South and the East regions of Cameroon were available. The present study carried out 1 year after introduction of RVA vaccine in Cameroon is the first investigation on RVA infection in the Littoral region. This study provides an update of rotavirus epidemiology in Cameroon and highlights the importance of co-infection with other enteric diarrhoeagenic pathogens in RVA positive cases. Using antigen detection by ELISA, 54.6% of the sampled children tested positive for RVA. This frequency is higher than the global proportion of diarrheal cases attributed to rotavirus, and also higher than the 42.8 and 41.0% RVA prevalence previously obtained in Cameroon in 2012 [23] and in 2014 [21]. A concern is that the previous lower prevalence results by Ndze and his team as well as Boula and collaborators represent RVA prevalence before the introduction of the rotavirus vaccine [21, 23]. Although RVA prevalence during the pre-vaccine and the post-vaccine periods may have remained the same, the absolute number of rotavirus cases and admissions may have declined, and additional data will have to be collected to investigate this finding. The higher ELISA prevalence reported in this study may also be attributed to false positive ELISA results. Ye et al., (2013) observed a discrepancy between ELISA and RT-PCR in Australia, and false positive ELISA reactions were identified as the



**Fig. 1** Group A rotavirus distribution by age group based on the different diagnostic methods performed

**Table 2** Co-infections patterns and the number of occurrences

S/N	Co-infection patterns	Occurrences
1	RVA, Shigella	9
2	RVA, ETEC LT/ST	3
3	RVA, Adenovirus 40/41	6
4	RVA, Campylobacter	3
5	RVA, Norovirus GI/GII	2
6	RVA, Salmonella 1, Salmonella 2	2
7	RVA, Cryptosporidium	1
8	RVA, Campylobacter, ETEC LT/ST	2
9	RVA, Adenovirus 40/41, ETEC LT/ST	1
10	RVA, ETEC LT/ST, Shigella	2
11	RVA, Norovirus GI/GII, Shigella	1
12	RVA, ETEC LT/ST, Cryptosporidium	1
13	RVA, Norovirus GI/GII, ETEC LT/ST	1

cause. They noted that twenty-five samples positive by ELISA were negative for VP6 detection by gel-based RT-PCR [26]. The observed discrepancy might as well result from low viral load in samples, due to additional shipment and freeze-thaw cycles, yet, with enough VP6 protein present to be detected by ELISA. Discrepancies of similar order between ELISA and VP6 RT-PCR were also observed recently by McAuliffe et al. (2018, 2019) in New-Zealand [27, 28].

The GPP results confirmed that 76.1% (54/71) of RVA positive samples detected using ELISA contained RVA. GPP is an automated multiplex nucleic detection acid test with a high sensitivity (95.8%) and specificity (100%) for RVA targets [25]. The GPP is considered the most reliable and sensitive method for RVA screening [29]. However, many African countries use ELISA to screen for RVA and evaluate the progress and impact of the rotavirus vaccine [11, 13, 14]. Further investigations are needed to confirm the impact of ELISA false positive in epidemiological studies.

High prevalence of RVA infection in Cameroon (> 41%) may be partly explained by a number of socio-environmental conditions, including difficult access to potable water, and the poor economic situation of the country, which negatively impact the standard of living and the sanitary conditions, compounded by poor hygiene and malnutrition. In effect, there is a gradient in RVA vaccine effectiveness between high, medium and low-income countries. Vaccine effectiveness is generally better in high income countries and poor in low-income countries [4, 5]. Malnutrition, a poverty related conditions of low-income countries, has been identified as a contributing factor for reduced vaccine effectiveness and has been experimentally proven to impair the adaptive immune response to RVA infection in gnotobiotic piglets [30]. Therefore,

malnutrition may lead to impaired development of protective immune responses following vaccination and increase the susceptibility of the host to RVA infection. In addition, poor sanitary conditions and lack of potable water increase the exposure to other enteric pathogens, a condition known to inhibit immune responses to RVA vaccine [31].

In this study, we found that 63.0% of RVA cases detected were also infected with other enteric pathogens. RVA cases co-infected with other enteric pathogens (*Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, *Plesiomonas shigelloides*, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., Norovirus and Adenovirus) are common among children age less than 5 years in low-income countries [32, 33]. Furthermore, RVA infection predisposes enterocytes to increased adhesion and invasion by other enteric pathogens and the presence of coinfecting pathogens increases RVA replication in the host gut [34]. The co-infection frequency of RVA cases with other enteric pathogens found in this study is about six times (10.3%) that observed in Niger by Langendorf and collaborators in 2015 [35]. Co-infection with *Shigella*, ETEC, Adenovirus and *Campylobacter* are likely to increase the severity of the diarrhea and may cause an increase in diarrheal related deaths among children aged less than 5 years, thus increasing the diarrheal burden [36]. Moreover, the pathogenic processes of co-infecting pathogens can act synergistically to worsen the patient conditions, resulting in a greater burden of the infection [32]. RVA infections decrease nutrient absorption through depletion of enterocytes but does not induce intestinal inflammation. *Shigella* causes inflammatory and invasive diarrhea, while ETEC alters intestinal epithelial integrity [33, 37]. These combined effects may trigger several cellular mechanisms that can exacerbate diarrheal disease.

The main limitations of this study were reduced access to medical records, which increased the number of children with unknown vaccination status, a large number of non-consenting mothers or legal guardians affected enrolment and inability to differentiate between circulating RVA and RVA vaccine strains. Due to limited resources, we could test only ELISA positive samples by GPP and PCR; assay comparison would have been more robust if all the samples were tested by the three methods.

## Conclusions

This study revealed a high prevalence of RVA among vaccinated children admitted to hospital for the treatment of diarrhea, with significant presence of co-infections with other diarrheagenic pathogens. RVA genotyping is needed to determine which genotypes are circulating in the Littoral region of Cameroon, including

those causing disease in vaccinated children. This study, which demonstrates a high percentage of RVA co-infection with other pathogens, suggests the need to carry out expanded studies on RVA co-infections in Cameroon in order to provide appropriate measures for management and control of infectious diarrheal diseases among children below 5 years of age. It is also imperative to assess the impact of Rotarix in the socio-environmental context of Cameroon to identify key factors impairing successful development of adequate protection against RVA.

#### Abbreviations

CDC: Center for disease control and prevention; dNTP: Desoxyribonucleotides triphosphate; ELISA: Enzyme linked immunosorbent assay; EPE: Expanded program on immunization; ETEC: Enterotoxigenic *Escherichia coli*; GPP: Gastrointestinal pathogen panel; NTC: Non-template control; OD: Optical density; RNA: Ribonucleic acid; RT-PCR: Reverse transcriptase-polymerase chain reaction; RVA: Group A rotavirus; STEC: Shiga toxin producing *Escherichia coli*; TMB: Tetramethylbenzidine; WHO: World health organization

#### Acknowledgments

We hereby acknowledge the bench support for this work from CDC-Atlanta through the GRVLB, Rotavirus Surveillance team, Atlanta, USA, and the Mother and Child Centre of the Chantal Biya's Foundation through the Virology Laboratory, Yaounde, Cameroon.

#### Disclaimer

The findings and conclusions in this report are those of the author(s) and do not necessarily represent the official position of the Centers for Disease Control and Prevention. Names of specific vendors, manufacturers, or products are included for public health and informational purposes; inclusion does not imply endorsement of the vendors, manufacturers, or products by the Centers for Disease Control and Prevention or the US Department of Health and Human Services.

#### Authors' contributions

Bench and data analysis: RNG, MB RG. Reagents/materials and analysis tools: MDE, VNN, AEM, RG. Manuscript preparation: RNG, MB MDE. Study designed: MB, MDE, FXE, MDB. Field work activities: RNG, MB. Laboratory work: RNG, MB, MDE, VNN, RG, AEM. Supervision: MB, MDE, MDB, FXE. All the authors read and approved the final manuscript.

#### Funding

This study was partially supported by Cameroon Higher Education Ministry special allowances to support research modernization (Prime spéciale pour la modernization de la recherche universitaire).

#### Availability of data and materials

The datasets used and analyzed during the current study are available from the corresponding author.

#### Declarations

##### Ethics approval and consent to participate

Ethical clearance and research authorization were obtained for this study respectively from the Cameroon National Ethics Committee (N°: 2016/01/696/CNERSH/SP), and the Littoral regional delegation of Public Health (N°: 1684/AR/MINSANTE/DRSPL/BCASS). Parents or legal guardians of sampled patients consented by signing the informed consent form. The study protocol conformed to the ethical guidelines of the 1975 declaration of Helsinki was approved by the National Ethics Committee and the Ministry of Public Health of Cameroon.

##### Consent for publication

Not applicable.

#### Competing interests

No competing interests.

#### Author details

<sup>1</sup>Department of Biochemistry, Faculty of Science, The University of Yaoundé 1, Yaoundé, Cameroon. <sup>2</sup>Department of Microbiology, Faculty of Science, The University of Yaoundé 1, Yaoundé, Cameroon. <sup>3</sup>Division of Viral Diseases, National Center for Immunization and Respiratory Diseases, Centers for Diseases Control and Prevention, Atlanta, Georgia, USA. <sup>4</sup>Faculty of Health Sciences, University of Buea, Buea, Cameroon. <sup>5</sup>Department of Microbiology and Parasitology, Faculty of Science, University of Buea, Buea, Cameroon.

Received: 13 January 2021 Accepted: 14 June 2021

Published online: 28 June 2021

#### References

- Liu L, Johnson HL, Cousens S, Perin J, Scott S, Lawn JE, et al. Global, regional, and national causes of child mortality: an updated systematic analysis for 2010 with time trends since 2000. *Lancet*. 2012;379(9832):2151–61. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)60560-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)60560-1).
- WHO. (World Health Organisation). World health statistics. [http://www.who.int/gho/publications/world\\_health\\_statistics/2013/fr/](http://www.who.int/gho/publications/world_health_statistics/2013/fr/) (2013).
- Tate JE, Burton AH, Boschi-Pinto C, Parashar UD, Agoos M, Serhan F, et al. Global, regional, and national estimates of Rotavirus mortality in children <5 years of age, 2000–2013. *Clin Infect Dis*. 2016;62(Suppl 2):S96–S105 PMID: 27059362/ cid / civ1013.
- Shah MP, Tate JE, Mwenda JM, Steele AD, Parashar UD. Estimated reductions in hospitalizations and deaths from childhood diarrhea following implementation of rotavirus vaccination in Africa. *Exp Rev Vac*. 2017;16(10):987–95.
- Burnett E, Parashar U, Tate J. Rotavirus vaccines: effectiveness, safety, and future directions. *Paediatr Drugs*. 2018;20(3):223–33. <https://doi.org/10.1007/s40272-018-0283-3>.
- Parashar UD, Gibson CJ, Bresee JS, Glass RI. Rotavirus and severe childhood diarrhea. *Emer Infect Dis*. 2006;12(2):304–6. <https://doi.org/10.3201/eid1202.050006>.
- Than VT, Jeong S, Kim W. A systematic review of genetic diversity of human rotavirus circulating in South Korea. *Inf Genet Evol*. 2014;28:462–9. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.08.020>.
- Burnett E, Yen C, Tate JE, Parashar UD. Rotavirus vaccines: current global impact and future perspectives. *Future Virol*. 2016;11(10):699–708. <https://doi.org/10.2217/fvl-2016-0082>.
- Madhi SA, Cunliffe NA, Steele D, Witte D, Kirsten M, Louw C, et al. Effect of human rotavirus vaccine on severe diarrhea in African infants. *New England Journal of Medicine*. 2010;362(4):289–98. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0904797>.
- Magagula NB, Esona MD, Nyaga MM, Karla M, Mphahlele MJ. Whole genome analyses of G1P[8] rotavirus strains from vaccinated and non-vaccinated south african children presenting with diarrhea. *J Med Virol*. 2014;87(1):79–101. <https://doi.org/10.1002/jmv.23971>.
- De Deus N, Chilaúle JJ, Cassocera M, Bambo M, Langa JS, Siteo E, et al. Early impact of rotavirus vaccination in children less than five years of age in Mozambique. *Vaccine*. 2017;36(47):7205–9.
- Msimang VM, Page N, Groome MJ, Moyes J, Cortese MM, Seheri M, et al. Impact of rotavirus vaccine on childhood diarrheal hospitalization after introduction into the South African public immunization program. *Pediatr Infect Dis J*. 2013;32(12):1359–64 35.
- Maphalala G, Phungwayo N, Masona G, Lukhele N, Tsegaye G, Dube N, et al. Early impact of rotavirus vaccine in under 5 year old children hospitalized due to diarrhea, Switzerland. *Vaccine*. 2017;36(47):7210–4.
- Tsolenyau E, Djadou KE, Fiawoo M, Akolly DAE, Mwenda JM, Leshem E, et al. Evidence of the impact of monovalent rotavirus vaccine on childhood acute gastroenteritis hospitalization in Togo. *Vaccine*. 2018;36(47):7185–91.
- PATH : Infection à rotavirus et vaccins préventifs au Cameroun. Disponible à : [http://www.path.org/publications/files/IMM\\_solutions\\_global\\_killer.pdf](http://www.path.org/publications/files/IMM_solutions_global_killer.pdf). 2014 Consulté le 5 février 2015.
- Ndombo PK, Ndze VN, Fokunang C, et al. Pre-vaccine circulating group A rotavirus strains in under 5 years children with acute diarrhea during 1999–2013 in Cameroon. *Virology (Lond)*. 2017;1(4). <https://doi.org/10.15761/VRR.1000120>.

17. Esona MD, Armah GE, Geyer A, Steele AD. Detection of an unusual human rotavirus strain with G5P[8] specificity in a Cameroonian child with diarrhea. *J Clin Microbiol.* 2004;42(1):441–4. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.1.441-444.2004>.
18. Esona MD, Geyer A, Banyai K, Page N, Aminu M, Armah GE, et al. SteeleDA, Glass RI, Gentsch JR. novel human rotavirus genotype G5P[7] from child with diarrhea, Cameroon. *Emerg Infect Dis.* 2009;15(1):83–6. <https://doi.org/10.3201/eid1501.080899>.
19. Esona MD, Steele D, Kerin T, Armah G, Peenze I, Geyer A, et al. Determination of the G and P Types of Previously Nontypeable Rotavirus Strains from the African Rotavirus Network, 1996–2004: Identification of Unusual G types. *J Infect Dis.* 2010;202(Suppl 1):S49–54. <https://doi.org/10.1086/653552> S1.
20. Ndzé VN, Papp H, Achidi EA, Gonsu KH, László B, Farkas S, et al. One year survey of human rotavirus strains suggests the emergence of genotype G12 in Cameroon. *J Med Virol.* 2013;85(8):1485–90. <https://doi.org/10.1002/jmv.23603>.
21. Boula A, Kouomou WD, Kinkela NM, Esona DM, Kemajou G, Mekontso D, Seheri M, Ndzé NV, Emah I, Ela S, Dahl AB, Kobela M, Cavallaro FK, Mballa EAG, Gentsch RJ, Bowen DM and Ndombo KP. Molecular surveillance of rotavirus strains circulating in Yaoundé, Cameroon, September 2007–December 2012. *Infect Genet Evol.* 2014;28: 470–475. DOI.org/<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.08.019>
22. Gautam R, Lyde F, Esona MD, Quaye O, Bowen MD. Comparison of premier™ Rotaclone®, ProSpec™, and RIDASCREEN® rotavirus enzyme immunoassay kits for detection of rotavirus antigen in stool specimens. *J Clin Virol.* 2013;58(1):292–4. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2013.06.022>.
23. Ndzé VN, Akum AE, Kamga GH, Enjema LE, Esona MD, Banyai K, Therese OA. Epidemiology of rotavirus diarrhea in children under 5 years in Northern Cameroon. *Pan Afr Med J.* 2012;11:73. Epub 2012 Apr 17.
24. Iturriza Gómara M, Wong C, Blome S, Desselberger U, Gray J. Molecular characterization of VP6 genes of human rotavirus isolates: correlation of genogroups with subgroups and evidence of independent segregation. *J Virol.* 2002;76(13):6596–601. <https://doi.org/10.1128/jvi.76.13.6596-6601.2002>.
25. Chhabra P, Gregoricus N, Weinberg AG, Halasa N, Chappell J, Hassan F, et al. Comparison of three multiplex gastrointestinal platforms for the detection of gastroenteritis viruses. *J Clin Virol.* 2017;95:66–71. Published online 2017 Sep 1. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2017.08.012>.
26. Ye S, Roczo-Farkas S, Whitley D, Lambert S, Robson J, Heney C, et al. Evidence of false-positive results in a commercially available rotavirus assay in the vaccine era, Australia, 2011 to 2012. *Uro Surveill.* 2013;18(21):1–5.
27. McAuliffe GN, Taylor SL, Drinković D, Roberts SA, Wilson EM, Best EJ. Rotavirus infection in the Auckland region after the implementation of universal infant rotavirus vaccination: impact on hospitalizations and laboratory implications. *Pediatr Infect Dis J.* 2018;37(1):e1–5. <https://doi.org/10.1097/INF.0000000000001706>.
28. McAuliffe GN, Taylor SL, Moore S, Hewitt J, Upton A, Howe AS, et al. Suboptimal performance of rotavirus testing in a vaccinated community population should prompt laboratories to review their rotavirus testing algorithms in response to changes in disease prevalence. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2019;93(3):203–7. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2018.10.003>.
29. Leva A, Eibach D, Krumkamp R, Käsmaier J, Rubbenstroth D, Adu-Sarkodie Y, May J. Diagnostic performance of the Luminex xTAG gastrointestinal pathogens panel to detect rotavirus in Ghanaian children with and without diarrhoea. *Virol J* 13, 132. 2016. <https://doi.org/https://doi.org/10.1186/s12985-016-0588-1>, 1.
30. Fischer DD, Kandasamy S, Paim FC, Langel SN, Alhamo MA, Shao L, et al. Protein malnutrition alters tryptophan and angiotensin-converting enzyme 2 homeostasis and adaptive immune responses in human rotavirus-infected Gnotobiotic pigs with human infant fecal microbiota transplant. *Clin Vaccine Immunol.* 2017;24(8):e00172–17. <https://doi.org/10.1128/CI.00172-17>.
31. Wang H, Moon S, Wang Y, Jiang B. Multiple virus infection alters rotavirus replication and expression of cytokines and toll-like receptors in intestinal epithelial cells. *Virus Res.* 2012;167(1):48–55. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2012.04.001>.
32. Bhavnani D, Goldstick JE, Cevallos W, Trueba G, Eisenberg JNS. Synergistic effects between rotavirus and coinfecting pathogens on diarrheal disease: evidence from a community-based study in northwestern Ecuador. *Am J Epidemiol.* 2012;176(5):387–95. <https://doi.org/10.1093/aje/kws220>.
33. Moyo SJ, Kommedal Ø, Blomberg B, Hanevik K, Tellevik MG, Maselle SY, et al. Comprehensive analysis of prevalence, epidemiologic characteristics, and clinical characteristics of mono-infection and coinfection in diarrheal diseases in children in Tanzania. *Am J Epidemiol.* 2017;186(9):1074–83. <https://doi.org/10.1093/aje/kwx173>.
34. Superti F, Petrone G, Pisani S, Morelli R, Ammendolia MG, Seganti L. Superinfection by listeria monocytogenes of cultured human enterocyte-like cells infected with poliovirus or rotavirus. *Med Microbiol Immunol.* 1996; 185(3):131–7. <https://doi.org/10.1007/s004300050022>.
35. Langendorf C, Le Hello S, Moumouni A, Gouali M, Mamaty A-A, Grais RF, et al. Enteric bacterial pathogens in children with diarrhea in Niger: diversity and antimicrobial resistance. *PLoS One.* 2015;10(3):e0120275. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120275>.
36. Shrivastava AK, Kumar S, Mohakud NK, Suar M, Sahu PS. Multiple etiologies of infectious diarrhea and concurrent infections in a pediatric outpatient-based screening study in Odisha, India. *Gut Pathogens.* 2017;9(1):16. <https://doi.org/10.1186/s13099-017-0166-0>.
37. Hodges K, Gill R. Infectious diarrhea: cellular and molecular mechanisms. *Gut Microbes.* 2010;1(1):4–21. <https://doi.org/10.4161/gmic.1.1.11036>.

## Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

**Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:**

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

**At BMC, research is always in progress.**

Learn more [biomedcentral.com/submissions](https://biomedcentral.com/submissions)

