

CENTRE DES ETUDES DOCTORALES DES SCIENCES
DE LA VIE ET DE LA SANTE
Formation Doctorale : Biologie médicale, Pathologie humaine
et Expérimentale et Environnement

THESE DE DOCTORAT

**Analyse génétique du rotavirus groupe A isolé chez l'Homme, les bovins et les caprins au Maroc prouve l'émergence de nouveaux génotypes humains :
Preuves de transmission inter espèces des gènes du rotavirus**

Présentée et soutenue publiquement le 31/12/2021

Par

Sanaâ ALAOUI AMINE

MEMBRES DE JURY

Pr. Nadia TOUIL

PES, Ecole Royale des Sciences de Santé Militaire de Rabat

Présidente

Pr. Elmostafa EL FAHIME

PES, Faculté de Médecine et de Pharmacie, Université Mohammed V de Rabat

Directeur de thèse

Pr. Mostapha EL OUANNAS

PES, Faculté de Médecine et de Pharmacie, Université Mohammed V de Rabat

Pr. Khalid ENNIBI

Professeur Agrégé en Médecine Interne, Faculté de Médecine et de Pharmacie, Université Mohammed V de Rabat

Pr. Mohamed BELLAOUI

PES, Faculté de Médecine et de Pharmacie, Université Mohammed Premier D'Oujda

Juges

Pr. Hassan AGUENAOU

PES, Faculté des Sciences, Université Ibn Toufail de Kénitra



Dédicace

*À mes chers parents,
Ma chère sœur, mon frère adoré
Et à tous mes amis,*

Bien entourée, le chemin paraît moins long.



Remerciements

A l'issue de la rédaction de ce manuscrit, je suis convaincue que la thèse est loin d'être un travail solitaire. En effet, je n'aurais jamais pu réaliser ce travail doctoral sans le soutien d'un grand nombre de personnes dont la générosité, la bonne humeur et l'intérêt manifestés à l'égard de ma recherche m'ont permis de progresser dans cette phase délicate de « *l'apprenti-chercheur*».

Je tiens à remercier dans un premier temps, les membres de mon jury de thèse qui m'ont fait l'honneur d'évaluer mon manuscrit. Je remercie donc Pr. **AGUENAOU Hassan**, Pr. **EL OUANNAS Mostapha** et Pr. **BELLAOUI Mohamed** d'avoir accepté d'être rapporteurs et Pr. **ENNIBI Khalid** en tant qu'examineur.

Mes remerciements chaleureux au Pr. **TOUIL Nadia** qui malgré ses contraintes professionnelles et son agenda très chargé me fait l'honneur d'accepter d'être la présidente de jury. Je la remercie aussi pour son rôle facilitateur dans ce travail. Je lui suis également reconnaissante pour sa franchise et sa sympathie.

Je tiens à remercier mon directeur de thèse, Pr. **EL FAHIME Elmostafa**, de m'avoir fourni les moyens nécessaires au bon déroulement du présent travail, de la confiance qu'il m'a accordée tout au long du projet, de son encadrement tout en me laissant évoluer librement dans mes recherches, de sa patience et de son aide pour la correction de ce rapport.

Bien sûr, atteindre ces objectifs n'aurait pas été possible sans l'aide des membres de l'équipe de la plateforme Biologie relevant des Unités d'Appui Technique à la Recherche Scientifique au sein du CNRST. Je souhaite notamment remercier **MELLOUL Marouane** et **EL ALAOUI Moulay Abdelaziz** pour leur implication dans mes travaux, leurs conseils avisés et leur aide précieuse et leur disponibilité. J'ai eu beaucoup de plaisir à travailler avec eux. Le cadre de travail était idéal.

Remerciements

Mes remerciements s'adressent également à Madame **LOUTFI Chafiqa** de la société de Production Biologique et Pharmaceutiques Vétérinaires BIOPHARMA, département de virologie, pour son aide précieuse dans la partie de mon travail se rapportant à l'infection expérimentale de la chèvre, pour sa disponibilité et son enthousiasme.

J'associe également à ces remerciements le docteur vétérinaire **FELLAHI Siham** pour son aide précieuse au cours de l'échantillonnage dans la région de Bouaarfa.

J'exprime ma gratitude à tous les amis - chercheurs pour leurs multiples conseils et pour leur soutien affectif sans faille, je cite notamment **Hassan, Fatima Zahra, Oumaima, Sara, Bahia, Taha, Mouhcine et Safaa.**

Enfin, je ne terminerai pas ces remerciements sans quelques mots pour mes proches, ce travail est aussi en partie le vôtre et je suis fière de le partager avec vous, merci.



Principales publications et communications réalisées dans le cadre de ce travail	11
Résumé	14
ملخص	15
Abstract	16
Liste des abreviations	17
Liste des figures	20
Liste des tableaux	22
Liste des annexes	24
Introduction générale	27
Chapitre I : Généralités sur le rotavirus	34
1. Introduction	34
2. Historique	34
3. La particule virale	35
3.1. Propriétés physico-chimiques	35
3.2. Composition	36
3.3. Structure de la particule virale	37
3.3.1 Structure à basse résolution	37
3.3.2 Les pseudo-particules virales	39
3.3.3 Modèle atomique de la particule virale	40
3.4. Les protéines virales	41
3.4.1 Les protéines structurales	43
3.4.2 Les protéines non structurales	49
3.5. Le cycle de réplication du rotavirus	54
3.5.1 Entrée du virus	55

3.5.2	Clivage de la protéine VP4	56
3.5.3	Attachement cellulaire	56
3.5.4	Translocation des particules virales dans le cytoplasme	59
3.5.5	Décapage (uncoating)	61
3.5.6	Synthèse de l'ARN(m) viral et sa traduction	61
3.5.7	Formation de viroplasma	63
3.5.8	RNA packaging et formation de DLP	63
3.5.9	Maturation et libération de particules virales (virion)	64
3.5.10	Infection récurrente au rotavirus	65
3.5.11	Croissance du rotavirus dans les organoïdes des cellules souches	65
3.5.12	Protéines cellulaires impliquées dans la réplication du rotavirus	65
4.	Classification du rotavirus	66
5.	Diversité génétique du rotavirus	68
5.1.	Les mutations ponctuelles	69
5.2.	Les réarrangements génétiques	70
5.3.	Les réassortiments génétiques	71
6.	Symptômes cliniques, pathogénie et traitement	74
7.	Réponse immunitaire	76
8.	Diagnostic	77
9.	Épidémiologie du rotavirus	79
9.1.	Transmission	80
9.2.	Prévalence des génotypes de rotavirus du groupe A	80

Chapitre II : Vaccins antirotavirus	83
1. Généralités	83
2. Vaccins anti-rotavirus commerciaux	84
3. Efficacité des vaccins anti-rotavirus	85
4. Vaccination anti-rotavirus au Maroc	86
Chapitre III : Transmission inter espèces du rotavirus ou caractère zoonotique du rotavirus	89
1. Généralités	89
2. Transmission inter espèces humain-félin- canin	90
3. Transmission inter espèces humain-bovin	91
4. Transmission inter espèces humain-porcin	93
5. Analyse phylogénétique: la parenté interspécifique et l'évolution des rotavirus	93
5.1. Gènes structurales	94
5.2. Gènes non structurales	94
Travaux de thèse	
Partie I : Analyse complète du génome du premier rotavirus humain G8P[14]. La souche du Maroc suggère des preuves de transmission zoonotique	98
1. Objectif de l'étude	98
2. Echantillon de l'étude et caractérisation initiale	98
3. Séquençage complet du génome de la souche ma31	100
3.1. Isolement du rotavirus et extraction de l'ADN viral	100
3.2. Reverse transcription et amplification du génome entier (RT-PCR)	101
3.3. Séquençage capillaire	103
3.4. Analyse phylogénétique	107

4.	Résultats	107
4.1.	Comparaison des constellations	108
4.2.	Analyse phylogénétique	110
4.3.	Régions hypervariables VP8*, VP7 et VP6	116
5.	Discussions	120
6.	Conclusion	123
7.	Publication	124

Partie II : Preuves de transmission zoonotique du rotavirus groupe A à partir de chèvres et de bovins dans des troupeaux nomades au Maroc, 2012-2014 136

1.	Objectif de l'étude	136
2.	Zone de l'étude et population	136
3.	Echantillonnage	137
4.	Détection du RVA	137
4.1.	Extraction de l'ARN viral	137
4.2.	RT-PCR et séquençage partiel des gènes VP7 et VP4	137
4.3.	Attribution des génotypes	138
5.	Séquençage complet du génome de la souche bovine (S18) et de la souche caprine (S19)	140
5.1.	Amplification du génome complet	140
5.2.	Séquençage capillaire	140
5.3.	Analyse phylogénétique et soumission des séquences	141
6.	Résultats	142
6.1.	Caractérisation des génotypes des souches de RVA circulant dans la région de Bouaarfa	142
6.2.	Séquençage nucléotidique et génotypage complet des souches S18 et S19	143
6.3.	Comparaison des constellations	143

6.4.	Analyse phylogénétique	145
7.	Discussions	153
8.	Conclusion	155
9.	Publication	156
Partie III : Infection expérimentale d'une chèvre alpine par la souche humaine ma31		170
1.	Objectif	170
2.	Modèle animal	170
3.	Infection expérimentale (lieu de l'infection)	171
4.	Résultats et discussion	173
5.	Publication	176
Conclusion générale et recommandations		179
Références Bibliographiques		183
Annexes		215

**PRINCIPALES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS REALISEES DANS LE
CADRE DE CE TRAVAIL**

- 1. Alaoui Amine S, Melloul M, El Alaoui MA, Touil N, El Fahime E. Full-length genome analysis of the first human G8P[14] rotavirus strain from Morocco suggests evidence of zoonotic transmission. *Virus Genes*. 2019; 55(4):465-478, DOI: 10.1007/s11262-019-01677-9. Epub 2019 Jun 13. PMID: 31197545.**
- 2. Alaoui Amine S, Melloul M, El Alaoui MA, Touil N, El Fahime E. Evidence for zoonotic transmission of species A rotavirus from goat and cattle in nomadic herds in Morocco, 2012–2014. *Virus Genes*. 2020; 56, 582–593, DOI: 10.1007/s11262-020-01778.**
- 3. Boulahyaoui H, Alaoui Amine S, Melloul M, Loutfi C, Tagajdid R, El Annaz H, Touil N, Singh Malik Y, El Fahime E & Mrani S. Molecular characterization of G2P[4] and G9P[8] rotaviruses strains isolated from Moroccan children fully vaccinated with Rotarix™ between 2013 and 2014. *Alexandria Journal of Medicine*. 2019; 55:1, 7-14, DOI: 10.1080/20905068.2019.1592887.**
- 4. Alaoui Amine S, El Fahime E, Mrani S. Transmission inter espèces du rotavirus groupe A au Maroc. *Esperance Médicale*. 2015 ; Tome 22-N°213.**

COMMUNICATIONS ORALES

1. **Alaoui Amine S**, Kaplon J, Melloul M, Ambert-Ballay K , Loutfi C, El Fahime Elm, Touil N, Pothier P.

"Partial genomic analyses of Moroccan caprine rotavirus strains provide evidence for interspecies transmission".

The 6th European Rotavirus Biology Meeting (ERBM) Dijon, France, May 17 to May 20, **2015**.

2. **Amine Alaoui S**, Tagjdid R, Loutfi C, Melloul M, El Alaoui MA, Touil N, El Fahim M.

« Evidence for Replication of an Unusual G8P[14] Human Rotavirus Strain in the Feces of an Alpine Goat: Zoonotic Transmission from Caprine Species". Vol: 9 International Journal of World Academy of Science, Engineering and Technology, Jeddah, **2015**.

3. Boulahyaoui H, **Alaoui Amine S**, Loutfi C, El Annaz H, Touil N, El Fahime E, Mrani S **"Genotyping of G/P No Typable Group a Rotavirus Strains Revealed G2 and G9 Genotype Circulations in Moroccan Children Fully Vaccinated with Rotarix™"**. Vol: 9 International Journal of World Academy of Science, Engineering and Technology, Jeddah, **2015**.

4. Touil N, El Fahim M, **Amine Alaoui S**, Sebbar G, Singh Malik Y, Sayed Abdel-Moneim A, El Ouannass M, Keil G. **"Efficient Groupe A Rotavirus VP6 protein expression in a Mammalian cell line using a BacMam Platform"**.

6TH European Expert Meeting on Rotavirus Vaccination joint with 8TH European Rotavirus Biology Meeting, 23-25 April 2019, Riga, Latvia.

COMMUNICATIONS AFFICHEES

1. **Alaoui Amine S**, Kaplon J, Melloul M, Ambert- Ballay K, Loutfi C, Mrani S, Touil N, El fahime E, Pothier P.

« Le Sequençage Genomique des Rotavirus Caprins Semble Prouver Leur Potentiel Zoonotic au Maroc. »

Forum Afrique Global Santé : Casablanca, Maroc, du 9 au 12 Avril 2015.

2. **Alaoui Amine S**, Melloul M, El Alaoui MA, Touil N, El Fahime E.

« Circulation of G6, G8, G10 and P[14] rotavirus genotypes and in dairy goat kids: Bouaarfa, Morocco ».

6TH European Expert Meeting on Rotavirus Vaccination joint with 8TH European Rotavirus Biology Meeting, 23-25 April 2019, Riga, Latvia

Analyse génétique du rotavirus groupe A isolés chez l'Homme, les bovins et les caprins au Maroc prouve l'émergence de nouveaux génotypes humains : Preuves de transmission inter espèces des gènes du rotavirus

Mots-clés : Rotavirus groupe A, Analyse phylogénétique, Réassortiment, Transmission inter espèces, Population nomade Marocaine.

Sanaâ ALAOUI AMINE

RESUME

Le rotavirus est l'agent pathogène le plus fréquent des gastro-entérites de l'enfant de moins de 2 ans dans le monde, il est également responsable d'une morbidité et d'une mortalité importante chez les jeunes animaux d'espèces différentes.

Les rotavirus sont généralement spécifiques à une espèce, mais la transmission inter-espèces est possible. La surveillance des rotavirus en circulation dans la population humaine a révélé la présence de plusieurs génotypes peu communs.

C'est dans ce contexte que le présent travail fourni, pour la première fois, d'une part des données génétiques sur le génome complet de trois souches marocaines de rotavirus groupe A (RVA) d'origine animale et humaine avec établissement de leur constellation complète et leur phylogénie moléculaire. D'autre part, ce travail examine le potentiel de transmission zoonotique des rotavirus dans une perspective marocaine.

La première partie de ce travail rapporte le séquençage complet du génome d'une souche inhabituelle Marocaine (ma31). L'analyse a révélé la constellation G8-P[14]-I2-R2-C2-M2-A11-N2-T6-E2-H3, présente chez d'autres souches zoonotiques. L'analyse phylogénétique révèle une configuration génétique mixte provenant d'animaux et d'humains, ainsi que son potentiel zoonotique de transmission.

La deuxième partie consiste à identifier le RVA chez des chèvres et des veaux de nomades lors de deux épidémies de diarrhée sévère survenues en 2012 et 2014 à Bouaarfa. La caractérisation de la constellation génomique complète de deux souches bovines et caprines (S18 et S19) a permis d'établir leur parenté génétique avec la souche humaine Marocaine ma31. L'analyse phylogénétique a révélé une similarité partagée avec des souches d'origine animale et humaine. Nos résultats ont révélé des cas de transmission zoonotique et confirmé le risque d'émergence de nouveaux génotypes dans les régions nomades.

التحليل الجيني لمجموعة الروتفيروس أ المستخرجة من البشر والماشية والماعز في المغرب يثبت ظهور نماذج جينية بشرية جديدة: دليل على انتقال جينات الروتفيروس بين الأنواع

الكلمات المفتاحية : الروتفيروس مجموعة أ، التحليل الجيني، إعادة الفرز، الانتقال بين الأنواع، السكان الرحل المغربية.

سناء العلوي الأمين

ملخص

الروتفيروس هو العامل الممرض الأكثر شيوعا لالتهاب المعدة والأمعاء لدى الأطفال دون سن الثانية من العمر في جميع أنحاء العالم ، كما أنه مسؤول عن نسبة انتشار المرض والوفيات الكبيرة بين صغار الحيوانات من مختلف الأنواع. الروتفيروسات عادة ما تكون خاصة بنوع واحد لكن انتقالها بين الأنواع ممكن. وكشفت المراقبة للروتفيروسات المنتشرة بين السكان عن وجود عدة أنماط جينية غير شائعة.

وفي هذا السياق قدم هذا العمل ولأول مرة من ناحية، البيانات الجينية عن الجينوم الكامل لثلاث سلالات مغربية من المجموعة أ من الروتفيروس أ من أصل حيواني وبشري مع إنشاء كوكبتها الكاملة وعلم وراثتها الجيني. ومن ناحية أخرى، يدرس هذا العمل إمكانية انتقال الروتفيروسات الحيوانية المنشأ من منظور مغربي.

يقدم الجزء الأول من هذا العمل التسلسل الكامل لجينوم سلالة مغربية غير عادية حيث كشف التحليل عن كوكبة موجودة في سلالات أخرى حيوانية المنشأ، كما يكشف التحليل الجيني عن تكوين وراثي مختلط من الحيوانات والبشر فضلا عن قدرته الحيوانية المنشأ على الانتقال.

الجزء الثاني من العمل يتمحور حول تحديد نمط الروتفيروسات الموجودة عند الماعز والعجول البدوية خلال جائحتين تسببتا عند هذه الحيوانات في إسهال شديد عامي 2012 و2014 في منطقة بوعرفة. حيث تم توصيف الكوكبة الجينومية الكاملة لسلالتين وتم استخراجهما من الماعز والبقر. مما جعل من الممكن إنشاء قرابتهما الجينية مع السلالة البشرية. كما ان التحليل الجيني لهذه الأخيرة كشف عن تشابه مشترك مع سلالات أخرى من أصل حيواني وبشري.

إن نتائج هذه الدراسة كشفت عن حالات انتقال العدوى حيوانية المنشأ، وأكدت خطر ظهور أنماط جينية جديدة في مناطق السكان الرحل، وبالتالي هناك حاجة ملحة الى وضع :

- استراتيجية للترصد الوبائي المستمر في الطب البشري والبيطري في المغرب من خلال إنشاء نظام ترصد الروتفيروسات المتداولة،
- الرصد الدائم للأنماط الجينية،
- توسيع نطاق ترصد عدوى الروتفيروس عند الحيوانات الأليفة

Genetic analysis of rotavirus group A isolated from humans, cattle and goats in Morocco provides evidence for the emergence of new human genotypes: Evidence for interspecies transmission of rotavirus genes

Keywords: Rotavirus group A, Phylogenetic analysis, Reassortment, Inter-species transmission, Moroccan nomadic population.

Sanaâ ALAOUI AMINE

Abstract

Rotavirus is the most common pathogen of gastroenteritis in children under 2 years of age worldwide and is also responsible for significant morbidity and mortality in young animals of different species. Rotaviruses are generally specie specific, but interspecies transmission is possible. Surveillance of circulating rotaviruses in the human population has revealed the presence of several uncommon genotypes.

It is in this context that the present work provides, for the first time, genetic data on the complete genome of three Moroccan strains of rotavirus group A (RVA) of animal and human origin with the establishment of their complete constellation and their molecular phylogeny. On the other hand, this work examines the zoonotic transmission potential of rotaviruses in a Moroccan perspective.

The first part of this work reports the complete genome sequencing of an unusual Moroccan strain (ma31). The analysis revealed the constellation G8-P[14]-I2-R2-C2-M2-A11-N2-T6-E2-H3, present in other zoonotic strains. Phylogenetic analysis reveals a mixed genetic configuration from animals and humans, as well as its zoonotic potential for transmission.

The second part consists in identifying the RVA in nomadic goats and calves during two severe diarrhoea epidemics in 2012 and 2014 in Bouaarfa. Characterisation of the complete genomic constellation of two bovine and caprine strains (S18 and S19) allowed us to establish their genetic relationship with the human Moroccan strain ma31. Phylogenetic analysis revealed a shared similarity with strains of animal and human origin. Our results revealed cases of zoonotic transmission and confirmed the risk of emergence of new genotypes in nomadic regions, hence the need to implement:

- + Ongoing epidemiosurveillance in human and veterinary medicine in Morocco through the creation
 - of a surveillance system for circulating rotaviruses,
- + Permanent monitoring of genotypes
- + Extending the surveillance of rotavirus infections to domestic animals.

Aa	: Acide aminée
A260	: Absorbance à 260
A280	: Absorbance à 280
ADNc	: Acide désoxyribonucléique complémentaire
AMPc	: Adénosine Monophosphate cyclique
ARN	: Acide Ribonucléique
ARNdb	: Acide ribonucléique double brin
ARNm	: Acide Ribonucléique messenger
ATPase	: Adénosine Triphosphatase
Caco2	: Human Colorectal Adenocarcinoma Cells.
CHO	: Chinese hamster ovary
CT	: Complexe de transcription
Ct	: Cycle threshold
DLP	: Double layer virus particle
ddNTPs	: Didésoxyribonucléotide triphosphate
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle Medium
dNTPs	: Désoxyribonucléoside triphosphate
DO	: Densité optique
DPI	: Days Post Infection
dsRNA	: Double stranded Ribonucleic Acid
ECP	: Effet cytopathique
EDIM	: Epizootic Diarrhea Infant Mice
EDTA	: Éthylènediaminetétraacétique
EE	: l'entéropathie environnementale
EGTA	: ethylene glycol-bis(β -aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid
eIF4GI	: Eukaryotic Initiation Factor 4 Gamma I
ELISA	: Enzyme-linked immunosorbent assay,
EM	: Electron microscopy
G	: Glycoprotéine
GAVI	: Alliance Globale pour les Vaccins et l'Immunisation

GEA	: Gastroentérites aiguës
GPR	: Gene to protein to reaction
GTPase	: Guanosine triphosphatase
Hsc 70	: Heat shock cognate 71 kDa protein
IFN	: Interféron
IgA	: Immunoglobulines A
IgG	: Immunoglobulines G
IgM	: Immunoglobulines M
IP	: Intra péritonéal
IP3	: Inositol Trisphosphate 3
IRF	: Interferon Regulatory Factor
LA	: Latex agglutination test
MA104	: Monkey African 104
MEGA 6	: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0
Muscle	: Multiple Sequence Comparison by Log- Expectation
NA	: Neuraminidase
nar3	: neuraminidase-resistant 3
NCBI	: National Center of Biotechnology Information
NCDV	: Nebraska Calf Diarrhea Virus
NSP	: Non Structural Protein
OMS	: Organisation Mondiale de la Santé
ORF	: Open Reading Frame
ORT	: Oral Rehydration Therapy
P	: Sensitive Protein
PABP	: Poly A Binding Protein
PAGE	: Polyacrylamide gel electrophoresis
PBS	: Phosphate-buffered saline
PCR	: Polymerase Chain Reaction
PIF	: Post Infection
PNI	: Programme National d'Immunsation

RCWG	: Rotavirus Classification Working Group
RdRp	: ARN polymérase ARN-dépendante
RE	: Réticulum Endoplasmique
RoXaN 62	: Rotavirus X-associated Non-structural 62 protein
RRV	: Rhesus rotavirus
RT-PCR	: Reverse transcriptase PCR
RV	: Rotavirus
RVA	: Rotavirus groupe A
SA11	: Simian Agent 11
siRNA	: Small interfering RNA
SLP	: Single layer virus particle
ssRNA	: single stranded Ribonucleic Acid
TAE	: Tris Acétate EDTA
TCID	: Median Tissue Culture Infectious Dose
TLP	: Triple layer virus particle
TPCK-Trypsine	: L- (1-tosylamido-2-phenyl) ethyl chloromethyl ketone - Trypsine
UV	: Ultra violet
VLP	: Virus-like Particle
VP	: Viral Protein
VPO	: Vaccin Poliomyélite
Zn	: Zinc

- Figure 1** : Aperçu de la particule de rotavirus.
- Figure 2** : Reconstruction à basse résolution de la structure tridimensionnelle de la particule virale à partir d'images de cryo-microscopie électronique
- Figure 3** : Structure tridimensionnelle des pseudo-particules virales VLP2/6 à une résolution de 22 Å
- Figure 4** : Vue d'un canal de type II découpé lors de la reconstruction en cryo-microscopie électronique de la particule virale complète
- Figure 5** : Structure de la protéine VP2 déterminée par cristallographie avec une résolution de 3,8 Å
- Figure 6** : Représentation schématique du réarrangement structural de VP4 avant l'entrée du virus
- Figure 7** : Le cycle de réplication des rotavirus adapté de Sadiq et al. 2018
- Figure 8** : Modèle illustrant les premières étapes d'interaction du rotavirus avec les différents récepteurs de la cellule hôte (d'après Lopez et al., 2006)
- Figure 9** : Modèle issu de la reconstruction par cryo-microscopie électronique de la transcription des DLP
- Figure 10** : Mécanismes génétiques de la diversité du virus
- Figure 11** : Mécanismes de la diarrhée induite par les rotavirus
- Figure 12** : Dosage et contrôle de la qualité de l'échantillon d'ARN ma31 extrait avec le kit QIAamp Viral RNA Mini Kit
- Figure 13** : Photo de gel des produits PCR (14 produits PCR) du gène VP3 de la souche ma31

- Figure 14** : Electrophoregramme du gène VP7 de la souche ma31 après séquençage capillaire
- Figure 15** : Arbres phylogénétiques basés sur les séquences nucléotidiques complètes des 11 segments de gènes de RVA
- Figure 16** : Alignement des résidus antigéniques des quatre régions antigéniques VP8* (VP4) entre la souche ma31, les souches vaccinales Rotarix™ et RotaTeq™, et les souches pertinentes sélectionnées dans l'arbre phylogénétique VP4
- Figure 17** : Alignement des résidus antigéniques dans les trois régions antigéniques VP7 entre la souche ma31, les souches vaccinales Rotarix™ et RotaTeq™, et les souches pertinentes sélectionnées dans l'arbre phylogénétique VP7
- Figure 18** : Alignement des résidus antigéniques au niveau des quatre régions antigéniques VP6 entre la souche ma31, les souches vaccinales Rotarix™ et RotaTeq™, et les souches pertinentes sélectionnées dans l'arbre VP6
- Figure 19** : Arbres phylogénétiques construits à partir des séquences nucléotidiques complètes des 11 segments de gènes RVA de la souche caprine RVA/Goat-wt/MAR/S19/ 2012/G10P[14] et de la souche bovine RVA/Calf-wt/MAR/S18/2012/G6P[14]
- Figure 20** : Analyse des épitopes antigéniques VP8* (VP4) des souches S18 et S19 avec des souches P[14] sélectionnées. Les souches marocaines sont indiquées en gras.
- Figure 21** : Photo du chevreau dans le box avant inoculation
- Figure 22** : Photo du chevreau au cours de l'inoculation par voie orale et IP
- Figure 23** : Suivi post infection du chevreau après inoculation

Tableau 1 : Protéines structurales (VP) et non-structurales (NSP) du rotavirus, Tableau adapté de Desselberger et al. 2014

Tableau 2 : Les géotypes des rotavirus groupe A (actualisé à partir de Matthijnssens et al. 2008)

Tableau 3 : Amorces utilisées dans le séquençage partiel de la souche ma31

Tableau 4 : Mélange réactionnel utilisé lors de la réaction de séquence

Tableau 5 : Programme de la réaction de séquence

Tableau 6 : Comparaison des constellations génomiques complètes de la souche humaine RVA/Human-tc/MAR/ma31/2011/G8P [14], certaines souches de RVA animales et des souches de RVA humaines de type bovin-like

Tableau 7 : Identités des séquences nucléotidiques de la souche RVA/Human-tc/MAR/ma31/2011/G8P[14] par rapport aux souches étroitement apparentées dans la base de donnée GenBank

Tableau 8 : Recueil de données à partir de 30 échantillons fécaux collectés en 2012 et 2014 à Bouaarfa, dans la partie orientale du Maroc.

Tableau 9 : Numéros d'accès GenBank des 11 segments de gènes de rotavirus des souches S18 et S19 entièrement séquencés dans cette étude

Tableau 10 : Comparaison de la constellation du génome entier des souches étudiées S18 et S19 avec d'autres RVA de type bovine-like, humain et certaines souches de RVA animales

Tableau 11 : Pourcentage d'identités des séquences de nucléotides les plus étroitement liés des souches de rotavirus répertoriées dans GenBank comparées aux 2 souches bovine (S18) et caprine (S19)

Tableau 12 : Récapitulatif du protocole expérimental

Tableau 13 : Résultats du suivi clinique et virologique après l'infection expérimentale

Annexe I : Test immunochromatographique rapide pour la détection qualitative du rotavirus et de l'adénovirus dans les selles

Annexe II : Protocole d'extraction de l'ARN viral par le kit « QIAamp Viral RNA Mini Kit »

Annexe III : Les amorces utilisées pour amplifier les 11 segments du génome de la souche ma31

Annexe IV : Protocole du Kit « MyFi Mix » utilisé pour l'amplification des 11 segments de la souche ma31

Annexe V : Protocole de purification des produits PCR par le kit de purification ExoSAP-IT

Annexe VI : Les amorces utilisées pour le séquençage des 11 segments du génome de la souche ma31

Annexe VII : Purification des produits de la réaction de séquence par gel-filtration sur résine Sephadex® G-50 Super fine

Annexe VIII : Valeurs seuils du pourcentage d'identité des nucléotides définissant les génotypes pour les 11 segments de gènes de rotavirus

Annexe IX : Dosage des ARN extraits à partir des selles collectées en 2012 et 2014 à Bouaarfa

Annexe X : Les amorces utilisées pour amplifier les 11 segments du génome des souches S18 et S19

Annexe XI : Les amorces utilisées pour le séquençage des 11 segments du génome des souches S18 et S19

Annexe XII : Calcul du pourcentage de la nouvelle séquence pour chaque gène sur la base de la longueur nucléotidique des amorces utilisées en séquençage et la longueur du gène respectif obtenu

Introduction générale

Introduction générale

Le rotavirus groupe A (RVA), agent de diarrhées infectieuses d'origine virale engendre des pertes économiques considérables aussi bien dans le secteur agronomique que dans celui de la santé. Il est le principal agent viral mis en cause dans les gastro-entérites (GEA) infantiles et est ainsi à l'origine d'un véritable problème de santé publique, car responsable de milliers de décès et d'hospitalisations chaque année dans le monde. De plus, il représente la grande majorité des étiologies d'infections nosocomiales chez les très jeunes enfants, aussi bien des pays industrialisés que ceux des pays en voie de développement avec d'importantes conséquences en termes de morbidité avant tout et de coût (prolongation de la durée du séjour hospitalier, augmentation des dépenses de santé, etc.).

Au Maroc, le taux de mortalité infanto-juvénile reste élevé à 22,16 pour mille [1], et les maladies diarrhéiques seraient responsables de 6% de la mortalité infanto juvénile en 2013 selon les projections annuelles de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) après les infections respiratoires [2]. L'extrême résistance du virus dans le milieu extérieur, la fréquence accrue de sa circulation pendant les saisons froides dans les pays à climat tempéré comme le Maroc, ainsi que son portage asymptomatique sont autant de facteurs favorisant sa dissémination dans les hôpitaux, souvent surchargés en période épidémique. Ce virus hautement contagieux, fut découvert en 1973 dans des biopsies duodénales d'enfants diarrhéiques, par Bishop (Melbourne, Australie). Sa transmission est avant tout féco-orale, interhumaine, par contacts directs ou indirects des surfaces et objets contaminés par les fèces ou les vomissures.

Le problème des GEA à rotavirus peut être réduit en améliorant l'hygiène, en fournissant la thérapie de réhydratation et en vaccinant les enfants afin de prévenir la mortalité et la morbidité infantiles dues à la déshydratation [3]. Or, l'amélioration de l'hygiène est souvent compliquée par le manque d'infrastructures adéquates et le faible financement dans de nombreux pays en développement où l'impact de la GEA sur les enfants est particulièrement dévastateur. Surtout, quand les mesures sanitaires standards tuant la plupart des bactéries et des parasites sont inefficaces pour contrôler le rotavirus, car un faible nombre de virus (10-100 particules) peut causer une infection. La transmission est ainsi courante même avec de bonnes pratiques d'hygiène [4]. Ceci est démontré par le fait que l'incidence des rotavirus est

similaire aussi bien dans les pays où les normes d'hygiène sont élevées que dans les pays où elles sont moins bonnes [5].

La prévention de la gastro-entérite à rotavirus par la vaccination a donc un impact beaucoup plus important, c'est un outil d'intervention de santé publique rentable pour réduire considérablement le nombre de décès due aux maladies diarrhéiques, réduisant ainsi considérablement le fardeau du système de santé [6, 7].

En 2009, deux vaccins contre le rotavirus : RotaTeq® (Merck& Co. Inc, USA) composé de cinq souches bovines-humaines réassorties, incluant les génotypes G1-G4 et P[8], et Rotarix® (GlaxoSmithKline Biologicals, Belgique) comprenant une souche G1P[8] humaine atténuée, ont été recommandés par l'OMS pour être inclus dans le programme mondial de vaccination des enfants, en particulier lorsque les décès par diarrhée représentent ≥ 10 % de la mortalité infantile [8-10]. Alors que les essais cliniques de ces vaccins ont démontré une grande efficacité contre les gastro-entérites graves à rotavirus dans les pays à revenu élevé et moyen en Amérique et en Europe (85%–98%) [11, 12], les essais dans les pays à faible et moyen revenu d'Afrique et d'Asie ont démontré une efficacité plus faible, allant de 40 à 70 %, avec une moyenne de 50% à 60% [13-15]. Toutefois, compte tenu de l'incidence élevée des maladies à rotavirus dans ces pays à faibles ressources, les avantages de la vaccination pourraient être considérables même avec une efficacité moindre.

Au Maroc, une étude de la base des données collectées au niveau des sites sentinelles, entre 2006 et 2010 [16-18] a permis de décrire l'épidémiologie des GEA à rotavirus. Elle a montré que les GEA à rotavirus (RV) évoluent selon une saisonnalité automnale, avec une activité plus élevée durant les mois d'Octobre et Novembre, la tranche d'âge de 3 à 8 mois est la plus touchée. La proportion des cas positifs au RV par rapport à l'ensemble des prélèvements réalisés est de 44% et les génotypes circulant au Maroc sont G1P[8] (55%) suivie de G9P[8] (12%), G1G2P[8] (7%), G2P[6] (7%) et G1P[6] (2%). Après l'introduction en décembre 2010 d'un vaccin anti RV, Rotarix (administré en deux doses à l'âge de deux et trois mois, par voie orale) dans le Programme National d'Immunsation (PNI), visant la prévention contre les affections graves provoquées par les RVA, le pourcentage des cas positifs a chuté à 29%, 15% et 24% 3 ans après (2011, 2012 et 2013) [19]. En revanche, il a été constaté que la prévalence

des géotypes G2P[4] et G9P[8] a fortement augmenté dans la période post vaccinale (2011-2013) par rapport aux saisons précédentes (2006-2010).

Le rotavirus appartient à la famille des *Reoviridae* et au genre des *Rotavirus*, qui regroupe virus humains et animaux. Ce sont de petits virus nus, composés d'une double capsidite et d'un ARN bicaténaire segmenté en 11 segments, associé dans le virion à une ARN polymérase virale. Les 11 segments du génome viral portent chacun une séquence codante unique encadrée par des séquences conservées non codantes. Ce génome code pour 6 protéines structurales (VP) et 5 protéines non structurales (NSP).

La protéine majeure de capsidite interne VP6 permet le classement des rotavirus en 7 groupes antigéniques (A à G). Les sérogroupes A et C ont été identifiés à la fois chez l'Homme et diverses espèces animales domestiques et de ce fait, suspects d'être à risque zoonotique. Les protéines structurales de la capsidite interne VP7 et de la capsidite externe VP4 correspondent aux antigènes G (Glycoprotéine) et P (sensible aux protéases) respectivement induisant la production d'anticorps neutralisants. Ces antigènes ont permis de définir les types G et P des souches virales et de ce fait, mieux connaître d'une part les souches prédominantes dans les diarrhées humaines et d'autre part de les comparer aux souches isolées chez les animaux en vue d'identifier un éventuel risque zoonotique. En raison de la nature segmentée du génome, le réassortiment entre et au sein des souches humaines et animales est courant, ce qui entraîne une évolution génétique des souches de rotavirus [20]. Ainsi la comparaison des séquences génétiques a permis de montrer soit l'existence d'une parenté étroite entre certains rotavirus animaux et humains ou la découverte de nouveaux géotypes humains pouvant reconnaître une origine animale, démontrant ainsi que la spécificité de l'hôte peut être rompue facilement. Les gènes VP7 et VP4 ont été largement utilisés dans un système de double classification, ainsi jusqu'à présent, 36 géotypes G (VP7) et 51 géotypes P (VP4) [21, 22] ont été identifiés chez les humains et les animaux. Seulement, le système de classification récemment proposé par le groupe de travail sur la classification des rotavirus (RCWG), qui est basé sur l'analyse complète du génome des souches de rotavirus, a fourni un excellent moyen de déchiffrer l'origine réelle et les schémas d'évolution des souches en particulier celles dérivées d'événements de réassortiment inter-espèces [23, 24]. L'utilisation de ce nouveau système de classification a permis d'identifier ces événements de réassortiment et de transmission inter

espèces, soulignant le rôle des animaux comme source d'infection par le rotavirus chez l'homme [25].

Dans le groupe A, les sérotypes G1, G2, G3 et G4 représentent à eux seuls 95% des souches isolées chez l'Homme, avec une prédominance du type G1P[8] [26, 27].

Au cours de la dernière décennie, on a assisté à une émergence mondiale des souches G8 et G12 [28-31]. Plus récemment, les souches G8, G12 et P[6] ont été de plus en plus identifiées chez les enfants diarrhéiques de plusieurs pays africains [7, 32-42] indiquant l'expansion continue de ces souches sur le continent.

Le génotype G8 a été découvert pour la première fois chez un jeune enfant atteint de gastro-entérite en Indonésie [43]. Par la suite, des souches G8 ont été retrouvées sporadiquement chez des humains et des animaux comme des porcs et des vaches dans le monde entier [44, 45], ce qui a conduit à l'hypothèse d'une transmission inter-espèces de la souche, en particulier en Afrique, en raison de la proximité des humains avec le bétail [46-48].

À l'échelle mondiale, les souches humaines G8 ont été associées à un large éventail de génotypes P (P[1], P[2], P[4], P[6], P[8], P[10], P[11] ou P[14]) [27, 44, 49-54] et l'analyse de la longueur totale ou presque totale des séquences nucléotidiques des 11 segments de gènes de ces souches a permis de dégager des informations sur l'origine de ces dernières.

Le rotavirus est ainsi en constante évolution, soit par mutation ponctuelle ou à la suite d'un réassortiment génétique et de nombreuses souches inhabituelles humaines et/ou animales ont émergé dans de nombreux pays et la liste des souches humaines de rotavirus pouvant reconnaître un segment génomique d'origine animale est loin d'être complète. Ainsi Esposito S, et al. ont découvert en 2019 en Italie chez un enfant de 8 ans scolarisé atteints de diarrhée sévère, une souche humaine G3P[8] reconnaissant un reassortiment entre des gènes bovins, équins et humains.

Au Maroc, il n'existe malheureusement pas de stratégies de surveillance des souches de rotavirus groupe A permettant de prévoir l'introduction éventuelle de nouvelles souches résultant d'une transmission interspèces aussi bien chez les humains que chez les animaux domestiques. Pourtant des systèmes d'élevage nomades (bédouins) sont présents dans plusieurs régions du pays pouvant favoriser l'introduction de nouvelles souches ou de souches réassorties à partir d'un hôte hétérologue par transmission inter-espèces compte tenu de leur

mode de vie nomade (proximité des nomades de leurs animaux domestiques et les mauvaises conditions d'hygiène).

Compte tenu de l'éventuel risque zoonotique que présente le rotavirus groupe A, et de l'absence d'informations génétiques sur le génome des RVA circulants déjà détectés au Maroc, le séquençage complet du génome de souches marocaines aussi bien humaines qu'animales s'imposait surtout qu'un génotype (G8P[14]) jusque-là n'existant que chez les animaux (les ruminants) a été détecté pour la première fois au Maroc chez un enfant souffrant de gastroentérite aiguë.

Ainsi l'objectif principal de ce travail de thèse consiste d'une part à fournir pour la première fois des données génétiques sur le génome complet de trois souches marocaines de rotavirus groupe A d'origines animales et humaines permettant d'établir leur constellation complète et aussi d'établir leur phylogénie moléculaire et de ce fait pouvoir reconstruire leur histoire évolutive. D'autre part ce travail examinera le potentiel de transmission zoonotique des rotavirus dans une perspective marocaine, en décrivant l'incidence de souches de rotavirus peu communes, en détaillant les voies potentielles de transmission des rotavirus animaux à l'homme et en discutant les risques d'exposition, qui devraient illustrer la situation dans un contexte géographique plus large.

Quant aux objectifs spécifiques, ils se résument comme suit :

- + Une meilleure compréhension de l'origine ainsi que de l'évolution d'une souche de RVA humaine de génotype rare (G8P[14]) détectée au Maroc pour la première fois, à travers le séquençage complet de son génome,
- + Comparaison des principales régions antigéniques des séquences d'acides aminés VP8* et VP7 de la souche marocaine de génotype rare avec d'autres souches pertinentes humaines et animales à travers le monde ainsi que les régions antigéniques des deux vaccins les plus utilisés Rotarix™ et RotaTeq™, ce qui pourra nous renseigner sur le degré d'efficacité de l'immunité induite par les deux vaccins dans la protection contre les infections par des souches de rotavirus d'origine zoonotique tel est notre cas .
- + Fournir un aperçu sur la circulation de RVA chez des chèvres et des bovins nomades marocains profitant de la survenue d'un pic d'épidémie de diarrhées aiguës dans une région nomade Marocaine « Bouaarfa », connaissant le caractère zoonotique du virus.

- + Déterminer la phylogénie de deux souches de rotavirus caprine et bovine choisies pour le séquençage complet de leur génome vu leur grande ressemblance avec la souche humaine marocaine de génotype rare.
- + Tester la reproductibilité de l'infection par RVA sur des caprins à travers l'infection expérimentale de chèvre alpine saine par la souche humaine de rotavirus de génotype rare (G8P14) détectée au Maroc. La réussite de l'infection expérimentale permettra de confirmer la présence d'un cas de transmission inter espèces de RVA pour la première fois au Maroc.

Chapitre I :

Généralités sur le rotavirus

Chapitre I : Généralités sur le rotavirus

1. Introduction

Les rotavirus (RV) sont la principale cause de gastro-entérite aiguë chez les jeunes enfants et environ 453 000 décès sont dus à des infections à rotavirus chaque année [5]. Outre l'homme, les rotavirus sont également connus pour infecter régulièrement les jeunes de nombreuses espèces animales [55]. En fait, les rotavirus ont été détectés pour la première fois dans des échantillons de selles de souris et de singes vervets en 1963 [56, 57]. Ce n'est que plus tard, en 1973, que les rotavirus ont également été détectés chez l'homme, lorsqu'ils ont été observés par Bishop et ses collègues en utilisant la microscopie électronique dans une biopsie duodénale d'un enfant hospitalisé souffrant de gastro-entérite non bactérienne [58]. Le virus récemment découvert a également été trouvé dans des matières fécales et a été rapidement reconnu comme le principal agent étiologique de la gastro-entérite chez les enfants de moins de cinq ans [59].

2. Historique

Cet agent infectieux d'origine virale a été découvert récemment, contrairement aux bactéries et parasites qui ont été, pour certains, identifiés au 19ème siècle. Néanmoins, l'hypothèse d'une étiologie virale était suspectée de longue date, lorsqu'il a été démontré que des ultra filtrats extraits de selles de patients affectés de gastroentérite, ne contenant qu'un faible nombre de bactéries, pouvaient transmettre la maladie à des sujets sains. Puis dans les années 1950 à 1960, le développement de méthodes d'isolement de particules virales en culture cellulaire, a permis aux virologues d'identifier un certain nombre de ces virus. Cette technique fut hélas très décevante dans le cas de gastroentérites. Cependant, en 1963, l'utilisation de la microscopie électronique a permis à Adams et Kraft de déceler la présence de particules virales sphériques, dans l'épithélium intestinal de souris infectés par le virus de la diarrhée épizootique (EDIM : Epizootic Diarrhea Infant Mice). A la suite de cette première découverte, d'autres virus répondant aux critères de la maladie ont été décrits chez diverses

espèces animales. En 1967, Malherbe et Strickland-Cholmley ont mis en évidence la présence de particules virales nommées SA11 (Simian Agent 11) chez le singe. Puis, en 1969, Mebus et al, ont identifié le NCDV (Nebraska Calf Diarrhea Virus) chez les veaux diarrhéiques [60]. Mais ce n'est qu'en 1973, que Bishop et son équipe du département de Gastro-entérologie du Royal Children's Hospital de Melbourne (Australie), ont découvert dans des biopsies duodénales d'enfants diarrhéiques [58], des particules virales identiques au NCDV et ont rattaché ce virus au genre orbivirus. Finalement, en 1974, Flewett et son équipe ont révélé l'existence d'analogies antigéniques et morphologiques entre les virus humains et bovins [61]. Ils ont ainsi, proposé de les regrouper sous le nom de rotavirus, du latin « rota » signifiant roue, inspiré par leur forme en roue révélée par microscopie électronique. En 1979, le genre Rotavirus est instauré au sein de la famille Reoviridae.

3. La particule virale

3.1. Propriétés physico-chimiques

Les rotavirus se caractérisent par un très haut degré de résistance, qui leur permet de persister dans l'environnement extérieur. Par ailleurs, les observations faites en milieu hospitalier, suite au développement des maladies nosocomiales, ont mis en exergue le rôle de l'environnement dans la transmission des infections à rotavirus [62-64].

Le virus possède un grand pouvoir infectieux, ainsi la dose infectieuse du rotavirus est supposée être proche de 10 à 100 particules [65], toutefois, en absolu, on estime qu'une seule particule virale peut suffire à déclencher une infection [66]. Les particules virales sont très stables à un pH allant de 3 à 9 et également dans des conditions d'humidité relativement faible et élevée.

Réputées aussi pour leur capacité à survivre dans la matière fécale pendant une longue période, ces particules virales sont inactives en présence de chlore [67], d'ammonium quaternaire et d'hypochlorite. Par contre les virus soumis à des températures très élevées (chauffage à 50°C pendant 30 min) deviennent inactifs. En plus, les rotavirus sont inactifs en présence d'éthanol, de phénol, de formaldéhyde et de lysol, tandis que le formaldéhyde à

37°C, l'hexachlorophène à 0,75% (1:3) et le n-chloro-tosylamide de sodium à 67% peuvent détruire ces derniers [68]

3.2. Composition

La particule virale entièrement infectieuse (virion) se compose de 3 couches de protéines et est également appelée particule à triple couche (TLP). En microscopie électronique, les TLP ressemblent à des roues (en latin. rota), et cette apparence a donné le nom de Rotavirus au genre [69]. En se basant sur les données de cryo-microscopie électronique et de reconstruction d'images (revues par Jayaram et al., 2004) [70], la structure de symétrie icosaédrique a été reconnue ; la particule monocouche (SLP = core shell) est ainsi formée de 120 molécules de la protéine virale VP2 disposées en 60 dimères. Les complexes enzymatiques de réplication, constitués de VP1 et VP3, sont situés à l'intérieur du noyau [71-74] et sont en contact étroit avec un segment d'ARN double brin spécifique via VP1 [75]. Ainsi, la couche la plus interne, appelée « core » renferme le génome viral de 11 segments d'ARN bicaténaire de même que l'ARN polymérase virale « VP1 » et la guanylyltransférase « VP3 ». Le noyau viral est entouré d'une couche intermédiaire de protéine VP6 représentant près de 50 % du poids du virus et qui constitue la particule à double couche (DLP). Cette dernière, est à son tour couverte par 260 trimères de glycoprotéines VP7 d'où émergent les protéines VP4 pour former à la fin des particules à triple couche (TLP). Il existe entre ces trois couches protéiques un réseau de cavités, qui permet l'extrusion de l'ARNm néo synthétisé et assure également le passage de métabolites (Figure 1) [76, 77].

Le génome du rotavirus est composé de onze segments de gènes d'ARN double brin (dsRNA) et sont numérotés de un à onze par taille décroissante. A l'exception du segment onze du génome, qui code deux protéines, tous les autres segments de gènes sont monocistroniques et leur taille varie de 664 à 3302 paires de base [55]. Au total, les onze segments de gènes codent pour six protéines virales (VP) et six protéines non structurales (NSP). Les protéines virales sont présentes dans les rotavirus, tandis que les protéines non structurales sont produites dans les cellules infectées pour faciliter la réplication virale et la maturation des virions.

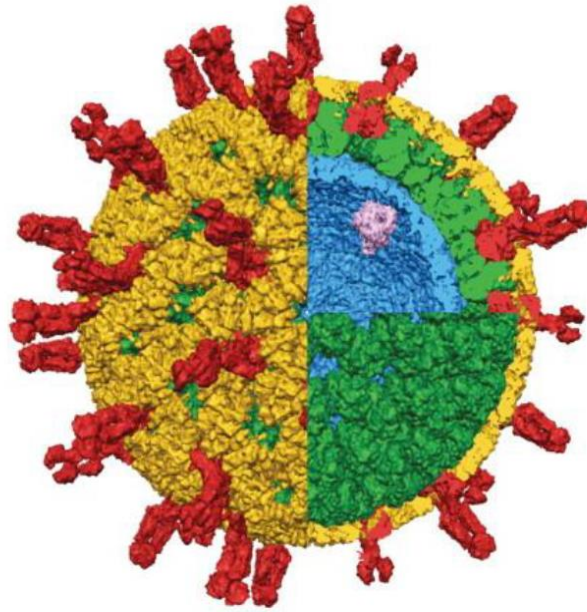


Figure 1. Aperçu de la particule de rotavirus. Particule mature de rotavirus composée du noyau, qui est formé par la protéine de capsid interne VP2 (bleu), de la protéine VP1 (rose), la protéine VP3 (structure inconnue) et le génome d'ARN bicaténaire. La particule centrale est entourée par la couche intermédiaire de la capsid, qui est composée de VP6 (vert). Les protéines de la capsid externe VP7 (jaune) et VP4 (rouge) forment ensemble la couche externe de la capsid. Image adaptée de Trask SD et al. 2012 [72]

3.3. Structure de la particule virale

3.3.1 Structure à basse résolution

La reconstruction à basse résolution de la structure tridimensionnelle du rotavirus établie par Yeager et al., à partir d'analyse d'images acquises par cryo-microscopie électronique, a permis de déterminer l'organisation générale du virus à une résolution de 37 Å et 26 Å [78] (Figure 2A).

Les principales caractéristiques de la particule virale sont les suivantes : la capsid externe est constituée de 780 sous unités de VP7 et de 60 spicules de VP4 qui émergent au moins de 100Å à partir de la surface de la capsid. A la surface de la couche de VP7 sont présent 132 canaux, de diamètre variant de 40Å à 60 Å. Vient ensuite, la capsid intermédiaire constituée de 260 trimères de VP6 et présentant également à sa surface des canaux, correspondant à ceux

de la capsid externe. Selon leur localisation, ces canaux sont classés en trois types (Figure 2B) :

- Les canaux de type I : localisés sur les axes icosaédriques d'ordre 5
- Les canaux de type II : sont situés sur les axes locaux d'ordre 6 entourant les axes d'ordre 5
- Les canaux de types III : ils sont au nombre de 60 qui entourent les axes d'ordre 3

La couche la plus interne, « core », d'un rayon moyen estimé à 255 Å a été attribuée aux trois protéines VP1, VP2 et VP3, en absence de données structurales déterminantes.

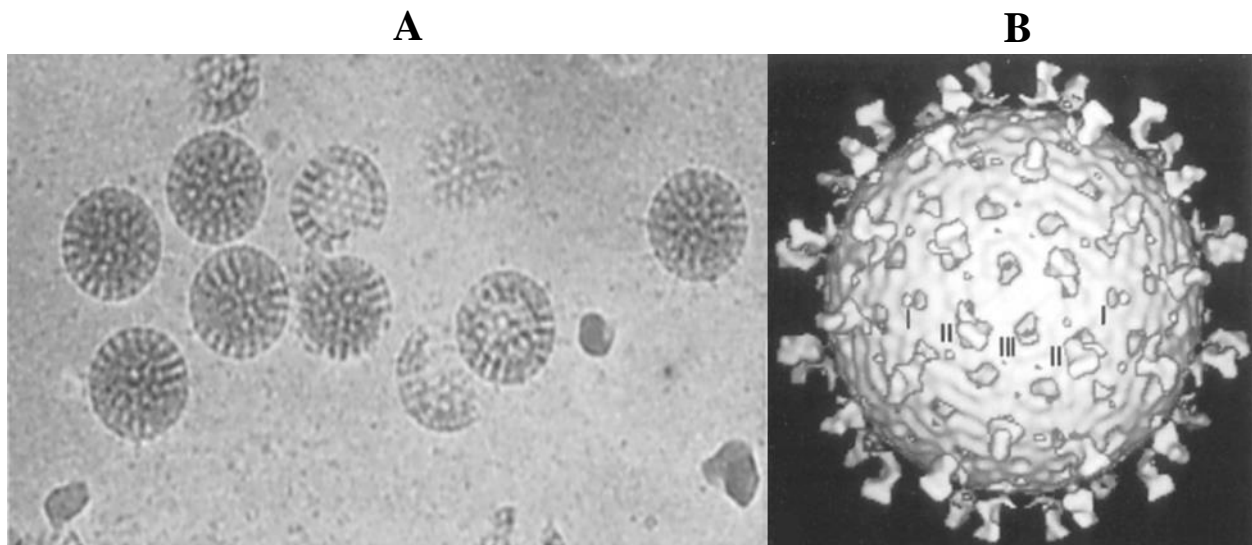


Figure 2. Reconstruction à basse résolution de la structure tridimensionnelle de la particule virale à partir d'images de cryo-microscopie électronique (adapté de Yeager et al.1990) [78].

A : Vue selon l'axe cinq de la particule virale à une résolution de 37 Å.

B : Micrographies électroniques d'échantillons de rotavirus non colorés, congelés et hydratés. Les contours circulaires et le diamètre constant des virions intacts indiquent une bonne conservation de la forme sphérique et de la symétrie.

3.3.2 Les pseudo-particules virales

Les rotavirus sont des particules à triple couches qui contiennent quatre protéines majeures de la capsid, VP2, VP4, VP6 et VP7, et deux protéines mineures, VP1 et VP3. Le clonage de chacun des gènes de rotavirus codant pour une protéine de capsid majeure dans le système d'expression des baculovirus et l'expression de chaque protéine dans des cellules d'insectes a été possible depuis 1994 grâce à SE Crawford et al. [79]. La co expression de différentes combinaisons des principales protéines structurales du rotavirus a entraîné la formation de pseudo- particules virales stables (VLPs).

La co expression de VP2 et VP6 seuls ou avec VP4 entraîne la production de pseudo-particules virales VP2/6 ou VP2/4/6, qui sont similaires aux particules de rotavirus à double

couche (DLP) (Figure 3). Par contre la co expression de VP2, VP6 et VP7, avec ou sans VP4, produit des VLP à triple couche VP2/6/7 ou VP2/4/6/7, similaires aux particules natives de rotavirus. Ainsi et selon les protéines qui les constituent, les pseudo-particules virales (VLP) présentent les mêmes propriétés structurales et fonctionnelles que les particules natives, mais sans leurs capacités répliquatives et infectieuses [29]. De ce fait, elles constituent un outil particulièrement intéressant pour les études structurales, fonctionnelles et immunologiques.

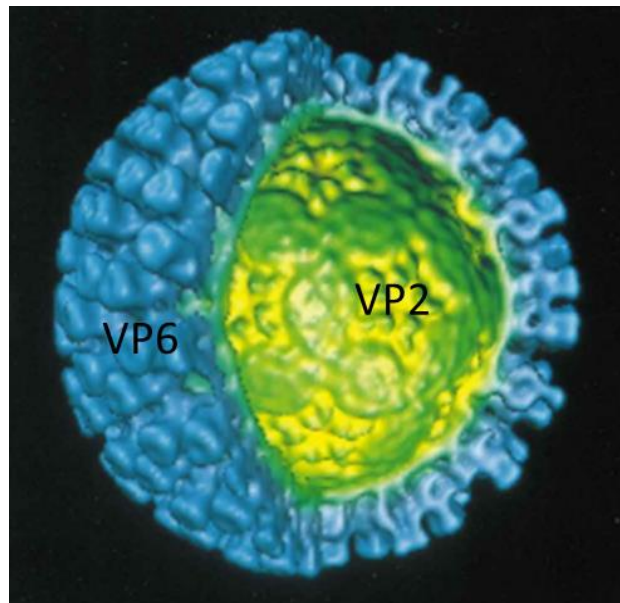


Figure 3. Structure tridimensionnelle des pseudo-particules virales VLP2/6 à une résolution de 22 Å (d'après Lawton et al., 1997) [80].

3.3.3 Modèle atomique de la particule virale

La combinaison des nouvelles techniques d'analyse structurale avec la structure en cryo microscopie électronique à résolution nanométrique du rotavirus a permis l'obtention d'une description des particules virales à une résolution de 9.5 Å [81]. De plus, ces études associées aux structures cristallographiques des différentes protéines, VP7 [82], VP6 [83], VP4 [76, 77, 84] et de la particule virale à double couche protéique (DLP) [71], ont fournis un modèle structural plus détaillé des principales protéines de la capsid et de leurs interactions au sein de la particule à triple couche. Grâce à une série d'interactions entre les sous-unités, les

spicules de la protéine VP4 adoptent un aspect dimérique au-dessus de la surface de la capside, tout en formant une base trimère ancrée à l'intérieur de l'un des trois types de canaux aqueux entre les couches de capside VP7 et VP6 (Figure 4).

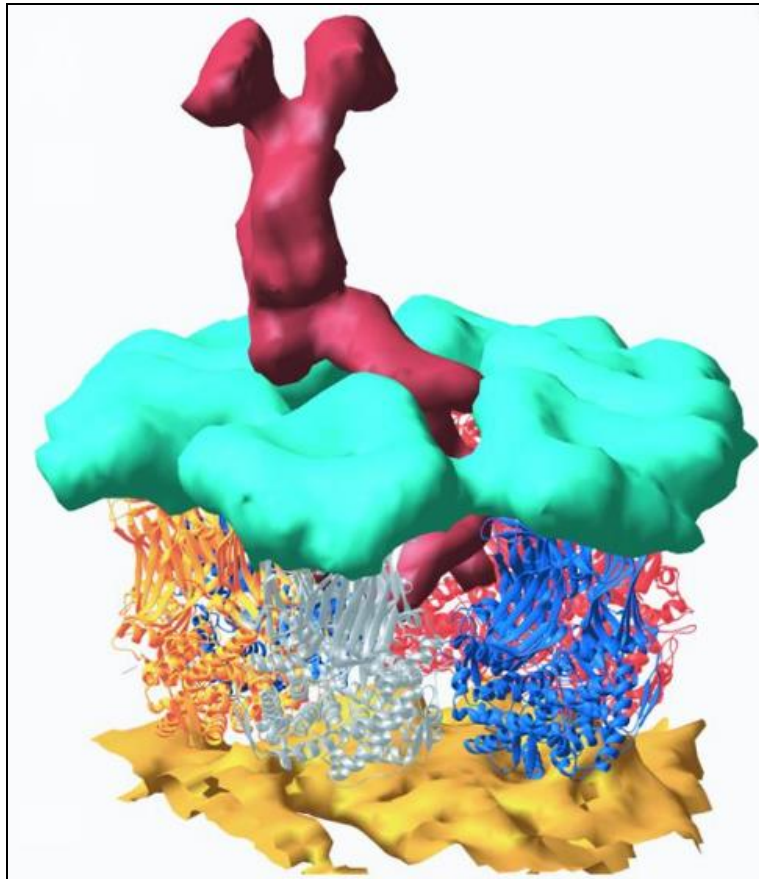


Figure 4. Vue d'un canal de type II découpé lors de la reconstruction en cryo-microscopie électronique de la particule virale complète. Le modèle atomique, représenté par des rubans multicolores remplace la densité correspondant à VP6. La densité EM de la couche VP2 est indiquée en jaune et la densité de la couche VP7 en cyan. L'hémagglutinine virale VP4 est représentée en rouge (d'après Mathieu et al. 2001) [83].

3.4. Les protéines virales

Le rotavirus est un virus à triple couche d'ARN double brin segmenté (ARNdb) et appartient à la famille des Reoviridae [60]. Sa taille, y compris les spicules, est d'environ 100 nm. Le

génom viral comporte 11 segments de gènes, qui codent pour 6 protéines structurales et 5 ou 6 protéines non structurales (NSP), selon les espèces (tableau 1).

Tableau 1 : Protéines structurales (VP) et non-structurales (NSP) du rotavirus, Tableau adapté de Desselberger et al. 2014 [164]

Segment	Taille (bp)	Nom de la protéine	Taille (kDa)	Localisation sur le virion	Molécules /virion	Fonctions
1	3302	VP1	125	Noyau	12	RdRp; ssRNA binding; complexe avec VP3
2	2690	VP2	94	Noyau	120	Interagit avec VP1 et VP3, rôle structural dans la transcription, la réplication et l'assemblage des protéines.
3	2592	VP3	88	Noyau	12	Guanyltransférase, méthyltransférase, complexe avec VP1
4 (VP8* + VP5*)	2362	VP4	86	Couche externe	180	Protéine de spicule dimérisée, oligomérisée avec VP7 et NSP5, liée à la virulence, induit des anticorps neutralisants, clivée en VP5* et VP8* (protéine d'hémagglutination), impliquée dans l'attachement du virus aux cellules, induit la perméabilisation membranaire après trypsination, présente dans la membrane plasmique et associée aux microtubules
5	1611	NSP1	58	Non structural	-	Fonction inconnue. Motif en doigt de zinc N-terminal, fixe le zinc, lie les ARNm viraux
6	1356	VP6	44	Couche intermédiaire	780	Protéine majoritaire, antigénique, n'induit pas d'anticorps neutralisants, interaction absolue avec VP2 pour la transcription, possède les canaux pour sortie des ARNm
7	1104	NSP3	34	Non structural	-	Fixe les ARNm viraux sur la séquence consensus 3', dimérise, non viroplasmique, interagit avec le facteur de transcription eIFG4 et la protéine RoXaN
8	1059	NSP2	36	Non structural	-	Fixe les ARN double brins viraux, multimérise, intervient dans la réplication, impliquée dans la formation des viroplasmes, activité NTPase
9	1062	VP7	37	Couche externe	780	Antigénique, induit des anticorps neutralisants, induit la perméabilisation membranaire après clivage, glycosylée, insérée dans la membrane du réticulum plasmique, intégrité structurale calcium dépendante.

10	751	NSP4	20	Majoritairement non structural	Très peu	Fonction multiple. Glycoprotéine, ancrée dans la membrane du réticulum endoplasmique, récepteur intracellulaire des particules immatures, tétramérisé, déstabilise la membrane plasmique, entérotoxine virale
11	667	NSP5	21	Non structural	-	Formation des viroplasmés, interagit avec NSP2, O-glycosylée, auto-phosphorylée
		NSP6	12	Non structural	-	Viroplasmé, interagit avec NSP5

3.4.1 Les protéines structurales

3.4.1.1. L'ARN polymérase

La protéine VP1 est le produit du segment 1 de l'ARN viral et est un composant mineur du noyau central. VP1 ne représente que 2% de la masse virale [85] et son poids moléculaire dans les rotavirus du groupe A et du groupe C est de 125 000 daltons et pour le groupe B de 136 000 daltons. La séquence du gène VP1 du groupe C est bien conservée. VP1 est moins important d'un point de vue structural et est associé à la transcription de l'ARN avec la transcriptase virale et à la fonction de réplication. VP1 est l'une des trois protéines (VP1, VP2 et VP3) qui composent la particule centrale du rotavirus. Les protéines VP1 et VP3 font partie de l'activité RNA polymérase ARN dépendante associée aux particules à double enveloppe [86].

Les éléments suivants suggèrent que le gène VP1 a une activité de transcription et de réplication.

- Toutes les séquences VP1 des groupes A, B et C du rotavirus partagent les quatre motifs communs conservés dans les séquences de toutes les ARN polymérase ARN dépendantes [87, 88], et la région conservée est probablement importante pour l'activité structurale ou fonctionnelle de la polymérase.
- Le gène VP1 se lie spécifiquement à l'extrémité 3' de l'ARNm viral [86].

3.4.1.2. VP2, la protéine de structure

La protéine VP2 est un produit du segment 2 de l'ARN viral, et forme le principal composant protéique du noyau central du rotavirus. On estime que le noyau contient environ 200 molécules de VP2 et que 120 molécules sont organisées en 60 dimères selon une symétrie T=1. VP2 est la troisième protéine la plus abondante dans les particules virales à double enveloppe (Figure 5).

La protéine VP2 est immunogène et les anticorps sériques dirigés contre la protéine VP2 sont de bons indicateurs d'une infection antérieure [89].

L'analyse de la séquence des acides aminés (aa) du segment 2 du gène a mis en évidence la présence de leucine après chaque sept résidus à partir des acides aminés 536 et 665. Le système de « fermeture éclair » à la leucine (the leucine zipper) représenterait une partie de la protéine qui interagit avec un site cible sur l'ADN [90]. La séquence du gène VP2 des souches de rotavirus telle que la souche simienne SA11, la souche humaine Wa et la souche bovine RF a été déterminée et montre une similitude au niveau des nucléotides et des protéines [91].

La protéine VP2 joue un rôle important dans la structure et la fonction du noyau central. Par exemple :

- Le VP2 est une composante de la réplication virale liée à la capacité de VP2 à se greffer sur la matrice d'ARNm pour la synthèse du brin négatif (minus strand) [92].
- Chaque protéine VP2 est riche en proline et ces résidus sont très conservés, elle contient également des motifs de fermeture éclair à base de leucine, qui semblent être impliqués dans la dimérisation des protéines de liaison des acides nucléiques (Nucleic acid binding proteins) [93].
- Le VP2 interagit avec les trimères du VP6 et est perforé par 132 canaux aqueux transportant les métabolites à l'intérieur et l'ARN néo-transcrit vers l'extérieur pendant la transcription [94].

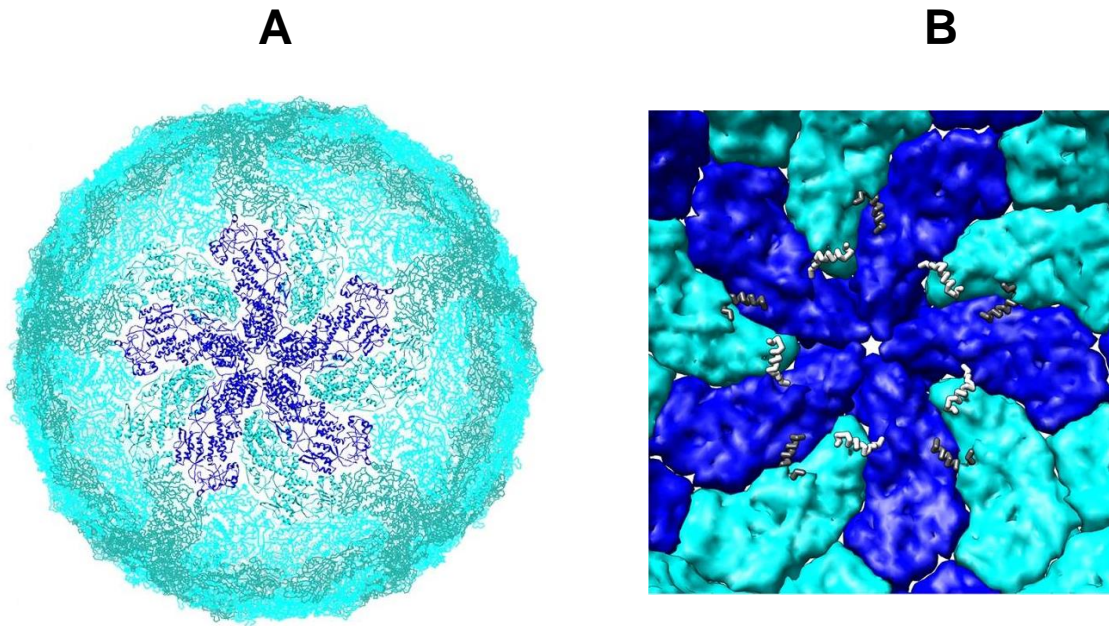


Figure 5. Structure de la protéine VP2 déterminée par cristallographie avec une résolution de 3,8 Å (d'après McClain et al., 2010) [71].

- A. Vue de l'extérieur (en haut) de la capside selon l'axe d'ordre 5*
- B. Vue de l'intérieur (en bas) de la capside selon l'axe d'ordre 5*

3.4.1.3. VP3, la guanyltransférase

VP3 est une protéine du core viral, codée par le segment 3. Une activité guanyltransférase a été associée à cette protéine [95, 96], qui lui permet d'ajouter une coiffe en 5' des ARNm. De plus Chen et al, ont montré que VP3 possède une activité méthyltransférase, induisant ainsi la méthylation des ARN exogènes [97]. Bien que produites en petites quantités, la fonction principale de ces enzymes est de produire des transcrits d'ARNm coiffés. Par conséquent, le VP3 pourrait avoir un impact sur la transcription ou avoir un lien avec l'activité de la phosphatase ou de l'ATPase. La séquence VP3 présente une forte homologie avec l'ARN polymérase d'autres virus, ce qui suggère que cette protéine est impliquée dans la réplication de l'ARN [91].

3.4.1.4. VP4, la protéine de spicules

La protéine de la capside externe VP4 est codée par le segment 4. C'est une petite protéine non glycosylée de la capside externe, qui ne constitue que 2% de la masse virale, a un poids moléculaire de 88 000 dalton [85]. VP4 forme 60 projections de surface d'environ 10-12 nm de long avec une structure en forme de bouton à l'extrémité distale sur la capside externe lisse de VP7 (Figure 6). VP4 est la protéine d'attachement viral [98]. En tant qu'importante protéine de la capside externe, VP4 remplit diverses fonctions qui ont été identifiées par des analyses génétiques et immunologiques, notamment (1) VP4 a une activité hémagglutinante [99], (2) VP4 porte des épitopes spécifiques de neutralisation [100], (3) VP4 est une protéine d'attachement cellulaire et (4) VP4 est un déterminant important de la virulence.

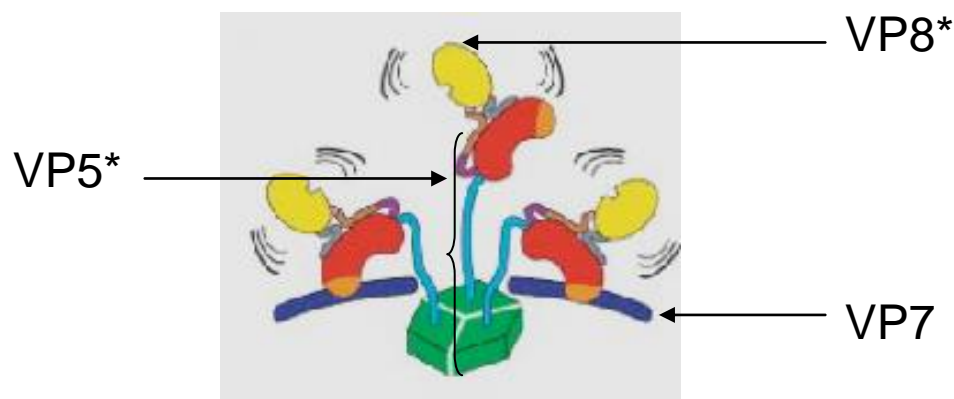


Figure 6. Représentation schématique du réarrangement structural de VP4 avant l'entrée du virus (d'après Dormitzer et al., 2004) [76].

Les couleurs utilisées pour le schéma correspondent aux différents segments de VP4 (VP5 en rouge, bleu et vert, VP8* en jaune et les résidus 232-247 (marron) dont l'excision est induite par la trypsine). VP7 est représenté par les traits bleus continus.*

Le clivage protéolytique du VP4 augmente le pouvoir infectieux du virus. Le clivage du gène VP4 avec des protéases telles que la trypsine, donne naissance à deux polypeptides, VP5* et VP8*. Ceci est nécessaire pour que le virus puisse infecter efficacement les cellules en y facilitant son entrée [101, 102]. VP8* est responsable de la fixation de l'acide sialique et de l'activité hémagglutinante que l'on trouve chez de nombreuses souches de rotavirus d'origine

animale [103]. Les anticorps contre VP8* neutralisent le virus en inhibant la fixation virale [101]. La fonction de VP5* est de permettre la fixation du virus qui ne nécessite pas d'acide sialique pour son infectivité [102], le segment joue également un rôle important dans la pénétration cellulaire [104].

Le clivage protéolytique se trouve dans une région conservée des résidus d'arginine 241 et 247 [105, 106]. D'autres résidus conservés de cystéine se trouvent au niveau des positions 216, 318, 380 et 774 dans toutes les souches de rotavirus [107]. La plupart des rotavirus animaux ont un résidu supplémentaire de cystéine à la position 203 [108].

In vitro, le VP4 détermine la croissance et la formation de plaques [109, 110], dirige la virulence chez les souris [111] et influence la pathogénèse chez l'homme [112].

Le VP4 induit des anticorps neutralisants qui définissent les sérotypes P (sensibles aux protéases). L'activité neutralisante est spécifique à chaque sérotype. Diverses études indiquent que pour la protection contre les gastroentérites à rotavirus, VP4 et VP7 semblent tous deux être spécifiques au sérotype [111, 113-116].

L'analyse de séquence de VP4 montre un ORF long de 776 aa chez les rotavirus d'origine animale et 775 aa chez les souches humaines. Les interactions entre le VP4, les protéines structurales et les protéines non structurales ont été observées au sein du réticulum endoplasmique (RE) et les complexes membranaires de VP4, NSP4 et de VP7 y ont été détectés. La fonction de ces complexes est de participer au bourgeonnement des particules à simple coque dans la lumière du RE, où la maturation en particules à double coque se produit [117].

3.4.1.5. VP6, la protéine de la capsid intermédiaire

VP6 est le produit du segment 6 de l'ARN viral et est la principale protéine structurale de la capsid virale interne, elle constitue 51% du virion et a un poids moléculaire de 44 816 daltons [85]. Au cours des processus d'infection, VP6 joue d'importantes fonctions structurales, immunologiques et morphogéniques. Le VP6 est une protéine trimère qui est stabilisée par des liaisons non covalentes à la surface des particules virales [118].

Des études ont montré que l'élimination de VP6 des particules à simple enveloppe entraîne une défaillance de l'activité de la transcriptase, tandis que l'ajout de VP6 rétablit à nouveau l'activité de transcription [119]. Le VP6 est donc associé à l'activité transcriptase de l'ARN viral bien qu'il n'ait pas d'activité polymérase en soi. On ignore cependant si le VP6 fonctionne comme une composante structurale, en maintenant les segments VP1, VP2, VP3 et l'ARN virale dans la bonne conformation pour permettre la transcription, ou s'il participe activement au processus de transcription [120].

VP6 contient des épitopes qui ont été utilisés pour classer les virus du groupe A en sous-groupe I, sous-groupe II, sous-groupe I + II et sous-groupe non I non II, sur la base de la présence ou de l'absence de deux épitopes distincts réagissant avec un, deux ou aucun des anticorps monoclonaux décrits par Greenberg et al. (1983) [109]. Les épitopes spécifiques des sous-groupes du VP6 ont été utilisés comme outil épidémiologique car ils définissent et identifient différentes souches de virus. Les rotavirus du groupe A humains et animaux partagent des déterminants antigéniques du VP6 ainsi que des épitopes qui spécifient les sous-groupes I et II. Chez le rotavirus groupe A, les sites immunodominants du VP6 qui contiennent les épitopes spécifiques du groupe se trouvent dans quatre régions (résidus aa 32-64, 155-167, 208-294 et 380-397) [121], tandis que le gène VP6 a un ORF unique codant pour une protéine de 397 acides aminés.

3.4.1.6. VP7, la glycoprotéine externe

VP7 est le produit :

- 1) du segment 7 de l'ARN du rotavirus rhésus (RRV) de sérotype 3,
- 2) du segment 8 de l'ARN du rotavirus bovin de sérotype 6,
- 3) et du segment 9 de l'ARN du rotavirus simien (SA11) de sérotype 3. La protéine VP7 est par conséquent codée par le segment d'ARN 7, 8 ou 9, selon la souche.

La protéine VP7 constitue la protéine principale de la capside externe, elle est glycosylée et constitue 30% de la masse virale [85]. Elle est composée de 780 molécules disposées en 260 trimères, perforées en 132 canaux et chaque molécule de VP7 a un poids moléculaire de 34 000 [122]. Le VP7 contient des résidus d'oligosaccharides à haute teneur en mannose liés à

l'azote qui sont modifiés par découpage (trimming) [91]. De plus, VP7 est une protéine intégrale qui est traduite par les ribosomes du RE et expulsée dans la lumière de ce dernier.

L'analyse de séquence du segment VP7 révèle la présence de deux ORF codant pour deux polypeptides ayant 326 et 286 acides aminés respectivement. Ces ORF commencent avec des séquences hydrophobes qui pourraient être des séquences de signal qui dirigent le VP7 naissant vers le RE.

Le VP7 est une protéine hautement immunogène qui induit des anticorps neutralisants spécifiques aux sérotypes G du rotavirus groupe A [91]. D'après la réactivité des anticorps monoclonaux spécifiques de VP7 et les résultats des expériences réalisées par Sabara et al. (1985) [123] et Fukuhara et al. (1988) [124], VP7 est la protéine d'attachement du virus aux cellules. Les anticorps spécifiques du sérotype dans les tests immunologiques (ELISA) ont été largement utilisés dans les premières études épidémiologiques pour la détection des sérotypes de rotavirus. Actuellement, 36 sérotypes G ont été identifiés et partagés entre l'homme et l'animal (<https://rega.kuleuven.be/cev/viralmetagenomics/virus-classification/rcwg>).

Les sérotypes G1-G4, G9 et G12 sont les sérotypes les plus répandus circulant dans le monde chez l'homme [27, 125]. Concernant les combinaisons de génotypes G/P les plus courantes et causant plus de 90 % des infections sont G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8], G9P[8] et G12P[8] [26, 28].

3.4.2 Les protéines non structurales

Durant l'infection virale, les rotavirus codent également pour au moins cinq protéines non structurales (NSPs). Bien qu'elles ne soient pas présentes dans les particules virales, elles jouent un rôle très important dans la réplication, la morphogenèse et la pathogénèse du virus.

3.4.2.1. NSP1, une protéine accessoire

La protéine non structurale NSP1 est le produit du segment 5 de l'ARN viral, avec un poids moléculaire de 58 400 dans les souches SA11. La protéine a été trouvée dans des cellules infectées et dans un système sans cellule, la NSP1 est synthétisée en grande quantité par rapport à d'autres protéines virales [126].

Les résultats des études d'hybridation ont indiqué que la séquence du gène NSP1 est considérée comme la moins conservée de tous les gènes de rotavirus groupe A [127]. Une région riche en cystéines près de l'extrémité N-terminale de la protéine NSP1 est très bien conservée. Cette séquence riche en cystéine C-X 2 -C-X 8 -C-X 2 -C-X 3 -H-X-C-X 2 -C-X 5 -C forme un motif dit « en doigt de zinc » (Zn), où X indique un éventuel autre acide aminé. Cette structure s'avère essentielle pour l'interaction avec l'ARNm [128].

De nombreux virus ont la capacité de contourner une partie des mécanismes effecteurs de l'immunité innée par inhibition d'un ou plusieurs composants du système d'interféron (IFN). Dans le cas du rotavirus, c'est la protéine NSP1 qui assure cette fonction en induisant la dégradation protéasome-dépendante du facteur de réponse à interféron 3 (IRF3), IRF5 et IRF7. Il résulte de cette dégradation l'inhibition de la transcription d'interférons IFN α/β de type I [129]. Des études précédentes décrites par Graff et al. (2002) [130] indiquent également que la protéine NSP1 sous exprime la réponse de l'interféron, car elle interagit avec l'IRF3, ce qui entraîne sa dégradation par le protéasome. Une étude ultérieure de Barro et Patton, (2007) [131] suggère que les rotavirus ont un mécanisme pour supprimer la voie de signalisation de l'IFN pendant les premiers stades de l'infection. Au cours de la réplication virale, la protéine joue un rôle dans la régulation de l'efficacité de l'expression des gènes viraux ou dans la modulation des réponses des cellules hôtes. Ainsi, dans les cellules infectées, NSP1 est exprimée à des niveaux très faibles, principalement peu de temps après l'infection [126], mais dans les cellules infectées matures, cette dernière est synthétisée à des niveaux élevés. Cela suggère que NSP1 pourrait jouer un rôle régulateur dans le cycle de réplication du virus. Des protéines NSP1 défectueuses ont été identifiées contenant des réarrangements dans les segments 5 du génome qui peuvent croître en culture cellulaire [132, 133]. Cela suggère que NSP1 peut jouer un rôle régulateur pendant la réplication de l'ARN, le réassortiment du génome comme elle peut être impliqué dans le packaging des segments d'ARN génomiques [126, 133].

3.4.2.2. 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. La caractéristique distincte des cellules infectées par un rotavirus est la formation de corps d'inclusion cytoplasmique appelés viroplasmes où se produit la réplication virale. Il a été démontré que la protéine NSP2 est un composant important dans la formation de viroplasmes par interaction avec la protéine NSP5 [134, 135]. Cette interaction entre NSP2 et NSP5 est capable de conduire à la formation de structures de type viroplasma sans la présence d'autres protéines virales [134, 135]. Cependant, lorsque NSP2 est exprimée seule de façon transitoire, elle se distribue de façon diffuse dans le cytoplasme [134, 135].

Une activité NTPase (RNA nucleoside triphosphatases), Mg²⁺ dépendante, a été également associée à la protéine NSP2. Elle a été mise en évidence par Taraporewala et al., en 1999 [136]. Les auteurs suggèrent que NSP2 pourrait agir comme « un moteur moléculaire » facilitant l'encapsidation des ARNm [137].

3.4.2.3. 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. Le premier domaine correspond au domaine de liaison à l'extrémité 3' des ARNm viraux [138, 139], il permet ainsi à la protéine d'assurer son rôle dans le transport spécifique des ARNm vers les sites d'encapsidation et de réplication. Le second domaine fonctionnel, permet la fixation du facteur d'initiation de la traduction eucaryote (eIF4GI) [140, 141]. La protéine NSP3 est chargée d'aider à réguler la synthèse de l'ARNm à partir de l'ARN double brin viral [133]. Grâce à des essais de co-immunoprécipitation, il a été constaté que NSP3 interagit avec les complexes eIF4GI (eukaryotic initiation factor 4 gamma 1). Elle régule la circularité de l'ARNm en se liant simultanément à la séquence consensus 3' et à la coiffe de la protéine de liaison eIF4G [140]. Lors d'une infection à rotavirus, les compétitions entre NSP3, les complexes eIF4GI et la poly A binding protein (PABP) sont responsables de l'arrêt de la synthèse des protéines cellulaires [140].

Les travaux de Vitour et al., en 2004 [142] ont abouti à l'identification d'un partenaire cellulaire de la protéine NSP3, la protéine RoXaN 62 (Rotavirus X-associated Non-structural Protein), dont l'expression a été corrélée aux tumeurs stromales digestives [143]. Il semble que cette protéine soit impliquée dans la régulation de la traduction en formant un complexe ternaire avec les protéines NSP3 et eIF4G.

3.4.2.4. 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. Cette protéine possède trois domaines hydrophobes N-terminaux et une séquence signal qui assure son ancrage dans la membrane du réticulum endoplasmique [144], tandis que, le domaine C-terminal hydrophile est cytoplasmique. 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.

La protéine NSP4 est aussi, caractérisée par ses propriétés d'oligomérisation en absence de toute autre protéine, conduisant ainsi à la formation de tétramères. D'autre part, NSP4 en interaction avec la protéine VP6 agit comme un récepteur aux particules infectieuses à double couche (DLP) lors de la morphogénèse virale, assurant ainsi leur translocation à travers la membrane du réticulum endoplasmique [145-147].

Poruchynsky et al., ont montré que la déplétion en calcium du réticulum endoplasmique induit une dissociation de l'hétéro complexe NSP4/VP4/VP7, conduisant à une accumulation des particules virales immatures enveloppées [148]. En plus, 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 viroplastes et dans la régulation de la synthèse des ARNm [149-151].

La protéine NSP4 fonctionne également comme une entérotoxine. En effet, Dong et al., ont montré que 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'inositol trisphosphate (IP3) [152]. L'autre fonction de la

protéine réside dans sa modulation des niveaux de calcium intracellulaire et de la sécrétion de chlorure [150].

3.4.2.5. NSP5, une protéine kinase

NSP5 est l'une des deux protéines codées par le segment 11. Elle est à la fois O-glycosylée et phosphorylée post-traductionnellement [153]. Des études portant sur la modification de protéines ont montré que NSP5 possède une activité auto-kinase qui conduit à son hyperphosphorylation indépendamment des autres protéines virales [154, 155]. Les interactions de NSP5 avec NSP2 et VP2 sont capables de produire des structures de type viroplasmique de manière calcium dépendante [135, 156, 157]. De plus, il a été démontré que les interactions NPS5-NSP2 et NSP5-VP2 recourent à toutes les autres protéines virales présentes dans les viroplasmes [156]. Ces résultats ont permis de suggérer que NSP5 joue un rôle clé dans l'assemblage des viroplasmes et dans le recueil des protéines viroplasmiques [156]. D'autre part, Le rôle de la phosphoprotéine O-glycosylée dans le cycle viral a été mis en évidence par l'utilisation des siRNA. En effet, l'inhibition de l'expression de la protéine NSP5 induit une chute de la synthèse des ARN viraux simples et doubles brins [158, 159].

Un autre rôle a été également associé à la protéine NSP5. Il s'agit d'une activité ATPase spécifique, magnésium (Mg 2+) dépendante. Cette activité a été corrélée à un faible niveau de phosphorylation de la protéine NSP5, suggérant ainsi un lien possible entre l'hydrolyse d'ATP et l'activité autokinase [160].

3.4.2.6. NSP6, protéine d'interaction avec les acides nucléiques

La protéine NSP6 est un produit du segment 11, dont le poids moléculaire est de 26 000. Il a été découvert que le segment 11 présente deux ORF [161] le premier code pour la protéine NSP5 (198 aa) et le deuxième pour la protéine NSP6 (92 aa), toutes deux s'accumulant dans le viroplasma [162]. NSP6 interagit avec NSP5 pendant le processus de réplication, mais sa fonction précise reste floue. NSP6 semble modifier la structure tridimensionnelle de NSP5 afin de permettre à ce dernier de fonctionner plus efficacement [163]. Il a été suggéré que NSP6 joue un rôle de régulation dans l'auto-association de NSP5 [163]. En tout cas, il semble clair que la protéine NSP6 est impliquée dans la réplication du génome viral.

3.5. Le cycle de réplication du rotavirus

Les rotavirus infectent les cellules endothéliales matures à l'extrémité des villosités qui sont présentes dans la lumière de l'intestin grêle. Le cycle viral (Figure 7) comprend les étapes suivantes :

- + Fixation par l'intermédiaire de VP4 et VP7
- + Pénétration et décapsidation
- + Synthèse de l'ARN simple brin sens (=ARNm) par l'intermédiaire de VP1, VP3 et VP2
- + Formation de viroplasmes, médiation du packaging de l'ARN, synthèse de l'ARN simple brin antisens (= réplication de l'ARN) et formation de DLP
- + Maturation des particules virales (en TLPs) et libération

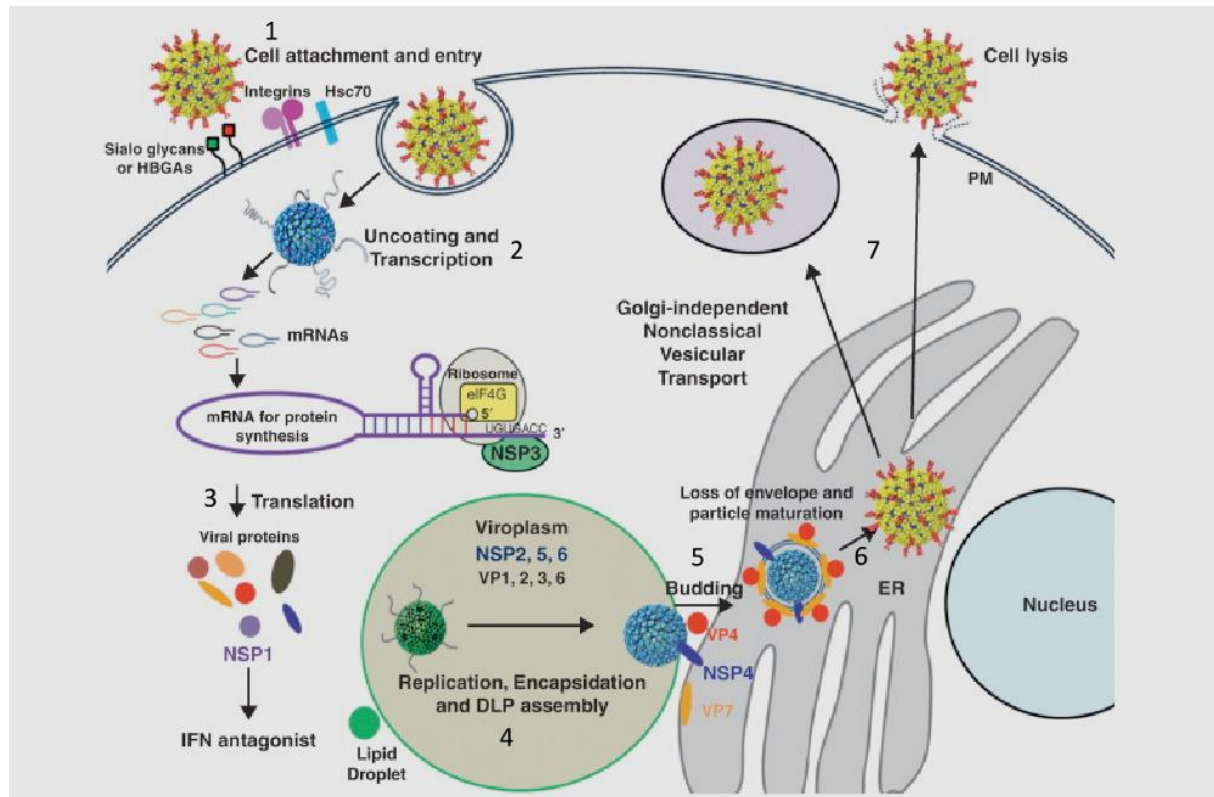


Figure 7. Le cycle de réplication des rotavirus adapté de Sadiq et al. 2018 [165]

1. Attachement et entrée du virus ; 2. Décapsidation et transcription des ARN viraux ; 3. Traduction des ARNm ; 4. Réplication du génome viral et assemblage des DLPs ; 5. Translocation des DLPs dans le réticulum endoplasmique ; 6. Acquisition de la capsid externe ; 7. Relargage des particules matures (TLPs)

3.5.1 Entrée du virus

Contrairement aux virus enveloppés, les mécanismes qui permettent l'internalisation des virus non enveloppés en général et du rotavirus en particulier sont encore mal compris. Cependant une description générale du processus de transport de la particule virale vers l'intérieur de la cellule a été proposée. Ce mécanisme s'effectuant en plusieurs étapes comprend : le clivage par la trypsine de la protéine VP4 en VP8* et VP5* ; l'attachement cellulaire et enfin l'internalisation des DLPs, particules virales infectieuses, dans le cytoplasme après déstabilisation de la membrane (plasmidique ou endosomale). La solubilisation de la capsid externe peut s'effectuer selon deux mécanismes toujours débattus : une entrée directe du virus

à travers la membrane plasmique [166] ou bien une internalisation par endocytose [167] puis une entrée à travers la membrane de l'endosome.

3.5.2 Clivage de la protéine VP4

Avant l'infection, la protéine spicule VP4 est clivée de manière protéolytique par des protéases de type trypsine présentes dans l'intestin grêle en VP5* (corps de la protéine) et VP8* (tête de la protéine) [102, 168]. Il a été démontré que le clivage protéolytique de VP4 augmente considérablement l'infectivité de la particule de rotavirus. Avant le clivage, les spicules de VP4 sont flexibles, mais la protéolyse induit un changement de conformation et forme un spicule dimérique rigide de VP5*, tandis que le troisième VP5* se tient à plat sur la surface du virion [169, 170]. Le VP8* reste attaché de manière non covalente à la protéine VP5* [76]. Il a été démontré que pour certaines souches de rotavirus, VP8* est capable de se lier aux acides sialiques terminaux [77, 171, 172]. Récemment, ce système a été étendu à une gamme plus large de glycanes, suggérant que VP8* est un déterminant important de la limitation de la gamme d'hôtes [173-175], de la même manière que la protéine VP1 le fait dans les norovirus [176].

3.5.3 Attachement cellulaire

Plusieurs éléments laissent à penser que les rotavirus interagissent séquentiellement avec plusieurs récepteurs cellulaires impliquant les protéines VP4 et VP7 de la couche externe, permettant ainsi l'entrée du virus dans la cellule [177-183]. L'ensemble des travaux effectués afin de déterminer les différentes étapes conduisant à la translocation du virus dans le cytoplasme, suggèrent que le premier contact du virus avec la surface cellulaire s'effectue par interaction de la protéine VP8* avec les récepteurs cellulaires contenant l'acide sialique. Après ce premier contact avec l'acide sialique, le virus interagit avec quatre autres protéines de la surface cellulaire : $\alpha 1\beta 2$, Hsc 70, $\alpha v\beta 3$ et $\alpha x\beta 2$ (Figure 8).

Parmi les divers récepteurs cellulaires potentiels identifiés, l'acide sialique a généralement été considéré comme un médiateur de l'attachement viral initial aux cellules sensibles, sur la base de l'observation selon laquelle le traitement des cellules par la neuraminidase (NA) ou la pré-

incubation du virus par des composés contenant de l'acide sialique réduisent tous deux l'infectivité de certaines souches virales [184, 185]. Les souches virales affectées par ces traitements sont classées comme des souches sensibles à NA (NA-sensitive strains) et comprennent les rotavirus simiens SA11 et RRV, et la souche bovine NCDV [184, 185]. En revanche, un certain nombre d'isolats de virus animaux et la plupart des souches isolées chez l'homme ne sont pas affectés par le traitement préalable des cellules à la neuraminidase et sont donc classés comme des souches résistantes à NA (NA-resistant strains) et comprennent les souches humaines Wa et DS-1 [184, 185]. Cependant, cette division ne signifie pas que les souches NA-résistantes n'utilisent pas l'acide sialique pour la fixation des cellules, mais elles utilisent celui situé dans les régions internes des structures oligosaccharidiques, comme le ganglioside GM1. Cet acide sialique interne est moins sensible ou totalement insensible au traitement par NA [185]. Des études récentes utilisant la spectroscopie, la modélisation moléculaire et les tests de compétition d'infectivité ont fourni des preuves que l'acide sialique sub-terminal du ganglioside GM1 était un déterminant clé de la reconnaissance virus-cellule chez la souche humaine Wa NA-résistante [186]. Ceci suggère que l'acide sialique joue également un rôle dans l'attachement aux cellules chez les souches NA-résistantes.

Il est évident que les intégrines sont les composants ultérieurs auxquels le virus se lie spécifiquement après sa fixation initiale aux cellules. À ce jour, un certain nombre d'intégrines, dont $\alpha 2\beta 1$, $\alpha x\beta 2$, $\alpha 4\beta 1$ et $\alpha v\beta 3$, ont été identifiées comme jouant un rôle au niveau post-attachement [185].

L'intégrine $\alpha v\beta 3$ a été abordée en détail. La transformation des gènes $\alpha v\beta 3$ dans les cellules CHO a considérablement augmenté leur sensibilité aux souches de rotavirus RRV, nar3 et Wa [180]. La protéine virale responsable de la liaison à $\alpha v\beta 3$ a été identifiée comme étant VP7 plutôt que VP4 [178, 187].

D'autres membres de la famille des intégrines, tels que $\alpha 4\beta 1$ et $\alpha x\beta 2$, ont également été rapportés comme favorisant la liaison virale post-attachement [178, 188-190]. Il a été démontré que le site $\alpha 4\beta 1$ interagit avec VP4 [189], et son interaction avec VP7 a également été suggérée par le fait que les anticorps dirigés contre VP7 réduisent la liaison virale au site $\alpha 4\beta 1$ [188].

Des études sur $\alpha\beta 2$ ont montré qu'il interagit avec le motif d'acide aminé GPR sur VP7 [178]. En outre, il a été démontré que les peptides synthétiques contenant des acides aminés GPR bloquent l'infectivité du virus [190].

L'interaction de la protéine VP5* avec les protéines de choc thermique « Hsc70 » implique un domaine qui s'étend de la position 642 à 659 dans la séquence primaire de la protéine VP4 (VP5* + VP8*). De plus, il a été montré que l'utilisation d'un peptide synthétique mimant cette région bloque l'infectivité du virus mais pas sa liaison cellulaire.

Ces résultats indiquent que VP5* se lie aux protéines Hsc70 à une étape dite de « post-attachement » [182]. D'autre part, Pérez-Vargas et al., suggèrent que l'interaction de VP5* avec les protéines Hsc70 induit un changement conformationnel au sein des particules virales facilitant ainsi leur entrée dans le cytoplasme de la cellule [191].

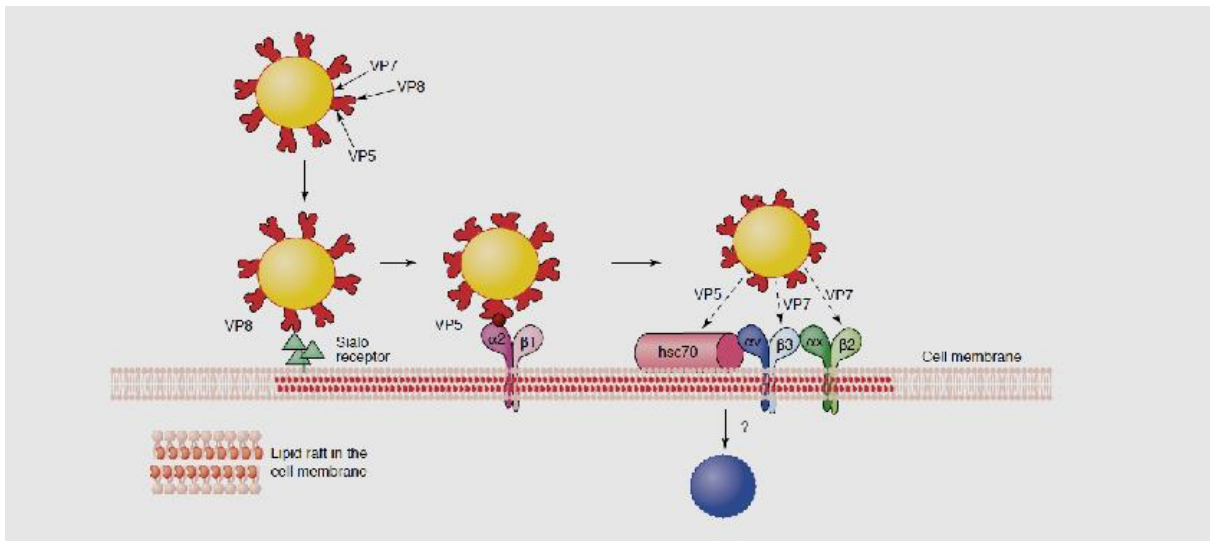


Figure 8 : Modèle illustrant les premières étapes d'interaction du rotavirus avec les différents récepteurs de la cellule hôte (d'après Lopez et al., 2006) [192]

Aussi, à ce jour, l'étude de la pénétration des rotavirus a révélé la participation de l'acide sialique, des intégrines et du hsc70 en tant que récepteurs cellulaires et a également suggéré que les molécules nécessaires à l'entrée du virus sont dépendantes de la souche virale et de la lignée cellulaire. Il est également possible que d'autres protéines de surface cellulaire jouent un rôle essentiel dans le processus de pénétration. Par conséquent, il semble que le mécanisme

moléculaire de la pénétration soit un processus complexe et à plusieurs étapes exigeant une organisation et une interaction correctes entre les deux antigènes viraux de surface (VP4 et VP7) et les divers récepteurs de la surface cellulaire.

3.5.4 Translocation des particules virales dans le cytoplasme

Quelle que soit la voie d'entrée, le mécanisme de translocation du rotavirus dans le cytoplasme nécessite la solubilisation de la capsid externe suivie de la perméabilisation des membranes (plasmidique ou endosomale).

3.5.4.1. Entrée directe

Diverses approches et techniques ont permis de mettre en évidence que le mécanisme d'entrée directe du rotavirus induisait la perméabilisation des membranes plasmiques. Cette conclusion a été faite en se basant sur les différentes observations effectuées par plusieurs groupes. Ces observations sont les suivantes :

- la co-entrée des toxines (α -sarcine) dans les cellules infectées [193],
- la libération des marqueurs fluorescents encapsulés dans des liposomes en présence de particules virales traitées par la trypsine,
- l'utilisation des inhibiteurs d'endocytose, tels que l'azide de sodium, et le dinitrophénol ont un effet limité sur l'entrée du virus [166],
- la perméabilisation des membranes est optimale à pH neutre et est considérablement réduite à pH acide [194, 195].
- les études par microscopie électronique montrent le passage directe des particules virales (traitées par la trypsine) à travers la membrane plasmique [196].

Une séquence dans la protéine VP5*, s'étendant des résidus 384 à 401, présentant une forte similarité avec les peptides de fusion des virus enveloppés a été observée [108, 197]. Ces peptides de fusion sont caractérisés pour leur capacité à induire la perméabilisation des membranes [198]. Cette homologie a conduit les auteurs à associer la perméabilisation de la membrane à la protéine VP5* [104].

3.5.4.2. Entrée par endocytose

Après s'être fixé à la surface de la cellule, le virus amorce l'internalisation de la particule virale. Des études au microscope électronique ont montré que les particules virales sont associées à des cavités enveloppées, piégées dans une variété de vésicules couvertes, ce qui suggère que l'endocytose est utilisée pour l'internalisation [199, 200]. En revanche, dans ces études, des particules virales non infectieuses non traitées ont été éliminées de la membrane plasmidique par endocytose, ce qui a entraîné une infection non productive [201]. Des études utilisant des approches biochimiques ont démontré que l'utilisation d'agents lysosomotropes, tels que NH_4Cl , la chloroquine, la méthylamine et l'amantadine, et des médicaments qui bloquent le trafic intracellulaire des endosomes, tels que la cytochalasine D, la dansylcadavérine et la bafilomycine A1, n'ont aucun effet sur l'entrée du virus [101, 193, 199, 202, 203]. L'échec de ces traitements plaide contre l'endocytose, comme principale voie utilisée par le virus pour pénétrer dans les cellules. Par conséquent, l'entrée directe par la membrane plasmique est peut-être maintenant plus favorisée comme mécanisme d'internalisation des rotavirus [204].

En utilisant une combinaison d'approches biochimiques et génétiques (surexpression de mutants dominants-négatifs du gène cible), une étude a démontré que l'entrée du virus ne se fait pas par une clathrine bien définie ou une endocytose cavéoline-dépendante, mais qu'elle dépend plutôt d'une GTPase dynamine fonctionnelle dans la voie sensible au cholestérol [204]. Dans une autre étude la comparaison de quatre différentes souches de rotavirus, comprenant la souche simienne RRV, hsc70, la GTPase dynamine et le cholestérol ont été requis pour l'entrée de toutes les souches. Cependant, la souche humaine Wa, la souche porcine TFR-41 et la souche bovine UK semblent toutes entrer dans les cellules par endocytose induite par la clathrine, leur infectivité étant bloquée par le traitement inhibant cette voie. Ces trois souches de rotavirus sont aussi constamment sensibles aux changements du pH endosomal [205]. Ces études soulignent la possibilité que différentes souches virales semblent utiliser divers mécanismes (c'est-à-dire la pénétration directe de la membrane plasmique et/ou l'endocytose) pour leur internalisation, et que le mécanisme exact de chaque voie demeure encore mal connu.

3.5.5 Décapage (*uncoating*)

Le processus de décapage des rotavirus consiste à retirer la coque extérieure composée de VP4 et de VP7. Ce processus peut être réalisé *in vitro* par l'utilisation d'EDTA ou d'EGTA comme agents chélatants [206]. *In vivo*, il est estimé que les faibles niveaux de concentration de calcium dans les cellules sont importantes pour activer cet événement ; l'inhibition de décapage de la souche porcine OSU dans les cellules MA104 par le calcium ionophore A23187 étant le fondement expérimental de cette conclusion [199]. Il a été également signalé que le décapage des souches RRV et SA11 n'est pas affecté par l'utilisation de composés tels que le calcium ionophore A23187 et l'ionomycine ou encore la thapsigargine, l'inhibiteur calcium-ATPase du réticulum endoplasmique, qui fait augmenter les niveaux du calcium intracellulaire [193].

Les différentes souches virales utilisées dans les différentes études [193, 199] peuvent expliquer ces différentes observations concernant l'importance des taux de calcium pour l'entrée des virus.

3.5.6 Synthèse de l'ARN(m) viral et sa traduction

Les particules de rotavirus possèdent leurs propres complexes de transcription (CT), composés de VP1, l'ARN polymérase ARN dépendante (RdRp), et VP3, l'enzyme de coiffage viral (avec ses activités phosphodiesterase, guanylyltransférase et méthylase). Les CT sont localisées sur la surface interne de la couche VP2 (noyau) au niveau des axes de symétrie d'ordre 5 [70]. Chaque CT est associé à un segment d'ARN viral qui lui est propre [75]. Les formes DLP du rotavirus produisent dans le cytoplasme des transcrits d'ARN simple brin capsulés, non polyadénylés (à partir du brin négatif de l'ARN génomique) qui sont libérés de la particule par les canaux de classe I (Figure. 9).

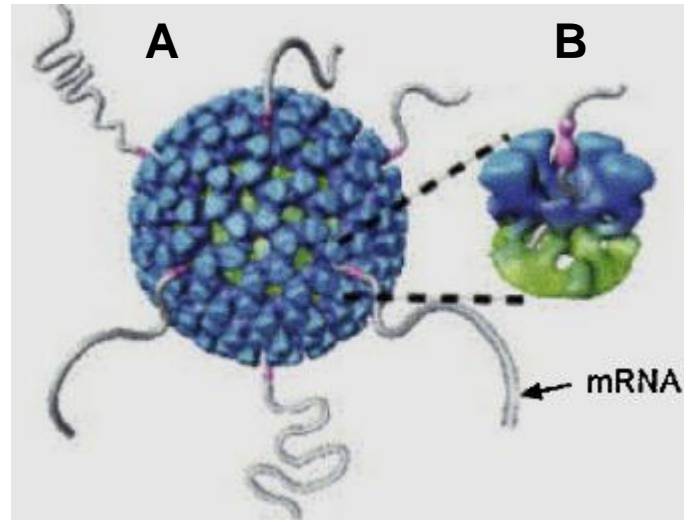


Figure 9. Modèle issu de la reconstruction par cryo-microscopie électronique de la transcription des DLP. La transcription endogène entraîne la libération simultanée des ARNm transcrits (A) à partir de canaux situés aux sommets des axes de symétrie d'ordre 5 des DLP (B) (D'après Jayaram et al. 2004 [70]).

Les transcrits servent soit à la traduction des protéines codées par le virus (au début du cycle de réplication), soit comme matrices de réplication (à la fin du cycle de réplication) pour devenir les génomes d'ARN double brin de la descendance du rotavirus [207].

Les formes DLP du rotavirus sont "transcriptionnellement actives" dans le cytoplasme cellulaire et *in vitro*, où elles produisent de grandes quantités (de l'ordre du mg) d'ARNm, à condition que les précurseurs et une source d'énergie (ATP) soient en quantité suffisante [80, 206, 208, 209]. Une augmentation logarithmique de la production d'ARNm aux stades avancés de l'infection (>4h post infection) indique que les DLP nouvellement synthétisés sont devenus actifs pour la transcription (transcription secondaire) [210, 211]. Les ARNm spécifiques des segments de rotavirus expulsés des DLP sont ensuite traduits en protéines dans le cytoplasme (Tableau 1).

Pour traduire l'ARNm viral encapsulé libéré par les DLP, le virus détourne la machinerie de traduction de la cellule, les ribosomes cellulaires étant recrutés pour la synthèse de l'ensemble des 12 protéines virales [212]. Pour réguler la traduction des protéines virales, il a été démontré que la protéine NSP3 est importante pour arrêter la synthèse des protéines

cellulaires et améliorer la synthèse des protéines virales en interagissant avec le facteur d'initiation eucaryote 4G (eIF4G) et la protéine du rotavirus X associée à NSP3 (RoXaN) [140-142, 213-215]. Cependant, l'interaction entre NSP3 et eIF4G semble seulement interrompre la synthèse des protéines cellulaires et ne pas contribuer à une traduction efficace des protéines virales comme indiqué dans les expériences de knock-down du gène NSP3 utilisant l'ARN interference [216].

Une étude visant à comprendre la régulation traductionnelle utilisée par la souche bovine de rotavirus UKtc a clairement montré que les protéines virales ne sont ni synthétisées en quantités égales ni en quantités similaires à celles de leurs gènes transcrits correspondants, [217]. Cette étude a montré que VP6 et NSP4 étaient synthétisés en plus grande quantité que les neuf autres protéines virales alors que NSP5 et NSP6 étaient les protéines les moins synthétisées [217, 218].

3.5.7 Formation de viroplasm

Après la traduction des protéines virales NSP2 et NSP5, ces dernières s'assemblent pour former des inclusions cytoplasmiques denses (viroplasm). Ces structures sont les sites de la synthèse d'ARN viral antisens et la formation de DLP [135, 162, 219]. Il a été proposé que les transcrits d'ARN initiaux réalisés par infection des DLP, se déplacent soit vers des polysomes pour la traduction des protéines, soit vers des viroplasm pour la synthèse du brin d'ARN antisens, c'est-à-dire la réplication du génome [212]. La suite de la synthèse de brins d'ARN viral sens pour la réplication, se fait exclusivement dans des viroplasm provenant de DLP nouvellement formés [207]. Le stockage des transcrits sens dans les noyaux et leur réplication pour former l'ARN double brin se produit successivement de telle sorte qu'aucun ARN double brin ne se forme dans le cytoplasme des cellules infectées [212].

3.5.8 RNA packaging et formation de DLP

En raison de leur longueur persistante de 1130Å [220], les ARN double brin nus ne peuvent pas être contenus dans des noyaux enveloppés. Les 11 différents segments d'ARN sens sont

plutôt réassemblés, interagissent avec les protéines du noyau viral et sont ensuite emballés et répliqués.

Il est supposé [72] que les complexes de réplication primaire de VP1/VP3/ssRNA interagissent avec un décimère VP2 (impliquant très probablement NSP5 et NSP2) [221], ce qui conduit à la formation de particules « noyau ». Au cours de ce processus, la charge négative de l'ARN doit être neutralisée par le co-packaging de cations divalents ou de spermidine, un composé cationique trivalent cellulaire [222, 223].

Le domaine N-terminal de VP2 est essentiel pour l'encapsidation de VP1 (et de l'ARN simple brin qui lui est rattaché) [224, 225]. La formation de complexe avec VP2 est essentielle pour l'activité RdRp de VP1, les complexes VP1/VP2 étant les particules minimales de réplication *in vitro* [226].

Les données moléculaires de la morphogenèse précoce des particules de rotavirus (formation du noyau et réplication de l'ARN) ne sont pas bien comprises. Ainsi le contrôle du packaging de l'ensemble correct des 11 segments d'ARN en particules individuelles n'est pas encore clair.

Une fois formées, les particules « noyau » sont rapidement transcapsidées par le VP6, conduisant à la synthèse des DLP, ce dernier processus a été étudié *in vitro* [222, 227].

3.5.9 Maturation et libération de particules virales (virion)

Lors de la sortie des viroplasmés, les formes DLP du rotavirus bourgeonnent à travers le réticulum endoplasmique (RE) pour finir leur maturation. Dans ce processus, la protéine NSP4 sert de récepteur intercellulaire en interagissant avec la protéine VP6 [228]. Au sein du RE, les particules de rotavirus naissantes sont temporairement enveloppées, mais l'enveloppe est perdue lorsque les particules acquièrent la couche externe composée de VP4 (60 trimères) et de VP7 (260 trimères) [20]. L'origine, la fonction et la perte de l'enveloppe transitoire ne sont pas bien connus. Cependant, il est probable que les trimères de VP4, qui forment des spicules, réagissent d'abord avec VP6 et sont ensuite incorporés dans une couche continue de trimères de VP7 [227] (Figure. 4).

Des expériences *in vitro* de transcapsidation ont montré qu'une première interaction entre VP4 et les DLP d'abord, suivie par VP7, permettait de rétablir la pleine infectivité des TLP [227]. Un autre pool de VP4 interagit avec la membrane plasmidique cellulaire [229-231]. Comme décrit ci-dessus, en interagissant avec les DLP, la protéine NSP4 a une fonction cruciale dans le processus de maturation : le blocage de l'expression de NSP4 par siRNA conduit à des défauts de maturation des particules de rotavirus [150], et l'inhibition de la réplication de l'ARN virale, probablement dû à l'interaction de la fraction NSP4 avec les viroplasmies [151].

Les formes TLP du rotavirus sont libérées à partir de cellules non polarisées (MA104) par la lyse [232], et par une forme de processus de bourgeonnement chez les cellules épithéliales (par exemple Caco2) qui ne détruit pas immédiatement la cellule [233].

3.5.10 Infection récurrente au rotavirus

En culture cellulaire et chez les hôtes immunodéprimés (humains et autres espèces de mammifères), l'infection à rotavirus peut devenir récurrente [234-237]. Les mécanismes moléculaires détaillés de cette relation virus-hôte sont mal compris à l'heure actuelle.

3.5.11 Croissance du rotavirus dans les organoïdes des cellules souches

Après avoir réussi à différencier *in vitro* des lignées de cellules souches humaines en cultures de cellules intestinales (organoïdes intestinaux humains) [238], il a été démontré que ces cultures peuvent être infectées par des rotavirus, qu'il s'agisse de souches de laboratoire (SA11) ou d'isolats cliniques [239]. Le grand potentiel de ces cultures pour l'étude de la réplication des rotavirus est en cours d'exploration.

3.5.12 Protéines cellulaires impliquées dans la réplication du rotavirus

En tant que parasites obligatoires de cellules, les virus ont besoin de fonctions cellulaires pour leur réplication, seulement la plupart ne possèdent pas la machinerie nécessaire pour traduire les protéines de leur ARNm et dépendent des organelles de traduction et des fonctions de la

cellule hôte. Plus récemment, une implication beaucoup plus large des composés et des fonctions cellulaires dans la réplication des virus ont été découverts.

Pour les rotavirus, il s'agit :

- Des récepteurs et co-récepteurs cellulaires pour l'adsorption
- Des endosomes cellulaires pour la conversion des formes TLP en DLP
- Interaction des viroplasmes de la "fabrique virale" avec les gouttelettes de lipides cellulaires
- Interaction de NSP3 avec les composants de la machine de traduction cellulaire,
- Interaction de NSP4 avec les membranes cellulaires contenant les réserves intracellulaires de Ca²⁺
- Interaction des protéines non structurales virales avec les protéines structurales cellulaires (actine, microfilaments),
- Interaction de NSP1 avec divers composants de la réponse immunitaire innée

4. Classification du rotavirus

Les rotavirus appartiennent au genre *Rotavirus* et font partie de la sous famille des *Sedoreovirinae* qui appartient elle-même à la famille des *Reoviridae* [240].

Le genre *Rotavirus* a été classé initialement en cinq espèces différentes (A-E) [241] en fonction de son caractère antigénique vis-à-vis du gène VP6. Cependant, la disponibilité des séquences nucléotidiques ces dernières années, a permis de déterminer les espèces de RV actuellement sur la base des similitudes d'acides aminés. Ainsi les rotavirus ayant plus de 53% de similitude d'acides aminés appartiennent à la même espèce [242]. Grâce à ce nouveau système de classification, huit groupes différents ont été identifiés (A-H). Parmi ces huit groupes, les rotavirus du groupe A ont été reconnus comme les agents étiologiques prédominants de la gastro-entérite virale aiguë chez les nourrissons et les jeunes enfants [243]. La présente thèse portera donc exclusivement sur les rotavirus du groupe A. Outre VP6, les deux protéines de la capsid externe, VP7 et VP4, ont été traditionnellement utilisées pour la classification des sous-espèces [100, 244-246]. Pour les rotavirus groupe A, VP7 et VP4 produisent tous deux des anticorps neutralisants, qui ont été utilisés pour distinguer les

rotavirus selon différents sérotypes, VP7 déterminant le sérotype G (Glycosylated protein) du virus et VP4 le sérotype P (Protease-sensitive protein) [82, 105, 126, 247]. Avec l'augmentation du nombre de sérotypes et la disponibilité d'un plus grand nombre de séquences nucléotidiques de VP7 et VP4, ce système de classification a rapidement été abandonné au profit d'un système de classification basé sur la similarité des nucléotides, basé sur les génotypes G et P. Ainsi les rotavirus présentant une similarité de plus de 89 % de leur séquence d'acides aminés appartiennent au même génotype G ou même génotype P. En général, une bonne corrélation existe entre les génotypes G et les sérotypes G, mais quelques discordances ont été observées entre les génotypes P et les sérotypes P, notamment en raison de l'absence d'anticorps spécifiques du type P [55, 248]. En conséquence, la classification du sérotype P et du génotype P a été maintenue, le génotype P étant indiqué entre crochets (par exemple : P1A[8]= sérotype 1A, génotype 8). La classification basée sur les similarités nucléotidiques a été étendue par Matthijnsens et ses collègues pour englober les 11 segments de gènes, ce qui a donné lieu à des constellations de génotypes, qui sont désignés par une lettre pour chaque segment de gène dans l'ordre suivant : VP7-VP4-VP6-VP1-VP2-VP3-NSP1-NSP2-NSP3-NSP4-NSP5, suivie d'un numéro arabe pour le génotype (par exemple Gx-P[x]-Ix-Rx-Cx-Mx-Ax-Nx-Tx-Ex-Hx, où x représente le génotype d'un segment de gène particulier) [24, 25, 249].

Il s'agit actuellement du système de classification le plus élaboré et le plus largement utilisé, il est fréquemment mis à jour et a été particulièrement utile pour l'analyse des relations évolutives dans le cas des transmissions inter espèces des rotavirus (Tableau 2) [21, 250].

Tableau 2. Les géotypes des rotavirus groupe A (actualisé à partir de Matthijssens et al. 2008) [24]

^a la valeur seuil (Cut off) du pourcentage d'identité des nucléotides définissant les géotypes

^b Rotavirus classification working group (<https://rega.kuleuven.be/cev/viralmetagenomics/virus-classification/rcwg>)

^c RNA-dependent RNA polymerase.

Protéine du rotavirus	Pourcentage d'identité ^a (%)	Nombre de géotypes ^b	Géotype (acronyme en gras)
VP7	80	36G	G lycosylated
VP4	80	51P	P rotease-sensitive
VP6	85	26I	I nter capsid
VP1	83	22R	R dRp ^c
VP2	84	C20	C ore protein
VP3	81	M20	M ethyltransferase
NSP1	79	31A	A ntagonist
NSP2	85	22N	N TPase
NSP3	85	22T	T ranslation enhancer
NSP4	85	27E	E nterotoxin
NSP5	91	22H	P Hosphoprotein

5. Diversité génétique du rotavirus

En raison de leur large variété d'hôtes, les rotavirus sont génétiquement très divers. Leur variabilité génomique repose sur trois grands mécanismes génétiques : les mutations ponctuelles, les réarrangements génomiques et les réassortiments génétiques [251] (Figure 10)

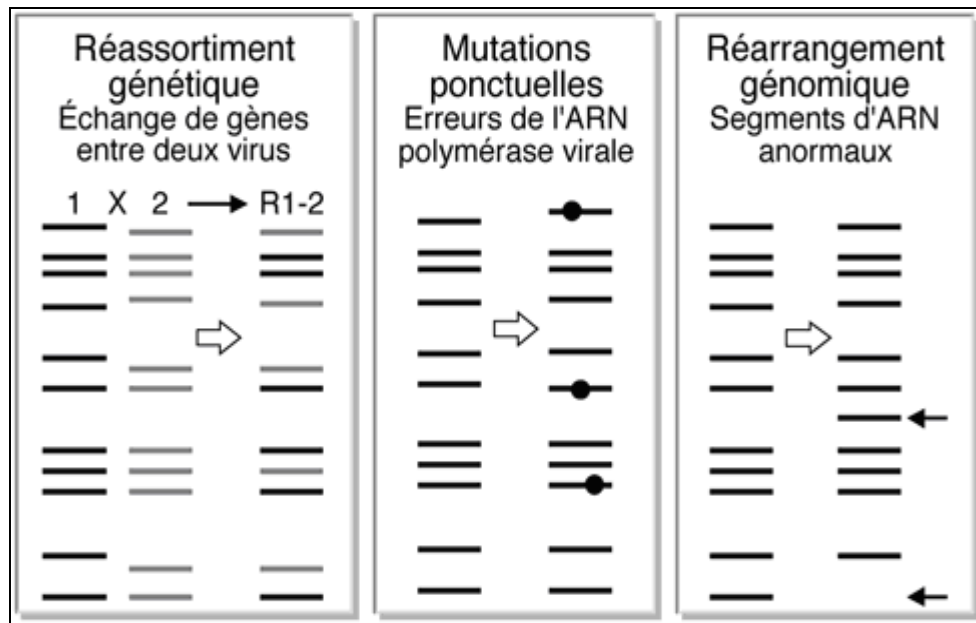


Figure 10. Mécanismes génétiques de la diversité du virus. Les réassortiments sont des échanges de gènes entre deux rotavirus lors d'une infection mixte. Les mutations ponctuelles sont liées à des erreurs de l'ARN polymérase virale. Les réarrangements génomiques sont liés à des altérations majeures de segments d'ARN virale dont le poids moléculaire se trouve modifié (D'après E. Gault, 1998) [252]

5.1. Les mutations ponctuelles

Une mutation ponctuelle désigne un changement spontané d'une seule paire de bases causé par une modification chimique de l'ADN. Les ARN-polymérases ARN-dépendantes, similaires à ceux trouvés dans les rotavirus, n'ont pas d'activité de relecture, ce qui entraîne des taux de mutation élevés lors de la réplication. Des études ont révélé que les taux de mutation des rotavirus sont de $<5 \times 10^{-5}$ mutations par nucléotide par réplication virale. Ce taux de mutation suggère que le génome moyen du rotavirus diffère de son génome parental par au moins une mutation [253]. La dérive antigénique résulte donc de l'accumulation de mutations ponctuelles, causées par des délétions, des substitutions et des insertions au cours de la réplication. Les mutations peuvent être conservées et s'accumuler dans les virus de la descendance, définissant ainsi des lignées et des sous-lignées génétiques [254]. En outre, Les

mutations dans les sites antigéniques importants peuvent conduire à la génération de monotypes capables d'échapper à la détection par les anticorps dans les essais de laboratoire et chez l'hôte humain [255].

5.2. Les réarrangements génétiques

Les réarrangements génomiques consistent en une altération majeure de la séquence d'un gène, sous forme de délétions, ou, plus souvent, de duplications partielles de la séquence [256, 257].

La survenue d'un réarrangement se caractérise par l'apparition de segments génomiques de mobilité inhabituelle, remplaçant des segments absents de leur position habituelle de migration électrophorétique (Figure 10).

Ces souches de rotavirus à génome réarrangé ont tout d'abord été isolées chez des enfants immunodéprimés (syndrome d'immunodéficience combinée sévère) ayant une infection chronique à rotavirus [258]. Ce phénomène a été reproduit secondairement *in vitro* sur des souches de rotavirus bovins cultivées dans des conditions de haute multiplicité d'infection [132]. Les réarrangements ont été décrits pour les segments 5, 6, 7, 8, 10 et 11, qui codent, à l'exception du segment 6, pour des protéines non structurales. Le réarrangement le plus fréquemment observé concerne le segment 11, mais il reste à déterminer si les réarrangements du segment 11 sont réellement plus fréquents, ou s'ils confèrent un avantage sélectif aux virus, rendant leur détection plus aisée [259]. Les virus à génome réarrangé ne sont généralement pas défectifs, ainsi que l'ont démontré Allen et al. [260] par des expériences de réassortiment génétique entre des rotavirus humains à génome réarrangé et des rotavirus bovins. Les auteurs ont isolé en culture des virus réassortants bovins comportant le segment humain réarrangé en lieu et place du gène bovin homologue, prouvant ainsi que le gène réarrangé est fonctionnel. Certaines séquences de gènes réarrangés sont connues [261]. Dans la plupart des cas, elles consistent en des duplications partielles de la région codante. La longueur du segment est donc augmentée, mais le cadre de lecture est préservé, les régions 3' et 5' non codantes sont conservées, et la protéine produite est identique à celle codée par le gène normal. Un virus à génome réarrangé peut encapsider jusqu'à 2 000 paires de bases supplémentaires sans que sa

viabilité soit affectée. Aucun des variants génomiques présentés dans la littérature n'apparaît comme une mosaïque (recombinaison au sens propre) comportant des séquences provenant de plusieurs segments, ou comportant des séquences provenant du génome de la cellule hôte (contrairement à ce qui a pu être observé pour le virus de la grippe) [251].

Il existe cependant des réarrangements touchant le cadre de lecture et conduisant à la synthèse de protéines modifiées [262]. Certains variants bovins à gène 5 réarrangé comportant des modifications importantes du cadre de lecture de la protéine NSP1 ont été isolés [263]. Ces mutants ne sont pas défectifs, bien que la protéine NSP1 ne soit pas synthétisée, mais présentent un phénotype altéré : diminution de la taille des plages en culture *in vitro*. Par ailleurs, Tian et al. ont décrit une souche brvA de rotavirus bovin possédant un réarrangement du segment 5 responsable d'une duplication partielle de la phase de lecture [262]. Une mutation ponctuelle produit un codon non-sens codant pour une protéine NSP1 tronquée comportant 258 acides aminés au lieu de 491.

Un autre variant (brvE) possédant un segment 5 réarrangé code pour une protéine NSP1 comportant 728 acides aminés. Ces deux variants possèdent également un phénotype « petite plage ». Il semble donc que le réarrangement conduit plutôt à un désavantage pour la multiplication du virus. Toutefois, Xu et al. ont montré qu'un réarrangement du gène 6 (protéine VP6) pouvait conduire à un avantage sélectif pour le virus [264].

Le mécanisme moléculaire à l'origine des réarrangements est actuellement inconnu, l'hypothèse la plus couramment admise étant un dysfonctionnement de l'ARN polymérase virale lors de la réplication. Ce phénomène de réarrangement génomique pourrait être un mécanisme d'évolution génétique des rotavirus. La possibilité de diffusion des souches de rotavirus à génome réarrangé chez des enfants non immunodéprimés a été récemment évoquée [265]. L'importance du phénomène reste cependant à établir, de même que la pathogénicité propre à ces souches.

5.3. Les réassortiments génétiques

Le réassortiment génétique entre deux virus distincts est un échange de segments d'ARN codant pour des gènes homologues. Il survient lors d'une infection mixte et génère des virus

réassortants constitués d'une mosaïque des gènes des virus parentaux.

La nature segmentée du génome du rotavirus peut faciliter le réassortiment entre différentes souches lors d'une infection mixte conduisant à une variété de phénotypes [266]. Des études *in vitro* et *in vivo* ont indiqué que le réassortiment des segments de gènes de rotavirus se produit à une fréquence élevée lors d'infections mixtes de deux souches de rotavirus ou plus. La capacité de rotavirus à réassortir lors d'infections mixtes provoque un échange de matériel génétique entre les virus animaux et humains [267-269], générant ainsi de nouvelles souches virales.

Le rôle des séquences conservées des extrémités 3' et 5' non codantes paraît déterminant au cours du réassortiment. Des séquences consensus trop divergentes interdisent la possibilité d'un réassortiment des gènes. Ainsi, il ne semble pas exister de réassortiment possible entre des rotavirus de groupes différents ou entre des rotavirus et d'autres virus de la famille des Reoviridæ. En revanche, pour les rotavirus du groupe A, des réassortiments sont possibles entre des rotavirus d'espèces différentes et des rotavirus de sous-groupes ou de sérotypes différents (réassortants intertypiques).

D'après les données d'expériences réalisées *in vitro* en culture de cellules et même *in vivo* sur des modèles animaux, le réassortiment génétique lors d'une infection mixte est un événement très fréquent. *In vitro*, l'obtention de virus réassortants est possible, même en l'absence de pression de sélection visant à éliminer les virus parentaux (anticorps neutralisants par exemple).

Dans ces conditions, une infection mixte génère plus de 50 % de virus réassortants après un cycle de réplication virale [270, 271]. *In vivo*, des expériences réalisées chez la souris ont montré que, 72 à 96 heures après une infection mixte, 100 % des virus obtenus étaient des virus réassortants.

Le réassortiment génétique n'est pas un phénomène aléatoire. En effet, on constate *in vitro* que la fréquence de réassortiment n'est pas identique pour tous les segments et que certains segments sont souvent cosélectionnés dans les réassortants (coségrégation). Il existe vraisemblablement des associations protéiques plus favorables que d'autres pour la multiplication du virus. Au cours du réassortiment, des associations seront sélectionnées,

aboutissant à une coségrégation non aléatoire d'un groupe de segments génomiques (on parle de constellation de gènes). Dans la nature, cette coségrégation semble également exister, comme en témoigne l'association retrouvée pour les rotavirus humains entre la spécificité de sous-groupe I (portée par le segment 6) et l'électrophorétype court (défini par les segments 10 et 11). Certaines souches de rotavirus isolés chez l'homme correspondent vraisemblablement à des virus réassortants naturels entre des virus humains ou entre des virus humains et animaux. Ainsi, des spécificités antigéniques G ou P, inhabituelles dans leur type ou leur association, semblent correspondre à des réassortants intertypiques.

Des expériences d'hybridation moléculaire ont également montré que certains virus humains comportent des segments ayant une forte homologie avec ceux des virus animaux. D'une façon générale, les réassortiments naturels semblent plus fréquents dans les pays en voie de développement où les conditions d'hygiène (en particulier la contamination des eaux par des excréments d'origine humaine et animale) favorisent les infections mixtes (jusqu'à 30 %) et donc les réassortiments. Cette transmission interespèces, associée au réassortiment génétique, pourrait être impliquée dans l'émergence de souches virales de virulence atténuée (ainsi par exemple, la protéine VP4 des souches isolées chez les nouveau-nés asymptomatiques est très proche de la protéine VP4 de souches bovines apathogènes). Il n'est cependant pas exclu que les réassortiments génétiques puissent être associés à l'émergence de souches plus virulentes, bien qu'aucune situation pandémique liée à un tel phénomène n'ait été décrite à ce jour.

Sur le plan expérimental, l'utilisation du réassortiment comme outil génétique a permis l'identification des gènes viraux responsables de différents phénotypes biologiques. Le réassortiment génétique est en particulier un outil très utile pour la caractérisation des mutants thermosensibles ts (le phénotype ts est défini par l'incapacité du mutant à se multiplier à 39 °C alors que sa multiplication est possible à 33 °C). Pour un mutant ts donné, il est possible de déterminer le gène porteur de la mutation par réassortiment entre le mutant ts et un virus non muté pour ce gène. Lors du réassortiment, la substitution du gène muté par le gène sauvage homologue va restaurer le phénotype sauvage chez les réassortants (capacité à se multiplier à 39 °C). L'analyse des virus réassortants a ainsi permis de caractériser différentes collections de mutants ts et de préciser la fonction de certaines protéines.

Une autre application du phénomène de réassortiment génétique à l'étude des rotavirus a été l'adaptation en culture cellulaire de rotavirus humains non cultivables *in vitro*. L'analyse des virus réassortants entre un rotavirus bovin ts cultivable et un rotavirus humain non cultivable a montré que tous les virus réassortants capables de se multiplier en culture possèdent le gène 4 du rotavirus bovin. Cela constitue la preuve que le facteur de restriction de la culture des rotavirus est lié à la protéine VP4 codée par le gène 4.

En dernier lieu, le réassortiment génétique a été utilisé pour l'obtention de souches vaccinales. Ainsi des virus vaccinaux ont été fabriqués par réassortiment génétique entre une souche animale et des rotavirus humains de sérotypes différents.

6. Symptômes cliniques, pathogénie et traitement

La gravité et la localisation de l'infection par le rotavirus varient selon les espèces animales et surtout l'âge. L'infection est presque exclusivement limitée à l'intestin grêle. Le rotavirus infecte les entérocytes matures se situant dans les parties supérieures des villosités du petit intestin [272]. Au niveau cellulaire, l'infection est caractérisée par une vacuolisation du cytoplasme et l'atrophie des villosités.

Diverses études cliniques témoignent de la virulence des rotavirus [243, 273, 274]. Les enfants âgés de plus de 6 mois jusqu'à 5 ans développent une pathologie sévère tandis que les nouveaux-nés ont une pathologie modérée voire asymptomatique. Les adultes infectés par contact avec des enfants infectés sont asymptomatiques et représentent un réservoir majeur des rotavirus dans les populations [273].

Les infections à rotavirus provoquent divers symptômes qui peuvent varier de légers à graves et être également asymptomatiques [272, 275, 276]. Les symptômes comprennent les vomissements, la diarrhée, la fièvre et une sensation générale de maladie, y compris la fatigue et la faiblesse [277]. Un retard de la digestion a également été observé [278]. Les modifications histopathologiques ne peuvent pas expliquer à elles seules les symptômes cliniques, car ces derniers apparaissent parfois avant que les modifications histologiques ne soient apparentes [277]. La plupart des études ont porté sur la manière dont les rotavirus induisent la diarrhée, bien que les vomissements contribuent à la déshydratation et compliquent le traitement standard par thérapie de réhydratation orale (ORT). La diarrhée et

les vomissements sont tous deux des mécanismes de protection évolutifs supposés aider l'hôte à se débarrasser des éléments ingérés, par exemple des toxines et des agents pathogènes. Même la fièvre [279] et la sensation de fatigue ont été suggérées comme mécanismes de protection, concentrant l'énergie pour combattre l'infection [280].

In vivo, les rotavirus ont un fort tropisme pour les entérocytes matures de l'intestin grêle où ils induisent des lésions à l'origine d'une diarrhée multifactorielle à triple mécanisme. Sous l'effet des protéines virales, la multiplication du rotavirus dans les entérocytes aboutit à la dérégulation de leurs fonctions, puis à leur destruction, entraînant une diarrhée par malabsorption, une diarrhée osmotique (due à la présence de résidus glucidiques dans la lumière intestinale) et une diarrhée sécrétoire (Figure. 11).

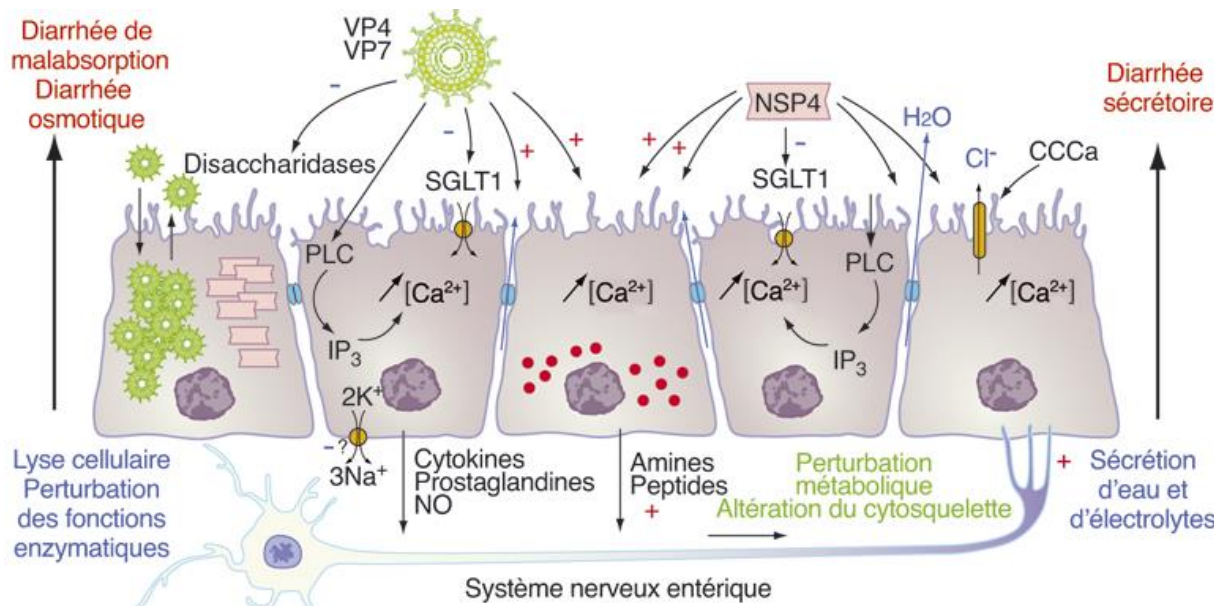


Figure 11. Mécanismes de la diarrhée induite par les rotavirus. (D'après A. de Rougemont, P. Pothier, 2010) [281]

La pathogenèse de cette diarrhée est liée aux diverses protéines virales qui jouent un rôle dans l'efficacité de la réplication virale (VP3, NSP2, VP6 et NSP3), l'inhibition de la synthèse des protéines de l'hôte (NSP3), la diffusion extra-intestinale du virus (NSP3 et VP6), l'entrée du virus dans la cellule (VP4 et VP7) et la régulation de l'induction d'interféron (NSP1). L'induction des sécrétions intestinales semble, quant à elle, liée, d'une part, à la protéine

virale non structurale NSP4 qui, telle une entérotoxine, agit à distance sur les cellules non infectées et induit en particulier une augmentation du calcium intracellulaire responsable de l'activation de pompes membranaires; d'autre part à l'activation du système nerveux entérique par des substances virales ou cellulaires /telle que la sérotonine [276, 282-286]. Les infections à rotavirus se caractérisent également par des vomissements. Il a été récemment démontré que l'infection entraîne le relargage de sérotonine par les cellules entérochromaffines. Celle-ci est impliquée dans l'activation des zones du cerveau impliquées dans les nausées et dans les vomissements [283].

Le traitement de référence de la gastro-entérite à rotavirus est la réhydratation orale (ORT), avec une solution sucrée-salée, recommandée par l'OMS [287]. En outre, l'OMS recommande que les enfants reçoivent, en même temps que l'ORT, un traitement au zinc qui réduit la durée et la gravité des épisodes de diarrhée, le volume des selles et la nécessité de soins médicaux avancés. Le zinc inhibe la sécrétion de chlorure (Cl-) par médiation de l'Adénosine Monophosphate cyclique (AMPc) en bloquant les canaux ioniques du côté basolatéral des cellules épithéliales [288, 289]. De plus, l'OMS déclare que le lait maternel est un excellent fluide de réhydratation et que l'allaitement doit être poursuivi en même temps que la thérapie de réhydratation orale. Les enfants non allaités souffrant de diarrhée devraient continuer à être nourris pendant cette dernière, car l'apport alimentaire favorise l'absorption de liquide de l'intestin dans le sang, ce qui prévient la déshydratation et aide à maintenir l'état nutritionnel et la capacité à combattre l'infection.

7. Réponse immunitaire

L'infection à rotavirus induit une immunité innée et une immunité adaptative spécifique. L'immunité innée se manifeste au début de l'infection et joue un rôle important dans la pathogénèse et/ou la protection contre les maladies à rotavirus chez les enfants. L'immunité adaptative spécifique apparaît plus tard au cours de l'infection par la stimulation de l'immunité à médiation humorale et cellulaire [290, 291].

De nombreuses études ont montré que l'infection naturelle par le rotavirus protège les enfants contre le développement d'une diarrhée sévère à rotavirus lors de la réinfection [241, 292]. Une étude menée au Mexique, qui a suivi des enfants de la naissance à l'âge de 2 ans et a

recueilli des échantillons de selles hebdomadaires et des échantillons de sang mensuels, a indiqué que les premières infections sont généralement les plus graves et que la gravité de la maladie diminue après les infections ultérieures. L'infection initiale par le rotavirus provoque une réponse homotypique d'anticorps neutralisants contre le virus, tandis que l'infection ultérieure peut provoquer des réponses hétérotypiques [293, 294].

Lors d'une infection à rotavirus, les anticorps produits dans la lumière intestinale sont les plus importants dans la protection passive contre l'infection et sont considérés comme des marqueurs de la réponse immunitaire. Les antirotavirus IgM et IgA sont les isotopes les plus courants que l'on trouve dans le duodénum, la salive et les fèces des nourrissons de moins de 3 mois [295, 296]. Les IgG, IgA et anticorps neutralisants spécifiques des rotavirus peuvent également être détectés dans le sérum et les sécrétions intestinales des patients infectés par le rotavirus. Diverses études ont indiqué la corrélation entre les IgA et IgM sériques et les IgA et IgM muqueuses contre l'infection à rotavirus [295, 297-299]. Plusieurs jours après l'infection primaire par le rotavirus, les anticorps IgM sont les premiers à apparaître, suivis par les anticorps IgA. Les anticorps IgA sériques sont bien conservés, alors que dans les sécrétions muqueuses, ils ne persistent pas très longtemps [295]. Les IgA spécifiques du rotavirus, les cellules auxiliaires T spécifiques du rotavirus et la réponse des anticorps neutralisants peuvent encore être détectés dans les trois à cinq mois suivant une infection aiguë symptomatique par le rotavirus chez les enfants de moins de deux ans [300]. Bien que le mécanisme de la protection à médiation cellulaire ne soit pas entièrement clair, dans le modèle de souris adulte, il semble que les lymphocytes T CD8+ soient responsables de l'élimination des particules de rotavirus [290].

8. Diagnostic

Le diagnostic du rotavirus peut être effectué en identifiant le virus dans les selles du patient à l'aide de techniques telles que les tests de détection d'antigènes, la microscopie électronique (EM), l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE), la technique d'amplification génique par transcription inverse (RT-PCR) et l'isolement du virus [32].

Les tests de détection des antigènes sont les plus utilisés dans les laboratoires de diagnostic et comprennent le test immuno-enzymatique (ELISA), le test d'agglutination des particules de latex (LA) et l'immunochromatographie [301]. Bien que la sensibilité et la spécificité de ces tests soient généralement élevées, ils ne sont conçus que pour détecter les rotavirus du groupe A. De plus, le test ELISA n'est pas une méthode raisonnable après le dixième jour suivant l'infection, lorsque les niveaux d'antigènes dans les selles chutent [302]. La détection des anticorps peut également être utilisée pour le diagnostic des rotavirus, mais elle n'est pas couramment utilisée. Certains rotavirus animaux et humains ont été cultivés avec succès grâce à l'utilisation de cellules rénales de singe primaires et transformées et à l'activation protéolytique du virus par la trypsine avant l'infection [303]. Cependant, les différentes souches de rotavirus varient dans leur capacité à se développer en culture et la culture virale est limitée à des fins de recherche.

La microscopie électronique est relativement rapide et peut être utilisée pour identifier les rotavirus hors groupe A [59]. Cependant, l'accès aux microscopes électroniques n'est généralement pas disponible dans les pays en développement. La technique PAGE est pratique pour la détection de l'ARN de rotavirus extrait directement des échantillons de selles. Le test permet également de détecter les rotavirus hors groupe A. La technique est relativement peu coûteuse et simple, avec une bonne spécificité et sensibilité. En outre, ce test fournit des informations épidémiologiques basées sur le schéma de migration électrophorétique des 11 segments de l'ARNdb [304]. Cependant, la RT-PCR est généralement considérée comme l'outil standard de détection des virus à des fins de recherche [305, 306]. Cette technique qui est très sensible et spécifique, convient également au génotypage et fournit des informations sur les souches de rotavirus en circulation et sur la durée de l'excrétion virale dans les selles [307]. En raison de la dérive génomique continue par des mutations ponctuelles, les amorces utilisées pour le génotypage doivent être modifiées périodiquement [308-310].

9. Épidémiologie du rotavirus

Le rotavirus est distribué de manière uniforme dans le monde entier. Quelles que soient les pratiques d'hygiène ou l'accès à l'eau potable, presque tous les enfants du monde seront infectés par le rotavirus avant l'âge de cinq ans [4]. Toutefois, les conséquences de l'infection sont nettement plus graves selon le lieu de résidence de l'enfant, ainsi la majorité des décès dus à la diarrhée à rotavirus surviennent dans les pays en développement du sous-continent indien et de l'Afrique subsaharienne en raison de l'accès limité aux interventions médicales [274, 311].

Les humains de tous âges sont sensibles à l'infection par le rotavirus, mais les enfants de 6 mois à 2 ans, les prématurés, les personnes âgées et les personnes immunodéprimées sont particulièrement sujets à des symptômes plus graves. Les enfants deviennent plus sensibles après l'âge de 6 mois lorsque la protection conférée par les anticorps maternels diminue [312]. L'âge médian des enfants hospitalisés pour une diarrhée à rotavirus dans de nombreux pays d'Afrique et d'Asie est de 6 à 9 mois, et jusqu'à 80 % d'entre eux ont moins d'un an [313]. En revanche, l'âge médian dans les pays développés est de 13-16 mois et la plus forte proportion de cas survient au cours de la deuxième année de vie [314]. À l'âge de 15 mois, beaucoup ont développé une certaine protection après une infection primaire [3]. Néanmoins, dans les pays développés et en développement, le rotavirus est la principale cause de gastro-entérite grave et est associé à environ 40 % des hospitalisations chez les enfants âgés de moins de 5 ans dans le monde [315].

Au Maroc, une étude de la base des données collectées au niveau des sites sentinelles, entre 2006 et 2010, a permis de décrire l'épidémiologie des GEA à rotavirus. Elle a montré que les GEA à rotavirus évoluent selon une saisonnalité automnale, avec une activité plus élevée durant les mois d'Octobre et Novembre. La tranche d'âge de 3 à 8 mois est la plus touchée. La proportion des cas positifs au rotavirus par rapport à l'ensemble des prélèvements réalisés est de 44% et les génotypes circulant au Maroc sont G1P[8] (55%) suivie de G9P[8] (12%), G1G2P[8] (7%), G2P[6] (7%) et G1P[6] (2%) [18, 316].

9.1. Transmission

Le virus se transmet par voie oro-fécale de personne à personne ou par l'intermédiaire d'objets contaminés [317]. Des taux de transmission élevés de rotavirus ont été associés à la double condition d'une concentration extrêmement élevée de virus dans les fèces des individus symptomatiques et asymptomatiques (plus de 10⁹ particules virales/g) et des faibles inoculums nécessaires à l'infection (10-100 particules virales). La contamination virale généralisée de différentes réserves d'eau (à l'exception peut-être de l'eau de mer) et la persistance prolongée du virus infectieux dans les eaux souterraines et de surface peuvent contribuer aux taux élevés de prévalence de l'infection à rotavirus dans le monde [318, 319]. Dans les pays tempérés tels que le Maroc, les infections à rotavirus atteignent un pic en hiver et au début du printemps, avec moins de cas à d'autres moments. Dans les pays tropicaux, les infections se produisent tout au long de l'année, bien que l'on observe davantage de cas pendant les mois les plus frais et les plus secs [314].

9.2. Prévalence des génotypes de rotavirus du groupe A

Les rotavirus sont classés selon leur génotype qui est déterminé par les gènes codant la protéine VP4 (génotype P) et VP7 (génotype G). Cette nomenclature binaire, G et P, offre en théorie une grande diversité des génotypes des rotavirus. En pratique, cette diversité génotypique est plus limitée. Ainsi, seul un petit nombre de génotypes de rotavirus sont détectés chez l'homme au cours des trois dernières décennies : Les génotypes G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8], et plus récemment G9P[8] et G12P[8] ont co-circulé à haute fréquence, contribuant à 80-90 % de toutes les infections à rotavirus en Amérique du Nord, en Europe et en Australie [27, 28, 320]. En revanche, dans les pays d'Afrique, d'Asie et d'Amérique du Sud, d'autres génotypes tels que le G5, le G6 et le G8 sont plus répandus [35, 321-324].

Dans les pays européens, il existe chaque année des fluctuations entre les génotypes prédominants, par contre l'émergence et la prédominance de génotypes inhabituels est rare [281, 325, 326]. Des associations G/P inhabituelles ont été caractérisées et sont bien souvent le produit de réassortiments entre souches humaine et animale ; le génotype G5 est par exemple issu d'une souche porcine [27, 327]. En Inde, au Brésil et en Afrique, les souches de

rotavirus G9P[6], G5 et G8 sont plus fréquentes que dans d'autres parties du monde [27]. Il faut souligner que la plus grande variabilité des rotavirus est observée en Afrique, où les souches circulant avec une combinaison G-P inhabituelles, probablement issues d'une transmission zoonotique, sont les plus fréquentes [323].

Chapitre II :

Vaccins antirotavirus

Chapitre II : Vaccins antirotavirus

1. Généralités

Bishop et al. (1983) ont rapporté que chez les nouveau-nés, l'infection à rotavirus offre une protection significative contre une infection grave à rotavirus mais pas contre une réinfection ultérieure. Par conséquent, un vaccin efficace contre le rotavirus doit être administré dès la petite enfance. Potentiellement, le vaccin est utilisé pour prévenir une diarrhée grave à rotavirus (qui peut entraîner une déshydratation ou la mort) en induisant une réponse protectrice similaire à celle induite par une infection naturelle. Le site initial de l'infection à rotavirus est la muqueuse intestinale et presque tous les vaccins antirotavirus développés sont des vaccins vivants atténués par voie orale. Par conséquent, les vaccins oraux ont été considérés comme les meilleurs pour induire une réponse immunitaire protectrice contre le rotavirus.

La mise au point de vaccins efficaces contre le rotavirus s'est avéré d'une priorité absolue. On a estimé qu'un vaccin efficace contre le rotavirus pourrait (1) réduire de 30 % tous les décès dus à la diarrhée dans le groupe d'âge 3-24 mois dans les pays en développement ; (2) réduire le nombre de décès d'environ 2,5 millions d'enfants d'ici 2025 [328]; (3) réduire le nombre d'hospitalisations liées à la diarrhée et (4) réduire les coûts médicaux et indirects élevés des maladies à rotavirus [10].

Les souches de rotavirus humaines et animales partagent un groupe antigénique commun (VP6). La protéine virale VP6 est la protéine la plus immunogène et porte des épitopes spécifiques à un groupe ou à un sous-groupe. Diverses études épidémiologiques utilisant des modèles animaux ont démontré une bonne protection hétérotypique, soutenant une approche Jennerienne du développement des vaccins [329, 330]. L'approche Jennerienne impliquait l'utilisation d'une souche animale vivante et atténuée de rotavirus comme vaccin candidat [331]. Les efforts déployés pour mettre au point des vaccins vivants atténués par voie orale contre la diarrhée humaine à rotavirus ont abouti à cinq candidats : vaccins au rotavirus bovin, au rhésus, au réassortant rhésus-humain, au réassortant bovin-humain et ovin.

2. Vaccins anti-rotavirus commerciaux

Plusieurs études cliniques chez les enfants, y compris des études de cohorte bien conçues, ont démontré de manière concluante qu'une infection naturelle par le rotavirus protège contre la réinfection, mais que la protection est incomplète [241, 332]. Les enfants (et probablement les adultes) peuvent être réinfectés plusieurs fois au cours des ans, mais la grande majorité d'entre eux ne subiront tout au plus qu'un épisode clinique modéré à sévère lors de leur première rencontre avec le virus.

Cette observation clinique a été à la base du concept « l'infection induit l'immunité protectrice », qui a conduit au concept « le vaccin induit l'immunité protectrice » [6]. La preuve du concept « l'infection induit l'immunité protectrice » a été apportée au début des années 1990 avec la première génération de vaccins antirotavirus utilisant l'approche Jennérienne initiale. Les vaccins étaient des souches animales monovalentes naturellement atténuées. Les essais cliniques de trois de ces vaccins ; le sérotype bovin G6 (RIT 4237 et WC3) et le sérotype rhésus G3 (vaccin contre le rotavirus rhésus [RRV]) ont donné une efficacité élevée (82 % à 100 %) contre les maladies graves à rotavirus dans les pays à revenu élevé. Cependant, les vaccins de première génération ont produit une protection sous-optimale dans les milieux à faibles revenus en Gambie, au Pérou, au Rwanda et en République centrafricaine, ainsi que dans les réserves indiennes américaines [3, 312]. Cette observation a fourni une indication précoce du potentiel de différences d'efficacité entre les régions en développement et les régions développées.

La deuxième génération de vaccins antirotavirus a utilisé l'approche Jennérienne modifiée, qui comprend des virus réassortis avec le squelette d'une souche animale qui incorporent les gènes VP7 ou VP4 humains. En août 1998, Rotashield (Wyeth-Lederle, États-Unis), une formulation orale d'un vaccin réassorti tétravalent humain simien, a été homologué pour une utilisation chez les enfants à l'âge de 2, 4 et 6 mois. Toutefois, le produit a été retiré du marché un an plus tard en raison d'un risque accru d'invagination intestinale, avec un risque attribuable estimé à 1:10000 [333, 334].

En 2006, deux vaccins candidats se sont révélés bien tolérés et efficaces lors de vastes essais de phase III : RotaTeq® (Merck & Co. Inc., États-Unis) composé de cinq souches bovines-

humaines réassorties, incluant les génotypes G1-G4 et le génotype P1A[8] et Rotarix® (GlaxoSmithKline Biologicals, Belgique) comprenant une souche P1A[8]G1 atténuée chez l'homme. Les deux vaccins sont administrés par voie orale ; le Rotarix® en deux doses et le RotaTeq® en trois doses [8, 9]. Ayant démontré une bonne efficacité (85 %-98 %) contre la diarrhée sévère à rotavirus lors d'essais cliniques menés en Amérique et en Europe [11, 12] , ces vaccins ont été introduits dans le calendrier de vaccination de routine de plusieurs pays de ces régions. Suite à l'introduction du vaccin, une baisse impressionnante des hospitalisations pour rotavirus et diarrhées toutes causes confondues a été observée dans de nombreux pays [335]. Au Mexique et au Brésil, des réductions de 35 % et 22 % respectivement de la mortalité liée à la diarrhée ont été observées chez les enfants de moins de 5 ans, suite à l'introduction du vaccin antirotavirus [336, 337]. Néanmoins, l'Organisation mondiale de la santé (OMS) a exigé que l'efficacité de ces vaccins soit démontrée spécifiquement dans les pays à faible revenu d'Afrique et d'Asie avant de recommander leur inclusion dans le programme mondial de vaccination des enfants [338]. Cela s'explique par le fait que l'efficacité d'autres vaccins oraux vivants a varié selon les groupes de population, l'efficacité étant plus faible dans les milieux pauvres en ressources. En outre, l'Alliance Globale pour les Vaccins et l'Immunsation (GAVI) a conditionné son aide pour les pays en développement à financer l'introduction du vaccin contre le rotavirus uniquement si son efficacité est démontrée dans la région [312].

3. Efficacité des vaccins anti-rotavirus

Par conséquent, divers essais cliniques évaluant l'efficacité de Rotarix® et de RotaTeq® dans les pays en développement d'Afrique et d'Asie ont été réalisés. Les résultats de ces essais ont indiqué que l'efficacité est sensiblement plus faible dans ces contextes plus difficiles, avec des taux d'efficacité allant de 40 à 70 %, avec une moyenne de 50 à 60 % [13-15]. Une étude sur le Rotarix® en Afrique du Sud et au Malawi a révélé une efficacité de 61 % contre les gastro-entérites graves à rotavirus au cours de la première année de vie [14]. Quant au vaccin RotaTeq®, ce dernier avait une efficacité globale de 64 % contre les gastro-entérites graves à rotavirus au cours de la première année de vie dans trois sites d'étude : Kenya, Mali et Ghana

[13]. L'évaluation de l'efficacité clinique de RotaTeq® pour la prévention des gastro-entérites graves à rotavirus chez les nourrissons au Bangladesh et au Vietnam a révélé une efficacité vaccinale de 48,3 % pendant près de deux ans consécutive [15].

La raison de cette efficacité plus faible n'a pas été entièrement expliquée, mais imite, d'une certaine manière, l'efficacité plus faible d'autres vaccins oraux vivants tels que le vaccin poliomyélite (VPO) et les vaccins oraux contre le choléra et la typhoïde dans des contextes similaires [312]. Les explications possibles comprennent : l'effet inhibiteur de titres élevés d'anticorps maternels transférés au nourrisson soit par le placenta soit par le lait maternel, chacun de ces titres pouvant diminuer le titre du vaccin et de ce fait diminuer son effet ; l'entéropathie environnementale (EE) ; les différences entre le microbiote intestinal ou les villosités intestinale des nourrissons vivant dans des milieux pauvres en ressources et ceux des milieux plus riches ou l'interférence avec d'autres virus dans l'intestin, y compris les virus du vaccin oral anti-polio; il y a aussi les différences dans l'épidémiologie des rotavirus et la distribution des sérotypes des souches candidates entre les différents environnements.

Néanmoins, même avec une efficacité moindre que dans les milieux à revenus élevés et moyens, une réduction importante du nombre absolu de cas de gastro-entérites graves et de décès est attendue grâce à l'utilisation de ces vaccins dans les pays en développement d'Afrique et d'Asie en raison de l'incidence plus élevée des maladies graves et de la mortalité dans ces milieux. Ultérieurement, en 2009, l'OMS a recommandé que les vaccins contre le rotavirus soient introduits dans tous les programmes nationaux de vaccination, en particulier lorsque les décès dus à la diarrhée représentent $\geq 10\%$ de la mortalité infantile [10]. Cette recommandation a été faite en partant du principe que, malgré une efficacité moindre, les vaccins permettraient de prévenir un grand nombre de maladies graves et de décès dans les pays en développement à forte mortalité en Afrique et en Asie.

4. Vaccination anti-rotavirus au Maroc

Le vaccin Rotarix® a été introduit dans le Programme National de Vaccination du Maroc en octobre 2010, atteignant rapidement 87% de la population cible des enfants au niveau national. L'incidence des gastro-entérites à rotavirus et la prévalence des souches de rotavirus

circulantes ont été surveillées dans trois hôpitaux sentinelles depuis juin 2006. Le pourcentage moyen de cas positifs pour le rotavirus parmi tous les enfants de moins de 5 ans hospitalisés pour une gastro-entérite au cours de la période précédant la vaccination (2006-2010) était de 44 %. Ce pourcentage est tombé à 29 %, 15 % et 24 % dans les trois années qui ont suivi l'introduction du vaccin (2011, 2012 et 2013), soit une baisse de 34 %, 66 % et 45 %, respectivement. Les baisses de prévalence ont été plus importantes chez les enfants de 0 à 1 an (53 %) et ont été plus marquées pendant la saison hivernale et automnale. la prévalence des génotypes G2P[4] et G9P[8] a par contre fortement augmenté au cours de la période post-vaccinale (2011-2013) par rapport aux saisons précédentes (2006-2010). Les vaccins antirotavirus ont ainsi permis de réduire considérablement le nombre d'enfants hospitalisés pour cause d'infection à rotavirus dans les trois hôpitaux sentinelles ; on ignore toutefois si la prédominance des génotypes G2P[4] et G9P[8] est liée à l'introduction du vaccin ou si elle est imputable à des fluctuations normales du génotype [339].

Chapitre III :
Transmission inter espèces et
caractère zoonotique du rotavirus

Chapitre III : Transmission inter espèces du rotavirus ou caractère zoonotique du rotavirus

1. Généralités

Les rotavirus sont généralement spécifiques à une espèce, mais la transmission inter-espèces est possible, comme cela a été démontré expérimentalement. Plusieurs études de cas ont indiqué une infection de l'homme par des rotavirus animaux. La comparaison des séquences génétiques des rotavirus humains et animaux révèle souvent une identité étroite. La surveillance des rotavirus circulant dans la population humaine a révélé la présence de plusieurs génotypes peu communs. Beaucoup d'entre eux ont été trouvés chez des animaux domestiques, et il est possible qu'ils soient apparus dans la population humaine par transmission zoonotique. La faible incidence de souches peu communes suggérerait que cette transmission, ou du moins l'établissement d'un rotavirus animal ou d'un virus réassorti humain/animal dans la population humaine, ne se produit pas avec une grande fréquence. Cependant, plusieurs millions de personnes seront exposées chaque année à des rotavirus animaux. Cela se produit au sein des communautés agricoles, et potentiellement chez les visiteurs des campagnes. Il se peut que les excréments du bétail contaminent l'environnement dans une certaine mesure. Cette exposition peut ne pas entraîner des niveaux d'infection élevés, mais une certaine infection peut se produire. Il peut y avoir un apport continu de souches ou de séquences de rotavirus dans la population humaine à partir de la population animale, bien qu'à un niveau très faible.

Même s'il existe de nombreux exemples de souches de rotavirus qui semblent avoir été dérivées via une transmission inter-espèces, il existe peu d'exemples documentés où l'événement de transmission a impliqué une constellation entière de gènes du virus.

Les rotavirus animaux sont considérés comme un réservoir potentiel d'échange génétique avec les rotavirus humains. Il y a maintenant de plus en plus de preuves que les rotavirus animaux peuvent infecter les humains, soit par transmission directe du virus, soit en apportant un ou

plusieurs gènes à des réassortiments ayant essentiellement un fond génétique de souche humaine [340, 341].

Depuis le nouveau système de classification des virus défini par Matthiessens et al, on comprend mieux les interactions complexes entre les rotavirus humains et animaux. Ainsi chez les rotavirus groupe A humains, trois groupes géniques ont été identifiés : Wa-like, DS-1-like et AU-1-like. L'évolution d'une étroite parenté d'une part, entre la souche humaine Wa-like et les souches de rotavirus porcins et d'autre part, entre la souche humaine DS-1-like et les souches de rotavirus bovins, suggère ainsi que les rotavirus humains majeurs G et P pourraient reconnaître une origine animale. Une troisième famille de rotavirus, AU-1-like, est composée de nombreux segments retrouvés dans les rotavirus circulant chez les animaux. La fréquente coexistence d'infections mixtes (par deux souches différentes de rotavirus), surtout notée lors d'un pic épidémique, sera à l'origine d'échanges de gènes entre les virus (reassortiments) ce qui explique la diversité des souches, en particulier dans certains pays en voie de développement dont le Maroc [25]. Beaucoup de ces génotypes ((G6, G8, G10, G11) et (P ([1], [3], [9], [10], [11], [14], [19] et [25])) sont soupçonnés de provenir de rotavirus animaux qui ont été introduits dans les populations humaines par transmission inter-espèces et / ou réassortiments de gènes, l'un des principaux moyens par lesquels la diversité génétique du rotavirus est générée [27]. Un nombre croissant de souches de rotavirus humain P[14], principalement en combinaison avec G6 et, dans une moindre mesure, avec le G8 et G3, ont été décrits dans le monde entier [342-345]. Les premières souches de rotavirus humain, G6P[14] ont été détectées en Italie entre 1987 et 1989 chez les jeunes enfants atteints de gastroentérites [346]. Plusieurs souches humaines G6P[14] ont été isolées dans le sud et le centre de l'Australie entre 1993 et 1997, et en Hongrie en 1997 [49].

2. Transmission inter espèces humain-félin- canin

Le premier virus humain atypique étudié en détail était le AU-1, qui a été retrouvé chez un nourrisson au Japon en 1982 [347]. L'analyse de l'hybridation a montré que ce virus était étroitement apparenté à un virus félin standard (FRV-1). La relation entre les rotavirus humain et félin a été établie par l'analyse d'une souche humaine atypique, Ro1845 isolée en

Israël en 1985 [348]. Le rôle des félins en tant que source d'infection par les rotavirus chez l'homme a d'abord été évoqué par Birch et al [349] et est confirmé par les observations ci-dessus. Ce rôle est également suggéré par l'analyse des virus G6 humains dont on pense qu'ils sont issus d'un croisement entre espèces de bovins, où G6 est un génotype commun. Un de ces virus G6 humains, PA151 [350], contient un allèle VP4 qui est apparenté aux virus félins [351].

Par conséquent, Les félins peuvent donc avoir joué un rôle intermédiaire dans le transfert des virus G6 des bovins aux humains. Le lien a été appuyé par des études d'hybridation suggérant que la souche PA151 était le produit du réassortiment intergénogroupe entre les virus appartenant aux génogroupes bovins et AU-1 [352].

D'autres preuves de la transmission des rotavirus des félins et des chiens aux humains proviennent de l'analyse de la souche humaine HCR3, qui a été isolée chez un nourrisson asymptomatique aux États-Unis en 1984 [353].

Ce virus a montré une activité hémagglutinante et a réagi aux anticorps monoclonaux de manière similaire à celle des souches félines et canines. L'analyse de la séquence des gènes VP4 et VP7 du HCR3 a révélé un niveau élevé d'identité avec les souches félines et canines [352, 354] , tandis qu'une récente analyse d'hybridation a montré que le HCR3 formait 11 bandes hybrides avec les virus félins et canins, mais pas avec les virus humains communs [355]. Cela suggère que le HCR3 pourrait avoir été transmis à l'homme en tant que virus entier. Au final, Il a été suggéré que les virus de type AU-1 circulent chez l'homme à la fois comme génomes entiers de AU-1 et comme réassortants avec des virus bovins par un processus évolutif continu [356].

3. Transmission inter espèces humain-bovin

Les rotavirus de génotype G6 sont des agents pathogènes courants des bovins [357], cependant, des virus G6 humains ont été isolés chez des enfants hospitalisés en Italie [350] et en Australie [358, 359]. Deux des souches italiennes (PA151 et PA169) ont été analysées par hybridation et une homologie avec les virus G6 bovins dans les gènes 10 et 11 a été observée.

Lorsqu'ils ont été testés, il a été déterminé que les virus australiens avaient le même gène VP4 que le PA169. Étant donné que le gène VP4 est impliqué dans la restriction de la gamme d'hôtes [360], cela suggère que ces virus peuvent être des rotavirus de type animal qui ont acquis un nouveau gène permettant l'infection et la réplication chez l'homme. Une étude des virus standard et des isolats cliniques italiens a révélé qu'un seul (un virus G6) parmi quatre virus humains atypiques et aucun des 50 virus humains typiques ne portait le gène [14] [361]. Ce génotype a également été trouvé en association avec certains isolats humains du génotype G8 de diverses origines géographiques et des isolats G1 d'Afrique du sud [362]. Des rotavirus du génotype G6 ont également été trouvés chez les ovins, les caprins et les porcins.

Les génotypes G8 des rotavirus, ont été isolés pour la première fois chez des enfants atteints de gastro-entérite aiguë en Indonésie [363], mais ont depuis été trouvés chez des bovins, des porcs et un cheval. L'analyse d'hybridation des génomes des virus G8 humain et bovin suggère que : i) ce génotype existe sous forme de virus épidémiologiquement distincts qui peuvent provenir de sources différentes [364] et ii) les virus G8 humain et bovin possèdent des gènes VP4 et NSP1 différents [365]. Le premier point peut expliquer la répartition géographique large de ce génotype chez l'homme par rapport au génotype G6. Le deuxième point soutient l'idée que ces virus sont la combinaison d'une constellation de gènes bovins avec des gènes (VP4 et/ou NSP1), qui sont tous deux impliqués dans la restriction de la gamme d'hôtes permettant la réplication dans des espèces appropriées, comme le suggère une analyse similaire menée sur les génotypes G6.

La preuve directe qu'un réassortiment de virus humain-bovin est possible, provient de la description d'un nourrisson doublement infecté par un rotavirus humain et un rotavirus bovin [366]. En outre, l'exposition humaine naturelle aux virus bovins est attestée par des enquêtes sérologiques qui ont montré la présence d'anticorps contre les sérotypes G6 [367] et G8 [368, 369] dans le sérum prélevé sur des enfants et des adultes. Toutefois, des taux relativement faibles d'infection grave des humains par les génotypes G6 et G8 ont généralement été signalés. Cela peut être dû à une protection croisée résultant d'une exposition antérieure aux rotavirus bovins.

4. Transmission inter espèces humain-porcin

Les rotavirus de génotype G5 ont été associés à des infections symptomatiques chez les porcs et les chevaux [370], mais ce génotype est récemment apparu comme une cause importante de diarrhée chez l'homme. Des enquêtes menées au Brésil ont permis de détecter ce génotype chez les enfants [371, 372] et ont indiqué qu'il pourrait être une cause importante d'infection infantile (représente 30 % des échantillons dans une enquête).

Une autre preuve de transmission de gènes entre les porcs et les humains provient de la définition d'un nouveau génotype P humain qui partageait 94,5% d'identité d'acides aminés avec le VP4 d'un rotavirus porcin [373]. Ces résultats indiquent l'émergence de nouvelles souches porcines par réassortiment entre les rotavirus humains et porcins.

Enfin, il convient de noter que l'évolution permanente des rotavirus, notamment par réassortiment et/ou par l'émergence de nouveaux génotypes, sera à l'origine de nouvelles mosaïques virales justifiant l'importance d'une épidémiologie-surveillance constante en médecine humaine et vétérinaire. Cette co-surveillance des souches de rotavirus animales et humaines sera essentielle pour mieux comprendre les relations entre les virus en circulation et évaluer tout programme de vaccination pertinent.

5. Analyse phylogénétique : la parenté interspécifique et l'évolution des rotavirus

L'analyse des séquences des gènes de rotavirus de nombreuses espèces a montré des relations génétiques suggérant une ascendance commune pour certaines espèces. En particulier, la parenté des rotavirus humains et porcins dans la phylogénie des gènes structurales et non structurales et des protéines est évidente et peut indiquer un échange passé ou continu de gènes entre les espèces.

5.1. Gènes structurales

Un certain nombre de gènes et de protéines de rotavirus ont été associés à la pathogénèse et à la virulence [360]. Parmi ceux-ci, VP4 a été associé à une restriction de la gamme d'hôtes et, en général, les groupements phylogénétiques de VP4 sont en corrélation avec les espèces d'origine pour chaque souche virale [93].

Outre les exceptions décrites ci-dessus, le type VP4 associé à l'infection néonatale humaine se retrouve également dans certaines souches porcines. L'analyse phylogénétique des séquences VP4 d'une gamme diversifiée d'espèces animales a confirmé l'opinion selon laquelle les souches humaines HCR3 et Ro1845 étaient liées aux rotavirus félins et canins [374].

Les relations entre les souches hétérologues de rotavirus appartenant au même type VP7 ont été détaillées ci-dessus. Ainsi quelle que soit l'espèce, les rotavirus du même type G sont regroupés par analyse phylogénétique [93].

L'analyse phylogénétique des séquences VP6 montre un regroupement par sous-groupe. Les deux groupes contiennent des séquences de rotavirus humains et animaux. Un groupe comprend des virus du sous-groupe I humain et des virus du sous-groupe I animal dérivés de bovins et de singes, tandis que l'autre groupe contient des virus du sous-groupe II d'origine humaine et porcine [93]. Ces associations peuvent indiquer des origines ancestrales diverses pour différents virus humains et sont soutenues par l'analyse des gènes non structurales et une analyse récente des séquences de la protéine VP1 [375].

5.2. Gènes non structurales

Les analyses génétiques et phylogénétiques des gènes non structurales ont indiqué un modèle cohérent de relations évolutives entre certains rotavirus animaux et humains.

Les comparaisons de la protéine NSP1 ont montré que cette dernière avait tendance à se différencier selon les espèces d'origine, à l'exception des protéines humaines et porcines qui ont montré une relation significative [376]. Cette relation était évidente d'après l'analyse phylogénétique des séquences d'acides aminés et l'hybridation utilisant des sondes spécifiques aux gènes [376]. La relation humaine-porcine a été confirmée par une étude ultérieure [377]

qui a également détecté une relation d'inter espèces féline-bovine et équine- porcine. Une autre étude utilisant des sondes génétiques NSP1 dérivées de félins et de chiens dans l'hybridation dot-blot a montré des similitudes entre les souches humaines et félines appartenant au génogroupe AU-1 et les souches félines et canines [378].

Le lien entre les virus humains et porcins a été établi par des études de séquence, de phylogénie et d'hybridation des gènes NSP3 [379] et NSP4 [380-382], tandis que le gène NSP5 d'un rotavirus humain particulier s'est révélé plus proche du NSP5 porcine [383].

Au sein de chaque génotype, les souches d'une espèce particulière ont tendance à se regrouper, ce qui suggère la présence d'un gène conservé au sein des génotypes. Toutefois, la classification des rotavirus d'une même espèce en différents génotypes suggère des événements de transmission inter espèces passés.

Travaux de thèse

Partie I :
Analyse complète du génome du
premier rotavirus humain
G8P[14]. La souche du Maroc
suggère des preuves de
transmission zoonotique

Partie I : Analyse complète du génome du premier rotavirus humain G8P[14]. La souche du Maroc suggère des preuves de transmission zoonotique

1. Objectif de l'étude

Au Maroc, la surveillance de la circulation des souches inhabituelles n'est pas encore effectuée. À cet égard, notre groupe de recherche souligne dans la présente étude, le séquençage complet du génome d'une souche rare humaine de RVA (RVA/Human-tc/MAR/ma31/2011/ G8P[14]) isolée chez un enfant de 18 mois souffrant de diarrhée aiguë. La comparaison des séquences d'acides aminés des régions antigéniques VP8*, VP7 et VP6 entre la souche étudiée et d'autres souches G8 ou P[14] et les souches vaccinales mondiales a également été effectuée.

Cette étude a été réalisée pour mieux comprendre le génotype G8P[14], son origine et son évolution par rapport aux autres souches humaines et animales G8P[14] détectées dans le monde entier.

2. Echantillon de l'étude et caractérisation initiale

L'échantillon fécal ma31 sélectionné pour cette étude a été obtenu à partir d'un garçon de 18 mois atteint de gastro-entérite aiguë (AGE) lors d'une enquête sur la gastro-entérite virale menée entre 2011 et 2013 au Maroc [384]. L'enfant, vivant dans une région rurale près de Rabat, a été admis à l'hôpital universitaire militaire Mohammed V à Rabat en 2011, avec un diagnostic de gastro-entérite légère et un score clinique moyen de 9 au test Vésikari.

L'échantillon a été identifié comme positif pour le RVA à l'aide du test rapide (Duo Rota-Adenovirus-Check-1, VEDA LAB, France) selon les instructions du fabricant (*Cf. Annexe D*); ensuite, 10 % de la suspension de selles a été préparée dans du PBS et l'homogénat a été centrifugé à 5000×g pendant 15 minutes.

+ Extraction de l'ARN viral

L'acide nucléique viral a été extrait à partir du surnageant en utilisant le protocole expérimental fourni par le kit « QIAamp Viral RNA Mini Kit » (Qiagen, Inc., Valencia, CA) (Cf. Annexe II).

+ Dosage et contrôle de la qualité de l'ARN

La quantification et le contrôle de la qualité de l'ARN a été effectué par le spectrophotomètre Nanodrop (ND-8000 Thermo Fisher Scientific) en déposant 1µl de l'échantillon d'ARN. Sachant que la concentration des acides ribonucléique est déterminée par la mesure de la densité optique à 260nm, et que 1 unité DO à cette longueur d'onde correspond à 40ng/µl, la concentration de l'ARN extrait a été calculée. La pureté de l'ARN par rapport aux protéines et aux molécules organiques est déterminée par la mesure de la DO de l'ARN aux longueurs d'ondes respectives 280nm et 230nm. Les ratios A260/A280 et A260/A230 doivent être proche de 2 pour pouvoir conclure que l'ARN est de bonne qualité.

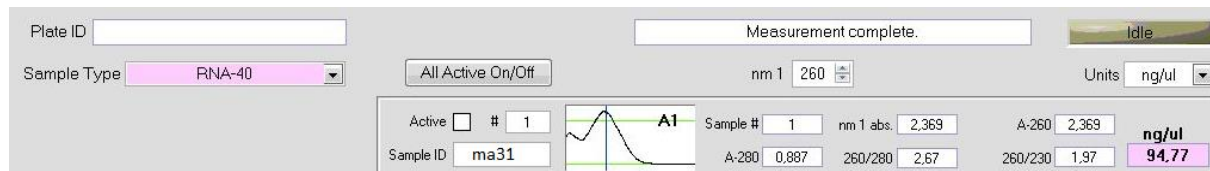


Figure 12. Dosage et contrôle de la qualité de l'échantillon d'ARN ma31 extrait avec le kit QIAamp Viral RNA Mini Kit

+ Amplification partielle des gènes VP4 et VP7 de la souche ma31

L'ARN extrait a été reverse transcrit et amplifié à l'aide d'amorces spécifiques ciblant les gènes VP4 et VP7 (Tableau 3) [309, 310]. Les génotypes G et P ont été déterminés par séquençage partiel avec les mêmes amorces que celles utilisées pour la PCR. En utilisant l'outil de classification en ligne RotaC [385], le génotype de ma31 a été déterminé comme G8P[14].

Tableau 3. Amorces utilisées dans le séquençage partiel de la souche ma31

Amorce	Séquence (5'-3')	Position des nucléotides	Taille de l'amplicon (bp)	Références
VP7-F	ATG TAT GGT ATT GAA TAT ACC AC	51-71nt	881	Iturriza-Gomara et al., 2004
VP7-R	AAC TTG CCA CCA TTTTTT CC	914-932nt		Iturriza-Gomara et al., 2004
VP4-F	TAT GCT CCA GTN AAT TGG	132-149nt	663	Simmonds et al., 2008
VP4-R	ATT GCA TTT CTT TCC ATA ATG	775-795nt		Simmonds et al., 2008

Les détails sur les kits, les protocoles et les instruments utilisés pour caractériser cette souche sont fournis dans les sections suivantes car la même démarche a été utilisée pour le séquençage complet du génome de la souche.

3. Séquençage complet du génome de la souche ma31

3.1. Isolement du rotavirus et extraction de l'ADN viral

Comme ce génotype a été détecté pour la première fois au Maroc, des études supplémentaires comprenant le séquençage complet du génome de cette souche ont été réalisées ; son isolement était donc nécessaire pour éviter de perdre l'échantillon en raison de l'épuisement des selles. L'isolement a été réalisé après un passage sur des cellules de rein de singe rhésus (MA104) comme décrit par Ennima et al. [386].

+ Isolement du rotavirus

A partir du prélèvement, 2 ml de selles ont été placés dans un tube contenant 6 ml de PBS avec des billes de verre. L'échantillon a ensuite été clarifié par centrifugation à 2500 tours/minute pendant 30 min. Le surnageant de l'homogénat a été filtré à travers une membrane de 0,45 µm (Sigma) et stockés à -80 °C jusqu'à son utilisation.

Ensuite, 500 µl du filtrat a été traité avec 15ug de TPCK-Trypsine (CAT No. 9002-93-1, Sigma) pendant 1 h dans un bain-marie à 37 °C après avoir mélangé brièvement. En parallèle, 0,5 ml du milieu DMEM sans sérum a été préparé et constituait le contrôle négatif. Pour une infection efficace des cellules, le milieu de croissance a été retiré des cellules MA104 monocouches et lavé une fois avec 4 ml de milieu DMEM préchauffé sans sérum. Cette étape est essentielle car la présence du sérum inhibe l'activation du rotavirus.

Immédiatement après l'activation, l'échantillon (ou le contrôle) a été inoculé dans une monocouche confluente de cellules MA104 et incubés à 37 °C, avec 5 % de CO₂ pendant 60 minutes pour permettre l'adsorption. Après l'adsorption virale, les cellules ont été observées au microscope pour détecter toute dégénérescence cellulaire due à la trypsine et ont été lavées une fois en utilisant 8 ml de DMEM sans sérum préchauffé. Le milieu de lavage est retiré et 8 ml du milieu sans sérum préchauffé sont ajoutés avec 1 µg/ml de TPCK. Ensuite, les flacons de cellules MA104 infectées et contrôle ont été vérifiés quotidiennement pendant 3 à 6 jours ou jusqu'à l'apparition d'un effet cytopathique (ECP). Les cellules infectées ont été congelées à -20°C jusqu'à leur utilisation soit pour l'extraction de l'ARN viral ou pour de prochaines inoculations sur des cellules fraîches monocouches confluentes pour un autre passage.

+ Extraction de l'ARN viral

L'ARN viral a été extrait par le kit « QIAamp Viral RNA Mini Kit » (Qiagen, Inc., Valencia, CA) à partir de 140µl de culture cellulaire infectée selon le protocole du fabricant (*Cf. Annexe II*). L'ARN extrait a été stocké à -80°C.

3.2. Reverse transcription et amplification du génome entier (RT-PCR)

+ La reverse transcription

L'ARN extrait a été dénaturé à 97 °C pendant 5 minutes puis rapidement refroidi dans la glace pendant au moins 2 minutes en présence d'un mix d'amorces Random Hexamer, de 0,5 mM de dNTP et d'H₂O dans un volume final de 20 µl. L'ADN complémentaire a été synthétisé en utilisant le kit « Tetro cDNA Synthesis kit » (Bioline, London, UK), ainsi le mélange réactionnel de transcription inverse contient la RNase inhibiteur à 10U/µl et la transcriptase

inverse à 20U/ μ l constituant un volume final de 26 μ l dans les conditions suivantes : 25 °C pendant 10 minutes, 45 °C pendant 60 minutes et 85 °C pendant 5 minutes.

+ Amplification du génome

Chaque segment de gène de rotavirus (11 segments) a été amplifié par PCR avec des amorces nouvellement conçues en plus des amorces spécifiques (*Cf. Annexe III*) en utilisant MyFi Mix (Bioline, Londres, Royaume-Uni) selon les instructions du fabricant (*Cf. Annexe IV*). En bref, 2,5 μ l d'ADNc, 0,8 μ M d'amorces spécifiques pour chaque gène et 8 μ l de MyFi Mix ont été ajoutés à l'eau Milli-Q pour constituer un volume final de 25 μ l.

La PCR consiste en une étape d'activation à 95 °C pendant 2 min suivie de 35 cycles d'amplification dans un Thermal Cycler « Veriti » (Life technologies, Inc. Foster City, CA) dans les conditions suivantes : 1 min à 95 °C, 1 min à 60 °C et 1 min à 72 °C, avec une extension finale à 72 °C pendant 8 min.

+ Electrophorèse sur gel d'agarose

L'amplification est vérifiée par le dépôt de 8 μ l de chaque produit PCR mélangé avec 0,5 μ l de tampon de charge (Sigma Aldrich), sur un gel d'agarose à 1,5 % contenant du bromure d'éthidium (10 mg/ml) et en présence du marqueur de poids moléculaire 100bp (Sigma Aldrich). La migration se fait dans du TAE 1x et dure 35 minutes à 120V/100mA et à température ambiante. Le gel a été visualisé sous transilluminateur UV en utilisant le G Box gel documentation system (Syngene) (Figure. 13).



Figure 13. Photo de gel des produits PCR (14 produits PCR) du gène VP3 de la souche ma31

3.3. Séquençage capillaire

+ Purification des produits PCR par ExoSAP

Cette étape de purification permet d'éliminer le reste d'amorces et les nucléotides (dNTPs) qui n'ont pas été utilisés pendant l'amplification (PCR) en utilisant deux enzymes : une exonucléase et une phosphatase alcaline.

Pour ceci, le kit de purification ExoSAP-IT (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) a été utilisé selon le protocole suivant : 2µl de l'ExoSAP-IT est mélangé à 5µl de produit PCR, le tout est incubé à 37°C pendant 15 minutes dans un thermocycleur. Pour inactiver l'ExoSAP-IT, le mélange est incubé à 80°C pendant 15 minutes (Cf. Annexe V).

+ Réaction de séquence

La réaction de séquence a été effectuée par le kit de séquençage « Big Dye Terminator v3.1 » (Life technologies, Inc. Foster City, CA) dans les deux sens avec les mêmes amorces utilisées pour la PCR, en plus d'amorces utilisées uniquement pour le séquençage afin de récupérer le fragment entier. Pour certains gènes (VP1, VP3 et NSP1), la conception de nouvelles amorces a été nécessaire pour compléter le séquençage de l'ensemble du génome (Annexe VI).

Le mélange réactionnel a été préparé manuellement dans des plaques 96 puits, ainsi les réactifs suivants ont été ajoutés en respectant la quantité et l'ordre indiqué ci-dessous (Tableau 4).

Tableau 4. Mélange réactionnel utilisé lors de la réaction de séquence

Mélange réactionnel pour une réaction de séquence	Quantité en μl
1. BigDye	1 μl
2. 5X sequencing buffer	3 μl
3. Primer (0.8 pmol/ μl)	1 μl
4. ADN matrice	2 μl
5. H2O (MiliQ)	3 μl
Volume final	10 μl

Dans la plaque 96, au niveau de chaque puit contenant 2 μl de produit PCR purifié, sont ajoutés 8 μl du mélange réactionnel pour un volume final de 10 μl . la plaque est placée ensuite dans le thermocycleur selon le programme suivant (Tableau 5) :

Tableau 5. Programme de la réaction de séquence

Cycle	Temps	Température °C	
Dénaturation initiale	1 minute	96°C	
Dénaturation	10 secondes	96°C	x 25 cycles
Hybridation	5 secondes	50°C	
Elongation	4 minutes	60°C	

+ Purification des produits de la réaction de séquence

La purification des produits de la réaction de séquence a pour but d'enlever les sels, les dNTPS et les ddNTPs non incorporés durant la réaction de séquence afin d'éviter leur injection dans les capillaires du séquenceur automatique.

Ainsi, 10µl des produits de la réaction de séquence sont ajoutés à 30µl de Milli-Q (stérile), le tout est purifié en présence de Séphadex G50 (Sigma Aldrich) préalablement préparés et conservés à +4°C (*Cf. Annexe VII*).

+ Electrophorèse capillaire et Assemblage des séquences des 11 segments de la souche ma31

Les produits purifiés des réactions de séquence sont ensuite déposés dans une plaque 96 puits, cette dernière est placée sur le séquenceur ABI Prism 3130XL (Life technologies, Inc. Foster City, CA). Une électrophorèse capillaire y est réalisée. Les données du séquençage ont été recueillies ensuite sous forme d'électrophorégrammes qui se présentent sous forme de pics de fluorescence.

La visualisation des électrophoregrammes recueillis est effectuée par le logiciel « Sequence Scanner V1.0 » (Applied Biosystems) (Figure 14). Il permet également d'évaluer la qualité des séquences obtenues et de vérifier les nucléotides au niveau des séquences qui présentent des ambiguïtés. Les séquences ont été éditées et assemblées à l'aide de la version 1.6.0 du logiciel DNA Dragon Sequence Assembler (Sequentix-Digital DNA Processing, Germany) disponible sur le lien suivant : (<http://www.dna-dragon.com>).

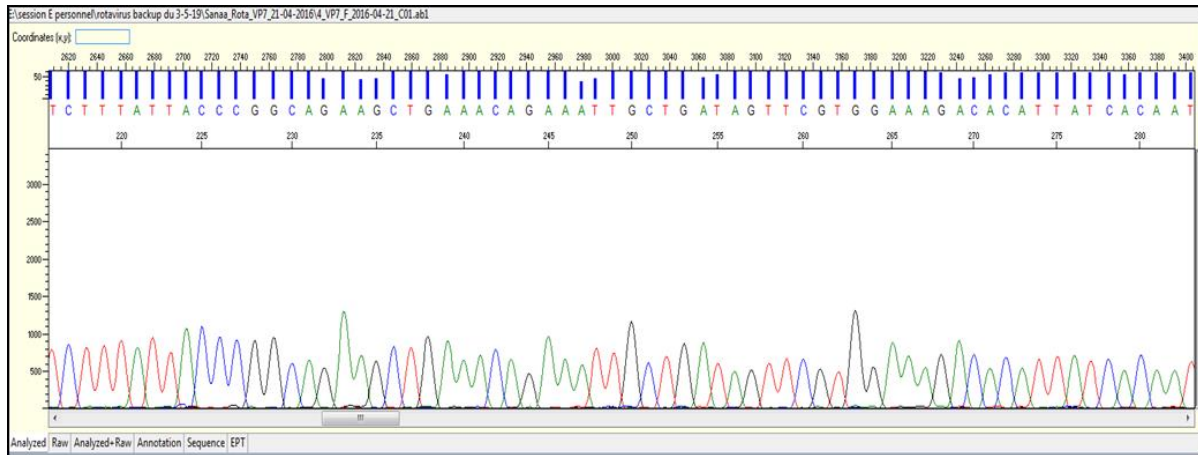


Figure 14. Electrophoregramme du gène VP7 de la souche ma31 après séquençage capillaire

+ Soumission des séquences à GenBank

Les séquences de nucléotides et d'acides aminés des 11 segments du génome de la souche RVA/Human-tc/MAR/ma31/2011/ G8P[14] ont été déposées dans la base de données du National Center of Biotechnology Information (NCBI), GenBank, à l'aide du logiciel Sequin (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Sequin/>) sous les numéros d'accès allant de MG214332 (NSP1) à MG214342 (VP7).

+ Génotypage des 11 segments de la souche ma31

Les génotypes de chacun des 11 segments de gènes ont été déterminés à l'aide de l'outil de génotypage automatisé RotaC v2.0 pour les rotavirus du groupe A (<http://rotac.regatools.be>). En lui soumettant la séquence Fasta de chaque segment, le génotype est ainsi déterminé en fonction du pourcentage d'identité de chaque gène par rapport à la souche la plus proche, sachant que chaque segment a une Valeur seuil (Cut-off value) du pourcentage d'identité des nucléotides définissant le génotype selon Matthijssens J. et al. 2008 [24] (*Cf. Annexe VIII*).

3.4. Analyse phylogénétique

Pour chaque gène de la souche ma31, des alignements multiples de séquences ont été réalisés à l'aide du programme MUSCLE dans le logiciel MEGA 6 [387].

Les relations phylogénétiques entre les 11 séquences de la souche étudiée (ma31) et les séquences des souches qui lui sont proches dans la base de données NCBI ont été étudiées en utilisant la méthode de Maximum de vraisemblance « Maximum Likelihood Method » ; les distances utilisées pour cette méthode ont été calculées par le logiciel MEGA 6 [387] à travers des modèles de substitution de nucléotides qui variaient selon les gènes, ainsi pour les gènes NSP1, VP1, VP2, VP3 et VP4 le modèle utilisé était GTR + G+I, le modèle T92 + G pour NSP2, NSP3, NSP4 et VP7 et le modèle T92 + G+I pour NSP5 et VP6. Pour chaque arbre phylogénétique, les valeurs de *bootstrap* ont été obtenues à la suite de 1000 répétitions.

En plus des alignements des séquences nucléotidiques, des alignements de séquences d'acides aminés ont été réalisés à l'aide du logiciel MEGA 6 pour les gènes VP7, VP4 et VP6 de la souche ma31 avec d'autres séquences d'acides aminés de souches pertinentes sélectionnées présentes dans les arbres correspondants et avec les séquences des souches vaccinales de Rotarix™ et RotaTeq™.

4. Résultats

Cet isolat de RVA, objet de l'étude, a été détecté dans un échantillon de selles prélevé sur un garçon de 18 mois non vacciné. Un génotypage partiel a permis de retrouver cet isolat sous la forme de G8P[14]. La séquence nucléotidique complète obtenue de la souche ma31 a été soumise à la base de données RotaC, il lui a été attribué la constellation G8-P[14]-I2-R2-C2-M2-A11-N2-T6-E2-H3. Quatre des gènes de structure (VP1, VP2, VP3 et VP6) et deux des gènes non structurales (NSP2, NSP4) étaient de type DS-1-like, NSP5 était de type AU-1-like, NSP1 portait le génotype A11 et NSP3 le génotype T6.

4.1. Comparaison des constellations

La souche humaine ma31 présente la même constellation génotypique que les souches humaines bovines d'Italie (BA01, BA02) et de Hongrie (BP1062, 182-02). Elle partage également la même constellation avec les RVA G6 humains tels que MG6 (Australie), EGY3399 (Égypte), N-1 (Inde), Hun5 et BP1879 (Hongrie) et avec les rotavirus G10 d'Italie et d'Australie (V585 et PR457, respectivement) (Tableau 6).

Tableau 6. Comparaison des constellations génomiques complètes de la souche humaine RVA/Human-tc/MAR/ma31/2011/G8P [14], certaines souches de RVA animales et des souches de RVA humaines de type bovin-like

^a Les génotypes indéterminés sont indiqués par un "X"

Strain names	Host	Country	VP7	VP4	VP6	VP1	VP2	VP3	NSP1	NSP2	NSP3	NSP4	NSP5	Shared Genotypes
RVA/Human-tc/MAR/ma31/2011/G8P[14]	Human	Morocco	G8	P[14]	I2	R2	C2	M2	A11	N2	T6	E2	H3	
RVA/Human-wt/ITA/BA01/2012/G8P[14]	Human	Italy	G8	P[14]	I2	R2	C2	M2	A11	N2	T6	E2	H3	11
RVA/Human-wt/ITA/BA02/2012/G8P[14]	Human	Italy	G8	P[14]	I2	R2	C2	M2	A11	N2	T6	E2	H3	11
RVA/Human-wt/HUN/BP1062/2004/G8P[14]	Human	Hungary	G8	P[14]	I2	R2	C2	M2	A11	N2	T6	E2	H3	11
RVA/Human-wt/HUN/182-02/2001/G8P[14]	Human	Hungary	G8	P[14]	I2	R2	C2	M2	A11	N2	T6	E2	H3	11
RVA/Sheep-tc/ESP/OVR762/2002/G8P[14]	Sheep	Spain	G8	P[14]	I2	R2	C2	M2	A11	N2	T6	E2	H3	11
RVA/Human-wt/ITA/PR1300/2004/G8P[14]	Human	Italy	G8	P[14]	I2	R2	C2	M2	A3	N2	T6	E2	H3	10
RVA/Human-wt/ITA/PR1973/2009/G8P[14]	Human	Italy	G8	P[14]	I2	R2	C2	M2	A3	N2	T6	E2	H3	10
RVA/Human-wt/GTM/2009726790/2009/G8P[14]	Human	Guatemala	G8	P[14]	I2	R2	C2	M2	A13	N2	T6	E2	H3	10
RVA/Human-tc/AUS/MG6/1993/G6P[14]	Human	Australia	G6	P[14]	I2	R2	C2	M2	A11	N2	T6	E2	H3	10
RVA/Human-wt/IND/N-1/2009/G6P[14]	Human	India	G6	P[14]	I2	R2	C2	M2	A11	N2	T6	E2	H3	10
RVA/Human-wt/EGY/EGY3399/2004/G6P[14]	Human	Egypt	G6	P[14]	I2	R2	C2	M2	A11	N2	T6	E2	H3	10
RVA/Human-wt/HUN/Hun5/1997/G6P[14]	Human	Hungary	G6	P[14]	I2	R2	C2	M2	A11	N2	T6	E2	H3	10
RVA/Human-wt/HUN/BP1879/2003/G6P[14]	Human	Hungary	G6	P[14]	I2	R2	C2	M2	A11	N2	T6	E2	H3	10
RVA/Antelope-wt/ZAF/RC-18/2008/G6P[14]	Antelope	South Africa	G6	P[14]	I2	R2	C2	M2	A11	N2	T6	E2	H3	10
RVA/Human-wt/AUS/V585/2011/G10P[14]	Human	Australia	G10	P[14]	I2	R2	C2	M2	A11	N2	T6	E2	H3	10
RVA/Human-wt/ITA/PR457/2009/G10P[14]	Human	Italy	G10	P[14]	I2	R2	C2	M2	A11	N2	T6	E2	H3	10
RVA/Human-wt/USA/2012841174/2012/G8P[14]	Human	United States	G8	P[14]	I2	R3	C2	M2	A3	N2	T6	E2	H3	9
RVA/Human-tc/KEN/B12/1987/G8P[1]	Human	Kenya	G8	P[1]	I2	R2	C2	M2	A3	N2	T6	E2	H3	9
RVA/Cow-wt/ZAF/1604/2007	Bovine	South Africa	G8	P[1]	I2	R2	C2	M2	A3	N2	T6	E2	H3	9
RVA/Macaque-tc/USA/PTRV/1990/G8P[1]	Macaque	United States	G8	P[1]	I2	R2	C2	M2	A3	N2	T6	E2	H3	9
RVA/Human-tc/ITA/PA169/1988/G6P[14]	Human	Italy	G6	P[14]	I2	R2	C2	M2	A3	N2	T6	E2	H3	9
RVA/Human-wt/BEL/B10925/1997/G6P[14]	Human	Belgium	G6	P[14]	I2	R2	C2	M2	A3	N2	T6	E2	H3	9
RVA/Human-wt/THA/SKT-27/2012/G6P[14]	Human	Thailand	G6	P[14]	I2	R2	C2	M2	A3	N2	T6	E2	H3	9
RVA/Human-wt/ITA/111-05-27/2005/G6P[14]	Human	Italy	G6	P[14]	I2	R2	C2	M2	A3	N2	T6	E2	H3	9
RVA/Goat-tc/BGD/GO34/1999/G6P[1]	Goat	Bangladesh	G6	P[1]	I2	R2	C2	M2	A11	N2	T6	E2	H3	9
RVA/Human-tc/GBR/A64/1987/G10P[14]	Human	England	G10	P[14]	I2	R2	C2	M1	A3	N2	T6	E2	H3	9
RVA/Guanaco-wt/ARG/Chubut/1999/G8P[14]	Guanaco	Argentina	G8	P[14]	I2	R5	C2	M2	A3	N2	T6	E12	H3	8
RVA/Vicugna-wt/ARG/75/2010/G8P[14]	Vicugna	Argentina	G8	P[14]	I2	R5	C2	M2	^a AX	N2	T6	E12	^a HX	7
RVA/Goat-wt/ARG/0040/2011/G8P[1]	Goat	Argentina	G8	P[1]	I2	R5	C2	M2	A3	N2	T6	E12	H3	6

La constellation de la souche ovine OVR 762 d'Espagne est totalement identique à la constellation de la souche humaine ma31 avec onze génotypes communs, tandis que certaines souches d'origine animale partagent dix génotypes avec ma31, comme la souche d'antilope RC 18 isolée en Afrique du Sud. D'autres souches animales, telles que les souches caprines (GO34, 0040), la souche bovine 1604 et la souche macaque PTRV, ne présentent que neuf génotypes communs. Deux souches animales d'Argentine portant le génotype G8P[14] ont le nombre minimum de génotypes partagés avec la souche humaine ma31; huit génotypes pour la souche Chubut et sept génotypes pour la souche 75 (Tableau 6).

En comparant la constellation de la souche ma31 avec des souches animales ayant la même constellation, la séquence complète de cette dernière présente un squelette bovin indiquant qu'elle est probablement d'origine ovine (Tableau 6).

4.2. Analyse phylogénétique

Au total, 11 arbres phylogénétiques ont été construits en utilisant la séquence complète des 11 gènes de ma31 (Figure. 15A-K). Les identités nucléotidiques des gènes comparées aux souches les plus proches présentes dans GenBank ont été déterminées aussi (Tableau 7).

L'analyse phylogénétique de la souche ma31 a montré que les gènes VP7, NSP2, NSP3 et NSP4 se regroupaient avec les souches RVA animales alors que le reste des gènes étaient étroitement liés aux souches humaines (Tableau 7 et Figure. 15A-K).

Tableau 7. Identités des séquences nucléotidiques de la souche RVA/Human tc/MAR/ma31/2011/G8P[14] par rapport aux souches étroitement apparentées dans la base de donnée GenBank

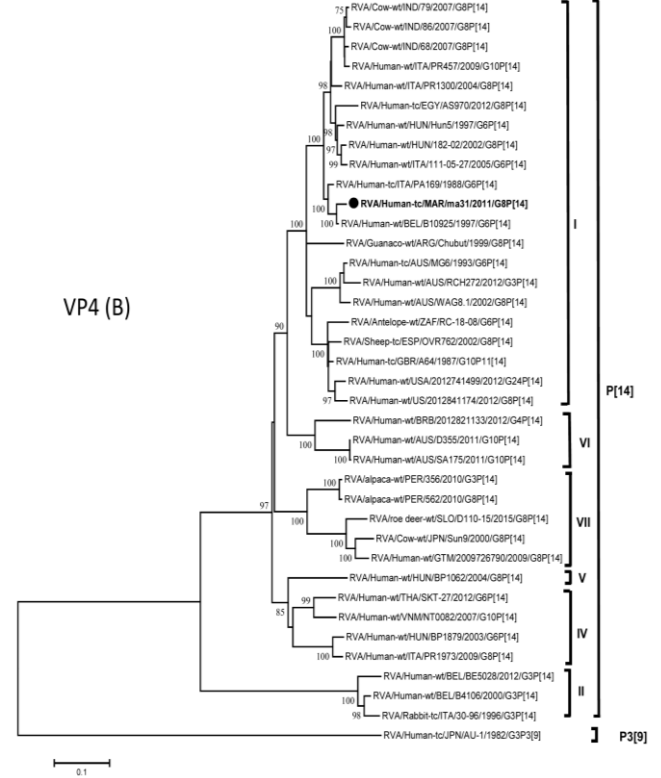
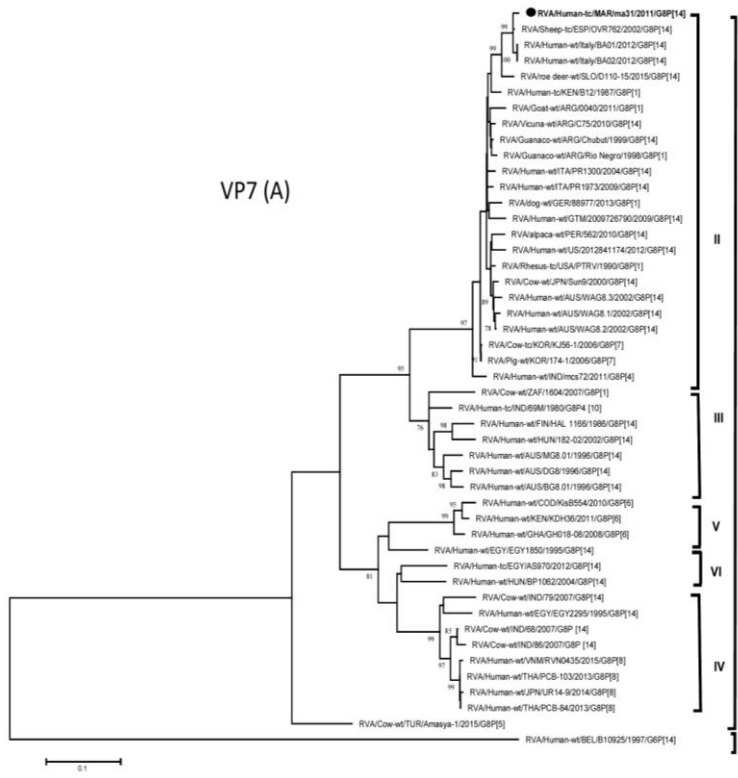
Gene	% identity to closest related strain	Closely related strain	GenBank accession no.	RotaC classification
NSP1	92.5	RVA/Human-wt/HUN/BP1879/2003/G6P[14]	FN665681	A11
NSP2	98.5	RVA/Dog-wt/GER/88977/2013/G8P[1]	KJ940158	N2
NSP3	99	RVA/Sheep-tc/ESP/OVR762/2002/G8P[14]	EF554156	T6
NSP4	97.6	RVA/Sheep-tc/ESP/OVR762/2002/G8P[14]	EF554157	E2
NSP5	99.1	RVA/Human-wt/HUN/182-02/2002/G8P[14]	KU508379	H3
VP1	94.4	RVA/Human-wt/ITA/PAI11/1996/G2P[4]	KC178764	R2
VP2	96.1	RVA/Human-wt HUN/182-02/2002/G8P[14]	KU508381	C2
VP3	95.9	RVA/Human-wt/BEL/B10925/1997/G6P[14]	EF554117	M2
VP4	98.1	RVA/Human-wt/BEL/B10925/1997/G6P[14]	EF554118	P[14]
VP6	98.5	RVA/Human-wt/ZAF/2371WC/2008/G9P[8]	JN014002	I2
VP7	99	RVA/Sheep-tc/ESP/OVR762/2002/G8P[14]	EF554153	G8

L'analyse de l'arbre phylogénétique VP7 (Figure. 15A) a révélé un regroupement très étroit (identité nucléotidique de 99 %) de la souche ma31 avec la souche ovine G8P[14] détectée en Espagne en 2002 (ovins tc/ESP/OVR762/2002/G8P[14]), au sein d'un groupe (lignée II) qui comprend des souches humaine, caprine, de chevreuil et de guanaco.

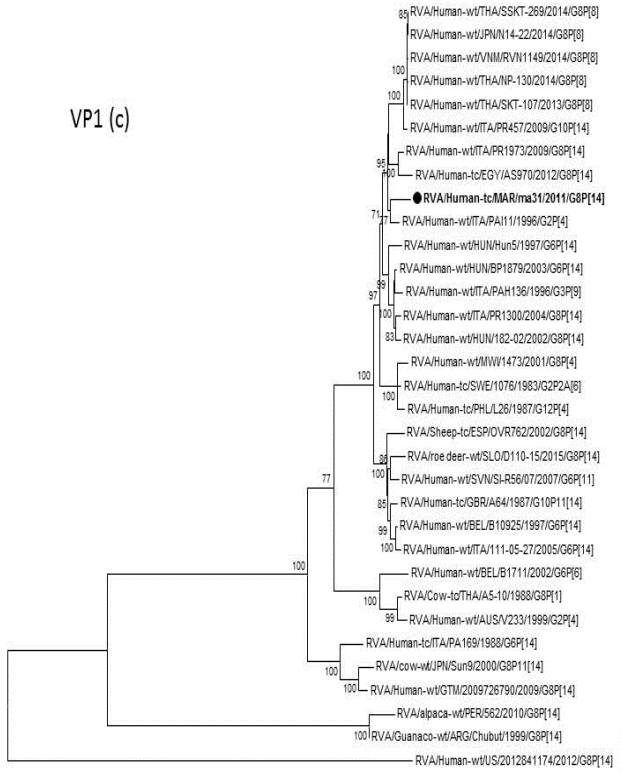
L'arbre phylogénétique VP4 a montré que ma31 était lié aux séquences P[14] détectées chez l'homme, le guanaco, l'antilope et le mouton entre 1988 et 2012. Les souches humaines incluses dans l'arbre avaient principalement les génotypes G6, G8 et G10 VP7 (Figure. 15B).

Pour les gènes des protéines du noyau de la souche ma31, VP1 s'est regroupé avec des souches P[14] humaines telles que ITA/PAI11, ITA/PR1973, EGY/AS970 et HUN/Hun5 (91,3-94,4%) (Figure. 15C), tandis que la phylogénie du gène VP2 a montré des relations évolutives intermédiaires avec les souches P[14] humaines, d'antilope et de vache (Human-wt/HUN/182-02, Human-wt/ITA/PAH136, Antelope-wt/ZAF/RC-18-08 et Cow-wt/ZAF/1603) allant de 94,3-96,1% (Figure. 15D).

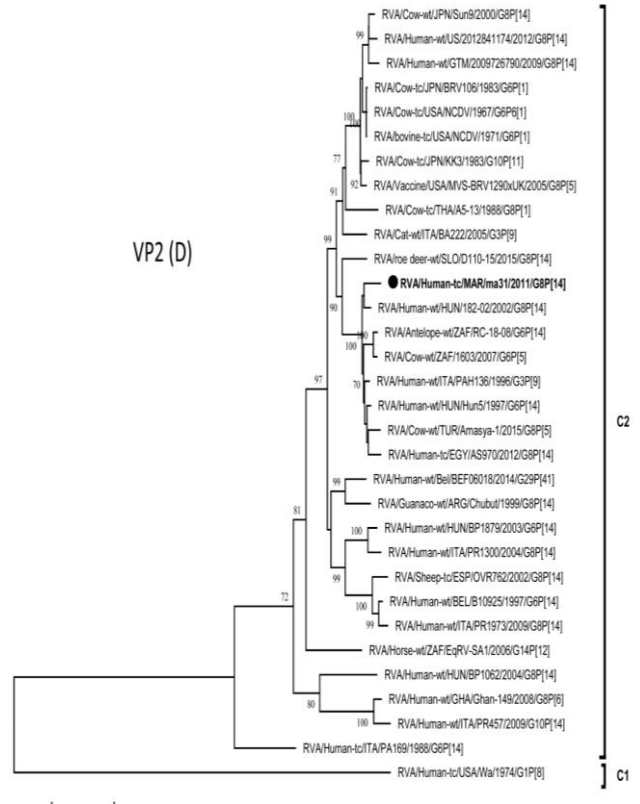
La phylogénie du gène VP3 a révélé le même phénomène que le gène VP2 avec une relation évolutive intermédiaire (84,6 % à 95,9 % au niveau nucléotidique) avec les souches P[14] de l'homme, du mouton et de l'alpaga (Humanwt/ ITA/PR1973, Human-wt/BEL/B10925, Sheep-tc/ESP/ OVR762 et alpaca-wt/PER/562) (Figure. 15E).



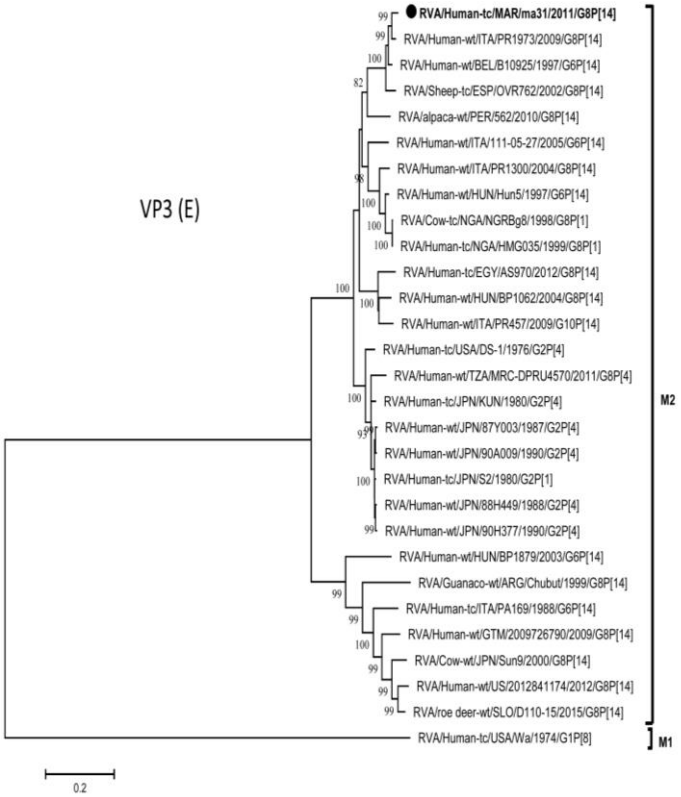
VP1 (c)



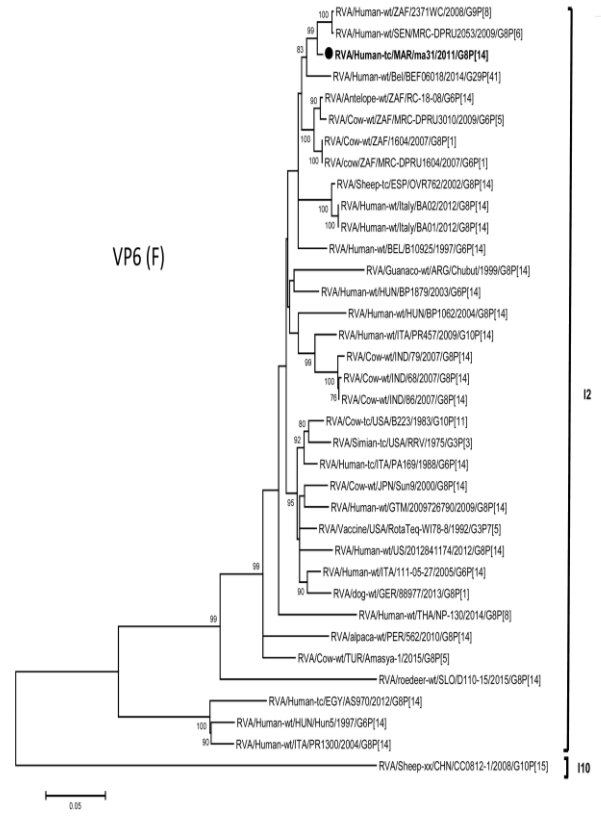
VP2 (D)

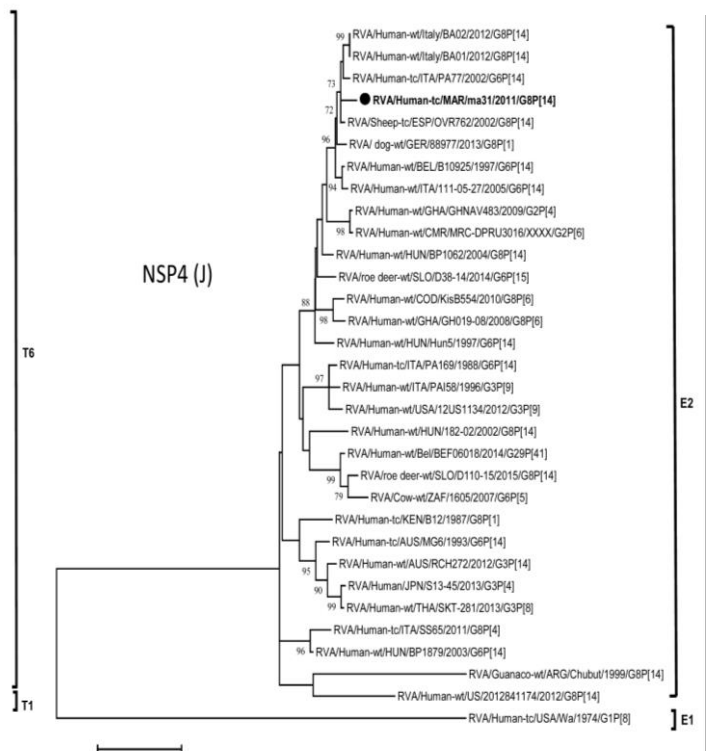
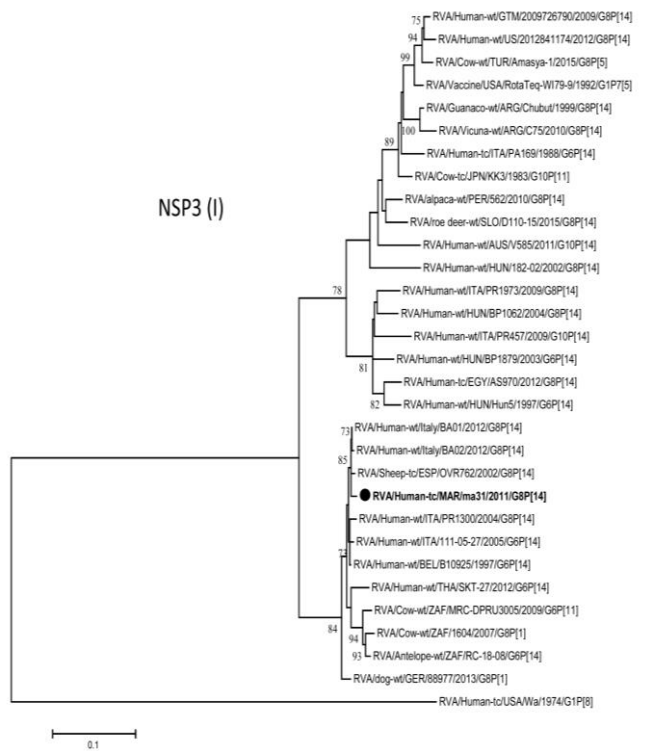
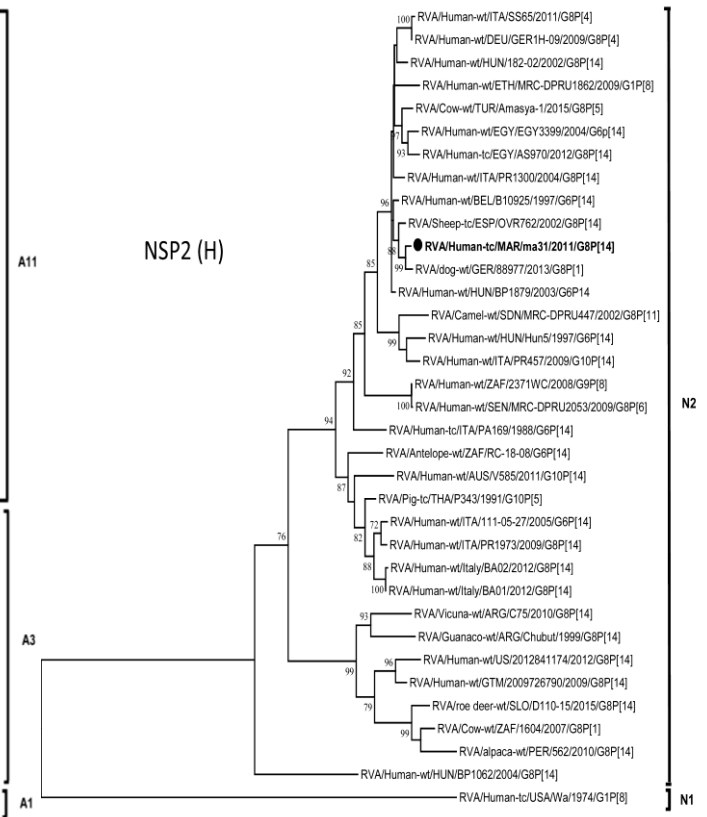
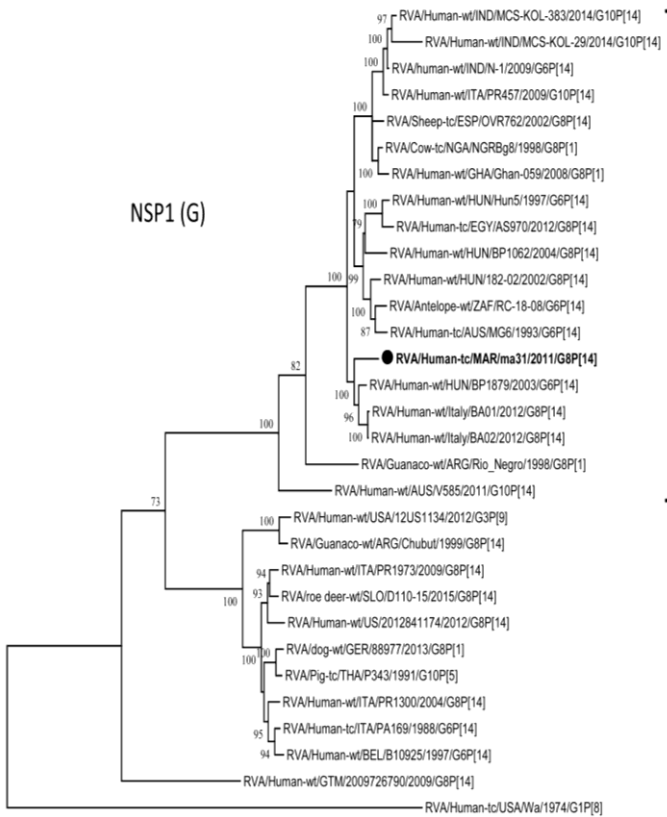


VP3 (E)



VP6 (F)





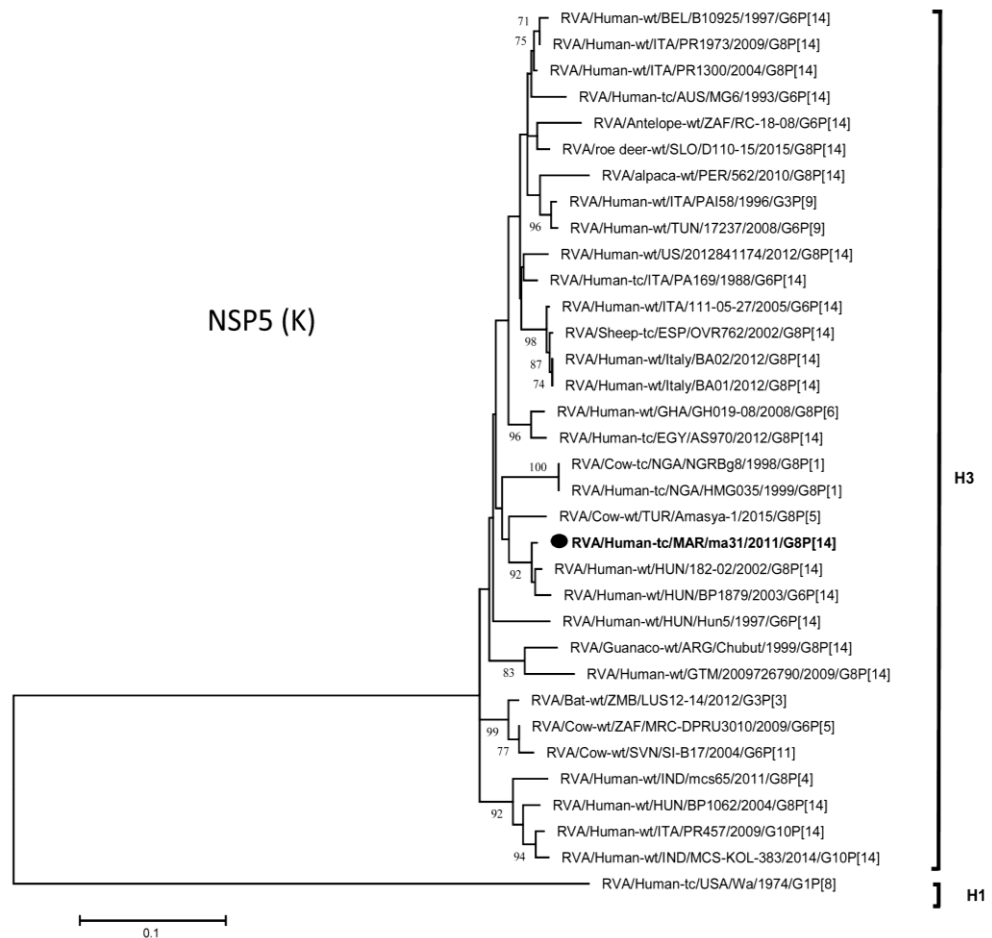


Figure 15. Arbres phylogénétiques basés sur les séquences nucléotidiques complètes des 11 segments de gènes de RVA. La souche ma31 est indiquée en gras. La méthode « Maximum likelihood » a été utilisée, avec un bootstrap à 1000 répétitions. Les barres d'échelles représentent le nombre de substitution de nucléotides par site.

Le dernier gène VP6 était étroitement lié à la souche humaine ZAF/2371WC détectée en Afrique du Sud en 2008 (98,5% d'identité nucléotidique) (Figure. 15F) cette dernière a été décrite comme étant d'origine artiodactyle [388].

En ce qui concerne les gènes non structurales, le gène NSP1 a été regroupé avec des souches P[14] humaines telles que HUN/BP1879/2003/ G6P[14], Italy/BA02/2012/G8P[14] et Italy/BA01/2012/ G8P[14] avec respectivement 92,5%, 84,1%, 83,9% d'identité nucléotidique (Figure. 15G).

L'arbre phylogénétique NSP2 a montré une relation étroite entre la souche ma31 et la souche 88977 du chien détectée en Allemagne en 2013 (98,5% nt d'identité) (Figure. 15H).

Pour les gènes NSP3 et NSP4, leurs séquences se sont très bien assemblées avec la même souche ovine (ESP/OVR762/2002/G8P[14]) présentant, respectivement, 99% et 97,6% d'identité nucléotidique (Figure. 15I-J).

Pour le dernier arbre phylogénétique du gène NSP5, la souche ma31 ressemblait fortement à la souche humaine hongroise HUN/182-02/2002/ G8P[14] avec 99,1% d'identité nucléotidique (Figure. 15K).

4.3. Régions hypervariables VP8*, VP7 et VP6

Les séquences d'acides aminés déduites des gènes VP4 (VP8*), VP7 et VP6 de la souche ma31 ont été comparées aux différentes souches pertinentes présentes dans les arbres phylogénétiques correspondants et aux séquences des souches vaccinales Rotarix™ et RotaTeq™.

La comparaison des séquences d'acides aminés du gène VP4 a été effectuée pour les régions antigéniques 8-1, 8-2, 8-3 et 8-4 (Figure. 16).

	8-1										8-2		8-3						8-4						
	100	146	148	150	188	190	192	193	194	195	196	180	183	113	114	115	116	125	131	132	133	135	87	88	89
Human-tc/MAR/ma31/2011/G8P[14]	D	L	K	G	Y	L	I	N	N	D	N	T	N	S	N	T	Q	T	S	N	N	S	T	Q	I
Human-wt/BEL/B10925/1997/G6P[14]	D
Sheep-tc/ESP/OVR762/2002/G8P[14]	D	.	.	.
Human-wt/HUN/182-02/2002/G8P[14]	D	.	.	.
Human-wt/EGY/AS970/2012/G8P[14]	D	.	.	.
Human-wt/ITA/PR1300/2004/G8P[14]	D	.	.	.
Human-wt/GTM/2009726790/2009/G8P[14]	I	.	.	Q	.	.	.	A	.	.	.	D	.	.	A
Human-wt/US/2012841174/2012/G8P[14]	D	.	.	.
Cow-wt/IND/79/2007/G8P[14]	D	.	.	.
Human-wt/AUS/WAG8.1/2002/G8P[14]
Rotarix/USA/2009/G1P[8]	.	S	S	N	S	S	A	.	L	N	.	E	R	N	P	V	D	S	.	.	D	N	N	T	N
RotaTeq-WI79-4/USA/1992/G6P1A[8]	.	S	S	N	S	N	A	.	L	N	D	E	R	N	P	V	D	N	R	.	D	D	N	T	N

Figure 16. Alignement des résidus antigéniques des quatre régions antigéniques VP8* (VP4) entre la souche ma31, les souches vaccinales Rotarix™ et RotaTeq™, et les souches pertinentes sélectionnées dans l'arbre phylogénétique VP4

L'analyse de l'alignement de VP8* n'a montré aucune substitution d'acides aminés dans la région antigénique 8-1 (Fig. 15) ; en revanche, cinq substitutions d'acides aminés ont été

trouvées entre la souche ma31 et la souche guatémaltèque 2009726790/2009 (G8P[14]) au niveau des résidus T180I (8-2), S113Q, T125A et N133D (8-3) et I89A (8-4). Un changement d'acide aminé a différencié la souche ma31 de toutes les souches apparentées incluses dans la comparaison au niveau du résidu N133D (8-3), à l'exception des souches belge B10925/1997/G6P[14] et australienne WAG8.1/2002/ G8P[14]. En outre, une substitution d'acide aminé a été trouvée au niveau du résidu N183D (8-2) avec la souche belge B10925/1997/G6P[14] (Figure. 16).

La comparaison de la souche marocaine G8P[14] avec les régions antigéniques VP8* (8-1, 8-2, 8-3 et 8-4) des souches vaccinales P[8] Rotarix™ et RotaTeq™ a montré, respectivement, 20 et 22 substitutions d'acides aminés (Figure. 16).

Les séquences d'acides aminés dans les régions antigéniques du gène VP7 (7-1a, 7-1b et 7-2) de la souche ma31 G8P[14] ont montré un seul changement par rapport aux souches animales et humaines Vicuna-wt/ARG/C75/2010/G8P[14], Cow-wt/JPN/ Sun9/2000/G8P[14], Goat-wt/ARG/0040/2011/G8P[1] et Human-tc/KEN/B12/1987/G8P[1] au résidu T87 V (7-1a). En outre, deux substitutions d'acides aminés ont été trouvées en comparaison avec la souche Guanaco-wt/ARG/Chubut/1999/G8P[14] aux résidus T87 V (7-1a), N238S (7-1b), avec la souche Dog-wt/ GER/88977/2013/G8P[1] à T87 V, T91 K (7-1a) et avec la souche humaine GTM/2009726790/2009/G8P[14] à T87 V (7-1a), N147S (7-2). Deux autres substitutions d'acides aminés ont été observées entre la souche ma31 et la souche animale roe deer-wt/SLO/D110-05/2015/G8P[14] au niveau des résidus T87I et N147S (7-1a et 7-2, respectivement) (Figure. 17).

	7-1a													7-1b						7-2										
	87	91	94	96	97	98	99	100	104	123	125	129	130	291	201	211	212	213	238	242	143	145	146	147	148	190	217	221	264	
Human-tc/MAR/ma31/2011/G8P[14]	T	T	A	S	S	W	K	D	Q	D	A	I	N	K	Q	D	T	T	N	T	K	N	A	N	S	S	E	A	G	
Sheep-tc/ESP/OVR/762/2002/G8P[14]	
Human-wt/Italy/BA01/2012/G8P[14]	
Human-wt/Italy/BA02/2012/G8P[14]	
Roe deer-wt/SLO/D110-15/2015/G8P[14]	I	S	
Vicuna-wt/ARG/C75/2010/G8P[14]	V	
Guanaco-wt/ARG/Chubut/1999/G8P[14]	V	S	
Human-wt/GTM/2009726790/2009/G8P[14]	V	S	
Cow-wt/JPN/Sur9/2000/G8P[14]	V	
Dog-wt/GER/88977/2013/G8P[1]	V	K	
Human-tc/KEN/B12/1987/G8P[1]	V	
Goat-wt/ARG/0040/2011/G8P[1]	V	
RotaTeq-WI79-9/USA/1992/G1P[5]	.	.	N	G	D	.	.	.	S	V	V	D	.	.	.	N	V	D	.	.	.	D	Q	S	L	.	M	N	.	
RotaTeq-S2-9/USA/1992/G2P[5]	A	N	S	D	E	.	E	N	.	.	T	M	.	.	.	V	S	.	S	.	R	D	N	T	.	D	I	S	.	
RotaTeq-WI78-8/USA/1992/G3P[5]	.	.	N	N	V	D	A	N	K	D	.	.	D	T	L
RotaTeq-BrB-9/USA/1996/G4P[5]	S	.	S	T	E	.	.	.	N	L	.	D	A	D	.	.	R	A	S	G	E	.	T	S	.	
RotaTeq-WI79-4/USA/1992/G6P1A[8]	V	N	.	T	E	V	E	.	.	.	N	P	D	.	A	.	D	S	T	Q	.	T	T	.	.
Rotarix/USA/2009/G1P[8]	.	.	N	G	E	.	.	.	S	V	V	D	.	.	.	N	V	D	.	.	.	D	Q	.	L	.	M	N	.	

Figure 17. Alignement des résidus antigéniques dans les trois régions antigéniques VP7 entre la souche ma31, les souches vaccinales Rotarix™ et RotaTeq™, et les souches pertinentes sélectionnées dans l'arbre phylogénétique VP7

La comparaison des régions antigéniques du gène VP7 de la souche ma31 avec le génotype G1 de la souche vaccinale Rotarix™ a montré que 14 résidus sur 29 étaient conservés alors qu'avec les cinq gènes VP7 des souches RotaTeq™, c'est entre 10 à 18 résidus qui étaient conservés avec la même souche (Figure. 17).

L'analyse des quatre sites antigéniques de VP6 (I-IV) a démontré un degré élevé de conservation entre la souche ma31 et la plupart des souches humaines et animales analysées. Seules deux substitutions d'acides aminés ont été observées dans le site antigénique I ; au niveau du résidu V56I à partir de ZAF/RC-18-08/G6P[14] à GTM/2009726790/G8P[14] et au niveau du résidu D62A avec la souche SEN/MRC-DPRU2053/G8P[6]. Dans le site antigénique III, une substitution d'acide aminé a été signalée au niveau du résidu I211V pour deux souches ZAF/MRC-DPRU3010 et GTM/2009726790 (Figure. 18).

La comparaison des régions antigéniques du gène VP6 avec les souches vaccinales a révélé quatre substitutions d'acides aminés entre la souche ma31 et la souche Rotarix™ (sites antigéniques I et IV), et une seule substitution avec les souches RoTateq™ au niveau du résidu I211V (site antigénique III) (Figure. 18).

5. Discussions

Ce rare génotype G8P[14] est signalé pour la première fois au Maroc et est apparu dans des conditions naturelles. Il représente, à notre connaissance, le deuxième cas signalé en Afrique après l'Égypte [389].

Les génotypes circulant au Maroc même après l'introduction successive des vaccins Rotarix™ et RoTateq™ dans les programmes nationaux de vaccination en 2010 et 2014, respectivement, sont G1P[8], G9P[8], G2P[4], G4P[8] et G3P[8] [30-32]. Les quelques cas signalés dans le monde (Italie, Danemark, Finlande, Hongrie, États-Unis, Guatemala, Taiwan, Australie) [343, 390] suggèrent que ce génotype rare des rotavirus n'est pas totalement adapté à l'homme, ce qui explique sa diffusion limitée. Pour approfondir l'étude de la relation génétique de cette souche avec d'autres souches de génotype G8P[14], il a été nécessaire de caractériser son génome complet.

Les données de la constellation ont démontré que cette souche appartient au génogroupe 2 de type DS-1-like pour la plupart des gènes, à l'exception du génotype H3 qui se présente normalement parmi les rotavirus de type AU-1-like (génogroupe 3) et des génotypes A11 et T6, qui sont caractéristiques des souches de rotavirus bovins de type artiodactyles (Artiodactyl bovine-like rotavirus strains) [391]. Par conséquent, la souche humaine ma31 représente des transmissions inter-espèces des souches de RVA appartenant aux membres de la famille *Artiodactyla* tels que les bovins, le guanaco et les moutons comme cela a été signalé précédemment dans les travaux de Matthijnsens et al. [30].

L'analyse du génome complet de la souche ma31 a montré une configuration mixte de gènes d'origine animale possible et d'origine humaine zoonotique ce qui indique la génération d'un réassortiment entre les rotavirus humains et animaux révélant cette souche humaine inhabituelle (Figure. 15A-K). Quatre gènes parmi les onze gènes (VP7, NSP2, NSP3, NSP4) de la souche RVA/Human-tc/MAR/ma31/2011/G8P[14] ont présenté une identité très proche avec les gènes respectifs des souches Dog-wt/GER/88977/2013/G8P[1] et Sheep-tc/ESP/OVR762/2002/ G8P[14], tandis que les gènes restants (VP1, VP2, VP3, VP4, VP6, NSP1, NSP5) étaient plus proches des souches du rotavirus humain telles que HUN/182-02/2002/G8P[14], BEL/ B10925/1997/G6P[14] et ZAF/2371WC/2008/G9P[8] détectée

plusieurs années auparavant dans respectivement la Hongrie, la Belgique et l’Afrique du sud (Tableau 6).

Concernant les souches P[14] humaines, des études antérieures ont proposé leur origine commune avec les souches affectant les ongulés qui appartiennent à l'ordre des Artiodactyles [30]. Au sein du génotype P[14], la souche marocaine occupe la lignée I qu’elle partage avec les souches P[14] humaines d'Italie, de Belgique et de Hongrie ainsi que les souches RVA P[14] animales (bovines, antilopes et ovins) d'Inde, d'Afrique du Sud et d'Espagne.

Ce génotype a été signalé chez des veaux nouveau-nés de différentes régions géographiques du Maroc en combinaison avec le génotype G10 [386], ce qui suggère une origine possible de l'infection par une espèce bovine.

De plus, la sensibilité de l'enfant au génotype hétérologue du rotavirus P[14] pourrait être lié au phénotype du groupe sanguin ABO. En effet, il a été démontré que le fragment VP8* de la protéine du génotype P[14] du gène VP4, par exemple, interagit avec les antigènes du groupe histo-sanguin de type A des humains et que seules les personnes portant ce type d'antigènes sont susceptibles d'être infectées par ces génotypes [173, 175].

Le génotype animal G8 du rotavirus est connu pour être présent chez les espèces bovines mais il circule avec une fréquence plus faible par rapport aux génotypes G6 et G10, cependant ce génotype représente la souche dominante au Japon [392] et en Tunisie [393]. Chez l'homme, le rotavirus ayant le génotype G8 a été détecté sporadiquement dans le monde entier en combinaison avec différents génotypes P tels que P[4], P[6] et P[8] [344, 394]. En revanche, ce génotype rare présentait une prévalence de 12% dans certains pays africains par rapport aux autres génotypes détectés sur ce continent [323], combinés à d'autres gènes de rotavirus d'origine animale [23, 51, 344]. Au Maroc, le génotype humain G8 a été signalé pour la première fois en 2015 à Rabat parmi les souches circulantes en tant que souche isolée G8P[9] [395]. Au sein du génotype G8, la littérature décrit la présence de 6 lignées identifiées à ce jour [394]. Le gène VP7 de la souche ma31 appartient à la lignée II, qui comprend essentiellement des souches isolées à partir de moutons, de chèvres, de porcs, de bovins et des souches humaines d’origine artiodactyle (Artiodactyl-like human strains). Il a été démontré que cette lignée est d'origine animale [344].

Les personnes qui vivent à proximité d'élevages intensifs, notamment de petits ruminants, courent un risque accru d'exposition aux rotavirus animaux, ce qui peut entraîner une éventuelle co-infection et la génération de réassortiments entre les rotavirus humains et animaux. Le cas infecté signalé dans la présente étude vit dans une zone rurale près de Rabat, en contact étroit avec des moutons, des chèvres, des bovins et des chiens. Cela pourrait expliquer en partie la constellation génomique rare ma31 telle que décrite dans d'autres études [51]. Cependant, le fait que ce génotype rare G8P [14] ait été détecté chez un seul patient parmi tous les échantillons prélevés au cours de l'enquête, ceci peut suggérer que ce génotype ou souche réassortie n'est pas encore bien adaptée pour se propager efficacement parmi les humains.

Dans la mesure où les deux vaccins les plus utilisés Rotarix™ et RotaTeq™ ont montré une grande efficacité contre les cinq génotypes G les plus répandus (G1, G3, G4, G9 et G12) dans le monde et une large protection croisée contre les sérotypes non présents dans le vaccin, les données d'efficacité contre les génotypes d'origine non humaine en revanche sont encore limitées [335]. Une étude récente effectuée sur les souches de génotype G8 en Afrique subsaharienne a montré que le vaccin RotaTeq™ a une bonne efficacité contre ce génotype, cela peut être dû à la composition du vaccin qui porte un background génétique bovin [396].

La comparaison des principales régions antigéniques (8-1, 8-2, 8-3, 8-4, 7-1a, 7-1b, 7-2) des séquences d'acides aminés des deux protéines VP8* et VP7 [171] de la souche ma31 et de certaines souches animales et humaines P[14] et/ou G8 pertinentes analysées dans différentes parties du monde a montré plusieurs différences au niveau de certaines positions des résidus.

Même si ces souches présentent une variabilité génétique, elles partagent un fond génétique commun qui semble être modifié par des événements indépendants de transmission inter-espèces (Figures. 16, 17 et 18).

Sans surprise, l'analyse de la région antigénique VP7 de la souche ma31 a révélé 15 différences sur les 29 acides aminés contenus dans les principaux sites antigéniques liés à la neutralisation de la souche G1 Rotarix™, ainsi que 11 à 19 différences avec les quatre souches RotaTeq™ (G1-G4) (Figure. 17). Des résultats similaires ont été observés pour les régions antigéniques de VP8*, où les sites antigéniques de la souche ma31 différaient sensiblement de celles des souches vaccinales (P[8]) avec respectivement 20 et 22 acides

aminés différents sur 29 par rapport à Rotarix™ et RotaTeq™ (Figure. 16). Toutefois, ces différences constatées dans les protéines VP7 et VP8* de la souche ma31 ne permettent pas de conclure clairement si l'efficacité de l'immunité induite par les vaccins Rotarix™ et RotaTeq™ dans la protection contre les infections par des souches de rotavirus d'origine zoonotique sera réduite. En revanche, l'analyse des séquences d'acides aminés de la protéine VP6 des quatre principaux sites antigéniques [397] a montré un degré élevé de conservation entre la souche ma31, et les souches animales et humaines incluses dans l'analyse, avec respectivement 1 et 4 différences avec les souches vaccinales RotaTeq™ et Rotarix™ (Figure. 18).

Les mécanismes de protection contre l'infection par le rotavirus ne sont toujours pas clairs jusqu'à présent et il semble que d'autres gènes que VP4 et VP7 soient impliqués [398], tel que le gène VP6 qui pourrait jouer un rôle dans l'immunité induite par le vaccin [399]. En outre, de multiples facteurs peuvent influencer l'efficacité des deux vaccins, et l'éventuel impact des modifications des acides aminés au niveau des régions antigéniques ne peut être assumé par l'information sur la séquence seulement [400, 401]. En conclusion, et puisque les séquences d'acides aminés de la protéine VP6 des quatre principaux sites antigéniques de la souche ma31 ont montré un haut degré de conservation avec les souches vaccinales RotaTeq™ et Rotarix™, ceci permettrait probablement de lancer une réponse immunitaire dirigée contre la souche G8P[14]. Malheureusement, au Maroc, il n'existe pas de stratégies de surveillance des souches de RVA permettant de prévoir l'introduction éventuelle de nouvelles souches résultant de la transmission inter-espèces animal- Homme.

6. Conclusion

En résumé, cette étude rapporte pour la première fois le cas d'une souche de rotavirus groupe A de génotype G8P[14] isolée au Maroc (Afrique) avec une constellation génomique G8-P[14]-I2-R2-C2-M2-A11-N2-T6-E2-H3. Cette souche appartient à la lignée I au sein du génotype P[14]. Les résultats de cette étude confirment l'importance de la transmission inter espèces qui joue un rôle dans la génération d'une grande diversité de rotavirus humains par le biais de réassortiments zoonotiques. Toutefois, des études supplémentaires sont nécessaires et justifiées afin de surveiller au niveau du génome entier si de telles souches émergentes

peuvent se répandre à l'échelle mondiale dans le but de pouvoir assurer une utilisation réussie des vaccins et pouvoir expliquer leur échec si jamais ça se produit.

7. Publication

Ce travail a fait l'objet d'une publication dans la revue « *Virus Genes* » :

Alaoui Amine S, Melloul M, El Alaoui MA, Touil N, El Fahime E. **Full-length genome analysis of the first human G8P[14] rotavirus strain from Morocco suggests evidence of zoonotic transmission.** *Virus Genes*. 2019 Aug; 55(4):465-478. doi: 10.1007/s11262-019-01677-9. Epub 2019 Jun 13. PMID: 31197545

Virus Genes (2019) 55:465–478
<https://doi.org/10.1007/s11262-019-01677-9>

ORIGINAL PAPER



Full-length genome analysis of the first human G8P[14] rotavirus strain from Morocco suggests evidence of zoonotic transmission

Sanaâ Alaoui Amine^{1,2} · Marouane Melloui³ · Moulay Abdelaziz El Alaoui^{2,4} · Nadia Touil^{1,5} · Elmostafa El Fahime^{1,2}

Received: 18 March 2019 / Accepted: 6 June 2019 / Published online: 13 June 2019
© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2019

Abstract

An unusual group A rotavirus (RVA) strain MAR/ma31/2011/G8P[14] was detected for the first time in Morocco in a stool sample from hospitalized child aged 18 months suffering from acute gastroenteritis and fever in 2011. Complete genome sequencing of the ma31 strain was done using the capillary sequencing technology. The analysis revealed the G8-P[14]-I2-R2-C2-M2-A11-N2-T6-E2-H3 constellation and the backbone genes: I2-R2-C2-M2-A11-N2-T6-E2-H3 are commonly found in RVA strains from artiodactyls such as cattle. The constellation was shared with another Italian zoonotic G8P[14] strains (BA01 and BA02), two Hungarian human strains (182-02 and BP1062) and a sheep RVA strain OVR762. Phylogenetic analysis of each genome segment of ma31 revealed a mixed gene configuration originated from animals and human. Comparison of the antigenic regions of VP7 and VP4 amino acid sequences between ma31 strain and selected animal and human strains bearing G8 and or P[14], showed a high level of conservation, while many substitutions was observed in comparison with RotaTeq™ and Rotarix™ vaccine strains. In contrast, alignment analysis of the four antigenic sites of VP6 revealed a high degree of conservation. These findings reveal a typical zoonotic origin of the strain and confirm a high potential for RVA zoonotic transmission between bovine and humans, allowing the generation of novel rotavirus genotypes.

Keywords Group A rotavirus · G8P[14] genotype · Reassortment · Phylogenetic analysis · Morocco

Edited by Zhen F. Fu.

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s11262-019-01677-9>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Sanaâ Alaoui Amine
salaoui16@yahoo.fr

- ¹ Genomic Center for Human Pathologies (GENOPATH), Faculty of Medicine and Pharmacy, University Mohammed V in Rabat, Av. Mohamed Belarbi El Alaoui, 6203, Rabat, Morocco
- ² Molecular Biology and Functional Genomics Platform, National Center for Scientific and Technical Research, CNRST, Angle Avenue Allal El Fassi, Avenue des FAR, Quartier Er-Ryad, 8027, Rabat, Morocco
- ³ Laboratory of Physiology, Genetics and Ethnopharmacology, Faculty of Sciences of Oujda, University Mohammed Premier, 717, Oujda, Morocco
- ⁴ Virology Laboratory, Research Team in Molecular Virology and Onco Biology (ERVMOB), Faculty of Medicine and Pharmacy, University Mohammed V in Rabat, Av. Mohamed Belarbi El Alaoui, 6203, Rabat, Morocco
- ⁵ Research and Biosafety Laboratory, Med V Military Teaching Hospital, Hay Riad, 10045 Rabat, Morocco

Introduction

Group A rotavirus (RVA) is a most important etiologic agent of severe acute gastroenteritis among children under 5 years of age and many animal species worldwide [1, 2], causing 215,000 deaths per year and 37% of hospitalizations annually worldwide, more than 50% of these deaths occur in Africa [3, 4].

RVA belongs to the genus *Rotavirus* within the family *Reoviridae* based on the shared structural and genomic features. Known to be a non-enveloped virus, its genome is composed of 11 segments of double-stranded RNA (dsRNA). These RNA segments encode six structural proteins (VP1-4, VP6, and VP7) and six non-structural proteins (NSP1-NSP6) [5].

The traditional binomial RVA classification system was based on the two outer capsid proteins VP7 and VP4 and it is the most widely used scheme in molecular epidemiology and surveillance programs [6]. These antigens made it possible to define G and P types of the viral strains to better know the predominant strains in human diarrhea and compare them with those isolated from animals to identify

a potential zoonotic risk. Until now, at least 35 G-types and 50 P-types have been identified [7, 8].

The fragmented nature of the genome facilitates the reassortment between and among human and animal strains, which constitutes one of the major processes of the genetic evolution of rotaviruses [2]. Therefore, a new classification system has been proposed in 2008 by the Rotavirus classification working group (RCWG) to better understand the evolution of reassortments and viral inter-species transmission [7]. This new classification system is based on extending the classical binomial genotyping to a full genotype constellation including the 11 segments. These RVA genes VP7-VP4-VP6-VP1-VP2-VP3-NSP1-NSP2-NSP3-NSP4-NSP5 are determined as Gx-P[x]-Ix-Rx-Cx-Mx-Ax-Nx-Tx-Ex-Hx, respectively, with x indicates the genotype number.

In RVA research, complete genome sequencing has become largely used because it offers a good tool allowing the understanding of the intra-genomic variations in the rotavirus genes, hence revealing the pattern of unusual and/or new emerging RVA strains. These latter genotypes are suspected to be originated from animal rotaviruses that have been introduced into human populations through inter-species transmission events, which may be accompanied by reassortment and/or adaptation to a new host [2, 9]. The genotypes G6, G8, and G10 are for example the most common RVA G types found in cattle [10, 11], while the P[14] RVA genotype identified in humans sporadically, takes its origin from several distinct animal species such as rabbits, ungulates and ruminants hosts [12, 13].

The diversity of the human genotypes of circulating RVA as well as the appearance of genotypes considered unusual remain more important in developing countries including Africa than developed countries [14]. The common G and P-type combinations found in Africa were G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8] and G9P[8]; the uncommon G8 and P[6] genotypes have been well documented and associated to a possible zoonotic transmission [15, 16]. The human G8 RVA strains detected in African children were either DS-1-like or Wa-like genotype constellations with a predominance of DS-1-like in abundance and frequency [17–19]. In contrast, elsewhere in the world, the same human G8 genotype mainly carrying the DS-1-like constellation is less common [20, 21].

In Morocco, monitoring the circulation of such unusual strains is not yet performed. In this regard, our research group highlights in the present study, the full genome sequencing of a rare human RVA strain (RVA/Human-tc/MAR/ma31/2011/G8P[14]) isolated in 2011 from an 18-month-old male child with acute diarrhea during a study conducted between April 2011 and May 2013 in the pediatric division of the military teaching hospital Med V in Rabat, Morocco. The amino acid sequence comparison of VP8*, VP7 and VP6 antigenic regions between the strain under study and other world-wide

G8 or P[14] strains and vaccine strains was also performed. This investigation was done to gain more insight into G8P[14] origin and evolution compared to other human and animal G8P[14] strains detected around the world.

Materials and methods

Study sample and initial characterization

Fecal specimen ma31 selected for this study was obtained from an 18-month-old boy with acute gastroenteritis (AGE) during a survey performed on viral gastroenteritis conducted between 2011 and 2013 in Morocco [22]. The child, living in rural region near Rabat, was admitted at the military teaching hospital Mohammed V in Rabat in 2011, diagnosed with mild gastroenteritis with a mean clinical vesikari score of 9. The sample was identified as positive for RVA using the rapid test (Duo Rota-Adenovirus-Check-1, VEDA LAB, France) according to the manufacturer's instructions; then 10% of stool suspension was prepared in PBS and the homogenate was centrifuged at 5000×g for 15 min. Briefly, viral nucleic acid was extracted, reverse transcribed and amplified using specific primers targeting VP4 and VP7 genes [23, 24]. The G- and P- types were determined by partial sequencing with the same primers used for PCR. Using RotaC online classification tool [25], the genotype of ma31 was determined as G8P[14]. Details about kits, protocols and instruments used to characterize this strain are provided in the following sections. Both partial and full-genome sequencing were performed at the National Center for Scientific and Technical Research.

Full-length genome sequencing of ma31 strain

Rotavirus isolation and nucleic acid extraction

As this genotype was detected for the first time in Morocco, further studies including the complete genome sequencing of this strain was performed; thus its isolation was necessary to avoid losing the sample due to stool exhaustion. The isolation was achieved following one passage on rhesus monkey kidney cells (MA104) as described by Ennima et al. [26]. The QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Inc., Valencia, CA) was used to extract total viral RNA from 140 µl of infected cell culture fluid according to the manufacturer's protocol.

Reverse transcription and whole-genome amplification (RT-PCR)

The extracted RNA was denatured at 97 °C for 5 min and quickly chilled on ice for at least 2 min in the presence of Random Hexamer primers mix, 0,5 mM dNTP mix and H₂O

in a final volume of 20 μ l. cDNA was synthesized using Tetro cDNA Synthesis kit (Bioline, London, UK) by adding the reverse transcription reaction mix which contains 10U/ μ l RNase inhibitor and 20U/ μ l reverse transcriptase to make up a final volume of 26 μ l under the following conditions: 25 °C for 10 min, 45 °C for 60 min and 85 °C for 5 min.

Each rotavirus gene segment (11 segments) was amplified by PCR with newly designed primers in addition to specific primers (Supplementary Table 1) using MyFi Mix (Bioline, London, UK) according to manufacturer's instruction. Briefly, 2.5 μ l of cDNA, 0.8 μ M of specific primers for each gene and 8 μ l of MyFi Mix were added to MiliQ water to make up a final volume of 25 μ l. The PCR consisted on an activation step at 95 °C for 2 min and 35 cycles of amplification in a Veriti Thermal Cycler (Life technologies, Inc. Foster City, CA) using the following conditions: 1 min at 95 °C, 1 min at 60 °C and 1 min at 72 °C, with a final extension at 72 °C for 8 min. All PCR products were separated on 1.5% agarose gels containing ethidium bromide (10 mg/ml) and visualized under UV transilluminator.

Nucleotide sequencing

PCR products were purified using ExoSAP-IT purification kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) according to the manufacture's protocol. Sequencing was carried out using Big Dye Terminator Cycle Sequencing kit v3.1 (Life technologies, Inc. Foster City, CA) in both forward and reverse directions with the same primers used for PCR, in addition to primers used only for sequencing to recover the entire fragment. For some genes (VP1, VP3 and NSP1), design of new primers was necessary to complete the sequencing of the whole genome (Supplementary Table 2). The sequence data were collected from an ABI Prism 3130XL Genetic analyzer (Life technologies, Inc. Foster City, CA). The sequences were edited and assembled using DNA Dragon Sequence Assembler version 1.6.0 (Sequentix-Digital DNA Processing, Germany).

The genotypes of each of the 11 gene segments were determined using the RotaC v2.0 automated genotyping tool for group A rotaviruses (<http://rotac.regatools.be>).

Phylogenetic analysis

Multiple sequence alignments were carried out using the MUSCLE program within the MEGA 6 software [27]. Maximum likelihood phylogenetic trees were constructed using models of nucleotide substitutions based on the lowest Bayesian Information Criterion (BIC) scores [28]: GTR+G+I (NSP1, VP1, VP2, VP3 and VP4), T92+G (NSP2, NSP3, NSP4 and VP7) and T92+G+I (NSP5 and VP6) in the MEGA 6 software. The trees were constructed using bootstrap resampling analysis at 1000 replicates.

Amino acid alignments for VP7, VP4, and VP6 genes were performed using MEGA 6 software.

The nucleotide and deduced amino acid sequences of all genome segments of RVA/Human-tc/MAR/ma31/2011/G8P[14] strain were deposited in the National Centre of Biotechnology Information (NCBI) database, GenBank, under the accession numbers from MG214332 (NSP1) to MG214342 (VP7).

Results

This RVA isolate was detected in a stool sample collected from an unvaccinated 18-month-old boy. Partial genotyping recovered the RVA isolate as G8P[14]. The full-genome nucleotide sequence obtained was submitted to RotaC database, it results in assignment of G8-P[14]-I2-R2-C2-M2-A11-N2-T6-E2-H3 constellation. Four of the structural genes (VP1, VP2, VP3 and VP6) and two of the non-structural genes (NSP2, NSP4) were DS-1-like, NSP5 was AU-1-like, NSP1 was the A11 genotype and NSP3 the T6 genotype.

Constellation comparison

The human ma31 strain presents the same genotype constellation with the bovine-like human strains from Italy (BA01, BA02) and Hungary (BP1062, 182-02). It shares also the same constellation with human G6 RVAs such as MG6 (Australia), EGY3399 (Egypt), N-1 (India), Hun5 and BP1879 (Hungary) and with G10 rotaviruses from Italy and Australia (V585 et PR457, respectively) (Table 1).

The constellation of the ovine strain OVR 762 from Spain is completely identical to the human ma31 constellation strain with eleven shared genotypes while some strains from animal origin share ten genotypes with ma31 such as the antelope strain RC 18 from South Africa. Other animal strains such as the caprine strains (GO34, 0040), the bovine strain 1604, and the macaque strain PTRV present only nine shared genotypes. Two animal strains from Argentina with the G8P[14] genotype have the minimum number of shared genotypes with the human strain ma31, eight genotypes for the strain Chubut and seven genotypes for the strain 75 (Table 1). According to the comparison of the constellation of ma31 with animal strains having the same constellation, the full-length sequence has bovine backbone indicating that it is probably of ovine origin (Table 1).

Phylogenetic analysis

In total, 11 phylogenetic trees were built using the full-length sequence of the 11 genes of ma31 (Fig. 1a–k). Nucleotide

identities of the genes compared to the closest related strains present in GenBank were determined (Table 2).

Phylogenetic analysis of ma31 strain showed that VP7, NSP2, NSP3 and NSP4 genes clustered with animal RVA strains while the rest of the genes were closely related to human strains (Table 2 and Fig. 1a–k).

The analysis of the VP7 tree (Fig. 1a) revealed a very close clustering (99% nucleotide identity) of the ma31 strain with the sheep G8P[14] strain detected in Spain in 2002 (sheep-tc/ESP/OVR762/2002/G8P[14]), within a cluster (lineage II) which includes human, goat, roe deer and guanaco strains.

The VP4 tree showed that ma31 was related to P[14] sequences detected in humans, guanaco, antelope and sheep between 1988 and 2012. Human strains included in the tree had mostly G6, G8 and G10 VP7 genotypes (Fig. 1b).

For the ma31 core protein genes, VP1 clustered with human P[14] strains such as ITA/PAI11, ITA/PR1973, EGY/AS970 and HUN/Hun5 (91.3–94.4%) (Fig. 1c), while the VP2 gene phylogeny showed intermediate evolutionary relationships with human, antelope and cow P[14] strains (Human-wt/HUN/182-02, Human-wt/ITA/PAH136, Antelope-wt/ZAF/RC-18-08 and Cow-wt/ZAF/1603) ranging between 94.3–96.1% (Fig. 1d). The VP3 gene phylogeny revealed the same phenomenon as VP2 with an intermediate evolutionary relationships (84.6% to 95.9% at the nucleotide level) with humans, sheep and alpaca P[14] strains (Human-wt/ITA/PR1973, Human-wt/BEL/B10925, Sheep-tc/ESP/OVR762 and alpaca-wt/PER/562) (Fig. 1e). The last gene VP6 clustered closely with the human strain ZAF/2371WC detected in South Africa in 2008 (98.5% nt identity) (Fig. 1f) which was described to be of artiodactyl origin [29].

Concerning non-structural genes, NSP1 gene clustered with human P[14] strains such as HUN/BP1879/2003/G6P[14], Italy/BA02/2012/G8P[14] and Italy/BA01/2012/G8P[14] with 92.5%, 84.1%, 83.9% of nucleotide identity, respectively (Fig. 1g). NSP2 tree showed a close relationship between ma31 strain and the dog 88977 strain detected in Germany in 2013 (98.5% nt identity) (Fig. 1h). For NSP3 and NSP4 genes, their sequences clustered very well with the same sheep strain (ESP/OVR762/2002/G8P[14]) presenting, respectively, 99% and 97.6% of nucleotide identity (Fig. 1i–j). For the latest tree of NSP5 gene, the ma31 strain matched closely with the human strain HUN/182-02/2002/G8P[14] (99.1% nt identity) (Fig. 1k).

VP8*, VP7 and VP6 hypervariable regions

The deduced VP4 (VP8*), VP7 and VP6 amino acid sequences of ma31 strain were compared with selected relevant strains present in the corresponding trees and with sequences of Rotarix™ and RotaTeq™ vaccine strains.

The comparison of VP4 amino acid sequences was carried out for antigenic regions 8-1, 8-2, 8-3, and 8-4 (Fig. 2).

Analysis of the VP8* alignment showed no amino acid substitution in the antigenic region 8-1 (Fig. 2) in contrast five amino acid substitutions were found between ma31 strain and Guatemalan strain 2009726790/2009 (G8P[14]) at residues T180I (8-2), S113Q, T125A and N133D (8-3) and I89A (8-4). One amino acid change differentiated the ma31 strain from all related strains included in the comparison at residue N133D (8-3) with the exception of Belgian B10925/1997/G6P[14] and Australian WAG8.1/2002/G8P[14] strains. In addition, one amino acid substitution was found at residue N183D (8-2) with the Belgium strain B10925/1997/G6P[14] (Fig. 2).

Comparison of the Moroccan G8P[14] strain with the VP8* antigenic regions (8-1, 8-2, 8-3 and 8-4) of the P[8] vaccine strains Rotarix™ and RotaTeq™ showed 20 and 22 amino acid substitutions, respectively (Fig. 2).

The amino acid sequences in the VP7 antigenic regions (7-1a, 7-1b and 7-2) of the ma31 G8P[14] strain showed a single change compared to animal and human strains Vicuna-wt/ARG/C75/2010/G8P[14], Cow-wt/JPN/Sun9/2000/G8P[14], Goat-wt/ARG/0040/2011/G8P[1] and Human-tc/KEN/B12/1987/G8P[1] at residue T87 V (7-1a). Additionally, two amino acid substitutions were found in comparison with Guanaco-wt/ARG/Chubut/1999/G8P[14] strain at residues T87 V (7-1a), N238S (7-1b), with Dog-wt/GER/88977/2013/G8P[1] strain at T87 V, T91 K (7-1a) and with human strain GTM/2009726790/2009/G8P[14] at T87 V (7-1a), N147S (7-2). Another two amino acid substitutions were observed between ma31 strain and animal strain roe deer-wt/SLO/D110-05/2015/G8P[14] at residues T87I and N147S (7-1a and 7-2, respectively) (Fig. 3).

Comparison with the VP7 antigenic regions of vaccine strains showed that 14 residues from 29 were conserved between the ma31 strain and the G1 Rotarix™ strain, and from 10 to 18 residues compared with the five VP7 RotaTeq™ strains (Fig. 3).

The analysis of the four antigenic sites of VP6 (I–IV) demonstrated a high degree of conservation between ma31 strain and most of the human and animal strains analyzed. Only two amino acid substitutions were observed in antigenic site I; at residue V56I from ZAF/RC-18-08/G6P[14] to GTM/2009726790/G8P[14] and at residue D62A with SEN/MRC-DPRU2053/G8P[6]. In the antigenic site III, one amino acid substitution was reported at residue I211 V with two strains ZAF/MRC-DPRU3010 and GTM/2009726790 (Fig. 4).

The comparison of the VP6 antigenic regions with the vaccine strains showed four amino acid substitutions between ma31 strain and the Rotarix™ strain (I and IV), and only one substitution with the RotaTeq™ strains at residue I211 V (III) (Fig. 4).

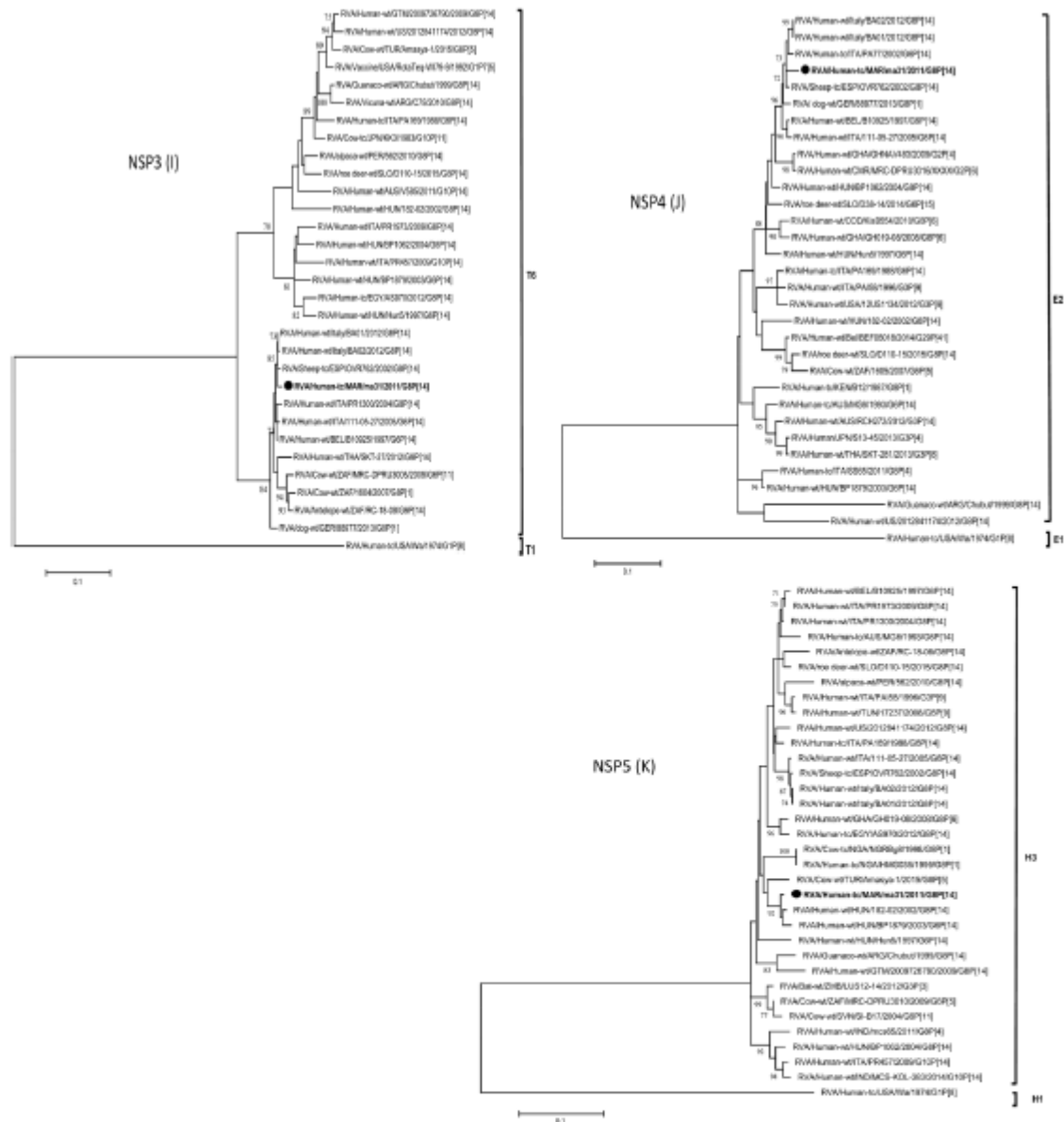


Fig. 1 (continued)

Discussion

The rare genotype G8P[14] is reported for the first time in Morocco and appeared in natural conditions. It represents to our knowledge, the second case reported in Africa after Egypt [30]. Genotypes circulating in Morocco even after a successive introduction of Rotarix™ and RoTateq™ vaccines into the national immunization programs in 2010 and

2014, respectively, are G1P[8], G9P[8], G2P[4], G4P[8] and G3P[8] [30–32]. The limited cases reported worldwide (Italy, Denmark, Finland, Hungary, United states, Guatemala, Taiwan, Australia,) [33, 34] suggest that this rare genotype of rotaviruses is not fully adapted to humans which explains its limited spread. To further investigate the genetic relationship of this strain with other G8P[14] strains, it was necessary to characterize its full genome.

Table 2 Nucleotide sequence identities of RVA/Human-tc/MAR/ma31/2011/G8P[14] strain to closely related strains

Gene	% identity to closest related strain	Closely related strain	GenBank accession no.	RotaC classification
NSP1	92.5	RVA/Human-wt/HUN/BP1879/2003/G6P[14]	FN665681	A11
NSP2	98.5	RVA/Dog-wt/GER/88977/2013/G8P[1]	KJ940158	N2
NSP3	99	RVA/Sheep-tc/ESP/OVR762/2002/G8P[14]	EF554156	T6
NSP4	97.6	RVA/Sheep-tc/ESP/OVR762/2002/G8P[14]	EF554157	E2
NSP5	99.1	RVA/Human-wt/HUN/182-02/2002/G8P[14]	KU508379	H3
VP1	94.4	RVA/Human-wt/ITA/PA111/1996/G2P[4]	KC178764	R2
VP2	96.1	RVA/Human-wt/HUN/182-02/2002/G8P[14]	KU508381	C2
VP3	95.9	RVA/Human-wt/BEL/B10925/1997/G6P[14]	EF554117	M2
VP4	98.1	RVA/Human-wt/BEL/B10925/1997/G6P[14]	EF554118	P[14]
VP6	98.5	RVA/Human-wt/ZAF/2371WC/2008/G9P[8]	JN014002	I2
VP7	99	RVA/Sheep-tc/ESP/OVR762/2002/G8P[14]	EF554153	G8

	8-1										8-2		8-3							8-4						
	120	148	148	150	188	190	192	193	194	195	196	180	183	113	114	115	116	125	131	132	133	135	87	88	89	
Human-tc/MAR/ma31/2011/G8P[14]	D	L	K	G	Y	L	I	N	N	D	N	T	N	S	N	T	Q	T	S	N	N	S	T	Q	I	
Human-wt/BEL/B10925/1997/G6P[14]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Sheep-tc/ESP/OVR762/2002/G8P[14]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	D	-	-	-	
Human-wt/BEL/N182-02/2002/G8P[14]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Human-wt/EGY/AS970/2012/G8P[14]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Human-wt/ITA/PA111/1996/G2P[4]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Human-wt/CHN/B1215987/G8P[14]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Human-wt/USA/2009/G1P[8]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	I	Q	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	A	
Human-wt/USA/2009/G1P[8]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Cow-wt/IND/79/2007/G8P[14]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Human-wt/ALI/S/WR/08/1/2002/G8P[14]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Rotarix/USA/2009/G1P[8]	-	S	S	N	S	S	A	-	L	N	-	E	R	N	P	V	D	S	-	-	-	D	N	N	T	N
RotaTeq-WT79-4/USA/1992/G6P1A[8]	-	S	S	N	S	N	A	-	L	N	D	E	R	N	P	V	D	N	R	-	-	D	D	N	T	N

Fig. 2 Alignment of antigenic residues in the four VP8* (VP4) antigenic regions between the ma31 strain, the vaccine strains Rotarix™ and RotaTeq™, and relevant strains selected from the VP4 tree

	7-1a										7-1b					7-2														
	87	91	94	96	97	98	99	100	104	123	125	129	130	201	211	212	213	238	242	143	145	146	147	148	190	207	221	284		
Human-tc/MAR/ma31/2011/G8P[14]	T	T	A	S	S	W	K	D	Q	D	A	I	N	K	Q	D	T	T	N	T	K	N	A	N	S	S	E	A	G	
Sheep-tc/ESP/OVR762/2002/G8P[14]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Human-wt/Italy/IA01/2012/G8P[14]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Human-wt/Italy/IA02/2012/G8P[14]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Roe deer-wt/BEL/OH110-152015/G8P[14]	I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S	-	-	-	-	
Vietnam-wt/ARG/CT5/2010/G8P[14]	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Ghana-wt/ARG/Chibata/1999/G8P[14]	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Human-wt/GTM/20097267902009/G8P[14]	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S	-	-	-	-	
Cow-wt/IND/79/2007/G8P[14]	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Dog-wt/GER/88977/2013/G8P[1]	V	K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Human-wt/CHN/B1215987/G8P[14]	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Giant-wt/ARG/00402011/G8P[1]	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Rotarix/USA/2009/G1P[8]	-	N	G	E	-	-	-	-	S	V	V	D	-	-	N	V	D	-	-	-	-	-	-	-	D	Q	-	L	M	N
RotaTeq-OR2-9/USA/1992/G12P[5]	A	N	S	D	E	-	E	N	-	T	M	-	-	-	V	S	-	S	R	D	N	T	-	D	I	S	-	-		
RotaTeq-WT79-4/USA/1992/G12P[5]	-	N	N	-	-	-	-	-	-	V	D	-	-	-	A	N	K	D	-	-	-	-	-	-	D	T	L	-	-	-
RotaTeq-OR2-9/USA/1992/G12P[5]	S	-	S	T	E	-	-	-	N	L	-	D	-	-	-	A	D	-	-	R	A	S	G	E	-	T	S	-	-	
RotaTeq-WT79-4/USA/1992/G12P[5]	V	N	-	T	E	-	-	-	-	V	E	-	-	-	N	P	D	-	A	-	-	-	D	S	T	Q	-	T	T	

Fig. 3 Alignment of antigenic residues in the three VP7 antigenic regions between ma31 strain, the vaccine strains Rotarix™ and RotaTeq™, and relevant strains selected from the VP7 tree

The constellation results demonstrated that this strain belongs to DS-1-like genogroup 2 for most genes except for H3 genotype which is presented normally among AU-1-like rotaviruses (genogroup 3) and for A11 and T6 genotypes, which are characteristic of artiodactyl bovine-like rotavirus strains [35]. Consequently, the human ma31 strain represent interspecies transmissions from RVA strains belonging to members of the *Artiodactyla* family such as cattle, guanaco and sheep like it was previously reported by Matthijnsens et al. [36]. The full length genome analysis of ma31 strain showed a mixed configuration of genes of possible animal origin and zoonotic human origin which indicates the generation of reassortment between human and animal rotaviruses revealing this unusual human strain (Fig. 1a–k). Four out of eleven genes (VP7, NSP2, NSP3, NSP4) of the strain RVA/Human-tc/MAR/ma31/2011/G8P[14] presented a very close identity with the respective genes of Dog-wt/GER/88977/2013/G8P[1] and Sheep-tc/ESP/OVR762/2002/G8P[14] strains while the remaining genes (VP1, VP2, VP3, VP4, VP6, NSP1, NSP5) were more closer to human rotavirus strains such as HUN/182-02/2002/G8P[14], BEL/B10925/1997/G6P[14] and ZAF/2371WC/2008/G9P[8] detected several years before in Hungary, Belgium and South Africa respectively (Table 2).

Concerning human P[14] strains, previous studies proposed their common origin with strains affecting ungulates belonging to the order *Artiodactyla* [36] and within the P[14] genotype, the Moroccan strain occupies lineage I shared with human P[14] strains from Italy, Belgium and Hungary as well as animal RVA P[14] strains (bovine, Antelope and sheep) from India, South Africa and Spain. This genotype was reported in neonate calves from different Moroccan geographical regions in combination with G10 genotype [26] suggesting a possible origin of infection from a bovine species. Moreover, the susceptibility of the child to the heterologous genotype of rotavirus P[14] might be related to the phenotype of the ABO blood group. Indeed, the VP8* fragment of the P[14] VP4 protein for example was demonstrated to interact with type A histo-blood group antigens of humans and only people carrying this kind of antigens are likely to be infected with these genotypes [37, 38].

The animal G8 rotavirus genotype is known to be present in bovine species but circulating with a lower frequency compared to the G6 and G10 genotypes, however this genotype represented the dominant strain identified in Japan [39] and Tunisia [40]. In humans, G8 rotavirus has been detected sporadically throughout the world in combination with different P-types such as P[4], P[6] and P[8] [21, 41]. In contrast, this rare genotype presented a prevalence of 12% in some African countries compared to other genotypes detected in that continent [16] combined with other rotavirus genes from animal origin [18, 41, 42]. In Morocco, human G8 genotype has been reported among circulating strains

for the first time in 2015 in Rabat as G8P[9] isolated strain [43]. Within the G8 genotype, the literature described the presence of 6 lineages identified to date [21]. The VP7 ma31 gene belongs to lineage II which contains mostly sheep, goat, porcine, bovine and artiodactyl-like human strains. This lineage was demonstrated to be of animal origin [41].

People living nearby intensive livestock farms especially close to small ruminants are at increased risk exposure to animal rotaviruses which may lead to a possible co-infection and generation of reassortants between human and animal rotaviruses. The infected case reported in the present study lives in a rural area near Rabat in close contact with sheep, goats, bovine and dogs. This may explain in part the ma31 genomic rare constellation as described in other studies [42]. However, the fact that this rare G8P[14] genotype has been detected in a single patient among all the samples collected during the survey, may suggest that this genotype or reassortant strain is not yet well adapted to spread effectively among humans.

Considering that the two most used vaccines Rotarix™ and RotaTeq™ have shown great efficacy against the five most widespread G genotypes (G1, G3, G4, G9, and G12) in the world and a large cross-protection against serotypes not present in the vaccine, the efficacy data against genotypes of non-human origins are still limited [44]. A recent study carried out on G8 strains in sub-Saharan Africa showed that RotaTeq™ has good efficacy against this serotype, this may be due to the composition of the vaccine which carries a bovine genetic background [45].

Comparison of the major antigenic regions (8-1, 8-2, 8-3, 8-4, 7-1a, 7-1b, 7-2) of the VP8* and VP7 amino acid sequences [46] between ma31 strain and some relevant animal and human P[14] and/or G8 strains analyzed in various parts of the world showed several differences in some residues positions. Even if these strains present a genetic variability, they share the common genetic background that appears to be modified by independent interspecies transmission events (Figs. 2, 3 and 4).

Unsurprisingly, the analysis of VP7 antigenic region of ma31 strain revealed 15 differences out of 29 amino acids contained in the major antigenic sites related to the neutralization of the G1 Rotarix™ strain, as well as 11 to 19 differences with the four RotaTeq™ strains (G1–G4) (Fig. 3). Similar results were observed for the antigenic regions of VP8*, where the ma31 strain antigenic sites differed significantly from those of vaccine strains (P[8]) with 20 and 22 different amino acids out of 29 compared to Rotarix™ and RotaTeq™ strains, respectively (Fig. 2). However, these differences noted in the VP7 and VP8* of the ma31 strain do not provide a clear conclusion as to whether or not the effectiveness of the immunity induced by the Rotarix™ and RotaTeq™ vaccines in protection against infections with rotavirus strains of zoonotic origin will be reduced.

In contrast, the analysis of the VP6 amino acid sequences of the four major antigenic sites [47] showed a high degree of conservation between ma31 strain, animal and human strains included in the analysis, while it represented 1 and 4 differences with the RotaTeq™ and Rotarix™ vaccine strains, respectively (Fig. 4).

The mechanisms of protection against rotavirus infection are still unclear until now and it seems that other genes in addition to VP4 and VP7 are involved [48] such as the VP6 gene which might play a role in vaccine-induced immunity [49]. Furthermore, multiple factors may influence the effectiveness of both vaccines and the potential impact of amino acid changes in the antigenic regions cannot be assumed by sequence information alone [50, 51].

In conclusion, and since the VP6 amino acid sequences of the four major antigenic sites in ma31 strain showed a high degree of conservation with RotaTeq™ and Rotarix™ vaccine strains, this would probably initiate an effective immune response against G8P[14] strain. Unfortunately, in Morocco, there are no RVA strain surveillance strategies to predict the possible introduction of new strains resulting from interspecies transmission into humans.

In summary, this study presents the first report of G8P[14] RVA strain isolated in Morocco, Africa with a genomic constellation G8-P[14]-I2-R2-C2-M2-A11-N2-T6-E2-H3. This strain belongs to lineage I within the P[14] genotype. The results of this study confirm the importance of interspecies transmission which plays a role in the generation of a large diversity of human rotaviruses through zoonotic reassortments. Further studies are, therefore, warranted to monitor at the full-genome level if such emerging strains will spread globally to ensure the successful use of vaccines and to explain the vaccine failure if it occurs.

Acknowledgements This study was supported by the National Center for Scientific and Technical Research (CNRST) and the Military Health Service. There was no involvement of the funding sources in carrying out this work from its conception to the data analysis, article writing and its submission for publication.

Author contributions NT and EE conceived and designed the study. SA and MM carried out the experiments. SA, MM and ME performed the data analysis. SA wrote the draft. NT, EE, MM and ME reviewed the manuscript. All the authors read the final version of the manuscript and approved it for publication.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethical approval Ethical approval for this study was obtained from the Biomedical Research Ethics Committee of the Faculty of Medicine and Pharmacy of Rabat, Mohamed V University, Morocco following the guidelines set by the Declaration of Helsinki.

References

- Estes MK, Greenberg HB (2013) Rotaviruses. In: Knipe PMHDM, Cohen JI, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Racaniello VR, Roizman B (eds) *Fields Virology*. Williams and Wilkins, Philadelphia, pp 1347–1401
- Martella V, Banyai K, Matthijnsens J, Buonavoglia C, Ciarlet M (2010) Zoonotic aspects of rotaviruses. *Vet Microbiol* 140(3–4):246–255
- Parashar UD, Gibson CJ, Bresee JS, Glass RI (2006) Rotavirus and severe childhood diarrhea. *Emerg Infect Dis* 12(2):304–306
- Tate JE, Burton AH, Boschi-Pinto C, Parashar UD (2016) Global, regional, and national estimates of rotavirus mortality in children < 5 years of age, 2000–2013. *Clin Infect Dis* 1(62):S96–S105
- Estes MK, Kapikian AZ (2006) Rotaviruses. In: Knipe D, Griffin D, Lamb R, Martin M, Roizman B, Straus S (eds) *Fields Virology*. Wolters Kluwer Health; Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, pp 1917–1974
- Iturriza-Gomara M, Dallman T, Banyai K, Bottiger B, Buesa J, Diedrich S, Fiore L, Johansen K, Koopmans M, Korsun N, Koukou D, Kroneman A, Laszlo B, Lappalainen M, Maunula L, Marques AM, Matthijnsens J, Midgley S, Mladenova Z, Nawaz S, Poljsak-Prijatelj M, Pothier P, Ruggeri FM, Sanchez-Fauquier A, Steyer A, Sidaraviciute-Ivaskeviciene I, Syriopoulos V, Tran AN, Usonis V, Van Ranst M, Rougemont A, Gray J (2011) Rotavirus genotypes co-circulating in Europe between 2006 and 2009 as determined by EuroRotaNet, a pan-European collaborative strain surveillance network. *Epidemiol Infect* 139(6):895–909
- Matthijnsens J, Ciarlet M, McDonald SM, Attoui H, Banyai K, Brister JR, Buesa J, Esona MD, Estes MK, Gentsch JR, Iturriza-Gomara M, Johne R, Kirkwood CD, Martella V, Mertens PP, Nakagomi O, Parreno V, Rahman M, Ruggeri FM, Saif LJ, Santos N, Steyer A, Taniguchi K, Patton JT, Desselberger U, Van Ranst M (2011) Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG). *Arch Virol* 156(8):1397–1413
- Rojas Miguel A, Gonçalves Jorge Luiz S, Dias Helver G, Mançago A, Santos N (2017) Identification of two novel rotavirus A genotypes, G35 and P[50], from Peruvian alpaca faeces. *Infect Genet Evol* 55:71–74
- Degiuseppe JJ, Beltramino JC, Millan A, Stupka JA, Parra GI (2013) Complete genome analyses of G4P[6] rotavirus detected in Argentinean children with diarrhoea provides evidence of interspecies transmission from swine. *Clin Microbiol Infect*. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12216>
- Banyai K, Gentsch JR, Griffin DD, Holmes JL, Glass RI, Szucs G (2003) Genetic variability among serotype G6 human rotaviruses: identification of a novel lineage isolated in Hungary. *J Med Virol* 71(1):124–134
- Matthijnsens J, Ciarlet M, Heiman E, Arijs I, Delbeke T, McDonald SM, Palombo EA, Iturriza-Gomara M, Maes P, Patton JT, Rahman M, Van Ranst M (2008) Full genome-based classification of rotaviruses reveals a common origin between human Wa-like and porcine rotavirus strains and human DS-1-like and bovine rotavirus strains. *J Virol* 82(7):3204–3219
- Doro R, Farkas SL, Martella V, Banyai K (2015) Zoonotic transmission of rotavirus: surveillance and control. *Expert Rev Anti Infect Ther* 13(11):1337–1350
- Medici MC, Tummolo F, Bonica MB, Heylen E, Zeller M, Calderaro A, Matthijnsens J (2015) Genetic diversity in three bovine-like human G8P[14] and G10P[14] rotaviruses suggests independent interspecies transmission events. *J Gen Virol* 96(Pt 5):1161–1168

14. Page N, Esona M, Seheri M, Nyangao J, Bos P, Mwenda J, Steele D (2010) Characterization of genotype G8 strains from Malawi, Kenya, and South Africa. *J Med Virol* 82(12):2073–2081
15. Armah GE, Steele AD, Esona MD, Akran VA, Nimzing L, Penap G (2010) Diversity of rotavirus strains circulating in west Africa from 1996 to 2000. *J Infect Dis* 1(202):653571
16. Todd S, Page NA, Duncan Steele A, Peenze I, Cunliffe NA (2010) Rotavirus strain types circulating in Africa: review of studies published during 1997–2006. *J Infect Dis* 1(202):653555
17. Dennis FE, Fujii Y, Haga K, Damanka S, Lartey B, Agbemabiese CA, Ohta N, Armah GE, Katayama K (2014) Identification of novel Ghanaian G8P[6] human-bovine reassortant rotavirus strain by next generation sequencing. *PLoS ONE* 9(6):e100699
18. Ghosh S, Gatheru Z, Nyangao J, Adachi N, Urushibara N, Kobayashi N (2011) Full genomic analysis of a G8P[1] rotavirus strain isolated from an asymptomatic infant in Kenya provides evidence for an artiodactyl-to-human interspecies transmission event. *J Med Virol* 83(2):367–376
19. Nakagomi T, Doan YH, Dove W, Ngwira B, Iturriza-Gomara M, Nakagomi O, Cunliffe NA (2013) G8 rotaviruses with conserved genotype constellations detected in Malawi over 10 years (1997–2007) display frequent gene reassortment among strains co-circulating in humans. *J Gen Virol* 94(Pt 6):1273–1295
20. Gautam R, Mijatovic-Rustempasic S, Roy S, Esona MD, Lopez B, Mencos Y, Rey-Benito G, Bowen MD (2015) Full genomic characterization and phylogenetic analysis of a zoonotic human G8P[14] rotavirus strain detected in a sample from Guatemala. *Infect Genet Evol* 33:206–211
21. Ianiro G, Delogu R, Bonomo P, Castiglia P, Ruggeri FM, Fiore L (2014) Molecular characterization of human G8P[4] rotavirus strains in Italy: proposal of a more complete subclassification of the G8 genotype in three major lineages. *Infect Genet Evol* 21:129–133
22. Doblali T, Touil N, Kaplon J, Ambert-Balay K, Agdar A, El hamzaoui S, Pothier P (2015) Clinical and molecular descriptions of rotavirus in Morocco 2 years after Rotarix® introduction. In 6th European Rotavirus Biology Meeting (ERBM), Dijon, France, 17–20 May
23. Iturriza-Gomara M, Kang G, Gray J (2004) Rotavirus genotyping: keeping up with an evolving population of human rotaviruses. *J Clin Virol* 31(4):259–265
24. Simmonds MK, Armah G, Asmah R, Banerjee I, Damanka S, Esona M, Gentsch JR, Gray JJ, Kirkwood C, Page N, Iturriza-Gomara M (2008) New oligonucleotide primers for P-typing of rotavirus strains: strategies for typing previously untypeable strains. *J Clin Virol* 42(4):368–373
25. Maes P, Matthijssens J, Rahman M, Van Ranst M (2009) RotaC: a web-based tool for the complete genome classification of group A rotaviruses. *BMC Microbiol* 9(238):1471–2180
26. Ennima I, Sebbar K, Harif B, Amzazi S, Loutfi C, Touil N (2016) Isolation and identification of group A rotaviruses among neonatal diarrheic calves Morocco. *BMC Res Notes* 9(1):261
27. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 28(10):2731–2739
28. Schwarz G (1978) Estimating the dimension of a model. *Ann Stat* 6(2):461–464
29. Jere KC, Mlera L, Page NA, van Dijk AA, O'Neill HG (2011) Whole genome analysis of multiple rotavirus strains from a single stool specimen using sequence-independent amplification and 454(R) pyrosequencing reveals evidence of intergenotype genome segment recombination. *Infect Genet Evol* 11(8):2072–2082
30. Holmes JL, Kirkwood CD, Gerna G, Clemens JD, Rao MR, Naficy AB, Abu-Elyazed R, Savarino SJ, Glass RI, Gentsch JR (1999) Characterization of unusual G8 rotavirus strains isolated from Egyptian children. *Arch Virol* 144(7):1381–1396
31. Benhafid M, Elomari N, Azzouzi Idrissi M, Rguig A, Gentsch JR, Parashar U, Elaouad R (2015) Effect of monovalent rotavirus vaccine on rotavirus disease burden and circulating rotavirus strains among children in Morocco. *J Med Virol* 87(6):944–953
32. Benhafid M, Rguig A, Trivedi T, Elqazoui M, Teleb N, Mouane N, Filali-Maltouf A, Parashar U, Patel M, Elaouad R (2012) Monitoring of rotavirus vaccination in Morocco: establishing the baseline burden of rotavirus disease. *Vaccine* 30:6515–6520
33. Gerna G, Steele AD, Hoshino Y, Sereno M, Garcia D, Sarasini A, Flores J (1994) A comparison of the VP7 gene sequences of human and bovine rotaviruses. *J Gen Virol* 75(Pt 7):1781–1784
34. Mijatovic-Rustempasic S, Roy S, Sturgeon M, Rungtirsuriyachai K, Reisdorf E, Corlese MM, Bowen MD (2015) Full-genome sequence of the first G8P[14] rotavirus strain detected in the United States. *Genome Announc* 3(3):00677–15
35. Matthijssens J, Van Ranst M (2012) Genotype constellation and evolution of group A rotaviruses infecting humans. *Curr Opin Virol* 2(4):426–433
36. Matthijssens J, Potgieter CA, Ciarlet M, Parreno V, Martella V, Banyai K, Garaicoechea L, Palombo EA, Novo L, Zeller M, Arista S, Gerna G, Rahman M, Van Ranst M (2009) Are human P[14] rotavirus strains the result of interspecies transmissions from sheep or other ungulates that belong to the mammalian order Artiodactyla? *J Virol* 83(7):2917–2929
37. Hu L, Crawford SE, Czako R, Cortes-Penfield NW, Smith DF, Le Pendu J, Estes MK, Prasad BV (2012) Cell attachment protein VP8* of a human rotavirus specifically interacts with A-type histo-blood group antigen. *Nature* 485(7397):256–259
38. Liu Y, Huang P, Tan M, Biesiada J, Meller J, Castello AA, Jiang B, Jiang X (2012) Rotavirus VP8*: phylogeny, host range, and interaction with histo-blood group antigens. *J Virol* 86(18):9899–9910
39. Fukai K, Sakai T, Hirose M, Itou T (1999) Prevalence of calf diarrhea caused by bovine group A rotavirus carrying G serotype 8 specificity. *Vet Microbiol* 66:301–311
40. Fodha I, Boumaiza A, Chouikha A, Dewar J, Armah G, Geyer A, Trabelsi A, Steele AD (2005) Detection of group A rotavirus strains circulating in calves in Tunisia. *J Vet Med* 52:49–50
41. Matthijssens J, Rahman M, Yang X, Delbeke T, Arijis I, Kabue JP, Muyebe JT, Van Ranst M (2006) G8 rotavirus strains isolated in the democratic Republic of Congo belong to the DS-1-like genogroup. *J Clin Microbiol* 44(5):1801–1809
42. Esona M, Steele D, Kerin T, Armah G, Peenze I, Geyer A, Page N, Nyangao J, Akran Agbaya V, Trabelsi A, Tsion B, Aminu M, Sebunya T, Dewar J, Glass R, Gentsch J (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. *J Infect Dis* 202:S49–S54
43. Benmessaoud R, Jroundi I, Mouane N, Moraleda C, Tligui H, Seffar M, Alvarez-Martinez MJ, Pons MJ, Chaacho S, Hayes EB, Vila J, Alonso PL, Bassat Q, Ruiz J (2015) Aetiology, epidemiology and clinical characteristics of acute moderate-to-severe diarrhoea in children under 5 years of age hospitalized in a referral paediatric hospital in Rabat, Morocco. *J Med Microbiol* 64(1):84–92
44. Patel M, Steele D, Gentsch J, Wecker J, Glass R, Parashar U (2011) Real-world impact of rotavirus vaccination. *Pediatr Infect Dis J* 30(1 Suppl):S1–S5
45. Heylen E, Zeller M, Ciarlet M, Lawrence J, Steele D, Van Ranst M, Matthijssens J (2015) Comparative analysis of pentavalent rotavirus vaccine strains and G8 rotaviruses identified during vaccine trial in Africa. *Sci Rep* 5:14658
46. Dormitzer PR, Sun ZY, Wagner G, Harrison SC (2002) The rhesus rotavirus VP4 sialic acid binding domain has a galectin fold with a novel carbohydrate binding site. *EMBO J* 21(5):885–897

47. Buragohain M, Cherian SS, Prabhakar G, Chitambar SD (2008) VP6 capsid protein of chicken rotavirus strain CH2: sequence, phylogeny and in silico antigenic analyses. *Virus Res* 137(2):173–178
48. Desselberger U, Huppertz HI (2011) Immune responses to rotavirus infection and vaccination and associated correlates of protection. *J Infect Dis* 203(2):188–195
49. Franco MA, Angel J, Greenberg HB (2006) Immunity and correlates of protection for rotavirus vaccines. *Vaccine* 24(15):2718–2731
50. Delogu R, Ianiro G, Camilloni B, Fiore L, Ruggeri FM (2015) Unexpected spreading of G12P[8] rotavirus strains among young children in a small area of central Italy. *J Med Virol* 87(8):1292–1302
51. Kirkwood CD (2010) Genetic and antigenic diversity of human rotaviruses: potential impact on vaccination programs. *J Infect Dis* 202:S43–S48

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

Partie II :
Preuves de transmission
zoonotique du rotavirus groupe
A à partir de chèvres et de
bovins dans des troupeaux
nomades au Maroc, 2012-2014

Partie II : Preuves de transmission zoonotique du rotavirus groupe A à partir de chèvres et de bovins dans des troupeaux nomades au Maroc, 2012-2014

1. Objectif de l'étude

Le premier objectif de cette étude était de fournir quelques indications sur la circulation du rotavirus groupe A chez les chèvres et les veaux nomades lors de deux graves épidémies de diarrhée survenues en 2012 et 2014 à Bouaarfa, une région nomade de la partie orientale du Maroc.

Le deuxième objectif était la détermination de la constellation du génome complet d'une souche de RVA caprine et d'une deuxième souche de RVA bovine en utilisant le séquençage complet du génome afin d'obtenir plus d'informations sur leur parenté génétique avec un génotype humain rare G8P[14] détecté chez un enfant pour la première fois au Maroc [341].

La comparaison des séquences d'acides aminés de la région antigénique VP8* entre les souches caprines, bovine et humaine et d'autres souches pertinentes a également été menée. En même temps, d'éventuels événements de transmission inter espèces de RVA dans ces circonstances ont également été discutés.

2. Zone de l'étude et population

Au Maroc, les systèmes d'élevage bédouins qui sont présents dans plusieurs régions du pays, dont la région de Bouarffa, peuvent favoriser l'introduction de nouvelles souches d'un hôte hétérologue à l'homme par transmission inter-espèces compte tenu de leur mode de vie nomade. En raison de la grande mobilité du bétail et du caractère temporaire des habitats nomades, aucune étude n'a identifié les RVA en circulation qui provoquent des épidémies saisonnières soudaines de diarrhée chez les moutons, les chèvres, les dromadaires et le bétail. En outre, cette maladie infectieuse peut avoir de graves répercussions négatives sur l'économie de l'élevage pour les éleveurs nomades, étant donné le grand impact économique que représente l'élevage de ruminants dans ces régions. Quelques études ont été menées au

niveau des exploitations laitières au Maroc pour la détection du RVA; il a été démontré que chez les veaux, G10P[14] et G6P [5] sont les génotypes les plus en circulation [386].

3. Echantillonnage

Au total, 30 échantillons de selles diarrhéiques ont été prélevés sur des jeunes chèvres (19) et des veaux (11) lors de graves épidémies de diarrhée aiguë qui se sont produites en 2012 et en 2014 à Bouaarfa, une région d'éleveurs nomades située dans l'Est du Maroc.

4. Détection du RVA

Les échantillons de selles ont été identifiés comme étant positifs pour le RVA en utilisant le test rapide (Duo Rota-Adenovirus-Check-1, VEDA LAB, France) selon les instructions du fabricant.

4.1. Extraction de l'ARN viral

10 % de la suspension fécale a été préparée dans le PBS. L'homogénat a été centrifugé à 5000×g pendant 15 minutes et le surnageant a été collecté. L'ARN viral total a été extrait de 140 µl du surnageant à l'aide du mini kit d'ARN viral QIAamp (Qiagen, Inc., Valencia, CA) en suivant les instructions du fabricant. L'ARN viral a été élué dans 50 µl de tampon d'élution et stocké à -80 °C (*Cf. Annexe II*).

Le dosage des échantillons d'ARN ainsi que le contrôle de qualité ont été effectué par le Nanodrop 8000 (*Cf. Annexe IX*).

4.2. RT-PCR et séquençage partiel des gènes VP7 et VP4

L'ARN viral extrait a été reverse transcrit (RT) à l'aide du kit de synthèse d'ADNc « Tetro cDNA Synthesis kit » (Bioline, Londres, Royaume-Uni) en suivant les instructions du fabricant. Les PCR ont été réalisées à l'aide d'amorces spécifiques ciblant VP4 et VP7 et MyFi Mix (Bioline, Londres, Royaume-Uni) comme décrit précédemment [402, 403].

Les produits PCR ont été purifiés en utilisant le kit de purification ExoSAP-IT (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) selon le protocole du fabricant.

Les séquences nucléotidiques ont été déterminées en utilisant le Kit de séquençage « Big Dye Terminator v3.1 » (Technologies de la vie, Inc. Foster City, CA) sur le séquenceur « ABI 3130XL » (Life technologies, Inc. Foster City, CA).

Les étapes de RT PCR et de séquençage partiel des gènes VP4 et VP7 des souches positives se sont déroulées en suivant les mêmes protocoles de la partie I relative au séquençage partiel de la souche humaine rare G8P[14].

4.3. Attribution des génotypes

Les génotypes du rotavirus groupe A ont été attribués aux segments de gènes VP7 et VP4 des souches positives à l'aide de l'outil de génotypage en ligne des rotavirus, RotaC v2.0 [385].

Les séquences partielles des gènes VP7 et VP4 ont été déposées dans la base de données de séquences GenBank sous les numéros d'accès de KT461271 à MN583318 (Tableau 8).

Tableau 8. Recueil de données à partir de 30 échantillons fécaux collectés en 2012 et 2014 à Bouaarfa, dans la partie orientale du Maroc.

(+) Echantillons positifs pour le RVA en utilisant le test rapide Duo Rota-Adenovirus-Check-1, VEDA LAB, France. (-) Echantillons négatifs pour le RVA en utilisant le test rapide Duo Rota-Adenovirus-Check-1, VEDA LAB, France. (X) Génotypes indéterminés.

Identification des échantillons	Age (jours)	Origine	Test rapide Duo Rota-Adenovirus-Check-1	Génotypes	Numéros d'accès du gène VP4	Numéros d'accès du gène VP7
Ch_S10	10	Young goat	+	G6P[14]	KT461271	KT461280
Ch_S11	8	Young goat	+	G6P[14]	KT461274	KT461283
Ch_S111	10	Young goat	+	G6P[14]	KT461275	KT461284
Ch_S31	4	Young goat	+	G6P[14]	KT461276	KT461285
Ch_S61	15	Young goat	+	G6P[14]	KT461277	KT461286
Ch_S44	20	Young goat	+	G10P[14]	KT461279	KT461288
Ch_S2	15	Young goat	+	G6P[14]	KT461272	KT461281
Ch_S12	10	Young goat	+	G6P[14]	KT461278	KT461287
Ch_S22	10	Young goat	+	G6P[14]	KT461273	KT461282
S1	10	Calf	+	GxP[14]		-
S2	10	Calf	+	G10P[14]	MN583320	MN583315
S3	10	Calf	+	GxP[14]	MN583321	-
S4	22	Calf	+	GxP[14]	MN583322	
S5	14	Young goat	+	G6P[14]	MN583323	MN583316
S6	16	Calf	+	GxP[14]	MN583324	-
S7	10	Calf	+	GxP[14]	MN583325	
S8	22	Young goat	+	GxP[14]	MN583326	-
S9	25	Calf	+	GxP[14]	MN583327	-
S10	15	Young goat	-	-	-	-
S11	15	Calf	-	-	-	-
S12	60	Young goat	+	G10P[14]	MN583328	MN583317
S13	21	Calf	-	-	-	-
S14	60	Calf	-	-	-	-
S15	7	Young goat	+	G10P[5]	MN583329	MN583318
S16	6	Young goat	-	-	-	-
S17	7	Young goat	-	-	-	-
S18	15	Calf	+	G6P[14]	MN067458	MN067460
S19	7	Young goat	+	G10P[14]	MN067447	MN067449
S20	10	Young goat	-	-	-	-
S21	8	Young goat	-	-	-	-

5. Séquençage complet du génome de la souche bovine (S18) et de la souche caprine (S19)

Deux des 22 échantillons positifs au RVA de bovins et de caprins ont été sélectionnés pour le séquençage du génome entier. La souche RVA/Calf-wt/MAR/S18/2012/G6P[14] a été sélectionnée parce que sa séquence du gène VP4 est identique à 100% à celle de la souche humaine ma31 [341], alors que la sélection de la seconde souche caprine RVA/Goat-wt/MAR/S19/2012/G10P[14] a été basée sur la disponibilité du matériel en quantité suffisante permettant le séquençage du génome entier directement à partir de l'échantillon fécal.

5.1. Amplification du génome complet

L'ADN complémentaire (ADNc) de chaque segment de gène de rotavirus (11 segments) des deux souches S18 et S19 a été soumis à une PCR en utilisant des amorces spécifiques en plus des amorces nouvellement conçues (Cf. Annexe X) et MyFi Mix (Bioline, Londres, Royaume-Uni) selon les instructions du fabricant. Les conditions d'amplification étaient de 95 ° C pendant 2 min, 35 cycles de 95 ° C pendant 1 min, 60 ° C pendant 1 min et 72 ° C pendant 1 à 5 min selon la longueur de l'ADNc, suivie d'une extension finale à 72 ° C pendant 8 min. Les amplicons ont été séparés sur des gels d'agarose à 1,5% contenant du bromure d'éthidium à 0,5 µg / ml et visualisés sous Transilluminateur UV.

5.2. Séquençage capillaire

La purification des produits PCR a été effectuée par le kit de purification ExoSAP-IT (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) selon le protocole de fabrication. Les amplicons ont été séquencés avec le kit Big Dye Terminator v3.1 (Life technologies, Inc. Foster City, CA) en utilisant les mêmes amorces que celles utilisées pour la PCR, en plus d'amorces utilisées exclusivement pour le séquençage. Pour récupérer l'ensemble des fragments de séquence, y compris les terminaisons 5' et 3' des 11 segments de gènes, une stratégie « Primer walking » a été menée. Pour les gènes VP3 et NSP1, les amorces ont été nouvellement

dessinées pour récupérer les séquences complètes des phases ouvertes de lecture (ORF) (Cf. *Annexe XI*). Le pourcentage de la nouvelle séquence pour chaque gène a également été calculé sur la base de la longueur nucléotidique des amorces utilisées pour le séquençage et la longueur du gène respectif obtenu (Cf. *Annexe XII*).

Les données ont été recueillies par un analyseur génétique ABI Prism 3130XL (Life technologies, Inc. Foster City, CA). Les séquences ont été éditées et assemblées à l'aide de la version 1.6.0 du logiciel DNA Dragon Sequence Assembler (Sequentix- Digital DNA Processing, Allemagne).

L'outil de classification des RVA le RotaC version 2 (<https://rotac.regatools.be>), a été utilisé pour attribuer les génotypes aux onze segments de gènes.

Les étapes de RT PCR, séquençage et analyse phylogénétique ont suivi les mêmes protocoles déjà détaillés dans la partie I lors du séquençage complet de la souche ma31.

5.3. Analyse phylogénétique et soumission des séquences

Des analyses évolutives phylogénétiques et moléculaires ont été réalisées à l'aide du logiciel MEGA 6 [387]. Ainsi des alignements de séquences multiples ont été réalisés à l'aide du programme MUSCLE. Des arbres phylogénétiques à probabilité maximale ont été ensuite construits dans le logiciel MEGA 6 en utilisant les modèles de substitutions de nucléotides suivants : GTR+G+I (NSP1 et VP3), T92+G (NSP2, NSP3, NSP4, VP6 et VP7), TN93+G+I (VP2 et VP4), GTR+I (VP1) et T92+G+I (NSP5). Les valeurs de *bootstrap* ont été obtenues à la suite de 1000 répétitions.

L'alignement de séquences des acides aminés du gène VP4 des 2 souches étudiées (S18 et S19), des souches vaccinales et d'autres souches pertinentes de RVA a été aussi réalisé à l'aide du logiciel MEGA 6.

Les séquences de nucléotides de tous les segments du génome des deux souches ont été déposées dans la base de données du National Centre of Biotechnology Information (NCBI), GenBank, sous les numéros d'accès de MN067450 (NSP1) à MN067460 (VP7) pour S18 et de MN067439 (NSP1) à MN067449 (VP7) pour S19 (Tableau 9).

Tableau 9 : Numéros d'accès GenBank des 11 segments de gènes de rotavirus des souches S18 et S19 entièrement séquencés dans cette étude

Souches bovines et caprines étudiées	Numéros d'accès sur <u>GenBank</u>										
	VP7	VP4	VP6	VP1	VP2	VP3	NSP1	NSP2	NSP3	NSP4	NSP5
RVA/Cow- wt/MAR/S18/2014/G6P[14]	MN067 460	MN067 458	MN067 459	MN067 455	MN067 456	MN067 457	MN067 450	MN067 451	MN067 452	MN067 453	MN067 454
RVA/Goat- wt/MAR/S19/2014/G10P[14]	MN067 449	MN067 447	MN067 448	MN067 444	MN067 445	MN067 446	MN067 439	MN067 440	MN067 441	MN067 442	MN067 443

6. Résultats

6.1. Caractérisation des géotypes des souches de RVA circulant dans la région de Bouaarfa

La région de Bouaarfa est située dans la région orientale du Nord-Est du Maroc. Les steppes de l'Alfa et de l'armoise sont à la base de la production agricole régionale. La tradition pastorale est bien établie parmi les tribus de la région à vocation nomade. En effet, cette région est très majoritairement habitée par des communautés pastorales nomades qui profitent de cet environnement hostile pour élever des moutons, des chèvres, des chameaux et du bétail. En avril 2012 et 2014, trente échantillons fécaux diarrhéiques ont été prélevés sur des bovins et des chèvres (onze veaux et dix-neuf chevreaux) pendant une grave épidémie qui a touché le cheptel nomade de cette région. Parmi les 30 échantillons fécaux diarrhéiques collectés, les RVA ont été détectés dans vingt-deux échantillons par le test rapide Duo Rota- Adénovirus-Check-1. Ces échantillons positifs ont été obtenus auprès de différents agriculteurs nomades établis dans des zones reculées de cette vaste région.

Par l'analyse de séquences nucléotidiques partielles, les gènes VP7 et VP4 des échantillons positifs provenant des deux élevages de caprins et de bovins ont été assignées à G6P[14] pour dix échantillons (45,45 %), G10P[14] pour quatre échantillons (18,18 %), et G10P[5] pour un échantillon (4,54%). Un séquençage partiel du génome a été possible dans quinze (68,18 %) des échantillons fécaux de veaux et de chèvres positifs. Ainsi, pour certaines souches, des géotypes indéterminés ont été attribués au gène VP7 tels que S1, S3, S4, S6, S7, S8 et S9 (Tableau 7).

Les souches de RVA isolées à partir de chevreaux présentaient trois génotypes différents : G6P[14], G10P[14] et G10P[5], tandis que le gène VP7 n'a pas pu être identifié dans tous les échantillons de selles de veaux, à l'exception de S2 et S18. En revanche, le génotype P[14] a été observé dans tous les échantillons positifs, à l'exception d'une souche S15, dont le génotype a été déterminé comme étant G10P[5] (Tableau 7).

6.2. Séquençage nucléotidique et génotypage complet des souches S18 et S19

Les génotypes des 11 segments de gènes des souches S18 et S19 ont été identifiés respectivement comme étant G6-P[14]-I2-R2-C2-M2-A3-N2-T6-E2-H3 et G10-P[14]-I2-R2-C2-M2-A11-N2-T6-E2-H3, en utilisant la base de données RotaC.

Ces constellations de génotypes se sont avérées être sur un squelette génétique de type DS-1-like (I2-R2-C2-M2-A2-N2-T2-E2-H2). Cependant, pour les deux souches, NSP5 était de type AU-1-like et NSP3 correspondait au génotype T6. Le gène NSP1 présentait les génotypes A3/11 pour S18 et S19, respectivement.

6.3. Comparaison des constellations

La comparaison de la constellation génotypique complète des souches étudiées avec la souche marocaine humaine ma31 et d'autres souches bovines et non bovines est présentée dans le tableau 10.

Tableau 10. Comparaison de la constellation du génome entier des souches étudiées S18 et S19 avec d'autres RVA de type bovine-like, humain et certaines souches de RVA animales

Strain names	Host	Country	Genotype										
			VP7	VP4	VP6	VP1	VP2	VP3	NSP1	NSP2	NSP3	NSP4	NSP5
RVA/Calf-nt/MAR/S18/2012/G6P[14]	Cow	Morocco	G6	P[14]	I2	R2	C2	M2	A3	N2	T6	E2	H3
RVA/Goat-qt/MAR/S19/2012/G10P[14]	Goat	Morocco	G10	P[14]	I2	R2	C2	M2	A11	N2	T6	E2	H3
RVA/Human-tc/MAR/ma31/2011/G8P[14]	Human	Morocco	G8	P[14]	I2	R2	C2	M2	A11	N2	T6	E2	H3
RVA/Human-qt/ITA/PA169/1988/G6P[14]	Human	Italy	G6	P[14]	I2	R2	C2	M2	A3	N2	T6	E2	H3
RVA/Human-qt/BEL/B10925/1997/G6P[14]	Human	Belgium	G6	P[14]	I2	R2	C2	M2	A3	N2	T6	E2	H3
RVA/Human-qt/THA/SKT-27/2012/G6P[14]	Human	Thailand	G6	P[14]	I2	R2	C2	M2	A3	N2	T6	E2	H3
RVA/Human-qt/ITA/111-05-27/2005/G6P[14]	Human	Italy	G6	P[14]	I2	R2	C2	M2	A3	N2	T6	E2	H3
RVA/Human-tc/AUS/MG6/1993/G6P[14]	Human	Australia	G6	P[14]	I2	R2	C2	M2	A11	N2	T6	E2	H3
RVA/Human-qt/IND/N-1/2009/G6P[14]	Human	India	G6	P[14]	I2	R2	C2	M2	A11	N2	T6	E2	H3
RVA/Human-qt/EGY/EGY3399/2004/G6P[14]	Human	Egypt	G6	P[14]	I2	R2	C2	M2	A11	N2	T6	E2	H3
RVA/Human-qt/HUN/Han5/1997/G6P[14]	Human	Hungary	G6	P[14]	I2	R2	C2	M2	A11	N2	T6	E2	H3
RVA/Human-qt/HUN/BP1879/2003/G6P[14]	Human	Hungary	G6	P[14]	I2	R2	C2	M2	A11	N2	T6	E2	H3
RVA/Human-qt/AUS/V585/2011/G10P[14]	Human	Australia	G10	P[14]	I2	R2	C2	M2	A11	N2	T6	E2	H3
RVA/Human-qt/ITA/PR457/2009/G10P[14]	Human	Italy	G10	P[14]	I2	R2	C2	M2	A11	N2	T6	E2	H3
RVA/Human-tc/GBR/A64/1987/G10P[14]	Human	England	G10	P[14]	I2	R2	C2	M1	A3	N2	T6	E2	H3
RVA/Sheep-xx/CHN/CC0812-1/2008/G10P[15]	Sheep	China	G10	P[15]	I10	R2	C2	M2	A11	N2	T6	E2	H3
RVA/Goat-tc/BGD/GO34/1999/G6P[1]	Goat	Bangladesh	G6	P[1]	I2	R2	C2	M2	A11	N2	T6	E2	H3
RVA/Human-qt/ITA/BA02/2012/G8P[14]	Human	Italy	G8	P[14]	I2	R2	C2	M2	A11	N2	T6	E2	H3
RVA/Human-qt/HUN/BP1062/2004/G8P[14]	Human	Hungary	G8	P[14]	I2	R2	C2	M2	A11	N2	T6	E2	H3
RVA/Human-qt/HUN/182-02/2001/G8P[14]	Human	Hungary	G8	P[14]	I2	R2	C2	M2	A11	N2	T6	E2	H3
RVA/Sheep-tc/ESP/OVR762/2002/G8P[14]	Sheep	Spain	G8	P[14]	I2	R2	C2	M2	A11	N2	T6	E2	H3
RVA/Human-qt/ITA/PR1300/2004/G8P[14]	Human	Italy	G8	P[14]	I2	R2	C2	M2	A3	N2	T6	E2	H3
RVA/Human-qt/ITA/PR1973/2009/G8P[14]	Human	Italy	G8	P[14]	I2	R2	C2	M2	A3	N2	T6	E2	H3
RVA/Human-qt/GTM/2009726790/2009/G8P[14]	Human	Guatemala	G8	P[14]	I2	R2	C2	M2	A13	N2	T6	E2	H3
RVA/Human-qt/USA/2012841174/2012/G8P[14]	Human	United States	G8	P[14]	I2	R3	C2	M2	A3	N2	T6	E2	H3
RVA/Human-tc/KEN/B12/1987/G8P[1]	Human	Kenya	G8	P[1]	I2	R2	C2	M2	A3	N2	T6	E2	H3
RVA/Cow-qt/ZAF/1604/2007/G8P[1]	Bovine	South Africa	G8	P[1]	I2	R2	C2	M2	A3	N2	T6	E2	H3
RVA/Macaque-tc/USA/PTRV/1990/G8P[1]	Macaque	United States	G8	P[1]	I2	R2	C2	M2	A3	N2	T6	E2	H3
RVA/Guanaco-qt/ARG/Chubut/1999/G8P[14]	Guanaco	Argentina	G8	P[14]	I2	R5	C2	M2	A3	N2	T6	E12	H3
RVA/Vicugna-qt/ARG/75/2010/G8P[14]	Vicugna	Argentina	G8	P[14]	I2	R5	C2	M2	AX*	N2	T6	E12	HX*
RVA/Goat-qt/ARG/0040/2011/G8P[1]	Goat	Argentina	G8	P[1]	I2	R5	C2	M2	A3	N2	T6	E12	H3

Les souches S18 et S19 partagent une grande partie de la constellation de génotypes non G (P[14]-I2-R2-C2-M2-(A3/11)-N2-T6-E2-H3) que l'on trouve couramment dans les souches bovine-like. La constellation de la souche bovine S18 est totalement identique à celle des souches humaines d'Italie (PA169, 111-05-27), de Belgique (B10925) et de Thaïlande (SKT-27), avec onze génotypes communs, tandis que certaines souches d'origine humaines et animale partagent neuf génotypes avec la souche S18, telles que la souche humaine ma31 du

Maroc, la souche bovine 1604 d'Afrique du Sud et la souche de macaque PTRV des États-Unis. La souche Chubut et la souche caprine 0040 d'Argentine partagent huit et sept génotypes, respectivement, avec la souche bovine S18. Cette dernière partage également la même constellation avec les RVA humains de génotype G8 tels que PR1300 et PR1973 (Italie) (Tableau 10). La souche caprine S19 présente, quant à elle, une constellation identique avec les souches humaines V585 et PR457 d'Australie et d'Italie, respectivement, avec onze génotypes partagés. D'autres souches humaines et animales partagent dix génotypes avec la souche S19 comme la souche ovine OVR762 d'Espagne et les souches humaines ma31, MG6, N-1, EGY3399, BA02, Hun5, BP1879, BP1062 et 182-02 provenant respectivement du Maroc, de l'Australie, de l'Inde, d'Égypte, de l'Italie et de la Hongrie, (Tableau 10). De plus, la comparaison des constellations des isolats S18 et S19 montre qu'ils ont neuf génotypes en commun et que la majorité des souches humaines et animales étudiées présentent les mêmes génotypes que S18 et S19 pour neuf gènes VP4, VP6, VP1- VP3, NSP2-NSP5 (Tableau 10).

6.4. Analyse phylogénétique

Nous avons construit des arbres phylogénétiques pour la séquence génétique complète de chacun des onze segments de gènes des souches de RVA marocaines : la souche caprine S19 et la souche bovine S18, ainsi que d'autres souches de RVA humaines et animales pertinentes. Nous avons calculé également le pourcentage d'identité des séquences nucléotidiques pour les souches sélectionnées pour les analyses phylogénétiques. Les souches de la base de données NCBI qui ont le plus grand pourcentage d'identité de séquence avec les souches de RVA bovines et caprines de cette étude sont indiquées dans le tableau 11.

Tableau 11. Pourcentage d'identités des séquences de nucléotides les plus étroitement liés des souches de rotavirus répertoriées dans GenBank comparées aux 2 souches bovine (S18) et caprine (S19)

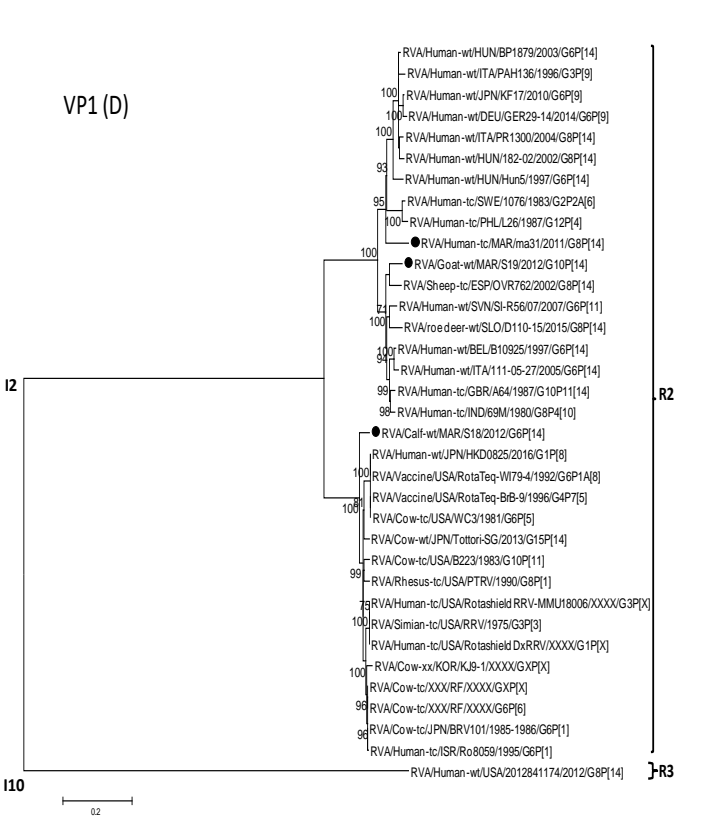
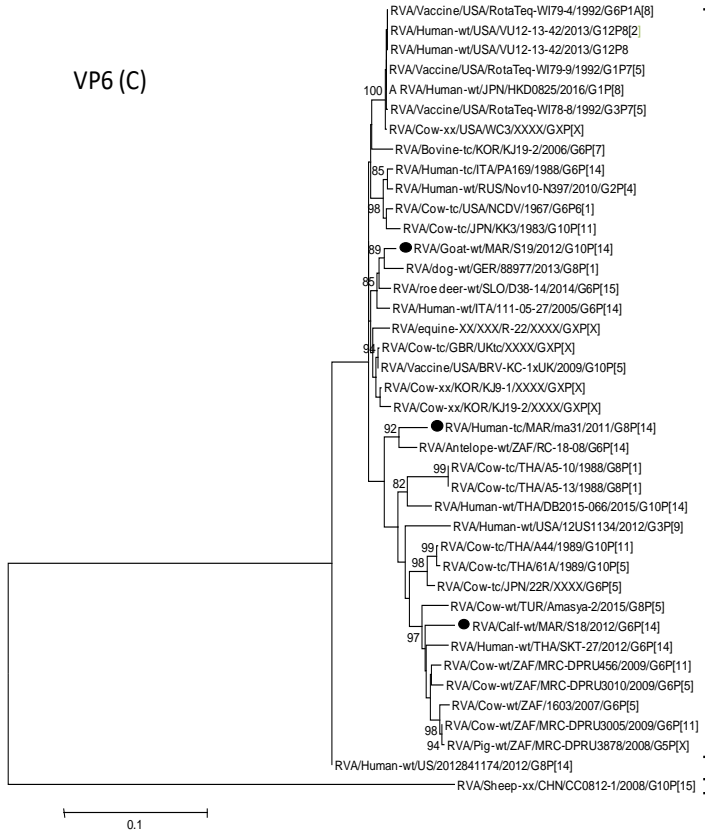
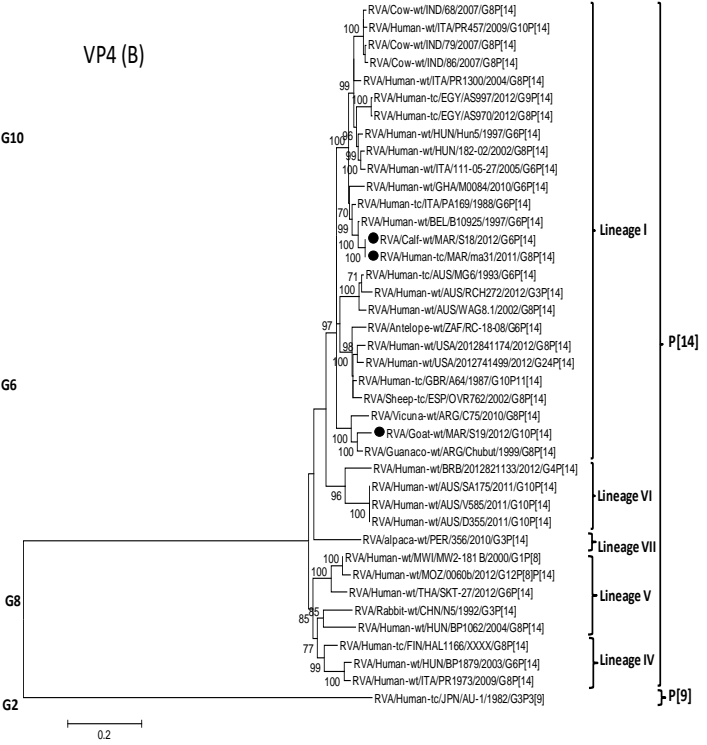
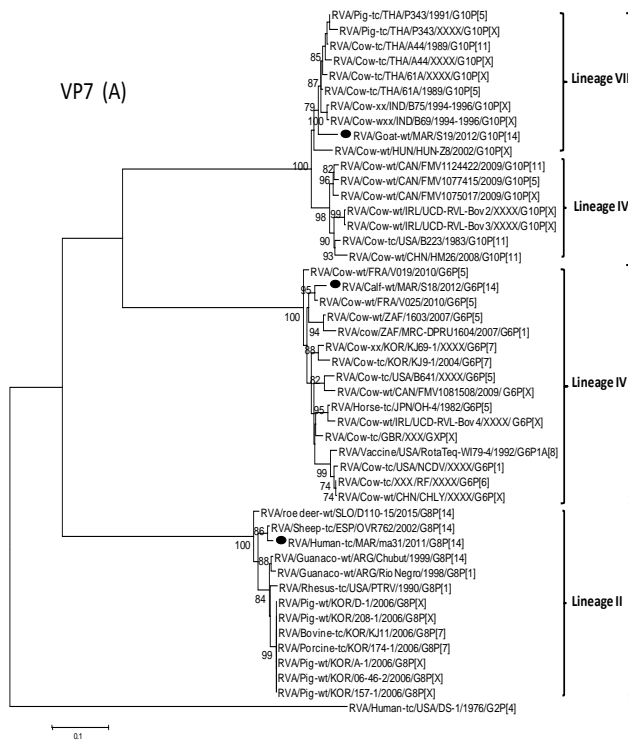
*Pourcentage d'identité de la séquence nucléotidique par rapport à la souche la plus proche

Genes	RVA/Calf-wt/MAR/S18/2012/G6P[14]				RVA/Goat-wt/MAR/S19/2012/G10P[14]			
	Genotype	Closely related strain	NA* (%)	Accession number	Genotype	Closely related strain	NA* (%)	Accession number
NSP1	A3	RVA/Cow-tc/JPN/NCDV/XXXX/GXP[X]	96.48	GU808570	A11	RVA/Human-tc/MAR/ma31/2011/G8P[14]	98.55	MG214332
NSP2	N2	RVA/Human-wt/THA/CMH-N165-13/2013/G8P[8]	97.3	MH060115	N2	RVA/Human-wt/HUN/BP1879/2003/G6P[14]	96.13	FN665683
NSP3	T6	RVA/Cow-wt/TUR/Amasya-1/2015/G8P[5]	97.30	KX212881	T6	RVA/Cow-tc/XXX/RF/XXXX/G6P[6]	96.37	Z21639
NSP4	E2	RVA/Pig-tc/THA/P343/1991/G10P[5]	98.38	AB972865	E2	RVA/Human-wt/Bel/BEF06018/2014/G29P[41]	95.17	KU128901
NSP5	H3	RVA/Dog-wt/GER/88977/2013/G8P[1]	98.20	KJ940161	H3	RVA/Sheep-tc/ESP/OVR762/2002/G8P[14]	98.65	EF554158
VP1	R2	RVA/Cow-tc/XXX/RF/XXXX/G6P[6]	96.31	J04346	R2	RVA/Sheep-tc/ESP/OVR762/2002/G8P[14]	94.73	EF554148
VP2	C2	RVA/Giraffe-wt/IRL/UCD/2007/G10P[11]	97.65	GQ428142	C2	RVA/Human-tc/MAR/ma31/2011/G8P[14]	97.66	MG214338
VP3	M2	RVA/roe deer-wt/SLO/D110-15/2015/G8P[14]	97.43	KY426811	M2	RVA/Human-wt/DEU/GER29-14/2014/G6P[9]	96.62	KX880441
VP4	P[14]	RVA/Human-tc/MAR/ma31/2011/G8P[14]	100	MG214340	P[14]	RVA/Guanaco-wt/ARG/Chubut/1999/G8P[14]	95.85	FJ347103
VP6	I2	RVA/Human-wt/THA/SKT-27/2012/G6P[14]	97.05	LC055551	I2	RVA/Human-wt/ITA/111-05-27/2005/G6P[14]	98.30	EF554141
VP7	G6	RVA/Cow-wt/FRA/V025/2010/G6P[5]	97.55	HE646646	G10	RVA/Cow-tc/THA/61A/1989/G10P[5]	96.10	LC133541

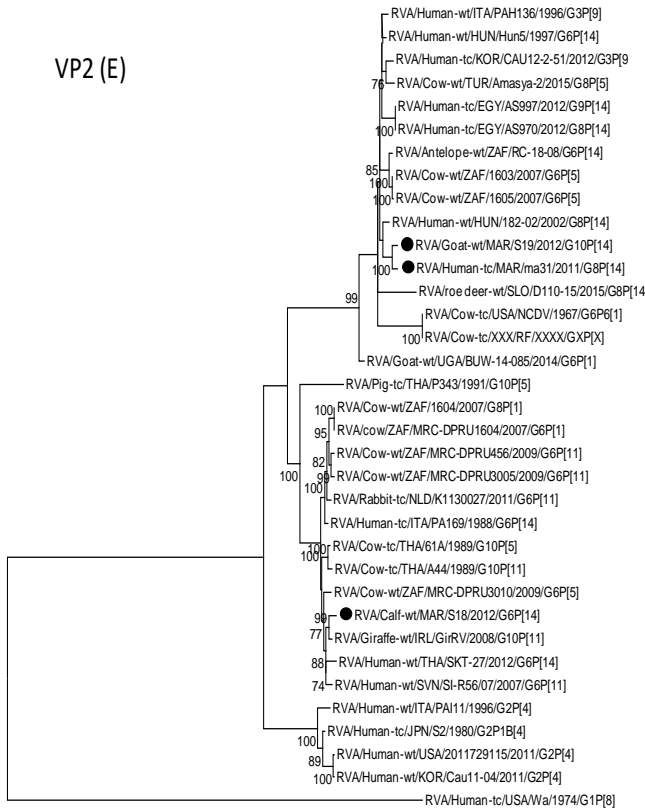
L'analyse phylogénétique a montré que les gènes NSP2, VP4 et VP6 pour la souche S18 et les gènes NSP1, NSP2, NSP4, VP2, VP3 et VP6 pour la souche S19 se regroupaient avec les souches RVA humaines, tandis que le reste des gènes pour les deux souches S18 et S19 étaient étroitement liés aux souches animales (Tableau 11 et Figure. 19A-K).

Les gènes VP7 de la souche bovine marocaine S18 et de la souche caprine S19 présentaient la plus grande identité de séquence nucléotidique (97,55% et 96,10%, respectivement) avec la souche bovine française V025 (G6P[5]) et la souche caprine thaïlandaise 61A (G10P[5]) (Figure. 19A). La souche S18 appartenait à la lignée IV du génotype G6, tandis que la souche caprine S19 appartenait à la lignée VII du génotype G10. La souche humaine ma31 avec son génotype G8 était trop éloignée des autres souches marocaines de l'arbre VP7.

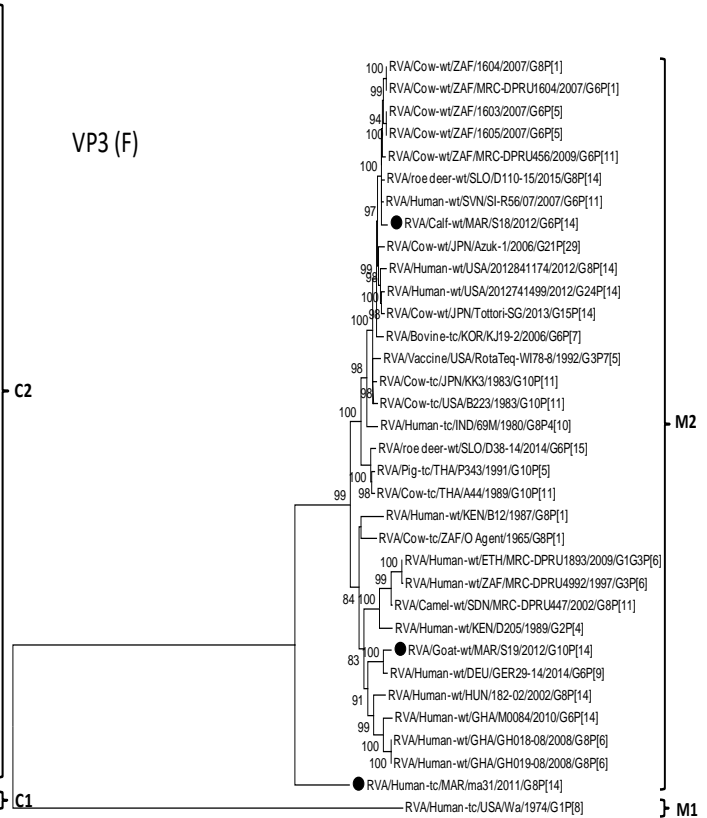
Les gènes VP4 des souches S18 et S19 de génotype P[14] présentaient la plus grande identité de séquence nucléotidique (100% et 95,85%, respectivement) avec la souche humaine Marocaine ma31 (G8P[14]) de type Bovine-like et la souche Guanaco argentine « Chubut » (G8P[14]) (Tableau 11 et Figure. 19B). Sur le plan phylogénétique, les souches S18 et S19 appartiennent à la lignée I qui comprend des souches humaines, caprines, bovines, ovines et antilopes. De plus, nous avons comparé les épitopes antigéniques VP8* potentiels des souches S18 et S19 avec ceux de quelques souches P[14] sélectionnées (Figure. 20).



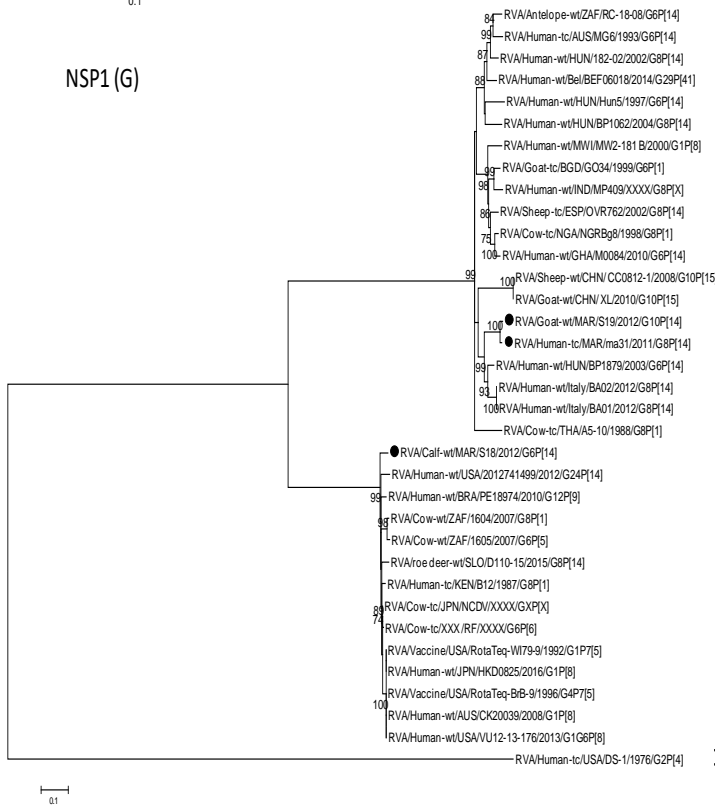
VP2 (E)



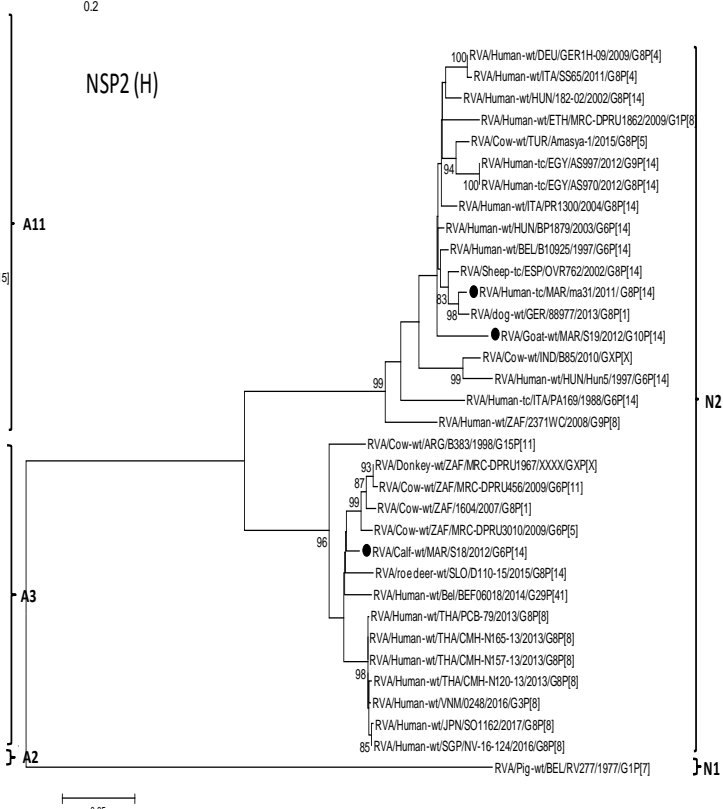
VP3 (F)

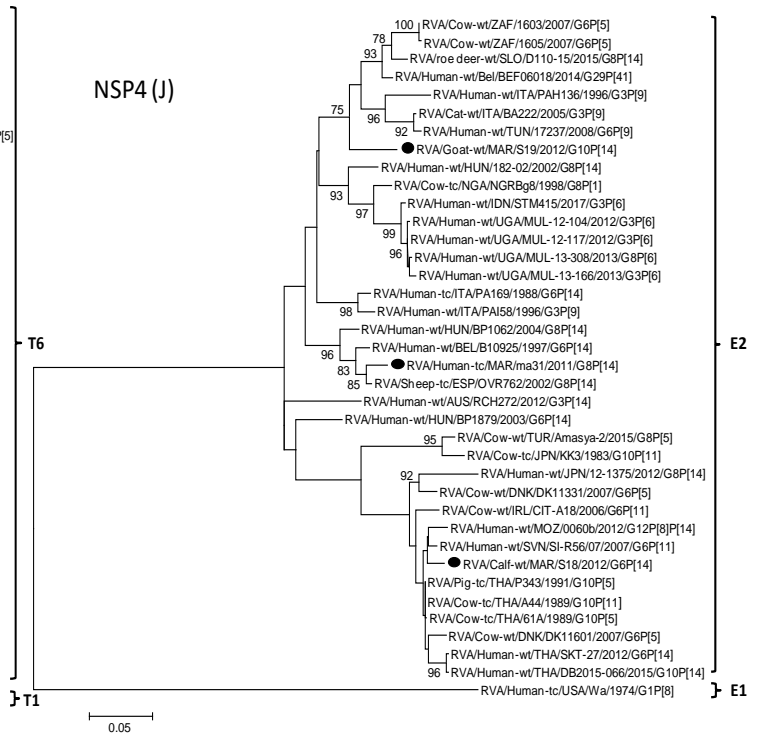
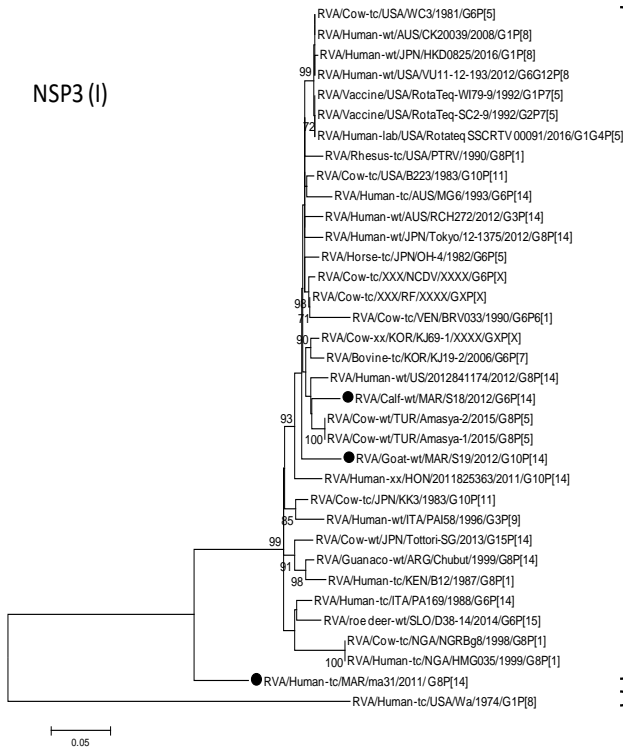


NSP1 (G)



NSP2 (H)





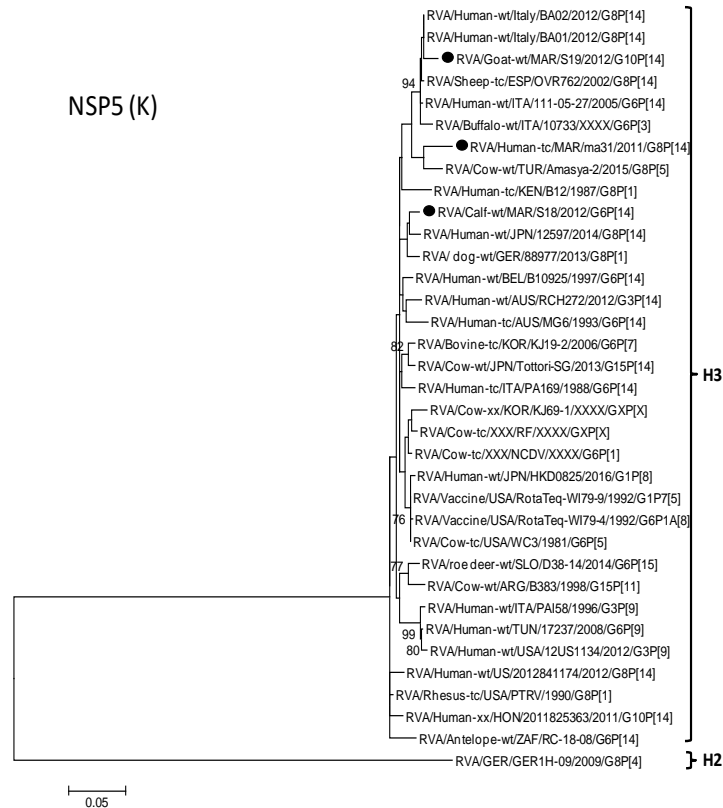


Figure 19. Arbres phylogénétiques construits à partir des séquences nucléotidiques complètes des 11 segments de gènes RVA de la souche caprine *RVA/Goat-wt/MAR/S19/2012/G10P[14]* et de la souche bovine *RVA/Calf-wt/MAR/S18/2012/G6P[14]*. Les souches marocaines sont identifiées par un cercle noir. La méthode du maximum de vraisemblance a été utilisée, avec un bootstrap à 1000 répétitions. Les barres d'échelle représentent le nombre de substitution de nucléotides par site.

L'épitope antigénique 8-1 des souches S18 et S19 semblait être conservées avec celui des souches de RVA de génotype P[14] de différentes espèces (humaines, bovines et ovines). Les souches *RVA/Human-tc/MAR/ma31/2011/G8P[14]*, *RVA/BOV/MAR/Bas1:2S/2014/P[14]*, *RVA/BOV/MAR/Bas2:6S/2014/P[14]*, *RVA/Human-wt/BEL/B10925/1997/G6P[14]* et *RVA/Human-wt/GHA/M0084/2010/G6P[14]* portaient des épitopes neutralisants très similaires à ceux de la souche S18. Cependant, des différences ont été observées au niveau de quatre positions d'acides aminés, trois au niveau de la région 8-3 (S113P et N114S pour les souches de chèvre et de guanaco, N133D pour les souches humaine, guanaco et ovine) et une différence observée au niveau de la région 8-4 (I89V) (Figure 20).

	8-1												8-2		8-3							8-4			
	100	146	148	150	188	190	192	193	194	195	196	180	183	113	114	115	116	125	131	132	133	135	87	88	89
<i>Cow-wt</i> /MAR/S18/2012/G6P[14]	D	L	K	G	Y	L	I	N	N	D	N	T	N	S	N	T	Q	T	S	N	N	S	T	Q	I
Human-tc /MAR/ma31/2011/G8P[14]
BOV/MAR/Bas1:2S/2014/P[14]
BOV/MAR/Bas2:6S/2014/P[14]
<i>Goat-wt</i> /MAR/S19/2012/G10P[14]	P	S	D	.	.	.	V
<i>Guanaco-wt</i> /ARG/Chubut/1999/G8P[14]	P	S	D	.	.	.	V
<i>Human-tc</i> /ITA/PA169/1988/G6P[14]
<i>Human-wt</i> /BEL/B10925/1997/G6P[14]	D
<i>Human-wt</i> /THA/SKT-27/2012/G6P[14]	Q	D
<i>Sheep-tc</i> /ESP/OVR/762/2002/G8P[14]	D
<i>Human-wt</i> /AUS/V585/2011/G10P[14]	D
<i>Human-tc</i> /GBR/A64/1987/G10P[14]	D
<i>Human-wt</i> /GTM/2009726790/2009/G8P[14]	I	.	Q	.	.	.	A	.	.	D	.	.	.	A
<i>Human-wt</i> /ITA/PR457/2009/G10P[14]	D
<i>Vicuna-wt</i> /ARG/C75/2010/G8P[14]	D	.	.	S
<i>Human-wt</i> /GHA/M0084/2010/G6P[14]	D

Figure 20. Analyse des épitopes antigéniques VP8* (VP4) des souches S18 et S19 avec des souches P[14] sélectionnées. Les souches marocaines sont indiquées en gras.

L'analyse des épitopes neutralisants accompagnée d'une analyse phylogénétique a suggéré que le gène VP4 de la souche humaine marocaine ma31 était le résultat d'une transmission inter-espèces d'un rotavirus de type bovin à l'homme.

Le gène VP6 de la souche S18 a montré une identité maximale de séquence nucléotidique (97,05 %) avec le gène VP6 de la souche humaine thaïlandaise SKT-27 (G6P[14]) [404] ayant un squelette génétique de type DS-1-like. Alors que le gène VP6 de la souche S19 présentait la plus forte identité de séquence nucléotidique (98,30 %) avec le gène VP6 de la souche humaine italienne 111-05-27 (G6P[14]) [7] (Tableau 11 et Figure. 19C).

Les gènes VP1 des souches S18 et S19 présentaient un maximum d'identité de séquence nucléotidique (96,31 % et 94,73 %, respectivement) avec la souche bovine RF (G6P[6]) et la souche ovine OVR762 (G8P[14]) provenant d'Espagne (Tableau 11). L'analyse phylogénétique a révélé que les souches S18 et S19 étaient étroitement liées à plusieurs souches humaines, bovines et humaines bovine-like provenant de différentes parties du monde au sein du sous-groupe bovin-like R2 (Figure. 19D).

L'analyse de l'arbre phylogénétique VP2 (Figure. 19E) a révélé un regroupement très étroit (97,65 % d'identité nucléotidique) de la souche S18 avec la souche de girafe G10P[11] détectée en Irlande en 2007 (RVA/Giraffe-wt/IRL/UCD/2007/G10P[11]), tandis que le gène VP2 de la souche S19 se regroupait étroitement avec la souche humaine MAR/ma31 détectée au Maroc en 2011 (97. 66% nt d'identité) (Tableau 11 et Figure. 19G) laquelle décrite comme ayant une origine humaine bovine-like [341].

Le gène VP3 des souches S18 et S19 s'est regroupé avec la souche G8P[14] du chevreuil (D110-15) de Slovénie détectée en 2015 (97,43% nt d'identité) et la souche humaine G6P[9] (GER29-14) isolée en Allemagne en 2014 (96,62% nt d'identité). L'analyse de l'arbre phylogénétique VP3 a montré que la souche ma31 était située trop loin des deux souches S18 et S19 bien qu'elle soit classée dans le même génotype M2 comme ces dernières (Figure. 19F et Tableau 11).

En ce qui concerne les gènes non structurels, le gène NSP1 de la souche S18 a montré une identité maximale de séquence nucléotidique (96,48%) avec celle de la souche humaine japonaise de type bovin NCDV (Tableau 11), et phylogénétiquement, La souche S18 s'est avérée être apparentée de loin à d'autres souches humaines et bovines dans le génotype A3 (Figure. 19G), en revanche, le gène NSP1 de la souche S19, se regroupait étroitement avec la souche humaine marocaine ma31 en affichant 98,55% d'identité nucléotidique. Sur l'arbre phylogénétique, les deux souches étaient étroitement liées à des souches bovines et des souches humaines provenant de différentes parties du monde au sein du Génotype A11 (Tableau 11 et Figure. 19G).

L'arbre phylogénétique NSP2 a révélé une relation étroite entre la souche S18 et la souche humaine CMH-N165-13 détectée en Thaïlande en 2013 (97,3% d'identité nt). Le même arbre a montré un regroupement très étroit entre la souche caprine S19 et la souche humaine BP1879 isolée en Hongrie en 2003 présentant 96,13% d'identité nucléotidique (Tableau 11 et Figure. 19H).

Pour le gène NSP3, la séquence de la souche S18 s'est très bien groupée avec la souche bovine (TUR/Amasya-2/2015/ G8P[5]) avec 97,30% d'identité nucléotidique, tandis que la souche S19 présentait une identité maximale de séquence nucléotidique (96,37%) avec la souche bovine RF (G6P[6]) (Tableau 11), quant à la souche humaine bovine-like ma31, elle était apparentée à distance à d'autres souches bovines et humaines du génotype T6 (Figure. 19I).

Les gènes NSP4 des souches S18 et S19 présentaient la plus forte identité de séquence nucléotidique (98,38% et 95,17%, respectivement) avec la souche porcine P343 (G10P[5]) isolée en Thaïlande en 1991 et avec la souche humaine BEF06018 (G29P[41]) détectée en Belgique en 2014, respectivement. Sur le plan phylogénétique, il a été constaté que la souche

humaine ma31 était apparentée à distance aux souches S18 et S19 du génotype E2 (Tableau 11 et figure 19J).

Pour le dernier arbre phylogénétique du gène NSP5, la souche S18 ressemblait beaucoup à la souche canine GER/88,977/2013/G8P[1] (98,20% d'identité nt), tandis que la souche S19 se regroupait étroitement avec la souche ovine ESP/OVR762/2002/G8P[14] (98,65%) (Tableau 11). L'analyse phylogénétique a montré aussi que la souche humaine ma31 était prise en sandwich entre les deux souches S18, S19 et d'autres souches humaines et bovines provenant de différents pays tels que l'Allemagne, le Japon, la Turquie, l'Espagne et l'Italie (Figure. 19K).

7. Discussions

Les rotavirus caprins et bovins isolés en 2012 et 2014, dans le cheptel nomade de la région de Bouaarfa et analysés dans cette étude, ont révélé l'existence de 3 génotypes circulants G6P[14], G10P[14] et G10P[5] chez les ruminants avec une dominance du génotype G6P[14]. Ce résultat est conforme aux données publiées précédemment, qui indiquaient que les souches G6P[14] avaient été trouvées jusqu'à présent dans un rotavirus caprin du groupe A sud-africain [405]. De plus, les génotypes G6, G8 et G10 ont été détectés dans différentes souches de RVA chez le bétail. Le génotype bovin le plus répandu dans le monde est le G6, suivi du génotype G10 en Europe, en Asie, en Australie et en Amérique, et du génotype G8 en Afrique [406].

En ce qui concerne le typage du P, les souches P[14] et P[5] sont dominantes dans de nombreux pays à travers le monde et les trois combinaisons G6P[14], G10P[14] et G10P[5] sont déjà décrites dans de nombreuses régions du monde telles que l'Europe, l'Australie et l'Afrique du Sud [405, 406]. Au Maroc, une étude menée en 2016 dans différentes fermes laitières de l'ouest du pays lors de la survenue d'une sévère diarrhée néonatale des veaux, a rapporté la circulation de deux génotypes G10P[14] et G6P[5] [386]. Ainsi, malgré la position géographique et le mode de vie du bétail, les génotypes circulant dans l'élevage aussi bien des producteurs laitiers que les nomades sont plus ou moins les mêmes selon notre étude. Parmi ces souches caprines et bovines génotypées, les séquences complètes du génome ont été

déterminées pour deux souches S18 et S19 afin de mieux comprendre la relation génétique entre ces dernières et la souche humaine ma31. Sur la base de l'analyse génomique complète, les 11 segments des souches ma31, S18 et S19 se sont révélés sur le plan génétique relativement divers, mais ils partagent globalement la constellation de génotypes non G (P[14]-I2-R2-C2-M2-(A3/11)-N2-T6-E2-H3), que l'on trouve couramment et qui est caractéristique des souches de rotavirus artiodactyles de type bovine-like [30, 391]. D'autre part, l'analyse phylogénétique a révélé que la plupart des gènes des trois souches étaient apparentés à ceux de souches bovines et de souches bovine-like. L'analyse des épitopes antigéniques VP8* pour S18, S19 et ma31 a révélé une similarité commune avec les souches bovines, caprines, ovines et humaines du Maroc et d'autres pays. Ainsi, ces souches partagent le même fond génétique qui semble être altéré par des événements indépendants de transmission inter-espèces (Figure. 20). Cela peut indiquer la conservation probable parmi ces souches de la fonction et de la structure des épitopes antigéniques.

Tous ces résultats suggèrent que la souche humaine ma31 est le résultat d'un réassortiment entre des rotavirus humains et animaux. Il s'agit d'un cas de transmission inter-espèces de souches de RVA appartenant aux membres de la famille *Artiodactyla*, comprenant les bovins, les chèvres et les camélidés, comme ça a été discuté par Matthijnssens et al [30] et d'autres auteurs [388]. De nombreux exemples de transfert de segments du virus de l'animal à l'homme ont été signalés dans différentes parties du monde [45, 407-410]. La plupart de ces segments ont été isolés soit à partir de souches porcines vers l'homme, comme cela a été démontré à Belém, au Brésil, par le séquençage du gène VP6 [408], soit par le séquençage des gènes VP7, VP4, VP6 et NSP4 pour analyser la relation génétique entre les rotavirus humains et animaux (bovins et caprins), comme cela a été décrit dans deux études danoises et brésiliennes [45, 409, 410]. L'événement de transfert du segment de RVA animal du virus à l'homme a été détecté plus fréquemment dans les pays à faible revenu où les animaux et les humains vivent en étroite proximité, partageant souvent les mêmes habitations, comme c'est le cas des éleveurs nomades marocains. Nous avons déjà rapporté que la souche humaine ma31 a été isolée à partir d'un enfant vivant dans une région rurale proche de la ville de Rabat en contact fréquent avec des bovins, des chèvres et des moutons [341], ce qui peut expliquer l'isolement de ce génotype peu commun G8P[14] jamais auparavant détectée chez les enfants

marocains. Ainsi, sept segments de gènes (VP2, VP4, VP7, NSP1, NSP2, NSP3 et NSP4) de la souche ont affiché un degré élevé de similarité avec des souches d'origine animale (caprine, bovine, ovine et canine). Trois de ces segments sont très similaires à ceux de la souche S18 (VP4) et la souche S19 (VP2, NSP1) isolées dans la région de Bouaarfa au Maroc, tandis que les autres gènes (VP7, NSP3 et NSP4) sont proches de la souche ovine espagnole OVR762 (G8P[14]) isolée en 2002 [25], pour le gène NSP2, il est similaire à la souche canine 88977 (G8P[1]) isolée en Allemagne en 2013 [411]. Les quatre gènes restants (VP1, VP3, VP6 et NSP5) présentaient une très grande similitude avec les souches de RVA humaines. De plus, les génotypes les plus fréquemment isolés chez les enfants et rapportés selon Benhafid et al. [16, 18, 19, 412] sont G1P[8], G9[P8], G2P[4], G4P[8] et G3P[8].

Par conséquent, la parenté étroite des trois gènes (VP4 pour S18 avec une identité de 100 % nt, VP2 et NSP1 pour S19 avec une identité de 97,66 % et 98,55 % nt, respectivement) des souches bovine et caprine avec la souche humaine ma31, ainsi que la parenté étroite de trois autres gènes avec la souche ovine OVR762 (NSP4, NSP3 et VP7 avec 97. 6-99% d'identité nt) et un gène (NSP2 avec 98,5% d'identité nt) avec une souche canine 88977, suggèrent que ma31 pourrait évoluer à travers de multiples événements de réassortiments entre les rotavirus humains et les rotavirus des ruminants. Nos données indiquent une transmission inter-espèces entre les artiodactyles (bovins et/ou caprins) et les rotavirus humains, ainsi le potentiel zoonotique des souches de rotavirus provenant des ruminants semble avoir une importance majeure puisque les espèces animales domestiques telles que les ruminants en contact direct avec l'homme, peuvent jouer un rôle dans la propagation du virus en agissant comme réservoirs naturels de ce dernier [30, 341, 413, 414].

8. Conclusion

En conclusion, la transmission zoonotique et le réassortiment de segments de gènes entre le RVA humain et animal contribuent à accroître la diversité des souches humaines de RVA [409]. Les études zoonotiques sont limitées en raison de la faible disponibilité des séquences du génome de RVA animal. Par conséquent, il est important aujourd'hui d'étendre la surveillance des infections par les rotavirus aux animaux domestiques, car son absence semble

réduire la compréhension du comportement épidémiologique du virus. Ainsi et concernant cette recherche, des études supplémentaires sont nécessaires avec plus d'échantillons prélevés sur le cheptel nomade dans différentes régions du Maroc pour obtenir des résultats apportant plus d'informations. En plus, sur la base des résultats de cette première étude menée sur le cheptel des éleveurs nomades, et pour éviter que les infections à rotavirus causant le syndrome diarrhéique néonatal chez les veaux et les chèvres nomades n'entraînent d'importantes pertes économiques, une stratégie de vaccination maternelle contre le rotavirus est recommandée pour renforcer l'immunité lactogène et transférer des anticorps passifs au nouveau-né via le colostrum et le lait.

Il est également impératif, au Maroc, de créer un système de surveillance qui puisse détecter et identifier les rotavirus animaux, collecter des données génétiques et estimer leur potentiel zoonotique. Parallèlement, la mise en œuvre de stratégies de surveillance des rotavirus avec un suivi permanent des génotypes chez l'homme est également cruciale. Ces deux actions contribueront de manière significative au contrôle et à la prévention des infections à RVA tant chez l'homme que chez les animaux domestiques, en particulier dans les régions où vivent les éleveurs nomades.

9. Publication

Ce travail a fait l'objet d'une publication dans la revue « *Virus Genes* » :

Alaoui Amine S, Melloul M, El Alaoui MA, Touil N, El Fahime E. **Evidence for zoonotic transmission of species A rotavirus from goat and cattle in nomadic herds in Morocco, 2012–2014.** *Virus Genes* 56, 582–593 (2020). <https://doi.org/10.1007/s11262-020-01778->

Virus Genes
<https://doi.org/10.1007/s11262-020-01778-w>

ORIGINAL PAPER



Evidence for zoonotic transmission of species A rotavirus from goat and cattle in nomadic herds in Morocco, 2012–2014

Sanaâ Alaoui Amine^{1,2} · Marouane Melloul^{1,2} · Moulay Abdelaziz El Alaoui^{2,3} · Hassan Boulahyaoui¹ · Chafiq Loutfi⁴ · Nadia Touil^{1,5} · Elmostafa El Fahime^{1,2}

Received: 25 December 2019 / Accepted: 28 June 2020
 © Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2020

Abstract

Species A rotaviruses (RVAs) are a leading cause of diarrhea in children and in the young of a large variety of mammalian and avian host species. The purpose of this study was to identify RVA in nomadic goats and calves during severe diarrhea outbreaks in 2012 and 2014 in Bouaarfa, Morocco, and to characterize the complete genomic constellation of two bovine and caprine strains (S18 and S19) and their genetic relatedness with the human strain ma31 detected in 2011 in Morocco. Partial nucleotide sequencing of VP4 and VP7 genes for the twenty-two positive samples revealed three circulating genotypes: G6P[14], G10P[14], and G10P[5] with predominance of G6P[14] genotype. Full-genome sequencing for both strains S18 and S19 presented, respectively, the following genomic constellations: G6-P[14]-I2-R2-C2-M2-A3-N2-T6-E2-H3 and G10-P[14]-I2-R2-C2-M2-A11-N2-T6-E2-H3. Phylogenetic analyses and the analysis of the VP8* antigenic epitopes for S18, S19 and ma31 revealed a shared similarity with bovine, caprine, ovine and human strains from Morocco and other countries. The VP2 and NSP1 genes of the S19 strain were closely related to those of the cognate genes of the human ma31 strain, while the VP4 gene of S18 strain was closely related to the cognate gene of the ma31 strain. Our findings revealed cases of zoonotic transmission and confirmed the risk of emergence of new genotypes in some environments such as nomadic regions, where close physical proximity between human and livestock is common. The present study is novel in reporting whole-genome analyses of RVA isolates obtained from nomadic livestock in Morocco.

Keyword Group A rotavirus · Whole-genome analysis · Interspecies transmission · Moroccan nomadic populations

Introduction

Species A rotaviruses (RVAs) (family *Reoviridae*) are one of the most important pathogens of the gastrointestinal tract causing severe acute diarrhea mainly in children and many young animal species worldwide [1, 2]. In children, the gastroenteritis not well managed may lead to death. In animals, rotavirus infection can lead to colossal financial losses due

Edited by Juergen A Richt.

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s11262-020-01778-w>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Sanaâ Alaoui Amine
 salaoui16@yahoo.fr

¹ Genomic Center for Human Pathologies (GENOPATH), Faculty of Medicine and Pharmacy, University Mohammed V in Rabat, Av. Mohamed Belarbi El Alaoui, 6203 Rabat, Morocco

² Molecular Biology and Functional Genomics Platform, National Center for Scientific and Technical Research, CNRST, Angle Avenue Allal El Fassi, Avenue des FAR, Quartier Er-Ryad, 8027 Rabat, Morocco

³ Virology Laboratory, Research Team in Molecular Virology and Onco Biology (ERVMOB), Faculty of Medicine and Pharmacy, University Mohammed V in Rabat, Av. Mohamed Belarbi El Alaoui, 6203 Rabat, Morocco

⁴ Département de Virologie, Société de Productions Biologiques et Pharmaceutiques Vétérinaires, Km 2, Route de Casablanca, B.P. 4569 Rabat, Morocco

⁵ Research and Biosafety Laboratory, Med V Military Teaching Hospital in Rabat, 10045 Hay Ryad, Morocco

Published online: 10 July 2020

Springer

to a decrease in productivity mainly in developing countries such as Africa and Asia [3].

The RVA genome consists of 11 segments of double-stranded RNA (dsRNA) encoding six structural viral proteins (VP1 to VP4, VP6, and VP7) and six non-structural viral proteins (NSP1 to NSP5/6) [4]. Genome segment 11 codes for two proteins: NSP5 and NSP6 [5].

RVA can be categorized by a dual classification system, based on the two outer capsid proteins VP7 and VP4 that determine G (VP7) and P (VP4) genotypes [6]. Recently, RVAs have been classified based on the nucleotide sequence identity cut-off values of all the 11 segments since all genes are subject to mutations, reassortment and recombination events [7, 8]. Until now 36G types and 51P types have been identified in humans and animals [9, 10] according to the Rotavirus Classification Working Group (RCWG) (<https://rega.kuleuven.be/cev/viralmetagenomics/virus-classification/rcwg>). This last classification combined with complete genome sequencing and phylogenetic analysis has been applied to elucidate the evolutionary mechanisms through which the strain under study has emerged and to determine potential origins of new strains [11–13]. This has led to obtain conclusive information and vital insights on the complex genetic diversity of rotavirus strains.

Interspecies transmission of RVA may lead to the emergence of novel strains; this mechanism contributes greatly to the diversity of the virus in both animals and humans. Other mechanisms are involved in the rotavirus evolution such as gene reassortment, gene recombination and accumulation of point mutations [2]. The combination of two of these mechanisms between RVAs of different species can lead to the rise and spread of novel genotypes [14].

In Morocco, the Bedouin livestock farming systems that are present in several regions of the country may favor the introduction of new strains from a heterologous host to human by interspecies transmission considering their nomadic lifestyle. Due to the high mobility of livestock and the temporary character of the nomadic settlements, no study identified the circulating RVAs causing sudden seasonal disease outbreaks of diarrhea in sheep, goats, dromedaries and cattle. Besides, this infectious disease can have serious negative repercussions on the livestock economy for nomadic farmers, given the large economic impact that represents the breeding of ruminants in these regions. Few studies have been conducted at the dairy farm level in Morocco for the detection of RVA; it was shown that in calves G10P[14] and G6P[5] are the most circulating genotypes [15]. In other neighboring countries such as Tunisia, a study was done on dairy calves to determine the prevalence of rotavirus infection and the genomic diversity of bovine rotavirus strains. The most common genotypes found were G6P[11] and G10P[11], and the genotype G10P[14] was seen in only one specimen [16]. In Western Algeria, the prevalence of bovine

rotavirus and bovine coronavirus was determined in feces from diarrheic calves. It showed that both bovine coronavirus and rotavirus are involved in the neonatal calves diarrhea with a high prevalence for bovine coronavirus compared to rotavirus [17, 18].

The first purpose of this study was to provide some insights into the circulation of RVA in nomadic goats and calves during severe outbreaks of diarrhea which occurred in 2012 and 2014 in Bouaarfa, a nomadic region in Eastern part of Morocco. The second objective was the determination of the complete genome constellation of one caprine and one bovine RVA strain using the full-genome sequencing to obtain more information about the genetic relatedness with a rare human genotype G8P[14] detected in a child for the first time in Morocco [19]. The amino acid sequence comparison of the VP8* antigenic region between the caprine, the bovine and the human strains and other relevant strains was also conducted. In the meantime, the possible interspecies transmission events of RVA in this circumstance are also discussed.

Materials and methods

Sampling

A total of 30 diarrheic fecal samples were collected from young goats (19) and calves (11) during severe outbreaks of acute diarrhea in 2012 and 2014 in Bouaarfa, a region of nomadic farmers in Eastern part of Morocco.

Detection of RVA

Fecal samples were identified as positive for RVA using the rapid test (Duo Rota-Adenovirus-Check-1, VEDA LAB, France) according to the manufacturer's instruction.

Viral dsRNA extraction

10% of fecal suspension was prepared in PBS. The homogenate was centrifuged at 5000×g for 15 min and the supernatant collected. Total viral RNA was extracted from 140 µl of the supernatant using QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Inc., Valencia, CA) following the manufacturer's instructions. Viral RNA was eluted in 50 µl of elution buffer and stored at -80 °C.

RT-PCR and partial nucleotide sequencing

The extracted viral RNA was reverse transcribed (RT) using Tetro cDNA Synthesis kit (Bioline, London, UK) following the manufacturer's instructions. PCRs were performed using specific primers targeting VP4 and VP7

Virus Genes

genes and MyFi Mix (Bioline, London, UK) as described previously [20, 21]. The PCR products were purified using ExoSAP-IT purification kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) according to the manufacturer's protocol. Nucleotide sequences were determined using Big Dye Terminator Cycle Sequencing kit v3.1 (Life technologies, Inc. Foster City, CA) on an ABI Prism 3130XL Genetic Analyzer (Life technologies, Inc. Foster City, CA).

Genotype assignment

RVA genotypes were assigned to VP7 and VP4 gene segments of positive strains using the online rotavirus genotyping tool, RotaC v2.0 [22].

The partial sequences of VP7 and VP4 genes were deposited into the GenBank sequence database under accession numbers KT461271 through MN583318 (Table 1).

Full-length genome sequencing of bovine strain (S18) and caprine strain (S19)

Two out of 22 bovine and caprine RVA positive samples were selected for whole-genome sequencing. The strain RVA/Calf-wt/MAR/S18/2012/G6P[14] was selected because its VP4 gene sequence is 100% identical to that of the human strain ma31 [19]. The selection of the second strain RVA/Goat-wt/MAR/S19/2012/G10P[14] among the caprine RVA samples was based on the availability of sufficient material allowing whole-genome sequencing directly from the fecal sample.

Table 1 Record data from thirty fecal samples collected during 2012 and 2014 in Bouaarfa, Eastern part of Morocco

Samples identification	Age by days	Host	Duo Rota-Adenovirus-Check-1 rapid test	Genotypes	VP4 Accession numbers	VP7 Accession numbers
Ch_S10	10	Young goat	+	G6P[14]	KT461271	KT461280
Ch_S11	8	Young goat	+	G6P[14]	KT461274	KT461283
Ch_S111	10	Young goat	+	G6P[14]	KT461275	KT461284
Ch_S31	4	Young goat	+	G6P[14]	KT461276	KT461285
Ch_S61	15	Young goat	+	G6P[14]	KT461277	KT461286
Ch_S44	20	Young goat	+	G10P[14]	KT461279	KT461288
Ch_S2	15	Young goat	+	G6P[14]	KT461272	KT461281
Ch_S12	10	Young goat	+	G6P[14]	KT461278	KT461287
Ch_S22	10	Young goat	+	G6P[14]	KT461273	KT461282
S1	10	Calf	+	GxP[14]	MN583319	–
S2	10	Calf	+	G10P[14]	MN583320	MN583315
S3	10	Calf	+	GxP[14]	MN583321	–
S4	22	Calf	+	GxP[14]	MN583322	–
S5	14	Young goat	+	G6P[14]	MN583323	MN583316
S6	16	Calf	+	GxP[14]	MN583324	–
S7	10	Calf	+	GxP[14]	MN583325	–
S8	22	Young goat	+	GxP[14]	MN583326	–
S9	25	Calf	+	GxP[14]	MN583327	–
S10	15	Young goat	–	–	–	–
S11	15	Calf	–	–	–	–
S12	60	Young goat	+	G10P[14]	MN583328	MN583317
S13	21	Calf	–	–	–	–
S14	60	Calf	–	–	–	–
S15	7	Young goat	+	G10P[5]	MN583329	MN583318
S16	6	Young goat	–	–	–	–
S17	7	Young goat	–	–	–	–
S18	15	Calf	+	G6P[14]	MN067458	MN067460
S19	7	Young goat	+	G10P[14]	MN067447	MN067449
S20	10	Young goat	–	–	–	–
S21	8	Young goat	–	–	–	–

(+) Positive samples for RVA (rapid test Rota-Adenovirus-Check-1, VEDA LAB, France). (–) Negative samples for RVA (rapid test Rota-Adenovirus-Check-1, VEDA LAB, France). (X) Undetermined genotypes

Whole-genome amplification

The cDNA of each rotavirus gene segment (11 segments) of the two strains S18 and S19 was subjected to PCR using specific primers in addition to newly designed primers (Supplementary Table 1) and MyFi Mix (Bioline, London, UK) according to manufacturer's instruction. The amplification conditions were 95 °C for 2 min, 35 cycles of 95 °C for 1 min, 60 °C for 1 min, and 72 °C for 1 to 5 min depending on the length of cDNA, followed by final extension at 72 °C for 8 min. Amplicons were separated on 1.5% agarose gels containing ethidium bromide (0.5 µg/ml) and visualized under UV transilluminator.

Nucleotide sequencing

Purification of the PCR products was done by ExoSAP-IT purification kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) according to the manufacturer's protocol. Amplicons were sequenced with the Big Dye Terminator Cycle Sequencing kit v3.1 (Life technologies, Inc. Foster City, CA) using the same primers used for PCR, in addition to primers used exclusively for sequencing. To recover the entire sequence fragments including the 5' and 3' termini of the 11 gene segments, Primer walking strategy was conducted. For VP3 and NSP1 genes, primers were newly designed to recover the complete open reading frame (ORF) sequences (Supplementary Table 2). The percentage of the novel sequence for each gene was also calculated based on the nucleotide length of the primers used for sequencing and the length of the respective gene obtained (Supplementary Table 3).

The sequence data was collected from an ABI Prism 3130XL Genetic analyzer (Life technologies, Inc. Foster City, CA). The sequences were edited and assembled using DNA Dragon Sequence Assembler version 1.6.0 (Sequentix-Digital DNA Processing, Germany).

RotaC version 2 (<https://rotac.regatools.be>), a classification tool for RVAs, was used to assign genotypes to the eleven gene segments.

Phylogenetic analysis

Phylogenetic and molecular evolutionary analyses were conducted using the MEGA 6 software [23]. Multiple sequence alignments were conducted utilizing the MUSCLE program. Maximum likelihood phylogenetic trees were constructed using models of nucleotide substitutions based on the lowest Bayesian Information Criterion (BIC) scores [24]: GTR+G+I (NSP1 and VP3), T92+G(NSP2, NSP3, NSP4, VP6 and VP7), TN93+G+I (VP2 and VP4), GTR+I (VP1) and T92+G+I (NSP5) in the MEGA 6

software. The trees were constructed using bootstrap resampling analysis at 1000 replicates. Amino acid alignment for VP4 gene was performed using MEGA 6 software.

Sequence submission

The nucleotide sequences of all genome segments of both strains were deposited in the National Centre of Biotechnology Information (NCBI) database, GenBank, under the accession numbers from MN067450 (NSP1) to MN067460 (VP7) for S18 and from MN067439 (NSP1) to MN067449 (VP7) for S19 (Supplementary Table 4).

Results

Characterization of the genotypes of RVA strains circulating in the Bouaarfa region

The area of Bouaarfa is located in the oriental region in North-Eastern Morocco. Steppes of Alfa and sagebrush are the basis for the regional farming production. The pastoral tradition is well established among the tribes of the region with nomadic vocation. Indeed this area is overwhelmingly inhabited by nomadic pastoral communities who make use of this harsh environment, keeping sheep, goats, camels, and cattle together. In April 2012 and 2014, thirty diarrheic fecal samples were collected from cattle and goats (eleven calves and nineteen young goats) during a severe outbreak in nomadic livestock in this region. Among the 30 diarrheic fecal samples collected, RVAs were detected in twenty-two samples by the Duo Rota-Adenovirus-Check-1, rapid test. These positive samples were obtained from different nomadic farmers established in remote areas in this vast region.

By analysis of partial nucleotide sequences, the VP7 and VP4 genes of the positive samples from both caprine and bovine origin were assigned to G6P[14] for ten (45.45%) samples, G10P[14] for four (18.18%) samples, and G10P[5] for one (4.54%) sample. Successful partial genome sequencing was possible in fifteen (68.18%) of the positive calf and goat fecal samples. Thus, for some strains, undetermined genotypes were attributed to the VP7 gene such as S1, S3, S4, S6, S7, S8 and S9 (Table 1). The RVA strains isolated from young goats presented three different genotypes: G6P[14], G10P[14] and G10P[5], whereas the VP7 gene could not be identified in all calf fecal samples, except for S2 and S18. On the other hand, the P[14] genotype was found for all positive samples, except for one strain S15, whose genotype has been determined as G10P[5] (Table 1).

Nucleotide sequencing and full-genome-based genotyping of strains S18 and S19

The genotypes of the 11 genes of S18 and S19 strains were assigned as G6-P[14]-I2-R2-C2-M2-A3-N2-T6-E2-H3 and G10-P[14]-I2-R2-C2-M2-A11-N2-T6-E2-H3, respectively, using the RotaC database. These genotypes constellations were found to be on a DS-1-like genetic backbone (I2-R2-C2-M2-A2-N2-T2-E2-H2). However, for the two strains, NSP5 was AU-1-like and NSP3 was the T6 genotype. NSP1 was A3/11 genotypes for S18 and S19, respectively.

Constellation comparison

Comparison of the complete genotype constellation of the studied strains with the human Moroccan strain ma31 and other bovine and non-bovine strains is shown in Supplementary Table 5.

S18 and S19 strains were found to share a largely conserved non-G genotype constellation (P[14]-I2-R2-C2-M2-(A3/11)-N2-T6-E2-H3) which is commonly found in bovine-like strains. The constellation of the bovine strain S18 is completely identical to the human strains from Italy (PA169, 111-05-27), Belgium (B10925) and Thailand (SKT-27) with eleven shared genotypes, while some strains from human and animal origin share nine genotypes with S18 such as the human strain ma31 from Morocco, the bovine strain 1604 from South Africa and the Macaque strain PTRV from United States. The Chubut strain and the caprine strain 0040 from Argentina share eight and seven genotypes, respectively, with the bovine strain S18. The latter shares also the same constellation with human G8 RVAs such as PR1300 and PR1973 (Italy) (Supplementary Table 5). The caprine strain S19 present an identical constellation with the human strains V585 and PR457 from Australia and Italy, respectively, thus eleven genotypes are shared. Other animal and human strains share ten genotypes with S19 like the ovine strain OVR762 from Spain and the human strains ma31, MG6, N-1, EGY3399, BA02, Hun5, BP1879, BP1062 and 182-02 from Morocco, Australia, India, Egypt, Italy, and Hungary, respectively (Supplementary Table 5). Also, the comparison of the constellations of the S18 and S19 isolates shows that they have nine genotypes in common and the majority of the human and animal strains present the same genotype with S18 and S19 for nine genes VP4, VP6, VP1-VP3, NSP2-NSP5 (Supplementary Table 5).

Phylogenetic analyses

We constructed phylogenetic trees for the full-length gene sequence of each of the eleven gene segments of Moroccan RVA strains: the caprine strain S19 and the bovine strain S18, together with appropriate human and animal RVA

strains. We also calculate the nucleotide sequence identity for strains selected for phylogenetic analyses. The strains in NCBI database that had the highest sequence identity with the bovine and the caprine RVA strains of this study are given in Table 2.

Phylogenetic analysis showed that NSP2, VP4 and VP6 genes for S18 strain and NSP1, NSP2, NSP4, VP2, VP3 and VP6 genes for S19 strain clustered with human RVA strains, while the rest of the genes for both S18 and S19 were closely related to animal strains (Table 2 and Fig. 1a–k).

The VP7 genes of Moroccan bovine strain S18 and caprine strain S19 exhibited the highest nucleotide sequence identity (97.55% and 96.10%, respectively) with French bovine strain V025 (G6P[5]) and Thai caprine strain 61A (G10P[5]) (Fig. 1a). The S18 strain belonged to lineage IV of the G6 genotype, while the caprine strain S19 belonged to lineage VII of the G10 genotype. The human strain ma31 with its G8 genotype was too far from the other Moroccan strains in the VP7 tree.

The VP4 genes of P[14] strains S18 and S19 exhibited the maximum nucleotide sequence identity (100% and 95.85%, respectively) with the Moroccan bovine-like human strain ma31 (G8P[14]) and the Argentinean Guanaco strain Chubut (G8P[14]) (Table 2 and Fig. 1b). Phylogenetically, S18 and S19 strains belonged to lineage I which includes human, goat, cow, sheep and antelope strains. Furthermore, we compared the putative VP8* antigenic epitopes of S18 and S19 strains with those of selected P[14] strains (Fig. 2). The antigenic epitope 8-1 of S18 and S19 strains appeared to be conserved with those of RVA P[14] strains from different species (human, bovine and ovine). RVA/Human-tc/MAR/ma31/2011/G8P[14], RVA/BOV/MAR/Bas1:2S/2014/P[14], RVA/BOV/MAR/Bas2:6S/2014/P[14], RVA/Human-wt/BEL/B10925/1997/G6P[14] and RVA/Human-wt/GHA/M0084/2010/G6P[14] carried very similar neutralizing epitopes as that of S18 strain. However, differences were observed at four amino acid positions, three at 8-3 (S113P and N114S for goat and guanaco strains; N133D for human, guanaco and ovine strains) and one at 8-4 (I89V) (Fig. 2). The analysis of the neutralizing epitopes along with phylogenetic analysis suggested that the VP4 gene of the Moroccan human strain ma31 was a result of an interspecies transmission from bovine-like rotavirus to human.

The VP6 gene of S18 strain showed the maximum nucleotide sequence identity (97.05%) with the VP6 gene of the Thai human strain SKT-27 (G6P[14]) [25] having a DS-1-like genetic backbone. While the VP6 gene of S19 strain showed the highest nucleotide sequence identity (98.30%) with the VP6 gene of the Italian human strain 111-05-27 (G6P[14]) [7] (Table 2 and Fig. 1c).

The VP1 genes of strains S18 and S19 exhibited the maximum nucleotide sequence identity (96.31% and 94.73%, respectively) with the bovine strain RF (G6P[6]) and the

Table 2 Percentage identities of the most closely related nucleotide sequences of the complete genome segments of rotavirus strains listed in the GenBank compared to the bovine strain (S18) and the caprine strain (S19)

Genes	Genotype	RVA/Calf-wt/MAR/S18/2012/G6P[14]			RVA/Goat-wt/MAR/S19/2012/G10P[14]			
		Closely related strain	NA ^a (%)	Accession number	Genotype	Closely related strain	NA ^a (%)	Accession number
NSP1	A3	RVA/Cow-tc/JPN/ NCDV/XXXX/ GXP[X]	96.48	GU808570	A11	RVA/Human-tc/MAR/ ma31/2011/G8P[14]	98.55	MG214332
NSP2	N2	RVA/Human-wt/THA/ CMH-N165-13/2013/ G8P[8]	97.3	MH060115	N2	RVA/Human-wt/HUN/ BP1879/2003/G6P[14]	96.13	FN665683
NSP3	T6	RVA/Cow-wt/TUR/ Amasya-1/2015/ G8P[5]	97.30	KX212881	T6	RVA/Cow-tc/XXX /RF/ XXXX /G6P[6]	96.37	Z21639
NSP4	E2	RVA/Pig-tc/THA/ P343/1991/G10P[5]	98.38	AB972865	E2	RVA/Human-wt/BeV/ BEF06018/2014/ G29P[41]	95.17	KU128901
NSP5	H3	RVA/Dog-wt/ GER/88,977/2013/ G8P[1]	98.20	KJ940161	H3	RVA/Sheep-tc/ESP/ OVR762/2002/ G8P[14]	98.65	EF554158
VP1	R2	RVA/Cow-tc/XXX /RF/ XXXX /G6P[6]	96.31	J04346	R2	RVA/Sheep-tc/ESP/ OVR762/2002/ G8P[14]	94.73	EF554148
VP2	C2	RVA/Giraffe-wt/IRL/ UCD/2007/G10P[11]	97.65	GQ428142	C2	RVA/Human-tc/MAR/ ma31/2011/G8P[14]	97.66	MG214338
VP3	M2	RVA/roe deer-wt/SLO/ D110-15/2015/G8[14]	97.43	KY426811	M2	RVA/Human-wt/DEU/ GER29-14/2014/ G6P[9]	96.62	KX880441
VP4	P[14]	RVA/Human-tc/MAR/ ma31/2011/G8P[14]	100	MG214340	P[14]	RVA/Guanaco-wt/ARG/ Chubut/1999/G8P[14]	95.85	FJ347103
VP6	I2	RVA/Human-wt/THA/ SKT-27/2012/G6P[14]	97.05	LC055551	I2	RVA/Human-wt/ ITA/111-05-27/2005/ G6P[14]	98.30	EF554141
VP7	G6	RVA/Cow-wt/FRA/ V025/2010/G6P[5]	97.55	HE646646	G10	RVA/Cow-tc/ THA/61A/1989/ G10P[5]	96.10	LC133541

^aPercentage of nucleotide sequence identity to closest related strain

ovine strain OVR762 (G8P[14]) from Spain (Table 2). Phylogenetic analysis revealed that S18 and S19 strains were closely related to several human, bovine and bovine-like human strains from different parts of the world within the bovine-like R2 subcluster (Fig. 1d).

The analysis of the VP2 tree (Fig. 1e) revealed a very close clustering (97.65% nucleotide identity) of the S18 strain with the giraffe G10P[11] strain detected in Ireland in 2007 (RVA/Giraffe-wt/IRL/UCD/2007/G10P[11]), while the VP2 gene of the S19 strain clustered closely with the human strain MAR/ma31 detected in Morocco in 2011 (97.66% nt identity) (Table 2 and Fig. 1g) which was described to be of bovine-like human origin [19].

The VP3 gene of the S18 and S19 strains clustered with the roe deer G8P[14] strain (D110-15) from Slovenia detected in 2015 (97.43% nt identity) and the human G6P[9] strain (GER29-14) isolated in Germany in 2014 (96.62% nt identity). The analysis of the VP3 tree showed that the ma31

strain was located too distantly from the two strains S18 and S19 although it classified within the same M2 genotype as the latter (Fig. 1f and Table 2).

Concerning non-structural genes, the NSP1 gene of S18 strain showed the maximum nucleotide sequence identity (96.48%) with that of Japanese bovine-like human strain NCDV (Table 2), and phylogenetically, S18 strain was found to be distantly related to other human and bovine strains in the A3 genotype (Fig. 1g) on the other hand, the NSP1 gene of S19 strain clustered closely with the Moroccan human strain ma31 with 98.55% of nucleotide identity. In the phylogenetic tree, the two strains were closely related with bovine and human strains from different parts of the world in the A11 genotype (Table 2 and Fig. 1g).

NSP2 tree showed a close relationship between S18 strain and the human CMH-N165-13 strain detected in Thailand in 2013 (97.3% nt identity). The same tree showed a very close clustering between the caprine strain S19 and the

Virus Genes

human BP1879 strain isolated in Hungary in 2003 presenting 96.13% of nucleotide identity (Table 2 and Fig. 1h).

For the NSP3 gene, the sequence of S18 strain clustered very well with the bovine strain (TUR/Amasya-2/2015/G8P[5]) with 97.30% of nucleotide identity, while the S19 strain presented a maximum nucleotide sequence identity (96.37%) with the bovine strain RF (G6P[6]) (Table 2), the

bovine-like human strain ma31 was found to be distantly related to other bovine and human strains in the T6 genotype (Fig. 1i).

The NSP4 genes of strains S18 and S19 exhibited the highest nucleotide sequence identity (98.38% and 95.17%, respectively) with the porcine strain P343 (G10P[5]) isolated in Thailand in 1991 and with the human strain BEF06018

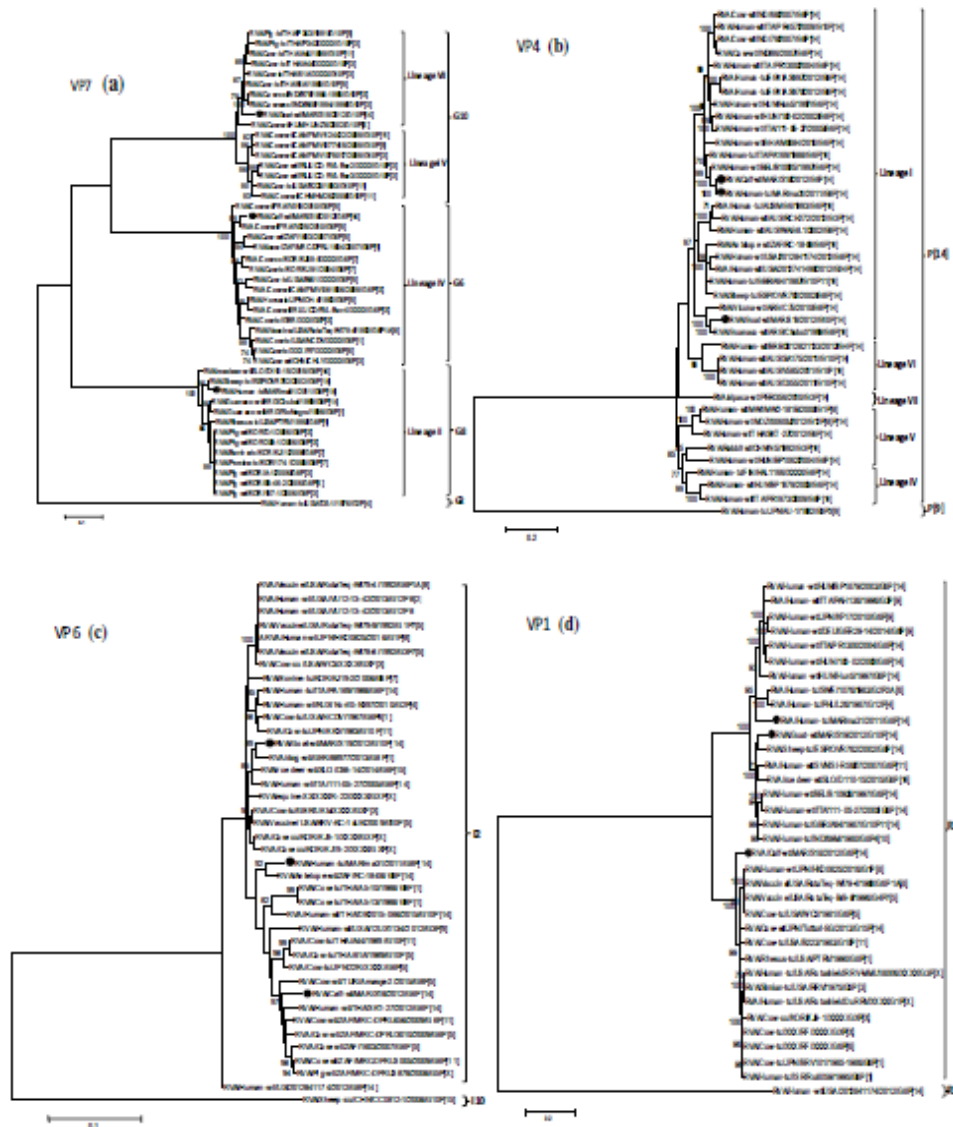


Fig. 1 Phylogenetic trees constructed from full nucleotide sequences of all 11 RVA gene segments of caprine RVA strain RVA/Goat-w/MAR/S19/2012/G10P[14] and bovine RVA strain RVA/CalF-w/MAR/S18/ 2012/G6P[14] with those of Moroccan human RVA strain ma31 and other RVAs. Moroccan strains are identified by a black cir-

cle. Maximum likelihood method was used, with bootstrap at 1000 repetitions. Percent bootstrap support is indicated by the value at each node when the value was 80% or larger. Scale bars represent the number of nucleotide substitution per site

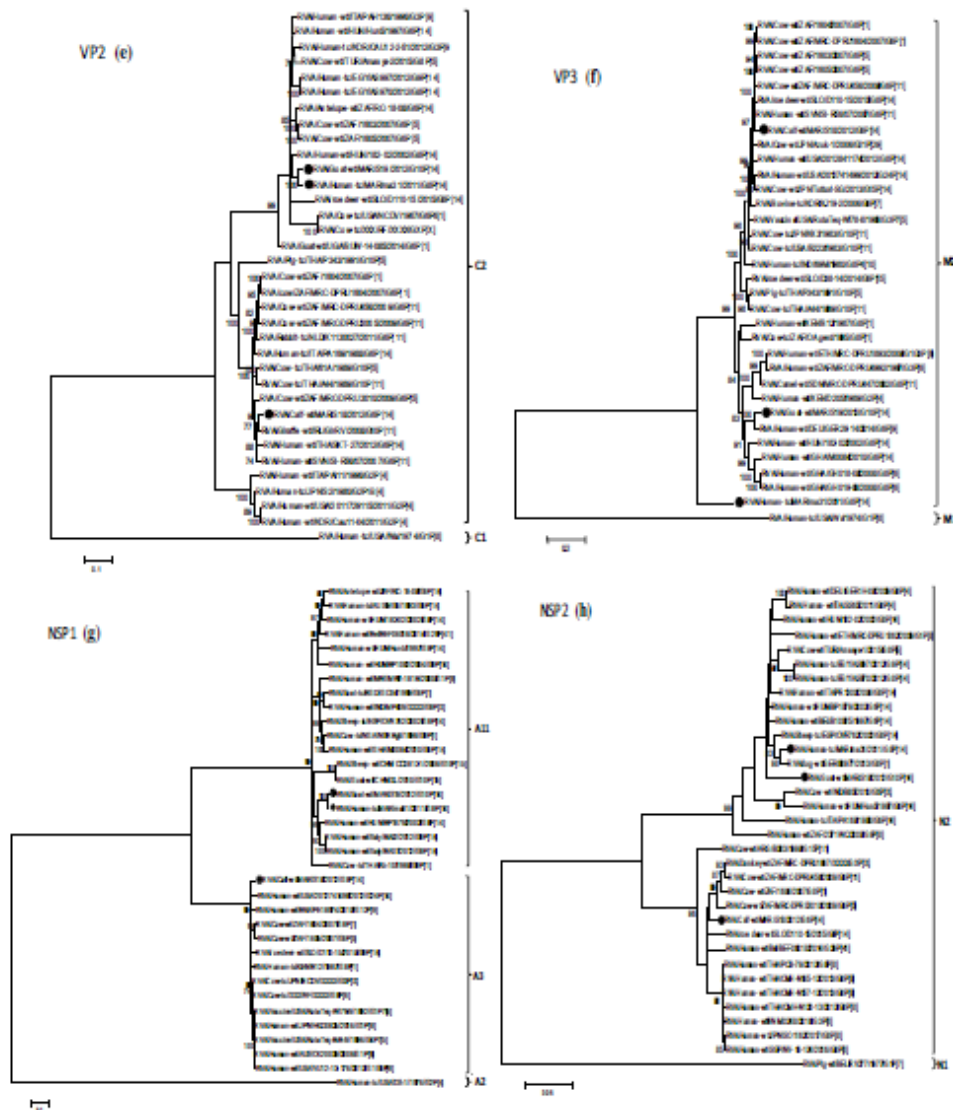


Fig. 1 (continued)

(G29P[41]) detected in Belgium in 2014, respectively. Phylogenetically, the human strain ma31 was found to be remotely related to S18 and S19 strains in the E2 genotype (Table 2 and Fig. 1j).

For the latest tree of the NSP5 gene, S18 strain matched closely with the dog strain GER/88,977/2013/G8P[1] (98.20% nt identity), while the S19 strain clustered closely with the ovine strain ESP/OVR762/2002/G8P[14] (98.65%) (Table 2). Phylogenetic analysis showed that the human strain ma31 was sandwiched between the two strains S18,

S19 and other human and bovine strains from different countries such as Germany, Japan, Turkey, Spain and Italy (Fig. 1k).

Discussion

The caprine and bovine rotaviruses isolated in 2012 and 2014, in the nomadic livestock of the Bouaarfa region and analyzed in this study, revealed the existence of 3 circulating

Virus Genes

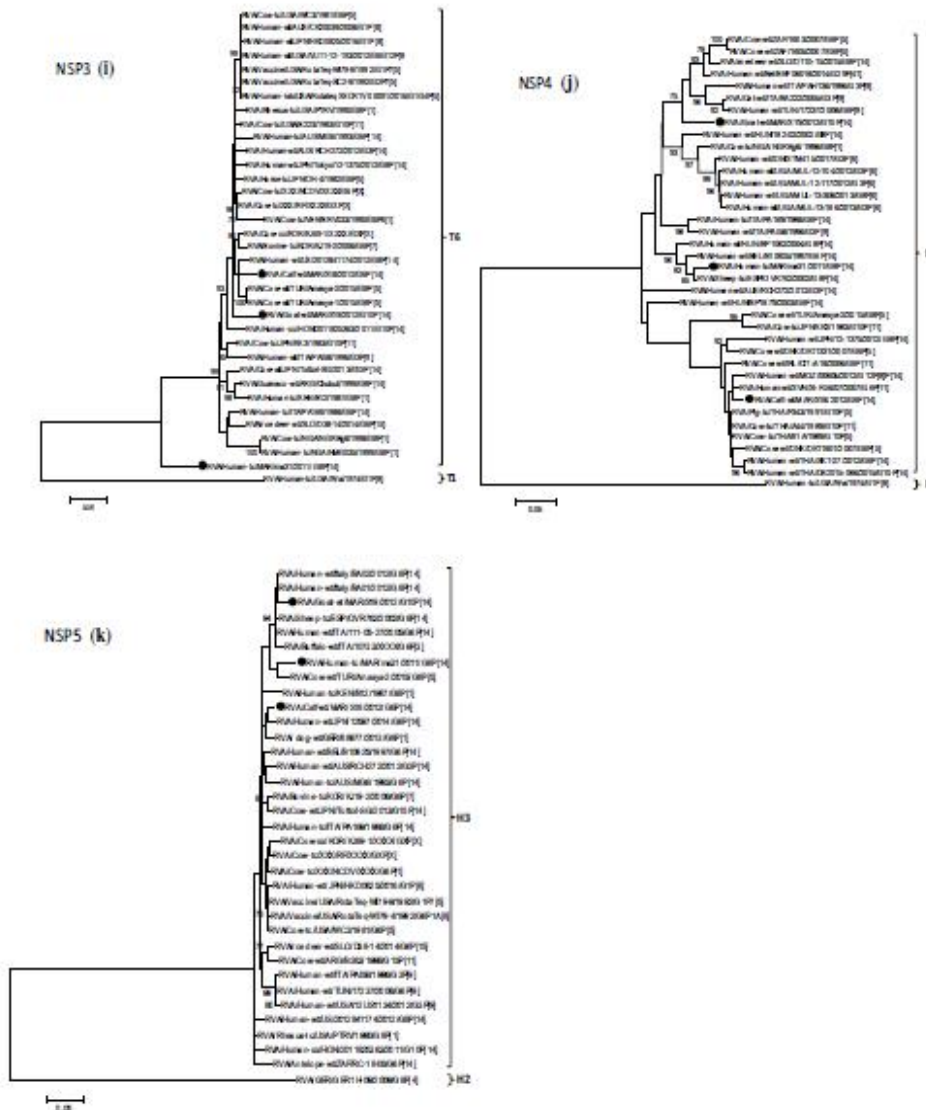


Fig. 1 (continued)

genotypes G6P[14], G10P[14] and G10P[5] in ruminants with a dominance of G6P[14]. This finding is in accordance with previously published data, which reported that the G6P[14] strains have been found so far in a South African group A caprine rotavirus [26]. Furthermore, the G6, G8, and G10 types have been detected in various RVA strains in cattle. The most common worldwide bovine genotype is G6, followed by G10 in Europe, Asia, Australia and Americas, and G8 in Africa [27].

Regarding P typing, P[14] and P[5] strains are prevalent in many countries around the world and the three

combinations G6P[14], G10P[14] and G10P[5] are already described in many areas worldwide such as Europe, Australia and South Africa [26, 27]. In Morocco, a study conducted in 2016 in different farm dairies in the western part of the country during a severe neonatal calve diarrhea reported the circulation of two genotypes G10P[14] and G6P[5] [15]. Thus, despite the geographical position and lifestyle of the livestock, the genotypes circulating in cattle of both dairy farmers and nomads are more or less the same according to our study. Among these caprine and bovine strains genotyped, the complete genome sequences were determined for

Virus Genes

	S-1										S-2			S-3					S-4						
	100	146	148	150	188	190	192	193	194	195	196	180	183	113	114	115	116	125	131	132	133	135	87	88	89
<i>Cov-wt/MAR/S18/2012/G8P[14]</i>	D	L	K	G	Y	L	I	N	N	D	N	T	N	S	N	T	Q	T	S	N	N	S	T	Q	I
Human-tc/MAR/ma31/2011/G8P[14]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BOV/MAR/Be1:2S/2014P[14]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BOV/MAR/Be2:6S/2014P[14]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Goat-wt/MAR/S19/2012/G10P[14]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	P	S	-	-	-	-	-	D	-	-	-	V
Guinea-wt/ARG/Chabuf1/999/G8P[14]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	P	S	-	-	-	-	-	D	-	-	-	V
Human-tc/TAPA169/1988/G8P[14]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Human-wt/BL10/925/1997/G8P[14]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Human-wt/THA/SKT-2/3/2012/G6P[14]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Q	-	-	-	-	-	-	D	-	-	-	-
Sheep-tc/ESH/OVR762/2002/G8P[14]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	D	-	-	-	-
Human-wt/AUS/V58/5/2011/G10P[14]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	D	-	-	-	-
Human-tc/GBR/A64/1983/G10P[14]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	D	-	-	-	-
Human-wt/GTM/200/972/690/2009/G8P[14]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	I	-	Q	-	-	-	A	-	-	D	-	-	-	A
Human-wt/ITA/P845/3/2009/G10P[14]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	D	-	-	-	-
Vicuna-wt/ARG/C75/2010/G8P[14]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	D	-	-	-	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Human-wt/GHA/M0084/2010/G8P[14]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	D	-	-	-	-

Fig. 2 VP8* (VP4) antigenic epitopes analysis of strains S18 and S19 with selected P[14] strains. Moroccan strains are marked in bold

two strains S18 and S19 in order to gain more insights about the genetic relatedness between the latter and the human strain ma31. On whole-genomic analysis, the 11 segments of strains ma31, S18 and S19 were found to be relatively genetically diverse, but they share a widely conserved non-G genotype constellation (P[14]-I2-R2-C2-M2-(A3/11)-N2-T6-E2-H3), which is commonly found and characteristic of artiodactyls bovine-like rotavirus strains [28, 29]. On the other hand, the phylogenetic analysis revealed that most genes of the three strains were related to those of bovine and bovine-like strains. The analysis of the VP8* antigenic epitopes for both S18, S19 and ma31 revealed a shared similarity with bovine, caprine, ovine and human strains from Morocco and other countries. Thus, these strains share the same genetic background that appears to be altered by independent interspecies transmission events (Fig. 2). This may indicate the probable conservation of function and structure of the antigenic epitopes among these strains.

All these findings, suggest that the human strain ma31 was a result of reassortment events between human and animal rotaviruses. It represents a case of interspecies transmission of RVA strains belonging to members of the *Artiodactyla* family including cattle, goat and camelids as has been discussed by Matthijnssens *et al.* [29] and others [30]. Many examples of the transfer of animal segments of the virus to humans were reported in different parts in the world [31–35]. Most of these segments were isolated either from porcine strains to human as demonstrated in Belem, Brazil by the VP6 gene sequencing [32], or by sequencing the VP7, VP4, VP6, and NSP4 genes to analyze the genetic relationship between human and animal rotaviruses (bovine and caprine) as described in two Danish and Brazilian studies [33–35]. The event of animal RVA segment transfer of the virus to human has been detected most frequently in low income countries where animals and humans are living closely, often sharing the same dwellings, as is the case of

Moroccan nomadic farmers. We have previously reported that the human strain ma31 was isolated from a child living in a rural region near the city of Rabat in frequent contact with cattle, goat and sheep [19], which may explain the isolation of the uncommon genotype G8P[14] never previously detected in Moroccan children. Thus seven gene segments (VP2, VP4, VP7, NSP1, NSP2, NSP3 and NSP4) of the strain demonstrated a high degree of similarity with strains of animal origin (caprine, bovine, ovine and dog). Three of these segments are very similar to those of S18 (VP4) and S19 (VP2, NSP1) strains isolated in Bouaarfa region in Morocco, while the other genes (VP7, NSP3, and NSP4) are close to the ovine Spanish strain OVR762 (G8P[14]) isolated in 2002 [7], and NSP2 similar to the dog strain 88977 (G8P[1]) isolated in Germany in 2013 [36]. The remaining four genes (VP1, VP3, VP6, and NSP5) presented a very close similarity to human RVA strains. In addition to that, the most frequent genotypes isolated in children and reported according to Benhafid *et al.* [37–40] are G1P[8], G9P[8], G2P[4], G4P[8] and G3P[8].

Therefore, the close relatedness of the three genes (VP4 for S18 with 100% nt identity, VP2 and NSP1 for S19 with 97.66% and 98.55% nt identity, respectively) of bovine and caprine strains to the human strain ma31, as well as the close relationship of three other genes with the ovine strain OVR762 (NSP4, NSP3 and VP7 with 97.6–99% nt identity) and one gene (NSP2 with 98.5% nt identity) with a dog strain 88977, suggest that ma31 may evolve through multiple reassortment events between human and ruminant rotaviruses. Our data indicates interspecies transmission between artiodactyl (bovine and/or caprine) and human rotaviruses and the zoonotic potential of rotavirus strains from ruminants seems to have a major significance since domestic animal species such as ruminants with direct contact to humans, can play a role in the spread of the virus by acting as natural reservoirs of the rotavirus [19, 29, 41, 42].

In conclusion, zoonotic transmission and gene segment reassortment between human and animal RVA do contribute to increase the diversity of human RVA strains [33]. The zoonotic studies are limited due to a poor disposability of genome sequences of animal RVA. Consequently it is important nowadays to expand monitoring of infections by rotaviruses to domestic animals, because its absence seems to reduce understanding of epidemiologic behavior of the virus. Thus and concerning this research, additional studies are needed with more samples taken from nomadic livestock in different regions of Morocco to obtain better informed results. Moreover, based on the results of this first study conducted on the livestock of nomadic farmers, and to avoid rotavirus infections causing neonatal diarrheic syndrome in nomadic calves and goats leading to important economic losses, a strategy for maternal rotavirus vaccination is recommended to boost lactogenic immunity and transfer passive antibodies to the neonate via colostrum and milk.

It is also imperative in Morocco, to create a surveillance system that can detect and identify animal rotaviruses, collect genetic data and estimate their zoonotic potential. Also, in parallel, the implementation of rotavirus surveillance strategies with an ongoing monitoring of genotypes in humans is crucial. These two actions will contribute significantly to the control and prevention of RVA infections in both humans and domestic animals, especially in regions with nomadic herders.

Acknowledgements This study was supported by the National Center for Scientific and Technical Research (CNRST) and the virology department. There was no involvement of the funding sources in carrying out this work from its conception to the data analysis, article writing and its submission for publication.

Author contributions NT, CL and EE conceived and designed the study. SA, HB and MM carried out the experiments. SA, MM and ME performed the data analysis. SA wrote the draft. NT, EE, MM, CL, HB and ME reviewed the manuscript. All the authors read the final version of the manuscript and approved it for publication.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethical approval All fecal samples were collected from different nomadic farmers after authorization and in accordance with the Vet responsible, Dr. S. Fellahi.

References

- Greenberg HB, Estes MK (2009) Rotaviruses: from pathogenesis to vaccination. *Gastroenterology* 136(6):1939–1951
- Desselberger U (2014) Rotaviruses. *Virus Res* 190:75–96
- Tate JE, Burton AH, Boschi-Pinto C, Steele AD, Duque J, Parashar UD (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 Infect Dis* 12(2):136–141
- Estes MK (2013) Rotaviruses. In: Knipe DM, et al. (eds) *Fields virology*. Wolters Kluwer Health, Philadelphia
- Estes MK, Kang G, Zeng CQ, Crawford SE, Ciarlet M (2001) Pathogenesis of rotavirus gastroenteritis. *Novartis Found Symp* 238(82–96):6
- Kirkwood CD (2010) Genetic and antigenic diversity of human rotaviruses: potential impact on vaccination programs. *J Infect Dis* 202(Suppl):S43–48
- Matthijssens J, Ciarlet M, Heiman E, Arijis I, Delbeke T, McDonald SM, Palombo EA, Iturriza-Gomara M, Maes P, Patton JT, Rahman M, Van Ranst M (2008) Full genome-based classification of rotaviruses reveals a common origin between human Wa-Like and porcine rotavirus strains and human DS-1-like and bovine rotavirus strains. *J Virol* 82(7):3204–3219
- Matthijssens J, Ciarlet M, Rahman M, Attoui H, Banyai K, Estes MK, Gentsch JR, Iturriza-Gomara M, Kirkwood CD, Martella V, Mertens PP, Nakagomi O, Patton JT, Ruggeri FM, Saif LJ, Santos N, Steyer A, Taniguchi K, Desselberger U, Van Ranst M (2008) Recommendations for the classification of group A rotaviruses using all 11 genomic RNA segments. *Arch Virol* 153(8):1621–1629
- Matthijssens J, Ciarlet M, McDonald SM, Attoui H, Banyai K, Brister JR, Buesa J, Esona MD, Estes MK, Gentsch JR, Iturriza-Gomara M, Johne R, Kirkwood CD, Martella V, Mertens PP, Nakagomi O, Parreno V, Rahman M, Ruggeri FM, Saif LJ, Santos N, Steyer A, Taniguchi K, Patton JT, Desselberger U, Van Ranst M (2011) Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG). *Arch Virol* 156(8):1397–1413
- Trojnar E, Sachsenroder J, Twardziok S, Reetz J, Otto PH, Johne R (2013) Identification of an avian group A rotavirus containing a novel VP4 gene with a close relationship to those of mammalian rotaviruses. *J Gen Virol* 94(1):136–142
- Delogu R, Ianiro G, Morea A, Chironna M, Fiore L, Ruggeri FM (2016) Molecular characterization of two rare human G8P[14] rotavirus strains, detected in Italy in 2012. *Infect Genet Evol* 44:303–312
- Dennis FE, Fujii Y, Haga K, Damanka S, Lartey B, Agbemabiese CA, Ohta N, Armah GE, Katayama K (2014) Identification of novel Ghanaian G8P[6] human-bovine reassortant rotavirus strain by next generation sequencing. *PLoS ONE* 9:6
- Ghosh S, Kobayashi N (2011) Whole-genomic analysis of rotavirus strains: current status and future prospects. *Future Microbiol* 6(9):1049–1065
- Doro R, Farkas SL, Martella V, Banyai K (2015) Zoonotic transmission of rotavirus: surveillance and control. *Expert Rev Anti Infect Ther* 13(11):1337–1350
- Ennima I, Sebbag G, Harif B, Amzazi S, Loufi C, Touil N (2016) Isolation and identification of group A rotaviruses among neonatal diarrheic calves. Morocco *BMC Res Notes* 9(1):261
- Hassine-Zaafrane M, Ben Salem I, Sdiri-Loulizi K, Kaplon J, Bouslama L, Aouni Z, Sakly N, Pothier P, Aouni M, Ambert-Balay K (2014) Distribution of G (VP7) and P (VP4) genotypes of group A bovine rotaviruses from Tunisian calves with diarrhoea. *J Appl Microbiol* 116(6):1387–1395
- Ammar SSM, Mokhtaria K, Tahar BB, Amar AA, Redha BA, Yuva B, Mohamed HS, Abdellatif N, Laid B (2014) Prevalence of rotavirus (GARV) and coronavirus (BCoV) associated with neonatal diarrhea in calves in western Algeria. *Asian Pac J Trop Biomed* 4:S318–S322

18. Smail NL, Rezali L, Abdelhadi SA (2018) Etude préliminaire sur la mortalité de veaux âgés de 0 à 90 jours en région de Tiaret Algérie Ouest. *Livestock Research for Rural Development* Volume 30. Article#98. https://www.lrrd.org/lrrd30/6/si_am30098.html
19. Alaoui Amine S, Melloul M, El Alaoui MA, Touil N, El Fahime E (2019) Full-length genome analysis of the first human G8P[14] rotavirus strain from Morocco suggests evidence of zoonotic transmission. *Virus Genes* 55(4):465–478
20. Iturriza-Gomara M, Kang G, Gray J (2004) Rotavirus genotyping: keeping up with an evolving population of human rotaviruses. *J Clin Virol* 31(4):259–265
21. Simmonds MK, Armah G, Asmah R, Banerjee I, Damanka S, Esona M, Gentsch JR, Gray JJ, Kirkwood C, Page N, Iturriza-Gomara M (2008) New oligonucleotide primers for P-typing of rotavirus strains: strategies for typing previously untypeable strains. *J Clin Virol* 42(4):368–373
22. Maes P, Matthijssens J, Rahman M, Van Ranst M (2009) RotaC: a web-based tool for the complete genome classification of group A rotaviruses. *BMC Microbiol* 9(238):1471–2180
23. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 28(10):2731–2739
24. Schwarz G (1978) Estimating the dimension of a model. *Ann Stat* 6(2):461–464
25. Tacharoenmuang R, Komoto S, Guntapong R, Ide T, Haga K, Katayama K, Kato T, Ouchi Y, Kurahashi H, Tsuji T, Sangkitporn S, Taniguchi K (2015) Whole genomic analysis of an unusual human G6P[14] rotavirus strain isolated from a child with diarrhea in Thailand: evidence for bovine-to-human interspecies transmission and reassortment events. *PLoS ONE* 10(9):e0139381. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139381>
26. de Beer M, Steele D (2002) Characterization of the VP7 and VP4 genes of a South African group A caprine rotavirus. *GenBank record*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/AY128709.1> and <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/AY128708.1>. Accessed Feb 2020
27. Valiakos GA, Chatzopoulos DCA, Tsokana CN (2017) Interspecies transmission of Rotaviruses among ruminants, dogs and humans: current facts and remarks. *J Hellen Veterin Med Soc* 68(2):123–130
28. Matthijssens J, Van Ranst M (2012) Genotype constellation and evolution of group A rotaviruses infecting humans. *Curr Opin Virol* 2(4):426–433
29. Matthijssens J, Potgieter CA, Ciarlet M, Parreno V, Martella V, Banyai K, Garaicoechea L, Palombo EA, Novo L, Zeller M, Arista S, Germa G, Rahman M, Van Ranst M (2009) Are human P[14] rotavirus strains the result of interspecies transmissions from sheep or other ungulates that belong to the mammalian order Artiodactyla? *J Virol* 83(7):2917–2929
30. Jere KC, Miera L, Page NA, van Dijk AA, O'Neill HG (2011) Whole genome analysis of multiple rotavirus strains from a single stool specimen using sequence-independent amplification and 454(R) pyrosequencing reveals evidence of intergenotype genome segment recombination. *Infect Genet Evol* 11(8):2072–2082
31. Bwogi J, Jere KC, Karamagi C, Byarugaba DK, Namuwulya P, Baliraine FN, Desselberger U, Iturriza-Gomara M (2017) Whole genome analysis of selected human and animal rotaviruses identified in Uganda from 2012 to 2014 reveals complex genome reassortment events between human, bovine, caprine and porcine strains. *PLoS ONE* 12(6):e0178855
32. Gabbay YB, Borges AA, Oliveira DS, Linhares AC, Mascarenhas JD, Barardi CR, Simoes CM, Wang Y, Glass RI, Jiang B (2008) Evidence for zoonotic transmission of group C rotaviruses among children in Belem. *Braz J Med Virol* 80(9):1666–1674
33. Luchs A, Cilli A, Morillo SG, de Carmona R et al (2012) Rare G3P[3] rotavirus strain detected in Brazil: possible human-canine interspecies transmission. *J Clin Virol* 54(1):89–92
34. Martella V, Banyai K, Matthijssens J, Buonavoglia C, Ciarlet M (2010) Zoonotic aspects of rotaviruses. *Vet Microbiol* 140(3–4):246–255
35. Midgley SE, Hjulsgaard CK, Larsen LE, Falkenhorst G, Bottiger B (2012) Suspected zoonotic transmission of rotavirus group A in Danish adults. *Epidemiol Infect* 140(6):1013–1017
36. Sieg M, Rückner A, Köhler C, Burgener I, Vahlenkamp T (2014) A bovine G8P[1] group A rotavirus isolated from an asymptotically infected dog. *J Gen Virol*. <https://doi.org/10.1099/vir.0.069120-0>
37. Benhafid M, Elomari N, Azzouzi Idrissi M, Rguig A, Gentsch JR, Parashar U, Elaouad R (2014) Effect of monovalent rotavirus vaccine on rotavirus disease burden and circulating rotavirus strains among children in Morocco. *J Med Virol* 87(6):944–953
38. Benhafid M, Elomari N, Elqazoui M, Meryem AI, Rguig A, Filali-Maltouf A, Elaouad R (2013) Diversity of rotavirus strains circulating in children under 5 years of age admitted to hospital for acute gastroenteritis in Morocco, June 2006 to May 2009. *J Med Virol* 85(2):354–362
39. Benhafid M, Youbi M, Klena JD, Gentsch JR, Teleb N, Widdowson MA, Elaouad R (2009) Epidemiology of rotavirus gastroenteritis among children <5 years of age in Morocco during 1 year of sentinel hospital surveillance, June 2006–May 2007. *J Infect Dis* 1(200):605048
40. El Qazoui M, Oumzil H, Baassi L, El Omari N, Sadki K, Amzazi S, Benhafid M, El Aouad R (2014) Rotavirus and norovirus infections among acute gastroenteritis children in Morocco. *BMC Infect Dis* 14:300–300
41. Donato CM, Manuelpillai NM, Cowley D, Roczo-Farkas S, Buttery JP, Crawford NW, Kirkwood CD (2014) Genetic characterization of a novel G3P[14] rotavirus strain causing gastroenteritis in 12 year old Australian child. *Infect Genet Evol* 25:97–109
42. Mullick S, Mukherjee A, Ghosh S, Pazhani GP, Sur D, Manna B, Nataro JP, Levine MM, Ramamurthy T, Chawla-Sarkar M (2013) Genomic analysis of human rotavirus strains G6P[14] and G11P[25] isolated from Kolkata in 2009 reveals interspecies transmission and complex reassortment events. *Infect Genet Evol* 14:15–21

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

Partie III :
Infection expérimentale d'une
chèvre alpine par la souche
humaine m31

Partie III : Infection expérimentale d'une chèvre alpine par la souche humaine ma31

1. Objectif

Le RVA est connu pour être la principale cause de gastro-entérites (GEA) virale aiguë chez les nourrissons et les jeunes enfants dans le monde, ainsi que chez les jeunes animaux d'une grande variété d'espèces. Au Maroc, les systèmes d'élevage bédouins présents dans plusieurs régions peuvent favoriser l'introduction de nouveaux génotypes G et sérotypes P chez l'Humain à partir d'un hôte hétérologue (caprins, bovins ou dromadaire) par transmission inter-espèces, en particulier dans les régions où les ruminants et les humains vivent côte à côte. Ainsi, les souches humaines de génotypes G8 ou G10 combinés au génotype P [14] sont généralement détectées chez les veaux et les chèvres et sont spéculées être le résultat de telle transmission chez l'humain. Récemment, un certain nombre de RVA infectant les humains avec des génotypes P[14] inhabituels ont émergé [27, 28, 30, 340]. Il reste à établir si ces génotypes P[14] humains sont bidirectionnels et peuvent être transmis aux espèces animales. Pour cela, une infection expérimentale a été menée sur une chèvre alpine afin d'évaluer la réceptivité de cette dernière à la souche humaine Marocaine de génotype rare G8P[14] isolée chez un enfant [341]. La reproductibilité de l'infection par RVA sur des caprins à travers l'infection expérimentale de chèvre alpine saine sera ainsi testée.

2. Modèle animal

L'infection expérimentale a été menée sur un chevreau femelle âgé de 8 mois, de race alpine, non vacciné, issu de mère non vaccinée et sérologiquement négative au RVA.

Le choix du modèle animal a été basé sur deux éléments. D'une part, la chèvre alpine est connue pour être très sensible à l'infection par les virus, et d'autre part, l'étude phylogénétique de la souche caprine Marocaine S19 dont le génome a été séquencé entièrement, a montré que six de ses gènes (NSP1, NSP2, NSP4, VP2, VP3 et VP6) sont

étroitement liés à des souches d'origine humaines contrairement à la souche bovine S18 ou seulement trois de ses gènes (NSP4, VP4 et VP6) se sont regroupés avec des souches humaines [415].

De ce fait, le modèle expérimentale caprin nous a paru le plus adéquat, compte tenu de la liaison étroite des souches caprine et des souches d'origine humaines pour l'étude de la reproductibilité de l'infection ainsi que la réceptivité de l'animal à la souche humaine de génotype G8P[14].

3. Infection expérimentale (lieu de l'infection)

Le chevreau était logé dans un box séparé pour éviter toute contamination croisée. Le personnel chargé du suivi était amené à respecter les consignes d'hygiène et de biosécurité pour éviter toute auto-infection et toute contamination croisée.

Les équipements de protection individuelle étaient changés lors des opérations de prélèvements d'écouvillons (Figure. 21).



Figure 21. Photo du chevreau dans le box avant inoculation

Le chevreau était inoculé par voie orale et intra péritonéale (IP) par la souche de RVA humain ma31 de génotype G8P[14] issue du 3ème passage sur les cellules MA104 et adapté davantage sur les cellules Vero. La dose infectieuse utilisée est de 7,4 TCID50/ml (Figure. 22).



Figure 22. Photo du chevreau au cours de l'inoculation par voie orale et IP

Un suivi post infection a été effectué sur le chevreau à travers un suivi clinique et un suivi virologique pendant 10 jours (Figure 23) :



Figure 23. Suivi post infection du chevreau après inoculation

Suivi clinique :

Le suivi clinique englobe les paramètres suivants :

- Relevé quotidien de la température
- Suivi des signes cliniques locaux et généralisés: excrétion de fèces diarrhéiques, anorexie, déshydratation
- Suivi du comportement: inappétence, abattement ou tous autres troubles digestifs
- Le suivi clinique est évalué selon l'index de scoring mis en œuvre pour le RVA.

Suivi virologique :

Le suivi virologique consiste en un écouvillonnage rectal réalisé chaque 2 jours y compris le jour J0.

Le résumé du protocole expérimental suivi au cours de l'infection figure dans le tableau ci-dessous :

Tableau 12. Récapitulatif du protocole expérimental

Animal	Voie d'inoculation	Souche/sérotypage	Dose infectieuse utilisée	Suivi post infection sur 14 jours
Chevreau de race alpine	Orale et IP	ma31 G8 P[14]	7,4 TCID50/ml	Clinique: relevé de T° et score clinique Virologique: Ecouvillons rectaux chaque 2 jours y compris le J0.

4. Résultats et discussion

Après infection du chevreau par la souche Marocaine ma31 de génotype G8P[14], un suivi clinique et virologique a été effectué par un vétérinaire pendant 10 jours, les résultats du suivi figurent dans le tableau suivant :

Tableau 13. Résultats du suivi clinique et virologique après l'infection expérimentale

Jours	Température	Signes cliniques et généraux	Comportement	Score de sévérité clinique (Vesikari score)	Valeur du Ct
J0	36,8	Pas de signes cliniques	Normal	1	Négative
J1	37	Pas de signes cliniques	Normal	4	-
J2	37,9	Diarrhées sanglantes + Déshydratation	inappétence	8	28
J3	38,8	Diarrhées sanglantes + Déshydratation	inappétence	9	-
J4	38,9	Diarrhées sanglantes + Déshydratation	Inappétence + faiblesse	10	26
J5	39	Diarrhées sanglantes + Déshydratation	Inappétence + faiblesse	10	25
J6	38,5	Déshydratation	Faiblesse	7	26
J7	37,1	Pas de signes cliniques (Rétablissement après réhydratation)	Faiblesse	6	-
J8	37	Pas de signes cliniques	Normal	4	27
J9	36,4	Pas de signes cliniques	Normal	4	-
J10	36,2	Rétablissement	Normal	1	35

Un suivi post infection (PIF) clinique chez le chevreau a révélé que la souche ma31 a provoqué une élévation progressive de la température à partir de J2 pif allant de 37,9°C jusqu'à 38,9°C le jour J4 et 39°C le jour J5. Une diminution progressive de la température a été observé à partir du jour J6 avec 38,5°C jusqu'au jour J10 avec une température de 36,2°C (Tableau 13).

Pour les signes cliniques, des diarrhées sanglantes ont été constatés à partir du jour J2 accompagnées d'un comportement caractérisé par une inappétence et ce jusqu'au jour J5 ou des signes de faiblesse ont été observés sur le chevreau. A partir du jour J7, l'état clinique de l'animal a commencé à s'améliorer avec une nette diminution de la température et un

comportement qui est redevenu normal. Le Score de sévérité clinique (Vesikari score) reflète cette évolution des signes cliniques, ainsi il est passé de 1 (sévérité légère) le jour J0 à une valeur de 10 (sévérité modérée) le jour J4 et J5 avant de diminuer à nouveau et revenir à une valeur de 1 le jour J10 (Tableau 13).

Concernant le suivi virologique, les prélèvements des selles effectués chaque 2 jours à travers les écouvillons rectaux ont montré la présence d'une excrétion virale à partir du jour J2 avec un Ct de 28 après extraction de l'ARN virale à partir des fèces et détection du virus par le test RT-PCR en temps réel. Les Ct ont diminué progressivement jusqu'à arriver à une valeur de 25 le jour J5, ce qui implique une augmentation de la charge virale dans les selles. A partir du jour J6 jusqu'au jour J10, une augmentation progressive des Ct a été observée allant de 26 à 35 (Tableau 13).

Ces résultats montrent de manière évidente que la souche humaine de RVA ma31 de génotype bovin G8P[14], a été capable d'induire une diarrhée sanglante 2 jours après l'infection (dpi) chez le chevreau alpin. L'excrétion du virus RVA a commencé à 2 dpi (valeur Ct de 28) et s'est poursuivie jusqu'à 5 dpi (valeur Ct de 25) avec une élévation concomitante de la température corporelle. Le virus a été isolé à partir d'échantillons fécaux au jour 4 pi avec un titre de 5,4 TCID50/ml.

Ces données prouvent que l'infection par RVA a été reproductible chez les caprins et que le test de réceptivité de la souche ma31 chez la chèvre alpine a réussi.

En conclusion, on peut dire que notre étude, bien que limitée à un seul animal, est la première à prouver expérimentalement qu'un génotype P[14] humain provoque la diarrhée et l'excrétion du virus chez la chèvre. Ce résultat renforce le rôle potentiel de la transmission inter-espèces dans la génération de nouvelles et rares souches de rotavirus telles que le G8P[14] qui infecte les humains. De plus, cette souche a été adaptée sur des lignées cellulaires Vero et donc elle constitue un candidat de choix dans le cas de la mise au point d'un nouveau vaccin.

5. Publication

Ce travail a fait l'objet d'une communication orale dans un congrès qui s'est tenu à Jeddah en 2015 et le résumé a été publié dans « *International Journal of World Academy of Science, Engineering and Technology* » Vol:9, No:, 2015

Titre: **“Evidence for Replication of an Unusual G8P[14] Human Rotavirus Strain in the Feces of an Alpine Goat: Zoonotic Transmission from Caprine Species”**

Evidence for Replication of an Unusual G8P[14] Human Rotavirus Strain in the Feces of an Alpine Goat: Zoonotic Transmission from Caprine Species

Authors : Amine Alaoui Sanae, Tagjdid Reda, Loutfi Chafiq, Melloul Merouane, Laloui Aziz, Touil Nadia, El Fahim, E. Mostafa

Abstract : Background: Rotavirus group A (RVA) strains with G8P[14] specificities are usually detected in calves and goats. However, these strains have been reported globally in humans and have often been characterized as originating from zoonotic transmissions, particularly in area where ruminants and humans live side-by-side. Whether human P[14] genotypes are two-way and can be transmitted to animal species remains to be established. Here we describe VP4 deduced amino-acid relationships of three Moroccan P[14] genotypes originating from different species and the receptiveness of an alpine goat to a human G8P[14] through an experimental infection. Material/methods: the human MA31 RVA strain was originally identified in a four years old girl presenting an acute gastroenteritis hospitalized at the pediatric care unit in Rabat Hospital in 2011. The virus was isolated and propagated in MA104 cells in the presence of trypsin. Ch_10S and 8045_S animal RVA strains were identified in fecal samples of a 2-week-old native goat and 3-week-old calf with diarrhea in 2011 in Bouaarfa and My Bousselham respectively. Genomic RNAs of all strains were subjected to a two-step RT-PCR and sequenced using the consensus primers VP4. The phylogenetic tree for MA31, Ch_10S and 8045_S VP4 and a set of published P[14] genotypes was constructed using MEGA6 software. The receptivity of MA31 strain by an eight month-old alpine goat was assayed. The animal was orally and intraperitoneally inoculated with a dose of 8.5 TCID₅₀ of virus stock at passage level 3. The shedding of the virus was tested by a real time RT-PCR assay. Results: The phylogenetic tree showed that the three Moroccan strains MA31, Ch_10S and 8045_S VP4 were highly related to each other (100% similar at the nucleotide level). They were clustered together with the B10925, Sp813, PA77 and P169 strains isolated in Belgium, Spain and Italy respectively. The Belgian strain B10925 was the most closely related to the Moroccan strains. In contrast, the 8045_S and Ch_10S strains were clustered distantly from the Tunisian calf strain B137 and the goat strain cap455 isolated in South Africa respectively. The human MA31 RVA strain was able to induce bloody diarrhea at 2 days post infection (dpi) in the alpine goat kid. RVA virus shedding started by 2 dpi (Ct value of 28) and continued until 5 dpi (Ct value of 25) with a concomitant elevation in the body temperature. Conclusions: Our study while limited to one animal, is the first study proving experimentally that a human P[14] genotype causes diarrhea and virus shedding in the goat. This result reinforce the potential role of inter- species transmission in generating novel and rare rotavirus strains such G8P[14] which infect humans.

Keywords : interspecies transmission, rotavirus, goat, human

Conclusion générale et recommandations

Conclusion générale et recommandations

Le présent travail a porté sur le séquençage du génome complet de trois souches de rotavirus groupe A, d'origine humaine ayant un génotype rare (G8P[14]), d'origine bovine (G6P[14]) et caprine (G10P[14]) permettant de déterminer leur constellation complète, composée des génotypes des 11 gènes de chaque souche virale. De plus, le séquençage partiel de souches de RVA d'origine bovines et caprines isolées chez le cheptel de fermiers nomades lors d'une grave épidémie de gastroentérite survenue dans la région de Bouaarfa au Maroc, a permis de déterminer 3 génotypes circulants : G6P[14], G10P[14] et G10P[5] avec une dominance du génotype G6P[14].

L'analyse phylogénétique de ces souches a montré l'existence d'une liaison étroite entre certains gènes des souches animales Marocaines (S18 et S19) et la souche d'origine humaine (ma31) à savoir les gènes VP4, VP2 et NSP1. Cette grande similitude entre certains gènes des souches animales et la souche humaine ayant un génotype rare parmi les génotypes existants au Maroc illustre l'existence d'un cas de transmission inter espèces entre les artiodactyles (bovins et/ou caprins) et les rotavirus humains. Ce phénomène de transmission zoonotique a été déjà décrit un peu partout dans le monde mais c'est la première fois qu'il est observé au Maroc.

Sachant que les génotypes P[14] sont plus apparentées aux souches isolées chez les espèces d'ongulés de l'ordre des artiodactyles, en particulier le mouton, il restait à établir si ces derniers sont bidirectionnels et peuvent être transmis aux espèces animales. Pour cela, une infection expérimentale a été menée sur une chèvre alpine afin d'évaluer la réceptivité de cette dernière à la souche humaine Marocaine de génotype rare G8P[14] isolée chez un enfant [341]. La reproductibilité de l'infection par RVA sur des caprins à travers l'infection expérimentale de chèvre alpine saine a été ainsi testée et le test de réceptivité de la souche ma31 chez cette dernière a réussi. Cet exemple, bien que limitée à un seul animal, démontre sans équivoque que l'infection entre espèces par un rotavirus existe, du moins expérimentalement, et que cette infection peut être pathogène chez l'espèce hétérologue. De ce fait, il existe des preuves attestant que la transmission zoonotique des rotavirus, ou de

Conclusion générale et recommandations

certaines gènes de rotavirus, peut se produire. 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.

D'un autre côté, la faible incidence des souches peu communes ou inhabituelles dans le monde et au Maroc en particulier, suggère toutefois qu'une telle transmission, ou du moins la propagation d'un rotavirus animal ou d'un virus réassorti humain/animal dans la population humaine, ne se produit pas très fréquemment. Ce phénomène de réassortiment reste la cause principale des échecs à la vaccination connu en médecine vétérinaire mais permet cependant l'emploi des souches animales atténuées pour la vaccination en médecine humaine.

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. Ce portrait semble suggérer que le contexte socio-culturel (ex. : 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, etc.) a probablement un impact sur la pression de sélection des souches réassorties et/ou zoonotiques. C'est le cas dans le milieu rural au Maroc et chez les éleveurs nomades vivant dans certaines régions du pays, où les risques de contact avec des matières fécales animales sont accrus, car les animaux et les humains vivent en étroite proximité, partageant souvent les mêmes habitations. Le risque d'apparition de souches de RVA inhabituelles augmente systématiquement dans ces cas, ce qui justifie l'importance de la mise en place d'une épidémiosurveillance constante en médecine humaine et vétérinaire au Maroc à travers la création d'un système de surveillance qui puisse détecter et identifier les rotavirus animaux, collecter les données génétiques et estimer leur potentiel zoonotique d'une part, et d'autre part mettre en place une stratégie de surveillance des rotavirus avec un suivi permanent des géotypes chez l'homme.

Il est important également d'étendre la surveillance des infections par les rotavirus aux animaux domestiques, car son absence semble réduire la compréhension du comportement épidémiologique du virus.

De telles mesures sont nécessaires et justifiées afin de surveiller au niveau du génome le risque éventuel de propagation de souches émergentes aussi bien au Maroc que dans le monde

Conclusion générale et recommandations

en vue de pouvoir assurer une utilisation réussie des vaccins et pouvoir expliquer leur échec si jamais ça se produit.

Références Bibliographiques

Références Bibliographiques

1. Santé, M.d.l., *Enquête Nationale sur la Population et la Santé Familiale, 2003-04, 2011 et 2018.*
2. DINI N., L.A., AGADR A., *Epidémiologie des diarrhées aiguës microbiennes 2016: 4ème Congrès National SOMIPEV, Marrakech.* p. 13.
3. O'Ryan, M.L., Hermosilla, G. Osorio, G., *Rotavirus vaccines for the developing world.* Current Opinion in Infectious Diseases, 2009. **22**: p. 483-489.
4. Parashar, U.D., Hummelman, E. G., Bresee, J. S., Miller, M. A., Glass, R. I., *Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children.* Emerging Infectious Diseases, 2003. **9**: p. 565-572.
5. Tate, J.E., et al., *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 Infect Dis, 2012. **12**(2): p. 136-41.
6. Rodrigo, C., Salman, N., Tatochenko, V., Meszner, Z., Giaquinto, C., *Recommendations for rotavirus vaccination: A worldwide perspective.* Vaccine, 2010. **28**: p. 5100-5108.
7. Tessa, W., Peter, S., Clarissa, B., Mickey, C., Elizabeth, M., *Diarrhoea: why children are still dying and what can be done.* The Lancet, 2010. **375**(9718): p. 870-872.
8. Co., M., *Full prescribing information.* 2011.
9. GlaxoSmithKline, *Summary of product characteristics.* 2011.
10. OMS. *Global use of rotavirus vaccines recommended.* 2009; Available from: https://www.who.int/mediacentre/news/releases/2009/rotavirus_vaccines_20090605/en/.
11. Ruiz-Palacios, G.M., Perez-Schael, I., Velazquez, F. R., Abate, H., Breuer, T., Clemens, S. C., et al., *Safety and efficacy of an attenuated vaccine against severe rotavirus gastroenteritis.* New England Journal of Medicine, 2006. **354**: p. 11-22.
12. Vesikari, T., Matson, D. O., Dennehy, P., Van Damme, P., Santosham, M., Rodriguez, Z., et al., *Safety and efficacy of a pentavalent human-bovine (WC3) reassortant rotavirus vaccine.* New England Journal of Medicine, 2006. **354**(23-33).
13. Armah, G.E., Sow, S. O., Breiman, R. F., Dallas, M. J., Tapia, M. D., Feikin, D. R., Binka, F.N., et al., *Efficacy of pentavalent rotavirus vaccine against severe rotavirus gastroenteritis in infants in developing countries in sub-Saharan Africa: a randomised, double blind, placebo-controlled trial.* Lancet 2010. **376**: p. 606-14.

14. Madhi, S.A., Cunliffe, N. A., Steele, D., Witte, D., Kirsten, M., Louw, C., Ngwira, B., Victor, J. and G. C., P. H., Cheuvart, B. B., Han, H. H., Neuzil, K. M., *Effect of human rotavirus vaccine on severe diarrhea in African infants*. New England Journal of Medicine, 2010. **362**: p. 289-98.
15. Zaman, K., Dang, D. A., Victor, J. C., Shin, S., Yunus, M., Dallas, M. J., Podder, G., Vu, D. T., T.P. Le, Luby, S. P., Le, H. T., Coia, M. L., Lewis, K., Rivers, S. B., Sack, D. A., Schodel, F., and A.D. Steele, Neuzil, K. M., Ciarlet, M., *Efficacy of pentavalent rotavirus vaccine against severe rotavirus gastroenteritis in infants in developing countries in Asia: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial*. Lancet, 2010. **376**: p. 615-23.
16. Benhafid, M., et al., *Diversity of rotavirus strains circulating in children under 5 years of age admitted to hospital for acute gastroenteritis in Morocco, June 2006 to May 2009*. J Med Virol, 2013. **85**(2): p. 354-62.
17. Benhafid, M., et al., *Monitoring of rotavirus vaccination in Morocco: Establishing the baseline burden of rotavirus disease*. Vaccine, 2012. **30**: p. 6515-20.
18. Benhafid, M., et al., *Epidemiology of rotavirus gastroenteritis among children <5 years of age in Morocco during 1 year of sentinel hospital surveillance, June 2006-May 2007*. J Infect Dis, 2009. **1**(200): p. 605048.
19. Benhafid, M., et al., *Effect of monovalent rotavirus vaccine on rotavirus disease burden and circulating rotavirus strains among children in Morocco*. J Med Virol, 2015. **87**(6): p. 944-53.
20. Estes, M.K., Greenberg, H.B., *Rotaviruses*, P.M. Knipe, Howley, D.M. (Eds.), Fields Virology, sixth ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Editor 2013. p. 1347-1401.
21. Matthijnssens, J., et al., *Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG)*. Arch Virol, 2011. **156**(8): p. 1397-413.
22. Trojnar, E., et al., *Identification of an avian group A rotavirus containing a novel VP4 gene with a close relationship to those of mammalian rotaviruses*. J Gen Virol, 2013. **94**(Pt 1): p. 136-42.
23. Ghosh, S., et al., *Full genomic analysis of a G8P[1] rotavirus strain isolated from an asymptomatic infant in Kenya provides evidence for an artiodactyl-to-human interspecies transmission event*. J Med Virol, 2011. **83**(2): p. 367-76.
24. Matthijnssens, J., et al., *Recommendations for the classification of group A rotaviruses using all 11 genomic RNA segments*. Arch Virol, 2008. **153**(8): p. 1621-9.
25. Matthijnssens, J., et al., *Full genome-based classification of rotaviruses reveals a common origin between human Wa-Like and porcine rotavirus strains and human DS-1-like and bovine rotavirus strains*. J Virol, 2008. **82**(7): p. 3204-19.

26. Banyai, K., et al., *Systematic review of regional and temporal trends in global rotavirus strain diversity in the pre rotavirus vaccine era: insights for understanding the impact of rotavirus vaccination programs*. *Vaccine*, 2012. **27**(30): p. 111.
27. Santos, N. and Y. Hoshino, *Global distribution of rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine*. *Rev Med Virol*, 2005. **15**(1): p. 29-56.
28. Gentsch, J.R., et al., *Serotype diversity and reassortment between human and animal rotavirus strains: implications for rotavirus vaccine programs*. *J Infect Dis*, 2005. **1**(192): p. 431499.
29. Matthijnssens, J., et al., *Phylogenetic analyses of rotavirus genotypes G9 and G12 underscore their potential for swift global spread*. *Mol Biol Evol*, 2010. **27**(10): p. 2431-6.
30. Matthijnssens, J., et al., *Are human P[14] rotavirus strains the result of interspecies transmissions from sheep or other ungulates that belong to the mammalian order Artiodactyla?* *J Virol*, 2009. **83**(7): p. 2917-29.
31. Rahman, M., Matthijnssens, J., Yang, X., Delbeke, T., Arijs, I., Taniguchi, K., Iturriza-Gómara, M., Iftekharuddin, N., Azim, T., Van Ranst, M., *Evolutionary history and global spread of the emerging G12 human rotaviruses*. *Journal of Virology*, 2007. **81**: p. 2382-2390.
32. Cunliffe, N.A., Rogerson, S., Dove, W., Thindwa, B. D. M., Greensill, J., Kirkwood, C. D., Broadhead, R. L. and Hart, C. A., *Detection and Characterization of Rotaviruses in Hospitalized Neonates in Blantyre, Malawi*. *Journal of Clinical Microbiology*, 2002. **40**: p. 1534-1537.
33. Cunliffe, N.A., Bagrey, M. N., Winifred, D., Nakagomi, O., Nakagomi, T., Perez, A., Hart, C.A., Peter, N. K. and Charles, C. V., *Serotype G12 rotaviruses, Lilongwe, Malawi*. *Emerging Infectious Diseases*, 2009. **15**: p. 87-90.
34. Enweronu-Laryea, C.C., Sagoe, K.W., Damanka, S., Lartey, B., Armah, G.E., *Rotavirus genotypes associated with childhood severe acute diarrhoea in southern Ghana: a cross-sectional study*. *Journal of Virology*, 2013. **10**: p. 287.
35. Mwenda, J.M., Ntoto, K.M., Abebe, A., Enweronu-Laryea, C., Amina, I., Mchomvu, J., Kisakye, A., Mpabalwani, E.M., Pazvakavambwa, I., Armah, G.E., Seheri, L.M., Kiulia, N.M., Page, N., Widdowson, M.A., Steele, A.D., *Burden and epidemiology of rotavirus diarrhea in selected African countries: preliminary results from the African Rotavirus Surveillance Network*. *Journal of Infectious Diseases*, 2010. **202**: p. S5-S11.
36. Ndze, V.N., Papp, H., Achidi, E.A., Gonsu, K.H., László, B., Farkas, S., Kisfali, P., Melegh, B., Esona, M.D., Bowen, M.D., Bányai, K., Gentsch, J.R., Odama, A.M., *One year survey of human rotavirus strains suggests the emergence of genotype G12 in Cameroon*. *Journal of Medical Virology*, 2013. **85**: p. 1485-1490.

37. Oluwatoyin, J.M., Adeyemi, A.O., Famurewa, O., Svensson, L., Nordgren, J., *Molecular epidemiology of rotavirus and norovirus in Ile-Ife, Nigeria: high prevalence of G12P[8] rotavirus strains and detection of a rare norovirus genotype.* Journal of Medical Virology, 2012. **84**: p. 1489-1496.
38. Page, A.L., Jusot, V., Mamaty, A.A., Adamou, L., Kaplon, J., Pothier, P., Djibo, A., Manzo, M.L., Toure, B., Langendorf, C., Collard, J.M., Grais, R.F., *Rotavirus surveillance in urban and rural areas of Niger, April 2010-March 2012.* Emerging Infectious Diseases, 2014. **20**: p. 573-580.
39. Page, N.A., de Beer, M.C., Seheri, L.M., Dewar, J.B., Steele, A.D., *The detection and molecular characterization of human G12 genotypes in South Africa.* Journal of Medical Virology, 2009. **81**: p. 106-113.
40. Pukuta, E.S., Esona, M.D., Nkongolo, A., Seheri, M., Makasi, M., Nyembwe, M., Mondonge, V., Dahl, B.A., Mphahlele, M.J., Cavallaro, K., Gentsch, J., Bowen, M.D., Waku-Kouomou, D., Muyembe, J.J., SURVAC Working Group, *Molecular surveillance of rotavirus infection in the Democratic Republic of the Congo August 2009 to June 2012.* Journal of Pediatric Infectious Diseases, 2014. **33**: p. 355-359.
41. Seheri, M., Namarude, L., Peenze, I., Netshifhefhe, L., Nyaga, M.M., Ngobeni, H.G., Maphalala, G., Maake, L.L., Steele, A.D., Mwenda, J.M., Mphahlele, J.M., *Update of rotavirus strains circulating in Africa from 2007 through 2011.* Journal of Pediatric Infectious Diseases, 2014. **33**: p. S76-S84.
42. Nakagomi, T., et al., *Molecular characterization of rotavirus strains detected during a clinical trial of a human rotavirus vaccine in Blantyre, Malawi.* Vaccine, 2012. **30**: p. A140-A151.
43. Hasegawa, A., Inouye, S., Matsuno, S., Yamaoka, K., Eko, R. and Suharyono, W., *Isolation of human rotaviruses with a distinct RNA electrophoretic pattern from Indonesia.* Microbiology and Immunology, 1984. **28**: p. 719-722.
44. Esona, M.D., et al., *Genomic characterization of human rotavirus G8 strains from the African rotavirus network: relationship to animal rotaviruses.* J Med Virol, 2009. **81**(5): p. 937-51.
45. Midgley, S.E., et al., *Suspected zoonotic transmission of rotavirus group A in Danish adults.* Epidemiology and Infection, 2012. **140**(6): p. 1013-1017.
46. Adah, M.I., Nagashima, S., Wakuda, M. and Taniguchi, K., *Close relationship between G8-serotype bovine and human rotaviruses isolated in Nigeria.* Journal of Clinical Microbiology, 2003. **41**: p. 3945-3950.
47. Cunliffe, N.A., Gentsch, J.R., Kirkwood, C.D., Gondwe, J.S., Dove, W., et al., *Molecular and serologic characterization of novel serotype G8 human rotavirus strains detected in Blantyre, Malawi.* Virology, 2000. **274**: p. 309-320.

48. Jere, K.C., Mlera, L., O'Neill, H.G., Peenze, I. and van Dijk, A.A., *Whole genome sequence analysis of three African bovine rotaviruses reveal that they emerged through multiple reassortment events between rotaviruses from different mammalian species*. *Veterinary Microbiology* 2012. **159**: p. 245–250.
49. Banyai, K., et al., *Genetic heterogeneity in human G6P[14] rotavirus strains detected in Hungary suggests independent zoonotic origin* 2009: *J Infect.* 2009 Sep;59(3):213-5. doi: 10.1016/j.jinf.2009.06.009. Epub 2009 Jun 24.
50. Banyai, K., et al., *Whole genome sequencing and phylogenetic analysis of a zoonotic human G8P[14] rotavirus strain*. *Infect Genet Evol*, 2010. **10**(7): p. 1140-4.
51. Esona, M., 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*. Vol. 202 Suppl. 2010. S49-54.
52. Nokes DJ, P.I., Netshifhefhe L, Abwao J, De Beer MC, Seheri LM, Williams T.N, Page N, Steele, AD., *Rotavirus genetic diversity, disease association and temporal change in hospitalized rural Kenyan children*. *J Infect Dis*, 2010. **202**: p. S180–S186.
53. Nyangao, J., Page, N., Esona, M., Peenze, I., Gatheru, Z., Tukei, P. and Steele, A. D., *Characterization of Human Rotavirus Strains from Children with Diarrhea in Nairobi and Kisumu, Kenya, between 2000 and 2002*. *The Journal of Infectious Diseases*, 2010. **202**: p. S187-S192.
54. Pietsch, C., et al., *Molecular Characteristics of German G8P[4] Rotavirus Strain GER1H-09 Suggest that a Genotyping and Subclassification Update Is Required for G8*. *Journal of Clinical Microbiology*, 2009. **47**(11): p. 3569-3576.
55. Estes, M.K.a.K., A, *Rotaviruses*, ed. E. In *Fields Virology*, Knipe, D.M., Howley, P.M., Griffin, D.E., Lamb, R.A., Martin, M.A., Roizman, B., Straus, S.E., 5th ed. Vol. Kluwer Health/Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia, pp: 1917-1974. 2007.
56. Adams, W.R. and L.M. Kraft, *Epizootic diarrhea of infant mice: identification of the etiologic agent*. *Science*, 1963. **141**(3578): p. 359-60.
57. Malherbe, H. and R. Harwin, *The cytopathic effects of vervet monkey viruses*. *S Afr Med J*, 1963. **37**: p. 407-11.
58. Bishop, R.F., et al., *Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis*. *Lancet*, 1973. **2**(7841): p. 1281-3.
59. Bishop, R.F., et al., *Detection of a new virus by electron microscopy of faecal extracts from children with acute gastroenteritis*. *Lancet*, 1974. **1**(7849): p. 149-51.
60. Mebus, C.A., et al., *Further studies on neonatal calf diarrhea virus*. *Proc Annu Meet U S Anim Health Assoc*, 1969. **73**: p. 97-9.

61. Flewett, T.H., A.S. Bryden, and H. Davies, *Letter: Virus particles in gastroenteritis*. Lancet, 1973. **2**(7844): p. 92760-8.
62. Ansari, S.A., et al., *Rotavirus survival on human hands and transfer of infectious virus to animate and nonporous inanimate surfaces*. Journal of Clinical Microbiology, 1988. **26**(8): p. 1513-1518.
63. Gaggero, A., et al., *Nosocomial transmission of rotavirus from patients admitted with diarrhea*. Journal of Clinical Microbiology, 1992. **30**(12): p. 3294-3297.
64. Rzezutka, A. and N. Cook, *Survival of human enteric viruses in the environment and food*. FEMS Microbiol Rev, 2004. **28**(4): p. 441-53.
65. Nicand, E., Tayssou, R. & Buisson, Y., *Le risque fécal viral en 1998*. Virology, 1998(2): p. 103-116.
66. Ansari, S.A., V.S. Springthorpe, and S.A. Sattar, *Survival and vehicular spread of human rotaviruses: possible relation to seasonality of outbreaks*. Rev Infect Dis, 1991. **13**(3): p. 448-61.
67. Berman, D. and J.C. Hoff, *Inactivation of simian rotavirus SA11 by chlorine, chlorine dioxide, and monochloramine*. Applied and environmental microbiology, 1984. **48**(2): p. 317-323.
68. Gazal, S., et al., *Ovine rotaviruses*. Open Veterinary Journal, 2011. **1**: p. 50-54.
69. Flewett, T.H., et al., *Relation between viruses from acute gastroenteritis of children and newborn calves*. Lancet, 1974. **2**(7872): p. 61-3.
70. Jayaram, H., M.K. Estes, and B.V. Prasad, *Emerging themes in rotavirus cell entry, genome organization, transcription and replication*. Virus Res, 2004. **101**(1): p. 67-81.
71. McClain, B., et al., *X-ray crystal structure of the rotavirus inner capsid particle at 3.8 Å resolution*. J Mol Biol, 2010. **397**(2): p. 587-99.
72. Trask, S.D., S.M. McDonald, and J.T. Patton, *Structural insights into the coupling of virion assembly and rotavirus replication*. Nature reviews. Microbiology, 2012. **10**(3): p. 165-177.
73. Trask, S.D., K.M. Ogden, and J.T. Patton, *Interactions among capsid proteins orchestrate rotavirus particle functions*. Current opinion in virology, 2012. **2**(4): p. 373-379.
74. Estrozi, L.F., et al., *Location of the dsRNA-dependent polymerase, VP1, in rotavirus particles*. Journal of molecular biology, 2013. **425**(1): p. 124-132.
75. Periz, J., et al., *Rotavirus mRNAs are released by transcript-specific channels in the double-layered viral capsid*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(29): p. 12042-7.

Références Bibliographiques

76. Dormitzer PR, N.E., Prasad BVV, Harrison SC, *Structural rearrangements in the membrane penetration protein of a non-enveloped virus*. Nature, 2004(430): p. 1053-1058.
77. Dormitzer, P.R., et al., *Specificity and affinity of sialic acid binding by the rhesus rotavirus VP8* core*. J Virol, 2002. **76**(20): p. 10512-7.
78. Yeager, M., et al., *Three-dimensional structure of rhesus rotavirus by cryoelectron microscopy and image reconstruction*. The Journal of cell biology, 1990. **110**(6): p. 2133-2144.
79. Crawford, S.E., et al., *Characterization of virus-like particles produced by the expression of rotavirus capsid proteins in insect cells*. J Virol, 1994. **68**(9): p. 5945-52.
80. Lawton, J.A., M.K. Estes, and B.V.V. Prasad, *Three-dimensional visualization of mRNA release from actively transcribing rotavirus particles*. Nature Structural Biology, 1997. **4**(2): p. 118-121.
81. Li, Z., et al., *Rotavirus architecture at subnanometer resolution*. J Virol, 2009. **83**(4): p. 1754-66.
82. Aoki, S.T., et al., *Structure of rotavirus outer-layer protein VP7 bound with a neutralizing Fab*. Science, 2009. **324**(5933): p. 1444-7.
83. Mathieu, M., et al., *Atomic structure of the major capsid protein of rotavirus: implications for the architecture of the virion*. The EMBO journal, 2001. **20**(7): p. 1485-1497.
84. Settembre, E.C., et al., *Atomic model of an infectious rotavirus particle*. Embo J, 2011. **30**(2): p. 408-16.
85. Liu, M., P.A. Offit, and M.K. Estes, *Identification of the simian rotavirus SA11 genome segment 3 product*. Virology, 1988. **163**(1): p. 26-32.
86. Patton, J.T., *Rotavirus VP1 alone specifically binds to the 3' end of viral mRNA, but the interaction is not sufficient to initiate minus-strand synthesis*. Journal of Virology, 1996. **70**(11): p. 7940-7947.
87. Poch, O., et al., *Identification of four conserved motifs among the RNA-dependent polymerase encoding elements*. Embo J, 1989. **8**(12): p. 3867-74.
88. Eiden, J.J. and C. Hirshon, *Sequence analysis of group B rotavirus gene 1 and definition of a rotavirus-specific sequence motif within the RNA polymerase gene*. Virology, 1993. **192**(1): p. 154-60.
89. Conner, M.E., M.K. Estes, and D.Y. Graham, *Rabbit model of rotavirus infection*. Journal of Virology, 1988. **62**(5): p. 1625-1633.

Références Bibliographiques

90. Kumar, A., A. Charpilienne, and J. Cohen, *Nucleotide sequence of the gene encoding for the RNA binding protein (VP2) of RF bovine rotavirus*. *Nucleic acids research*, 1989. **17**(5): p. 2126-2126.
91. Estes, M.K. and J. Cohen, *Rotavirus gene structure and function*. *Microbiological reviews*, 1989. **53**(4): p. 410-449.
92. Patton, J.T., et al., *Rotavirus RNA polymerase requires the core shell protein to synthesize the double-stranded RNA genome*. *Journal of Virology*, 1997. **71**(12): p. 9618.
93. Mattion N, C.J., Estes M., *The rotavirus proteins*. In: Kapikian AZ,, ed. e.V.I.o.t.G. Tract1994, New York: : Marcel Dekker .
94. Taniguchi, K., T. Urasawa, and S. Urasawa, *Reactivity patterns to human rotavirus strains of a monoclonal antibody against VP2, a component of the inner capsid of rotavirus*. *Archives of Virology*, 1986. **87**(1): p. 135-141.
95. Liu, M., N.M. Mattion, and M.K. Estes, *Rotavirus VP3 expressed in insect cells possesses guanylyltransferase activity*. *Virology*, 1992. **188**(1): p. 77-84.
96. Pizarro, J.M., et al., *Effect of nucleotide analogues on rotavirus transcription and replication*. *Virology*, 1991. **184**(2): p. 768-772.
97. Chen, D., et al., *Rotavirus open cores catalyze 5'-capping and methylation of exogenous RNA: evidence that VP3 is a methyltransferase*. *Virology*, 1999. **265**(1): p. 120-30.
98. Ludert, J.E., Feng, N., Yu, J. H., Broome, R. L., Hoshino, Y. & Greenberg, H. B. , *Genetic mapping indicates that VP4 is the rotavirus cell attachment protein in vitro and in vivo*. *Journal of Virology*, 1996. **70**: p. 487–493.
99. A.R. Kalica, J.F., H.B. Greenberg, *Identification of the rotaviral gene that codes for hemagglutination and protease-enhanced plaque formation*. *Virology*, 1983. **125**: p. 194-205.
100. Hoshino Y, S.M., Midthun K, et al., *Independent segregation of two antigenic specificities (VP3 and VP7) involved in neutralization of rotavirus infectivity*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1985. **82**: p. 8701-8704.
101. Kaljot, K.T., et al., *Infectious rotavirus enters cells by direct cell membrane penetration, not by endocytosis*. *Journal of Virology*, 1988. **62**(4): p. 1136-1144.
102. Estes, M.K., D.Y. Graham, and B.B. Mason, *Proteolytic enhancement of rotavirus infectivity: molecular mechanisms*. *Journal of Virology*, 1981. **39**(3): p. 879-888.
103. Fiore, L., H.B. Greenberg, and E.R. Mackow, *The VP8 fragment of VP4 is the rhesus rotavirus hemagglutinin*. *Virology*, 1991. **181**(2): p. 553-63.

Références Bibliographiques

104. Denisova, E., et al., *Rotavirus capsid protein VP5* permeabilizes membranes*. Journal of Virology, 1999. **73**(4): p. 3147-3153.
105. Lopez, S., et al., *Primary structure of the cleavage site associated with trypsin enhancement of rotavirus SA11 infectivity*. Virology, 1985. **144**(1): p. 11-19.
106. Gorziglia, M., et al., *Conservation of amino acid sequence of VP8 and cleavage region of 84-kDa outer capsid protein among rotaviruses recovered from asymptomatic neonatal infection*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. **83**(18): p. 7039-43.
107. Gorziglia, M., K. Green, K. Nishikawa, K. Taniguchi, R. Jones, A. Z. Kapikian, and R. M. Chanock. , *Sequence of the fourth gene of human rotaviruses recovered from asymptomatic or symptomatic infections*. J. Virol., 1988. **62**: p. 2978-2984.
108. Mackow, E.R., et al., *The rhesus rotavirus gene encoding protein VP3: location of amino acids involved in homologous and heterologous rotavirus neutralization and identification of a putative fusion region*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1988. **85**(3): p. 645.
109. Greenberg, H.B., et al., *Gene Coding Assignments for growth Restriction, Neutralization and Subgroup Specificities of the W and DS-1 Strains of Human Rotavirus*. Journal of General Virology, 1983. **64**(2): p. 313-320.
110. Kalica, A.R., J. Flores, and H.B. Greenberg, *Identification of the rotaviral gene that codes for hemagglutination and protease-enhanced plaque formation*. Virology, 1983. **125**(1): p. 194-205.
111. Offit, P.A., et al., *Molecular basis of rotavirus virulence: role of gene segment 4*. J Virol, 1986. **57**(1): p. 46-9.
112. Flores, J., et al., *Conservation of the fourth gene among rotaviruses recovered from asymptomatic newborn infants and its possible role in attenuation*. Journal of Virology, 1986. **60**(3): p. 972-979.
113. Bernstein, D.I., et al., *Evaluation of rhesus rotavirus monovalent and tetravalent reassortant vaccines in US children*. US Rotavirus Vaccine Efficacy Group. Jama, 1995. **273**(15): p. 1191-6.
114. Hoshino, Y., et al., *Infection immunity of piglets to either VP3 or VP7 outer capsid protein confers resistance to challenge with a virulent rotavirus bearing the corresponding antigen*. Journal of Virology, 1988. **62**(3): p. 744-748.
115. Rennels, M.B., et al., *Safety and efficacy of high-dose rhesus-human reassortant rotavirus vaccines--report of the National Multicenter Trial*. United States Rotavirus Vaccine Efficacy Group. Pediatrics, 1996. **97**(1): p. 7-13.
116. Santosham, M., et al., *Oral rehydration therapy for diarrhea: an example of reverse transfer of technology*. Pediatrics. 1997 Nov;100(5):E10. doi: 10.1542/peds.100.5.e10.

Références Bibliographiques

117. Mattion, N.M. and M.K. Estes, *Sequence of a rotavirus gene 4 associated with unique biologic properties*. Arch Virol, 1991. **120**(1-2): p. 109-13.
118. Prasad, B.V., et al., *Three-dimensional structure of rotavirus*. J Mol Biol, 1988. **199**(2): p. 269-75.
119. Kohli, E., et al., *Localization of group-specific epitopes on the major capsid protein of group A rotavirus*. J Gen Virol, 1992. **73**(Pt 4): p. 907-14.
120. HB, S.R.a.G., *Rotavirus (Reoviridae)*, in *Encyclopedia of Virology*. 1999, Granoff A, RG Webster. p. 1576-1592.
121. Holmes, I.H., *Rotaviruses*, in *The Reoviridae*, W.K. Joklik, Editor 1983, Springer US: Boston, MA. p. 359-423.
122. Kapikian AZ, H.Y., Chanock RM,, *Rotaviruses*. 4th ed. ed. Fields Virology, ed. K.D.M. Fields BN, Howley P.M., 2001, 7 Wilkins Philadelphia: Lippincott Williams.
123. Sabara, M., et al., *Preliminary characterization of an epitope involved in neutralization and cell attachment that is located on the major bovine rotavirus glycoprotein*. Journal of Virology, 1985. **53**(1): p. 58-66.
124. Fukuhara, N., et al., *Role of VP3 in human rotavirus internalization after target cell attachment via VP7*. Journal of Virology, 1988. **62**(7): p. 2209-2218.
125. Solberg, O.D., et al., *Characterization of novel VP7, VP4, and VP6 genotypes of a previously untypeable group A rotavirus*. Virology, 2009. **385**(1): p. 58-67.
126. Ericson, B.L., et al., *Identification, synthesis, and modifications of simian rotavirus SA11 polypeptides in infected cells*. Journal of Virology, 1982. **42**(3): p. 825-839.
127. Mitchell, D.B. and G.W. Both, *Conservation of a potential metal binding motif despite extensive sequence diversity in the rotavirus nonstructural protein NS53*. Virology, 1990. **174**(2): p. 618-21.
128. Hua, J., X. Chen, and J.T. Patton, *Deletion mapping of the rotavirus metalloprotein NS53 (NSP1): the conserved cysteine-rich region is essential for virus-specific RNA binding*. Journal of Virology, 1994. **68**(6): p. 3990-4000.
129. Piña-Vázquez, C., et al., *Post-translational regulation of rotavirus protein NSP1 expression in mammalian cells*. Archives of Virology, 2007. **152**(2): p. 345-368.
130. Graff, J.W., et al., *Interferon regulatory factor 3 is a cellular partner of rotavirus NSP1*. Journal of Virology, 2002. **76**(18): p. 9545-9550.
131. Barro, M. and J. Patton, *Rotavirus NSP1 Inhibits Expression of Type I Interferon by Antagonizing the Function of Interferon Regulatory Factors IRF3, IRF5, and IRF7*. Journal of Virology, 2007. **81**: p. 4473-81.

132. Hundley, F., et al., *Genome rearrangements of bovine rotavirus after serial passage at high multiplicity of Infection*. *Virology*, 1985. **143**(1): p. 88-103.
133. Patton, J., et al., *Effect of Intragenic Rearrangement and Changes in the 3' Consensus Sequence on NSP1 Expression and Rotavirus Replication*. *Journal of Virology*, 2001. **75**: p. 2076-86.
134. Eichwald, C., J. Rodriguez, and O. Burrone, *Characterization of rotavirus NSP2/NSP5 interactions and the dynamics of viroplasm formation*. *The Journal of general virology*, 2004. **85**: p. 625-34.
135. Fabbretti, E., et al., *Two non-structural rotavirus proteins, NSP2 and NSP5, form viroplasm-like structures in vivo*. *The Journal of general virology*, 1999. **80 (Pt 2)**: p. 333-9.
136. Taraporewala, Z., D. Chen, and J.T. Patton, *Multimers formed by the rotavirus nonstructural protein NSP2 bind to RNA and have nucleoside triphosphatase activity*. *J Virol*, 1999. **73**(12): p. 9934-43.
137. Taraporewala, Z.F. and J.T. Patton, *Nonstructural proteins involved in genome packaging and replication of rotaviruses and other members of the Reoviridae*. *Virus research*, 2004. **101**(1): p. 57-66.
138. Poncet, D., C. Aponte, and J. Cohen, *Rotavirus protein NSP3 (NS34) is bound to the 3' end consensus sequence of viral mRNAs in infected cells*. *J Virol*, 1993. **67**(6): p. 3159-65.
139. Poncet, D., S. Laurent, and J. Cohen, *Four nucleotides are the minimal requirement for RNA recognition by rotavirus non-structural protein NSP3*. *The EMBO journal*, 1994. **13**(17): p. 4165-4173.
140. Piron, M., et al., *Rotavirus RNA-binding protein NSP3 interacts with eIF4GI and evicts the poly(A) binding protein from eIF4F*. *The EMBO journal*, 1998. **17**(19): p. 5811-5821.
141. Piron, M., et al., *Identification of the RNA-binding, dimerization, and eIF4GI-binding domains of rotavirus nonstructural protein NSP3*. *Journal of Virology*, 1999. **73**(7): p. 5411-5421.
142. Vitour, D., et al., *RoXaN, a Novel Cellular Protein Containing TPR, LD, and Zinc Finger Motifs, Forms a Ternary Complex with Eukaryotic Initiation Factor 4G and Rotavirus NSP3*. *Journal of Virology*, 2004. **78**: p. 3851-62.
143. Kang, H.J., et al., *Differentially expressed proteins in gastrointestinal stromal tumors with KIT and PDGFRA mutations*. *PROTEOMICS*, 2006. **6**(4): p. 1151-1157.
144. Ericson, B.L., et al., *Two types of glycoprotein precursors are produced by the simian rotavirus SA11*. *Virology*, 1983. **127**(2): p. 320-32.

145. Au, K.S., et al., *Receptor activity of rotavirus nonstructural glycoprotein NS28*. Journal of Virology, 1989. **63**(11): p. 4553-4562.
146. Meyer, J.C., C.C. Bergmann, and A.R. Bellamy, *Interaction of rotavirus cores with the nonstructural glycoprotein NS28*. Virology, 1989. **171**(1): p. 98-107.
147. Taylor, J.A., et al., *The RER-localized rotavirus intracellular receptor: a truncated purified soluble form is multivalent and binds virus particles*. Virology, 1993. **194**(2): p. 807-14.
148. Poruchynsky, M.S., D.R. Maass, and P.H. Atkinson, *Calcium depletion blocks the maturation of rotavirus by altering the oligomerization of virus-encoded proteins in the ER*. Journal of Cell Biology, 1991. **114**(4): p. 651-656.
149. López, T., et al., *Silencing the morphogenesis of rotavirus*. Journal of Virology, 2005. **79**(1): p. 184-192.
150. Silvestri, L.S., et al., *Rotavirus glycoprotein NSP4 is a modulator of viral transcription in the infected cell*. Journal of Virology, 2005. **79**(24): p. 15165-15174.
151. Berkova, Z., et al., *Rotavirus NSP4 Induces a Novel Vesicular Compartment Regulated by Calcium and Associated with Viropasms*. Journal of Virology, 2006. **80**: p. 6061-71.
152. Dong, Y., et al., *The rotavirus enterotoxin NSP4 mobilizes intracellular calcium in human intestinal cells by stimulating phospholipase C-mediated inositol 1,4,5-trisphosphate production*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1997. **94**(8): p. 3960-3965.
153. Afrikanova, I., et al., *Phosphorylation Generates Different Forms of Rotavirus NSP5*. The Journal of general virology, 1996. **77 (Pt 9)**: p. 2059-65.
154. Sen, A., D. Agresti, and E. Mackow, *Hyperphosphorylation of the Rotavirus NSP5 Protein Is Independent of Serine 67 or NSP2, and the Intrinsic Insolubility of NSP5 Is Regulated by Cellular Phosphatases*. Journal of Virology, 2006. **80**: p. 1807-16.
155. Sotelo, P.H., et al., *Analysis of rotavirus non-structural protein NSP5 by mass spectrometry reveals a complex phosphorylation pattern*. Virus Res, 2010. **149**(1): p. 104-8.
156. Contin, R., et al., *Rotavirus NSP5 orchestrates recruitment of viroplasmic proteins*. The Journal of general virology, 2010. **91**: p. 1782-93.
157. Sen, A., N. Sen, and E. Mackow, *The Formation of Viroplasm-Like Structures by the Rotavirus NSP5 Protein Is Calcium Regulated and Directed by a C-Terminal Helical Domain*. Journal of Virology, 2007. **81**: p. 11758-67.
158. Campagna, M., et al., *RNA interference of rotavirus segment 11 mRNA reveals the essential role of NSP5 in the virus replicative cycle*. The Journal of general virology, 2005. **86**: p. 1481-7.

159. López, T., et al., *Reduced expression of the rotavirus NSP5 gene has a pleiotropic effect on virus replication*. The Journal of general virology, 2005. **86**: p. 1609-17.
160. Bar-Magen, T., E. Spencer, and J.T. Patton, *An ATPase activity associated with the rotavirus phosphoprotein NSP5*. Virology, 2007. **369**(2): p. 389-399.
161. Mitchell, D.B. and G.W. Both, *Simian rotavirus SA11 segment 11 contains overlapping reading frames*. Nucleic acids research, 1988. **16**(13): p. 6244-6244.
162. Petrie, B.L., et al., *Ultrastructural localization of rotavirus antigens using colloidal gold*. Virus research, 1984. **1**(2): p. 133-152.
163. Torres-Vega, M., et al., *The C-terminal domain of rotavirus NSP5 is essential for its multimerization, hyperphosphorylation and interaction with NSP6*. The Journal of general virology, 2000. **81**: p. 821-30.
164. Desselberger, U., *Rotaviruses*. Virus research, 2014. **190**.
165. Sadiq, A., et al., *Rotavirus: Genetics, pathogenesis and vaccine advances*. Reviews in Medical Virology, 2018. **28**: p. e2003.
166. Kaljot, K.T., et al., *Infectious rotavirus enters cells by direct cell membrane penetration, not by endocytosis*. Journal of Virology; (USA), 1988: p. Medium: X; Size: Pages: 1136-1144.
167. Ruiz, M., et al., *Cell lines susceptible to infection are permeabilized by cleaved and solubilized outer layer proteins of rotavirus*. The Journal of general virology, 1997. **78 (Pt 11)**: p. 2883-93.
168. Arias, C.F., et al., *Trypsin activation pathway of rotavirus infectivity*. Journal of Virology, 1996. **70**(9): p. 5832-5839.
169. Crawford, S.E., et al., *Trypsin cleavage stabilizes the rotavirus VP4 spike*. J Virol, 2001. **75**(13): p. 6052-61.
170. Yeager, M., et al., *Three-dimensional structure of the rotavirus haemagglutinin VP4 by cryo-electron microscopy and difference map analysis*. Embo J, 1994. **13**(5): p. 1011-8.
171. Dormitzer, P.R., et al., *The rhesus rotavirus VP4 sialic acid binding domain has a galectin fold with a novel carbohydrate binding site*. Embo J, 2002. **21**(5): p. 885-97.
172. Monnier, N., et al., *High-Resolution Molecular and Antigen Structure of the VP8* Core of a Sialic Acid-Independent Human Rotavirus Strain*. Journal of Virology, 2006. **80**: p. 1513-23.
173. Liu, Y., et al., *Rotavirus VP8*: phylogeny, host range, and interaction with histo-blood group antigens*. J Virol, 2012. **86**(18): p. 9899-910.

174. Ramani, S., et al., *The VP8(star) Domain of Neonatal Rotavirus Strain G10P[11] Binds to Type II Precursor Glycans*. Journal of Virology, 2013. **87**.
175. Hu, L., et al., *Cell attachment protein VP8* of a human rotavirus specifically interacts with A-type histo-blood group antigen*. Nature, 2012. **485**(7397): p. 256-9.
176. Tan, M. and X. Jiang, *Histo-blood group antigens: a common niche for norovirus and rotavirus*. Expert Rev Mol Med, 2014. **10**(16): p. 2.
177. Coulson, B.S., S.L. Londrigan, and D.J. Lee, *Rotavirus contains integrin ligand sequences and a disintegrin-like domain that are implicated in virus entry into cells*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1997. **94**(10): p. 5389-5394.
178. Graham, K.L., et al., *Integrin-using rotaviruses bind alpha2beta1 integrin alpha2 I domain via VP4 DGE sequence and recognize alphaXbeta2 and alphaVbeta3 by using VP7 during cell entry*. J Virol, 2003. **77**(18): p. 9969-78.
179. Guerrero, C.A., et al., *Heat shock cognate protein 70 is involved in rotavirus cell entry*. Journal of Virology, 2002. **76**(8): p. 4096-4102.
180. Guerrero, C.A., et al., *Integrin alpha(v)beta(3) mediates rotavirus cell entry*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(26): p. 14644-9.
181. Hewish, M.J., Y. Takada, and B.S. Coulson, *Integrins alpha2beta1 and alpha4beta1 can mediate SA11 rotavirus attachment and entry into cells*. Journal of Virology, 2000. **74**(1): p. 228-236.
182. Zárate, S., et al., *Interaction of rotaviruses with Hsc70 during cell entry is mediated by VP5*. J Virol, 2003. **77**(13): p. 7254-60.
183. Zárate, S., et al., *The VP5 domain of VP4 can mediate attachment of rotaviruses to cells*. J Virol, 2000. **74**(2): p. 593-9.
184. Isa, P., C.F. Arias, and S. López, *Role of sialic acids in rotavirus infection*. Glycoconjugate journal, 2006. **23**(1-2): p. 27-37.
185. López, S. and C.F. Arias, *Multistep entry of rotavirus into cells: a Versaillesque dance*. Trends Microbiol, 2004. **12**(6): p. 271-8.
186. Haselhorst, T., et al., *Sialic acid dependence in rotavirus host cell invasion*. Nat Chem Biol, 2009. **5**(2): p. 91-3.
187. Zárate, S., et al., *VP7 mediates the interaction of rotaviruses with integrin alphavbeta3 through a novel integrin-binding site*. J Virol, 2004. **78**(20): p. 10839-47.
188. Fleming, F.E., et al., *Rotavirus-neutralizing antibodies inhibit virus binding to integrins alpha 2 beta 1 and alpha 4 beta 1*. Arch Virol, 2007. **152**(6): p. 1087-101.

189. Graham, K.L., et al., *Rotaviruses interact with alpha4beta7 and alpha4beta1 integrins by binding the same integrin domains as natural ligands*. J Gen Virol, 2005. **86**(Pt 12): p. 3397-3408.
190. Graham, K.L., et al., *Effects on rotavirus cell binding and infection of monomeric and polymeric peptides containing alpha2beta1 and alphaxbeta2 integrin ligand sequences*. Journal of Virology, 2004. **78**(21): p. 11786-11797.
191. Pérez-Vargas, J., et al., *The peptide-binding and ATPase domains of recombinant hsc70 are required to interact with rotavirus and reduce its infectivity*. Journal of Virology, 2006. **80**(7): p. 3322-3331.
192. Lopez, S. and C.F. Arias, *Early steps in rotavirus cell entry*. Curr Top Microbiol Immunol, 2006. **309**: p. 39-66.
193. Cuadras, M.A., C.F. Arias, and S. López, *Rotaviruses induce an early membrane permeabilization of MA104 cells and do not require a low intracellular Ca²⁺ concentration to initiate their replication cycle*. J Virol, 1997. **71**(12): p. 9065-74.
194. Nandi, P., A. Charpilienne, and J. Cohen, *Interaction of rotavirus particles with liposomes*. J Virol, 1992. **66**(6): p. 3363-7.
195. Ruiz, M.C., et al., *Rotavirus interaction with isolated membrane vesicles*. J Virol, 1994. **68**(6): p. 4009-16.
196. Falconer, M., et al., *Rotavirus-induced fusion from without in tissue culture cells*. Journal of Virology, 1995. **69**: p. 5582-91.
197. Skehel, J.J. and D.C. Wiley, *Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin*. Annu Rev Biochem, 2000. **69**: p. 531-69.
198. Pereira, F.B., et al., *Permeabilization and fusion of uncharged lipid vesicles induced by the HIV-1 fusion peptide adopting an extended conformation: dose and sequence effects*. Biophysical journal, 1997. **73**(4): p. 1977-1986.
199. Ludert, J.E., et al., *Penetration and Uncoating of Rotaviruses in Cultured Cells*. Intervirology, 1987. **27**(2): p. 95-101.
200. Quan, C.M. and F.W. Doane, *Ultrastructural Evidence for the Cellular Uptake of Rotavirus by Endocytosis*. Intervirology, 1983. **20**(4): p. 223-231.
201. Suzuki, H., et al., *Two modes of human rotavirus entry into MA 104 cells*. Archives of Virology, 1985. **85**(1): p. 25-34.
202. Bass, D.M., et al., *Dansylcadaverine and cytochalasin D enhance rotavirus infection of murine L cells*. Virology, 1995. **212**(2): p. 429-37.

203. Fukuhara, N., et al., *Evidence for endocytosis-independent infection by human rotavirus*. Archives of Virology, 1987. **97**(1): p. 93-99.
204. Sánchez-San Martín, C., et al., *Characterization of rotavirus cell entry*. J Virol, 2004. **78**(5): p. 2310-8.
205. Gutiérrez, M., et al., *Different rotavirus strains enter MA104 cells through different endocytic pathways: the role of clathrin-mediated endocytosis*. J Virol, 2010. **84**(18): p. 9161-9.
206. Cohen, J., et al., *Activation of rotavirus RNA polymerase by calcium chelation*. Archives of Virology, 1979. **60**(3): p. 177-186.
207. Silvestri, L.S., Z.F. Taraporewala, and J.T. Patton, *Rotavirus Replication: Plus-Sense Templates for Double-Stranded RNA Synthesis Are Made in Viroplasms*. Journal of Virology, 2004. **78**(14): p. 7763-7774.
208. Lu, X., et al., *Mechanism for coordinated RNA packaging and genome replication by rotavirus polymerase VP1*. Structure, 2008. **16**(11): p. 1678-88.
209. Spencer, E. and M.L. Arias, *In vitro transcription catalyzed by heat-treated human rotavirus*. Journal of Virology, 1981. **40**(1): p. 1-10.
210. Ayala-Breton, C., et al., *Analysis of the kinetics of transcription and replication of the rotavirus genome by RNA interference*. J Virol, 2009. **83**(17): p. 8819-31.
211. Stacy-Phipps, S. and J.T. Patton, *Synthesis of plus- and minus-strand RNA in rotavirus-infected cells*. J Virol, 1987. **61**(11): p. 3479-84.
212. Patton, J., et al., *Rotavirus Genome Replication and Morphogenesis: Role of the Viroplasm*. Current topics in microbiology and immunology, 2006. **309**: p. 169-87.
213. Harb, M., et al., *Nuclear localization of cytoplasmic poly(A)-binding protein upon rotavirus infection involves the interaction of NSP3 with eIF4G and RoXaN*. Journal of Virology, 2008. **82**(22): p. 11283-11293.
214. Padilla-Noriega, L., O. Paniagua, and S. Guzmán-León, *Rotavirus Protein NSP3 Shuts Off Host Cell Protein Synthesis*. Virology, 2002. **298**: p. 1-7.
215. Vende, P., et al., *Efficient translation of rotavirus mRNA requires simultaneous interaction of NSP3 with the eukaryotic translation initiation factor eIF4G and the mRNA 3' end*. J Virol, 2000. **74**(15): p. 7064-71.
216. Montero, H., C.F. Arias, and S. Lopez, *Rotavirus Nonstructural Protein NSP3 is not required for viral protein synthesis*. J Virol, 2006. **80**(18): p. 9031-8.

217. Johnson, M.A. and M.A. McCrae, *Molecular biology of rotaviruses. VIII. Quantitative analysis of regulation of gene expression during virus replication*. Journal of Virology, 1989. **63**(5): p. 2048-2055.
218. Rainsford, E.W. and M.A. McCrae, *Characterization of the NSP6 protein product of rotavirus gene 11*. Virus Res, 2007. **130**(1-2): p. 193-201.
219. Altenburg, B.C., D.Y. Graham, and M.K. Estes, *Ultrastructural study of rotavirus replication in cultured cells*. J Gen Virol, 1980. **46**(1): p. 75-85.
220. Kapahnke, R., et al., *The stiffness of dsRNA: hydrodynamic studies on fluorescence-labelled RNA segments of bovine rotavirus*. Nucleic acids research, 1986. **14**(8): p. 3215-3228.
221. Berois, M., et al., *Rotavirus Nonstructural Protein NSP5 Interacts with Major Core Protein VP2*. Journal of Virology, 2003. **77**: p. 1757-63.
222. Desselberger, U., et al., *Further characterisation of rotavirus cores: Ss(+)RNAs can be packaged in vitro but packaging lacks sequence specificity*. Virus research, 2013. **178**.
223. Gouet, P., et al., *The highly ordered double-stranded RNA genome of bluetongue virus revealed by crystallography*. Cell, 1999. **97**(4): p. 481-90.
224. Boudreaux, C.E., et al., *Rotavirus core shell subdomains involved in polymerase encapsidation into virus-like particles*. J Gen Virol, 2013. **94**(Pt 8): p. 1818-1826.
225. Zeng, C.Q., et al., *The N terminus of rotavirus VP2 is necessary for encapsidation of VP1 and VP3*. Journal of Virology, 1998. **72**(1): p. 201-208.
226. Zeng, C.Q., et al., *Characterization and replicase activity of double-layered and single-layered rotavirus-like particles expressed from baculovirus recombinants*. Journal of Virology, 1996. **70**(5): p. 2736-2742.
227. Trask, S.D. and P.R. Dormitzer, *Assembly of highly infectious rotavirus particles recoated with recombinant outer capsid proteins*. J Virol, 2006. **80**(22): p. 11293-304.
228. Taylor, J.A., J.A. O'Brien, and M. Yeager, *The cytoplasmic tail of NSP4, the endoplasmic reticulum-localized non-structural glycoprotein of rotavirus, contains distinct virus binding and coiled coil domains*. Embo J, 1996. **15**(17): p. 4469-76.
229. Delmas, O., et al., *Heterogeneity of Raft-type membrane microdomains associated with VP4, the rotavirus spike protein, in Caco-2 and MA 104 cells*. Journal of Virology, 2007. **81**(4): p. 1610-1618.
230. González, R.A., et al., *Relative localization of vioplasmic and endoplasmic reticulum-resident rotavirus proteins in infected cells*. Arch Virol, 2000. **145**(9): p. 1963-73.

231. Nejmeddine, M., et al., *Rotavirus spike protein VP4 is present at the plasma membrane and is associated with microtubules in infected cells*. J Virol, 2000. **74**(7): p. 3313-20.
232. McNulty, M.S., W.L. Curran, and J.B. McFerran, *The morphogenesis of a cytopathic bovine rotavirus in Madin-Darby bovine kidney cells*. The Journal of general virology, 1976. **33**(3): p. 503-508.
233. Gardet, A., et al., *Rotavirus spike protein VP4 binds to and remodels actin bundles of the epithelial brush border into actin bodies*. J Virol, 2006. **80**(8): p. 3947-56.
234. Chiarini, A., et al., *Rotavirus Persistence in Cell Cultures: Selection of Resistant Cells in the Presence of Foetal Calf Serum*. Journal of General Virology, 1983. **64**(5): p. 1101-1110.
235. Estes, M.K. and D.Y. Graham, *Establishment of rotavirus persistent infection in cell culture*. Archives of Virology, 1980. **65**(2): p. 187-192.
236. Mrukowicz, J.Z., et al., *Viruses and cells with mutations affecting viral entry are selected during persistent rotavirus infections of MA104 cells*. J Virol, 1998. **72**(4): p. 3088-97.
237. Riepenhoff-Talty, M., et al., *Persistent rotavirus infection in mice with severe combined immunodeficiency*. Journal of Virology, 1987. **61**(10): p. 3345-3348.
238. Spence, J.R., et al., *Directed differentiation of human pluripotent stem cells into intestinal tissue in vitro*. Nature, 2011. **470**(7332): p. 105-9.
239. Finkbeiner, S.R., et al., *Stem cell-derived human intestinal organoids as an infection model for rotaviruses*. mBio, 2012. **3**(4): p. 00159-12.
240. Viruses, I.C.O.T.f., Available at: <http://www.ictvonline.org/>.
241. Velázquez, F.R., et al., *Rotavirus infection in infants as protection against subsequent infections*. N Engl J Med, 1996. **335**(14): p. 1022-8.
242. Matthijssens, J., et al., *VP6-sequence-based cutoff values as a criterion for rotavirus species demarcation*. Arch Virol, 2012. **157**(6): p. 1177-82.
243. Estes, M.K., et al., *Pathogenesis of rotavirus gastroenteritis*. Novartis Found Symp, 2001. **238**: p. 82-96.
244. Bernstein, D.I., et al., *Protection from rotavirus reinfection: 2-year prospective study*. J Infect Dis, 1991. **164**(2): p. 277-83.
245. Greenberg, H.B., et al., *Production and preliminary characterization of monoclonal antibodies directed at two surface proteins of rhesus rotavirus*. Journal of Virology, 1983. **47**(2): p. 267-275.

Références Bibliographiques

246. Offit, P.A. and G. Blavat, *Identification of the two rotavirus genes determining neutralization specificities*. Journal of Virology, 1986. **57**(1): p. 376-378.
247. Hoshino, Y. and A.Z. Kapikian, *Rotavirus serotypes: classification and importance in epidemiology, immunity, and vaccine development*. J Health Popul Nutr, 2000. **18**(1): p. 5-14.
248. McDonald, S.M., et al., *Evolutionary Dynamics of Human Rotaviruses: Balancing Reassortment with Preferred Genome Constellations*. PLOS Pathogens, 2009. **5**(10): p. e1000634.
249. Aoki, S.T., et al., *Cross-linking of rotavirus outer capsid protein VP7 by antibodies or disulfides inhibits viral entry*. Journal of Virology, 2011. **85**(20): p. 10509-10517.
250. Pesavento, J.B., et al., *pH-induced conformational change of the rotavirus VP4 spike: implications for cell entry and antibody neutralization*. Journal of Virology, 2005. **79**(13): p. 8572-8580.
251. Taniguchi, K. and S. Urasawa, *Diversity in rotavirus genomes*. Seminars in Virology, 1995. **6**(2): p. 123-131.
252. Gault, E., *Génétique des rotavirus*. Virologie, 1998. **2**(2): p. 139-48.
253. Blackhall, J., A. Fuentes, and G. Magnusson, *Genetic Stability of a Porcine Rotavirus RNA Segment during Repeated Plaque Isolation*. Virology, 1996. **225**(1): p. 181-190.
254. Iturriza-Gómara, M., et al., *Reassortment in vivo: driving force for diversity of human rotavirus strains isolated in the United Kingdom between 1995 and 1999*. J Virol, 2001. **75**(8): p. 3696-705.
255. Coulson, B.S. *VP4 and VP7 typing using monoclonal antibodies*. in *Viral Gastroenteritis*. 1996. Vienna: Springer Vienna.
256. Mattion, N., et al., *Rearrangement of genomic segment 11 in two swine rotavirus strains*. J Gen Virol, 1988. **69**(Pt 3): p. 695-8.
257. Scott, G.E., O. Tarlow, and M.A. McCrae, *Detailed structural analysis of a genome rearrangement in bovine rotavirus*. Virus Res, 1989. **14**(2): p. 119-27.
258. Pedley, S., et al., *The genomes of rotaviruses isolated from chronically infected immunodeficient children*. J Gen Virol, 1984. **65**(Pt 7): p. 1141-50.
259. M, E., *Rotaviruses and their replication*, K.D.M. In: Fields B N, Howley P M, editors. Fields virology. 3rd ed. Vol. 2. Philadelphia, Pa: Lippincott-Raven, Editor 1996. p. 1625–1655.
260. Allen, A.M. and U. Desselberger, *Reassortment of human rotaviruses carrying rearranged genomes with bovine rotavirus*. J Gen Virol, 1985. **66**(Pt 12): p. 2703-14.

Références Bibliographiques

261. Ballard, A., M.A. McCrae, and U. Desselberger, *Nucleotide sequences of normal and rearranged RNA segments 10 of human rotaviruses*. J Gen Virol, 1992. **73**(Pt 3): p. 633-8.
262. Tian, Y., et al., *Genomic concatemerization/deletion in rotaviruses: a new mechanism for generating rapid genetic change of potential epidemiological importance*. J Virol, 1993. **67**(11): p. 6625-32.
263. Taniguchi, K., K. Kojima, and S. Urasawa, *Nondefective rotavirus mutants with an NSP1 gene which has a deletion of 500 nucleotides, including a cysteine-rich zinc finger motif-encoding region (nucleotides 156 to 248), or which has a nonsense codon at nucleotides 153-155*. Journal of Virology, 1996. **70**(6): p. 4125-4130.
264. Xu, Z., et al., *A major rearrangement of the VP6 gene of a strain of rotavirus provides replication advantage*. Vet Microbiol, 1996. **52**(3-4): p. 235-47.
265. Giambiagi, S., et al., *A rearranged genomic segment 11 is common to different human rotaviruses*. Arch Virol, 1994. **136**(3-4): p. 415-21.
266. Kapikian, A.Z., Hoshino, Y., and Chanock, R. M., *Fields Virology*, in *Rotaviruses*, E. D. M. Knipe and P. M. Howley, Editor 2001, Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia. p. 1787–1833.
267. Midthun, K., et al., *Single gene substitution rotavirus reassortants containing the major neutralization protein (VP7) of human rotavirus serotype 4*. Journal of Clinical Microbiology, 1986. **24**(5): p. 822-826.
268. Gulati, B.R., et al., *Relative frequencies of G and P types among rotaviruses from Indian diarrheic cow and buffalo calves*. Journal of Clinical Microbiology, 1999. **37**(6): p. 2074-2076.
269. C-H., M.L.a.v.B., *Frequent reassortments may explain the genetic heterogeneity of rotaviruses: analysis of Finnish rotavirus strains*. J. Virol., 2002. **76**: p. 11793-11800.
270. Garbarg-Chenon, A., F. Bricout, and J.C. Nicolas, *Serological characterization of human reassortant rotaviruses*. J Virol, 1986. **59**(2): p. 510-3.
271. Garbarg-Chenon, A., F. Bricout, and J.C. Nicolas, *Study of genetic reassortment between two human rotaviruses*. Virology, 1984. **139**(2): p. 358-65.
272. Lundgren, O. and L. Svensson, *Pathogenesis of rotavirus diarrhea*. Microbes Infect, 2001. **3**(13): p. 1145-56.
273. Leung, A.K.C., J.D. Kellner, and H. Dele Davies, *Rotavirus gastroenteritis*. Advances in Therapy, 2005. **22**(5): p. 476-487.
274. Parashar, U., et Glass, R. I., *Public health. Progress toward rotavirus vaccines*. Science, 2006. **312**(5775): p. 851-852.

275. Greenberg, H.B. and M.K. Estes, *Rotaviruses: from pathogenesis to vaccination*. Gastroenterology, 2009. **136**(6): p. 1939-51.
276. Hagbom, M., et al., *Towards a human rotavirus disease model*. Curr Opin Virol, 2012. **2**(4): p. 408-18.
277. Fields, B.N., D.M. Knipe, and P.M. Howley, *Fields virology* 2013, Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins.
278. Bardhan, P.K., M.A. Salam, and A.M. Molla, *Gastric emptying of liquid in children suffering from acute rotaviral gastroenteritis*. Gut, 1992. **33**(1): p. 26-9.
279. Kluger, M.J., *Fever: role of pyrogens and cryogens*. Physiol Rev, 1991. **71**(1): p. 93-127.
280. Hart, B.L., *Biological basis of the behavior of sick animals*. Neurosci Biobehav Rev, 1988. **12**(2): p. 123-37.
281. De Rougemont, A. and P. Pothier, *Rotavirus*. 2009.
282. Ball, J.M., et al., *Age-dependent diarrhea induced by a rotaviral nonstructural glycoprotein*. Science (New York, N.Y.), 1996. **272**(5258): p. 101-104.
283. Hagbom, M., et al., *Rotavirus Stimulates Release of Serotonin (5-HT) from Human Enterochromaffin Cells and Activates Brain Structures Involved in Nausea and Vomiting*. PLOS Pathogens, 2011. **7**(7): p. e1002115.
284. Kordasti, S., et al., *Rotavirus Infection Is Not Associated with Small Intestinal Fluid Secretion in the Adult Mouse*. Journal of Virology, 2006. **80**(22): p. 11355.
285. Kordasti, S., et al., *Serotonin and vasoactive intestinal peptide antagonists attenuate rotavirus diarrhoea*. Gut, 2004. **53**(7): p. 952-957.
286. Lundgren, O., et al., *Role of the enteric nervous system in the fluid and electrolyte secretion of rotavirus diarrhoea*. Science, 2000. **287**(5452): p. 491-5.
287. WHO, *INTRODUCTION OF ROTAVIRUS VACCINES*. 2013.
288. Carlson, D., J. Sehested, and H.D. Poulsen, *Zinc reduces the electrophysiological responses in vitro to basolateral receptor mediated secretagogues in piglet small intestinal epithelium*. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol, 2006. **144**(4): p. 514-9.
289. Hoque, K.M., V.M. Rajendran, and H.J. Binder, *Zinc inhibits cAMP-stimulated Cl secretion via basolateral K-channel blockade in rat ileum*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2005. **288**(5): p. 23.

Références Bibliographiques

290. Dharakul, T., L. Rott, and H.B. Greenberg, *Recovery from chronic rotavirus infection in mice with severe combined immunodeficiency: virus clearance mediated by adoptive transfer of immune CD8+ T lymphocytes*. Journal of Virology, 1990. **64**(9): p. 4375-4382.
291. Jiang, B., et al., *Cytokines as mediators for or effectors against rotavirus disease in children*. Clin Diagn Lab Immunol, 2003. **10**(6): p. 995-1001.
292. Bishop, R.F., et al., *Clinical immunity after neonatal rotavirus infection. A prospective longitudinal study in young children*. N Engl J Med, 1983. **309**(2): p. 72-6.
293. Clark, H.F., F.E. Borian, and S.A. Plotkin, *Immune Protection of Infants against Rotavirus Gastroenteritis by a Serotype 1 Reassortant of Bovine Rotavirus WC3*. The Journal of Infectious Diseases, 1990. **161**(6): p. 1099-1104.
294. Bernstein, D.I., et al., *Evaluation of WC3 rotavirus vaccine and correlates of protection in healthy infants*. J Infect Dis, 1990. **162**(5): p. 1055-62.
295. Davidson, G.P., R.J. Hogg, and C.P. Kirubakaran, *Serum and intestinal immune response to rotavirus enteritis in children*. Infection and immunity, 1983. **40**(2): p. 447-452.
296. Sonza, S. and I.H. Holmes, *Coproantibody response to rotavirus infection*. Med J Aust, 1980. **2**(9): p. 496-9.
297. Coulson, B.S., et al., *Derivation of neutralizing monoclonal antibodies to human rotaviruses and evidence that an immunodominant neutralization site is shared between serotypes 1 and 3*. Virology, 1986. **154**(2): p. 302-12.
298. Hjelt, K., et al., *Antibody response in serum and intestine in children up to six months after a naturally acquired rotavirus gastroenteritis*. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 1986. **5**(1): p. 74-80.
299. Grimwood, K., et al., *Comparison of serum and mucosal antibody responses following severe acute rotavirus gastroenteritis in young children*. Journal of Clinical Microbiology, 1988. **26**(4): p. 732-738.
300. Offit, P.A., *Rotaviruses: immunological determinants of protection against infection and disease*. Adv Virus Res, 1994. **44**: p. 161-202.
301. Smith, T.F., et al., *New developments in the diagnosis of viral diseases*. Infect Dis Clin North Am, 1993. **7**(2): p. 183-201.
302. Greenberg, H., et al., *Serological analysis of the subgroup protein of rotavirus, using monoclonal antibodies*. Infection and immunity, 1983. **39**: p. 91-9.
303. Arnold, M., J.T. Patton, and S.M. McDonald, *Culturing, storage, and quantification of rotaviruses*. Curr Protoc Microbiol, 2009. **15**(3).

304. Nakagomi, T., et al., *Occurrence of changes in human rotavirus serotypes with concurrent changes in genomic RNA electropherotypes*. Journal of Clinical Microbiology, 1988. **26**(12): p. 2586.
305. Gouvea, V., et al., *Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens*. J Clin Microbiol, 1990. **28**(2): p. 276-82.
306. Richardson, S., et al., *Extended excretion of rotavirus after severe diarrhoea in young children*. Lancet, 1998. **351**(9119): p. 1844-8.
307. Fischer, T.K. and J.R. Gentsch, *Rotavirus typing methods and algorithms*. Rev Med Virol, 2004. **14**(2): p. 71-82.
308. Iturriza-Gómara, M., et al., *Diversity within the VP4 gene of rotavirus P[8] strains: implications for reverse transcription-PCR genotyping*. J Clin Microbiol, 2000. **38**(2): p. 898-901.
309. Iturriza-Gómara, M., G. Kang, and J. Gray, *Rotavirus genotyping: keeping up with an evolving population of human rotaviruses*. J Clin Virol, 2004. **31**(4): p. 259-65.
310. Simmonds, M.K., et al., *New oligonucleotide primers for P-typing of rotavirus strains: Strategies for typing previously untypeable strains*. J Clin Virol, 2008. **42**(4): p. 368-73.
311. Cunliffe, N.A. and O. Nakagomi, *A critical time for rotavirus vaccines: a review*. Expert review of vaccines, 2005. **4**(4): p. 521-532.
312. Patel, M., et al., *Oral rotavirus vaccines: how well will they work where they are needed most?* The Journal of Infectious Diseases, 2009. **200 Suppl 1**(0 1): p. S39-S48.
313. Cunliffe, N.A., et al., *Epidemiology of rotavirus diarrhoea in Africa : a review to assess the need for rotavirus immunization / N. A. Cunliffe ... [et al.]*. Bulletin of the World Health Organization 1998 ; 76(5) : 525-537, 1998.
314. Nakagomi, T., et al., *Incidence and burden of rotavirus gastroenteritis in Japan, as estimated from a prospective sentinel hospital study*. J Infect Dis, 2005. **1**(192): p. 431503.
315. (CDC), C.f.D.C.a.P., *Rotavirus surveillance: worldwide, 2001–2008*. Morbidity and Mortality Weekly Report, 2008. **57**: p. 1255–1257.
316. Benhafid, M., et al., *Monitoring of rotavirus vaccination in Morocco: Establishing the baseline burden of rotavirus disease*. Vol. 30. 2012. 6515-20.
317. Murphy, T.V., et al., *Intussusception among infants given an oral rotavirus vaccine*. N Engl J Med, 2001. **344**(8): p. 564-72.

318. Grassi, T., et al., *Rotavirus detection in environmental water samples by tangential flow ultrafiltration and RT-nested PCR*. Environ Monit Assess, 2010. **164**(1-4): p. 199-205.
319. Espinosa, A.C., et al., *Infectivity and genome persistence of rotavirus and astrovirus in groundwater and surface water*. Water Res, 2008. **42**(10-11): p. 2618-28.
320. Iturriza-Gómara, M., et al., *Rotavirus genotypes co-circulating in Europe between 2006 and 2009 as determined by EuroRotaNet, a pan-European collaborative strain surveillance network*. Epidemiol Infect, 2011. **139**(6): p. 895-909.
321. da Silva, M.F.M., et al., *VP7 Gene of human rotavirus A genotype G5: Phylogenetic analysis reveals the existence of three different lineages worldwide*. Journal of Medical Virology, 2011. **83**(2): p. 357-366.
322. Kang, G., et al., *Diversity of circulating rotavirus strains in children hospitalized with diarrhea in India, 2005-2009*. Vaccine, 2013. **31**(27): p. 2879-2883.
323. Todd, S., et al., *Rotavirus strain types circulating in Africa: Review of studies published during 1997-2006*. J Infect Dis, 2010. **1**(202): p. 653555.
324. Luchs, A. and M.C. Timenetsky, *G8P[6] rotaviruses isolated from Amerindian children in Mato Grosso do Sul, Brazil, during 2009: close relationship of the G and P genes with those of bovine and bat strains*. The Journal of general virology, 2014. **95 Pt 3**: p. 627-41.
325. Cilla, G., et al., *Rotavirus genotypes in children in the Basque Country (northern Spain) over a 13-year period (July 1996-June 2009)*. European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology, 2010. **29**: p. 955-60.
326. Lennon, G., et al., *Changing profile of rotavirus in Ireland: predominance of P[8] and emergence of P[6] and P[9] in mixed infections*. J Med Virol, 2008. **80**(3): p. 524-30.
327. Perez, N., *Rotavirus Gastroenteritis: Why to Back up the Development of New Vaccines?* Camp Immunol Microbial Infect, 2007. **31**(2-3): p. 253-69.
328. Mwenda, J.M., et al., *Evidence of reduction of rotavirus diarrheal disease after rotavirus vaccine introduction in national immunization programs in the African countries: Report of the 11(th) African rotavirus symposium held in Lilongwe, Malawi*. Vaccine, 2019. **37**(23): p. 2975-2981.
329. Wyatt, R.G., et al., *Rotaviral immunity in gnotobiotic calves: heterologous resistance to human virus induced by bovine virus*. Science, 1979. **203**(4380): p. 548-50.
330. Zheng, B.J., et al., *Development of neutralizing antibodies and group A common antibodies against natural infections with human rotavirus*. Journal of Clinical Microbiology, 1988. **26**(8): p. 1506-1512.

331. AZ., K., *Jennerian and modified jennerian approach to vaccination against rotavirus diarrhoea in infants and young children: an introduction.*, in *Viral Infections of Gastrointestinal Tract*, I.K.A. (ed). Editor 1994, Marcel Dekker: Inc, New York, Basel, Hong Kong. p. 409-417.
332. Fischer, T.K., et al., *Protective immunity after natural rotavirus infection: a community cohort study of newborn children in Guinea-Bissau, west Africa.* J Infect Dis, 2002. **186**(5): p. 593-7.
333. Practices, A.C.o.I., *Rotavirus vaccine for the prevention of rotavirus gastroenteritis among children. Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP).* MMWR Recomm Rep, 1999. **48**: p. 1-20.
334. (CDC)., C.f.D.C.a.P., *Withdrawal of rotavirus vaccine recommendation.* MMWR Morb Mortal Wkly Rep, 1999. **48**: p. 1007.
335. Patel, M.M., et al., *Real-world impact of rotavirus vaccination.* The Pediatric infectious disease journal, 2011. **30**(1 Suppl): p. S1-5.
336. Richardson, V., et al., *Effect of rotavirus vaccination on death from childhood diarrhea in Mexico.* The New England journal of medicine, 2010. **362**(4): p. 299-305.
337. do Carmo, G.M.I., et al., *Decline in Diarrhea Mortality and Admissions after Routine Childhood Rotavirus Immunization in Brazil: A Time-Series Analysis.* PLOS Medicine, 2011. **8**(4): p. e1001024.
338. Organization, W.H., *A generic protocol for monitoring impact of rotavirus vaccination on gastroenteritis disease burden and viral strains.* Geneva:WHO/IVB/, 2008: p. 08.16.
339. Benhafid, M., et al., *Effect of monovalent rotavirus vaccine on rotavirus disease burden and circulating rotavirus strains among children in Morocco.* J Med Virol, 2014. **87**(6): p. 944-53.
340. Boulahyaoui, H., S.A. Amine, M. Melloul, F. Hilali, E. El-Fahime, S. Mrani, N. Touil., *Characterization of unusual human group a rotavirus VP4 genotype detected in moroccan children fully vaccinated with RotarixTM.* Hosts and Viruses, 2020. **7**(2): p. 30-38.
341. Alaoui Amine, S., et al., *Full-length genome analysis of the first human G8P[14] rotavirus strain from Morocco suggests evidence of zoonotic transmission.* Virus Genes, 2019. **55**(4): p. 465-478.
342. Arista, S., et al., *G2 rotavirus infections in an infantile population of the South of Italy: Variability of viral strains over time.* Journal of Medical Virology, 2005. **77**(4): p. 587-594.
343. Gerna, G., Steele, A. D., Hoshino, Y., Sereno, M., Garcia, D., Sarasini, A., and Flores, J., *A comparison of the VP7 gene sequences of human and bovine rotaviruses.* J. Gen. Virol., 1994. **75**: p. 1781–1784.

Références Bibliographiques

344. Matthijssens, J., et al., *G8 rotavirus strains isolated in the Democratic Republic of Congo belong to the DS-1-like genogroup*. Journal of Clinical Microbiology, 2006. **44**(5): p. 1801-1809.
345. Medici, M.C., et al., *Molecular characterization of VP4, VP6 and VP7 genes of a rare G8P[14] rotavirus strain detected in an infant with gastroenteritis in Italy*. Virus research, 2008. **137**(1): p. 163-167.
346. Arista, S., et al., *Electrophenotypes, subgroups and serotypes of human rotavirus strains causing gastroenteritis in infants and young children in Palermo, Italy, from 1985 to 1989*. Res Virol, 1990. **141**(4): p. 435-48.
347. Nakagomi, O., et al., *Relative frequency of human rotavirus subgroups 1 and 2 in Japanese children with acute gastroenteritis*. Journal of Medical Virology, 1985. **17**(1): p. 29-34.
348. Aboudy, Y., et al., *Use of polyclonal and monoclonal antibodies and analysis of viral RNA in the detection of unusual group A human rotaviruses*. Journal of Medical Virology, 1988. **25**(3): p. 351-359.
349. Birch, C.J., et al., *Isolation of feline rotaviruses and their relationship to human and simian isolates by electrophenotype and serotype*. J Gen Virol, 1985. **66**(Pt 12): p. 2731-5.
350. Gerna, G., et al., *Isolation and characterization of two distinct human rotavirus strains with G6 specificity*. Journal of Clinical Microbiology, 1992. **30**(1): p. 9-16.
351. M., E., *Rotaviruses and their replication*, K.D.M. In: Fields B N, Howley P M, editors, Editor 1996: Philadelphia, Pa: Lippincott-Raven. p. 1625–1655.
352. Iizuka, M., et al., *Serotype G6 human rotavirus sharing a conserved genetic constellation with natural reassortants between members of the bovine and AU-1 genogroups*. Archives of Virology, 1994. **135**(3): p. 427-432.
353. Li, B., H.F. Clark, and V. Gouvea, *Nucleotide Sequence of the VP4-Encoding Gene of an Unusual Human Rotavirus (HCR3)*. Virology, 1993. **196**(2): p. 825-830.
354. Li, B., H.F. Clark, and V. Gouvea, *Amino acid sequence similarity of the VP7 protein of human rotavirus HCR3 to that of canine and feline rotaviruses*. J Gen Virol, 1994. **75**(Pt 1): p. 215-9.
355. Nakagomi, T. and O. Nakagomi, *Human rotavirus HCR3 possesses a genomic RNA constellation indistinguishable from that of feline and canine rotaviruses*. Arch Virol, 2000. **145**(11): p. 2403-9.
356. Gollop, R., et al., *Three forms of AU-1 like human rotaviruses differentiated by their overall genomic constellation and by the sequence of their VP8**. Arch Virol, 1998. **143**(2): p. 263-77.
357. Snodgrass, D.R., et al., *Rotavirus serotypes 6 and 10 predominate in cattle*. J Clin Microbiol, 1990. **28**(3): p. 504-7.

358. Palombo, E.A. and R.F. Bishop, *Genetic and antigenic characterization of a serotype G6 human rotavirus isolated in Melbourne, Australia*. J Med Virol, 1995. **47**(4): p. 348-54.
359. Cooney, M.A., R.J. Gorrell, and E.A. Palombo, *Characterisation and phylogenetic analysis of the VP7 proteins of serotype G6 and G8 human rotaviruses*. J Med Microbiol, 2001. **50**(5): p. 462-467.
360. Burke, B. and U. Desselberger, *Rotavirus pathogenicity*. Virology, 1996. **218**(2): p. 299-305.
361. Arista, S., et al., *Identification of human rotavirus strains with the P[14] genotype by PCR*. J Clin Microbiol, 1999. **37**(8): p. 2706-8.
362. Mphahlele, M.J., I. Peenze, and A.D. Steele, *Rotavirus strains bearing the VP4P[14] genotype recovered from South African children with diarrhoea*. Arch Virol, 1999. **144**(5): p. 1027-34.
363. Hasegawa, A., et al., *Isolation of human rotaviruses with a distinct RNA electrophoretic pattern from Indonesia*. Microbiol Immunol, 1984. **28**(6): p. 719-22.
364. Browning, G.F., et al., *Human and bovine serotype G8 rotaviruses may be derived by reassortment*. Arch Virol, 1992. **125**(1-4): p. 121-8.
365. Pongsuwanna, Y., et al., *Serological and genomic characterization of porcine rotaviruses in Thailand: detection of a G10 porcine rotavirus*. J Clin Microbiol, 1996. **34**(5): p. 1050-7.
366. Nakagomi, O., et al., *Naturally occurring dual infection with human and bovine rotaviruses as suggested by the recovery of G1P8 and G1P5 rotaviruses from a single patient*. Arch Virol, 1994. **137**(3-4): p. 381-8.
367. Brüssow, H., et al., *Neutralizing serum antibodies to serotype 6 human rotaviruses PA151 and PA169 in Ecuadorian and German children*. J Clin Microbiol, 1992. **30**(4): p. 911-4.
368. Brüssow, H. and J. Sidoti, *Antibody to serotype 8 rotavirus in Ecuadorian and German children*. Epidemiol Infect, 1991. **106**(2): p. 415-20.
369. Kelkar, S.D., P.G. Ray, and S.S. Bedekar, *Assay of neutralizing antibodies to animal rotavirus strains and human rotavirus serotype G8 by a modified method in the residents of Pune, India*. J Diarrhoeal Dis Res, 1996. **14**(2): p. 101-6.
370. M.K., E., *Rotaviruses and their replication*, K.D.M. in: Fields B.N., Howley P.M., Chanock R.M., Melnick J.L., Monath T.P., Roizman B., and Strauss S.E. (eds), Editor 1996: Lippincott-Raven Press, Philadelphia. p. 1625-1655.
371. Gouvea, V., et al., *Rotavirus serotype G5 associated with diarrhea in Brazilian children*. J Clin Microbiol, 1994. **32**(5): p. 1408-9.

Références Bibliographiques

372. Leite, J.P., et al., *Rotavirus G and P types circulating in Brazil: characterization by RT-PCR, probe hybridization, and sequence analysis*. Arch Virol, 1996. **141**(12): p. 2365-74.
373. Okada, J., et al., *New P serotype of group A human rotavirus closely related to that of a porcine rotavirus*. J Med Virol, 2000. **60**(1): p. 63-9.
374. Shirane, K. and O. Nakagomi, *Interspecies transmission of animal rotaviruses to humans as evidenced by phylogenetic analysis of the hypervariable region of the VP4 protein*. Microbiol Immunol, 1994. **38**(10): p. 823-6.
375. Masendycz P.J., P.E.A., *Genetic relatedness of VP1 genes of Australian and Taiwanese rotavirus isolates*. FEMS Microbiol Lett 198, 2001: p. 147-150.
376. Dunn, S.J., T.L. Cross, and H.B. Greenberg, *Comparison of the rotavirus nonstructural protein NSP1 (NS53) from different species by sequence analysis and northern blot hybridization*. Virology, 1994. **203**(1): p. 178-83.
377. Kojima, K., K. Taniguchi, and N. Kobayashi, *Species-specific and interspecies relatedness of NSP1 sequences in human, porcine, bovine, feline, and equine rotavirus strains*. Arch Virol, 1996. **141**(1): p. 1-12.
378. Fujiwara, Y. and O. Nakagomi, *Interspecies sharing of two distinct nonstructural protein 1 alleles among human and animal rotaviruses as revealed by dot blot hybridization*. J Clin Microbiol, 1997. **35**(10): p. 2703-5.
379. Patton, J.T., et al., *Nucleotide and amino acid sequence analysis of the rotavirus nonstructural RNA-binding protein NS35*. Virology, 1993. **192**(2): p. 438-46.
380. Horie, Y., O. Masamune, and O. Nakagomi, *Three major alleles of rotavirus NSP4 proteins identified by sequence analysis*. J Gen Virol, 1997. **78**(Pt 9): p. 2341-6.
381. Kirkwood, C.D. and E.A. Palombo, *Genetic characterization of the rotavirus nonstructural protein, NSP4*. Virology, 1997. **236**(2): p. 258-65.
382. Cunliffe, N.A., et al., *Sequence analysis of NSP4 gene of human rotavirus allows classification into two main genetic groups*. J Med Virol, 1997. **53**(1): p. 41-50.
383. Kojima, K., et al., *Sequence analysis of normal and rearranged NSP5 genes from human rotavirus strains isolated in nature: implications for the occurrence of the rearrangement at the step of plus strand synthesis*. Virology, 1996. **224**(2): p. 446-52.
384. DOBLALI T, T.N., KAPLON J, AMBERT-BALAY K, AGADR A, EL HAMZAOUI S, POTHIER P, *Clinical and molecular descriptions of rotavirus in Morocco 2 years after Rotarix® introduction*, in 6th European Rotavirus Biology Meeting (ERBM)17-20 May 2015.

385. Maes, P., et al., *RotaC: a web-based tool for the complete genome classification of group A rotaviruses*. BMC Microbiol, 2009. **9**(238): p. 1471-2180.
386. Ennima, I., et al., *Isolation and identification of group A rotaviruses among neonatal diarrheic calves, Morocco*. BMC Research Notes, 2016. **9**(1): p. 261.
387. Tamura, K., et al., *MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods*. Molecular Biology and Evolution, 2011. **28**(10): p. 2731-2739.
388. Jere, K.C., et al., *Whole genome analysis of multiple rotavirus strains from a single stool specimen using sequence-independent amplification and 454(R) pyrosequencing reveals evidence of intergenotype genome segment recombination*. Infect Genet Evol, 2011. **11**(8): p. 2072-82.
389. Holmes, J.L., et al., *Characterization of unusual G8 rotavirus strains isolated from Egyptian children*. Arch Virol, 1999. **144**(7): p. 1381-96.
390. Mijatovic-Rustempasic, S., et al., *Full-Genome Sequence of the First G8P[14] Rotavirus Strain Detected in the United States*. Genome Announc, 2015. **3**(3): p. 00677-15.
391. Matthijnsens, J. and M. Van Ranst, *Genotype constellation and evolution of group A rotaviruses infecting humans*. Curr Opin Virol, 2012. **2**(4): p. 426-33.
392. Fukai, K., et al., *Prevalence of calf diarrhea caused by bovine group: A rotavirus carrying G serotype 8 specificity*. Vol. 66. 1999. 301-11.
393. Fodha, I., et al., *Detection of Group A Rotavirus Strains Circulating in Calves in Tunisia*. Vol. 52. 2005. 49-50.
394. Ianiro, G., et al., *Molecular characterization of human G8P[4] rotavirus strains in Italy: proposal of a more complete subclassification of the G8 genotype in three major lineages*. Infect Genet Evol, 2014. **21**: p. 129-33.
395. Benmessaoud, R., et al., *Aetiology, epidemiology and clinical characteristics of acute moderate-to-severe diarrhoea in children under 5 years of age hospitalized in a referral paediatric hospital in Rabat, Morocco*. Journal of Medical Microbiology, 2015. **64**(1): p. 84-92.
396. Heylen, E., et al., *Comparative analysis of pentavalent rotavirus vaccine strains and G8 rotaviruses identified during vaccine trial in Africa*. Vol. 5. 2015: Sci Rep. 14658.
397. Buragohain, M., et al., *VP6 capsid protein of chicken rotavirus strain CH2: sequence, phylogeny and in silico antigenic analyses*. Virus Res, 2008. **137**(2): p. 173-8.
398. Desselberger, U. and H.I. Huppertz, *Immune responses to rotavirus infection and vaccination and associated correlates of protection*. J Infect Dis, 2011. **203**(2): p. 188-95.

399. Franco, M.A., J. Angel, and H.B. Greenberg, *Immunity and correlates of protection for rotavirus vaccines*. *Vaccine*, 2006. **24**(15): p. 2718-31.
400. Delogu, R., et al., *Unexpected spreading of G12P[8] rotavirus strains among young children in a small area of central Italy*. *Journal of Medical Virology*, 2015. **87**(8): p. 1292-1302.
401. Kirkwood, C.D., *Genetic and antigenic diversity of human rotaviruses: potential impact on vaccination programs*. *The Journal of infectious diseases*, 2010. **202** **Suppl**: p. S43-8.
402. Iturriza-Gomara, M., G. Kang, and J. Gray, *Rotavirus genotyping: keeping up with an evolving population of human rotaviruses*. *J Clin Virol*, 2004. **31**(4): p. 259-65.
403. Simmonds, M.K., et al., *New oligonucleotide primers for P-typing of rotavirus strains: Strategies for typing previously untypeable strains*. *J Clin Virol*, 2008. **42**(4): p. 368-73.
404. Tacharoenmuang, R., et al., *Whole Genomic Analysis of an Unusual Human G6P[14] Rotavirus Strain Isolated from a Child with Diarrhea in Thailand: Evidence for Bovine-To-Human Interspecies Transmission and Reassortment Events*. *PLoS One*, 2015. **10**(9).
405. de Beer M, S.D., *Characterization of the VP7 and VP4 genes of a South African group A caprine rotavirus*. GenBank record, 2002.
406. Valiakos, G.A., D.C.A. Chatzopoulos, and C.N. Tsokana, *Interspecies transmission of Rotaviruses among ruminants, dogs and humans: Current facts and remarks*. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, 2017. **Vol 68**(2): **123-130**.
407. Bwogi, J., et al., *Whole genome analysis of selected human and animal rotaviruses identified in Uganda from 2012 to 2014 reveals complex genome reassortment events between human, bovine, caprine and porcine strains*. *PLoS One*, 2017. **12**(6).
408. Gabbay, Y.B., et al., *Evidence for zoonotic transmission of group C rotaviruses among children in Belem, Brazil*. *J Med Virol*, 2008. **80**(9): p. 1666-74.
409. Luchs, A., et al., *Rare G3P[3] rotavirus strain detected in Brazil: possible human-canine interspecies transmission*. *J Clin Virol*, 2012. **54**(1): p. 89-92.
410. Martella, V., et al., *Zoonotic aspects of rotaviruses*. *Vet Microbiol*, 2010. **140**(3-4): p. 246-55.
411. Sieg, M., et al., *A bovine G8P[1] group A rotavirus isolated from an asymptotically infected dog*. *Journal of General Virology*, 2014.
412. El Qazoui, M., et al., *Rotavirus and norovirus infections among acute gastroenteritis children in Morocco*. *BMC infectious diseases*, 2014. **14**: p. 300-300.

Références Bibliographiques

413. Donato, C.M., et al., *Genetic characterization of a novel G3P[14] rotavirus strain causing gastroenteritis in 12 year old Australian child*. *Infect Genet Evol*, 2014. **25**: p. 97-109.
414. Mullick, S., et al., *Genomic analysis of human rotavirus strains G6P[14] and G11P[25] isolated from Kolkata in 2009 reveals interspecies transmission and complex reassortment events*. *Infect Genet Evol*, 2013. **14**: p. 15-21.
415. Alaoui Amine, S., et al., *Evidence for zoonotic transmission of species A rotavirus from goat and cattle in nomadic herds in Morocco, 2012–2014*. *Virus Genes*, 2020. **56**(5): p. 582-593.

Annexes

ANNEXE I

Test immunochromatographique rapide pour la détection qualitative du rotavirus et de l'adénovirus dans les selles

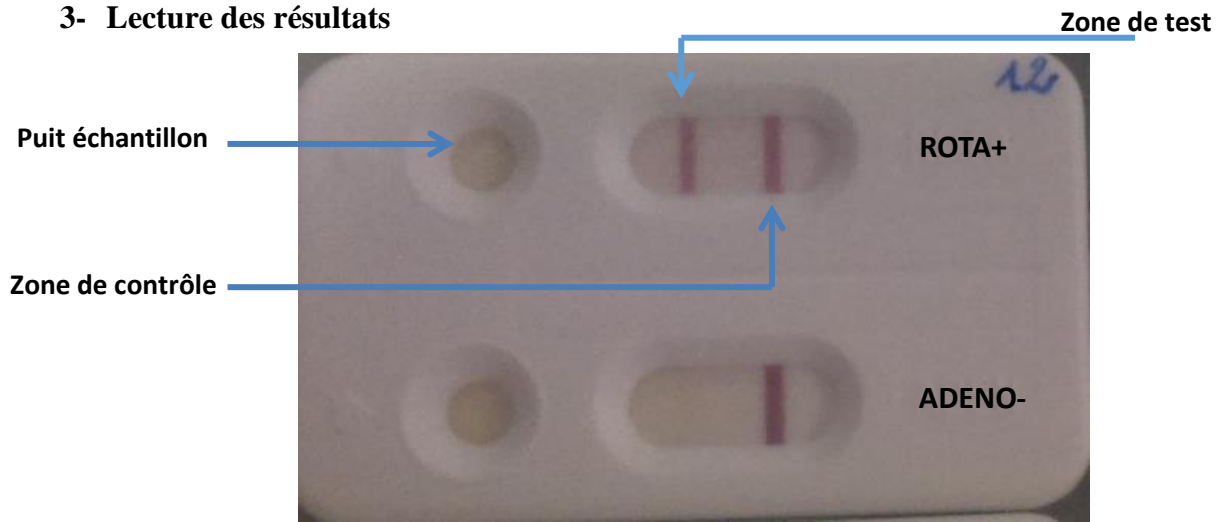
1- Préparation des échantillons

- + Numéroté le tube contenant la solution d'extraction.
- + Ouvrir le tube et, à l'aide de la cuillère de prélèvement, transférer un échantillon de selle (volume d'un petit pois) dans le tube, si l'échantillon est de consistance solide. Transférer un volume de 200 μ l, si l'échantillon est de consistance liquide.
- + Refermer le tube avec le capuchon et mélanger l'échantillon et le diluant en secouant le tube jusqu'à dissolution complète.
- + Laisser reposer le tube assez longtemps pour que les particules se déposent au fond du tube, alternativement, centrifuger le tube à 500-1000 rpm pendant 1 minute.

2- Mode opératoire

- + Ramener tous les réactifs à température ambiante
- + Sortir la cassette de son sachet protecteur
- + Ouvrir le tube plastique contenant l'échantillon extrait, à l'aide de la pipette en plastique, déposer 6 gouttes (200 μ l), de la solution extraite dans le puit échantillon
- + lire le résultat 10 minutes après le dépôt de l'échantillon.

3- Lecture des résultats



ANNEXE II

Protocole d'extraction de l'ARN viral par le kit « QIAamp Viral RNA Mini Kit »

- 1- Pipeter 560 µl de Tampon AVL contenant l'ARN porteur (carrier) dans un tube à centrifuger de 1,5 ml.
- 2- Ajouter 140 µl du surnageant (de selles ou de culture cellulaire) au tampon AVL-RNA carrier dans le tube de 1,5ml. Mélanger en utilisant le vortex pendant 15 s.
- 3- Incuber à température ambiante pendant 10min.
- 4- Centrifuger brièvement le tube pour enlever les gouttes de l'intérieur du couvercle.
- 5- Ajouter 560 µl d'éthanol (96-100 %) à l'échantillon et mélanger en utilisant le vortex pendant 15 s. Après avoir mélangé, centrifuger brièvement le tube pour enlever les gouttes de l'intérieur du couvercle.
- 6- Appliquer avec précaution 630 µl de la solution de l'étape 5 sur la mini-colonne QIAamp (dans un tube de collecte de 2 ml) sans mouiller le bord. Fermer le bouchon, et centrifuger à 6000 x g (8000 tr/min) pendant 1 min. Placez la mini-colonne QIAamp dans un tube collecteur propre de 2 ml, et jeter le tube contenant le filtrat.
- 7- Ouvrer soigneusement la mini-colonne QIAamp, et répétez l'étape 6. Si le volume de l'échantillon était supérieur à 140 µl, répétez cette étape jusqu'à ce que tout le lysat ait été chargé sur la colonne de spin
- 8- Ouvrer avec précaution la mini-colonne QIAamp et ajouter 500 µl de tampon AW1. Fermer le bouchon et centrifuger à 6000 x g (8000 tr/min) pendant 1 min. Placer la mini-colonne QIAamp dans un tube collecteur propre de 2 ml (fourni) et jetez le tube contenant le filtrat.

- 9- Ouvrir avec précaution la mini-colonne QIAamp et ajouter 500 µl de tampon AW2. Fermer le couvercle et centrifuger à pleine vitesse (20 000 x g ; 14 000 tr/min) pendant 3 min. Continuer directement avec l'étape 11 ; ou pour éliminer d'éventuels traces du tampon AW2, effectuer l'étape 10 puis continuer avec l'étape 11.
- 10- **Recommandé** : Placez la mini-colonne QIAamp dans un nouveau tube collecteur de 2 ml (non fourni), et jetez l'ancien tube collecteur avec le filtrat. Centrifuger à pleine vitesse pendant 1 min.
- 11- Placez la mini colonne QIAamp dans un tube 1,5 ml (non fourni). Jetez l'ancien tube de collecte contenant le filtrat. Ouvrez soigneusement la mini-colonne QIAamp et ajoutez 60 µl de tampon AVE équilibré à la température ambiante. Fermer le bouchon et incuber à température ambiante pendant 1 min.
- 12- Centrifuger à 6000 x g (8000 rpm) pendant 1 min.

ANNEXE III

Les amorces utilisées pour amplifier les 11 segments du génome de la souche ma31

Gene segment	Fragment Name	Primer Name	Sequence (5'-3')	Position	Amplicon bp	Reference
VP7		VP7 F Primer	GGCTTTAAAAGMGAGAATTTC	1-22	1062	<i>Fujii et al., 2012</i>
		VP7 R Primer	GGTCACATCATACAATTCT	1043-1062		<i>Fujii et al., 2012</i>
VP4	VP4-1	VP4P[14]1F	GGCTATAAAAATGGCTTCTTT	1-20	1319	<i>Fukai et al., 2004</i>
		VP4P[14]2R	AAAGATGGTTCACCTAACAGC	1300-1319		<i>Fukai et al., 2004</i>
	VP4-2	CD-VP4-P[14] 1191 F	CCAGTAAATGAGTGGTGGC	1192-1209	1169	<i>Cowley et al., 2013</i>
		VP4P[14] 3R	GGTCACATCYTWARCAGACAG	2341-2361		<i>Fukai et al., 2004</i>
	VP4-3	VP4P[14] 3F	ATGTCAGATGCGGTTCTTC	1711-1730	650	<i>Fukai et al., 2004</i>
		VP4P[14] 3R	GGTCACATCYTWARCAGACAG	2341-2361		<i>Fukai et al., 2004</i>
	VP4-4	VP4 P[14] 1F	GGCTATAAAAATGGCTTCTTT	1-20	554	<i>Fukai et al., 2004</i>
		P 4943 (P[14] reverse	GGTGTAGTTCCTGCGTA	535-554		<i>WHO, 2009</i>
	VP4-5	LAP_VP4_788F	CCTGTGGAAAGAAATGC	788-805	532	<i>Ben Hadj Fredj et al., 2013</i>
		VP4P[14] 2R	AAAGATGGTTCACCTAACAGC	1300-1319		<i>Fukai et al., 2004</i>
VP6		VP6F primer	GGCTTWAACCGAAGTCTTC	1-20	1355	<i>Fujii et al., 2012</i>
		VP6 R primer	GGTCACATCCTCTCACT	1340-1355		<i>Fujii et al., 2012</i>
VP1	VP1-1	GEN_VP1Fb	GGCTATTAAGCTRTACAATGGGGAAG	1-27	1044	<i>Matthijnssens et al., 2008a</i>
		VP1P2 R	GGCATCCAACATTTTCTGCT	1025-1045		<i>Ramani et al., 2009</i>
	VP1-2	GEN_VP1Fb	GGCTATTAAGCTRTACAATGGGGAAG	1-27	1009	<i>Matthijnssens et al., 2008a</i>
		Lama_VP1_1009R	GAAAYGACCAYGAATATATTTAGCC	984-1009		<i>Louge Uriarte et al., 2014</i>
	VP1-3	MG6_VP1_447F	TGCAGTTATGTTCTGTTGG	446-466	598	<i>Ben Hadj Fredj et al., 2013</i>
		VP1P2 R	GGCATCCAACATTTTCTGCT	1025-1045		<i>Ramani et al., 2009</i>
	VP1-4	VP1G1 F	CGAGCNATAGTCCNGACCA	847-867	1157	<i>Ramani et al., 2009; Louge Uriarte et al., 2014</i>
		VP1G6 R	ATTCGCGCRTAYGTTTCTCT	1984-2003		<i>Ramani et al., 2009; Louge Uriarte et al., 2014</i>
	VP1-5	VP1G5 F	GCAGCKAATTCAATAGCRAA	1810-1829	995	<i>Ramani et al., 2009; Louge Uriarte et al., 2014</i>
		CD-VP1-2805 R	GCTGATTTGAACCGTC	2788-2805		<i>Cowley et al., 2013</i>
	VP1-6	ma31-VP1-1486F	ATGCTGAGTCTATTACAGTC	1486-1506	495	<i>This study</i>
		ma31-VP1-1980R	GTCGTTTGATACATCTGAACC	1958-1980		<i>This study</i>
	VP6-7	CD-VP1-2544 F	TGCACCAATATCACTTGAC	2544-2562	759	<i>Cowley et al., 2013</i>
		Gen_VP1Rb	GGTCACATCTAAGCGYTCTAATCTTG	3276-3302		<i>Ben Hadj Fredj et al., 2013</i>
VP2	VP2-1	VP2 F primer	GGCTATTAAGGCTCAATGG	1-20	2687	<i>Fujii et al., 2012</i>
		VP2RV3 Rev end	GGTCATATCTCCACARTGG	2669-2687		<i>Rippinger et al., 2010</i>
	VP2-2	VP2RV3 FWD Start	GGCTATTRAAGGYTCAATGG	1-20	324	<i>Rippinger et al., 2010</i>
		260-97_VP2_345R	GACTCTTTGGTTCGAAAAGTAGG	302-324		<i>Ben Hadj Fredj et al., 2013</i>
	VP2-3	DC-VP2-585 F 1	AGAATTAATGCGGACAGGCG	2223-2243	464	<i>Cowley et al., 2013</i>
		VP2RV3 Rev end	GGTCATATCTCCACARTGG	2669-2687		<i>Rippinger et al., 2010</i>

VP3	VP3-1	ma31 VP3F	GGCTATTAAGCAATAYYAGTAG	1-23	246	<i>This study</i>
		TUN1_VP3_167R	TTTCTACTGCAGCTATGCCAG	225-245		<i>Ben Hadj Fredj et al., 2013</i>
	VP3-2	Gen_VP3_24F	TGYGTTTACCTCTGATGGTG	24-44	483	<i>Ben Hadj Fredj et al., 2013</i>
		CD-G10P14-VP3-509R	CATCATCATCCGTAGCCG	488-506		<i>Cowley et al., 2013</i>
	VP3-3	ma31 VP3F1	TTTCGTTTAGATGCCAGAATG	469-489	616	<i>This study</i>
		ma31VP3R1	CTATCTGTCTTATATCTACA	1063-1084		<i>This study</i>
	VP3-4	ma31Cons VP3F1	AARACRTRGTATCRGATCAT	660-680	430	<i>This study</i>
		ma31VP3R1	CTATCTGTCTTATATCTACA	1070-1090		<i>This study</i>
	VP3-5	CD-G10P14-VP3-917F	ATCAGCACCATCGTACTGGA	908-927	1054	<i>Cowley et al., 2013</i>
		B383_VP3_1959R	GGTGAGTGTAAGTATATCCATCG	1939-1960		<i>Louge Uriarte et al., 2014</i>
	VP3-6	ma31Cons VP3F2	ACTTCKTAYTCAGTTAYATT	1804-1823	537	<i>This study</i>
		ma31ConsVP3R2	GCGGTACTTTAACATCR TAYT	2325-2340		<i>This study</i>
	VP3-7	CD-G10P14-VP3-917F	ATCAGCACCATCGTACTGGA	908-927	1685	<i>Cowley et al., 2013</i>
		VP3R primer	TCACATCATGACYAGTGTGTTAAG	2569-2592		<i>Fujii et al., 2012</i>
VP3-8	ma31Cons VP3F2	ACTTCKTAYTCAGTTAYATT	1804-1823	795	<i>This study</i>	
	VP3R primer	TCACATCATGACYAGTGTGTTAAG	2569-2592		<i>Fujii et al., 2012</i>	
NSP1	NSP1-1	NSPIF	GGCTTTTTTATGAAAAGCTCTGTG	1-25	1547	<i>Fujii et al., 2012</i>
		NSP1 R	CTAGGCGCTACTCTAGT	1531-1547		<i>Fujii et al., 2012</i>
	NSP1-2	ma31 NSPIF	ATGAAGTGAATATGTGCTG	1242-1261	345	<i>This study</i>
Gen_NSP1R-RC		GGTCACATTTTATGCTGCC	1568-1586	<i>Ben Hadj Fredj et al., 2013</i>		
NSP2		NSP2 F primer	GGCTTTTAAAGCGTCTCAGTC	1-19	1058	<i>Fujii et al., 2012</i>
		NSP2 R primer	GGTCACATAAGCGCTTCTATTC	1036-1058		<i>Fujii et al., 2012</i>
NSP3		NSP3 F primer	GGCTTTAATGCTTTCAGTGGTTG	1-25	1078	<i>Fujii et al., 2012</i>
		NSP3 R primer	GGTCACATAACGCCCTATAGC	1057-1078		<i>Fujii et al., 2012</i>
NSP4		NSP4F	GGCTTTTAAAGTTCTGTTCCGAG	1-24	751	<i>Ben Hadj Fredj et al., 2013</i>
		NSP4R	GGTCACATCAAGACCATTCC	732-751		<i>Ben Hadj Fredj et al., 2013</i>
NSP5	NSP5-1	NSP5 F primer	GGCTTTTAAAGCGCTACAGT	1-20	667	<i>Fujii et al., 2012</i>
		NSP5 R primer	GGTCACAAAACGGGAGTGGGGA	646-667		<i>Fujii et al., 2012</i>
	NSP5-2	NSP5 F primer	GGCTTTTAAAGCGCTACAGT	1-20	314	<i>Fujii et al., 2012</i>
		LAP_NSP5_314R	CGTGATTGTGTTGATGAATCC	294-314		<i>Ben Hadj Fredj et al., 2013</i> <i>Louge Uriarte et al., 2014</i>
	NSP5-3	Goat_NSP5_217F	GCTTCAAACGACCCACTCA	217-235	451	<i>Louge Uriarte et al., 2014</i>
		NSP5 R primer	GGTCACAAAACGGGAGTGGGGA	646-667		<i>Fujii et al., 2012</i>

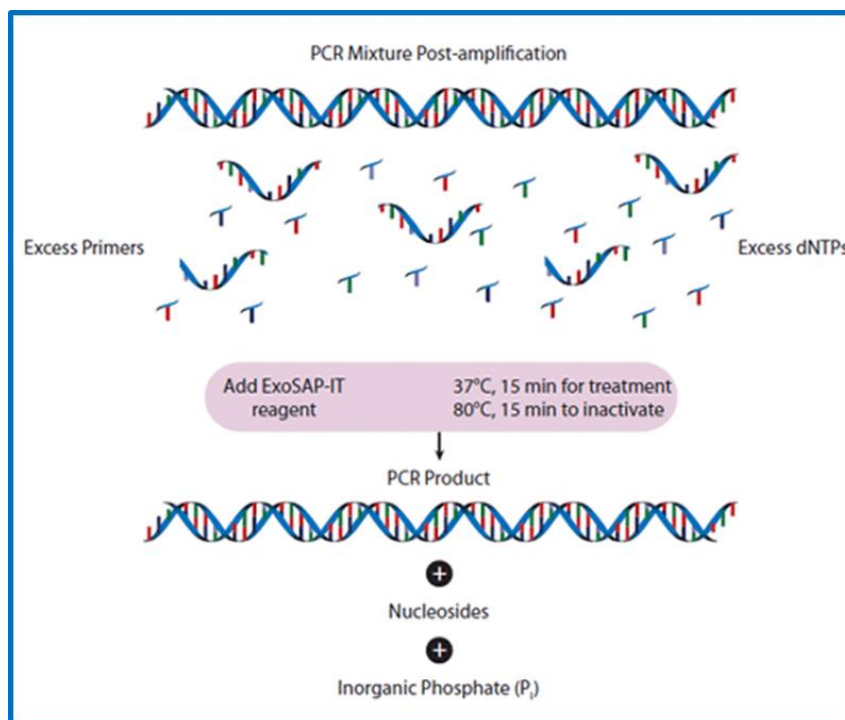
ANNEXE IV**Protocole du Kit « MyFi Mix » utilisé pour l'amplification des 11 segments de la souche ma31****Mix PCR**

Réactifs (MyFi DNA polymerase kit de Bioline)	Quantité pour 1 tube
2x buffer	10µl
Amorces F 10µM	2µl
Amorces R 10µM	2µl
cDNA	2,5µl
H2O	8,5µl

Volume total de la réaction est 25µl

ANNEXE V**Protocole de purification des produits PCR par le kit de purification ExoSAP-IT**

- 1- Retirez le réactif ExoSAP-IT™ du congélateur et conservez-le dans de la glace tout au long de la manipulation.
- 2- Mélangez 5 µl du produit PCR avec 2 µl du réactif ExoSAP-IT™ pour obtenir un volume réactionnel de 7 µl.
- 3- Incuber à 37°C pendant 15 minutes pour dégrader les amorces et les nucléotides restants.
- 4- Incuber à 80°C pendant 15 minutes pour inactiver le réactif ExoSAP-IT™.
- 5- Le produit PCR est maintenant prêt à être utilisé pour le séquençage de l'ADN, les analyses SNP ou d'autres applications d'extension d'amorces. Les produits PCR traités peuvent être stockés à -20°C jusqu'à ce qu'ils soient nécessaires.

**Schéma de purification des produits PCR par ExoSAP-IT**

ANNEXE VI**Les amorces utilisées pour le séquençage des 11 segments du génome de la souche ma31**

Gene segment	Primer Name	Sequence (5'-3')	Reference
VP7	VP7 F Primer	GGCTTTAAAAAGMGAGAATTTC	<i>Fujii et al., 2012</i>
	MW-8 (G type G8) Reverse	TCTTCAAAGTCGTAGTG	<i>WHO, 2009</i>
	VP7-Rdeg Reverse	AACTTGCCACCATYTYTTCC	<i>WHO, 2009</i>
	9con1-L Forward	TAGTCCTTTTAAATGTATGGTAT	<i>WHO, 2009</i>
	VP7 R primer	GGTCACATCATAACAATTCT	<i>Fujii et al., 2012</i>
VP4	VP4 P14 1F	GGCTATAAAATGGCTTCTTT	<i>Fukai et al., 2004</i>
	VP4P14 2R	AAAGATGGTTCACCTAACAGC	<i>Fukai et al., 2004</i>
	CD-VP4-P[14] 1191 F	CCAGTAATGAGTGGTGGC	<i>Cowley et al., 2013</i>
	VP4P[14] 3F	ATGTCAGATGCGGCTTCTTC	<i>Fukai et al., 2004</i>
	VP4P[14] 3R	GGTCACATCYTWARCAGACAG	<i>Fukai et al., 2004</i>
	P 4943 (P[14]) reverse	GGTGTAGTTCCTGCGTA	<i>WHO, 2009</i>
	SE1P[14] reverse	CTCTGCTACTCTACCTATTG	<i>WHO, 2009</i>
	DC VP4-585F	TACACTGCCGACAGATTTCG	<i>Cowley et al., 2013</i>
VP6	VP6F primer	GGCTTTWAAACGAAGTCTTC	<i>Fujii et al., 2012</i>
	VP6 R primer	GGTCACATCCTCTCACT	<i>Fujii et al., 2012</i>
	CDG10P[14]-VP6- 521R	CAGTGTAATGACGCTGAA	<i>Cowley et al., 2013</i>
	CDG10P[14]-VP6- 700F	CCAGATGCAGAAAGATTAG	<i>Cowley et al., 2013</i>
	E 403-VP6-1192F	TGGCTTCCATTAGAAGCATGC	<i>Ben Hadj Fredj et al., 2013</i>
VP1	GEN_VP1Fb	GGCTATTAAGCTRTACAATGGGGAAG	<i>Matthijnssens et al., 2008a</i>
	VP1P2 R	GGCATCCAACATTTTCTGCT	<i>Ramani et al., 2009</i>
	26097_VP1_269R	GCGTTATACTTATCATACGAATACG	<i>Ben Hadj Fredj et al., 2013</i>
	MG6_VP1_447F	TGCAGTTATGTTCTGGTTGG	<i>Ben Hadj Fredj et al., 2013</i>
	VP1G1 F	CGAGCNATAGTTCNGACCA	<i>Ramani et al., 2009; Louge Uriarte et al., 2014</i>
	ma31-VP1-1486F	ATGCTGAGTCTATTCACAGTC	<i>This study</i>
	ma31-VP1-1980R	GTCGTTTGATACATCTTGAACC	<i>This study</i>
	VP1G5 F	GCAGCKAATTCAATAGCRAA	<i>Ramani et al., 2009; Louge Uriarte et al., 2014</i>
	CD-VP1-2544 F	TGCACCAATATCACTTGAC	<i>Cowley et al., 2013</i>
	CD-VP1-2805 R	GCTGATTTTGAACCGTC	<i>Cowley et al., 2013</i>
	30-96_VP1_3163F	GGATCATGGATAAGCTTGTTCTG	<i>Ben Hadj Fredj et al., 2013</i>
	Gen_VP1Rb	GGTCACATCTAAGCGYTCTAATCTTG	<i>Ben Hadj Fredj et al., 2013</i>

VP2	VP2RV3 FWD Start	GGCTATTRAAGGYTCAATGG	<i>Rippinger et al., 2010</i>
	260-97 VP2 744R	GTA CTCTTTGTCTCATTTC CGC	<i>Ben Hadj Fredj et al., 2013</i>
	260-97 VP2 345R	GACTCTTTTGGTTCGAAAGTAGG	<i>Ben Hadj Fredj et al., 2013</i>
	VP2G1 F	TCATTAATTCAGGYATGTGG	<i>Ramani et al., 2009</i>
	VP2P2 R	AACAAAATGYAGCCAATTC	<i>Ramani et al., 2009</i>
	CD-VP2-2100 R	GCACGTTCTATYTGATCC	<i>Cowley et al., 2013</i>
	DC-VP2-585 F 1	AGAATTAATGCGGACAGGCG	<i>Cowley et al., 2013</i>
	LAP VP2 2543F	GACATCAAATCTTACCTTCACTG	<i>Ben Hadj Fredj et al., 2013</i>
	VP2 R primer	TTGGCGTTTACARTTCGTCA	<i>Fujii et al., 2012</i>
VP3	ma31 VP3F	GGCTATTAAGCAATAYYAGTAG	<i>This study</i>
	TUN1 VP3 167R	TTTCTACTGCAGCTATGCCAG	<i>Ben Hadj Fredj et al., 2013</i>
	Gen VP3 24F	TGYGTTTTACCTCTGATGGTG	<i>Ben Hadj Fredj et al., 2013</i>
	CD-G10P14-VP3-509R	CATCATCATCCGTAGCCG	<i>Cowley et al., 2013</i>
	ma31 VP3F1	TTTCGTTTAGATGCCAGAATG	<i>This study</i>
	ma31VP3R1	CTATCTGTTCTTATATCTACA	<i>This study</i>
	CD-G10P14-VP3-917F	ATCAGCACCATCGTACTGGA	<i>Cowley et al., 2013</i>
	B383 VP3 1959R	GGTGAGTGAAGTATATCCATCG	<i>Louge Uriarte et al., 2014</i>
	ma31 cons-VP3-F2	ACTTCKTAYTCAGGTTAYATT	<i>This study</i>
VP3R primer	TCACATCATGACYAGTIGGTTAAG	<i>Fujii et al., 2012</i>	
NSP1	Gen NSP1 F	GGCTTTTTTTTATGAAAAGTCTTG	<i>Ben Hadj Fredj et al., 2013</i>
	CD-G10P14-NSP1-531 R	CCTGCTCCATAAAATCATAG	<i>Cowley et al., 2013</i>
	ma31 NSP1F	ATGAAGTGGAAATATGTGCTG	<i>This study</i>
	NSP1 R	CTAGGCGCTACTCTAGT	<i>Fujii et al., 2012</i>
	Gen NSP1R-RC	GGTCACATTTTATGCTGCC	<i>Ben Hadj Fredj et al., 2013</i>
NSP2	NSP2 F	GGCTTTTAAAGCGTCTCAGTC	<i>Ben Hadj Fredj et al., 2013</i>
	POR NSP2 132R	ACTTTTGCTGTCAACATGC	<i>Ben Hadj Fredj et al., 2013</i>
	DC-NSP2 585F	ATGAAGCGGGAGAGTAATCC	<i>Fujii et al., 2012</i>
	NSP2 R	GGTCACATAAGCGCTTTCTATT	<i>Fujii et al., 2012</i>
NSP3	NSP3 F primer	GGCTTTTAAATGCTTTTTCAGTGGTTG	<i>Fujii et al., 2012</i>
	Au-1 NSP3 519R	ACTTCCATTTTCTTCAACGA	<i>Ben Hadj Fredj et al., 2013</i>
	TUN1 NSP3 786F	GCCTGATGAAATTAAGACGGAC	<i>Ben Hadj Fredj et al., 2013</i>
	NSP3 R primer	GGTCACATAACGCCCTATAGC	<i>Fujii et al., 2012</i>
	Gen NSP3R	ACATAACGCCCTATAGC	<i>Ben Hadj Fredj et al., 2013</i>
NSP4	NSP4F	GGCTTTTAAAGTCTGTCCGAG	<i>Ben Hadj Fredj et al., 2013</i>
	C4 NSP4 564F	ATGTAAGAGTTGAGCTGC	<i>Mathijnssens et al. 2006b</i>
	NSP4R	GGTCACATCAAGACCATTCC	<i>Ben Hadj Fredj et al., 2013</i>
	GEN NSP4R	GGWYACRYTAAGACCRITCC	<i>Mathijnssens et al. 2006a</i>
NSP5	NSP5 F primer	GGCTTTTAAAGCGCTACAGT	<i>Fujii et al., 2012</i>
	Goat NSP5 217F	GCTTCAAACGACCCACTCA	<i>Louge Uriarte et al., 2014</i>
	LAP NSP5 314R	CGTGATTGTGTGATGAATCC	<i>Ben Hadj Fredj et al., 2013 ; Louge Uriarte et al., 2014</i>
	NSP5 R primer	GGTCACAAAACGGGAGTGGGGA	<i>Fujii et al., 2012</i>

ANNEXE VII

Purification des produits de la réaction de séquence par gel-filtration sur résine Sephadex® G-50 Super fine

Cette étape a pour but de purifier par gel-filtration les produits de réaction de séquence avant injection sur le séquenceur capillaire.

La résine Sephadex® G50 utilisée permet de dé-saler les échantillons et d'éliminer les nucléotides non incorporés et les amorces de PCR en excès.

La limite d'exclusion de la résine G50 est d'environ 20 bases. La plaque 96 puits MultiScreen HV est utilisée comme support inerte de la résine G50.

Préparation des colonnes

La purification se fait sur colonnes de résine Sephadex® G50 dans les plaques MultiScreen :

- Charger la résine sèche Sephadex® G-50 Superfine dans les puits d'une plaque MultiScreen
- Ajouter 300 µl d'eau ultra pure dans chaque puits contenant de la résine, fermer la plaque avec son couvercle et laisser incuber 3 heures à température ambiante. Une fois que les mini-colonnes sont gonflées dans la plaque MultiScreen, elles peuvent être stockées à 4 °C.
- Placer la plaque MultiScreen HV sur une plaque de micro-titration au format standard 96 puits et centrifuger l'ensemble 5 minute à 910 g pour éliminer l'eau et compacter les mini-colonnes.

Filtration des produits de la réaction de séquence

Le produit de la réaction de séquence est si besoin dilué avec un volume d'eau ultra pure. Déposer délicatement les échantillons à purifier au centre des mini-colonnes. Placer la plaque MultiScreen sur une plaque de polypropylène au format standard 96 et centrifuger 5 minutes à 910 g. Les filtrats contiennent les produits purifiés dans l'eau.

ANNEXE VIII

Valeurs seuils du pourcentage d'identité des nucléotides définissant les génotypes pour les 11 segments de gènes de rotavirus (d'après J. Matthijssens, M. Ciarlet et al. 2008)

Gene product	Percentage identity cut-off values	Genotypes	Name of genotypes
VP7	80%	19G	Glycosylated
VP4	80%	27P	Protease sensitive
VP6	85%	11I	Inner capsid
VP1	83%	4R	RNA-dependent RNA polymerase
VP2	84%	5C	Core protein
VP3	81%	6M	Methyltransferase
NSP1	79%	14A	Interferon Antagonist
NSP2	85%	5N	NTPase
NSP3	85%	7T	Translation enhancer
NSP4	85%	11E	Enterotoxin
NSP5	91%	6H	pHosphoprotein

ANNEXE IX

Dosage des ARN extraits à partir des selles collectés en 2012 et 2014 à Bouaarfa



Sample Type: RNA-40 All Active On/Off nm 1: 260 Units: ng/ul


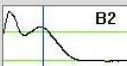


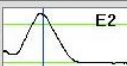
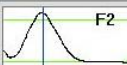
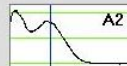
Active <input type="checkbox"/>	# 1		A2	Sample # 1	nm 1 abs. 2,331	A-260 2,331	ng/ul
Sample ID	S7			A-280 0,687	260/280 3,39	260/230 0,57	93,25
Active <input type="checkbox"/>	# 1		B2	Sample # 1	nm 1 abs. 2,885	A-260 2,885	ng/ul
Sample ID	S8			A-280 0,973	260/280 2,96	260/230 0,76	115,4
Active <input type="checkbox"/>	# 1		C2	Sample # 1	nm 1 abs. 1,630	A-260 1,630	ng/ul
Sample ID	S9			A-280 0,409	260/280 3,99	260/230 0,62	65,19
Active <input type="checkbox"/>	# 1		D2	Sample # 1	nm 1 abs. 1,496	A-260 1,496	ng/ul
Sample ID	S12			A-280 0,424	260/280 3,53	260/230 0,26	59,85
Active <input type="checkbox"/>	# 1		E2	Sample # 1	nm 1 abs. 2,492	A-260 2,492	ng/ul
Sample ID	S15			A-280 0,802	260/280 3,11	260/230 5,62	99,67
Active <input type="checkbox"/>	# 1		F2	Sample # 1	nm 1 abs. 2,328	A-260 2,328	ng/ul
Sample ID	S18			A-280 0,873	260/280 2,67	260/230 9,05	93,12

Plate ID: Measurement complete. Idle

Sample Type: RNA-40 All Active On/Off nm 1: 260 Units: ng/ul

Active <input type="checkbox"/>	# 1		A2	Sample # 1	nm 1 abs. 0,800	A-260 0,800	ng/ul
Sample ID	S19			A-280 0,278	260/280 2,87	260/230 0,87	32,01

ANNEXE X

Les amorces utilisées pour amplifier les 11 segments du génome des souches S18 et S19

Gene segment	Fragment Name	Primer Name	Sequence (5'-3')	Position	Amplicon bp	Reference
VP7	-	VP7 F Primer (S18)	GGCTTTAAAAGMGAGAATTTC	1-22	1062	<i>Fujii et al., 2012</i>
		VP7 R Primer (S18)	GGTCACATCATACAATTCT	1043-1062		<i>Fujii et al., 2012</i>
	-	Beg9 primer (S19)	GGCTTTAAAAGAGAGAATTTC	1-23	1062	<i>Cowley et al., 2013</i>
		End9 primer (S19)	GGTCACATCATACAATTCTAATCTAAG	1035-1062		<i>Cowley et al., 2013</i>
VP4	VP4-1	VP4P[14]1F	GGCTATAAAATGGCTTCTTT	1-20	1319	<i>Fukai et al., 2004</i>
		VP4P[14]2R	AAAGATGGTTCCTAACAGC	1300-1319		<i>Fukai et al., 2004</i>
	VP4-2	CD-VP4-P[14] 1191 F	CCAGTAATGAGTGGTGCC	1192-1209	1169	<i>Cowley et al., 2013</i>
		VP4P[14] 3R	GGTCACATCYTWARCAGACAG	2341-2361		<i>Fukai et al., 2004</i>
	VP4-3	VP4P[14] 3F	ATGTCAGATGCGGCTTCTTC	1711-1730	650	<i>Fukai et al., 2004</i>
		VP4P[14] 3R	GGTCACATCYTWARCAGACAG	2341-2361		<i>Fukai et al., 2004</i>
	VP4-4 (S19)	VP4 P[14] 1F	GGCTATAAAATGGCTTCTTT	1-20	554	<i>Fukai et al., 2004</i>
		P 4943 (P[14]) reverse	GGTGTAGTTCCTGCGTA	535-554		<i>WHO, 2009</i>
	VP4-5 (S18)	LAP_VP4_788F	CCTGTGGAAGAAATGC	788-805	532	<i>Ben Hadj Fredj et al., 2013</i>
		VP4P[14] 2R	AAAGATGGTTCCTAACAGC	1300-1319		<i>Fukai et al., 2004</i>
	VP4-6 (S19)	DC-VP4 585F	TACTGCGCCAGAGATTTCG	988-1007	1373	<i>Cowley et al., 2013</i>
		VP4P[14] 3R	GGTCACATCYTWARCAGACAG	2341-2361		<i>Fukai et al., 2004</i>
VP6	-	VP6F primer	GGCTTTWAAACGAAGTCTTC	1-20	1355	<i>Fujii et al., 2012</i>
		VP6 R primer	GGTCACATCCTCTCACT	1340-1355		<i>Fujii et al., 2012</i>
VP1	VP1-1	GEN_VP1Fb	GGCTATTAAGCTRTACAATGGGGAAG	1-27	1044	<i>Matthijnssens et al., 2008a</i>
		VP1P2 R	GGCATCCAACATTTTCTGCT	1025-1045		<i>Ramani et al., 2009</i>
	VP1-2	GEN_VP1Fb	GGCTATTAAGCTRTACAATGGGGAAG	1-27	1009	<i>Matthijnssens et al., 2008a</i>
		Lama_VP1_1009R	GAAAYGACCAYGAATATATTTAGCC	984-1009		<i>Louge Uriarte et al., 2014</i>
	VP1-3	MG6_VP1_447F	TGCAGTTATGTTCTGGTGG	446-466	598	<i>Ben Hadj Fredj et al., 2013</i>
		VP1P2 R	GGCATCCAACATTTTCTGCT	1025-1045		<i>Ramani et al., 2009</i>
	VP1-4	VP1G1 F	CGAGCNATAGTTCNGACCA	847-867	1157	<i>Ramani et al., 2009; Louge Uriarte et al., 2014</i>
		VP1G6 R	ATTCGCGCRTAYGTTTCTCT	1984-2003		<i>Ramani et al., 2009; Louge Uriarte et al., 2014</i>
	VP1-5	VP1G5 F	GCAGCKAATTAATAGCRAA	1810-1829	995	<i>Ramani et al., 2009; Louge Uriarte et al., 2014</i>
		CD-VP1-2805 R	GCTGATTTGAACCGTC	2788-2805		<i>Cowley et al., 2013</i>
	VP1-6 (S18)	CD-VP1-2544 F	TGCACCAATATCACTTGAC	2544-2562	759	<i>Cowley et al., 2013</i>
		Gen_VP1Rb	GGTCACATCTAAGCGYTCTAATCTTG	3276-3302		<i>Ben Hadj Fredj et al., 2013</i>
	VP1-7 (S19)	VP1 G5F	GCAGCKAATTAATAGCRAA	1810-1829	1493	<i>Ramani et al., 2009; Louge Uriarte et al., 2014</i>
		Gen_VP1Rb	GGTCACATCTAAGCGYTCTAATCTTG	3276-3302		<i>Ben Hadj Fredj et al., 2013</i>

VP2	VP2-1 (S19)	B383 VP2_1747F	GTAACTTCGGTTACATCGC	1747-1767	941	<i>Matthijssens et al. 2009</i>
		B383 VP2_2689R	GTCATATCTCCACAATGGGG	2669-2689		<i>Matthijssens et al. 2009</i>
	VP2-2 (S19)	FR5_VP2_23F	TACAGGAAACGTGGAGCG	23-40	1419	<i>Louge Uriarte et al., 2014</i>
		VP2P2R	AACAAAATGYAGCCAATTC	1423-1441		<i>Louge Uriarte et al., 2014</i>
	VP2-3 (S19)	VP2 G1F	TCATTAATTCAGGYATGTGG	1223-1244	878	<i>Louge Uriarte et al., 2014</i>
		CD-VP2-2100R	GCACGTTCTATYTGATCC	2083-2100		<i>Louge Uriarte et al., 2014</i>
	VP2-4 (S18)	VP2 F primer	GGCTATTAAGGCTCAATGG	1-20	2666	<i>Fujii et al., 2012</i>
		VP2 R primer	TTGGCGTTACARTTCGTCA	2645-2666		<i>Fujii et al., 2012</i>
VP3	VP3-1	ma31 VP3F	GGCTATTAAGCAATAYYAGTAG	1-23	246	<i>Alaoui Amine et al. 2019</i>
		TUN1_VP3_167R	TTTCTACTGCAGCTATGCCAG	225-245		<i>Ben Hadj Fredj et al., 2013</i>
	VP3-2	S19 consensus VP3F	TAAGAAAGTRGTGAGAATAGA	2464-2485	130	<i>This study</i>
		VP3R primer	TCACATCATGACYAGTGTGTTAAG	2569-2592		<i>Fujii et al., 2012</i>
	VP3-3	Gen_VP3_24F	TGYGTTTTACCTCTGATGGTG	24-44	483	<i>Ben Hadj Fredj et al., 2013</i>
		CD-G10P[14]-VP3-509R	CATCATCATCCGTAGCCG	488-506		<i>Cowley et al., 2013</i>
	VP3-4	Gen_VP3_24F	TGYGTTTTACCTCTGATGGTG	24-44	483	<i>Ben Hadj Fredj et al., 2013</i>
		CD- G10P[14] - VP3 509R	CATCATCATCCGTAGCCG	491-509		<i>Cowley et al., 2013</i>
	VP3-5	MG6-VP3 488F	GCAGCTACAGATGATGATGC	488-508	1288	<i>Ben Hadj Fredj et al., 2013</i>
		CD- G10P[14] - VP3 1776R	CGTATTTGATGCGACCGT	1758-1776		<i>Louge Uriarte et al., 2014</i>
	VP3-6	CD-G10P[14] - VP3-917F	ATCAGCACCATCGTACTGGA	917-937	859	<i>Cowley et al., 2013</i>
		CD- G10P[14] - VP3 1776R	CGTATTTGATGCGACCGT	1758-1776		<i>Louge Uriarte et al., 2014</i>
	VP3-7	CD-G10P[14] - VP3-917F	ATCAGCACCATCGTACTGGA	917-937	1043	<i>Cowley et al., 2013</i>
		B383_VP3_1959R	GGTGAGTGTAAGTATATCCATCG	1939-1960		<i>Louge Uriarte et al., 2014</i>
	VP3-8	CD-G10P[14] - VP3-917F	ATCAGCACCATCGTACTGGA	917-937	1675	<i>Cowley et al., 2013</i>
		VP3R primer	TCACATCATGACYAGTGTGTTAAG	2569-2592		<i>Fujii et al., 2012</i>
	VP3-9	S18VP3F1	TGGAAACTGACGTATGTTGGA	413-433	533	<i>This study</i>
		S18 consensus VP3 R2	CACATCRTATATCCAGTAYGA	925-946		<i>This study</i>
	VP3-10	S18VP3F1	TGGAAACTGACGTATGTTGGA	413-433	683	<i>This study</i>
		S18 VP3R2	CTTCTCTATCCGTTCTGATAT	1075-1095		<i>This study</i>
VP3-11	S18 consensus VP3 F1	AARACRTTRGTATCRGATCAT	660-678	285	<i>This study</i>	
	S18 consensus VP3 R2	CACATCRTATATCCAGTAYGA	925-946		<i>This study</i>	
VP3-12	S18 VP3 F2	TCAGGTTATATTTTAGAGAT	1812-1832	529	<i>This study</i>	
	S18 consensus VP3 R3	GCGGTACTTTAACATCRTAYT	2324-2340		<i>This study</i>	
VP3-13	S18 VP3 F2	TCAGGTTATATTTTAGAGAT	1812-1832	780	<i>This study</i>	
	VP3R primer	TCACATCATGACYAGTGTGTTAAG	2569-2592		<i>Fujii et al., 2012</i>	

NSP1	NSP1-1	NSP1F	GGCTTTTTTATGAAAAGTCTGTG	1-25	1559	<i>Fujii et al., 2012</i>
		NSP1 R	CTAGGCGCTACTCTAGT	1544-1560		<i>Fujii et al., 2012</i>
	NSP1-2	26097NSP1 GenF	CATGGCGACTTTAARGATGC	165-186	1344	<i>Mathijnssens et al., 2011b</i>
		26097NSP1 GenR	YCTAGGCGCTACTCTAGTG	1489-1508		<i>Mathijnssens et al., 2011b</i>
	NSP1-3	S19 NSP1 1F	ATGAATGGAAGCATTCCAAGG	1310-1330	277	<i>This study</i>
		Gen NSP1 R-RC	GGTCACATT TTATGCTGC C	1568-1586		<i>Ben Hadj Fredj et al., 2013</i>
	NSP1-4	S19 NSP1 2F	CGACTGGTTTGATATAAGAT	1378-1397	182	<i>This study</i>
		NSP1 R	CTAGGCGCTACTCTAGT	1544-1560		<i>Fujii et al., 2012</i>
	NSP1-5	S19 NSP1 2F	CGACTGGTTTGATATAAGAT	1378-1397	150	<i>This study</i>
		Consensus NSP1 R2	GTAGTTGTGACYATATTTAYT	1510-1528		<i>This study</i>
	NSP1-6	S19 NSP1 1F	ATGAATGGAAGCATTCCAAGG	1310-1330	250	<i>This study</i>
		NSP1 R	CTAGGCGCTACTCTAGT	1544-1560		<i>Fujii et al., 2012</i>
	NSP1-7	S18 NSP1 F	GACGTCAACAACAAATCAACT	1420-1440	108	<i>This study</i>
		Consensus NSP1 R2	GTAGTTGTGACYATATTTAYT	1510-1528		<i>This study</i>
	NSP1-8	S18 NSP1 F	GACGTCAACAACAAATCAACT	1420-1440	166	<i>This study</i>
		Gen NSP1 R-RC	GGTCACATT TTATGCTGC C	1568-1586		<i>Ben Hadj Fredj et al., 2013</i>
	NSP1-9	S18 NSP1 F	GACGTCAACAACAAATCAACT	1420-1440	140	<i>This study</i>
		NSP1 R	CTAGGCGCTACTCTAGT	1544-1560		<i>Fujii et al., 2012</i>
NSP2	-	NSP2 F primer	GGCTTTTAAAGCGTCTCAGTC	1-19	1058	<i>Fujii et al., 2012</i>
		NSP2 R primer	GGTCACATAAGCGCTTCTATTC	1036-1058		<i>Fujii et al., 2012</i>
NSP3	-	NSP3 F primer	GGCTTTTAAATGCTTTTCAGTGGTTG	1-25	1078	<i>Fujii et al., 2012</i>
		NSP3 R primer	GGTCACATAACGCCCTATAGC	1057-1078		<i>Fujii et al., 2012</i>
NSP4	-	NSP4F	GGCTTTTAAAAGTTCTGTTCCGAG	1-24	751	<i>Ben Hadj Fredj et al., 2013</i>
		NSP4R	GGTCACATCAAGACCATTCC	732-751		<i>Ben Hadj Fredj et al., 2013</i>
NSP5	NSP5-1	NSP5 F primer	GGCTTTTAAAGCGCTACAGT	1-20	667	<i>Fujii et al., 2012</i>
		NSP5 R primer	GGTCACAAAACGGGAGTGGGGA	646-667		<i>Fujii et al., 2012</i>
	NSP5-2	NSP5 F primer	GGCTTTTAAAGCGCTACAGT	1-20	314	<i>Fujii et al., 2012</i>
		LAP_NSP5_314R	CGTGATTGTGTTGATGAATCC	294-314		<i>Ben Hadj Fredj et al., 2013</i> <i>Louge Uriarte et al., 2014</i>
	NSP5-3	Goat_NSP5_217F	GCTTCAAACGACCCACTCA	217-235	451	<i>Louge Uriarte et al., 2014</i>
		NSP5 R primer	GGTCACAAAACGGGAGTGGGGA	646-667		<i>Fujii et al., 2012</i>

Matthijnssens et al. (2008a) : Matthijnssens, J., Max Ciarlet, M., Heiman, E., Arijs, I., Delbeke, T., McDonald, S.M., Palombo, E.A., Iturriza-Gómara, M., Maes, P., Patton, J.T., Rahman, M., Van Ranst, M., **2008a**. Full genome-based classification of rotaviruses reveals a common origin between human Wa-like and porcine rotavirus strains and human DS-1-like and bovine rotavirus strains. *J. Virol.* 82, 3204–3219.

Matthijnssens et al. (2011b) : Matthijnssens, J., De Grazia, S., Piessens, J., Heylen, E., Zeller, M., Giammanco, G.M., Ba'nyai, K., Buonavoglia, C., Ciarlet, M., Martella, V., Van Ranst, M., **2011b**. Multiple reassortment and interspecies transmission events contribute to the diversity of feline, canine and feline/ canine-like human group A rotavirus strains. *Infect. Genet. Evol.* 11, 1396–1406.

ANNEXE XI

Les amorces utilisées pour séquencer les 11 segments du génome des souches S18 et S19

Gene segment	Primer Name	Sequence (5'-3')	Reference
VP7	VP7 F Primer	GGCTTTAAAAGMGAGAATTTC	<i>Fujii et al., 2012</i>
	DC VP7-585R	TGATACATCCATCGATCCAG	<i>Cowley et al., 2013</i>
	VP7-Rdeg Reverse	AACTTGCCACCATYTYTTC	<i>WHO, 2009</i>
	VP7-G10F (S19)	ATGTCAGACTACARATACTGG	<i>WHO, 2009</i>
	PA169-VP7-895F	AGAATGATGCGAGTGAATTGG	<i>Ben Hadj Fredj et al., 2013</i>
	9-Con2R (S18)	GTATAAAATACTTGCCACCA	<i>WHO, 2009</i>
	DC-VP7-585F (S18)	ATCTGATCCAACGACTGCTC	<i>Cowley et al., 2013</i>
VP4	VP4 P14 1F	GGCTATAAAATGGCTTCTTT	<i>Fukai et al., 2004</i>
	VP4P14 2R	AAAGATGGTTCACCTAACAGC	<i>Fukai et al., 2004</i>
	CD-VP4-P[14] 1191 F (S18)	CCAGTAATGAGTGGTGGC	<i>Cowley et al., 2013</i>
	VP4P[14] 3F	ATGTCAGATGCGGCTTCTTC	<i>Fukai et al., 2004</i>
	VP4P[14] 3R	GGTCACATCYTWARCAGACAG	<i>Fukai et al., 2004</i>
	P 4943 (P[14]) reverse	GGTGTAGTTCCTGCGTA	<i>WHO, 2009</i>
	SEIP[14] reverse	CTCTGCTACTCTACCTATTTG	<i>WHO, 2009</i>
	DC VP4-585F	TACTGCGGACAGATTTTCG	<i>Cowley et al., 2013</i>
	VP4 R (S19)	GGGGGTCACATCCTC	<i>Fujii et al., 2012</i>
VP6	VP6F primer	GGCTTTWAAACGAAGTCTTC	<i>Fujii et al., 2012</i>
	VP6 R primer	GGTCACATCCTCTCACT	<i>Fujii et al., 2012</i>
	CDG10P[14]-VP6- 521R	CAGTGTAATGACGCTGAA	<i>Cowley et al., 2013</i>
	CDG10P[14]-VP6- 700F	CCAGATGCAGAAAGATTTAG	<i>Cowley et al., 2013</i>
	E 403-VP6-1192F	TGGCTCCATTAGAAGCATGC	<i>Ben Hadj Fredj et al., 2013</i>
VP1	GEN_VP1Fb	GGCTATTAAGCTRTACAATGGGGAAG	<i>Matthijnssens et al., 2008a</i>
	VP1P2 R	GGCATCCAACATTTCTGCT	<i>Ramani et al., 2009</i>
	26097_VP1_269R	GCGTTATACTATCATACGAATACG	<i>Ben Hadj Fredj et al., 2013</i>
	MG6_VP1_447F (S19)	TGCAGTTATGTTCTGGTTGG	<i>Ben Hadj Fredj et al., 2013</i>
	VP1G1 F	CGAGCNATAGTCCNGACCA	<i>Ramani et al., 2009; Louge Uriarte et al., 2014</i>
	Lap -VP1 1200F	GCTGTCAATGCATCAGC	<i>Ben Hadj Fredj et al., 2013</i>
	G8-VP1- 2121 R (S19)	CCATTGTGTGCTTTGACCC	<i>Louge Uriarte et al., 2014</i>
	VP1G5 F	GCAGCKAATTCAATAGCRAA	<i>Ramani et al., 2009; Louge Uriarte et al., 2014</i>
	CD-VP1-2805 R	GCTGATTTGAACCGTC	<i>Cowley et al., 2013</i>
	30-96_VP1_3163F	GGATCATGGATAAGCTTGTCTG	<i>Ben Hadj Fredj et al., 2013</i>
	Gen_VP1Rb	GGTCACATCTAAGCGYTCTAATCTTG	<i>Ben Hadj Fredj et al., 2013</i>

VP2	260-97_VP2_345R	GACTCTTTTGGTTCGAAAAGTAGG	<i>Ben Hadj Fredj et al., 2013</i>
	VP2G1 F	TCATTAATTCAGGYATGTGG	<i>Ramani et al., 2009</i>
	VP2P2 R	AACAAAATGYAGCCAATTC	<i>Ramani et al., 2009</i>
	CD-VP2-2100 R	GCACGTTCTATYTGATCC	<i>Cowley et al., 2013</i>
	DC-VP2-585 F 1 (S19)	AGAATTAATGCGGACAGGCG	<i>Cowley et al., 2013</i>
	B383-VP2-1747F	GTAACTTCGGTTACATCGC	<i>Matthijnssens et al. 2009</i>
	VP2 R primer (S18)	TTGGCGTTTACARTTCGTTCA	<i>Fujii et al., 2012</i>
	FR5 VP2-23F	TACAGGAAACGTGGAGCG	<i>Louge Uriarte et al., 2014</i>
	Lama VP2-917R (S19)	GYCTTAIRATCTAGCYGTTGATGG	<i>Matthijnssens et al. 2009</i>
	B383-VP2-2689R (S19)	GTCATATCTCCACAATGGGG	<i>Matthijnssens et al. 2009</i>
VP3	CD-G10P14-VP3-509R	CATCATCATCCGTAGCCG	<i>Cowley et al., 2013</i>
	Gen_VP3_24F	TGYGTTTTACCTCTGATGGTG	<i>Ben Hadj Fredj et al., 2013</i>
	MG6-VP3 488F (S19)	GCAGCTACAGATGATGATGC	<i>Ben Hadj Fredj et al., 2013</i>
	CD-G10P14-VP3-917F	ATCAGCACCATCGTACTGGA	<i>Cowley et al., 2013</i>
	CD- G10P[14] -VP3 1776R	CGTATTTGATGCGACCGT	<i>Louge Uriarte et al., 2014</i>
	B383_VP3_1959R	GGTGAGTGTAAGTATATCCATCG	<i>Louge Uriarte et al., 2014</i>
	VP3R primer	TCACATCATGACYAGTGTGTTAAG	<i>Fujii et al., 2012</i>
	Gen -VP3-2584R (S19)	TGACYAGTGTGTTAAGTTYTAGC	<i>Ben Hadj Fredj et al., 2013</i>
	S19 consensusVP3F	TAAGAAAGTRGTGAGAATAGA	<i>This study</i>
	S18 VP3R2	CTTCTCTATCCGTTCTGATAT	<i>This study</i>
	S18 consensus VP3 R2	CACATCRTATATCCAGTAYGA	<i>This study</i>
	S18 consensus VP3 F1	AARACRTTRGTATCRGATCAT	<i>This study</i>
	S18 consensus VP3 R3	GCGGTACTTTAACATCRTAYT	<i>This study</i>
	S18 VP3 F2	TCAGGTTATATTTTAGAGAT	<i>This study</i>
NSP1	Gen_NSP1 F	GGCTTTTTTTTATGAAAAGTCTTG	<i>Ben Hadj Fredj et al., 2013</i>
	CD-G10P14-NSP1-531 R	CCTGCTCCATAAAAATCATAG	<i>Cowley et al., 2013</i>
	NSP1 R	CTAGGCGCTACTCTAGT	<i>Fujii et al., 2012</i>
	NSP1F	GGCTTTTTTTTATGAAAAGTCTTG	<i>Fujii et al., 2012</i>
	26097NSP1 GenR (S18)	YCTAGGCGCTACTCTAGTG	<i>Matthijnssens et al. 2011b</i>
	S19 NSP1 1F	ATGAATGGAAGCATTCCAAGG	<i>This study</i>
	S18 NSP1 F	GACGTCAACAACAATCAACT	<i>This study</i>
	Consensus NSP1 R2	GTAGTTGTGACYATATTTAYT	<i>This study</i>

NSP2	NSP2 F	GGCTTTTAAAGCGTCTCAGTC	Ben Hadj Fredj et al., 2013
	POR_NSP2_132R	ACTTTTGCTGTCAACATGC	Ben Hadj Fredj et al., 2013
	DC-NSP2_585F	ATGAAGCGGGAGAGTAATCC	Fujii et al., 2012
	NSP2 R	GGTCACATAAGCGCTTCTATTTC	Fujii et al., 2012
	D2-25NSP2_471R (S19)	TGACCA ATAGCTATCAACACA G	Ben Hadj Fredj et al., 2013
	Lap NSP2-910F	ACTGTTCCAAAAGATGAAGC	Matthijssens et al. 2006a
NSP3	NSP3 F primer	GGCTTTTAATGCTTTTCAGTGGTTG	Fujii et al., 2012
	Au-1_NSP3_519R	ACTTCCATTTTCTTCAACGA	Ben Hadj Fredj et al., 2013
	TUN1_NSP3_786F	GCCTGATGAAATTAAGACGGAC	Ben Hadj Fredj et al., 2013
	NSP3 R primer	GGTCACATAACGCCCTATAGC	Fujii et al., 2012
	Gen_NSP3R (S19)	ACATAACGCCCTATAGC	Ben Hadj Fredj et al., 2013
NSP4	NSP4F	GGCTTTTAAAAGTTCTGTTCCGAG	Ben Hadj Fredj et al., 2013
	C4_NSP4_564F	ATGTAAGAGGTTGAGCTGC	Matthijssens et al. 2006b
	NSP4R	GGTCACATCAAGACCATTCC	Ben Hadj Fredj et al., 2013
	GEN_NSP4R	GGWYACRYTAAGACRRTTCC	Matthijssens et al. 2006a
NSP5	NSP5 F primer	GGCTTTTAAAGCGCTACAGT	Fujii et al., 2012
	Goat_NSP5_217F	GCTTCAAACGACCCACTCA	Louge Uriarte et al., 2014
	NSP5 R primer	GGTCACAAAACGGAGTGGGGA	Fujii et al., 2012

Matthijssens et al. (2006a) : Matthijssens, J., Rahman, M., Martella, V., Xuelei, Y., De Vos, S., De Leener, K., Ciarlet, M., Buonavoglia, C., Van Ranst, M., **2006a**. Full genomic analysis of human rotavirus strain B4106 and lapine rotavirus strain 30/96 provides evidence for interspecies transmission. *J. Virol.* 80, 3801–3810.

Matthijssens et al. (2006b) : Matthijssens, J., Rahman, M., Yang, X., Delbeke, T., Arijs, I., Kabue, J.P., Muyembe, J.J., Van Ranst, M., **2006b**. G8 rotavirus strains isolated in the Democratic Republic of Congo belong to the DS-1-like genogroup. *J. Clin. Microbiol.* 44, 1801–1809.

Matthijssens et al. (2008) : Matthijssens, J., Max Ciarlet, M., Heiman, E., Arijs, I., Delbeke, T., McDonald, S.M., Palombo, E.A., Iturriza-Gomara, M., Maes, P., Patton, J.T., Rahman, M., Van Ranst, M., **2008a**. Full genome-based classification of rotaviruses reveals a common origin between human Wa-like and porcine rotavirus strains and human DS-1-like and bovine rotavirus strains. *J. Virol.* 82, 3204–3219.

Matthijssens et al. (2011) : Matthijssens, J., De Grazia, S., Piessens, J., Heylen, E., Zeller, M., Giammanco, G.M., Ba'nyai, K., Buonavoglia, C., Ciarlet, M., Martella, V., Van Ranst, M., **2011b**. Multiple reassortment and interspecies transmission events contribute to the diversity of feline, canine and feline/ canine-like human group A rotavirus strains. *Infect. Genet. Evol.* 11, 1396–1406.

ANNEXE XII

Calcul du pourcentage de la nouvelle séquence pour chaque gène sur la base de la longueur nucléotidique des amorces utilisées pour le séquençage et la longueur du gène respectif obtenu

	Segments	Gene size obtained (bp)	Nucleotide length of primers used for sequencing	Length of the novel Sequence obtained without primers (bp)	Percentage of novel sequence (%)
Strain S18	NSP1	1586	147	1439	90.73
	NSP2	1059	103	956	90.27
	NSP3	1074	91	983	91.52
	NSP4	751	83	668	88.95
	NSP5	667	61	606	90.85
	VP1	3302	196	3106	94.06
	VP2	2687	140	2547	94.78
	VP3	2591	227	2364	91.23
	VP4	2361	157	2204	93.35
	VP7	1062	123	939	88.41
	VP6	1356	97	1259	92.84
Strain S19	NSP1	1586	128	1458	91.92
	NSP2	1059	125	934	88.19
	NSP3	1073	109	964	89.84
	NSP4	751	83	668	88.95
	NSP5	667	61	606	90.85
	VP1	3302	235	3067	92.88
	VP2	2687	184	2503	93.15
	VP3	2591	186	2405	92.82
	VP4	2361	154	2207	93.47
	VP7	1062	104	958	90.20
	VP6	1356	97	1259	92.84

RESUME

Le rotavirus est l'agent pathogène le plus fréquent des gastro-entérites de l'enfant de moins de 2 ans dans le monde, il est également responsable d'une morbidité et d'une mortalité importante chez les jeunes animaux d'espèces différentes.

Les rotavirus sont généralement spécifiques à une espèce, mais la transmission inter-espèces est possible. La surveillance des rotavirus en circulation dans la population humaine a révélé la présence de plusieurs génotypes peu communs.

C'est dans ce contexte que le présent travail fourni, pour la première fois, d'une part des données génétiques sur le génome complet de trois souches marocaines de rotavirus groupe A (RVA) d'origine animale et humaine avec établissement de leur constellation complète et leur phylogénie moléculaire. D'autre part, ce travail examine le potentiel de transmission zoonotique des rotavirus dans une perspective marocaine.

La première partie de ce travail rapporte le séquençage complet du génome d'une souche inhabituelle Marocaine (ma31). L'analyse a révélé la constellation G8-P[14]-I2-R2-C2-M2-A11-N2-T6-E2-H3, présente chez d'autres souches zoonotiques. L'analyse phylogénétique révèle une configuration génétique mixte provenant d'animaux et d'humains, ainsi que son potentiel zoonotique de transmission.

La deuxième partie consiste à identifier le RVA chez des chèvres et des veaux de nomades lors de deux épidémies de diarrhée sévère survenues en 2012 et 2014 à Bouaarfa. La caractérisation de la constellation génomique complète de deux souches bovines et caprines (S18 et S19) a permis d'établir leur parenté génétique avec la souche humaine Marocaine ma31. L'analyse phylogénétique a révélé une similarité partagée avec des souches d'origine animale et humaine. Nos résultats ont révélé des cas de transmission zoonotique et confirmé le risque d'émergence de nouveaux génotypes dans les régions nomades, d'où la nécessité de mettre en place :

- + Une épidémiosurveillance constante en médecine humaine et vétérinaire au Maroc à travers la création d'un système de surveillance des rotavirus circulants,
- + Un suivi permanent des génotypes
- + Elargissement de la surveillance des infections par les rotavirus aux animaux domestiques.

Mots-clés : Rotavirus groupe A, Analyse phylogénétique, Réassortiment, Transmission inter espèces, Population nomade Marocaine.

ABSTRACT

Rotavirus is the most common pathogen of gastroenteritis in children under 2 years of age worldwide and is also responsible for significant morbidity and mortality in young animals of different species. Rotaviruses are generally specie specific, but interspecies transmission is possible. Surveillance of circulating rotaviruses in the human population has revealed the presence of several uncommon genotypes.

It is in this context that the present work provides, for the first time, genetic data on the complete genome of three Moroccan strains of rotavirus group A (RVA) of animal and human origin with the establishment of their complete constellation and their molecular phylogeny. On the other hand, this work examines the zoonotic transmission potential of rotaviruses in a Moroccan perspective.

The first part of this work reports the complete genome sequencing of an unusual Moroccan strain (ma31). The analysis revealed the constellation G8-P[14]-I2-R2-C2-M2-A11-N2-T6-E2-H3, present in other zoonotic strains. Phylogenetic analysis reveals a mixed genetic configuration from animals and humans, as well as its zoonotic potential for transmission.

The second part consists in identifying the RVA in nomadic goats and calves during two severe diarrhoea epidemics in 2012 and 2014 in Bouaarfa. Characterisation of the complete genomic constellation of two bovine and caprine strains (S18 and S19) allowed us to establish their genetic relationship with the human Moroccan strain ma31. Phylogenetic analysis revealed a shared similarity with strains of animal and human origin. Our results revealed cases of zoonotic transmission and confirmed the risk of emergence of new genotypes in nomadic regions, hence the need to implement:

- + Ongoing epidemiosurveillance in human and veterinary medicine in Morocco through the creation of a surveillance system for circulating rotaviruses,
- + Permanent monitoring of genotypes
- + Extending the surveillance of rotavirus infections to domestic animals.

Keywords: Rotavirus group A, Phylogenetic analysis, Reassortment, Inter-species transmission, Moroccan nomadic population.

Structure de recherche accréditée : Equipe de recherche en Virologie Moléculaire et Onco-Biologie (ERVMOB)