

Creative commons : Paternité - Pas d'Utilisation Commerciale -
Pas de Modification 2.0 France (CC BY-NC-ND 2.0)



<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.0/fr>

T H E S E

pour le DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

présentée et soutenue publiquement le 18 novembre 2015 par

Mlle CUGNET Aurélie

Née le 04 juillet 1988

à Bourgoin-Jallieu

**DIAGNOSTIC MOLECULAIRE DES GASTRO-ENTERITES VIRALES A ROTAVIRUS,
NOROVIRUS ET ADENOVIRUS**

JURY

Mme MORFIN Florence, Professeur des Universités et Praticien Hospitalier

M. MEKKI Yahia, Praticien Hospitalier

M. CASALEGNO Jean-Sébastien, Maître de Conférences et Praticien Hospitalier

CUGNET Aurélie

Diagnostic moléculaire des gastro-entérites virales à rotavirus, norovirus et adénovirus

Th. D. Pharm., Lyon 1, 2015, p.100

RESUME

La gastro-entérite aiguë (GEA) virale est une infection largement répandue et les virus en cause sont multiples. Les principaux virus retrouvés sont les rotavirus, les norovirus, les adénovirus et plus récemment les astrovirus. Les GEA à rotavirus et à adénovirus touchent principalement les enfants de moins de 5 ans et les norovirus concernent toutes les tranches d'âge. L'infection se manifeste principalement par la survenue de diarrhées et/ou de vomissements mais elle reste asymptomatique dans 30 à 60 % des cas. Très contagieuse, la transmission de la GEA virale est oro-fécale, hydrique ou alimentaire et constitue un problème de santé publique récurrent dans les collectivités et à l'hôpital. Au Laboratoire de Virologie du Groupement Hospitalier Est de Lyon, la biologie moléculaire est utilisée pour le diagnostic des GEA à rotavirus, norovirus et adénovirus. Outil de diagnostic très sensible et spécifique, la biologie moléculaire détecte de très faibles charges virales dans les selles. Les infections asymptomatiques étant souvent associées à une charge virale faible, la détection du virus chez des porteurs sains a augmenté avec cette technique. Parmi les patients positifs à l'analyse PCR avec un cycle threshold (Ct) supérieur à 30, nous retrouvons pour les infections à rotavirus et à adénovirus environ 35% d'infections asymptomatiques et ce taux atteint 50% pour les infections à norovirus. Chez l'immunocompétent, une faible détection du virus dans les 30 jours suivants un épisode de GEA est fréquente et il peut être détecté dans les selles jusqu'à 70 jours après la GEA. Par conséquent un sondage des antécédents de GEA est un point important dans l'interprétation clinique du résultat de PCR. La valeur du Ct seuil associée à des manifestations cliniques reste à déterminer, néanmoins d'après l'étude de l'évolution du Ct au cours de l'infection, un Ct supérieur à 30 peut être considéré comme un résultat faiblement positif.

MOTS CLES

Gastro-entérite
Diagnostic
Cycle threshold
Rotavirus
Norovirus
Adénovirus

JURY

Mme MORFIN Florence, Professeur des Universités et Praticien Hospitalier
M. MEKKI Yahia, Praticien Hospitalier
M. CASALEGNO Jean-Sébastien, Maître de Conférences et Praticien Hospitalier

DATE DE SOUTENANCE

18 novembre 2015

ADRESSE DE L'AUTEUR

19, rue de la Vie Neuve – 01150 Saint Sorlin en Bugey

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

- Président de l'Université M. François-Noël GILLY
- Vice-Président du Conseil d'Administration M. Hamda BEN HADID
- Vice-Président du Conseil Scientifique M. Germain GILLET
- Vice-Président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire M. Philippe LALLE

Composantes de l'Université Claude Bernard Lyon 1

SANTE

- UFR de Médecine Lyon Est Directeur : M. Jérôme ETIENNE
- UFR de Médecine Lyon Sud Charles Mérieux Directeur : Mme Carole BURILLON
- Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques Directrice : Mme Christine VINCIGUERRA
- UFR d'Odontologie Directeur : M. Denis BOURGEOIS
- Institut des Techniques de Réadaptation Directeur : M. Yves MATILLON
- Département de formation et centre de recherche en Biologie Humaine Directeur : Anne-Marie SCHOTT

SCIENCES ET TECHNOLOGIES

- Faculté des Sciences et Technologies Directeur : M. Fabien DE MARCHI
- UFR de Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives (STAPS) Directeur : M. Yannick VANPOULLE
- Ecole Polytechnique Universitaire de Lyon (ex ISTIL) Directeur : M. Pascal FOURNIER
- I.U.T. LYON 1 Directeur : M. Christophe VITON
- Institut des Sciences Financières et d'Assurance (ISFA) Directeur : M. Nicolas LEBOISNE
- ESPE Directeur : M. Alain MOUGNIOTTE

LISTE DES DEPARTEMENTS PEDAGOGIQUES

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DE SCIENCES PHYSICO-CHIMIQUE ET PHARMACIE GALENIQUE

- **CHIMIE ANALYTIQUE, GENERALE, PHYSIQUE ET MINERALE**

Monsieur Raphaël TERREUX (Pr)
Monsieur Pierre TOULHOAT (Pr - PAST)
Madame Julie-Anne CHEMELLE (MCU)
Monsieur Lars-Petter JORDHEIM (MCU)
Madame Christelle MACHON (AHU)

- **PHARMACIE GALENIQUE -COSMETOLOGIE**

Madame Marie-Alexandrine BOLZINGER (Pr)
Madame Stéphanie BRIANCON (Pr)
Madame Françoise FALSON (Pr)
Monsieur Hatem FESSI (Pr)
Monsieur Fabrice PIROT (PU - PH)
Monsieur Eyad AL MOUAZEN (MCU)
Madame Sandrine BOURGEOIS (MCU)
Madame Ghania HAMDI-DEGOBERT (MCU-HDR)
Monsieur Plamen KIRILOV (MCU)
Monsieur Damien SALMON (AHU)

- **BIOPHYSIQUE**

Monsieur Richard COHEN (PU – PH)
Madame Laurence HEINRICH (MCU)
Monsieur David KRYZA (MCU – PH)
Madame Sophie LANCELOT (MCU - PH)
Monsieur Cyril PAILLER-MATTEI (MCU-HDR)
Madame Elise LEVIGOUREUX (AHU)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE PHARMACEUTIQUE DE SANTE PUBLIQUE

- **DROIT DE LA SANTE**

Monsieur François LOCHER (PU – PH)
Madame Valérie SIRANYAN (MCU - HDR)

- **ECONOMIE DE LA SANTE**

Madame Nora FERDJAOUI MOUMJID (MCU - HDR)
Madame Carole SIANI (MCU - HDR)
Monsieur Hans-Martin SPÄTH (MCU)

- **INFORMATION ET DOCUMENTATION**

Monsieur Pascal BADOR (MCU - HDR)

- **HYGIENE, NUTRITION, HYDROLOGIE ET ENVIRONNEMENT**

Madame Joëlle GOUDABLE (PU – PH)

- **INGENIERIE APPLIQUEE A LA SANTE ET DISPOSITIFS MEDICAUX**

Monsieur Gilles AULAGNER (PU – PH)
Monsieur Daniel HARTMANN (Pr)

- **QUALITOLOGIE – MANAGEMENT DE LA QUALITE**

Madame Alexandra CLAYER-MONTEMBault (MCU)
Monsieur Vincent GROS (MCU-PAST)
Madame Audrey JANOLY-DUMENIL (MCU-PH)
Madame Pascale PREYNAT (MCU PAST)

- **MATHEMATIQUES – STATISTIQUES**

Madame Claire BARDEL-DANJEAN (MCU)
Madame Marie-Aimée DRONNE (MCU)
Madame Marie-Paule PAULTRE (MCU - HDR)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE SCIENCES DU MEDICAMENT

- **CHIMIE ORGANIQUE**

Monsieur Pascal NEBOIS (Pr)
Madame Nadia WALCHSHOFER (Pr)
Monsieur Zouhair BOUAZIZ (MCU - HDR)
Madame Christelle MARMINON (MCU)
Madame Sylvie RADIX (MCU -HDR)
Monsieur Luc ROCHEBLAVE (MCU - HDR)

- **CHIMIE THERAPEUTIQUE**

Monsieur Roland BARRET (Pr)
Monsieur Marc LEBORGNE (Pr)
Monsieur Laurent ETTOUATI (MCU - HDR)
Monsieur Thierry LOMBERGET (MCU - HDR)
Madame Marie-Emmanuelle MILLION (MCU)

- **BOTANIQUE ET PHARMACOGNOSIE**

Madame Marie-Geneviève DIJOUX-FRANCA (Pr)
Madame Marie-Emmanuelle HAY DE BETTIGNIES (MCU)
Madame Isabelle KERZAON (MCU)
Monsieur Serge MICHALET (MCU)

- **PHARMACIE CLINIQUE, PHARMACOCINETIQUE ET EVALUATION DU MEDICAMENT**

Madame Roselyne BOULIEU (PU – PH)
Madame Magali BOLON-LARGER (MCU - PH)
Madame Christelle CHAUDRAY-MOUCHOUX (MCU-PH)
Madame Céline PRUNET-SPANO (MCU)
Madame Catherine RIOUFOL (MCU- PH-HDR)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DE PHARMACOLOGIE, PHYSIOLOGIE ET TOXICOLOGIE

- **TOXICOLOGIE**

Monsieur Jérôme GUITTON (PU – PH)
Madame Léa PAYEN (PU-PH)
Monsieur Bruno FOUILLET (MCU)
Monsieur Sylvain GOUTELLE (MCU-PH)

- **PHYSIOLOGIE**

Monsieur Christian BARRES (Pr)
Monsieur Daniel BENZONI (Pr)
Madame Kiao Ling LIU (MCU)
Monsieur Ming LO (MCU - HDR)

- **PHARMACOLOGIE**

Monsieur Michel TOD (PU – PH)
Monsieur Luc ZIMMER (PU – PH)
Monsieur Roger BESANCON (MCU)
Madame Evelyne CHANUT (MCU)
Monsieur Nicola KUCZEWSKI (MCU)
Monsieur Olivier CATALA (Pr-PAST)
Madame Corinne FEUTRIER (MCU-PAST)
Madame Mélanie THUDEROZ (MCU-PAST)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DES SCIENCES BIOMEDICALES A

- **IMMUNOLOGIE**

Monsieur Jacques BIENVENU (PU – PH)
Monsieur Guillaume MONNERET (PU-PH)
Madame Cécile BALTER-VEYSSEYRE (MCU - HDR)
Monsieur Sébastien VIEL (AHU)

- **HEMATOLOGIE ET CYTOLOGIE**

Madame Christine TROUILLOT-VINCIGUERRA (PU - PH)
Madame Brigitte DURAND (MCU - PH)
Monsieur Olivier ROUALDES (AHU)

- **MICROBIOLOGIE ET MYCOLOGIE FONDAMENTALE ET APPLIQUEE
AUX BIOTECHNOLOGIE INDUSTRIELLES**

Monsieur Patrick BOIRON (Pr)
Monsieur Jean FRENEY (PU – PH)
Madame Florence MORFIN (PU – PH)
Monsieur Didier BLAHA (MCU)
Madame Ghislaine DESCOURS (MCU-PH)
Madame Anne DOLEANS JORDHEIM (MCU-PH)
Madame Emilie FROBERT (MCU - PH)
Madame Véronica RODRIGUEZ-NAVA (MCU-HDR)

- **PARASITOLOGIE, MYCOLOGIE MEDICALE**

Monsieur Philippe LAWTON (Pr)

Madame Nathalie ALLIOLI (MCU)

Madame Samira AZZOUZ-MAACHE (MCU - HDR)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DES SCIENCES BIOMEDICALES B

- **BIOCHIMIE – BIOLOGIE MOLECULAIRE - BIOTECHNOLOGIE**

Madame Pascale COHEN (Pr)

Monsieur Alain PUISIEUX (PU - PH)

Monsieur Karim CHIKH (MCU - PH)

Madame Carole FERRARO-PEYRET (MCU - PH-HDR)

Monsieur Boyan GRIGOROV (MCU)

Monsieur Hubert LINCET (MCU-HDR)

Monsieur Olivier MEURETTE (MCU)

Madame Caroline MOYRET-LALLE (MCU – HDR)

Madame Angélique MULARONI (MCU)

Madame Stéphanie SENTIS (MCU)

Monsieur Anthony FOURIER (AHU)

- **BIOLOGIE CELLULAIRE**

Madame Bénédicte COUPAT-GOUTALAND (MCU)

Monsieur Michel PELANDAKIS (MCU - HDR)

- **INSTITUT DE PHARMACIE INDUSTRIELLE DE LYON**

Madame Marie-Alexandrine BOLZINGER (Pr)

Monsieur Daniel HARTMANN (Pr)

Monsieur Philippe LAWTON (Pr)

Madame Sandrine BOURGEOIS (MCU)

Madame Marie-Emmanuelle MILLION (MCU)

Madame Alexandra MONTEMBault (MCU)

Madame Angélique MULARONI (MCU)

Madame Valérie VOIRON (MCU - PAST)

- **Assistants hospitalo-universitaires sur plusieurs départements pédagogiques**

Madame Emilie BLOND

Madame Florence RANCHON

- **Attachés Temporaires d'Enseignement et de Recherche (ATER)**

Madame Sophie ASSANT 85ème section

Monsieur Benoit BESTGEN 85ème section

Madame Marine CROZE 86ème section

Madame Mylène HONORAT MEYER 85ème section

Pr : Professeur

PU-PH : Professeur des Universités, Praticien Hospitalier

MCU : Maître de Conférences des Universités

MCU-PH : Maître de Conférences des Universités, Praticien Hospitalier

HDR : Habilitation à Diriger des Recherches **AHU** : Assistant Hospitalier Universitaire

PAST : Personnel Associé Temps Partiel

Remerciements

A Florence MORFIN, Directrice et Présidente de thèse, pour m'avoir proposé ce sujet très enrichissant, pour son accompagnement tout au long de ce travail, sa gentillesse et sa disponibilité.

A Jean-Sébastien CASALEGNO pour ces précieux conseils, son aide dans la partie statistique et le prêt de son livre.

A Yahia MEKKI, pour sa grande sympathie et qui me fait l'honneur d'être membre du jury.

A mes chers parents, sans qui ces longues études n'auraient pas été possibles, votre amour, votre présence, votre soutien et aussi votre patience sont inestimables.

A ma sœur, mon frère et mon beau-frère, pour nos taquineries et nos rigolades que j'adore.

A mon parrain et ma marraine, pour votre bienveillance et vos attentions qui me font à chaque fois énormément plaisir.

A ma filleule, pour son sourire et ses câlins et grâce à qui je connais « la reine des neiges » par cœur.

A mes Russian adorées, notre amitié, nos soirées et nos moments de folies sont juste magiques.

A mes amies de Pharmacie Elsa, Clotilde, Hélène et Emilie, pour tous ces moments studieux (cours, TP, examens) et moins studieux (gaufres au nutella, soirées et galas) que j'ai eu plaisir à partager avec vous.

A Clémentine, Sandra et Mickaël, avec qui m'a carrière de scientifique à commencer, je repense particulièrement à un cours de chimie-physique mémorable.

Et pour finir je tiens à remercier tous les enseignants de la Faculté de Pharmacie de Lyon pour la qualité de leur enseignement, leur implication et leur gentillesse.

Table des matières

LISTE DES ABRÉVIATIONS	12
LISTE DES TABLEAUX	13
LISTE DES FIGURES	14
LISTE DES ANNEXES	14
INTRODUCTION	15
CHAPITRE 1. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	16
1. Définition de la gastro-entérite aiguë	16
2. Les virus responsables de gastro-entérites aiguës	16
2.1 Historique	16
2.2 Rotavirus	17
2.2.1 Classification et structure des rotavirus	17
2.2.2 Hôtes et diversité génétique des rotavirus	19
2.3 Norovirus	21
2.3.1 Classification et structure des norovirus	21
2.3.2 Hôtes et diversité génétique des norovirus	23
2.4 Adénovirus	24
3. Mode de transmission des virus de gastro-entérites aiguës	26
4. Physiopathogénie de la gastro-entérite	27
4.1 Physiologie de la paroi intestinale	27
4.2 Mécanisme des diarrhées aiguës	27
5. Aspects cliniques des gastro-entérites aiguës virales	28
5.1 Symptomatologie	28
5.2 Cinétique de l'excrétion virale dans les selles	31
6. Immunité	31
7. Diagnostic des gastro-entérites aiguës virales	32
7.1 Méthodes immunologiques	33
7.1.1 Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay	33
7.1.2 Les tests de diagnostic rapide	34
7.2 Méthodes de biologie moléculaire	37
7.2.1 Principe de la PCR/RT-PCR en temps réel	37
7.2.2 Performance des kits commerciaux de détection moléculaire des rotavirus, des norovirus et des adénovirus	41
8. Prévention et traitement des gastro-entérites virales	42
8.1 Les mesures de prévention	43

8.1.1	Mesures générales individuelles et collectives.....	43
8.1.2	Le vaccin anti-rotavirus.....	44
8.2	Le traitement symptomatique de la gastro-entérite aiguë.....	47
8.3	Antiviraux et perspectives	48
9.	Epidémiologie des gastro-entérites virales	49
9.1	Les gastro-entérites virales dans le monde	49
9.2	Les gastro-entérites virales dans les pays en voie de développement	53
9.3	Les gastro-entérites virales dans les pays développés	55
9.4	Les gastro-entérites virales en France	57
CHAPITRE 2. ETUDE EXPERIMENTALE		61
1.	Contexte	61
2.	Matériels et méthodes	61
2.1	Matériels	61
2.2	Méthodes	62
3.	Résultats.....	62
3.1	Partie descriptive	62
3.1.1	Population initiale	62
3.1.2	Population positive.....	64
3.1.3	Répartition des virus.....	65
3.2	Partie analytique	66
3.2.1	Taux de positivité.....	66
3.2.2	Virus et population	67
3.2.3	Distribution des Ct	68
3.3	Interprétation clinique des résultats faiblement positifs	72
3.3.1	Estimation de la proportion d'infections asymptomatiques	72
3.3.2	Symptomatologie des cas faiblement positifs	74
4.	Discussion.....	76
CONCLUSION		81
ANNEXES		82
BIBLIOGRAPHIE		90

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN	acide désoxyribonucléique
AdV	adénovirus
ARN	acide ribonucléique
CNR	Centre National de Référence des virus entériques
Ct	cycle threshold
EIA	enzyme immunoassay
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
GEA	gastro-entérite aiguë
HFME	Hôpital Femme-Mère-Enfant
IHOP	Institut d'Hématologie et d'Oncologie Pédiatrique
NoVI	norovirus génotype I
NoVII	norovirus génotype II
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
ORF	cadre de lecture ouverte (open reading frame)
PCR	réaction en chaîne de polymérase (polymerase chain reaction)
RT-PCR	reverse transcriptase polymerase chain reaction
RV	rotavirus
SRO	sels de réhydratation orale
TDR	tests de diagnostic rapide

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Classification des norovirus	23
Tableau 2: Caractéristiques cliniques des principaux virus de GEA	30
Tableau 3: Méthodes de diagnostic des virus de GEA.....	33
Tableau 4: Performance de 11 tests d'immunochromatographie commercialisés.....	36
Tableau 5. Propriétés analytiques de deux troussees commerciales de PCR/RT-PCR multiplex en temps réel utilisées dans le diagnostic viral des GEA	42
Tableau 6: Composition de la solution de réhydratation orale à osmolarité réduite.....	48
Tableau 7 : Composés antiviraux potentiels pour le traitement des GEA à norovirus	49
Tableau 8: Taux de détection médian des rotavirus sur la période 2001-2012.....	50
Tableau 9: Taux de détection des rotavirus par région de l'OMS chez les enfants <5ans en 2009	51
Tableau 10: Revue de la littérature sur la distribution des principales étiologies virales de gastro-entérites chez l'enfant	53
Tableau 11. Analyses de biologie moléculaire à la recherche des virus de GEA réalisées par le laboratoire de Virologie Est du 1 ^{er} septembre 2012 au 1 ^{er} juillet 2014.....	63
Tableau 12: Répartition des analyses positives.....	64
Tableau 13: Âge moyen des infections à rotavirus, à norovirus et à adénovirus, répartition des services hospitaliers et répartition homme/femme	68
Tableau 14: Ct moyen observé par virus en fonction de l'âge et du sexe des patients.....	71
Tableau 15: Analyse statistique: relation entre la valeur du Ct et l'âge du patient	72
Tableau 16: Analyse clinique des infections avec un Ct de détection >30	73
Tableau 17: Répartition des cas asymptomatiques et symptomatiques en fonction de l'âge du patient	74
Tableau 18: Symptomatology des GEA chez les patients faiblement positifs.....	75
Tableau 19: Estimation du Ct moyen des cas asymptomatiques RT-PCR positifs et du Ct seuil	77

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Rotavirus vus en microscopie électronique	17
Figure 2: Classification des rotavirus	18
Figure 3: Structure moléculaire des rotavirus	19
Figure 4: Comparaison de la distribution des géotypes de rotavirus entre l'Europe et l'Afrique	20
Figure 5. Classification des norovirus	21
Figure 6. Configuration génomique et structurale des norovirus	22
Figure 7: Site de mutation A et B des norovirus GII.4	24
Figure 8: Famille des Adenoviridae	24
Figure 9: Structure des adénovirus	25
Figure 10: Les voies de transmission des virus de gastro-entérites	26
Figure 11: Représentation d'un test d'immunochromatographie	34
Figure 12: Principe de la RT-PCR en temps réel	38
Figure 13: Relation linéaire entre le cycle threshold (Ct) et la quantité d'ADN	41
Figure 14: Carte mondiale du taux de mortalité des infections à rotavirus chez les enfants âgés de moins de 5 ans, OMS, 2008	54
Figure 15: Evolution des norovirus pandémiques de 1996 à 2012	56
Figure 16: Graphique représentant les variations des souches circulantes de norovirus GII.4 sur la période 2010-2013 (NoroNet)	57
Figure 17: Evolution du taux d'incidence des diarrhées aiguës en France de 1995 à 2014	58
Figure 18: Distribution géotypique des norovirus détectés en France en 2012	59
Figure 19: Evolution temporelle des géotypes G et P des rotavirus humains en France	60
Figure 20: Répartition des virus de GEA détectés	65
Figure 21: Distribution des virus dans les co-infections	66
Figure 22: Taux de positivité en fonction de l'âge	67
Figure 23: Distribution des Ct chez les patients immunocompétents et les patients immunodéprimés	70

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1. Arbre phylogénétique des norovirus	83
Annexe 2. Structure de l'intestin grêle	84
Annexe 3. Techniques variantes de PCR	85
Annexe 4. Cinétique de l'excrétion virale au cours de l'infection à rotavirus, à norovirus GII et à adénovirus	86
Annexe 5. Distribution des résultats semi-quantitatifs de biologie moléculaire des virus de GEA	87
Annexe 6. Logigramme d'interprétation clinique des résultats de biologie moléculaire Ct >30 des virus de GEA	89

INTRODUCTION

La gastro-entérite aiguë (GEA) est la maladie infectieuse la plus fréquente dans le monde. Les virus sont la première cause de gastro-entérite aiguë, principalement les norovirus et les rotavirus, d'autres microorganismes peuvent être impliqués tels que les bactéries (*Escherichia coli*, *Campylobacter*, *Salmonella*, *Shigella*) et certains parasites (Amibes, Giardia). L'infection se transmet par voie fécale-orale principalement, d'une personne à une autre en cas d'hygiène insuffisante, par contact avec une surface souillée et par ingestion d'eau ou d'aliments contaminés. Provoquant une déshydratation, une malnutrition et des troubles de la croissance, les gastro-entérites aiguës sont responsables d'une morbidité et d'une mortalité importantes chez les enfants de moins de 5 ans, particulièrement dans les pays en développement. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), après les pneumonies (23%), les diarrhées sont la deuxième cause de mortalité post néonatale dans le monde, elles sont responsables de 760 000 décès d'enfants par an, ce qui équivaut à 16 % des décès d'enfants âgés de 1 mois à 5 ans (1). Les maladies infectieuses intestinales sont l'une des premières causes d'hospitalisation infantile, entraînant des dépenses médicales et des coûts indirects considérables. Véritable problème de santé publique, la mise en place de moyens de prévention et une surveillance épidémiologique sont indispensables pour lutter contre ces infections. Des méthodes de diagnostic de plus en plus spécifiques, sensibles et rapides se développent dans les centres hospitaliers. Une détection directe du virus dans les selles par méthodes immunologiques est simple d'application et rapide mais ces techniques manquent de sensibilité. L'utilisation des méthodes de biologie moléculaire dans le cadre du diagnostic de routine tend à se généraliser. Le laboratoire de virologie du Groupement Hospitalier Est de Lyon utilise la Poly Chain Reaction (PCR) multiplex en temps réel pour détecter les principaux virus responsables de gastro-entérites : les rotavirus, les norovirus et les adénovirus. Cette technique est semi-quantitative, le nombre de cycles d'amplification nécessaires à la détection du virus, appelé cycle threshold (Ct), fournit une appréciation de la quantité de virus dans les selles. Compte tenu de son excellente sensibilité, la PCR permet de détecter de très faibles quantités de virus, ce qui a pour conséquence la détection relativement fréquente de portages asymptomatiques. (2). Pour essayer d'apporter des éléments dans l'interprétation clinique des résultats de PCR en temps réel, une étude rétrospective a été réalisée au laboratoire de Virologie Est. Cette étude porte sur l'analyse clinique des résultats virologiques de selles obtenus par PCR en temps réel sur la période de septembre 2012 à juin 2014.

CHAPITRE 1. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1. DEFINITION DE LA GASTRO-ENTERITE AIGUË

Sous forme de cas sporadiques ou d'épidémies, la GEA est une maladie infectieuse se traduisant par une inflammation du tractus digestif. L'infection touche à la fois la muqueuse intestinale et celle de l'estomac provoquant l'apparition brutale de nausées, de douleurs abdominales, de vomissements et/ou de diarrhées aiguës. Selon l'OMS, la diarrhée aiguë est définie par la survenue d'au moins trois selles molles à liquides par 24 heures. Les symptômes principalement digestifs peuvent être accompagnés de fièvre et de céphalées. La GEA est bénigne, elle dure en moyenne trois jours et la guérison est spontanée dans la majorité des cas. Toutefois, les jeunes enfants, les personnes âgées et les immunodéprimés peuvent faire l'objet de cas sévère nécessitant une hospitalisation, notamment à cause de la déshydratation, complication majeure de la GEA. La malnutrition, les maladies chroniques et les co-infections bactériennes seraient également des facteurs intervenant dans la gravité des symptômes.

2. LES VIRUS RESPONSABLES DE GASTRO-ENTERITES AIGUËS

2.1 HISTORIQUE

Décrites pour la première fois en 1929 par le Docteur J. Zahorsky sous le terme de « winter vomiting disease » (3), l'origine des gastro-entérites est restée longtemps méconnue. Le diagnostic étiologique se limitait à la recherche de quelques bactéries et de parasites. En 1972, grâce au progrès de la microscopie électronique, les *Calicivirus* ont été les premiers virus identifiés à partir d'un prélèvement de selles issu d'une épidémie de GEA dans une école de Norwalk dans l'Ohio (4), ce qui lui valut le nom de « virus de Norwalk ». Par la suite, d'autres virus apparentés ont été nommés selon le lieu de l'épidémie (Hawaii, Snow Mountain, Southampton, Bristol, etc.) et regroupés sous le terme de Small Round Structured Virus (SRSV). Avec l'avancée des analyses morphologiques et phylogénétiques, ces virus ont été rebaptisés récemment « norovirus » par l'International Committee on Taxonomy of Viruses (5). Les rotavirus (6), les astrovirus (7) et les adénovirus entériques (8) ont été découverts les années suivantes. Plus tardivement, dans les années 90, d'autres virus responsables de GEA ont été découverts tels que les sapovirus, les picobirnavirus, les torovirus, les coronavirus, les

parechovirus et les Aïchi virus. Les progrès de dépistage et la multiplication des études épidémiologiques ont permis de définir les virus comme la cause prédominante des gastro-entérites partout dans le monde. Les virus les plus communément dépistés sont les rotavirus, les norovirus et les adénovirus.

2.2 ROTAVIRUS

2.2.1 Classification et structure des rotavirus

Identifiés pour la première fois en 1973 par la virologue australienne Ruth Bishop (6), les rotavirus sont des virus non-enveloppés, à capsidre icosaédrique et dont le diamètre est d'environ 70 nm. Ils ont une morphologie caractéristique en forme de roue, d'où le préfixe latin « *rota* », visible en microscopie électronique par coloration négative (Figure 1).

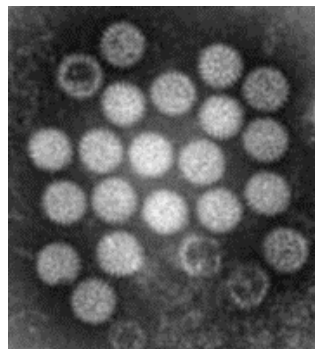


Figure 1: Rotavirus vus en microscopie électronique

Le genre *Rotavirus* appartient à la famille des Reoviridae et à la sous famille des Sedoreovirinae (Figure 2). Les rotavirus sont divisés en 7 sérogroupes de A à G, eux-mêmes divisés en sérotypes. Les sérogroupes sont définis par les caractéristiques de la protéine VP6 et seuls les rotavirus A, B et C infectent les humains. Les rotavirus du groupe A sont le plus souvent impliqués dans les gastro-entérites aiguës, les infections par les sérogroupes B et C sont très rares.

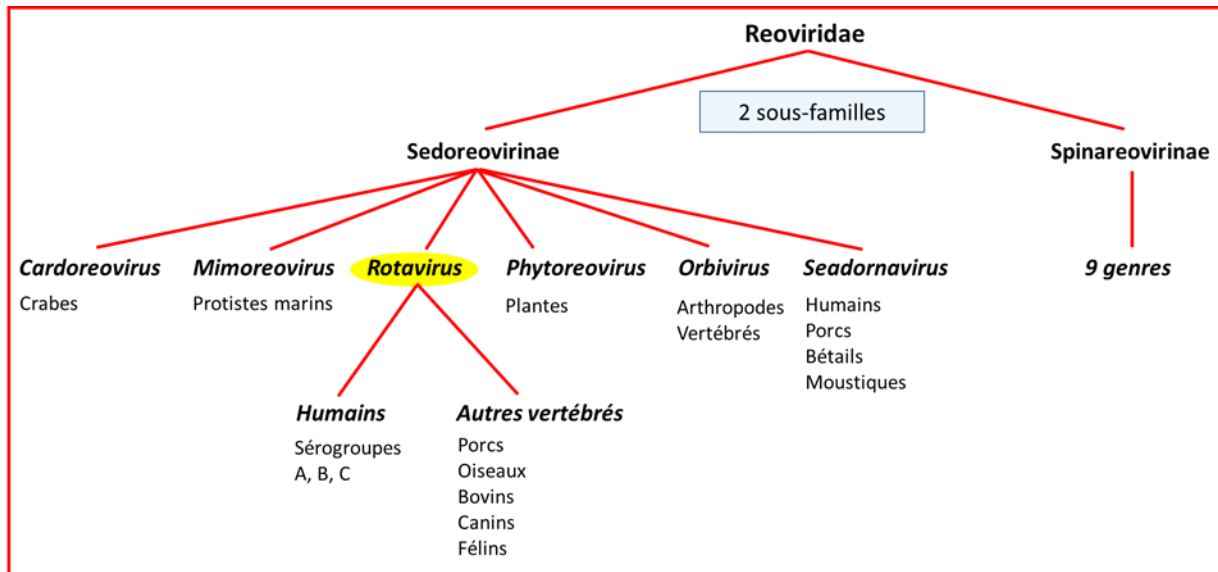


Figure 2: Classification des rotavirus

Son génome se compose de 11 segments d'ARN bicaténaire qui codent 6 protéines de structures (VP) et 6 protéines non structurales (NSP 1-6). Les segments d'ARN peuvent être séparés par électrophorèse en fonction de leur poids moléculaire sur gel de polyacrylamide. La capside, entourant le génome, est organisée en 3 couches (Figure 3). La couche externe est constituée de VP7 qui est l'antigène majeur de neutralisation, et de VP4 qui forme 60 spicules à la surface du virus et qui a un rôle important dans l'attachement du virus aux cellules par clivage protéolytique, la neutralisation et la virulence. La couche intermédiaire est composée par la protéine VP6, très immunogénique et antigénique, elle jouerait un rôle lors de la transcription. La capside interne ou core comprend majoritairement la protéine VP2 qui a la capacité de se lier à l'ARN et plus minoritairement VP1 et VP3 qui sont impliquées dans la réplication du virus. La réplication virale a lieu dans le cytoplasme cellulaire par l'intermédiaire de viroplasmes dans lesquels interviennent les protéines non structurales. Ces dernières participent aussi à la pathogénicité, notamment l'entérotoxine NSP4 (9)(10).

Ce sont VP7 (glycoprotéine ou G-type antigène) et VP4 (protéase ou P-type antigène), induisant la production d'anticorps neutralisants, qui sont à l'origine de la classification binaire des rotavirus. Etablie par séroneutralisation, on parle de sérotypes. En fonction des caractéristiques de la glycoprotéine VP7, on distingue 14 sérotypes G (G1, G2, G3, etc.) et selon les variations de la protéase VP4, 13 sérotypes P sont définis (e.g. P[4], P[8]). Une autre classification est également utilisée, il s'agit de la classification génotypique des rotavirus par analyse des gènes

codant les protéines VP7 et VP4, on parle alors de génotypes. Les deux méthodes de classification montrent cependant des discordances par rapport à la glycoprotéine VP7, par contre pour la protéase VP4, la concordance est parfaite entre sérotype et génotype. Par convention, on écrit le sérotype entre parenthèses (P) et le génotype entre crochets [P]. Parmi les sérotypes G, 10 d'entre eux (G1 à G10) infectent l'homme et pour le sérotype P, la majorité des souches humaines sont de génotype P[8] et P[4] (respectivement sérotype 1A et 1B).

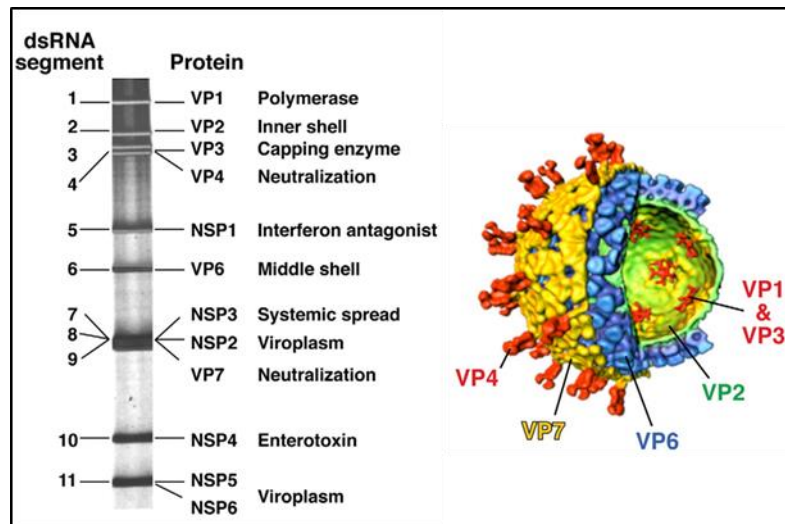


Figure 3: Structure moléculaire des rotavirus (9)

2.2.2 Hôtes et diversité génétique des rotavirus

Le principale réservoir des rotavirus sérogroupes A, B et C est l'homme ; néanmoins, des cas d'infection par des rotavirus du groupe A chez des veaux, des porcs, des poulains, des chats, des chiens et certains oiseaux ont été signalés. Les rotavirus du groupe A observés chez les animaux semblent très étroitement apparentés aux souches infectant l'homme. Malgré l'absence de zoonose avérée, il existe un réel risque de réassortiment génique et de transmission inter espèces. Ces animaux sont donc également considérés comme des réservoirs pertinents de rotavirus humains (11).

La variabilité génomique des rotavirus repose sur trois grands mécanismes génétiques : les mutations ponctuelles, les réassortiments génétiques et les réarrangements génomiques. Comme tous les virus à ARN, les rotavirus sont soumis à des mutations ponctuelles liées à l'infidélité de l'ARN polymérase virale. Il en découle un phénomène de glissement antigénique responsable de mutations en proportion variable selon les gènes. En effet, si les mutations

aléatoires concernent l'ensemble des gènes, la pression immunitaire de l'hôte induit un taux de mutation important des gènes codant les protéines de structure externes (VP4, VP7). Ainsi on distingue, dans la protéine VP7, six régions hypervariables associées à l'échappement immunitaire et qui définissent la spécificité de sérotype G. Les mutants résistants aux anticorps monoclonaux obtenus *in vitro* possèdent des mutations en amino-acides dans ces régions hypervariables, mutations que l'on retrouve également pour des souches isolées *in vivo*. A l'inverse, les protéines non structurales, soumises à des contraintes fonctionnelles, sont peu exposées à la pression immunitaire et par conséquent plus stables. Le réassortiment génétique entre les souches, notamment animales et humaines, peuvent être à l'origine de l'émergence de nouveaux génotypes. Il s'agit d'un échange de segments d'ARN codant pour des gènes homologues. Il survient lors d'une infection mixte et génère des virus réassortants. Les réassortiments de segments entraîne des modifications de taille visibles sur le profil électrophorétique, permettant de différencier les souches lors d'études épidémiologiques (12). Les réarrangements génomiques ont un impact moindre sur l'épidémiologie des rotavirus. Ils consistent en une altération majeure de la séquence d'un gène, sous forme de délétions ou de duplications partielles de la séquence. Ces souches de rotavirus à génome réarrangé ont tout d'abord été isolées chez des enfants immunodéprimés sévères ayant une infection chronique à rotavirus (13).

De ce fait, les rotavirus présentent une grande diversité génétique et antigénique. La distribution des souches de rotavirus diffère d'un pays à un autre, néanmoins, les génotypes les plus communs en Asie sont G1P[8] (23.6%), G2P[4] (11.8%), G3P[8] (18.9%) et G9P[8] (7.4%) (14). Les souches les plus courantes en Europe et aux USA sont : G1P[8]; G2P[4]; G4P[8] ; G3P[8] et G9P[8] (Figure 4). D'autres souches sont observées dans certains pays : G5P[8] au Brésil; G8P[8] en Afrique et G10P[11] ou G12P[4]/P[6] en Inde (15).

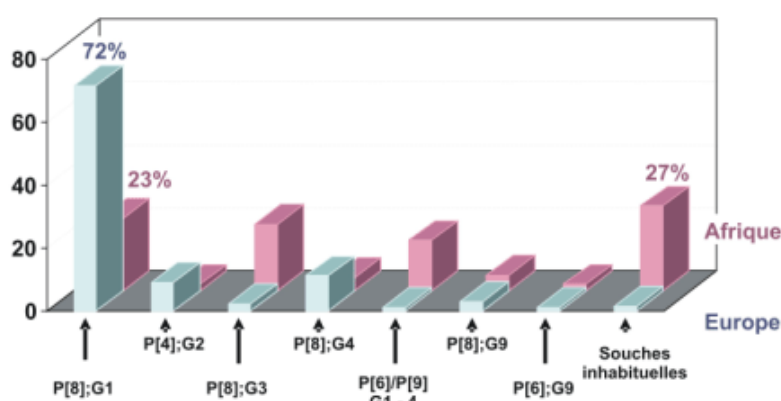


Figure 4: Comparaison de la distribution des génotypes de rotavirus entre l'Europe et l'Afrique (15)

2.3 NOROVIRUS

2.3.1 Classification et structure des norovirus

Les norovirus appartiennent à la famille des Caliciviridae. Grâce à la biologie moléculaire, la classification des Caliciviridae a beaucoup évolué ces dernières années, cette famille comprend actuellement 5 genres : *Vesivirus*, *Lagovirus*, *Norovirus*, *Sapovirus* et plus récemment *Nebovirus* (16) (Figure 5). D'autres genres de calicivirus ont été proposés tels que le genre *Recovirus* détecté dans les selles du macaque Rhésus (17), le genre *Valovirus* retrouvé chez le porc et le genre *Salovirus* isolé chez le saumon Atlantique (18). Ces genres n'ont pas encore été approuvés par le Comité International de Taxonomie des Virus. D'autres spécimens restent non classifiés, notamment le calicivirus du poulet. Les Caliciviridae présentent une très grande variabilité génétique et chaque genre est divisé en génogroupes, eux-mêmes subdivisés en génotypes.

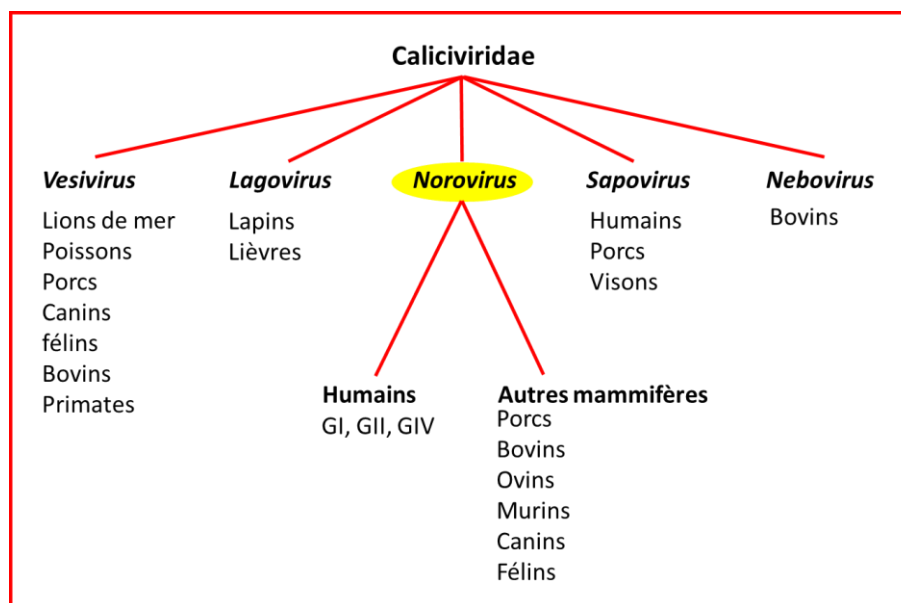


Figure 5. Classification des norovirus

Seuls les genres *Norovirus* et *Sapovirus* (anciennement Norwalk-like virus et Sapporo-like virus) infectent l'homme. Les norovirus sont plus majoritairement impliqués dans les cas de gastro-entérites que les Sapovirus. Ce sont des virus à ARN positif simple brin, nus et à capside T=3 de symétrie icosaédrique. Deux fois plus petits que les rotavirus, ils mesurent entre 27 et 35 nm.

Leur génome, représenté Figure 6, se compose de 3 cadres ouverts de lecture ORF (Open Reading Frames) suivants (19) :

- ORF1 code une polyprotéine de 200 kDa dont le clivage médié par la protéase 3C donne les protéines non structurales NS1 à NS7 (20).
- ORF2 code la protéine majeure de capside VP1 (≈ 57 kDa).
- ORF3 code la protéine mineure de capside VP2 (≈ 22 kDa).

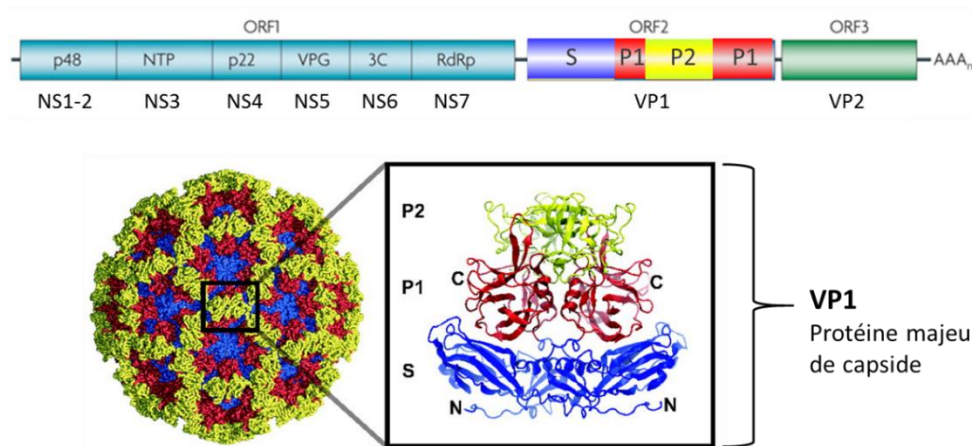


Figure 6. Configuration génomique et structurelle des norovirus (17)

Les protéines non structurales interviennent lors de la réplication virale. Parmi elles, la protéine NTP (NS3) a une fonction NTPase ; la protéine VPG (NS5), qui forme une coiffe à l'extrémité 5' de l'ARN, favorise le recrutement de facteurs traductionnels de la cellule hôte ; la protéase 3C (NS6) joue un rôle dans le clivage des protéines cellulaires et la maturation des protéines virales, la polymérase RdRp (NS7) synthétise de nouveaux brins d'ARN viraux. La fonction des protéines p48 (NS1-2) et p22 (NS4) reste inconnue (21).

La structure externe de la capside des norovirus est constituée de 180 protéines VP1 organisées en dimères. VP1 est constituée d'un domaine S hautement conservé associé à une région N-terminal et d'un domaine P. Le domaine P est formé de dimères P1/P2 dont la région la plus externe P2 est hypervariable, elle est responsable de l'antigénicité et de l'attachement du virus aux cellules entérocytaires humaines (22). La fonction de la protéine mineure de capside VP2 est peu connue, d'après Vongpunsawad *et al.* 2013, elle serait associée au domaine S de la protéine VP1 et elle jouerait un rôle dans la stabilité et l'assemblage de la capside autour du génome (23).

La classification des norovirus se base sur les séquences du gène de l'ARN polymérase RdRp (ORF1) qui a permis de définir 5 génogroupes, GI à GV, subdivisés en clusters ou génotypes (Tableau 1, Annexe 1) (12)(24).

Tableau 1: Classification des norovirus

Norovirus Génogroupe	Hôtes	Nombre de séquences	Clusters
GI	Humain	30	9
GII	Humain/porcin	121	22
GIII	Bovin	9	2
GIV	Humain	3	1
GV	Murin	1	1

2.3.2 Hôtes et diversité génétique des norovirus

Les génogroupes pathogènes pour l'homme sont GI (9 génotypes), GII (22 génotypes) et GIV (1 génotype) (24). Certaines souches GII infectent également le porc. Les souches GIII et GV sont retrouvées uniquement chez l'animal. Bien que certaines d'entre elles soient génétiquement proches des souches humaines, jusqu'à présent le risque de zoonose n'a pas été avéré (25).

A chaque épidémie de norovirus, la population hôte s'immunise contre la souche responsable. Cette immunité focale induit une pression de sélection et favorise l'apparition de nouveaux variants antigéniques qui seront à l'origine de l'épidémie suivante. Par l'absence de développement d'une immunité croisée et durable, un individu peut être infecté par plusieurs génotypes au cours de sa vie. L'importante capacité de mutation du virus s'explique par l'utilisation, lors de sa réplication, d'une ARN polymérase qui ne possède pas de fonction correctrice et par conséquent entraîne de nombreuses erreurs (5).

Un génotype en particulier se distingue par sa grande variabilité antigénique et son fort pouvoir épidémique, il s'agit du génotype GII.4. L'émergence et la persistance des souches GII.4 dans la population sont corrélées à la mutation de deux sites, le site A et le site B, situés dans le domaine P2 de la protéine de capsid VP1, à la surface du virion (Figure 7). La caractérisation des acides aminés des 2 sites a permis d'établir le profil antigénique du GII.4. Le motif A

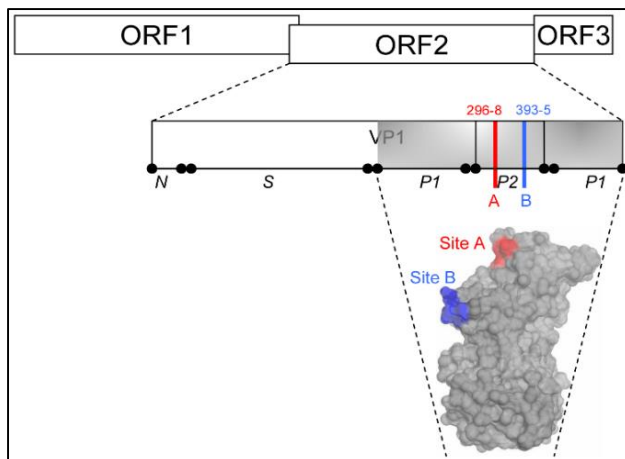


Figure 7: Site de mutation A et B des norovirus GII.4

pourrait être un épitope majeur d'intérêt pour la formulation d'un vaccin, l'épitope B est mineur mais la combinaison des 2 sites permet sa persistance dans les populations (26).

Récemment, de plus en plus de souches recombinantes de norovirus sont identifiées. Issues de la recombinaison génétique entre différentes souches, il semblerait que ce phénomène touche souvent la jonction ORF1/ORF2 entre le gène de la polymérase RdRp et le gène de capside. Appelée alors recombinaison intergénique, le virus recombinant possède une capside et une polymérase provenant de clusters distincts (27).

2.4 ADENOVIRUS

Découverts au début des années 50, les adénovirus humains appartiennent au genre Mastadénovirus de la famille des Adenoviridae (Figure 8).

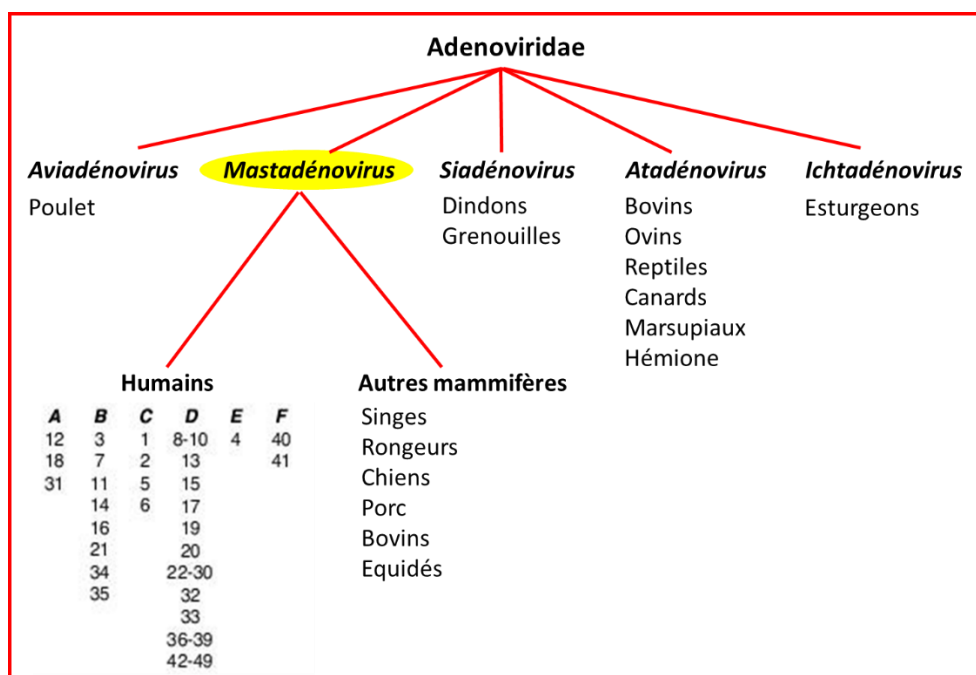


Figure 8: Famille des Adenoviridae (28)

Les adénovirus humains se divisent en 51 sérotypes répartis dans 6 groupes (A à F avec le groupe B divisé en deux sous-groupes B1 et B2). Cette classification est fondée sur des homologies structurales, des propriétés biologiques communes et sur les études phylogénétiques des séquences des gènes de l'hexon et de la protéase virale. Les adénovirus sont responsables principalement d'infections respiratoires, oculaires et digestives. Certains sérotypes peuvent provoquer plusieurs types d'infections. Les sérotypes 40 et 41 constituent le groupe F, appelés aussi adénovirus entériques, ils ont un tropisme pour le tube digestif et sont responsables d'épidémies et de cas sporadiques de gastro-entérites tout au long de l'année, en particulier chez l'enfant. Les sérotypes 12, 18 et 31 du groupe A et plus rarement les sérotypes 2, 3 et 7 ont également été associés à des gastro-entérites (29). Leur implication dans les GEA est moins renseignée que pour les sérotypes 40 et 41.

Contrairement aux rotavirus et aux norovirus, les adénovirus sont des virus à ADN, ils ont en commun l'absence d'enveloppe et une capsidie icosaédrique. Les adénovirus mesurent de 70 à 90 nm et portent, au sommet de leur capsidie, des extensions fibrillaires caractéristiques (12). La capsidie est composée de 252 capsomères dont 240 hexons et 12 pentons. Les pentons constituent les sommets de l'icosaèdre et sont prolongés par une fibre de longueur variable et terminée par l'antigène Y, responsable de la propriété d'hémagglutination (Figure 9)(30). La distinction des sérotypes est basée sur la capacité d'agglutination de différents types d'érythrocytes (29). L'hexon est constitué de 3 chaînes de polypeptide II alors que le penton est formé de 5 polypeptides III et la fibre de 3 polypeptides IV. Les polypeptides VI, VIII et IX forment les liaisons entre les capsomères. Le génome viral est constitué de deux brins d'ADN linéaires pouvant se circulariser grâce à la protéine p55. Les polypeptides VII sont des analogues d'histones se complexant avec l'ADN et les polypeptides V qui entourent le complexe ADN-VII le relient à la capsidie. Les gènes E1 (A et B), E2 (A et B), E3 et E4 interviennent dans la phase précoce de la réplication virale et les gènes L1, L2 et L3 induisent la production de protéines tardives (31).

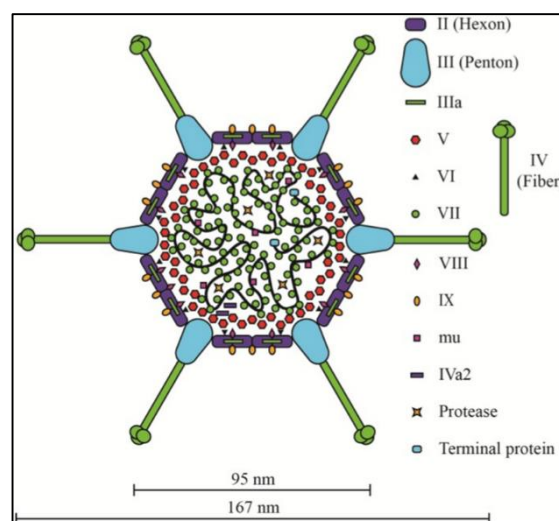


Figure 9: Structure des adénovirus

La diversité génétique des adénovirus est très faible. Les virus à ADN ont un taux de mutation considérablement plus faible que les virus à ARN en raison de la capacité de correction des ADN polymérases lors de la réplication virale.

3. MODE DE TRANSMISSION DES VIRUS DE GASTRO-ENTERITES AIGÜES

Du fait de l'absence d'enveloppe, les virus de GEA sont très résistants dans l'environnement et très contagieux. Ils possèdent une résistance aux solvants lipidiques ainsi qu'aux variations de pH et de températures. Les norovirus peuvent persister 2 semaines à la surface d'objet et 2 mois dans l'eau (32). Les rotavirus peuvent survivre à des températures de 30 à 35 °C et peuvent demeurer infectieux jusqu'à 60 jours sur des objets inertes (11).

La contamination a lieu par voie digestive et les modes de transmission sont multiples :

- Transmission indirecte
 - Ingestion d'aliments ou d'eau souillés
 - Manipulation d'objets contaminés
- Transmission directe interhumaine
 - Manu portée
 - Féciale-orale
 - Projection de vomi

Leur cycle de transmission implique l'homme ou les animaux et l'environnement hydrique. Ils sont présents dans les eaux usées et ne sont que partiellement éliminés dans les boues actives des stations d'épuration (Figure 10).

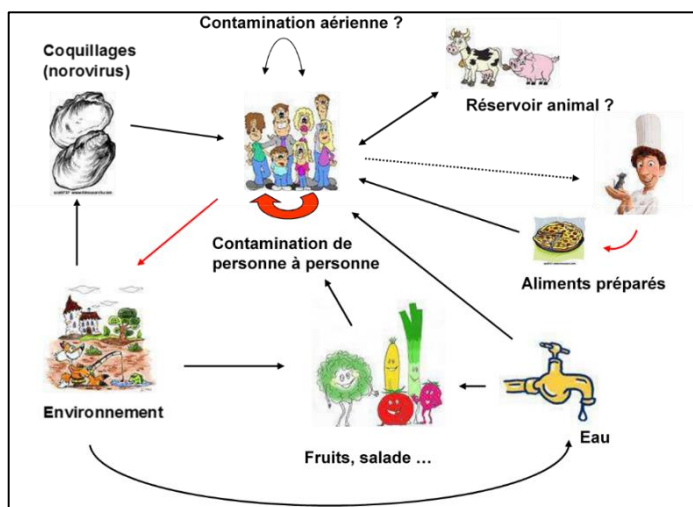


Figure 10: Les voies de transmission des virus de gastro-entérites

Les virus de GEA ont une infectivité élevée, l'ingestion de seulement 10 à 100 particules virales suffit à provoquer l'infection et au pic de la maladie, l'excrétion de virus dans les selles est importante, de l'ordre de 10^{10} particules virales par millilitre de selles. Les personnes infectées sont donc surtout contagieuses lors du pic de la maladie et le restent au moins 2-3 jours après la disparition des symptômes.

4. PHYSIOPATHOGENIE DE LA GASTRO-ENTERITE

4.1 PHYSIOLOGIE DE LA PAROI INTESTINALE

La muqueuse intestinale est essentiellement constituée d'entérocytes qui jouent un rôle prépondérant dans l'absorption des nutriments, notamment de l'eau et des électrolytes. On retrouve à sa surface des villosités et microvillosités en forme de brosse, dites bordures en brosse, directement en contact avec le contenu intestinal (Annexe 2). Cette organisation anatomique particulière permet d'augmenter la surface d'échange et d'absorber environ 9 litres de liquide par 24 heures dont 2 litres alimentaires et 7 litres de sécrétions digestives. La majeure partie (7 à 8 L) est absorbée par l'intestin grêle et une plus faible quantité (1 à 2 L) au niveau du côlon. Le reste, environ 200 ml, est éliminé dans les selles. L'absorption intestinale de l'eau est un phénomène passif, l'eau passe à travers la face apicale des entérocytes suivant un gradient osmotique lié au transport du sodium vers les espaces intercellulaires (33).

4.2 MECANISME DES DIARRHEES AIGÜES

La diarrhée se caractérise par une émission de selles de volume et de fréquence plus importants que la normale. Elle résulte d'un trouble des échanges électrolytiques et aqueux de part et d'autre de la muqueuse digestive. On distingue trois types de mécanisme de diarrhée infectieuse : sécrétoire, invasif et pénétrant (34). Les diarrhées virales ont un mécanisme pénétrant, en effet le virus pénètre et se multiplie dans les entérocytes matures provoquant la destruction de la bordure en brosse entérocytaire. L'altération des entérocytes conduit à une malabsorption de l'eau et des électrolytes et l'apparition d'une diarrhée. Les diarrhées sécrétoires et invasives ont généralement une origine bactérienne ou parasitaire. Dans le mode sécrétoire, le micro-organisme, tels que *V. cholera* et *E. coli* entérotoxigènes, sécrète une

entérotoxine responsable de la perte excessive d'eau et d'électrolytes par stimulation de l'adénylate cyclase au niveau de la membrane entérocytaire. Les selles, très abondantes et aqueuses, sont alors définies comme hydro-électrolytiques cholériformes. Le type invasif est caractérisé par une invasion destructrice de la muqueuse provoquant une réaction inflammatoire intense et un syndrome dysentérique avec la présence de sang et de glaires dans les selles (34)(35). Ce tableau est généralement associé aux bactéries *Shigella*, *Salmonella*, *Campylobacter*, *Yersinia*, *Clostridium* et *E.Coli* entéro-invasifs. Néanmoins, cette classification des diarrhées par type de pathogènes n'est pas toujours évidente, la physiopathologie est souvent complexe et l'infection peut associer plusieurs mécanismes.

Dans la diarrhée à rotavirus, une entérotoxine virale jouerait un rôle important, il s'agit de la glycoprotéine non structurale NSP4. Elle serait impliquée dans l'hypersécrétion modérée du chlore dans la lumière intestinale suite à une augmentation du calcium intracellulaire par la stimulation du système nerveux entérique (36)(37)(9). La présence des récepteurs spécifiques de NSP4 serait dépendante de l'âge et expliquerait en partie la sévérité de la diarrhée chez les jeunes enfants. Concernant la présence des nausées et des vomissements lors d'une GEA à rotavirus, le mécanisme probable mis en cause est la sécrétion de médiateurs, notamment la sérotonine (5-HT), par la stimulation virale des cellules entérochromaffines du tube digestif et par l'intermédiaire des fibres nerveuses vagues (38). La physiopathologie des infections à norovirus est peu connue, un ralentissement de la vidange gastrique apparaît au début de l'infection et serait à l'origine des nausées et des vomissements.

5. ASPECTS CLINIQUES DES GASTRO-ENTERITES AIGÜES VIRALES

5.1 SYMPTOMATOLOGIE

Les infections à rotavirus, norovirus et adénovirus peuvent être asymptomatiques ou symptomatiques. Des facteurs liés à l'hôte, tel que l'âge pour les rotavirus, jouent un rôle important dans le développement des symptômes. Du fait de l'immaturité intestinale et de la présence des anticorps maternels en période néonatale, l'infection à rotavirus est souvent asymptomatique ou pauci-symptomatique chez les nourrissons âgés de 0 à 5 mois. Des facteurs liés au virus pourraient également expliquer cette relative protection, les souches de rotavirus infectant les nouveau-nés seraient moins virulentes que celles infectant les enfants plus âgés.

Chez les nouveau-nés, lorsque les signes cliniques sont présents, il s'agit le plus souvent d'une accélération du transit avec parfois un aspect glairo-sanglant des selles, accompagnée d'une distension abdominale et ne se compliquant pas de déshydratation. Des formes sévères telles que des perforations intestinales ou des entérocolites ulcéro-nécrosantes peuvent aussi survenir (39). Les infections symptomatiques à rotavirus sont plus fréquentes à partir de 6 mois et jusqu'à l'âge de 2 ans, elles sont rares chez l'adulte et résultent en général d'une souche peu fréquente échappant au système immunitaire, d'une dose infectieuse extrêmement élevée ou d'une immunodépression (9).

Quant aux norovirus, des différences de susceptibilité entre individus ont été observées et expliquées par la présence ou non de récepteurs glycaniques à la surface des cellules intestinales. En effet, les norovirus se fixent à la surface des entérocytes matures par l'intermédiaire de ces récepteurs dont l'expression est spécifique du groupe sanguin A, B, O et Lewis (40). Toutes les souches de norovirus ne reconnaissant pas le même motif glycanique, une protection est alors induite en fonction du groupe sanguin mais seulement pour certaines souches.

En moyenne, il y aurait 40 à 60% d'infections asymptomatiques à rotavirus chez l'enfant et ce taux augmente avec l'âge grâce à l'acquisition d'une immunité au cours des infections (41). Le taux de cas asymptomatiques est estimé à 33% pour les infections à norovirus (25)(42) et à 46% pour les infections à adénovirus entériques (43).

Les signes cliniques les plus fréquents et typiques de la gastro-entérite aiguë sont des douleurs abdominales, des diarrhées, des vomissements et des nausées. Des céphalées, de la fièvre et des symptômes respiratoires sont également observés dans plus de 30 % des cas. La présence de sang dans les selles est plutôt rare (1 %)(44). La déshydratation est la complication principale, particulièrement dangereuse pour les nourrissons et les personnes âgées, elle est en générale la raison de l'hospitalisation. Les signes de déshydratation sont la soif, les lèvres sèches, une perte de poids, une asthénie, une pâleur et les yeux cernés. Chez les personnes fragilisées et en l'absence de soins adaptés, la gastro-entérite peut entraîner le décès.

Dans les gastro-entérites à rotavirus, le symptôme nettement dominant est la diarrhée et elle est accompagnée une fois sur deux par des vomissements et de la fièvre (Tableau 2). Le rotavirus est plus souvent impliqué dans les cas sévères que les autres virus, il est responsable de 20 à 30% des cas de diarrhées sévères nécessitant une hospitalisation dans le monde.

Tableau 2: Caractéristiques cliniques des principaux virus de GEA

	Durée d'incubation	Cellules infectées	Principaux signes cliniques	Durée des signes cliniques
Rotavirus	1 à 3 jours	Entérocytes matures, villosités de l'intestin grêle	Diarrhée aqueuse d'intensité variable: 98 % Vomissements: 51 % Fièvre: 51 % Déshydratation: 72 % des hospitalisation	3 à 7 jours
Norovirus	24 à 48 heures	Entérocytes matures, villosités de l'intestin grêle	Diarrhée aqueuse: 66 % Vomissements: 69 %, en jet parfois au premier plan Fièvre: 37 %	1 à 2 jours
Adénovirus	8 à 10 jours	Entérocytes matures, sommet, villosités de l'intestin grêle	Diarrhée aqueuse: 45-75 % Vomissements: 59 % Fièvre: 40-75 % Possibles signes respiratoires	5 jours à plus de 2 semaines

Pour les norovirus, l'incubation est courte, 24 à 48 heures, l'apparition des symptômes est violente et dominée par des nausées (95 %), des vomissements, des diarrhées et des douleurs abdominales. De la fièvre et des frissons peuvent survenir, environ 50 % des patients sont subfébriles (5). Chez les adultes en bonne santé, la maladie ne dure que 2-3 jours alors que chez des individus fragilisés, notamment les personnes âgées et les immunodéprimés, les symptômes peuvent persister pendant plusieurs semaines et s'accompagner de complications. Des infections chroniques à norovirus sont observées chez les personnes greffées sous traitement immunosuppresseur (45).

Le diagnostic clinique d'une épidémie à norovirus repose sur les critères de Kaplan (46) :

- Vomissements $\geq$ 50% des cas
- Diarrhée aqueuse aigüe
- Bactériologie des selles négative
- Durée de la maladie 12-60 heures
- Période d'incubation 24-48 heures

L'hypothèse d'une infection à norovirus est d'autant plus probable que patients et personnel soignant sont atteints.

Les diarrhées à adénovirus sont cliniquement proches de celles dues au rotavirus mais sont toutefois plus bénignes. Le temps d'incubation est long (8 à 10 jours) et ces virus sont responsables d'épisodes de gastro-entériques marqués par de la fièvre, des vomissements et des

diarrhées pendant 6 à 8 jours en moyenne. Dans certains cas, la durée des symptômes peut atteindre 14 jours. Les personnes immunodéprimées sont également sensibles aux infections à adénovirus qui présentent dans ce cas un risque de dissémination.

5.2 CINETIQUE DE L'EXCRETION VIRALE DANS LES SELLES

L'excrétion du virus dans les selles précède parfois les symptômes, c'est le cas dans 30 % des infections à rotavirus et à norovirus où la virologie des selles peut être positive 2 jours avant le début des symptômes. L'excrétion virale est maximale lors de la phase aiguë de la maladie, en général entre le 1er et le 3ème jour après le début des symptômes. De même, après l'arrêt des symptômes, les virus sont encore excrétés dans les selles. Ils peuvent être détectés à des titres faibles plusieurs semaines après la guérison chez des personnes sans pathologie sous-jacente et jusqu'à un an chez des personnes immunodéprimées. Des études chez des personnes âgées ont montré que le norovirus peut être présent dans les selles pendant 28,7 jours en moyenne (13,5–44,5 jours). Dans l'étude de Van et *al*, les adénovirus entériques peuvent être détectés 7 jours avant l'apparition des symptômes et jusqu'à 11 jours après l'arrêt des symptômes (43). Chez les personnes immunodéprimées, l'infection est souvent prolongée et l'on peut observer une excrétion chronique des virus de GEA avec une intermittence des symptômes (12). La détection à faible concentration de ces virus n'implique pas nécessairement une excrétion comportant un risque de transmission.

6. IMMUNITE

L'immunité humorale induite par les virus de gastro-entérites est sérotype-spécifique. Au cours de sa vie, un individu peut donc avoir plusieurs épisodes de gastro-entérites à rotavirus, à norovirus ou à adénovirus. Les expositions récurrentes à plusieurs sérotypes diminuent le risque d'infections ultérieures. Du fait de leur grande variabilité génétique, les réinfections à rotavirus et à norovirus sont les plus fréquentes.

L'immunité contre les rotavirus et les adénovirus est durable et se développe principalement pendant l'enfance. Dans l'infection à rotavirus, les anticorps neutralisants sont dirigés contre les protéines de capsid VP4 et VP7. Les gastro-entérites sévères sont souvent associées à une primo-infection à rotavirus, celle-ci ne protège pas l'enfant d'une seconde infection mais on

observe une diminution de la sévérité des symptômes. Ce phénomène n'est pas clairement expliqué, des anticorps IgA et d'autres réponses immunitaires au niveau des muqueuses pourraient être à l'origine de cette protection partielle lors de réinfections (47). À l'âge de 4 ans, plus de 85% des enfants possèdent des anticorps contre l'adénovirus type 40/41 et contre les rotavirus du groupe A.

En revanche, les norovirus n'induisent pas d'immunité protectrice à long terme. Elle durerait entre 6 mois et 2 ans. A partir d'un modèle mathématique, Simmons *et al.* estime que la durée de l'immunité des norovirus serait plus longue et comprise entre 4 et 8 ans (48).

7. DIAGNOSTIC DES GASTRO-ENTERITES AIGUËS VIRALES

Le contexte d'apparition de la maladie, la durée d'incubation et l'évolution des signes cliniques peuvent faire soupçonner l'agent pathogène responsable, néanmoins seule la détection directe du micro-organisme dans les selles permettra de confirmer le diagnostic. La grande majorité des investigations étiologiques est réalisée en milieu hospitalier. La GEA étant dans la majorité des cas bénigne et en l'absence de traitement spécifique par virus, des analyses virologiques sont rarement effectuées en médecine de ville.

Le diagnostic étiologique des gastro-entérites virales repose sur la recherche directe des antigènes viraux dans les selles. Un diagnostic sérologique est difficile du fait de la grande variabilité des souches infectieuses et de l'absence d'une immunité croisée. Historiquement, la microscopie électronique fut la première technique permettant de révéler la présence de ces virus dans les selles. Son principe repose sur les interactions entre un faisceau d'électrons accélérés et l'échantillon, aboutissant via un système de lentilles à une image d'une très haute résolution (0,08 nm). La distinction des virus est améliorée en augmentant le contraste de l'image par coloration négative (49). Cependant, avec l'apparition de techniques plus performantes et moins fastidieuses, la microscopie électronique n'est plus utilisée dans le diagnostic de routine des gastro-entérites virales. Le tableau 3 suivant indique les techniques actuellement utilisées en routine pour la détection des rotavirus, des norovirus et des adénovirus.

Tableau 3: Méthodes de diagnostic des virus de GEA

Prélèvement	Virus	Techniques
Selles	Rotavirus	ELISA Immunochromatographie Agglutination latex RT-PCR
	Norovirus	Immunochromatographie RT-PCR
	Adénovirus	ELISA Immunochromatographie Agglutination latex Culture (cellules Graham 293) PCR

La culture virale est possible uniquement pour les adénovirus et reste néanmoins peu fréquente. Ce sont surtout les méthodes immunologiques et plus récemment la biologie moléculaire qui sont utilisées pour le diagnostic des virus de GEA en routine.

7.1 METHODES IMMUNOLOGIQUES

Les méthodes ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay), d'agglutination latex et d'immunochromatographie sont des méthodes immunologiques basées sur la liaison spécifique antigène-anticorps. Cette liaison peut être révélée par agglutination, par coloration enzymatique ou par fluorescence. L'utilisation d'anticorps monoclonaux a permis d'augmenter leur spécificité et leur reproductibilité, cependant et contrairement à la biologie moléculaire, ces techniques ne permettent pas de distinguer les sérotypes viraux.

7.1.1 Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay

Malgré une sensibilité et une spécificité satisfaisantes, les techniques ELISA sont en désuétude depuis l'arrivée de méthodes plus rapides et performantes tels que les tests immunochromatographiques et la biologie moléculaire. Adaptées aux analyses de grandes séries, elles ne le sont pas pour les analyses unitaires ou en urgence car elles exigent un minimum d'équipement de laboratoire et la durée d'analyse est relativement longue. Pour se rapprocher d'un diagnostic en temps réel fiable, simple et peu coûteux, les tests immunochromatographiques connaissent un essor important et sont préférés à ELISA.

7.1.2 Les tests de diagnostic rapide

Les tests de diagnostic rapide (TDR) pour les gastro-entérites virales sont représentés par les tests d'agglutination au latex et surtout par les tests immunochromatographiques.

Le test d'agglutination au latex consiste à mettre en contact l'échantillon avec des microbilles de latex recouvertes d'anticorps spécifiques. La liaison de l'antigène viral cible à l'anticorps entraîne une agglutination visible à l'œil nu. Parmi les techniques de détection des virus de gastro-entérites, l'agglutination au latex est le test le moins sensible, il nécessite donc que les selles soient riches en virus. Par ailleurs, il est utilisé uniquement pour la détection des adénovirus et des rotavirus. En effet, la mise en place de ce type de test pour les norovirus est difficile à cause de la grande variabilité des souches. L'étude Lee *et al.* 2010, portant sur le développement d'un test d'agglutination au latex pour norovirus, obtient une excellente spécificité (100%) mais une sensibilité trop faible (35%) par rapport à la RT-PCR (50). Les tests d'agglutination au latex sont de plus en plus délaissés pour les tests d'immunochromatographie.

Les tests d'immunochromatographie présentent une meilleure sensibilité que les tests d'agglutination et leur champ d'application est plus large puisqu'ils sont utilisés aussi bien pour la détection des rotavirus, des adénovirus que des norovirus.

7.1.2.1 Principe des tests immunochromatographiques

Sous forme de bandelette (Figure 11), le test fait intervenir deux anticorps spécifiques de l'antigène recherché. Mis en contact avec l'échantillon, le premier anticorps forme un complexe antigène-anticorps migrant le long d'une membrane de nitrocellulose par capillarité. Quand ce complexe antigène-anticorps atteint la zone test, il est capturé par le second anticorps fixé à la membrane, dans ce cas une bande colorée apparaît dans la

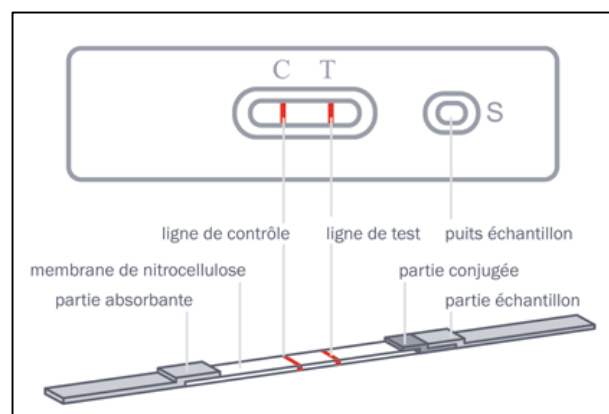


Figure 11: Représentation d'un test d'immunochromatographie

zone test. Pour s'assurer que la migration s'est faite correctement, un contrôle témoin est intégré au test.

Certains tests immunochromatographiques associent la détection conjointe des rotavirus et des adénovirus mais il n'existe pas encore de test détectant à la fois les rotavirus, les adénovirus et les norovirus. Ces tests ciblent spécifiquement les rotavirus du groupe A et les norovirus GI/GII, par contre il n'y a pas de sélection de groupe pour les adénovirus.

7.1.2.2 Performance des tests immunochromatographiques sur le marché

Plusieurs études ont testé la performance de différents kits commerciaux d'immunochromatographie pour la détection des virus de gastro-entérites (Tableau 4). Parmi elles, Bon *et al.* a évalué sept trousse commerciales de détection rapide par immunochromatographie des rotavirus du groupe A, en comparaison à une technique ELISA validée. En parallèle, une trousse d'agglutination latex est également testée. Trois trousse commerciales d'immunochromatographie (Rota strip, Rotascreen et VIKIA Rota/Adeno) se démarquent avec une sensibilité supérieure à 90 % et tous les kits obtiennent une spécificité de 100 %. En revanche la trousse Diarlex avec système de filtration (Orion Diagnostica) montre une sensibilité de 70,0 %, plus faible que l'agglutination latex testée (51). L'évaluation de De Rougemont sur le test VIKIA Rota/Adeno rapporte des résultats proches avec une sensibilité de 96,6 % et une spécificité plus faible de 96,4 %, en comparaison à la RT-PCR. La technique de référence de l'étude est à prendre en compte dans l'interprétation des résultats. En effet, l'évaluation des kits est d'autant plus pertinente qu'ils sont comparés à la technique la plus sensible et spécifique. Ainsi, on peut s'attendre à avoir des résultats plus probants en comparaison avec ELISA qu'avec une méthode de biologie moléculaire. La technique de référence est à prendre en compte dans la comparaison des performances des différents kits. C'est en effet ce qui est observé pour les deux évaluations du kit RIDA QUICK Rota/Adeno effectuées par le fournisseur R-Biopharm dont la sensibilité et la spécificité sont meilleures lorsque la technique de référence est ELISA que lorsque la technique de référence est la PCR. L'évaluation du kit RIDA QUICK Rota/Adeno par Weitzl *et al.* retrouve une sensibilité plus faible que le fournisseur R-Biopharm pour les rotavirus (75 % vs 98 %) et de manière plus importante pour les adénovirus (22 % vs 73%) (52). La littérature souligne d'importantes différences de sensibilité des kits de détection par immunochromatographie des norovirus,

variant de 35 % pour Immunocard STAT Norovirus (53) à 76 % pour SD Bioline (54). Permettant de détecter à la fois les norovirus GI et GII, il faut préciser que leur sensibilité est nettement meilleure pour le génotype II et ils sont plus particulièrement aptes à la détection des souches épidémiques GII.4 (53). La spécificité de l'ensemble des kits est excellente, une grande majorité est supérieure à 95 %. Globalement, les tests immunochromatographiques ont une meilleure performance pour la recherche des rotavirus que pour les adénovirus et les norovirus (55)(56). La publication Bon et *al* suggère que les étapes de congélation-décongélation des échantillons affectent le résultat des analyses immunologiques, cela induirait une dégradation des antigènes et leur non réactivité avec les anticorps. Ce facteur doit être pris en considération lors de l'utilisation de ces tests. Le coût des tests immunochromatographiques varie de 5 à 16\$ par unité (56).

Tableau 4: Performance de 11 tests d'immunochromatographie commercialisés

Nom du kit immunochromatographie	Fournisseur	Virus détectés	Sensibilité %	Spécificité %	Technique de référence de l'étude	Référence
VIKIA Rota-Adeno	Biomérieux	Rotavirus	96,6	96,4	RT-PCR	De Rougemont et al. 2009
		Adénovirus	92,5 nt	100 nt	ELISA	Bon et al. 2006
RIDA QUICK	R-Biopharm	Rotavirus	75	95	PCR/RT-PCR	Weitzel et al. 2007
		Adénovirus	22	84		
Combo Rota/Adeno Stick	All Diag	Rotavirus Adénovirus	87,5 nt	100 nt	ELISA	Bon et al. 2006
Diarlex®MB avec centrifugation	Orion Diagnostica	Rotavirus Adénovirus	88,8 nt	100 nt	ELISA	Bon et al. 2006
Diarlex®MB/Entérofiltres	Orion Diagnostica	Rotavirus Adénovirus	70,0 nt	100 nt	ELISA	Bon et al. 2006
Rota/Adeno Combi Stick	Bmd biomedical diagnostics	Rotavirus Adénovirus	82,5 nt	100 nt	ELISA	Bon et al. 2006
Rotascreen Dipstick	Microgen	Rotavirus	95,0	100	ELISA	Bon et al. 2006
ROTA Strip	Cypress Diagnostics	Rotavirus	98,8	100	ELISA	Bon et al. 2006
SD BIOLINE	Standard Diagnostics	Norovirus	76,5	99,7	RT-PCR	Park et al. 2011
			62	98,6	RT-PCR	Bruggink et al. 2013
RIDAQuick norovirus	R-Biopharm	Norovirus	61,4	100	RT-PCR	Battaglioli et al. 2012
			52	100	RT-PCR	Ambert-Balay et al. 2013
Immunocard STAT Norovirus	Denka Seiken Co	Norovirus	35	100	RT-PCR	Ambert-Balay et al. 2013

En conclusion, les tests immunochromatographiques possèdent des caractéristiques très satisfaisantes. Ils ne requièrent pas d'équipement coûteux ni de personnel expérimenté et la durée du test est courte. Cependant il est recommandé de les utiliser en complément d'une technique plus sensible telle que la PCR. En milieu hospitalier, les tests de diagnostic rapide

sont très utilisés car ils permettent d'identifier rapidement les patients infectés et d'établir l'origine virale des gastro-entérites. Ainsi, le traitement adéquat, les mesures d'hygiène et d'isolement peuvent être appliqués rapidement afin de limiter la diffusion nosocomiale. Ils améliorent également la rapidité d'alerte épidémique. Adapté aux situations d'urgence et de précarité, cet outil de diagnostic est particulièrement apprécié dans les pays en voie de développement.

7.2 METHODES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE

Mise au point par Kary Mullis en 1986 (57), la réaction en chaîne par polymérase ou PCR est une méthode de biologie moléculaire très sensible et spécifique qui connaît depuis un essor considérable dans de nombreux domaines. Elle est la plus performante des techniques disponibles pour détecter les virus de gastro-entérites. Elle a pour principe d'amplifier *in vitro* une séquence d'ADN ou d'ARN spécifique à partir d'une faible quantité d'acides nucléiques, de l'ordre de quelques picogrammes. De nombreuses variantes se développent et élargissent les champs d'applications (Annexe 3)(58). De plus, cette technique permet aussi de séquencer le génome du fragment amplifié et d'identifier les différents sérotypes viraux. Elle a permis de mieux connaître l'épidémiologie et la variabilité génétique des norovirus en particulier mais aussi des autres virus responsables de gastro-entérites. Les souches sont répertoriées dans des banques génomiques. Pour exemple, celle du Centre National de Référence des virus entériques en France comprend plus de 2000 souches virales caractérisées, essentiellement norovirus et rotavirus, mais également adénovirus 40/41, astrovirus, sapovirus et virus Aichi.

7.2.1 Principe de la PCR/RT-PCR en temps réel

La RT-PCR est utilisée lorsque le matériel génétique à analyser est de l'ARN, comme c'est le cas pour les rotavirus et les norovirus. Une étape de rétrotranscription, en amont de la PCR classique est alors nécessaire. Elle est réalisée par la reverse transcriptase (RT) qui est une enzyme provenant de rétrovirus ou de rétrotransposons qui l'utilisent pour transcrire l'ARN en ADN afin de pouvoir s'intégrer au génome de l'hôte. En RT-PCR, elle permet la synthèse d'un brin d'ADN complémentaire à partir d'une matrice d'ARN. L'ADN est ensuite soumis à l'amplification.

Dans un premier temps l'analyse de PCR est uniquement qualitative mais sa nature exponentielle la rend attrayante pour des analyses quantitatives. Les premières études cinétiques ont été lancées par Russel Higuchi en 1992, du bromure d'éthidium est utilisé comme agent intercalant au niveau des amplicons, sa fixation à l'ADN est révélée grâce à l'émission de rayonnements ultraviolets stimulée par un thermocycleur. En traçant l'augmentation de l'émission de fluorescence en fonction du nombre de cycles, le système décrit une relation entre la quantité initiale de la séquence nucléotidique présente dans l'échantillon et la quantité d'amplicons produits à chaque cycle (59)(60). La PCR/RT-PCR quantitative (qPCR), aussi appelée PCR/RT-PCR en temps réel, est née. Elle permet de suivre au cours du temps la quantité d'amplicons générés dans le tube réactionnel de PCR grâce à des marqueurs fluorescents (Figure 12). L'émission de fluorescence est directement proportionnelle à la quantité d'ADN synthétisé.

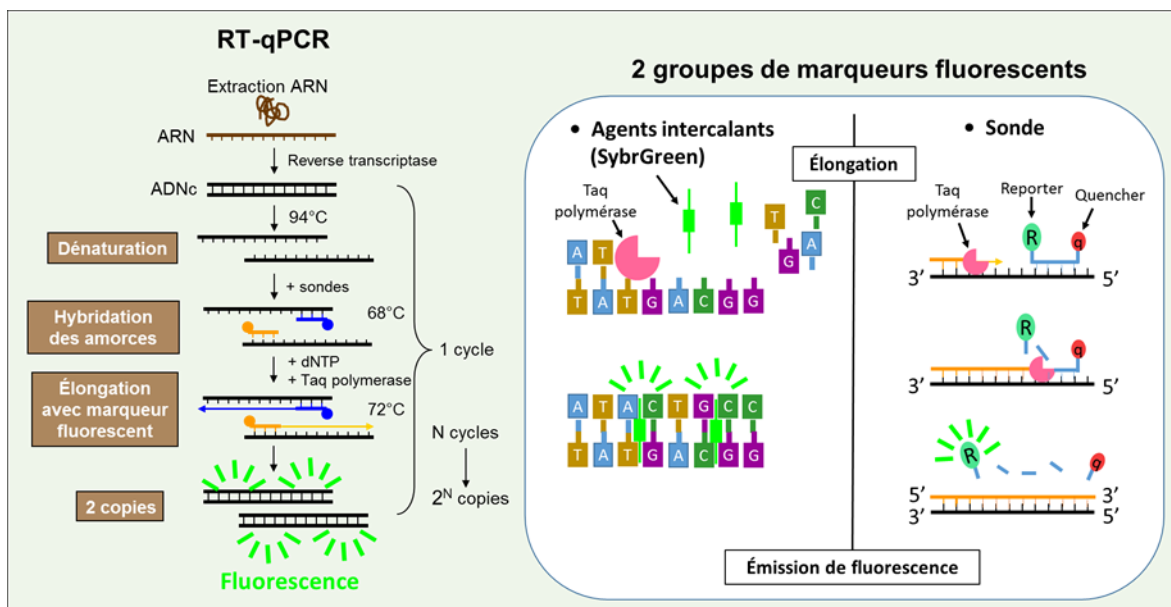


Figure 12: Principe de la RT-PCR en temps réel

7.2.1.1 Les systèmes de détections

On distingue deux systèmes de détection: les agents intercalants et les sondes.

L'agent intercalant est un fluorophore spécifique de l'ADN double brin, le Sybr Green. Ce fluorophore s'incorpore dans le petit sillon de la double hélice d'ADN et fluoresce. A chaque cycle de la PCR, le signal fluorescent augmente au cours de l'étape d'élongation. Avec ce système, la spécificité repose uniquement sur la spécificité des amorces utilisées. A la fin de la

réaction, une étape de vérification de la spécificité d'amplification est possible grâce à la courbe de fusion. La température de fusion de la séquence cible est représentée par un pic unique. Si l'on obtient plusieurs pics à des températures différentes ou des pics décalés par rapport au T_m attendu, c'est que l'on est en présence d'un mélange d'amplicons ou d'amplicons ayant une séquence différente. En général, le pic de fusion d'un produit PCR se distingue facilement des pics de fusion de produits non spécifiques car ceux-ci sont dénaturés à des températures plus faibles avec des pics plus larges.

Le second système utilise des sondes internes fluorescentes complémentaires d'une séquence située à l'extrémité 5' de l'ADN cible. De ce fait, la spécificité de la détection est plus importante. Il existe plusieurs types de sondes.

- La sonde d'hydrolyse ou sonde Taqman

Cette sonde est doublement marquée par un fluorochrome (reporter) à son extrémité 5' et par un suppresseur (quencher) à son extrémité 3'. Le quencher inhibe l'émission du reporter lorsqu'ils sont à proximité. Lors de l'élongation, l'activité 5'-3'exonucléasique de la Taq polymérase hydrolyse la sonde fixée et sépare le reporter du quencher. Le reporter peut alors émettre un signal fluorescent proportionnel au nombre de sondes hydrolysées, mesurable au moment de l'élongation. La spécificité de la réaction est liée à la fois à celle des amorces et à celle de la sonde réduisant significativement l'émission de fluorescence non spécifique due à des mésappariements ou des dimères d'amorce. Cependant, le risque d'avoir de faux négatifs est beaucoup plus élevé qu'avec les agents intercalants, des mutations dans la région reconnue par la sonde risquant d'entraîner un défaut d'hybridation et donc l'absence de détection. Cette technique présente par ailleurs l'avantage de détecter plusieurs cibles dans le même tube en utilisant différentes sondes marquées avec des fluorochromes ayant des spectres d'émission différents (multiplexage) (61).

- Les sondes d'hybridation

- La sonde Molecular Beacons

Comme la sonde Taqman, elle est composée d'un reporter et d'un quencher mais se présente sous forme d'épingle à cheveux à l'état libre. Sous cette forme, le reporter, très proche du quencher n'émet pas de fluorescence. Lors de l'hybridation de la sonde à l'ADN, cette dernière se linéarise éloignant le reporter du quencher qui peut alors fluorescer. Lors de l'élongation, la polymérase déplace la sonde qui revient à l'état libre. Une variante de Molecular Beacons,

appelé Scorpion, est complété d'une amorce après le quencher. Cette amorce permet de fixer la sonde à l'extrémité 3' de ADN cible et d'initier la polymérisation du brin complémentaire. La sonde toujours en forme d'épingle se retrouve alors dans la continuité du brin néo formé, à la prochaine étape de dénaturation, elle se linéarise puis s'hybride à ce même brin par retournement, rappelant la queue d'un scorpion. Dans cette configuration, le reporter, éloigné de l'inhibition du quencher, émet une forte fluorescence. Cette variante est dotée d'une grande sensibilité et d'une grande spécificité.

- La sonde FRET (Fluorescent Resonance Energy Transfer)

Cette méthode utilise deux sondes ce qui accroît la spécificité. L'une porte à son extrémité 3' un fluorochrome donneur (fluorescéine), et la seconde porte un fluorochrome accepteur à son extrémité 5'. Lorsque les sondes s'hybrident chacune sur leur séquence de nucléotides complémentaire, très proches l'une de l'autre, l'énergie du fluorochrome donneur est transmise par FRET (Fluorescent Resonance Energy Transfer) au fluorochrome accepteur qui se met à fluorescer. Les sondes FRET sont d'une excellente sensibilité et sont dotées d'une grande capacité de multiplexage mais leur prix est élevé et la présence de mutations non identifiées peut déstabiliser leur hybridation et donc l'interprétation de la réaction.

Contrairement à la sonde Taqman, les sondes FRET et Molecular Beacons ont l'avantage de ne pas être hydrolysées, la fluorescence est alors réversible ce qui permet la réalisation de courbes de fusion.

7.2.1.2 L'analyse quantitative

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

inversement proportionnel au log de la quantité initiale N_0 , il s'agit d'une donnée semi-quantitative.

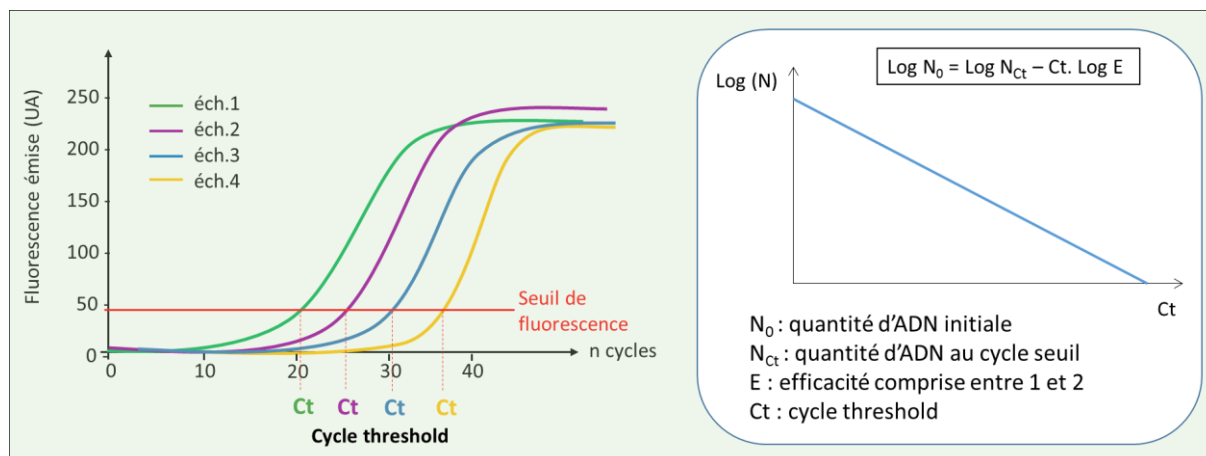


Figure 13: Relation linéaire entre le cycle threshold (Ct) et la quantité d'ADN

Il existe deux types de quantification : la quantification relative et la quantification absolue. Dans la quantification relative, le nombre de copies du gène ou de la séquence cible est déterminé par rapport à une référence. La quantification absolue mesure le titre exact de l'acide nucléique recherché dans l'échantillon à l'aide d'une courbe standard établie avec des titres standards purs et quantifiés.

7.2.2 Performance des kits commerciaux de détection moléculaire des rotavirus, des norovirus et des adénovirus

Dans un premier temps, des kits de PCR en temps réel détectant un seul virus ont été développés puis des kits de PCR multiplex. Ces derniers ont l'avantage de détecter plusieurs agents entéropathogènes dans une seule analyse de PCR. La PCR multiplex apporte ainsi un gain en coût et en temps d'analyse. Elle est particulièrement utile dans le diagnostic viral des gastro-entérites puisque les virus entéropathogènes ne sont pas cliniquement distinguables. De plus, les cas de co-infections sont directement identifiés et leur performance est comparable aux PCR simples (tableau 5) (62)(63). Les cibles d'amplification génique sont principalement les gènes codant les protéines de capsides externes VP6 ou VP7 pour les rotavirus et la région de la jonction des gènes ORF1-ORF2 (capside-polymérase) pour les norovirus GI/GII. Pour la détection des adénovirus type 40/41, c'est une région du gène de la fibre virale spécifique du groupe F qui est amplifiée. De spectre plus large, les PCR ayant pour cible le gène hexon permettent la détection de l'ensemble des adénovirus A-F.

Comparés à une autre technique de biologie moléculaire, les kits de détection moléculaire des norovirus GI/GII ont montré une sensibilité clinique très satisfaisante, de 91 à 97%. Pour les rotavirus et les adénovirus, la sensibilité est maximale. La spécificité, tous virus confondus, oscille entre 96% et 100%. Evalué par rapport à un test d'immunochromatographie, le kit multiplex EasyScreen obtient une sensibilité et une spécificité de 100% pour chaque virus testé. Bien entendu, la technique de référence utilisée est à prendre en compte dans l'interprétation des résultats de performance obtenus. Les techniques de référence étant différentes, une comparaison des résultats entre le kit Seeplex et le kit EasyScreen n'est pas pertinente. Le coût approximatif du kit Seeplex est de 25\$ par test (64) et il est estimé à 51\$ par test pour le kit Easyscreen (56).

Tableau 5. Propriétés analytiques de deux troussees commerciales de PCR/RT-PCR multiplex en temps réel utilisées dans le diagnostic viral des GEA

Nom du kit PCR	Fournisseur	Virus détectés	Limite de détection (GEq/réaction)	Sensibilité %	Spécificité %	Technique de comparaison	Référence
Seeplex Diarrhea-V ACE	Seegene (Corée du Sud)	Rotavirus	10	100	100	Microscopie électronique/ RT-PCR maison	Higgins et al. 2011
		Adénovirus	31	100	100		
		Norovirus GI	2	100	100		
		Norovirus GII	1	97	99,4		
EasyScreen Enteric viral detection kit	Genetic Signatures (Australie)	Rotavirus (A/B)	Non renseigné	100	100	IC (RIDA QUICK)	Thomas et al. 2013
		Norovirus GI		100	100		
		Norovirus GII		100	100		
		Adénovirus		100	100		
		Astrovirus		nt	nt		
		Sapovirus		nt	nt		

Des kits multiplex permettant la détection combinée de virus, de bactéries et de parasites entériques sont disponibles tels que XTAG GPP (Luminex), Faecal pathogens A (AusDiagnostic) et Filmarray GI panel (Biofire) qui détectent respectivement 15, 16 et 23 entéropathogènes différents (56)(65).

8. PREVENTION ET TRAITEMENT DES GASTRO-ENTERITES VIRALES

Excepté un traitement prophylactique par la vaccination pour l'infection à rotavirus, le traitement des gastro-entérites virales est uniquement symptomatique. Aucun antiviral efficace n'est actuellement disponible. La transmission étant principalement interhumaine, les mesures de prévention jouent un rôle primordial pour limiter la diffusion de la maladie.

8.1 LES MESURES DE PREVENTION

8.1.1 Mesures générales individuelles et collectives

Pour limiter la contamination par les virus entéropathogènes, les actions suivantes sont recommandées :

- Protection des denrées alimentaires
- Rinçage à l'eau des légumes crus et des fruits frais avant leur consommation
- Hygiène : lavage des mains, désinfections des zones sensibles (toilettes, linges, poignées de portes, jouets...)
- Allaitement maternel exclusif et prolongé
- Vaccination anti-rotavirus

Grâce à la présence d'anticorps dans le lait maternel, l'allaitement maternel protège les nourrissons des infections à rotavirus (66). Pour se prémunir des infections à norovirus, la protection et la surveillance des zones de production alimentaire et des zones hydriques (parc à huîtres, station d'épuration, eau de consommation...) sont recommandées. Le contrôle des zones sensibles par les techniques moléculaires améliore la surveillance et accélère les alertes sanitaires (45). Dans la restauration, la préparation des aliments doit suivre des règles d'hygiène strictes. Les surfaces de travail doivent être désinfectées à l'eau de javel et tout employé malade doit être exclu de son travail jusqu'à 48h à 72h après l'arrêt des symptômes. Dans les collectivités et les établissements de soins, le lavage minutieux des mains au savon antiseptique ou solution hydro-alcoolique et dont l'efficacité a été démontrée est une mesure permanente. La fréquence de nettoyage et de désinfection des locaux est intensifiée dès les premiers cas de GEA. En allant des zones les plus propres aux zones les plus sales, les surfaces peuvent être désinfectées à l'eau de javel (1000 ppm), avec des désinfectants oxygénés ou contenant des aldéhydes (5)(32). Les patients symptomatiques sont isolés et le personnel soignant utilise des équipements de protection individuelle (blouse, gants, masque) à usage unique. Dans les pays en voie de développement, les actions privilégiées sont l'accès à l'eau potable, aux soins et à la vaccination, ainsi que d'informer les populations sur les modalités de propagation des GEA et les moyens de prévention. Bien que l'incidence et la gravité des infections virales liées au péril fécal varient selon le niveau socio-économique des pays, le risque est omniprésent.

Les rotavirus, en suspension ou sur des surfaces inertes, sont sensibles aux produits suivants :

- Glutaraldéhyde 2 %
- Désinfectants chlorés (> 20 000 ppm de chlore)
- Désinfectants iodés (> 10 000 ppm d'iode)
- Associations de composés d'ammonium quaternaire avec des alcools > 40 %
- Certains acides dont l'acide chlorhydrique
- Certaines bases dont le métasilicate de sodium
- Associations de composés phénoliques et de puissants agents de surface anioniques

Des temps d'exposition plus longs sont nécessaires pour désinfecter les surfaces contaminées que les suspensions ou solutions contaminées. Les rotavirus se sont aussi révélés très sensibles aux désinfectants de marque Lysol (alcool éthylique à 79 %, o-phénylphénol à 0,1 %). Parmi les autres désinfectants efficaces, notons la formaline et l'hypochlorite de sodium. Le rotavirus est sensible à un pH fortement acide (< 3,0). Il est aussi sensible à la chaleur à une température supérieure à 50 °C pendant 30 minutes (11).

Pour les norovirus, la désinfection à l'eau de javel minimum 1000 ppm est le moyen le plus efficace (32). Cependant en cas d'impossibilité d'utilisation de ce produit, l'US Environmental Protection Agency soumet une liste de plus de 50 produits efficaces contre les norovirus et nommée « List G: EPA Registered Hospital Disinfectants Effective Against Norovirus » (67).

Les adénovirus sont eux aussi sensibles à l'hypochlorite de sodium (0,5% de chlore actif). Le glutaraldéhyde à 2 % et le dodécyl sulfate de sodium à 0.25 % sont des alternatives efficaces. L'utilisation d'éthanol à 70° n'est pas conseillée car il existe des résistances. Les adénovirus sont détruits par chauffage à 90°C pendant 5 minutes ou 56°C pendant 30 minutes et par les rayonnements ionisants (68).

8.1.2 Le vaccin anti-rotavirus

En raison de la grande diversité des rotavirus humains et de l'absence d'une immunité croisée, les vaccins anti-rotavirus doivent induire une protection hétérotypique suffisante pour être efficaces. Deux vaccins vivants atténués destinés aux nourrissons sont disponibles sur le marché depuis 2006.

- Rotarix ®, fabriqué par GlaxoSmithKline (GSK)

Ce vaccin est monovalent et provient d'une souche humaine atténuée de génotype G1P[8] (ou sérotype G1P1A). Le schéma vaccinal est de 2 doses, la première dose peut être administrée dès l'âge de 6 semaines, les deux doses doivent être espacées d'au moins 4 semaines et administrées avant l'âge de 24 semaines. Le vaccin Rotarix est administré par voie orale.

- RotaTeq ®, fabriqué par Merck & Co. Inc.

Ce second vaccin est pentavalent, il est composé de virus bovins recombinants exprimant les protéines de surface de rotavirus humains (VP7 de génotype G1, G2, G3, G4 et VP4 de génotype P[8]). Le schéma vaccinal est de trois doses, la première doit être administrée à l'âge de 6 à 12 semaines et les autres doses à intervalles de 4 à 10 semaines entre chaque dose, soit un calendrier vaccinal à 2, 4 et 6 mois. Le vaccin Rotateq est administré par voie orale.

Les essais cliniques puis leur large utilisation ont montré leur innocuité et leur efficacité dans la protection des diarrhées sévères à rotavirus. Les vaccins monovalent et pentavalent ont montré une efficacité similaire. Dans les pays développés, l'efficacité est comprise entre 74 et 87% contre tout type de diarrhée et entre 85 et 98% contre les diarrhées sévères, elle varie selon les génotypes de rotavirus. L'efficacité de la vaccination est moins élevée dans les pays en développement, surtout dans les pays présentant un taux de mortalité des enfants de moins de 5 ans élevée où elle a été estimée entre 50 et 64% (69).

Dans la plupart des pays qui ont introduit les vaccins anti-rotavirus dans leurs programmes nationaux de vaccination, une baisse rapide et significative des hospitalisations et des décès liés aux diarrhées a été observée (70). Devant ce constat, l'OMS recommande la vaccination contre le rotavirus depuis 2009. En avril 2014, 56 (29%) des 194 États Membres de l'OMS avaient introduit le vaccin anti-rotavirus. Dans la Région des Amériques, les études ont montré une baisse du dépistage des rotavirus et une diminution marquée des hospitalisations liées à la diarrhée et plus spécifiquement au rotavirus. Les cas de GEA recensés aux Etats-Unis par les praticiens généralistes ont diminué de 15% de 2006 à 2011 (71). La baisse du taux de dépistage a été plus importante que prévu par rapport au taux de couverture vaccinale, ce qui fait évoquer la possibilité d'une protection collective. Au Salvador, où le vaccin a été introduit en 2006, les hospitalisations pour infection à rotavirus ont chuté de 81% en 2008 et de 69% en 2009. En outre, les hospitalisations pour des diarrhées toutes causes confondues au cours de la saison des infections à rotavirus ont chuté de 48% en 2008 et de 35% en 2009, par rapport à 2005-2006

(72). En France, une campagne de vaccination localisée avec un taux de couverture vaccinale à 47% a permis de diviser par deux le nombre d'hospitalisation pour GEA à rotavirus (69). Hors, la vaccination contre les rotavirus concerne seulement 7 à 9% de la population infantile en France et la prise en charge ou non de cette vaccination fait encore débat. Des analyses supplémentaires sont nécessaires pour confirmer les effets de la vaccination, notamment dans les pays en développement. Les analyses doivent tenir compte de l'année au cours de laquelle le vaccin a été introduit, de la couverture vaccinale, de la classe d'âge sous surveillance, des tendances séculaires de la diarrhée à rotavirus et des modifications apportées aux systèmes de surveillance des pays.

L'absence de modification de la distribution des souches et de l'émergence d'une nouvelle suggère que le vaccin n'induit pas de pression sélective (73). Cependant, certains cas de GEA ont été associés à des souches vaccinales chez des personnes vaccinées et non vaccinées (74). Un réassortiment dérivé des souches vaccinales pourrait être à l'origine de ce phénomène occasionnel et il a été observé qu'un enfant vacciné pouvait transmettre la souche vaccinale à ses proches (75). Une surveillance accrue de la circulation des souches de rotavirus est nécessaire, d'une part pour évaluer l'efficacité du vaccin en fonction des souches et d'autre part pour détecter l'émergence de nouvelles souches qui pourraient être à l'origine d'un échappement à la vaccination.

Par rapport à la sécurité du vaccin, les études de sécurité postérieures à l'Autorisation de Mise sur le Marché confirment le faible risque d'invagination intestinale aiguë, 1 à 6 cas pour 100 000 enfants vaccinés. Ce risque est essentiellement limité à la période de 7 jours suivant l'administration de la première dose (76). Toutefois, une pharmacovigilance renforcée relative à la survenue d'invagination intestinale aiguë se poursuit.

Des vaccins anti-rotavirus homologués seulement pour une utilisation nationale sont actuellement disponibles en Inde (ROTAVAC®), au Vietnam (Rotavin-M1®) et en Chine (Lanzhou Lamb). De nouveaux vaccins, actuellement en cours de fabrication en Inde, en Chine et au Brésil, pourraient être disponibles prochainement.

En ce qui concerne les norovirus, leur variabilité et les mutations rapides rendent difficile la fabrication d'un vaccin efficace. Comme pour la grippe, les variations des souches virales du

norovirus impliqueraient une reformulation annuelle du vaccin. Néanmoins des vaccins anti-norovirus prometteurs sont en cours de développement (77) tel que le vaccin bivalent à particules pseudo-virales anti-norovirus GI.1/GII.4 (78)(79)(80). Ce vaccin bivalent est introduit par voie intranasale ou intramusculaire. Des essais cliniques de phase I sur un nombre limité d'adultes sains ont été réalisés (79). Les résultats de l'inoculation in vivo de ces particules pseudo-virales ont montré une forte réponse immunitaire humorale et cellulaire. Les anticorps neutralisants générés sont capables d'empêcher l'entrée du virus dans les cellules intestinales (81) et la tolérance du vaccin est bonne. Un essai clinique de phase II, coordonné par l'entreprise pharmaceutique japonaise Takeda, est actuellement en cours. Il a pour objectif d'évaluer la sûreté du vaccin et d'étudier les effets secondaires et les réactions indésirables. Cet essai clinique comprend 650 participants et devrait se terminer en janvier 2016 (82).

Pour les adénovirus entériques, aucun vaccin n'est disponible ou en cours de développement. Seul un vaccin contre les infections respiratoires provoquées par les adénovirus type 4 et 7 est disponible uniquement aux Etats-Unis, il est principalement utilisé chez les recrues militaires US (68). En revanche, les adénovirus ont des propriétés qui font d'eux des vecteurs de vaccin et de thérapie génique très prometteurs (83), de nombreuses recherches concernant la formulation de vaccins contre des maladies infectieuses tel que le syndrome d'immunodéficience acquise et de nouvelles thérapies anticancéreuses sont en cours (84)(85).

8.2 LE TRAITEMENT SYMPTOMATIQUE DE LA GASTRO-ENTERITE AIGÜE

La prise en charge des gastro-entérites s'est améliorée avec l'introduction de la thérapie par réhydratation orale (TRO). Elle permet de traiter ou de prévenir la déshydratation au moyen de sels de réhydratation orale (SRO). Les SRO sont une solution d'eau pure, de sel et de sucre. Ces composés sont rapidement absorbés par l'intestin grêle et compensent les pertes hydriques et électrolytiques causées par la diarrhée et les vomissements. Elle est administrée par voie intraveineuse en cas de déshydratation sévère ou de choc. Son introduction en 1978 a été un véritable succès puisque les SRO ont permis de réduire considérablement le taux de mortalité des gastro-entérites. La mortalité des enfants âgés de moins de 5 ans atteints de diarrhée aigüe est passée de 4,5 millions à 1,8 million annuellement. Depuis 2003, une nouvelle formule avec des teneurs en glucose et en sodium plus faibles est recommandée (Tableau 6), il s'agit de SRO

à osmolarité réduite. Cette nouvelle formule diminue la durée de la diarrhée et le besoin de perfusions intraveineuses.

Tableau 6: Composition de la solution de réhydratation orale à osmolarité réduite

SRO à osmolarité réduite	grammes/litre	SRO à osmolarité réduite	mmol/litre
Chlorure de sodium	2,6	Sodium	75
Glucose, anhydre	13,5	Chlorure	65
Chlorure de potassium	1,5	Glucose, anhydre	75
Dihydrate de citrate trisodique	2,9	Potassium	20
		Citrate	10
Osmolarité totale			245

L'alimentation et une supplémentation en zinc interviennent également dans le traitement de la diarrhée aiguë. Il a été démontré qu'un apport en zinc réduit la durée de 25% et la sévérité de l'épisode diarrhéique avec une réduction du volume des selles de 30%. Il réduit aussi l'incidence de la diarrhée dans les 2-3 mois suivant le traitement. L'apport recommandé est de 20 mg de zinc (10 mg pour les enfants de moins de 6 mois) pendant 10 à 14 jours. Une alimentation riche en nutriments, dont l'allaitement maternel, doit être maintenue, elle favorise la rémission des jeunes enfants (86).

8.3 ANTIVIRAUX ET PERSPECTIVES

De nombreuses études tentent de mieux comprendre le cycle de vie des virus afin de trouver de nouvelles stratégies antivirales. Que ce soit pour les rotavirus, les norovirus ou les adénovirus, de nombreuses cibles virales ont été explorées et plusieurs molécules ont montré leur efficacité *in vitro*. Cependant des études complémentaires *in vivo* et des essais cliniques sont nécessaires pour confirmer leur efficacité et leur innocuité chez l'homme. Les principaux composés antiviraux testés sont des inhibiteurs de liaison (sialylés, peptides), des inhibiteurs de la réplication virale (analogues nucléotidiques/nucléosidiques) et des inhibiteurs de protéase (Tableau 7) (81).

Tableau 7 : Composés antiviraux potentiels pour le traitement des GEA à norovirus

Composé	Cible virale	Activité antivirale
2'-C-methylcytidine et dérivés	Polymérase NS7	Inhibe la réplication virale
Fapivirapir	Polymérase NS7	Inhibe la réplication virale
Ribavirine	Polymérase NS7	Inhibe la réplication virale
Acides mycophenolique	Polymérase NS7	Inhibe la réplication virale
Styrylchromones	NS7 ?	Inhibe la réplication virale
2'-arauridine and 3'-deoxyuridine	Polymérase NS7	Inhibe la polymérase in vitro
NF023	Polymérase NS7	Inhibe la polymérase in vitro
Suramin	Polymérase NS7	Inhibe la polymérase in vitro
Suramin	Capside (VP1)	Diminue la liaison du virus aux cellules intestinales
Heparin	Capside (VP1)	Diminue la liaison du virus aux cellules intestinales
Citrate et analogues de fucose	Capside (VP1)	Inhibe la liaison aux antigènes de groupe sanguin
Substrate-based aldehydes	Protéase (NS6)	Inactive la protéase par liaison covalente
Phosphorodiamidate morpholino oligomers PPMOs	ARN viral	Blocage de l'expression de protéines par le gene ORF1
siRNAs	ARN viral	Active la réponse cellulaire RNAi contre le génome viral
Interféron	Translation virale	Inhibe la réplication virale

Compte tenu de la disponibilité d'un vaccin contre le rotavirus, les recherches de molécules antivirales se sont surtout tournées vers les norovirus. La multiplication des norovirus humains sur culture cellulaire étant impossible, ce sont des norovirus murins ou d'autres Calicivirus qui sont utilisés pour comprendre les interactions virus-cellule hôte et tester l'efficacité de certains composés antiviraux (87).

9. EPIDEMIOLOGIE DES GASTRO-ENTERITES VIRALES

9.1 LES GASTRO-ENTERITES VIRALES DANS LE MONDE

Partout dans le monde, les gastro-entérites aiguës virales sont principalement dues aux rotavirus chez les enfants de moins de 5 ans et aux norovirus tous âges confondus (88)(89)(90). Les rotavirus sont ubiquitaires, chaque année, ils sont responsables de 114 millions de cas de diarrhée aiguë engendrant approximativement 2,4 millions d'hospitalisations à travers le monde. Les infections sévères chez les jeunes enfants sont associées à un rotavirus dans 30% des cas. Environ 500 000 enfants de moins de 5 ans meurent de diarrhée à rotavirus par an, dont plus de 80 % dans les pays à faible revenu d'Afrique et d'Asie (91). L'OMS coordonne un réseau mondial de surveillance des rotavirus « The Global Rotavirus Surveillance Network », dans

lequel des hôpitaux sentinelles utilisent des définitions de cas et des méthodes de laboratoire normalisées, en général des dosages immuno-enzymatiques, pour répertorier les cas de diarrhée à rotavirus. De 2001 à 2012, 176 517 échantillons de selles provenant d'enfants âgés de moins de 5 ans souffrant de GEA ont été testés à la recherche de rotavirus (Tableau 8). Le taux médian de positivité au rotavirus a été de 37,3 %.

Tableau 8: Taux de détection médian des rotavirus sur la période 2001-2012

Réseau mondial de surveillance des rotavirus, OMS				
Période	Nombre de pays	Nombre d'enfants recrutés (échantillons testés)	Taux de dépistage de rotavirus médian	Source Relevé Epidémiologique Hebdomadaire, OMS
2001-2008	35	62 584	40 %	N°47, 2008, 83, 421-428
2009	43	38 580	36 %	N°18, 2011, 86, 173-176
2011-2012	37	75 353	36 %	N°30, 2014, 89, 337-344
Total	Moyenne 38	176 517	37,3 %	

Ce réseau est essentiellement composé de pays en voie de développement, dont une minorité a introduit le vaccin anti-rotavirus, ce taux est par conséquent plutôt représentatif des pays sévèrement touchés. Les taux obtenus dans les pays développés sont généralement plus faibles.

Le tableau 9 reprend les résultats de surveillance de l'année 2009. Le taux de dépistage médian a fluctué entre 25% dans la Région des Amériques et 47% dans la Région du Pacifique occidental (92).

Tableau 9 : Taux de détection des rotavirus par région de l'OMS chez les enfants <5ans en 2009

WHO region – Région OMS	No. of countries – Nombre de pays	No. (range) of children enrolled – Nombre d'enfants recrutés (éventail)	No. (range) of children enrolled	
			with stool specimens tested for rotavirus – Nombre d'enfants recrutés dont les échantillons de selles ont été testés à la recherche de rotavirus (éventail)	Median detection rate (%) for all countries (range) – Taux de détection médian (%) pour l'ensemble des pays (éventail)
African – Afrique	9	4 377 (153–1128)	4 191 (151–1036)	41 (16–57)
Americas ^a – Amériques ^a	12	16 242 (210–3698)	13 139 (111–2327)	25 (19–42)
Eastern Mediterranean – Méditerranée orientale	10	14 004 (205–6227)	10 475 (205–3442)	38 (14–54)
European – Europe	4	4 409 (737–1485)	4409 (737–1485)	36 (12–52)
South-East Asia – Asie du Sud-Est	2	1 389 (514–875)	1389 (514–875)	37 (32–42)
Western Pacific – Pacifique occidental	6	5 511 (276–2026)	4977 (275–1874)	47 (24–68)
Total	43	45 932 (153–6227)	38 580 (111–3442)	36 (12–68)

^a No data were available about the number of children enrolled in Suriname. – ^a Aucune donnée n'a été disponible concernant le nombre d'enfants recrutés au Suriname.

Face au rôle avéré de l'infection à rotavirus dans la diarrhée grave chez l'enfant, l'OMS a recommandé en 2009 d'inclure le vaccin anti-rotavirus dans tous les programmes nationaux de vaccination infantile. Les pays ont commencé à introduire le vaccin anti-rotavirus en 2006 et ceux de la Région des Amériques ont été parmi les premiers à adopter ce vaccin. En 2009, cette même région a notifié le taux de dépistage des rotavirus le plus faible de toutes les Régions de l'OMS (Tableau 9). Il existe d'autres réseaux de surveillance à échelle régionale tel qu'EuroRotanet qui a pour mission la surveillance et la caractérisation des rotavirus en Europe.

En ce qui concerne les norovirus, leur incidence dans les gastro-entérites a été sous-estimée par le passé car les méthodes de détection étaient limitées. Grace au développement de techniques de biologie moléculaire, ils sont à présent détectés dans la majorité des cas groupés de gastro-entérites en collectivités telles que les crèches, les hôpitaux et les maisons de retraite. La présence d'anticorps chez les enfants âgés de 5 à 15 ans à travers le monde montre la large diffusion des norovirus. Leur résistance et leur très faible dose infectieuse favorisent la contamination directe inter-humaine (voie fécal-orale ou vomi-orale) et indirecte par l'environnement, les aliments et l'eau contaminés. Les norovirus seraient responsables de 7 à 24% des infections d'origine alimentaire dans le monde (32). Ces dernières décennies, les norovirus du génogroupe II et du génotype 4 (GII.4) ont été la cause de la majorité des épidémies (26). Ils possèdent une étonnante capacité évolutive marquée par l'apparition de nouveaux variants à l'origine de nouvelles épidémies (93). Dans les cas sporadiques, c'est le norovirus GII.3 qui est le plus souvent impliqué (27). Comme les rotavirus, les norovirus font l'objet d'une surveillance internationale. Le réseau NoroNet regroupe plusieurs laboratoires d'Europe, d'Amérique du Nord et du Sud, d'Asie et d'Océanie qui suivent l'évolution des norovirus. Chaque pays participant peut ainsi alerter les autres pays de l'émergence d'un nouveau variant épidémique. Ces réseaux offrent l'accès à une base de données donnant la possibilité de comparer les souches entre elles.

Après les rotavirus et les norovirus, les pathogènes les plus rencontrés dans les gastro-entérites non bactériennes sont les adénovirus et les astrovirus. Leur implication est moindre puisqu'ils représentent chacun moins de 10 % des cas partout dans le monde (94)(68)(95). Pour cette raison, les investigations sur ces virus sont relativement faibles. Ils touchent essentiellement les enfants de moins de deux ans (29) et 85% de la population adulte est immunisée contre les sérotypes les plus communs d'adénovirus (28). Les personnes âgées et les personnes

immunodéprimées sont particulièrement sensibles. Plusieurs types d'adénovirus provoquent des gastro-entérites mais ce sont les adénovirus type 40 et 41 les plus communément impliqués (96)(97). L'implication des astrovirus dans les gastro-entérites est de plus en plus étudiée et leur recherche dans les selles se généralise. Une étude au Royaume-Uni reporte un taux de détection des astrovirus particulièrement élevé par rapport au taux moyen. Sur 200 prélèvements chez des enfants pendant la période hivernale 2012, un astrovirus a été détecté dans 18% des cas, ce taux est proche des 19% de rotavirus et devant les norovirus détectés dans 12% des cas. Ces virus possèdent un risque zoonotique qui renforce le besoin de les surveiller et de mieux connaître leur biologie et leur diversité (95).

Le paragraphe suivant traite de l'analyse de 17 études épidémiologiques réalisées dans 16 pays différents dont 6 pays développés et 10 pays en développement (Tableau 10). Les investigations sont rétrospectives et portent sur des cas de gastro-entérites en pédiatrie. La répartition des agents étiologiques varie d'une région à une autre ainsi que d'une année à l'autre. Les rotavirus sont dans la majorité des études l'agent causal viral dominant, impliqués dans 4 à 49% des gastro-entérites chez l'enfant avec un taux moyen de 24 %. Un norovirus est identifié dans 6 à 20% des cas avec un taux moyen de 13,6%. Un adénovirus et un astrovirus sont détectés respectivement dans 2 à 21% (taux moyen 7,5%) et dans 0 à 18% des cas (taux moyen 4,5%). Au Brésil, Raboni *et al.* 2014 place les adénovirus au premier plan, puis les norovirus et ensuite les rotavirus. Cet ordre de prédominance des virus est très différent de l'ordre majoritairement reporté par les autres études : rotavirus > norovirus > adénovirus > astrovirus. Disponible depuis 2006, l'impact de la vaccination anti-rotavirus sur le taux de détection des rotavirus est encore peu évalué, il dépend de la couverture vaccinale, de la variété des souches et des conditions du pays dans lequel elle a été introduite. En effet, les données issues des études cliniques dans les pays à revenus moyens et élevés, dont l'Amérique Latine, démontrent une efficacité du vaccin plus importante que dans les pays à faibles revenus situés en Afrique et en Asie. Le taux de co-infections est approximativement de 8 % (94).

Malgré les progrès de dépistage, 40 à 60% des diarrhées sont encore d'étiologie inconnue (98)(99)(94). Des investigations plus approfondies, notamment tournées vers les autres virus (picobirnavirus, torovirus, coronavirus, Aïchi virus) permettraient probablement de diminuer le pourcentage d'étiologie inconnue.

Tableau 10: Revue de la littérature sur la distribution des principales étiologies virales de gastro-entérites chez l'enfant

Pays	Période de l'étude	Nombre analyse	Méthodes de détection	Rotavirus %	Norovirus %	Adénovirus %	Astrovirus %	Source
Développés								
Finlande	Sept 1993-Juin1995	832	PCR/RT-PCR	29	20	6	9	Pang <i>et al.</i> 2000
Royaume-Uni	2000-2003 (déc-avril)	685	PCR/RT-PCR	27	9	6	2	Gomara <i>et al.</i> 2007
	Hiver 2012	200	PCR/RT-PCR	19	12	5	18	Borrows <i>et al.</i> 2014
France	Jan-déc 2007	973	EIA (Rota,Adv) ELISA (NoV,AstV)	21	13	5	2	Tran <i>et al.</i> 2010
Pays-Bas	2010-2013	PI	PI	11	10	nt	7	Enserink <i>et al.</i> 2014
Australie	Jan 2007-Déc 2010	430	PI	22	20	21	nt	Fletcher <i>et al.</i> 2013
République Tchèque	PI	107	PCR	30	14	5	nt	Fajfr <i>et al.</i> 2014
En développement								
Turquie	Juin-déc 2012	50	RT-PCR	4	16	nt	2	Akhter <i>et al.</i> 2014
Maroc	Jan-déc 2011	335	EIA (Rota), RT-PCR	27	16	nt	nt	El Qazoui <i>et al.</i> 2014
Tunisie	4 années	788	Immuno-enzymatique	nt	nt	2	4	Sdiri <i>et al.</i> 2009
Chine	Fev 2011- Jan 2012	767	RT-PCR	34	10	nt	nt	Sai <i>et al.</i> 2013
Taiwan	Avril 2008-Juil 2009	198	PI	24	19	2,5	0,5	Ku <i>et al.</i> 2014
Papua New Guinea	Aout 2009-Nov 2010	199	PCR/RT-PCR	26	6	12	0	Soli <i>et al.</i> 2014
Brésil	Sept 2010- Sept 2011	225	EIA (Rota), PCR/RT-PCR	6	8	16	0	Raboni <i>et al.</i> 2014
Ghana	Aout 2006-Dec 2011	3044	EIA confirmé par PCR	49	nt	nt	nt	Enweronu-Laryea <i>et al.</i> 2014
Lybie	Oct 2007-Sept 2008	520	ELISA (Rota), RT-PCR	31,5	17,5	nt	nt	Abugalia <i>et al.</i> 2011
Burkina Faso	Mai 2006-juin 2008	648	IC	21	nt	2	nt	Simpore <i>et al.</i> 2009

9.2 LES GASTRO-ENTERITES VIRALES DANS LES PAYS EN VOIE DE DEVELOPPEMENT

Les pays en voie de développement sont les plus touchés par les maladies diarrhéiques infectieuses. Le manque d'accès à l'eau potable et l'absence d'assainissement augmentent le péril fécal et ces infections sont présentes tout au long de l'année. Dans leurs 3 premières années de vie, les enfants souffrent en moyenne de 3 épisodes diarrhéiques par année, les privant des éléments nécessaires à leur croissance. Par conséquent, la diarrhée est une cause majeure de malnutrition et les enfants malnutris ont un plus grand risque d'avoir des diarrhées. Dans certaines régions d'Afrique et d'Asie, les malades ne bénéficiant pas de soins médicaux adaptés,

les infections à rotavirus sont graves et présentent le taux de mortalité le plus élevé, 100 à 1000 décès sur 100 000 cas selon l’OMS (Figure 14).

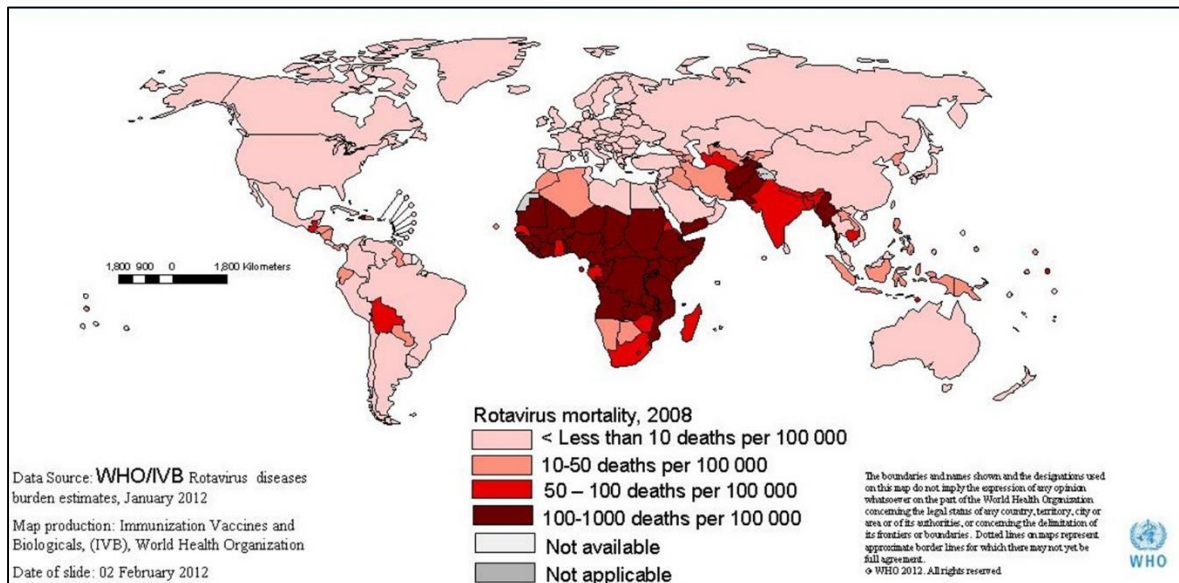


Figure 14: Carte mondiale du taux de mortalité des infections à rotavirus chez les enfants âgés de moins de 5 ans, OMS, 2008

Le rotavirus serait impliqué dans 37,5 % des cas de gastro-entérites reportés à l’hôpital, avec une proportion plus élevée en Asie du Sud-Ouest. Cette infection est associée à environ 145 000 décès chaque année en Asie, les chiffres les plus élevés ont été reportés en Inde, au Pakistan et en Indonésie. Les dépenses économiques annuelles qui en découlent sont à hauteur de US\$365 millions en Chine et US\$41-72 millions en Inde (14).

Dans les pays d’Asie et d’Afrique, le manque d’investigations sur les épidémies à norovirus ne permet pas de définir précisément leur épidémiologie. Patel *et al.* 2008 estime que les norovirus causeraient 1 million d’hospitalisations et 200 000 décès par an chez les enfants de moins de 5 ans dans les pays en développement (100). Les épidémies de norovirus chez les adultes semblent moins communes que dans les pays développés. Une différence d’exposition et d’immunité pourraient être à l’origine de cette disparité. En Inde, la présence d’anticorps IgG anti-norovirus dans la population est plus élevée qu’au Royaume-Uni et augmente avec l’âge tandis que le taux d’anticorps diminue chez les adultes vivant au Royaume-Uni (101).

La mise en place de mesures préventives dans ces pays reste difficile compte tenu des ressources économiques et humaines limitées. L’Alliance du Vaccin Gavi apporte un soutien à l’introduction du vaccin anti-rotavirus dans ces pays. Au 9 janvier 2015, 35 pays éligibles au

soutien Gavi ont pu bénéficier du vaccin (102). L'OMS collabore avec les États Membres et ses partenaires pour promouvoir l'accès à l'eau potable et à l'assainissement, les mesures de prévention des gastro-entérites aiguës et leur prise en charge.

9.3 LES GASTRO-ENTERITES VIRALES DANS LES PAYS DEVELOPPES

De par un accès à l'eau potable et une prise en charge médicale précoce, la mortalité due aux GEA dans les pays développés est faible. Cependant, les GEA représentent un fardeau sanitaire et économique important, les hospitalisations d'enfants malades entraînent des coûts médicaux et la concordance des épidémies de GEA avec les épidémies de grippe engorgent les hôpitaux. Les coûts indirects restent peu évalués à ce jour mais sont probablement non négligeables. Aux USA, une étude récente a évalué le coût total des GEA à \$3,88 billions (2900 milliards d'euros) sur la période 2006-2011 (71).

Dans les pays développés, la distribution d'infections à rotavirus est saisonnière avec un pic en hiver. Les rotavirus touchent principalement les enfants entre 6 et 24 mois et plus de 90 % des enfants âgés de 3 ans ont été infectés et sont immunisés (12). La proportion de cas de gastro-entérites dus aux rotavirus varie d'une étude à une autre. Une analyse de la littérature épidémiologique portant sur l'Europe de l'Ouest indique que le rotavirus est responsable de 25 à 63 % des gastro-entérites infantiles (103).

Les norovirus sont la première cause de diarrhée virale aiguë chez l'adulte, aussi bien pour les cas sporadiques qu'épidémiques. Ils sont responsables d'environ 1,1 million d'hospitalisations et du décès de plus de 200 000 enfants chaque année (104)(105). L'origine hydrique ou alimentaire de la contamination est fréquente, notamment par la consommation de coquillages. Les épidémies sont observées toute l'année mais un pic important survient pendant les mois d'hiver avec une amplitude qui varie d'une année à l'autre. Les établissements de soins et les maisons de retraite sont particulièrement sujettes aux épidémies à norovirus (32)(77). Dans les restaurants, la contamination est essentiellement alimentaire alors que dans les établissements de santé, la propagation de la maladie est surtout inter-humaine. En raison de la forte contagiosité et de la promiscuité, le taux d'attaque est élevé, entre 50 et 90 % (106). Une étude, menée en Europe de 1995 à 2000, a montré qu'un norovirus était impliqué dans plus de 95 % des épidémies de GEA non bactériennes au Danemark, en Finlande, en Suisse, en Angleterre et

au Pays de Galles (107). Ce constat est similaire aux Etats-Unis avec un taux de 93 % (108). La France, les Pays-Bas et le Japon reportent des taux de détection des norovirus inférieurs avec respectivement, 72%, 84% et 77% (109). Au Royaume-Uni, 650 000 cas de gastro-entérites à norovirus sont déclarés chaque année (5) ; aux Etats-Unis, il s'agit de 3,5 millions de cas dont 35 % nécessitent une hospitalisation et 75 à 150 personnes décèdent des suites de gastro-entérites (110).

La lignée GII.4 est d'intérêt majeur puisqu'elle est à l'origine des six dernières pandémies de GEA et elle est retrouvée dans 62 à 80% des épidémies à norovirus (111). De nouveaux variants GII.4 apparaissent tous les 2-3 ans et sont à l'origine de nouvelles épidémies (Figure 15) (112).

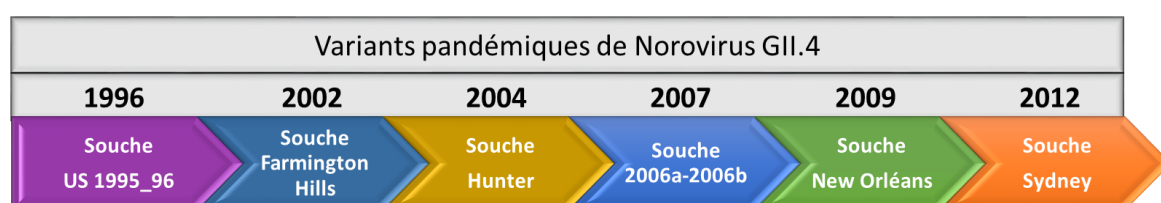


Figure 15: Evolution des norovirus pandémiques de 1996 à 2012

Ce fut le cas en 2002 (113), puis en 2004. En 2006, c'est 2 nouveaux variants, appelés 2006a et 2006b, circulant conjointement qui ont été détectés. En 2008, le variant 2006b est devenu prédominant puis il fut remplacé par la souche New Orléans en 2009-2010 (93)(114). La dernière émergence révélée date de 2012 avec l'identification d'un nouveau variant en Australie et nommé NV GII.4 Sydney 2012. La Nouvelle Zélande, le Japon et plusieurs pays d'Europe ont par la suite, eux aussi, reporté l'émergence de cette souche dans leur pays (115)(116). Ce phénomène s'explique par l'importante variabilité génétique de ces virus. La transition d'un variant dominant à un autre est relativement rapide, il existe cependant un chevauchement des souches qui co-circulent pendant plusieurs années (Figure 16) (117). Le nombre d'épidémies causées par d'anciennes souches diminue progressivement.

Cette co-circulation favorise certainement l'apparition de génotypes recombinants. Plusieurs pays ont constaté leur augmentation ces dernières années (118)(119)(120). C'est le cas du variant Sydney 2012, la souche pandémique la plus récemment détectée, qui possède le profil GIIPe/GII.4 (polymérase/capside) (119). En Chine, une étude récente portant sur la prévalence des norovirus dans les diarrhées en pédiatrie, de 2010 à 2013, rapporte l'augmentation du variant recombinant GII.12/GII.3 (118). Pour identifier ces génotypes recombinants, il est nécessaire d'analyser à la fois les séquences du gène ORF1 de la polymérase et les séquences du gène ORF2 de la capsid ou d'analyser une région de la jonction ORF1/ORF2.

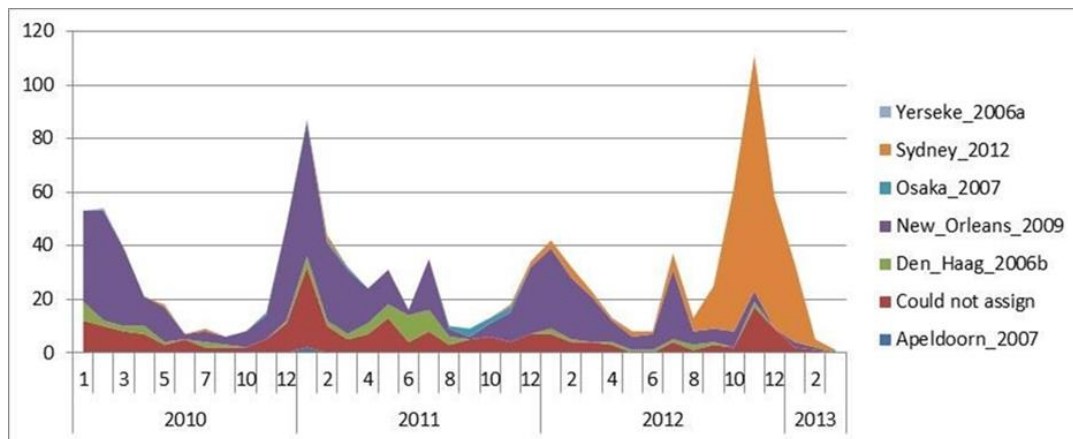


Figure 16: Graphique représentant les variations des souches circulantes de norovirus GII.4 sur la période 2010-2013, NoroNet (116)

9.4 LES GASTRO-ENTERITES VIRALES EN FRANCE

En France, les épidémies de gastro-entérites aiguës se développent surtout en hiver, générant en moyenne 3 millions de cas de consultations des médecins généralistes chaque année (99). Depuis 1990, la mise en place d'un réseau de surveillance permet de recenser les cas de diarrhée aiguë sur l'ensemble du territoire français et de calculer le taux d'incidence par semaine et par région. Cette surveillance est assurée par plusieurs systèmes complémentaires.

- Le Réseau Sentinelles : composé de 1300 médecins généralistes libéraux, il collecte en continu des données sur 7 maladies infectieuses dont la varicelle, la grippe et les diarrhées aiguës (27).
- Le signalement externe des épidémies de GEA nosocomiales
- Le signalement des cas groupés de GEA en collectivités de personnes âgées
- La déclaration obligatoire des toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) : elle permet de surveiller les cas groupés de gastro-entérites d'origine alimentaire et de connaître leurs caractéristiques et les aliments en cause.
- Le Centre National de Référence des virus entériques (CNR) : il apporte une expertise moléculaire, notamment par l'identification et la caractérisation des souches des virus de GEA et surveille l'évolution et l'apparition de nouvelles souches (93).

Cette surveillance a pour objectif de prévenir rapidement les différents acteurs de santé publique afin de déclencher les dispositifs de prévention et d'anticiper les besoins médicaux. Il donne également l'alerte au niveau international en cas de détection de nouveaux variants viraux.

Au cours des 20 dernières années en France, le taux d'incidence des diarrhées aiguës a globalement augmenté sur la période de 1995 à 2004. Il est minimum en 1995 (110 pour 100 000 habitants) et maximum en 2004 (189 pour 100 000 habitants). A partir de 2011, le taux d'incidence repasse en dessous du taux moyen de 151 pour 100 000 habitants (Figure 17) (121). Il est difficile de prédire l'évolution du nombre de cas de diarrhées d'une année à l'autre, de nombreux facteurs entrent en jeu tels que la mise en place des méthodes de prévention, le respect des règles d'hygiène, le degré d'infectiosité des souches circulantes, l'émergence de nouvelles souches et la couverture vaccinale anti-rotavirus.

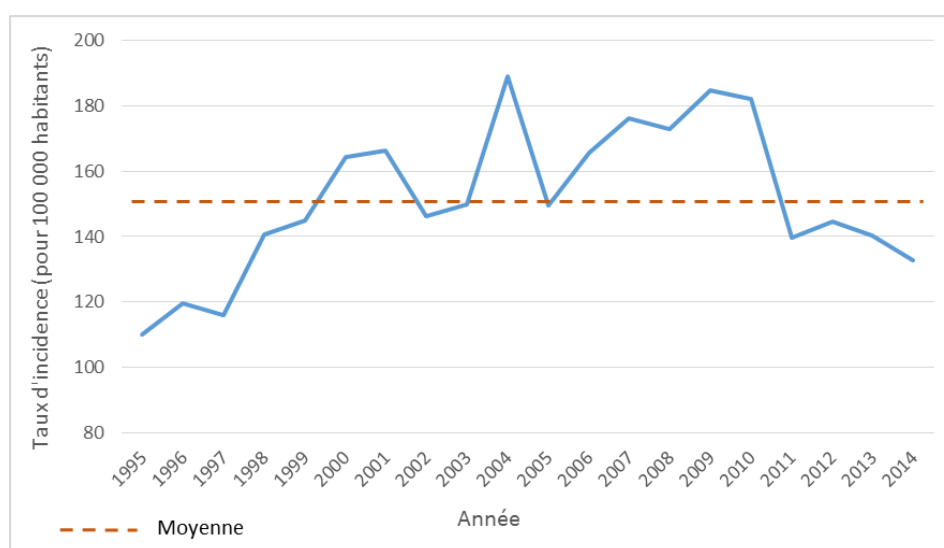


Figure 17: Evolution du taux d'incidence des diarrhées aiguës en France de 1995 à 2014
Graphique adapté du Réseau Sentinelles (<https://websenti.u707.jussieu.fr/sentiweb/>)

De janvier 2008 à décembre 2012, le CNR a investigué sur 1222 épidémies de GEA. La plupart des épidémies sont survenues en maisons de retraite (72%). Les autres sites sont des services hospitaliers (13%), des réceptions ou banquets (8%), des écoles (6%) et des collectivités d'adultes (1%). Un virus entérique a été détecté dans 84% des épidémies. Grâce à l'utilisation d'outils de diagnostic plus sensibles et à l'élargissement des virus recherchés, le nombre de cas avec une étiologie indéterminée tend à diminuer. Dans la très grande majorité des cas le virus en cause est un norovirus, il a été détecté seul dans 884 épidémies soit 72%. Ces épidémies se

distinguent également par le génotype en cause avec une nette prédominance du génotype GII.4 retrouvé dans 77% des épidémies à norovirus. Les observations sur les épidémies de GEA en France sont donc comparables à celles reportées dans les autres pays développés.

Sur la période de l'étude, le taux des épidémies causées par un norovirus est comparable d'une année à l'autre, il est compris entre 68 et 73%. De même la proportion GI/GII et celle du génotype GII.4 ne changent quasiment pas. En revanche, les variants génotypiques varient, surtout les variants GII.4. Chaque année de nombreuses souches sont identifiées, la figure 18 représente la distribution des sous-génotypes détectés en 2012.

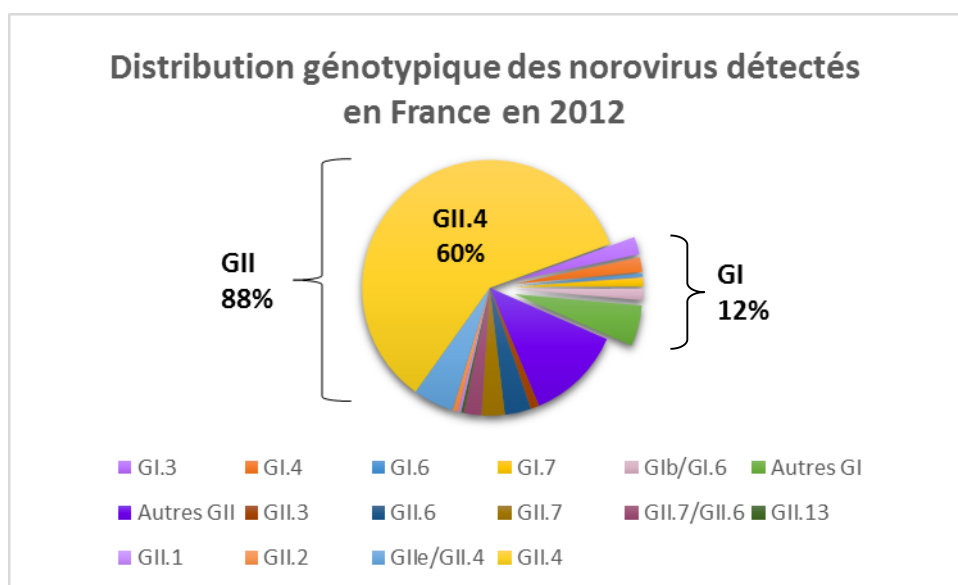


Figure 18: Distribution génotypique des norovirus détectés en France en 2012

Des disparités entre les génotypes concernant le mode de transmission et les lieux des épidémies sont constatées. Les norovirus GII.4 sont plus fréquemment transmis de personne à personne et détectés dans les établissements hébergeant des personnes âgées que les autres génotypes.

En revanche, dans la population infantile, le rotavirus prédomine sur les autres virus à GEA. L'infection à rotavirus en France serait responsable chaque année d'environ 300 000 épisodes de diarrhée aiguë chez les enfants de moins de cinq ans, dont 160 000 diarrhées sévères, avec en moyenne 9 décès annuels. Ces infections à rotavirus seraient à l'origine de 138 000 consultations par an et le nombre d'hospitalisations liées à ces infections est estimé à 18 000. Le coût annuel de l'infection est estimé à 28 millions d'euros pour le système de santé, dont la majeure partie est liée aux hospitalisations (66). Une étude épidémiologique en France a mis en évidence que le rotavirus est le premier agent responsable de GEA au cours des 2 premières

années de vie alors que les GEA à astrovirus et à calicivirus sont plus fréquentes dans la première année de vie (90).

La distribution des génotypes de rotavirus circulants fluctue d'une région à une autre et d'une année à l'autre (Figure 19), cependant, en France comme dans d'autres pays européens (93) et aux Etats-Unis (122), le génotype G1P[8] est prédominant. En France, il représente en moyenne environ 60% des infections à rotavirus. D'autres génotypes se démarquent dans une moindre mesure : G9P[8], G2P[4] et G3P[8]. Depuis son émergence en 2004/2005, le génotype G9P[8] est le deuxième génotype majeur en France avec une proportion globale de 17%. Il est toutefois retrouvé moins fréquemment dans l'ensemble de l'Europe (12%) où il se place derrière le rotavirus G4P[8] (15%) (93).

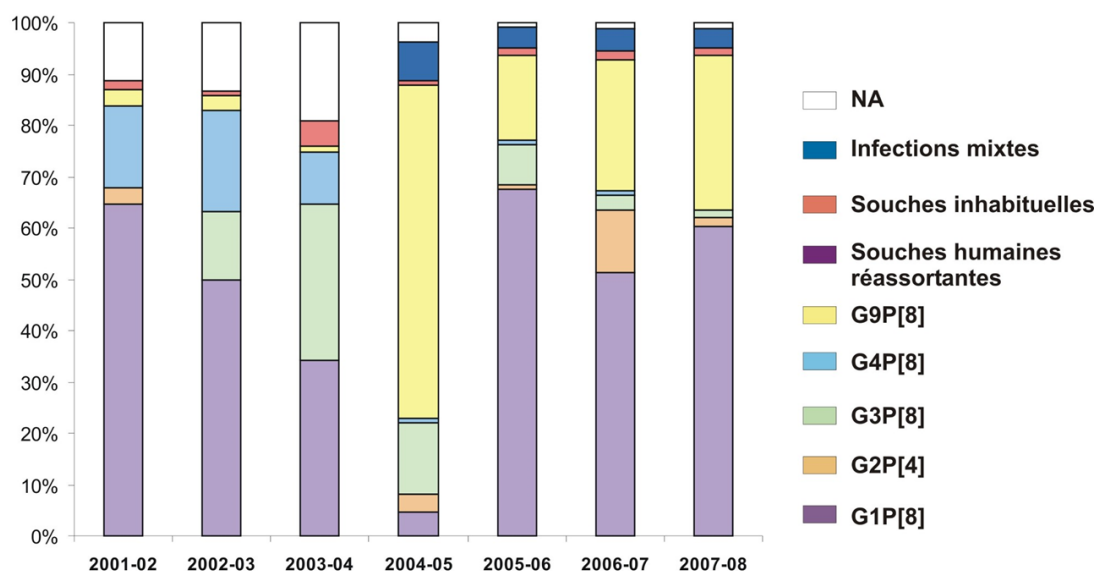


Figure 19: Evolution temporelle des génotypes G et P des rotavirus humains en France de 2001 à 2007

Les génotypes G inhabituels en France représentent 1 à 2%. Ils constituent un risque d'émergence. Parmi eux, le génotype G8, qui résulte d'une transmission inter-espèce bovin/humain et de réassortiments, est fréquent en Afrique ; le génotype G12 est lui émergent en Asie du Sud-Est et en Inde, il peut s'associer à différents génotypes P témoignant d'une capacité d'adaptation avec risque d'émergence. Compte tenu des variations temporelle et géographique constatées, seule une surveillance épidémiologique et moléculaire des rotavirus sur le long terme peut mettre en évidence l'émergence d'une de ces souches.

1. CONTEXTE

En France, le Laboratoire de Virologie du Groupement Hospitalier Est de Lyon utilise la biologie moléculaire comme technique de référence pour le diagnostic des gastro-entérites virales. Les virus recherchés dans les selles sont les rotavirus, les norovirus GI/GII et les adénovirus. L'utilisation de cette technique en routine est relativement récente puisqu'elle est effective depuis 2012. Du fait de la haute sensibilité de la PCR et de la notion de la charge virale fournie par la valeur du Ct, l'interprétation clinique des résultats se complexifie et des questionnements émergent, notamment sur le lien entre la valeur du Ct et les manifestations cliniques. Afin d'approfondir l'interprétation clinique des résultats de PCR, une étude s'est portée sur les analyses virologiques réalisées par le laboratoire du 1^{er} septembre 2012 au 1^{er} juillet 2014, soit une période de 22 mois. Les prélèvements proviennent de patients de plusieurs centres hospitaliers de la région lyonnaise. Cette étude a pour objectif d'apporter des éléments de réponses relatifs à l'interprétation clinique des résultats semi-quantitatifs de détection moléculaire des virus de gastro-entérites.

2. MATERIELS ET METHODES

2.1 MATERIELS

Dans un premier temps, le prélèvement de selles subit une étape d'extraction des acides nucléiques. Cette étape est réalisée par l'automate NucliSENS® EasyMAG de Biomérieux en suivant le protocole et les recommandations du fournisseur. Le principe de l'extraction repose sur des particules de silice magnétique sur lesquelles l'ADN et l'ARN vont venir se fixer. L'éluat issu de l'extraction est ensuite soumis à deux PCR multiplexes en temps réel pour la détection spécifique des rotavirus, des adénovirus et des norovirus génotype I et II. Le laboratoire utilise le kit commercial Rida® Gene Rotavirus/Adénovirus Duplex pour la détection simultanée des rotavirus et des adénovirus sans distinction de sérogroupes. Les séquences cibles amplifiées sont le gène de la NSP3 des rotavirus et le gène de l'hexon des adénovirus. Pour la détection des norovirus, le kit Rida® Gene Norovirus I et II est employé, il cible la région de la jonction des gènes ORF1/ORF2 et permet de différencier les génotypes I et II. Ces deux kits

disposent d'un contrôle interne et d'un témoin positif pour chacun des virus. La limite de détection de Rida®Gene Rotavirus/Adénovirus Duplex et Rida®Gene Norovirus I et II est respectivement $\leq$ à 5 copies et $\leq$ à 50 copies de génome par réaction. Le thermocycleur de PCR en temps réel utilisé est Applied Biosystems® 7500 de Life Technologies, cet instrument utilise des plaques de 96 puits et il effectue 45 cycles d'amplification.

2.2 METHODES

Les résultats d'analyses, extraits du Système de Gestion des Laboratoires, comprennent le numéro du patient, la date de naissance, la date du prélèvement, le centre hospitalier et/ou le service d'hospitalisation du patient et les résultats de détection semi-quantitative (Ct) des rotavirus, des adénovirus et des norovirus GI et GII. Afin de connaître l'état clinique des patients, leurs dossiers cliniques correspondant à la date du prélèvement ont été recherchés et consultés via le logiciel de gestion documentaire électronique Crystal Net des Hospices Civils de Lyon. Le recueil des données médicales a concerné seulement les patients positifs à un seul virus et dont le Ct était supérieur à 30. Les informations médicales recherchées étaient la présence ou l'absence de GEA, le caractère nosocomial et les symptômes de la GEA (diarrhée, vomissement, fièvre, rectorragie), les co-infections bactériennes ou autres maladies pouvant entraîner des symptômes digestifs, une immunodépression. Pour la suite de l'analyse, les cas de co-infections avec un autre agent entéropathogène et les patients immunodéprimés ont été exclus. Les données telles que l'âge, le service d'hospitalisation, le sexe, les résultats virologiques et les données cliniques des patients ont été analysées à l'aide du logiciel Epi Info™ 7.1.4 du Centers for Disease Control and Prevention.

3. RESULTATS

3.1 PARTIE DESCRIPTIVE

3.1.1 Population initiale

Au total, sur une période de 22 mois, le laboratoire a analysé 3684 prélèvements de selles pour une détection de virus de gastro-entérites. Dans 72 % des cas, les patients sont des enfants de moins de 7 ans et 93% ont moins de 19 ans. En minimisant les regroupements d'âges, les enfants âgés de moins de 1 an sont majoritaires, ils concernent 38% des analyses. Puis le nombre

d'analyses décroît avec l'âge qui augmente. En effet, le nombre d'analyses chez les moins de 1 an est supérieur à 1000, il diminue de 500 à 100 environ de 1 an à 6 ans puis le nombre d'analyses est inférieur à 100 pour chaque âge de 7 à 19 ans et il est inférieur à 10 pour chaque âge supérieur ou égal à 20 ans. Le centre hospitalier le plus fréquent est l'Hôpital Femme Mère Enfant (HFME), il représente 60% de l'activité de recherche des virus de gastro-entérite du Laboratoire de Virologie Est, suivi par l'Institut d'Hématologie et d'Oncologie Pédiatrique (IHOP) avec 27% (Tableau 11). Les services de l'Hôpital Femme Mère Enfant principalement concernés sont l'unité d'hospitalisation de courte durée (30%), la réanimation en néonatalogie et pédiatrie (16%), le service d'hépatologie (15%) et les urgences pédiatriques (7%). Pour l'Hôpital de Cardiologie Louis Pradel et celui de la Croix Rousse, il s'agit dans plus de 70% des cas, d'unités de pédiatrie ou de services de néonatalogie. Quant à l'Hôpital Lyon Sud, les prélèvements proviennent pour la plupart du service d'hémo-oncologie, à hauteur de 61%.

Tableau 11 : Analyses de biologie moléculaire à la recherche des virus de GEA réalisées par le laboratoire de Virologie Est du 1^{er} septembre 2012 au 1^{er} juillet 2014

ANALYSES TOTALES N = 3684			
	Nb	%	% cumulé
AGE			
< 1 an	1398	38	38
1 à 6 ans	1259	34	72
7 à 19 ans	773	21	93
≥ 20 ans	254	7	100
HÔPITAL			
Hôpital Femme Mère Enfant	2206	60	60
Institut d'Hématologie et d'Oncologie Pédiatrique	978	27	86
Hôpital Cardiologie Louis Pradel	201	5	92
Hôpital Lyon Sud	151	4	96
Hôpital de la Croix Rousse	52	1	97
Hôpital Edouard Herriot	41	1	99
Autres	55	1	100
SEXE			
Masculin	2122	57,6	57,6
Féminin	1562	42,4	100

3.1.2 Population positive

Sur les 3684 prélèvements, 1194 ont été positifs pour au moins un virus, soit 32% de positivité. Parmi ces analyses virologiques positives, la proportion d'enfants de moins de 7 ans est encore plus importante et s'élève à 89%. Contrairement à ce qui est observé sur la totalité des analyses, la proportion de patients âgés de 1 à 6 ans devient supérieure à celle des patients de moins de un an (48% vs 42%). En recoupant la catégorie des 1 à 6 ans, les patients de 1 an se démarquent puisqu'ils représentent la moitié de cette catégorie et constitue le deuxième âge majoritaire (24%), la classe d'âge dominante restant les nourrissons de moins de 1 an (42%). Les patients âgés de 7 ans et plus représentent seulement 11% des analyses positives. La proportion homme/femme des analyses totales et des analyses positives sont similaires, environ 57% d'hommes et 43% de femmes (Tableau 12).

Tableau 12 : Répartition des analyses positives

ANALYSES POSITIVES N = 1194			
	Nb	%	% cumulé
AGE			
< 1 an	498	41,7	41,7
1 an	285	23,9	65,6
2 à 6 ans	283	23,7	89,3
7 à 19 ans	92	7,7	97
≥ 20 ans	36	3	100
HÔPITAL			
Hôpital Femme Mère Enfant	908	76	76
Institut d'Hématologie et d'Oncologie Pédiatrique	214	18	94
Hôpital Cardiologie Louis Pradel	41	3	97
Hôpital Lyon Sud	14	1	98
Hôpital de la Croix Rousse	1	0,1	98
Hôpital Edouard Herriot	5	0,4	99
Autres	11	1	100
SEXE			
Masculin	685	57,4	57,4
Féminin	509	42,6	100

Certains patients font l'objet de plusieurs analyses au cours d'une même infection et un même patient peut avoir plusieurs infections au cours de son hospitalisation. Ces multiples analyses

constituent une source de biais puisque par conséquent le nombre d'analyses positives n'est pas égale au nombre d'infections. En effet, parmi les 1194 prélèvements positifs, nous distinguons au total 818 infections indépendantes. La distribution des âges, des sexes et des services des 818 infections est comparable à celle obtenue pour les 1194 analyses positives, on observe :

- 366 femmes et 448 hommes (45% vs 55%)
- 349 (43%) patients ont moins de 1 an et 725 (89%) ont moins de 7 ans.
- 668 (82%) patients sont hospitalisés à HFME, 94 (11,5%) à IHOP et 29 (3,5%) à l'hôpital Cardiologique, les autres centres hospitaliers représentent moins de 1%.

Pour une plus grande justesse, l'analyse de la répartition des virus se poursuivra donc sur les 818 infections.

3.1.3 Répartition des virus

Les infections à rotavirus (RV) sont les plus fréquentes, leur taux est de 41%. Les infections à adénovirus (AdV) et norovirus GII (NoVII) représentent respectivement 25% et 18% des cas. Le pourcentage de co-infections virales est de 15% et les norovirus GI (NoVI) sont détectés seuls dans moins de 2% des cas (Figure 20).

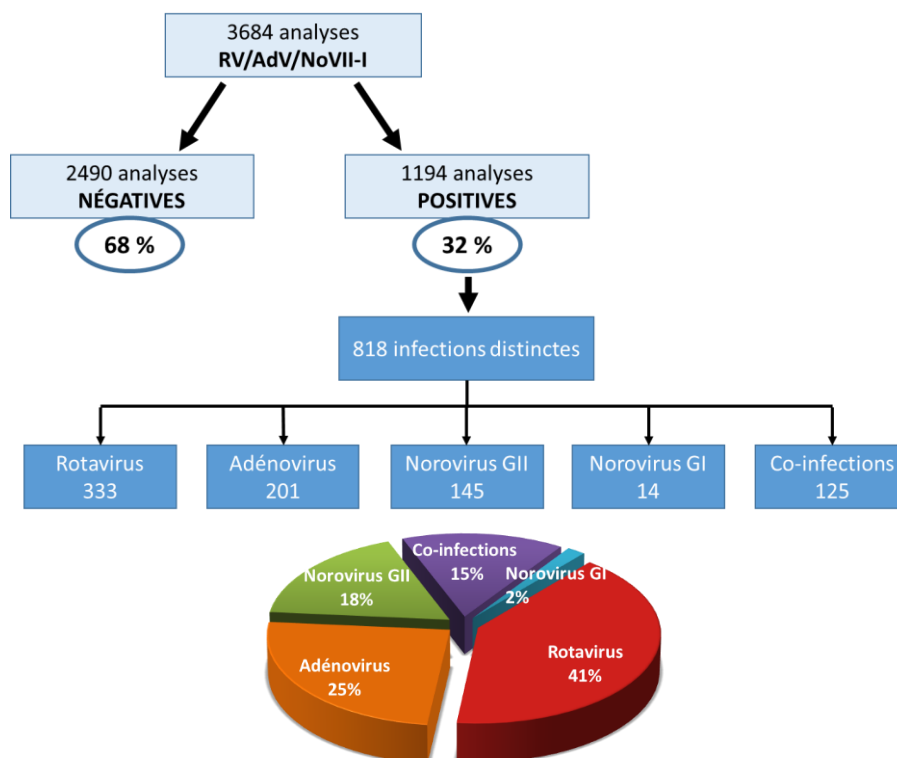


Figure 20: Répartition des virus de GEA détectés

L'histogramme ci-dessous détaille les types de co-infections (Figure 21). La co-infection la plus répandue est AdV/RV (38%). Les rotavirus et les adénovirus sont impliqués chacun dans 74% des co-infections, 58% pour les norovirus GII et 6% pour les norovirus GI.

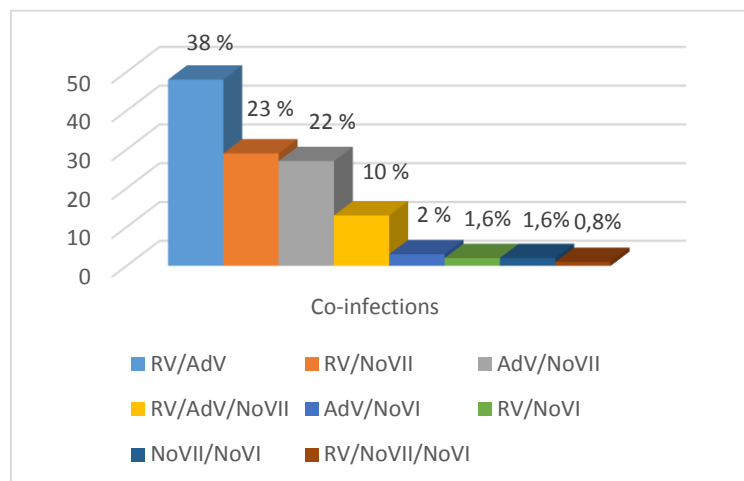


Figure 21: Distribution des virus dans les co-infections

3.2 PARTIE ANALYTIQUE

3.2.1 Taux de positivité

Le taux de positivité, défini par le nombre d'analyses positives rapporté au nombre d'analyses totales, est significativement plus élevé chez les patients âgés de moins de 7 ans (40,1% vs 12,5%, $p\text{-value} < 10^{-10}$). L'histogramme ci-dessous représente le taux de positivité par âge de 0 à 17 ans. De 0 à 6 ans, les taux de positivité sont supérieurs à 36% à l'exception du groupe des 5 ans avec un taux à 15% (Figure 22). Nous n'avons pas trouvé d'explication à cette chute du taux de positivité chez le groupe des 5 ans. Le plus fort taux de positivité (55%) est retrouvé chez les patients âgés de 1 an, il est significativement plus élevé que celui des autres groupes d'âge ($p\text{-value} \leq 0,004$). Les taux de positivité à 2, 3, 4 et 6 ans avoisinent 40% et ne sont pas significativement différents. Dans le groupe des moins de 1 an, le taux est un peu plus faible (35%) et peut s'expliquer par la protection des nourrissons dans les 6 premiers mois de vie par les anticorps maternels. En effet, le taux de positivité calculé chez les patients âgés de moins de 6 mois est égal à 29% alors que celui des patients âgés entre 6 et moins de 12 mois est égal à 46%. A partir de 7 ans, le taux de positivité des analyses virologiques diminue significativement avec un taux moyen à 11% ($p\text{-value} \leq 0,03$). Les patients âgés de plus de 17

ans ont été regroupés par manque d'effectifs, pour ces derniers, 42 analyses ont été positives sur 298 analyses réalisées, soit 14% de positivité.

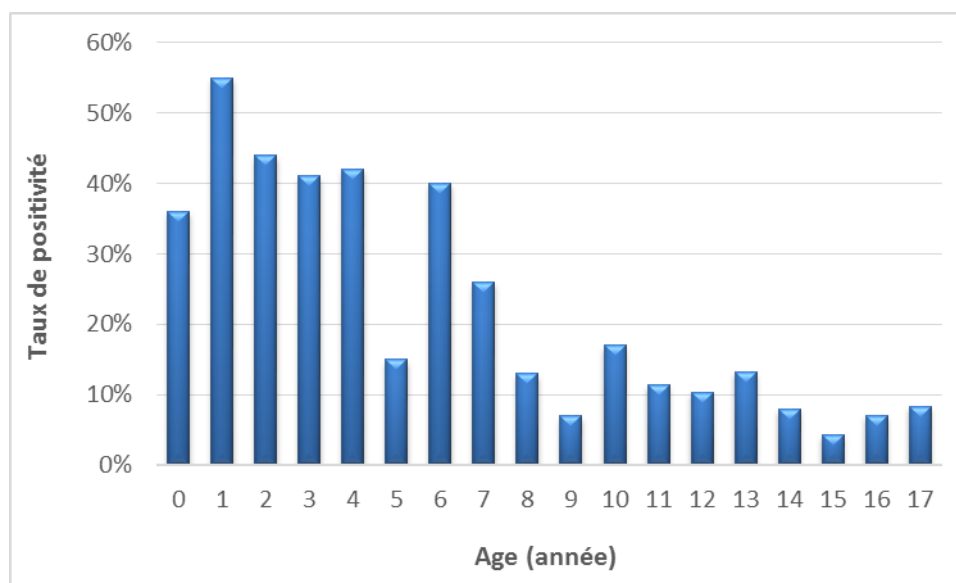


Figure 22: Taux de positivité en fonction de l'âge

En cohérence avec les résultats précédents, les prélèvements provenant de HFME obtiennent le plus fort taux de positivité avec 41% de cas positifs. Les prélèvements issus du deuxième établissement le plus fréquent, IHOP, sont positifs dans 22% des cas.

Concernant la proportion homme/femme, 57,6% des analyses totales concernent des hommes (2122/3684) contre 42,4% (1562/3684) des femmes (sex ratio 1,36, p-value < 0,01). Cependant, les taux de positivité chez l'homme (685/2122, 32,3%) et chez la femme (509/1562, 32,6%) ne sont pas significativement différents.

3.2.2 Virus et population

Nous avons ensuite comparé l'âge, les services d'hospitalisation et le sexe des patients en fonction du virus détecté (Tableau 13). Il n'a pas été mis en évidence de différence de la répartition homme/femme entre les trois virus. En revanche, l'âge moyen des patients et la distribution des services sont différents. L'âge moyen des infections à rotavirus est significativement plus faible que l'âge moyen des infections à adénovirus (p-value 0,0283) et des infections à norovirus (p-value 0,0003). Les enfants de moins de 1 an comptent pour 56% des infections à rotavirus, leur proportion est plus modérée dans les infections à norovirus et à adénovirus avec un pourcentage de 35% et de 26% respectivement. Chez les adultes de plus de

19 ans, les infections à adénovirus et surtout à rotavirus sont rares (< 5%) car une immunité efficace et durable s'est créée pendant l'enfance. Par contre, la proportion d'adultes est plus importante dans les infections à norovirus (10,3% vs 4,5% p-value 0,0034, 10,3% vs 1,8% p-value 0,000028) en raison d'une immunité éphémère. Les patients positifs à adénovirus et norovirus proviennent plus fréquemment d'IHOP que ceux positifs à rotavirus (p-value ≤ 0,006). Les patients immunodéprimés, sensibles aux infections à adénovirus et norovirus, font l'objet d'une surveillance étroite.

On note toutefois des similitudes. Pour chaque virus, plus de la moitié des prélèvements positifs sont issus d'enfants âgés de moins de 2 ans et le centre hospitalier principal est HFME.

Tableau 13 : Âge moyen des infections à rotavirus, à norovirus et à adénovirus, répartition des services hospitaliers et répartition homme/femme

	Rotavirus N = 333			Norovirus N = 145			Adénovirus N = 201		
	n	%	Moyenne	n	%	Moyenne	n	%	Moyenne
< 1 an	186	55,9	5,3 mois	51	35,2	6,5 mois	52	25,9	6,2 mois
1 an	75	22,5	18 mois	26	18	18 mois	54	26,8	18 mois
2 à 6 ans	47	14	3,2 ans	37	25,5	3,7 ans	66	32,8	3,7 ans
7 à 19 ans	19	5,7	13,8 ans	16	11,0	11,1 ans	20	10,0	10,2 ans
≥ 20 ans	6	1,8	62,9 ans	15	10,3	70,7 ans	9	4,5	47,4 ans
Total	333	100	2,95 ans	145	100	9,95 ans	201	100	4,87 ans
HFME	300	90,1		105	72,4		147	73,1	
IHOP	19	5,7		19	13,1		38	18,9	
Cardiologie	7	2,1		9	6,2		8	4,0	
Sud	3	0,9		2	1,4		7	3,5	
E.Herriot	1	0,3		2	1,4		1	0,5	
Autres	3	0,9		8	5,5		0	0,0	
Hommes	178	53,5		79	54,5		116	57,7	
Femmes	155	46,5		66	45,5		85	42,3	

3.2.3 Distribution des Ct

Dans 17% des cas (135/818), deux analyses ou plus ont été réalisées au cours d'une même infection. La pluralité des analyses concerne 33 infections à rotavirus, 33 infections à adénovirus, 36 infections à norovirus GII et 33 co-infections. Parmi les co-infections, on note

13 rotavirus, 16 adénovirus et 22 norovirus GII. Le nombre d'analyses varie de 2 à 26 avec en moyenne 4 analyses par infection. Dans 20% des cas (27/135), le nombre d'analyses réalisées est élevé (> 10), il s'agit de patients nécessitant un suivi infectieux renforcé, parmi eux, 70% sont des patients de l'IHOP ou des patients greffés et 30% sont des patients présentant des GEA virales successives ou en bilan de pré-transplantation hépatique.

Les infections ayant fait l'objet de plusieurs analyses rapprochées vont permettre d'étudier la répartition des Ct et l'évolution de l'excrétion virale au cours du temps. La figure 23 donne une indication de la répartition des Ct par virus, qu'il soit détecté seul ou en co-infection, d'une part chez les patients immunocompétents et d'autre part chez les patients immunodéprimés provenant de services de transplantation ou d'onco-hématologie. On distingue trois conjonctures possibles:

- les Ct sont uniquement inférieurs ou égaux à 30
- les Ct sont mixtes, inférieurs ou égaux à 30 et supérieurs à 30
- les Ct sont uniquement supérieurs à 30

Parmi les infections à rotavirus et norovirus GII, aucune série d'analyses positives ne présente que des cycles threshold supérieurs à 30. Dans la majorité des cas et de façon plus importante chez les immunodéprimés, les séries d'analyses sont composées que de Ct faibles (< 30) et elles sont mixtes dans environ 40% des cas chez les immunocompétents et 22 à 33% chez les immunodéprimés. Pour adénovirus, la répartition est différente, les séries mixtes composées de Ct faibles et de Ct forts sont majoritaires ($\approx 53\%$), le taux de séries composées que de Ct faibles est de 32% chez les immunocompétents, 24% chez les immunodéprimés et on observe des séries composées que de Ct forts dans 14% des cas chez l'immunocompétent et 24% des cas chez l'immunodéprimé. La présence de Ct supérieur à 30 est plus fréquente dans les infections à adénovirus que dans les infections à rotavirus et à norovirus et peut s'expliquer par la physiopathogénie différente des virus.

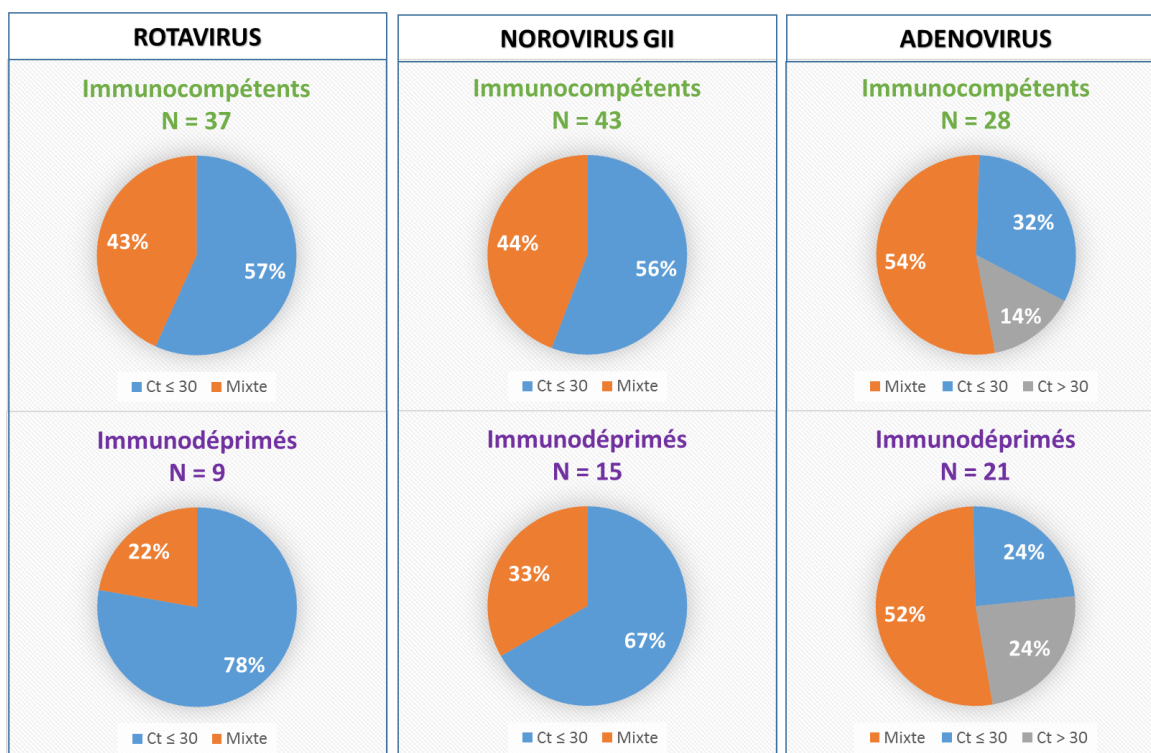


Figure 23: Distribution des Ct chez les patients immunocompétents et les patients immunodéprimés

Nous avons ensuite étudié l'évolution du cycle threshold au cours de l'infection lorsque les résultats sont mixtes chez l'immunocompétent. Nous avons sélectionné des patients avec au minimum 3 analyses positives et l'intervalle de temps entre chaque analyse est inférieur à 10 jours. Pour chaque virus, les Ct élevés sont majoritairement observés après la phase aiguë de l'excrétion virale (60 à 75% des cas). Dans environ 10% des cas pour rotavirus et norovirus et 35% des cas pour adénovirus, une faible positivité est détectée avant une forte positivité. Comme les premiers prélèvements sont souvent réalisés lors de la phase aiguë de la maladie, phase où l'excrétion virale est la plus forte, la valeur du Ct est faible puis l'excrétion virale tend à diminuer. La valeur du Ct devient supérieure à trente approximativement 8 jours après la phase aiguë pour rotavirus, 28 jours pour norovirus GII et 20 jours pour les adénovirus. Une évolution des Ct en dents de scie est peu fréquente, ce profil est observé dans environ 10% des cas étudiés. L'évolution du Ct au cours du temps est représentée annexe 4 pour chaque virus.

En prenant en compte les infections chez l'immunocompétent avec au minimum 3 analyses positives par infection, les rotavirus sont détectés pendant une durée moyenne de 17,3 jours, les norovirus sont détectés dans les selles en moyenne 27,2 jours et les adénovirus en moyenne 23,3 jours. Ne connaissant pas la date réelle où le virus n'est plus détecté, ces durées de

détection sont par conséquent certainement sous-estimées. Pour chacun des 3 virus, la durée maximale observée de détection du virus est de 70 jours, cependant ce résultat est peu fréquent, il concerne environ 5 % des cas.

Concernant les analyses uniques (683/818) parmi lesquelles 300 rotavirus, 168 adénovirus, 109 norovirus GII, 14 norovirus GI et 92 co-infections, nous observons les mêmes tendances en terme de distribution des cycles threshold. Les résultats avec un cycle threshold inférieur à 30 sont largement majoritaires pour les infections à rotavirus (240/300) et à norovirus GII (86/109), alors que les infections à adénovirus sont plus fréquemment détectées avec un cycle supérieur à 30 (91/168) (Annexe 5). La moyenne des cycles chez les hommes et chez les femmes ne diffère pas. Comparées deux à deux par un test Z, les moyennes totales des cycles varient selon les virus : $\mu(\text{Ct})_{\text{RV}} < \mu(\text{Ct})_{\text{NoV}} < \mu(\text{Ct})_{\text{AdV}}$ (p-value $< 10^{-4}$) (Tableau 14). Le test ANOVA pour comparer les 3 moyennes ne peut être appliqué car les variances des cycles des rotavirus et des norovirus ne sont pas homogènes (Test de Kruskal-Wallis $p < 10^{-4}$).

Tableau 14 : Ct moyen observé par virus en fonction de l'âge et du sexe des patients

	Rotavirus N = 300		Norovirus N = 109		Adénovirus N = 168	
	n	Ct moyen	n	Ct moyen	n	Ct moyen
Hommes	156	20	58	24	97	29
Femmes	144	20	51	25	71	28
< 1 an	163	20	33	25	41	26
1 à 6 ans	115	19	48	25	104	29
7 à 20 ans	17	30	14	25	14	30
> 20 ans	5	29	14	23	9	34
Total	300	20	109	25	168	28

Nous observons également des différences des valeurs des Ct en fonction de l'âge du patient. Pour les infections à rotavirus, les enfants de moins de 5 ans ont un taux de $\text{Ct} \leq 30$ plus élevé que les patients plus âgés (83,5% vs 36,4%). Pour les infections à adénovirus, ce sont les enfants âgés de moins de 1 an qui ont un taux de $\text{Ct} \leq 30$ plus élevé (61% vs 41%) (Tableau 15). Il s'agit des groupes d'âges obtenant la meilleure probabilité que la différence soit vraie. En revanche, il ne semble pas que les valeurs de Ct des infections à norovirus GII soient différentes en fonction de l'âge.

Tableau 15 : Analyse statistique: relation entre la valeur du Ct et l'âge du patient

Infections à rotavirus		Age		Total
		0-3 ans	4 ans et plus	
Cycle Threshold	Ct ≤ 30	223	17	240
	Ct > 30	45	15	60
Total		268	32	N = 300

Test du Khi-deux à 4 cases: $\alpha = 0,05$, 1 ddl $\chi^2 = 16,17$ p-value = $5,8.10^{-5}$

Infections à rotavirus		Age		Total
		0-5 ans	6 ans et plus	
Cycle Threshold	Ct ≤ 30	232	8	240
	Ct > 30	46	14	60
Total		278	22	N = 300

Test exact de Fisher : $\alpha = 0,05$ p-value = $3,7.10^{-6}$

Infections à adénovirus		Age		Total
		0-1 ans	2 ans et plus	
Cycle Threshold	Ct ≤ 30	25	52	77
	Ct > 30	16	75	91
Total		41	127	N = 168

Test du Khi-deux à 4 cases : $\alpha = 0,05$, 1 ddl $\chi^2 = 5,01$ p-value = 0,025

3.3 INTERPRETATION CLINIQUE DES RESULTATS FAIBLEMENT POSITIFS

3.3.1 Estimation de la proportion d'infections asymptomatiques

Le recueil des données cliniques a été effectué par consultation des dossiers médicaux des patients n'ayant eu que des résultats de biologie moléculaire faiblement positifs (Ct > 30) à rotavirus, adénovirus ou norovirus GII.

Afin d'établir une spécificité par virus, les cas de co-infections ont été exclus ainsi que les co-infections avec d'autres agents entéropathogènes tels que Campylobacter, Yersinia, Clostridium, Escherichia Coli entéro-hémorragique et Picornavirus. Nous avons également exclu les patients immunodéprimés (greffés, hémopathies malignes) de l'analyse clinique. Les cas inexploitable des infections à rotavirus représentent 40% (25/62), il est de 42% (10/24) pour les norovirus et de 57% (51/90) pour les adénovirus. Les cas exclus sont principalement des patients immunodéprimés pour les 3 virus (40 à 50%), en deuxième position il s'agit de dossiers cliniques non renseignés. En excluant les dossiers non renseignés et les patients

immunodéprimés, on retrouve sur le total des cas pour lesquels le Ct est supérieur à 30, 14% de co-infections bactériennes pour les infections à rotavirus (6/44) et à adénovirus (7/49), aucune co-infection bactérienne n'est observée pour les résultats faiblement positifs à norovirus GII (Tableau 16).

Tableau 16 : Analyse clinique des infections avec un Ct de détection >30

	Rotavirus Ct > 30 n = 62	Norovirus Ct > 30 n = 24	Adénovirus Ct > 30 n = 90
	n (%)	n (%)	n (%)
CAS INEXPLOITABLES			
Cliniques non renseignées	8 (32)	4 (40)	17 (33)
Patients immunodéprimés	10 (40)	5 (50)	24 (47)
Co-infections bactériennes	6 (24)	0 (0)	7 (14)
Co-infections picornavirus	0 (0)	1 (10)	1 (2)
Autre pathologie digestive	1 (4)	0 (0)	2 (4)
Total cas inexploitable	25 (100)	10 (100)	51 (100)
CAS EXPLOITABLES			
Présence de symptômes de GEA	24 (65)	7 (50)	26 (67)
Absence de symptômes de GEA	13 (35)	7 (50)	13 (33)
Total cas exploitables	37 (100)	14 (100)	39 (100)

Concernant les infections répondant à nos critères de sélection et dont la présence ou non d'une gastro-entérite est renseignée, le nombre de cas asymptomatiques est égale à 35%, 50% et 33% respectivement pour rotavirus, norovirus GII et adénovirus. Dans les infections à rotavirus, 41% des nourrissons de 0 à 5 mois et 23% des enfants de 6 mois à 5 ans sont asymptomatiques, cependant ces pourcentages ne sont pas statistiquement différents (Test exact de Fisher p-value= 0,46). Pour les infections à norovirus et adénovirus, nous ne retrouvons pas non plus de différence significative du taux de cas asymptomatiques en fonction de l'âge (Tableau 17).

Tableau 17 : Répartition des cas asymptomatiques et symptomatiques en fonction de l'âge du patient

	Groupe d'âges			
Biologie Moléculaire + Ct >30	0 à 5 mois n (%)	6 mois à 5 ans n (%)	> 5 ans n (%)	Total
ROTAVIRUS				
Asymptomatiques	9 (41)	3 (23)	1 (50)	13 (35)
Symptomatiques	13 (59)	10 (77)	1 (50)	24 (65)
Total	22 (100)	13 (100)	2 (100)	37 (100)
NOROVIRUS				
Asymptomatiques	1 (33)	4 (44)	2 (100)	7 (50)
Symptomatiques	2 (67)	5 (56)	0 (0)	7 (50)
Total	3 (100)	9 (100)	2 (100)	14 (100)
ADENOVIRUS				
Asymptomatiques	1 (14)	11 (38)	1 (33)	13 (33)
Symptomatiques	6 (86)	18 (62)	2 (67)	26 (67)
Total	7 (100)	29 (100)	3 (100)	39 (100)

Tous virus confondus, 65% des infections chez les patients âgés de plus de 28 mois sont asymptomatiques, ce pourcentage est significativement plus élevé que celui obtenu chez les jeunes enfants de moins de 28 mois à 33% (p-value = 0,0167). La probabilité qu'une faible détection du virus dans les selles soit associée à une GEA serait plus élevée chez les enfants de moins de 28 mois.

Parmi les 90 cas exploités, 8 cas concernent des nouveau-nés dont 7 positifs à rotavirus et 1 positif à adénovirus. Le nouveau-né positif à adénovirus n'avait pas de symptômes de gastro-entérite mais une bronchiolite à Virus Respiratoire Syncytial. Parmi les nouveau-nés positifs à rotavirus, 43% (3/7) sont asymptomatiques et parmi les cas symptomatiques, 75% (3/4) présentent des rectorragies.

3.3.2 Symptomatologie des cas faiblement positifs

Le tableau 18 ci-dessous donne la répartition des symptômes pour les 3 virus et la proportion d'infections nosocomiales. Comme certains dossiers cliniques n'indiquent pas la symptomatologie et renseignent uniquement le diagnostic final de GEA virale, l'effectif de l'étude des symptômes est par conséquent plus faible que le nombre de cas symptomatiques indiqué tableau 17.

Tableau 18 : Symptomatologie des GEA chez les patients faiblement positifs

	Rotavirus n/N (%)	Norovirus GII n/N (%)	Adénovirus n/N (%)
Diarrhées	11/17 (65)	6/6 (100)	16/19 (84)
Vomissements	5/17 (29)	5/6 (83)	10/19 (53)
Fièvre	3/17 (18)	3/6 (50)	9/19 (47)
Rectorragies	5/17 (29)	2/6 (33)	2/19 (11)
Nosocomiale	8/23 (35)	1/5 (20)	11/26 (42)

- Parmi les 17 cas de GEA à rotavirus où les symptômes ont été précisés, nous notons :
 - 5 cas d'évolution rapidement favorable
 - 4 cas pauci-symptomatiques
 - 3 cas ayant nécessité une réhydratation intraveineuse
 - 2 cas de selles glaireuses
 - 1 cas accompagné de convulsions sur terrain épileptique
 - 11 cas dont le motif d'hospitalisation est la GEA
- Parmi les 6 cas de GEA à norovirus, nous notons :
 - 1 cas d'évolution rapidement favorable
 - 1 cas de convulsion hyperthermique
 - 2 cas dont le motif d'hospitalisation est la GEA
- Parmi les 19 cas de GEA à adénovirus, nous notons :
 - 5 cas de GEA sévères
 - 2 cas accompagnés de diarrhées glairo-sanglantes
 - 2 cas accompagnés de convulsions fébriles
 - 10 cas dont le motif d'hospitalisation est la GEA

Devant le faible nombre de cas étudiés et en l'absence d'un score de gravité des symptômes, nous ne pouvons tirer de conclusions fiables sur la symptomatologie des infections avec un Ct > 30. Néanmoins, les infections à rotavirus sont d'évolution rapidement favorable ou pauci-symptomatiques dans 53% des cas faiblement positifs étudiés. A l'inverse, les infections à adénovirus semblent être plus sévères que celles à rotavirus, les symptômes de diarrhée, de vomissement et de fièvre sont plus fréquents que dans les infections à rotavirus, 26% des cas sont étiquetés GEA sévères et aucun dossier ne mentionne une infection pauci-symptomatique

ou rapidement favorable. Tous les cas de GEA à norovirus présentent une diarrhée et 83% des vomissements mais aucune infection n'est déclarée sévère.

Les rectorragies constituent le quatrième symptôme le plus fréquent, excepté pour le rotavirus où il se place en deuxième position à égalité avec les vomissements. Ce symptôme est souvent observé chez les jeunes nourrissons, 67% (6/9) des patients qui ont eu des rectorragies ont moins de 5 mois et 100% ont moins de 2 ans.

Les GEA font communément parties des infections nosocomiales, dans notre étude la GEA est survenue au cours de l'hospitalisation dans 20, 35 à 42% des cas respectivement pour norovirus, rotavirus et adénovirus.

Les patients présentaient une infection concomitante telles que bronchiolite à virus respiratoire syncytial, grippe, varicelle et septicémie dans 26% (6/23) des infections à rotavirus, 14% (1/7) des infections à norovirus GII et 35% (9/26) des infections à adénovirus.

4. DISCUSSION

Pour la détection des virus, la supériorité des tests de biologie moléculaire en terme de sensibilité a été démontrée au cours de plusieurs études. La PCR en temps réel pour la détection des rotavirus A et des adénovirus F a montré une augmentation du taux de détection de 111% et de 175% respectivement, par rapport à la méthode d'agglutination au latex (123). La PCR permet également d'obtenir un taux de détection des virus de GEA plus élevé par rapport à ceux obtenus par ELISA et par Enzyme Immunoassay (EIA) (56)(124)(125). Sur les prélèvements de patients symptomatiques, la détection de l'agent causal est passée de 49% avec les méthodes conventionnelles à 97% avec le diagnostic moléculaire (126). Cependant, la détection des virus chez des sujets sains est elle aussi plus importante. Il a été démontré que la valeur du Ct est significativement plus élevée pour les prélèvements où le rotavirus a été détecté uniquement par qRT-PCR par rapport à ceux détectés aussi par EIA ou ELISA (124)(127)(128). L'exemple de l'étude Bennet *et al.* trouve un Ct moyen de 35,9 pour les cas de GEA à rotavirus RT-PCR+/EIA- contre un Ct moyen de 19,5 pour les cas RT-PCR+/EIA+ et un Ct moyen de 37 chez les contrôles sains. Ce constat soulève le problème de l'interprétation clinique des résultats de biologie moléculaire.

S'il est démontré qu'un titre viral élevé est souvent associé à une symptomatologie, par ailleurs la traduction clinique d'un titre faible est peu connue. Plusieurs études ont émis l'hypothèse

qu'une faible quantité de virus dans les selles (Ct élevé) serait plus fréquemment associée à des infections asymptomatiques ou pauci-symptomatiques. Le tableau 19 reporte les résultats de détection des rotavirus et des norovirus par RT-PCR chez des sujets asymptomatiques. La comparaison des résultats entre les différentes études est limitée car la technique de RT-PCR utilisée est différente, cependant les mêmes tendances sont observées. Dans la grande majorité des cas asymptomatiques, la charge virale détectée est faible avec un Ct supérieur à 30, contrairement aux cas symptomatiques pour lesquels la valeur du Ct est souvent inférieure à 30. En combinant les résultats obtenus pour les 2 cohortes, ces études ont appliqué une analyse ROC (Receiver Operating Characteristic), associée au Youden's index, pour établir une valeur seuil de Ct permettant d'associer la détection du virus à la présence de symptômes de GEA. Ce test statistique évalue la performance du test de diagnostic et permet d'identifier la valeur du Ct optimisant la sensibilité et la spécificité du test.

Tableau 19 : Estimation du Ct moyen des cas asymptomatiques RT-PCR positifs et du Ct seuil

Référence de l'étude	Bennett <i>et al.</i> 2015	Tate <i>et al.</i> 2013	Phillips <i>et al.</i> 2009	Phillips <i>et al.</i> 2009
Virus recherché	Rotavirus	Rotavirus	Rotavirus	Norovirus GII
Total contrôles sains	n = 65	n = 500	NA	NA
RT-PCR positive contrôles sains	20/65 (31%)	24/500 (5%)	65	159
Ct moyen	37 (IQR 33-39)	32 (21-44)	37 (IQR 33-39)	38 (IQR 35-39)
Ct seuil estimé	26,7		24-27	31

Des études suggèrent que la valeur du Ct serait inversement proportionnelle à la sévérité de l'infection (2). Un Ct supérieur à 28 serait associé à une clinique minorée des infections à rotavirus et 20 à 40% des infections à rotavirus sont subcliniques (56). Dans notre étude, 56 % (9/16) des cas renseignés pour les positifs faibles à rotavirus sont pauci-symptomatiques ou d'évolution rapidement favorable. Pour les infections à adénovirus et à norovirus GII, la sévérité des symptômes est peu documentée, nous notons 19% (5/26) et 17% (1/6) de cas sévères respectivement pour adénovirus et norovirus GII. Selon les caractères génétiques des individus et la souche de norovirus, une grande variabilité de réponses cliniques est observée.

Les prélèvements proviennent principalement de services de pédiatrie et de néonatalogie, l'Hôpital Femme-Mère-Enfant représente 60 % des analyses suivi par l'Institut d'Hématologie

et d'Oncologie Pédiatrique avec 27 %. Le diagnostic moléculaire des virus de GEA est plus souvent réalisé chez l'homme que chez la femme. Nous n'avons pas trouvé d'explication à cette disparité, néanmoins il n'est pas observé de différence entre les genres sur le résultat du diagnostic moléculaire, les infections à rotavirus, à norovirus GII et à adénovirus touchent en proportions égales les hommes et les femmes.

La proportion d'infections à adénovirus est plus élevée que celle estimée dans la littérature (24% vs 10%). La proportion importante de patients immunodéprimés dans la population de l'étude peut expliquer cette hausse. En effet, environ 30% des patients de l'étude sont immunodéprimés, chez cette population sensible, les infections à adénovirus sont graves et peuvent devenir chroniques, ils font donc l'objet d'un suivi régulier et la recherche d'adénovirus dans les selles est fréquente. Ajoutée à cela, il se peut que la détection d'adénovirus dans les selles ne soit pas toujours liée à un adénovirus entéropathogène. Les adénovirus responsables d'infections respiratoires, fréquentes chez les enfants, peuvent passer dans le tractus digestif et se retrouver dans les selles.

Les infections à norovirus GII occupent la troisième position alors qu'ils sont reconnus comme étant le deuxième virus principal responsable de GEA. Cette position résulte en partie du taux élevé d'infections à adénovirus mais elle est probablement due aussi à une sous-estimation des infections à norovirus GII. En effet, les GEA à norovirus GII touchent aussi bien les adultes que les enfants, cependant le diagnostic virologique chez l'adulte est peu fréquent en raison des contraintes du prélèvement et de la bénignité de l'infection chez ces patients.

Pour notre analyse réalisée au Laboratoire de Virologie GHE et sur la base de la littérature, nous estimons que le nombre de cas asymptomatiques parmi les résultats de PCR inférieurs à 30 est négligeable. Nous avons donc sélectionné les résultats de biologie moléculaire avec un Ct supérieur à 30 afin d'évaluer le pourcentage d'infections asymptomatiques. Parmi ces cas faiblement positifs, nous retrouvons 35% (13/37), 50% (7/14) et 34% (13/39) de cas asymptomatiques respectivement pour rotavirus, norovirus et adénovirus, soit plus d'un 1 cas sur 3 des résultats positifs faibles. Rapporté sur la totalité des analyses positives, le taux d'infections asymptomatiques correspondrait approximativement à 5,0% (13/263) des infections à rotavirus, 8,4% (7/83) des infections à norovirus et 13,5% (13/96) des infections à adénovirus. Il faut cependant noter que ces taux sont probablement sous-estimés car les infections asymptomatiques parmi les positifs forts ne sont pas prises en compte. L'ordre de

prédominance du taux d'infections asymptomatiques entre les trois virus est différent entre la population faiblement positive et la population totale. En effet, sur la totalité des infections, la plus grande proportion d'infections asymptomatiques concerne les adénovirus alors que sur la population faiblement positive, ce sont les norovirus qui obtiennent le pourcentage le plus fort. Deux éléments peuvent expliquer ce tableau. Le premier élément porte sur la proportion d'analyses positives avec un $Ct < 30$, pour les adénovirus elle est seulement de 45% contre environ 80% pour les infections à rotavirus et à norovirus. Le deuxième élément concerne le fait que les infections asymptomatiques seraient fréquemment associées à un $Ct > 30$, cette association serait particulièrement vraie dans les infections à norovirus et de façon moindre dans les infections à adénovirus. Pour les 3 virus, le nombre de cas asymptomatiques a tendance à augmenter avec la valeur du Ct qui augmente, en raison d'un effectif réduit, l'association entre ces deux paramètres n'a pas pu être statistiquement confirmée.

Il est important de prendre en compte également que le diagnostic moléculaire des virus de GEA est généralement effectué lorsque les signes cliniques évoquant une GEA sont présents. Les taux de portages asymptomatiques sont donc probablement sous-estimés.

Dans la littérature, le taux d'infections asymptomatiques à adénovirus responsables de GEA est mal connu, il est estimé à 50% pour l'ensemble des adénovirus, sans distinction des sérotypes. Il est donc difficile de comparer ce taux à celui défini dans notre étude qui est spécifique de la GEA, néanmoins 34% des patients faiblement positifs sont asymptomatiques, ce taux étant inférieur au taux de 50% retrouvé dans la littérature, nous ne pouvons conclure sur la prédominance des infections asymptomatiques lorsque le Ct est fort pour les adénovirus.

Concernant les infections à rotavirus, le taux de portage asymptomatique varie de 5 à 65% dans la littérature (132). Des facteurs tels que la période de l'étude, l'âge des patients et l'implémentation de la vaccination anti-rotavirus peuvent expliquer ces fortes variations entre les différentes publications. La prévalence des infections à rotavirus étant plus élevée en période hivernale, le portage asymptomatique est donc plus élevé sur cette période. Une forte proportion de nourrissons âgés de 0 à 3 mois peut également élever le taux de cas asymptomatiques, en moyenne, 25 % des nouveau-nés excrètent du rotavirus tout au long de l'année et ce pourcentage augmente à 50 % en période épidémique hivernale (39). Dans notre étude, les nourrissons âgés de 0 à 3 mois concernent 18 patients sur 37, soit 49% des cas d'infections à rotavirus exploités. Cependant, nos résultats ne s'accordent pas avec la tendance de la littérature puisque le taux de cas asymptomatiques chez les nourrissons de 0 à 3 mois (7/18, 39%) n'est pas plus important que chez les patients plus âgés (7/19, 37%). Le taux déterminé dans notre

étude est similaire à celui de l'étude Bennet *et al.* évalué sur des contrôles sains et dont les Ct mesurés sont supérieurs à 30 (35% vs 31%). Par contre, l'étude Tate *et al.*, retrouve un taux bien plus faible puisqu'un rotavirus est détecté chez seulement 5% des contrôles sains, la vaccination mise en place avant l'étude serait à l'origine de la baisse de la détection du rotavirus chez les contrôles sains.

Les infections à norovirus détiennent le taux de cas asymptomatiques parmi les positifs faibles le plus élevé. Il atteint 50% contre un taux global de 20-30% dans la littérature. Ce résultat est cohérent avec le principe que les infections asymptomatiques sont plus fréquentes lorsque le Ct est supérieur à 30. Cependant le taux d'infections asymptomatiques peut varier d'un génotype à un autre et l'effectif des infections à norovirus de notre étude est relativement faible (n=14). Les infections qui ont fait l'objet d'un suivi montrent que la valeur du Ct a tendance à augmenter au cours du temps et peut varier de façon importante à seulement 3-4 jours d'intervalle. L'excrétion virale dure en moyenne 30 jours et peut perdurer jusqu'à 70 jours. La vitesse d'élimination du virus varie en fonction du virus et des souches, ainsi que des individus et de leurs caractéristiques physiologiques et immunitaires. Pour les trois virus, il est toujours observé une phase de détection forte du virus dans les selles (valeur du Ct basse), correspondant probablement à la phase aiguë de l'infection, suivi d'une phase de détection faible (valeur du Ct haute), traduisant l'élimination du virus et la guérison. Parfois, le virus est détecté faiblement avant la phase de détection forte (RV et Nv 10%, Adv 35%), il peut alors s'agir d'une phase de pré-sécrétion asymptomatique ou une phase d'apparition des symptômes. Le moment du prélèvement par rapport au début des symptômes ou des antécédents de GEA est donc essentiel dans l'interprétation des résultats. Un logigramme d'aide à l'interprétation clinique lorsque le Ct est supérieur à 30 est présenté Annexe 6.

De plus, l'échantillonnage du prélèvement de selles n'étant pas standardisé, une variabilité de la quantité de selles analysée existe entre les différentes analyses de PCR. Cette variation inter-analyse est faible mais elle constitue un biais de reproductibilité. Une standardisation future de l'échantillonnage permettra d'exprimer le résultat en Ct/ml ou mg de selles et ainsi d'améliorer l'interprétation clinique des résultats.

A ce jour, l'interprétation clinique des résultats semi-quantitatifs de PCR a fait l'objet de peu de publications. Des investigations complémentaires sont nécessaires pour confirmer l'existence d'une relation entre le Ct et la sévérité des symptômes et la possibilité de définir un Ct seuil en lien avec des manifestations cliniques.

CONCLUSION

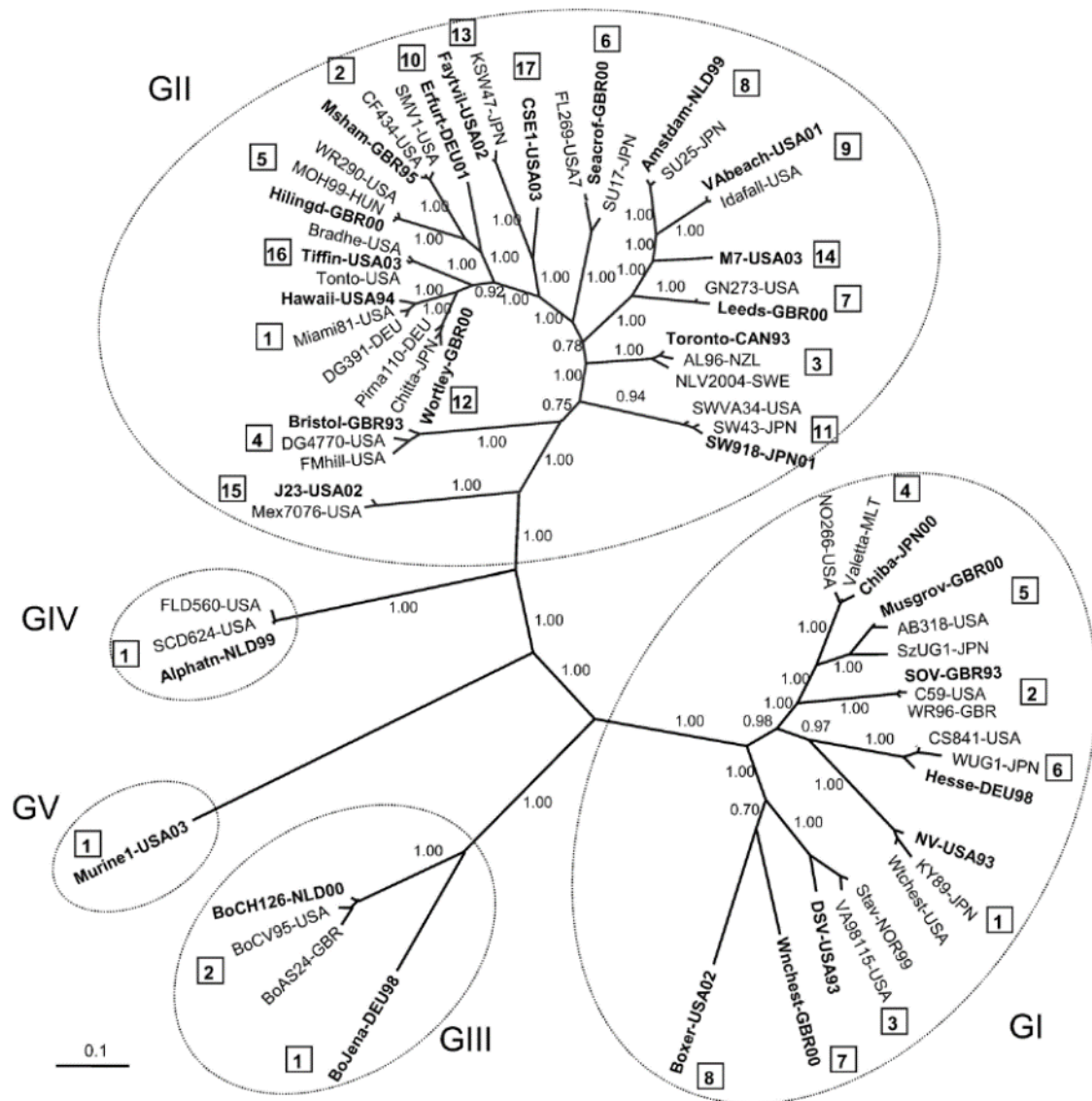
La PCR en temps réel apporte de nouvelles perspectives dans le diagnostic des GEA virales. La notion semi-quantitative donnée par le Ct doit cependant être interprétée en fonction de plusieurs critères. La quantité de virus excrétée dans les selles variant au cours de l'infection, le résultat semi-quantitatif va ainsi dépendre principalement du moment du prélèvement. Lors de la phase aiguë de l'infection, la quantité de virus détectée est dans la majorité des cas élevée. Après cette phase dont la durée dépend du type de virus, la quantité de virus diminue sur plusieurs jours voir plusieurs semaines. L'élimination du virus est plus ou moins rapide en fonction des individus et du type de virus. La cinétique d'élimination est plus rapide pour les rotavirus que pour les norovirus et les adénovirus et ce sont les infections à norovirus GII qui présentent la durée d'excrétion la plus longue. La quantité de virus excrétée semble aussi dépendante de l'âge, chez les enfants d'environ 2 ans et moins, le Ct est en moyenne plus élevé que chez les individus plus âgés. A noter aussi que les Ct des infections à adénovirus sont en général plus élevés que ceux des infections à rotavirus et à norovirus GII. Une excrétion faible peut aussi être détectée en amont de la phase aiguë. La valeur du Ct est aussi fonction du type de virus, de la chronologie et de l'intensité des symptômes, de l'âge du patient et de son état de sensibilité (immunodépression, prématurité, maladies chroniques...) ainsi que de l'historique des épisodes de GEA.

Au vue de nos résultats et ceux de la littérature, un Ct supérieur à 30 peut être considéré comme une positivité faible. En l'absence de symptômes et d'épisode récent de GEA, une positivité faible peut traduire une phase de sécrétion pré-symptomatique ou une infection asymptomatique. Chez les porteurs sains, il a été démontré que le Ct de détection des rotavirus et des norovirus est en moyenne plus élevé que chez les sujets symptomatiques. En l'absence de symptômes mais avec un épisode de GEA dans les 30 jours précédents l'analyse, il est très probable qu'une faible détection du virus soit liée à cet antécédent de GEA.

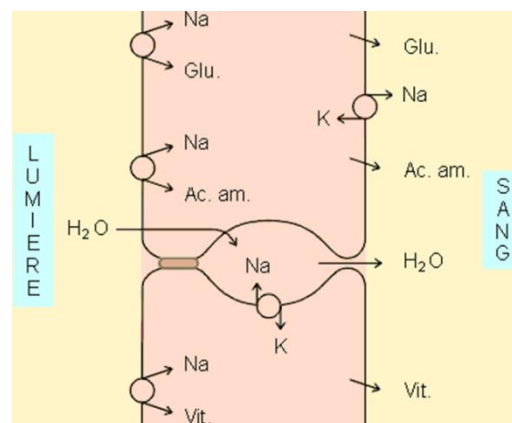
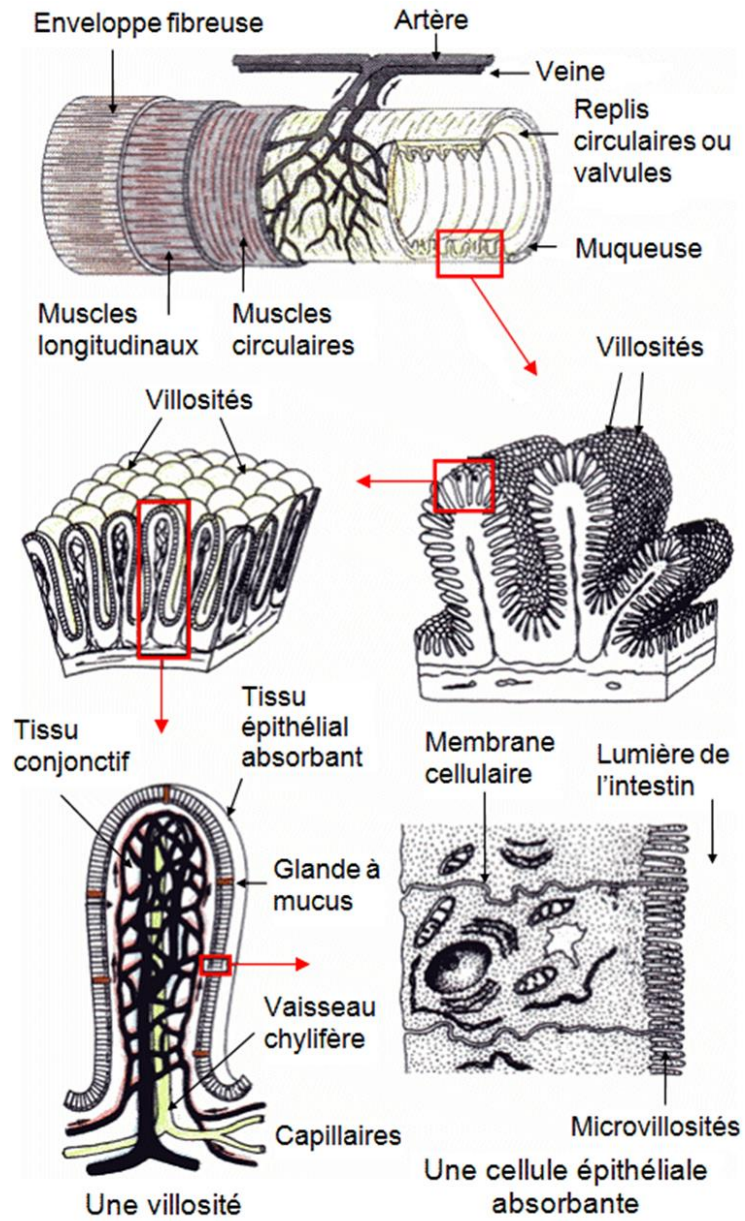
Les études portant sur l'interprétation des résultats de PCR et l'évaluation d'un Ct seuil en lien avec la clinique sont encore peu nombreuses. Néanmoins les investigations à ce sujet se multiplient. Lors de ce type d'analyse, la standardisation du moment du prélèvement par rapport au début des symptômes et la standardisation de l'échantillonnage lors de l'analyse de PCR sont des éléments clés à prédéfinir afin d'améliorer la justesse du résultat. La mise en place d'une analyse ROC et Youden index pour déterminer une valeur seuil permettrait de confirmer les résultats de notre étude préliminaire.

ANNEXES

Annexe 1. Arbre phylogénétique des norovirus



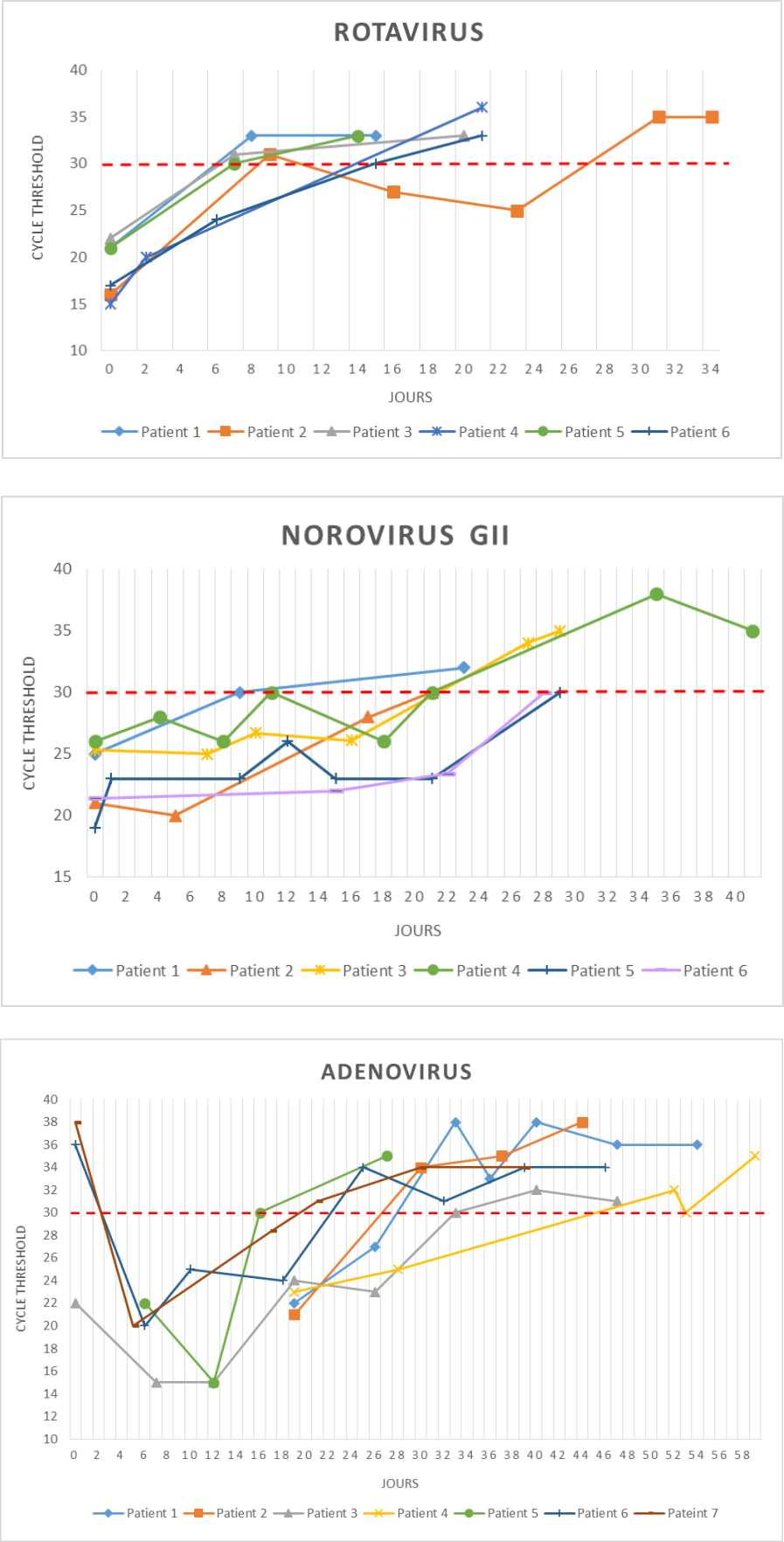
Annexe 2. Structure de l'intestin grêle



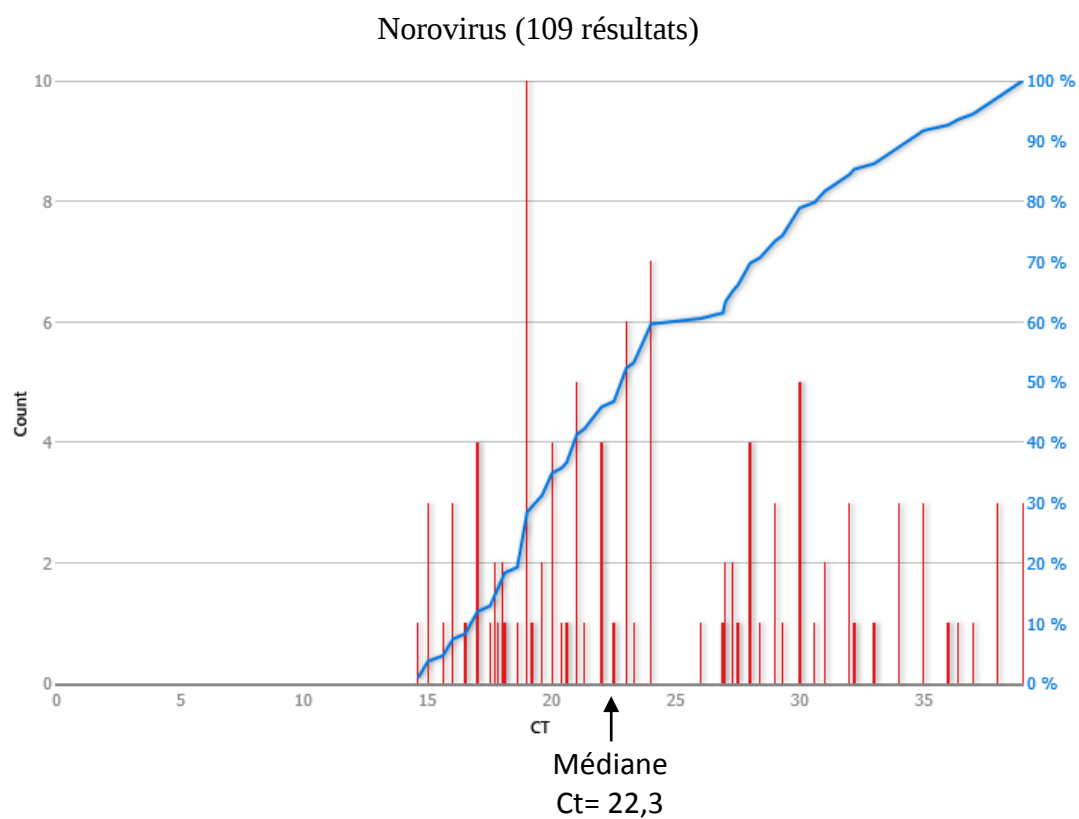
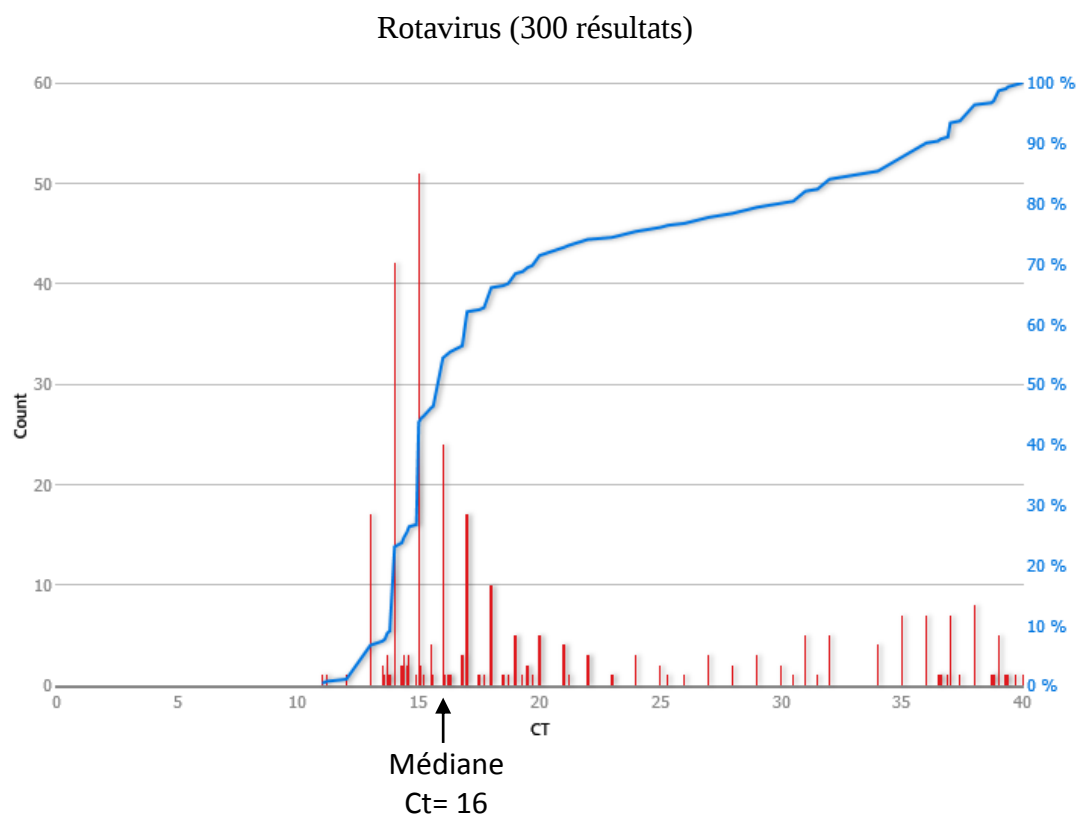
Annexe 3. Techniques variantes de PCR

Variantes de la PCR	Principe	Avantages
RT-PCR	PCR précédée d'une transcription inverse	Application aux virus à ARN et autres ARN messagers
PCR quantitative ou en temps réel	Mesure en continu des produits de PCR	Quantification de la charge Diminution du nombre de cycles requis par rapport à la PCR classique
PCR emboîtée ou Nested PCR	Deux PCR successives, la seconde utilisant des amorces situées à l'intérieur du premier fragment amplifié	Augmentation de la sensibilité permettant la détection de faibles quantités d'ADN
PCR in situ	PCR effectuée sur coupes tissulaires fixées	Combinaison de la sensibilité de la PCR et de la précision des données histologiques
Méta-PCR	PCR générant un ADN synthétique comprenant n'importe quelle combinaison d'ADN amplifiable par PCR dans n'importe quel ordre (129)	Augmentation du débit des méthodes de numérisation et balayage des mutations
PCR multiplex	PCR utilisant un mélange de couples d'amorces	Amplification au cours d'une même réaction de plusieurs génomes
TP-PCR	Amplification de gènes comportant des triplets répétés	Diagnostic de maladies génétiques
PCR asymétrique	PCR utilisant une faible quantité d'amorces et générant de l'ADN simple brin	Séquençage direct du produit de PCR
Eq-PCR	PCR utilisant la Taq polymérase conditionnée pour induire des erreurs de polymérisation (fortes concentrations en MgCl ₂ ou ajout de MnCl ₂)	Création et sélection de mutants
Thermal asymmetric interlaced PCR	Technique combinant la PCR emboîtée et asymétrique	Séquençage direct de faibles quantités d'ADN
PCR sur colonie	Inoculation directe d'une colonie de micro-organisme dans le milieu réactionnel de la PCR	Séquençage génomique de micro-organismes Vérification de l'efficacité d'une transgénèse

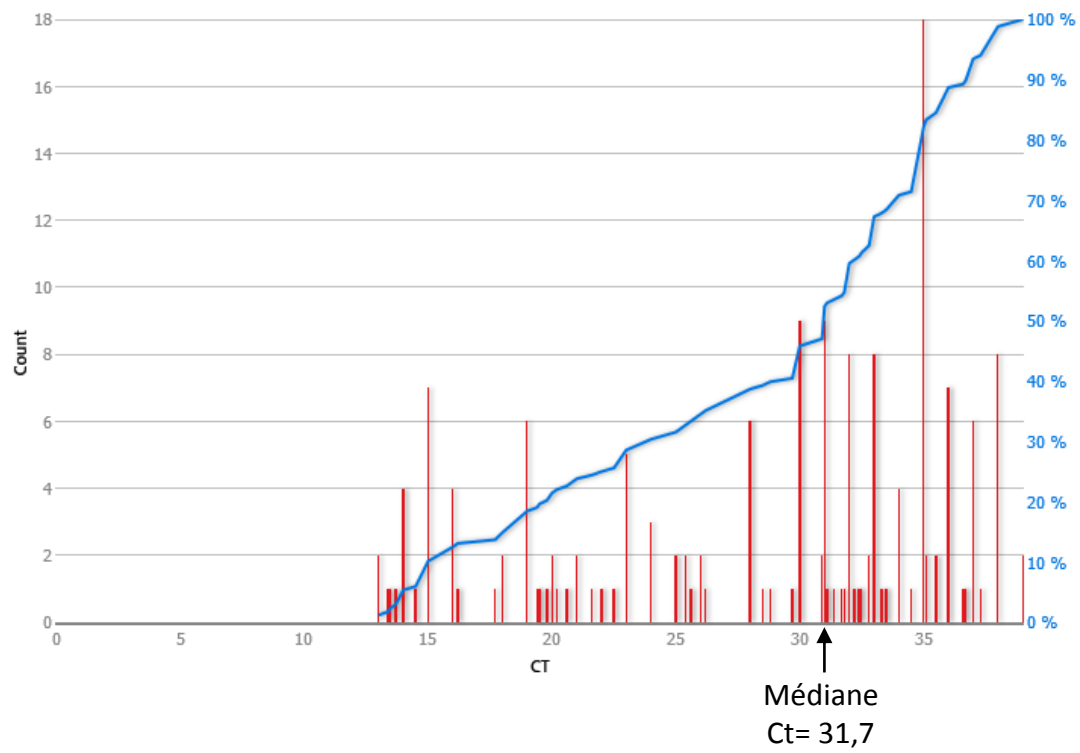
Annexe 4. Cinétique de l'excrétion virale au cours de l'infection à rotavirus, à norovirus GII et à adénovirus



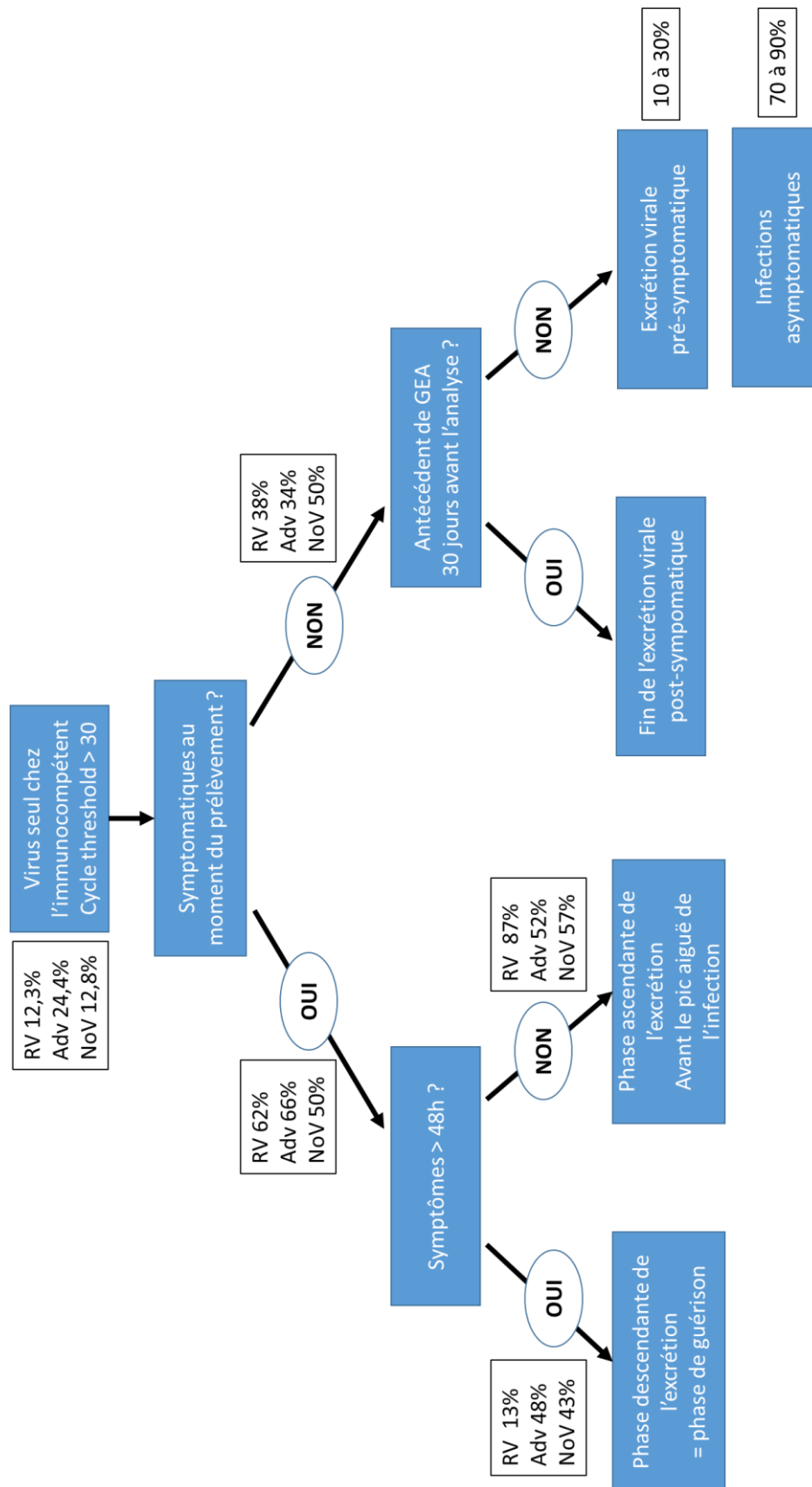
Annexe 5. Distribution des résultats semi-quantitatifs de biologie moléculaire des virus de GEA



Adénovirus (168 résultats)



Annexe 6. Logigramme d'interprétation clinique des résultats de biologie moléculaire Ct >30 des virus de GEA



BIBLIOGRAPHIE

1. WHO. Causes of child mortality, 2000–2012. http://www.who.int/gho/child_health/mortality/mortality_causes_region_text/en/ (consulté le 11.10.2014).
2. Corcoran MS, van Well GTJ, van Loo IHM. Diagnosis of viral gastroenteritis in children: interpretation of real-time PCR results and relation to clinical symptoms. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2014; 33(10):1663-1673.
3. Cubitt W., McSwiggan D., Moore W. Winter vomiting disease caused by calicivirus. *J Clin Path*. 1979; 32:786-793.
4. Kapikian AZ, Wyatt RG, Dolin R, Thornhill TS, Kalica AR, Chanock RM. Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *J Virol*. 1972;10(5):1075-81.
5. Graber P. Norovirus. *Forum Médical Suisse*. 2010; 10(4):65-69.
6. Bishop RF, Davidson GP, Holmes IH, Ruck BJ. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis. *Lancet*. 1973;2(7841):1281-3.
7. Madeley CR, Cosgrove BP. Letter: Viruses in infantile gastroenteritis. *Lancet*. 1975;2(7925):124.
8. Uhnoo I, Wadell G, Svensson L, Johansson ME. Importance of enteric adenoviruses 40 and 41 in acute gastroenteritis in infants and young children. *J Clin Microbiol*. 1984;20(3):365-72.
9. Greenberg HB, Estes MK. Rotaviruses: from pathogenesis to vaccination. *Gastroenterology*. 2009;136(6):1939-51.
10. Estes MK, Cohen J. Rotavirus gene structure and function. *Microbiol Rev*. 1989;53(4):410-49.
11. Agence de la Santé Publique du Canada. Rotavirus humain fiche technique santé-sécurité: agents pathogènes section i - agent infectieux. <http://www.phac-aspc.gc.ca/lab-bio/res/psds-ftss/rotavirus-fra.php#endnote8> (consulté le 14.11.2014).
12. Mammette A. Virologie médicale. Presse Universitaire de Lyon. 2002;2-7297-0663-1.
13. Gault E. Rotavirus genetics. *Virologie*. 1998;2(2):139-48.
14. Kawai K, O'Brien MA, Goveia MG, Mast TC, El Khoury AC. Burden of rotavirus gastroenteritis and distribution of rotavirus strains in Asia: a systematic review. *Vaccine*. 2012;30(7):1244-54.
15. Pothier P, Agnello D. Cours de Virologie Grands Syndromes. <http://www.microbes-edu.org/etudiant/gastro-enterites.html> (consulté le 14.04.2015).

16. International Committee on Taxonomy of Viruses. Caliciviridae Taxonomy. <http://ictvonline.org/virustaxonomy.asp> (consulté le 04.05.2015).
17. Farkas T, Sestak K, Wei C, Jiang X. Characterization of a rhesus monkey calicivirus representing a new genus of Caliciviridae. *J Virol*. 2008;82(11):5408-16.
18. Mikalsen AB, Nilsen P, Frøystad-Saugen M, Lindmo K, Eliassen TM, Rode M, et al. Characterization of a Novel Calicivirus Causing Systemic Infection in Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.): Proposal for a New Genus of Caliciviridae. *PLoS ONE*. 2014;9(9):e107132.
19. Donaldson EF, Lindesmith LC, LoBue AD, Baric RS. Viral shape-shifting: norovirus evasion of the human immune system. *Nat Rev Microbiol*. 2010;8(3):231-41.
20. Bull RA, Eden J-S, Rawlinson WD, White PA. Rapid evolution of pandemic noroviruses of the GII.4 lineage. *PLoS Pathog*. 2010;6(3):e1000831.
21. De Rougemont A. Rôle des antigènes tissulaires de groupes sanguins humains A, B, H et Lewis dans l'évolution des Norovirus GII.4. Thèse d'exercice: Pharmacie: Dijon; 2011.
22. Choi J-M, Hutson AM, Estes MK, Prasad BVV. Atomic resolution structural characterization of recognition of histo-blood group antigens by Norwalk virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(27):9175-80.
23. Vongpunsawad S, Venkataram Prasad BV, Estes MK. Norwalk Virus Minor Capsid Protein VP2 Associates within the VP1 Shell Domain. *J Virol*. 2013;87(9):4818-25.
24. Zheng D-P, Ando T, Fankhauser RL, Beard RS, Glass RI, Monroe SS. Norovirus classification and proposed strain nomenclature. *Virology*. 2006;346(2):312-23.
25. ANSES. Fiche de description de danger biologique transmissible par les aliments / Norovirus. <https://www.anses.fr/sites/default/files/documents/MIC2011sa0036Fi.pdf> (consulté le 14.04.2015).
26. Zakikhany K, Allen DJ, Brown D, Iturriza-Gómara M. Molecular evolution of GII-4 Norovirus strains. *PloS One*. 2012;7(7):e41625.
27. Mahar JE, Bok K, Green KY, Kirkwood CD. The Importance of Intergenic Recombination in Norovirus GII.3 Evolution. *J Virol*. 2013;87(7):3687-98.
28. Molinier-Frenkel V, Boulanger P. Les adénovirus : de la structure à la vectorisation de gènes et à la vaccinologie. I. Virologie des adénovirus et des adénovirus recombinants. *Virologie*. 2003;7(4):267-79.
29. Zaghloul M. Adenovirus serotypes (40, 41) as a cause of gastroenteritis. *Air Water Borne Dis*. 2012;1:e104.
30. Shah JD, Scharber SK, Cardona CJ. Development and application of quantitative real-time PCR for the rapid detection of hemorrhagic enteritis virus in tissue samples. *Avian Dis*. 2013;57(2):300-2.

31. Saha B, Wong CM, Parks RJ. The Adenovirus Genome Contributes to the Structural Stability of the Virion. *Viruses*. 2014;6(9):3563-83.
32. Barclay L, Park GW, Vega E, Hall A, Parashar U, Vinjé J, et al. Infection control for norovirus. *Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis*. 2014;20(8):731-740.
33. Sherwood L. *Physiologie humaine: A Human Perspective*. 2^e éd. Bruxelles : De Boeck ; 2006. 774 p.
34. Belaiche J. Physiopathologie des diarrhées aiguës infectieuses. *Acta Endosc*. 2000;30(3):8.
35. Morel P. Les principaux agents viraux responsables de gastro-entérites aiguës en France : présentation, prise en charge et importances sanitaires. Thèse d'exercice: Pharmacie: Rouen; 2012.
36. Lorrot M, Vasseur M. Physiopathologie de la diarrhée à rotavirus. *Arch Pédiatrie*. 2007;14(3):S145-51.
37. Dong Y, Zeng CQ, Ball JM, Estes MK, Morris AP. The rotavirus enterotoxin NSP4 mobilizes intracellular calcium in human intestinal cells by stimulating phospholipase C-mediated inositol 1,4,5-trisphosphate production. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(8):3960-5.
38. Hagbom M, Istrate C, Engblom D, Karlsson T, Rodriguez-Diaz J, Buesa J, et al. Rotavirus stimulates release of serotonin (5-HT) from human enterochromaffin cells and activates brain structures involved in nausea and vomiting. *PLoS Pathog*. 2011;7(7):e1002115.
39. Dommergues MA. Infections à rotavirus du nouveau-né. *Médecine Thérapeutique Pédiatrie*. 2006;9(1):21-4.
40. Tan M, Jiang X. The p domain of norovirus capsid protein forms a subviral particle that binds to histo-blood group antigen receptors. *J Virol*. 2005;79(22):14017-30.
41. Walther FJ, Bruggeman C, Daniëls-Bosman MS, Pourier S, Grauls G, Stals F, et al. Symptomatic and asymptomatic rotavirus infections in hospitalized children. *Acta Paediatr Scand*. 1983;72(5):659-63.
42. Huynen P, Mauroy A, Martin C, Savadogo LGB, Boreux R, Thiry E, et al. Molecular epidemiology of norovirus infections in symptomatic and asymptomatic children from Bobo Dioulasso, Burkina Faso. *J Clin Virol*. 2013;58(3):515-21.
43. Van R, Wun CC, O'Ryan ML, Matson DO, Jackson L, Pickering LK. Outbreaks of human enteric adenovirus types 40 and 41 in Houston day care centers. *J Pediatr*. 1992;120(4 Pt 1):516-21.
44. Van Cauteren D, De Valk H, Vaux S, Le Strat Y, Vaillant V. Burden of acute gastroenteritis and healthcare-seeking behaviour in France: a population-based study. *Epidemiol Infect*. 2012;140(4):697-705.

45. de Rougemont A, Ambert-Balay K, Belliot G, Pothier P. Actualités sur les norovirus. *Medecine/sciences*. 2010;26(1):73-8.
46. Kaplan JE, Feldman R, Campbell DS, Lookabaugh C, Gary GW. The frequency of a Norwalk-like pattern of illness in outbreaks of acute gastroenteritis. *Am J Public Health*. 1982;72(12):1329-32.
47. Coulson BS, Grimwood K, Hudson IL, Barnes GL, Bishop RF. Role of coproantibody in clinical protection of children during reinfection with rotavirus. *J Clin Microbiol*. 1992;30(7):1678-84.
48. Simmons K, Gambhir M, Leon J, Lopman B. Duration of Immunity to Norovirus Gastroenteritis. *Emerg Infect Dis*. 2013;19(8):1260-7.
49. Colliex C. La microscopie électronique. Paris: Presses universitaires de France; 1998. Que sais-je ?, ISSN 0768-0066 ; 1045
50. Lee H, Park Y, Kim M, Jee Y, Cheon D, Jeong HS, et al. Development of a latex agglutination test for norovirus detection. *J Microbiol*. 2010;48(4):419-25.
51. Bon F, Kaplon J, Metzger M-H, Pothier P. Évaluation de sept réactifs d'immunochromatographie pour détecter les rotavirus humains dans les selles. *Pathol Biol*. 2007;55(3-4):149-53.
52. Weitzel T, Reither K, Mockenhaupt FP, Stark K, Ignatius R, Saad E, et al. Field Evaluation of a Rota- and Adenovirus Immunochromatographic Assay Using Stool Samples from Children with Acute Diarrhea in Ghana. *J Clin Microbiol*. 2007;45(8):2695-7.
53. Ambert-Balay K, Pothier P. Evaluation of 4 immunochromatographic tests for rapid detection of norovirus in faecal samples. *J Clin Virol*. 2013;56(3):278-82.
54. Park KS, Baek KA, Kim DU, Kwon KS, Bing SH, Park JS, et al. Evaluation of a New Immunochromatographic Assay Kit for the Rapid Detection of Norovirus in Fecal Specimens. *Ann Lab Med*. 2012;32(1):79-81.
55. Rovida F, Campanini G, Sarasini A, Adzasehoun KMG, Piralla A, Baldanti F. Comparison of immunologic and molecular assays for the diagnosis of gastrointestinal viral infections. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2013;75(1):110-1.
56. Byrne S. Towards routine diagnosis for gastrointestinal infections by molecular technology in Australian laboratories, Departments of Microbiology and Molecular Pathology Australia; 2013. <http://city.asnevents.com.au/assets/Towards-the-Routine-Diagnosis-of-Gastrointestinal-Infections-by-Molecular-Technology-in-Australian-Laboratories-Shane-Byrne-Resubmission.pdf> (consulté le 19.01.2015)
57. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Biotechnol Read Mass*. 1992;24:17-27.
58. Huraux J-M. Traité de virologie médicale. Paris: Estem ; 2003. 712 p.

59. Poitras E, Houde A. La PCR en temps réel: principes et applications. *Biol Biotechnol.* 2002;2(2):11.
60. Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnol Nat Publ Co.* 1992;10(4):413-7.
61. Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Res.* 1996;6(10):986-94.
62. van Maarseveen NM, Wessels E, de Brouwer CS, Vossen ACTM, Claas ECJ. Diagnosis of viral gastroenteritis by simultaneous detection of Adenovirus group F, Astrovirus, Rotavirus group A, Norovirus genogroups I and II, and Sapovirus in two internally controlled multiplex real-time PCR assays. *J Clin Virol.* 2010;49(3):205-10.
63. Jiang Y, Fang L, Shi X, Zhang H, Li Y, Lin Y, et al. Simultaneous Detection of Five Enteric Viruses Associated with Gastroenteritis Using a PCR Assay: a Single Real-time Multiplex Reaction and its Clinical Application. *J Clin Microbiol.* 2014; 52(4):1266-8.
64. Higgins RR, Beniprashad M, Cardona M, Masney S, Low DE, Gubbay JB. Evaluation and Verification of the Seeplex Diarrhea-V ACE Assay for Simultaneous Detection of Adenovirus, Rotavirus, and Norovirus Genogroups I and II in Clinical Stool Specimens. *J Clin Microbiol.* 2011;49(9):3154-62.
65. Reddington K, Tuite N, Minogue E, Barry T. A current overview of commercially available nucleic acid diagnostics approaches to detect and identify human gastroenteritis pathogens. *Biomol Detect Quantif.* 2014;1(1):3-7.
66. Melliez H, Boelle P-Y, Baron S, Mouton Y, Yazdanpanah Y. Morbidity and cost of rotavirus infections in France. *Médecine Mal Infect.* 2005;35(10):492-9.
67. US EPA. List G: EPA's Registered Antimicrobial Products Effective Against Norovirus. http://www.epa.gov/oppad001/list_g_norovirus.pdf (consulté le 06.03.2015).
68. CHU Rouen. Adenovirus. <http://www.chu-rouen.fr/mtph/fiches/ADENOVIRUS.pdf> (consulté le 20.12.2014).
69. Comité technique des vaccinations. Vaccination systématique contre le rotavirus des nourrissons âgés de moins de 6 mois. Paris : Haut Conseil de la Santé Publique; 2010.
70. Rosen CJ. Rotavirus Disease and Vaccines: Frequently Asked Questions. Seattle: PATH; 2013.
71. Karve S, Krishnarajah G, Korsnes JS, Cassidy A, Candrilli SD. Burden of acute gastroenteritis, norovirus and rotavirus in a managed care population. *Hum Vaccines Immunother.* 2014;10(6):1544-56.
72. Yen C, Armero Guardado JA, Alberto P, Rodriguez Araujo DS, Mena C, Cuellar E, et al. Decline in rotavirus hospitalizations and health care visits for childhood diarrhea following rotavirus vaccination in El Salvador. *Pediatr Infect Dis J.* 2011;30(1 Suppl):S6-10.

73. Leshem E, Lopman B, Glass R, Gentsch J, Bányai K, Parashar U, et al. Distribution of rotavirus strains and strain-specific effectiveness of the rotavirus vaccine after its introduction: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis*. 2014; 14(9):847-56.
74. Gautam R, Esona MD, Mijatovic-Rustempasic S, Ian Tam K, Gentsch JR, Bowen MD. Real-time RT-PCR assays to differentiate wild-type group A rotavirus strains from Rotarix(®) and RotaTeq(®) vaccine strains in stool samples. *Hum Vaccines Immunother*. 2014;10(3):767-77.
75. Payne DC, Edwards KM, Bowen MD, Keckley E, Peters J, Esona MD, et al. Sibling transmission of vaccine-derived rotavirus (RotaTeq) associated with rotavirus gastroenteritis. *Pediatrics*. 2010;125(2):e438-41.
76. Haut Conseil de la Santé Publique. Avis relatif à la vaccination des nourrissons vis-à-vis des gastroentérites à rotavirus. Paris: Haut Conseil de la Santé Publique ; 2013.
77. Ramani S, Atmar RL, Estes MK. Epidemiology of human noroviruses and updates on vaccine development. *Curr Opin Gastroenterol*. 2014;30(1):25-33.
78. Kocher J, Bui T, Giri-Rachman E, Wen K, Li G, Yang X, et al. Intranasal P particle vaccine provided partial cross-variant protection against human GII.4 norovirus diarrhea in gnotobiotic pigs. *J Virol*. 2014;88(17):9728-43.
79. Treanor JJ, Atmar RL, Frey SE, Gormley R, Chen WH, Ferreira J, et al. A Novel Intramuscular Bivalent Norovirus Virus-Like Particle Vaccine Candidate-Reactogenicity, Safety, and Immunogenicity in a Phase 1 Trial in Healthy Adults. *J Infect Dis*. 2014;
80. Bernstein DI, Atmar RL, Lyon GM, Treanor JJ, Chen WH, Jiang X, et al. Norovirus Vaccine Against Experimental Human GII.4 Virus Illness: A Challenge Study in Healthy Adults. *J Infect Dis*. 2014;211(6):870-878.
81. Arias A, Emmott E, Vashist S, Goodfellow I. Progress towards the prevention and treatment of norovirus infections. *Future Microbiol*. 2013;8(11):1475-87.
82. U.S. National Institutes of Health. Safety and Immunogenicity of Norovirus Bivalent Virus-Like Particle Vaccine in Healthy Adults. <http://clinicaltrials.gov/show/NCT02142504> (consulté le 01.12.2014).
83. Tatsis N, Ertl HCJ. Adenoviruses as vaccine vectors. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther*. oct 2004;10(4):616-29.
84. Ondondo BO. The influence of delivery vectors on HIV vaccine efficacy. *Front Microbiol*. 2014;5:439.
85. Kasala D, Choi J-W, Kim SW, Yun C-O. Utilizing adenovirus vectors for gene delivery in cancer. *Expert Opin Drug Deliv*. 2014;11(3):379-92.

86. Organisation Mondiale de la Santé. Mise en application des nouvelles recommandations pour la prise en charge clinique des cas de diarrhée : directives pour les décideurs et les responsables de programme. Genève: WHO ; 2006.
87. Rocha-Pereira J, Neyts J, Jochmans D. Norovirus: Targets and tools in antiviral drug discovery. *Biochem Pharmacol*. 2014;91(1):1-11.
88. Borrows CL, Turner PC. Seasonal screening for viral gastroenteritis in young children and elderly hospitalized patients: is it worthwhile? *J Hosp Infect*. 2014;87(2):98-102.
89. Bon F, Fascia P, Dauvergne M, Tenenbaum D, Planson H, Petion AM, et al. Prevalence of group A rotavirus, human calicivirus, astrovirus, and adenovirus type 40 and 41 infections among children with acute gastroenteritis in Dijon, France. *J Clin Microbiol*. 1999;37(9):3055-8.
90. Cardine AM, Goullain K, Mouterde O, Castignolles N, Hellot M-F, Mallet E, et al. Epidemiology of acute viral gastroenteritis in children hospitalized in Rouen, France. *Clin Infect Dis*. 2002;34(9):1170-8.
91. Parashar UD, Gibson CJ, Bresee JS, Glass RI. Rotavirus and Severe Childhood Diarrhea. *Emerg Infect Dis*. 2006;12(2):304-6.
92. Organisation Mondiale de la Santé. Relevé épidémiologique hebdomadaire. WHO. 2011; 86(18):173–176.
93. Pothier P. Rapport d'activités 2012. CHU Dijon: CNR virus entériques; 2013.
94. Gomara MI, Simpson R, Perault AM, Redpath C, Lorgelly P, Joshi D, et al. Structured surveillance of infantile gastroenteritis in East Anglia, UK: incidence of infection with common viral gastroenteric pathogens. *Epidemiol Infect*. 2008;136(1):23-33.
95. Bosch A, Pintó RM, Guix S. Human astroviruses. *Clin Microbiol Rev*. 2014;27(4):1048-74.
96. Sdiri-Loulizi K, Gharbi-Khelifi H, de Rougemont A, Hassine M, Chouchane S, Sakly N, et al. Molecular epidemiology of human astrovirus and adenovirus serotypes 40/41 strains related to acute diarrhea in Tunisian children. *J Med Virol*. 2009;81(11):1895-902.
97. Moyo SJ, Hanevik K, Blomberg B, Kommedal O, Nordbø SA, Maselle S, et al. Prevalence and molecular characterisation of human adenovirus in diarrhoeic children in Tanzania; a case control study. *BMC Infect Dis*. 2014;14(1):666.
98. Schaechter M, Medoff G, Eisenstein BI. *Microbiologie et pathologie infectieuse*. 2^e éd. Paris: De Boeck Université; 1999.
99. Flahault A, Hanslik T. Epidemiology of viral gastroenteritis in France and Europe. *Bull Académie Natl Médecine*. 2010;194(8):1415-24.

100. Patel MM, Widdowson M-A, Glass RI, Akazawa K, Vinjé J, Parashar UD. Systematic literature review of role of noroviruses in sporadic gastroenteritis. *Emerg Infect Dis.* 2008;14(8):1224-31.
101. Menon VK, George S, Aladin F, Nawaz S, Sarkar R, Lopman B, et al. Comparison of age-stratified seroprevalence of antibodies against norovirus GII in India and the United Kingdom. *PloS One.* 2013;8(2):e56239.
102. PATH. Programme National de Vaccination 2015. <http://sites.path.org/rotavirusvaccine/ressources-en-francais/> (consulté le 11.02.2015)
103. Ogilvie I, Khoury H, Goetghebeur MM, El Khoury AC, Giaquinto C. Burden of community-acquired and nosocomial rotavirus gastroenteritis in the pediatric population of Western Europe: a scoping review. *BMC Infect Dis.* 2012;12:62.
104. Boon D, Mahar JE, Abente EJ, Kirkwood CD, Purcell RH, Kapikian AZ, et al. Comparative Evolution of GII.3 and GII.4 Norovirus over a 31-Year Period. *J Virol.* 2011;85(17):8656-66.
105. Hassine-Zaafraane M, Sdiri-Loulizi K, Kaplon J, Salem IB, Pothier P, Aouni M, et al. Prevalence and genetic diversity of norovirus infection in Tunisian children (2007-2010). *J Med Virol.* 2013;85(6):1100-10.
106. Ruvoën-Clouet N, Belliot G, Pendu JL. Genetic susceptibility to norovirus infection and herd innate protection. *Virologie.* 2013;17(4):264-77.
107. Lopman B, Reacher M, van Duynhoven Y, Hanon F-X, Brown D, Koopmans M. Viral gastroenteritis outbreaks in Europe, 1995–2000. *Emerg Infect Dis.* 2003;9(1):90.
108. Fankhauser RL, Monroe SS, Noel JS, Humphrey CD, Bresee JS, Parashar UD, et al. Epidemiologic and molecular trends of « Norwalk-like viruses » associated with outbreaks of gastroenteritis in the United States. *J Infect Dis.* 2002;186(1):1-7.
109. Hamano M, Kuzuya M, Fujii R, Ogura H, Yamada M. Epidemiology of acute gastroenteritis outbreaks caused by Noroviruses in Okayama, Japan. *J Med Virol.* 2005;77(2):282-9.
110. Blacklow NR, Greenberg HB. Viral gastroenteritis. *N Engl J Med.* 1991;325(4):252-64.
111. Eden J-S, Tanaka MM, Boni MF, Rawlinson WD, White PA. Recombination within the pandemic norovirus GII.4 lineage. *J Virol.* 2013;87(11):6270-82.
112. Centers for Disease Control and Prevention. Emergence of new norovirus strain GII.4 Sydney--United States, 2012. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2013;62(3):55.
113. Lopman B, Vennema H, Kohli E, Pothier P, Sanchez A, Negredo A, et al. Increase in viral gastroenteritis outbreaks in Europe and epidemic spread of new norovirus variant. *The Lancet.* 2004;363(9410):682-8.
114. Lindesmith LC, Donaldson EF, Baric RS. Norovirus GII.4 Strain Antigenic Variation. *J Virol.* 2011;85(1):231-42.

115. Maritschnik S, Kanitz EE, Simons E, Hohne M, Neumann H, Allerberger F, et al. A Food Handler-Associated, Foodborne Norovirus GII.4 Sydney 2012-Outbreak Following a Wedding Dinner, Austria, October 2012. *Food Environ Virol.* 2013;5(4):220-5.
116. van Beek J, Ambert-Balay K, Botteldoorn N, Eden JS, Fonager J, Hewitt J, et al. Indications for worldwide increased norovirus activity associated with emergence of a new variant of genotype II.4, late 2012. *Euro Surveill.* 2013;18(1):8-9.
117. van Beek J, Kroneman A, Vennema H, Koopmans M. Norovirus Molecular Platform Noronet report, April 2013. National Institute for Public Health and the Environment Netherlands.
http://www.rivm.nl/dsresource?objectid=rivmp:204484&type=org&disposition=inline&ns_nc=1 (consulté le 22.01.2015).
118. Lu Q-B, Huang D-D, Zhao J, Wang H-Y, Zhang X-A, Xu H-M, et al. An increasing prevalence of recombinant GII norovirus in pediatric patients with diarrhea during 2010–2013 in China. *Infect Genet Evol.* 2015; 31:48-52.
119. Arana A, Cilla G, Montes M, Gomariz M, Pérez-Trallero E. Genotypes, Recombinant Forms, and Variants of Norovirus GII.4 in Gipuzkoa (Basque Country, Spain), 2009–2012. *PLoS ONE.* 2014; 9(6): e98875014.
120. Mans J, Murray TY, Taylor MB. Novel norovirus recombinants detected in South Africa. *Virol J.* 2014;11(1):168.
121. Réseau Sentinelles. Tableaux de données taux d'incidence diarrhée aiguë 1995-2014.
<https://websenti.u707.jussieu.fr/sentiweb/?page=table> (consulté le 12.03.2015).
122. Vega E, Barclay L, Gregoricus N, Shirley SH, Lee D, Vinjé J. Genotypic and epidemiologic trends of norovirus outbreaks in the United States, 2009 to 2013. *J Clin Microbiol.* 2014;52(1):147-55.
123. Logan C, O'Leary JJ, O'Sullivan N. Real-Time Reverse Transcription-PCR for Detection of Rotavirus and Adenovirus as Causative Agents of Acute Viral Gastroenteritis in Children. *J Clin Microbiol.* 2006;44(9):3189-95.
124. Tate JE, Mijatovic-Rustempasic S, Tam KI, Lyde FC, Payne DC, Szilagyi P, et al. Comparison of 2 Assays for Diagnosing Rotavirus and Evaluating Vaccine Effectiveness in Children with Gastroenteritis. *Emerg Infect Dis.* 2013;19(8):1245-52.
125. Pang X, Honma S, Nakata S, Vesikari T. Human Caliciviruses in Acute Gastroenteritis of Young Children in the Community. *J Infect Dis.* 2000;181(s2):S288-94.
126. Wolffs PFG, Bruggeman CA, van Well GTJ, van Loo IHM. Replacing Traditional Diagnostics of Fecal Viral Pathogens by a Comprehensive Panel of Real-Time PCRs. *J Clin Microbiol.* 2011;49(5):1926-31.
127. Bennett A, Bar-Zeev N, Jere KC, Tate JE, Parashar U, Nakagomi O, et al. Determination of a viral load threshold to distinguish symptomatic versus asymptomatic rotavirus infection in a high disease burden African population. *J Clin Microbiol.* 2015; 53(6):1951-4.

128. Phillips G, Lopman B, Tam CC, Iturriza-Gomara M, Brown D, Gray J. Diagnosing rotavirus A associated IID: Using ELISA to identify a cut-off for real time RT-PCR. *J Clin Virol.* 2009;44(3):242-5.
129. Wallace AJ, Wu CL, Elles RG. Meta-PCR: a novel method for creating chimeric DNA molecules and increasing the productivity of mutation scanning techniques. *Genet Test.* 1999;3(2):173-83.

L'ISPB - Faculté de Pharmacie de Lyon et l'Université Claude Bernard Lyon 1 n'entendent donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses ; ces opinions sont considérées comme propres à leurs auteurs.

L'ISPB - Faculté de Pharmacie de Lyon est engagé dans une démarche de lutte contre le plagiat. De ce fait, une sensibilisation des étudiants et encadrants des thèses a été réalisée avec notamment l'incitation à l'utilisation d'une méthode de recherche de similitudes.