

UNIVERSITE DE NANTES
FACULTE DE MEDECINE

**Spécificité glycanique des souches de norovirus (NoVs)
humaines et animales:
Apport pour l'évaluation du risque de transmission inter-
espèce**

**THESE DE DOCTORAT
Ecole doctorale biologie santé
Discipline Sciences de la Vie et de la Santé
Spécialités Glycobiologie et Virologie**

*présentée
et soutenue publiquement par*

ZAKHOUR Maha

le 14 Décembre 2009, devant le jury ci-dessous

Président

Mme Berthe Marie Imbert, Professeur des Universités, Université de Nantes

Rapporteurs

M. Pierre Pothier, Professeur des Universités, Université de Bourgogne, Dijon

M. Francis Roubinet, Médecin, EFS centre-Atlantique, Tours

Examineur

M. Etienne Thiry, Professeur des Universités, Université de Liège

Co-directeur de thèse

Mme Nathalie Ruvoën-Clouet, Maître de conférences, ENVN, Nantes

Directeur de thèse

M. Jacques Le Pendu, Directeur de recherche, INSERM UMR-S892, Nantes

Sommaire

I- Les Norovirus	1
I.1 Classification	1
I.2 Diversité génétique des norovirus	3
I.2.1 Génogroupes et clusters	3
I.2.2 Causes de la variabilité des NoVs	4
I.3 Structure des particules virales	6
I.3.1 Organisation génomique	6
I.3.2 Capside virale	7
I.3.2 Propriétés physiques	9
I.4 Cycle de Multiplication	10
I.4.1 Les Calicivirus	10
I.4.2 Les norovirus	12
I.5 Pathogénie, signes cliniques et lésions	13
I.5.1 Chez l'Homme	13
I.5.2 Chez les bovins	14
I.5.3 Chez les porcins	14
I.5.4 Chez les autres espèces	15
I.6 Immunité	16
I.6.1. Chez l'Homme	16
I.6.2 Chez les animaux	17
I.7 Épidémiologie	17
I.7.1 Chez l'Homme	17
I.7.2 Porteurs asymptomatiques	22
I.7.3 Chez les bovins	23
I.7.4 Chez les porcins	23
II-Les antigènes de groupes sanguins ABH	25
II.1 Les antigènes tissulaires de groupe sanguin ABO(H), Lewis et apparentés	26
II.2 Les précurseurs	27
II.3 Biosynthèse des antigènes A, B et H	28
II.3.1 Les antigènes H	29
II.3.2 Les antigènes A et B	30
II.3.3 Les antigènes Lewis	30
II.3.4 Les antigènes sialylés	31
II.3.5 Les antigènes proches structurellement des antigènes ABH et Lewis	31
II.4 Les gènes des glycosyltransférases et leur polymorphisme	33
II.4.1 Les gènes FUT1 (H/h), FUT2 (Se/se) et SEC1 (famille GT11).	34
II.4.2 Le gène ABO des glycosyltransférases A et B (Famille GT6)	37
II.4.3 Les autres gènes de la famille ABO (GT6)	42
II.4.4 Nouveaux membres de la famille GT6 (GT6m5, m6, m7 et m8)	45
II.4.4 Les gènes des α 1,3/ α 1,4fucosyltransférases (Famille GT10)	46
II.4.5 Les gènes des sialyltransférases	49
II.5 Distribution tissulaire des antigènes ABH, Lewis et apparentés	50
II.5.1 Distribution tissulaire chez l'Homme	51

II.5.2 Distribution tissulaire dans les autres espèces animales	52
III-Interaction Norovirus-HBGAs	57
III.1 Caractérisation du ligand des norovirus sur les tissus humains	59
III.1.1 Étude de la souche Norwalk	59
III.1.2 Études d'autres souches de norovirus	60
III.2 Propriétés structurales de l'interaction norovirus-HBGAs	62
III.2.1 Modèle d'interaction norovirus-HBGAs.....	62
III.2.2 P2 domaine de fixation des norovirus	64
III.2.3 Analyse structurale de la reconnaissance HBGA-GI.1 et HBGA-GII.4	64
III.3 Importance des HBGAs pour l'infection.....	66
III.4 Etudes de la fixation des norovirus sur les tissus bovins, porcins et huîtres	68
III.4.1 Etude de la fixation des souches GI.1 et GII.4 sur les tissus de porcs.....	68
III.4.2 Étude de la fixation des souches GI.1 et GII.4 sur les tissus bovins.....	69
III.4.3 Relations entre l'Homme et les souches bovines et porcines	69
III.4.4 Fixation des norovirus dans l'huître.....	70
Objectifs et Contexte du travail	72
IV. Publications.....	73
IV.1 Caractérisation du ligand de la souche bovine GIII.2 NB2	73
IV.2 Caractérisation du ligand de la souche bovine GIII.2 BEC CH131	75
IV.3 Ligands des souches GI.1, GII.4 et GIII.2 sur les tissus d'huître	77
V. Résultats complémentaires	79
V.1 Matériels et méthodes	79
V.2 Etude de l'expression des HBGAs sur les tissus digestifs de bovin et de leur reconnaissance par les norovirus humains (GI.1 et GII.4)	82
V.2.1 Résultats	82
V.2.2 Conclusion et Discussion	84
V.3.1 Expression des HBGAs et fixation des VLPs GI.1 et GII.4.....	84
V.3.2 Caractérisation du ligand de la souche porcine GII.11 : données préliminaires.....	88
V.4 Comparaison des antigènes et de la fixation des différentes souches de NoVs chez l'Homme, le porc, la vache et l'huître	90
VI. Discussions et perspectives	93
VI.1 La coévolution entre l'hôte et le norovirus	93
VI.2 Le risque zoonotique et le mélange génétique.....	94
VI.3 Différence d'évolution de GI.1 et GII.4	96
VI.4 Les norovirus reconnaissent-ils d'autres récepteurs?	97

Liste des figures

Figure 1 : Arbre phylogénétique des norovirus et représentation des différents génogroupes	4
Figure 2 : Organisation du génome de norovirus (souche NV)	7
Figure 3 : Photographie en microscopie électronique de VLPs du virus Norwalk	8
Figure 4 : Structure d'une pseudoparticule virale du virus Norwalk	9
Figure 5 : Schéma de réplication des virus ARN simple brin positif produisant un ou plusieurs ARNm subgénomiques	11
Figure 6 : Voies de contamination de l'environnement par les NoVs et sources primaires d'infection chez l'Homme	21
Figure 7 : Schéma épidémiologique.....	22
Figure 8 : Les antigènes ABO sur les érythrocytes et leurs anticorps correspondants.....	26
Figure 9 : Biosynthèse des antigènes ABH et Lewis	29
Figure 10 : Biosynthèse de l'antigène Sialyl-Le ^x	31
Figure 11 : Biosynthèse du xénoantigène α 3Gal.....	31
Figure 12 : Biosynthèse de l'antigène Forssman.....	33
Figure 13 : Organisation des gènes des α 1,2fucosyltransférases dans le génome humain	35
Figure 14 : Représentation schématique du locus ABO, de l'ADN complémentaire des allèles A, B et O, ainsi que de leur produit de traduction respectif	38
Figure 15 : Diagramme représentant l'ADNc des principaux allèles du gène ABO.....	40
Figure 16 : Schématisation des gènes humains de l' α 1,3galactosyltransférase (GGTA1)	43
Figure 17 : Distribution tissulaire des antigènes de groupe sanguin chez différentes espèces de vertébrés.	54
Figure 18 : Modèle d'interface de fixation des différentes souches de norovirus	63
Figure 19 : Représentation schématique des huit profils de fixation observés chez les NoVs.....	63
Figure 20 : Les structures cristallographiques d'interaction norovirus- HBGAs: Norwalk virus (GI.1) et VA387 (GII.4).....	65
Figure 21 : Evolution de la souche GII.4 depuis l'année 1987 jusqu'à 2006.....	67
Figure 22 : Caractérisation du ligand de la souche Norwalk sur les tissus d'huîtres.....	70
Figure 23 : Analyse de la fixation des VLPs GII.4 et GI.1 sur les tissus bovins.....	83
Figure 24 : Phénotypage des salives bovines et test de fixation des souches humaines GI.1 et GII.4.	83
Figure 25 : Analyse de la fixation des VLPs GI.1 et GII.4 sur les tissus porcins.....	86
Figure 26 : Analyse de la fixation des VLPs GII.11 porcines sur les tissus porcins et bovins par immunohistologie.	89
Figure 27 : Analyse de la fixation des VLPs GII.11 porcines sur les tissus d'huîtres par immunohistologie.	90
Figure 28 : Schéma de transmission inter-espèce des souches de NoVs.....	96

Liste des tableaux

Tableau I : Famille des Caliciviridae	2
Tableau II : Représentation des souches recombinantes de NoVs	5
Tableau III : Organisation génomique des NoVs animaux et humains	7
Tableau IV : Nombre d'épidémies de gastroentérite virales en Europe et importance des gastroentérites à NoV en Europe.....	18
Tableau V : Évolution des principales souches circulant dans le monde	19
Tableau VI : Structure de différentes chaînes précurseurs et localisation	27
Tableau VII : Caractéristiques des gènes et enzymes de la famille Lewis (GT10)	48
Tableau VIII : Les différentes ST3Gal	50
Tableau IX : Distribution tissulaire des antigènes A, H, α Gal et NeuAc	53
Tableau X : Détection des épitopes oligosaccharides dans les tissus bovins	56
Tableau XI : Exemples de glycanes servant de récepteurs ou co-récepteurs viraux.....	58
Tableau XII : Profils de fixation des souches de norovirus en fonction du phénotype ABO et Se.....	61
Tableau XIII : Tableau des anticorps utilisés	80
Tableau XIV : Tableau des lectines utilisées	80
Tableau XV : Expression des antigènes A et H chez des porcs A- et A+ tout au long du tube digestif.....	85
Tableau XVI : Expression des HBGAs sur le duodénum des porcs génotypés FUT1	86
Tableau XVII : Fixation des souches GI.1 et GII.4 sur le tube digestif de deux porcs génétiquement différents.....	86
Tableau XVIII : Fixation des souches GI.1 et GII.4 sur le tube digestif de porcs génotypés FUT1	87
Tableau XIX : Comparaison des antigènes exprimés chez l'Homme, le porc et le bovin au niveau de la jonction gastroduodénale	91
Tableau XX : Comparaison de la fixation des souches GI.1, GII.4, GII.2 et GII.11 chez les différentes espèces.....	92

Liste des abréviations

A.A : acide aminé
ARN : Acide Ribonucléique
CIVD : Coagulation IntraVasculaire Disséminée
EBHS : European Brown Hare Syndrom Virus
FCV : Feline Calicivirus
Fuc : Fucose
Gal : Galactose
GalNAc : N-acétylgalactosamine
GGTA1 : Glycoprotein Alpha-GalactosylTransférase 1
Glc : Glucose
GlcNAc : N-acétylglucosamine
Gly: Glycine
GnT : Glucosaminyltransférase
HBGA : Antigène(s) tissulaire(s) de groupe sanguin
His : Histidine
HIV : Virus d'immunodéficience humaine
HuNoV: Human Norovirus
INF γ : Interféron γ
IL : Interleukine
JV : Jena
MNV: Murine Norovirus
NB2 : Newbury
NeuAc : Acide N-acétylneuraminique
NoV : Norovirus
NV : Virus Norwalk
NTPase : Nucleotide Tri Phosphatase
ORF : Open Reading Form
PBMC : Peripheral blood mononuclear cell
Pol : Polymerase
RHDV: Rabbit Hemorrhagic disease virus
RdRp: RNA Dependent RNA Polymerase
RT-PCR: Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction
SaV : Sapovirus
SMSV: San Miguel Sea Lion Virus
UEA-I : Agglutinine I d'*Ulex europaeus*
VESV: Vesicular Exanthema of Swine
VLP: Virus Like Particle
Vpg : Viral protein linked to genome
VP : Viral protein

Avant propos

D'origine bactérienne, virale, ou parasitaire, les gastroentérites aiguës se caractérisent cliniquement par des diarrhées, des vomissements, des douleurs abdominales, des courbatures, des céphalées et de l'asthénie. Les épidémies de gastroentérite constituent en fréquence la deuxième cause de morbidité après les infections respiratoires, entraînant annuellement plus de trois millions de consultations médicales en France et constituent un problème de santé mondial [1].

Les bactéries mises en cause dans la survenue des gastroentérites sont les colibacilles [2][3] et les salmonelles [4], mais au total, les infections bactériennes ne représentent que 10% des gastroentérites hivernales. En effet les agents responsables des gastroentérites sont les virus de la famille des rotavirus [5][6], des adénovirus [7][8][9] et des norovirus [10][11]. Dans les pays développés, ils sont à l'origine de 80% des épidémies gastroentériques [12].

Les rotavirus et les adénovirus infectent préférentiellement les jeunes enfants de moins de cinq ans, les norovirus, classés en tant que pathogène B dans le cas de bioterrorisme infectent la population indépendamment de l'âge [13][14], notamment au cours du pic hivernal de gastroentérites aiguës [15]. Les autres causes sont plus rares : parasites (amibes), intoxications, champignons, certains poissons, certains médicaments.

La première souche de norovirus a été identifiée à Norwalk en 1968 (Ohio, Etats Unis) par la technique d'immunomicroscopie électronique sous forme des petites particules dans des selles fécales provenant d'un groupe d'élèves d'une école primaire affectés par une gastroentérite, d'où le nom de cette première souche le «Norwalk» virus puis le nom générique norovirus [16].

Les norovirus sont reconnus pour être l'agent majeur responsable des gastroentérites épidémiques dans les collectivités (restaurant, maison de retraite, école,...) à cause de leur facilité de transmission par contact d'une personne à une autre. Stables dans l'environnement et résistants à la chaleur et aux variations de pH, ils se trouvent facilement dans l'eau, les huîtres, les légumes, les fruits et les viandes.

Depuis l'essor au cours des années 90 des techniques de biologie moléculaire, il est apparu qu'une large proportion des gastroentérites est associée aux norovirus [17]. On estime

aujourd'hui qu'ils sont responsables d'environ 50% des gastroentérites dans le monde [18]. La capacité d'évolution rapide des norovirus, leur rapidité de transmission, leur stabilité dans l'environnement, l'immunité de courte durée qu'ils induisent et l'absence d'un vaccin contribuent à leur impact médical et économique élevé au niveau mondial. Aux Etats-Unis, il a été estimé que les norovirus sont responsables d'environ 23 million d'infections, 50 000 cas d'hospitalisations et 300 morts par an [19]. Une étude récente indique qu'ils seraient responsables de 1,1 million d'hospitalisations et 218 000 décès par an chez les enfants de moins de 5 ans dans les pays en voie de développement [20].

Suite à l'identification en 2000 par Nathalie Ruvoen-Clouet d'un ligand tissulaire du RHDV [21], un autre Calicivirus membre du genre lagovirus spécifique du lapin, la caractérisation des ligands des norovirus humains a pu être réalisée. Le ligand du RHDV est un glycanne de la famille des antigènes tissulaires de groupe sanguin. L'application des mêmes principes et méthodes a conduit notre équipe à démontrer en 2002 que la souche Norwalk virus (GI.1) se fixe sur des antigènes de même nature présents à la surface des cellules épithéliales digestives de l'Homme. En 2006, Soizick Le Guyader a mis en évidence la fixation spécifique de cette même souche sur les glycanes de type A-like exprimés au niveau du tissu digestif de l'huître [22].

D'autre part, grâce au développement des techniques de RT-PCR, des norovirus porcins et bovins présentant des séquences génomiques voisines de celles de norovirus humains ont été récemment identifiées. Ceci suggère que ces animaux pourraient constituer un réservoir pour l'Homme, d'autant que des glycanes structurellement voisins sont présents à la surface de certaines de leurs cellules épithéliales.

L'ensemble de ces observations a conduit à émettre l'hypothèse que les huîtres pourraient sélectionner des souches de norovirus d'origine animale capables de reconnaître des ligands partagés entre l'Homme, le porc ou la vache et l'huître et ainsi faciliter le passage de la barrière d'espèce.

Au cours de ma thèse, je me suis particulièrement intéressée à étudier par immunohistochimie l'expression des HBGAs sur les cellules épithéliales des tissus animaux (bovins et porcs) grâce à un panel d'anticorps monoclonaux, et de lectines pour pouvoir caractériser précisément le(s) ligand(s) tissulaire(s) de souches animales bovines et porcines.

Afin de s'affranchir de la production de VLPs dans des « systèmes baculovirus », méthode

lourde et fastidieuse, j'ai produit dans un système bactérien, suivant la méthode de Tan, des dimères de la région P2 impliquée dans la fixation des Norovirus de deux souches humaines (Norwalk, GI.1 et Dijon GII-4) [23][24]. Ces dimères m'ont permis d'étudier la fixation de ces souches humaines sur les tissus animaux (bovins et porcins).

En résumé, ce manuscrit a pour ambition de présenter les norovirus humains, bovins et porcins chez les mammifères (porcs et vaches), chez l'Homme et dans l'environnement (huître) et de répondre en partie à l'hypothèse du risque zoonotique en caractérisant le ligand des norovirus bovins et en dressant un tableau des reconnaissances des antigènes tissulaires de groupe sanguin de l'Homme, du porc et de la vache par des souches représentatives des principaux norovirus humains et animaux.

Les articles sont présents dans la thèse papier

I- Les Norovirus

Les norovirus appartiennent à la famille des *Caliciviridae* qui doivent leur nom aux dépressions en forme de calices observées en microscopie électronique à la surface des virions. Les Calicivirus sont de petits virus, non enveloppés, de 27 à 35 nm de diamètre possédant un ARN monocaténaire de polarité positive [25]. Ils ont un large spectre d'hôtes et provoquent chez leurs hôtes soit des infections digestives (Homme, bovin, porc, chien), soit des lésions vésiculeuses associées à des problèmes respiratoires et systémiques (FCV, Feline calicivirus) ou de reproduction (VESV : Vesicular exanthema of swine, SMSV : San Miguel Sea Lion Virus), soit une maladie hémorragique (RHDV rabbit hemorrhagic disease, EBHS European brown hare syndrom).

I.1 Classification

En 2000 sur la base de critères génétiques, le Comité International de Taxonomie des virus (ICTV) a proposé de diviser la famille des *Caliciviridae* en quatre genres [25] : les vésivirus, les lagovirus, les norovirus (anciennement Norwalk-like virus) et les sapovirus (anciennement saporo-like virus). Dernièrement, d'autres virus ayant des caractéristiques morphologiques et physicochimiques proches de celles des Calicivirus ont été identifiés et trois nouveaux genres ont été récemment proposés, les nabovirus ou becovirus [26], les recovirus [27] et les valovirus [28] (Tableau I).

Tableau I : Famille des Caliciviridae

La famille des Caliciviridae comprend 7 genres. Chaque genre présente un ou plusieurs prototypes. Les norovirus et les sapovirus sont les seuls à infecter l'Homme. Les autres sont plutôt des virus animaux.

Genre	Nom (virus prototype)	Hôtes principaux	Pathologie	Références
Vésivirus	VESV (Vesicular exanthema of swine virus)	Porc	Exanthème vésiculeux	[29][30]
	FCV (Feline calicivirus)	Chat	Stomatites aiguës et pneumonies	[31]
	SMSV (San Miguel sea Lion Virus)	Pinnipèdes	Exanthème vésiculeux	[32]
	BCV (Bovine calicivirus)	Bovins	Pathologie respiratoire	[29]
Lagovirus	RHDV (rabbit haemorrhagic disease virus)	Lapin		[33]
	EBHSV (European Brown Hare syndrom Virus)	Lièvre	Hépatite aiguë avec CIVD	[34]
Sapovirus	Sapporo virus (5 génogroupes)	Homme, porc	Gastroentérite	[35]
Norovirus	Norwalk virus (5 génogroupes)	Homme, porc, bovin, souris, chien	Gastroentérite	[16]
* Becovirus /Nabovirus	Newburry agent1 virus Nebraska virus	Bovin	-	[26]
* Recovirus	Tulane virus	Singe rhésus	-	[27]
* Valovirus	St Valérien virus	Porc	-	[28]

* En cours de classification, - Inconnu

Les Calicivirus sont des virus qui infectent l'Homme et de nombreuses espèces animales et provoquent chez leurs hôtes une symptomatologie variée. Les vésivirus ont un épithéliotropisme net provoquant des lésions vésiculeuses associées à des problèmes respiratoires et systémiques (FCV) ou à des problèmes de reproduction (VESV, SMSV). Les lagovirus (RHDV, EBHS) provoquent une hépatite fulminante avec un syndrome de coagulation intravasculaire disséminée [36]. Les norovirus et sapovirus regroupent des virus responsables de gastroentérites chez les espèces infectées (Homme, bovin, porc, chien).

Depuis la découverte du virus Norwalk lors d'une épidémie de gastroentérite dans une école élémentaire d'Ohio aux Etats Unis, l'étude des Calicivirus, mis à part le FCV, a été limitée par l'absence de système de culture cellulaire permissif et de modèles animaux. Depuis les années 1990, l'essor des techniques de biologie moléculaire et notamment la possibilité de produire des pseudoparticules virales (VLPs) a permis d'enrichir nos connaissances sur ces virus qui ont été identifiés dans différentes espèces animales et qui présentent une grande diversité [37].

I.2 Diversité génétique des norovirus

I.2.1 Génogroupes et clusters

Le séquençage complet des protéines de capsid de souches de NoVs issues de selles de patients ou isolées de fèces d'autres espèces et l'étude phylogénétique de ces séquences peptidiques ont permis de subdiviser les NoVs en 5 génogroupes (GI à GV) [38]. Les NoVs humains se retrouvent dans les génogroupes GI, GII et GIV [39][25][40], les NoVs bovins dans le génogroupe GIII [41][26][42], les NoVs porcins dans le génogroupe GII [43], les NoVs murins dans le génogroupe GV [44][45] et les NoVs félins et canins dans le génogroupe IV [46]. Plus récemment, deux nouveaux génogroupes ont été proposés par certains auteurs, le génogroupe GVI correspondant à la souche J23/99/US et le génogroupe GVII correspondant à la souche Chiba, toutes les deux identifiées chez l'Homme [47].

D'un point de vue génomique, les NoVs présentent aussi une très grande variabilité. En effet, la comparaison des séquences de la polymérase et de la capsid d'un grand nombre de souches issues de selles de patients ou de fèces d'autres espèces a permis de distinguer 31 clusters répartis respectivement au sein des GI, GII, GIII, GIV et GV, en 8, 19, 2, 1, et 1 clusters (Figure 1). Cette distribution se base sur la variabilité de la séquence codant pour la protéine de capsid. Ainsi, entre les souches d'un même cluster cette variabilité est comprise entre 0 et 14,1%, entre les clusters d'un même génogroupe elle est comprise entre 14,3 et 43,8% et entre les différents génogroupes elle s'étend de 44,9 à 61,4% [38]. Sur ces bases d'analyses phylogénétiques, les NoVs porcins ont été classés dans 3 clusters du génogroupe GII; le GII.11 le plus proche des NoVs humains, le GII.18 et le GII.19 [48][49]. Les NoVs bovins, souche Jena et souche Newbury2 correspondent respectivement aux clusters GIII.1 et GIII.2.

lors de la transcription. Quelques exemples de recombinaison sont présentés dans le Tableau II [55]. La recombinaison joue un rôle très important dans l'évolution des virus à ARN car elle permet des modifications du génome viral par échange de séquences, générant des variations génétiques et l'émergence de nouvelles souches virales [56].

Tableau II : Représentation des souches recombinantes de NoVs

Cette recombinaison génère des variations génétiques et contribue à l'émergence de nouvelles souches et ainsi à l'évolution des norovirus. (D'après Bull 2007) [54]

Génogroupe des norovirus	Génotype	Souche	Polymérase du génotype	Capside du génotype	Références
I	1	WUG1/01/JP	GI.2	GI.6	[57]
II	1	Picton/03/AU	GII.b	GII.1	[55]
	2	Snow Mountain2/76/US	GII.c	GII.2	[58]
	3	E3/97/Crète	GII.4	GII.2	[55]
	4	Pont de Roide 673/04/Fr	GII.b	GII.2	[59]
	5	SydenyC14/02/AU	GII.b	GII.3	[60]
	6	Sydeny2212/98/AU	GII.a	GII.3	[51]
	7	SaitamaT66e/02/JP	GII.d	GII.3	[47]
	8	Chiba1/04/JP	GII.4	GII.3	[61]
	9	771/05/IRL	GII.4/GII.d	GII.4	[62]
	10	Nyiregyhaza/1057/02/HUN	GII.b	GII.4	[63]
	11	S63/99/Fr	GII.2	GII.5	[55]
	12	Hokkaido133/03/JP	GII.d	GII.5	[47]
	13	Kunming/04/Ch	GII.6	GII.7	[64]
	14	Mc37/01/Th	GII.4	GII.10	[55]
	15	SaitamaU1/02/JP	GII.4	GII.1012	[57]
	16	Minato14/99/JP	GII.4	GII.15	[65]
	17	VannesL23/99/US	GII.5	GII.15	[55]
GIII	1	B-1SVD/03/US	GIII.2	GIII.1	[54]
	2	CV521-OH/02/US	GIII.1	GIII.2	[53]

I.3 Structure des particules virales

Les norovirus sont des virus sphériques de petite taille, environ 30 nm, non enveloppés. Ils sont constitués d'un génome ARN simple brin positif et d'une capside de symétrie icosaédrique.

I.3.1 Organisation génomique

Les NoVs sont constitués d'un ARN monocaténaire de polarité positive d'environ 7700 nucléotides, en excluant la queue polyA en 3'. Cet ARN est lié par covalence à une protéine VPg (Viral protein linked to genome) qui fournit une coiffe à la partie 5'. Cette protéine joue un rôle dans le transport de l'ARN aux sites de synthèse [66].

Le génome est organisé en 3 cadres de lecture (ORF1, ORF2 et ORF3) (Figure 2). L'ORF1 (5 kb) code pour une polyprotéine d'environ 200 kDa clivée par la protéase « 3C like » virale pour donner les protéines non structurales [67] à savoir : la protéine N terminale P48, la « 2C like protéine » ou nucléoside triphosphatase (NTPase), la protéine P22 (ou P20), la VPg, et le complexe de réplication (RdRp) associant la 3C like protease (3CLPro) et l'ARN polymérase ARN dépendante (Pol) [68][69]. L'ORF2 (1.8 kb) code pour la protéine majeure de la capside virale, la VP1 (viral protein) de 57 kDa constitué de 550 acides aminés. L'ORF3 (0.6kb) situé à l'extrémité 3' code pour une petite protéine de 22 kDa dont la fonction reste inconnue (Figure 2). La nature de cette protéine suggère qu'elle pourrait être impliquée dans des interactions protéine-protéine ou dans la reconnaissance et l'encapsidation de l'ARN viral qui peut servir à l'assemblage du génome en virions [70][37].

Il faut noter pour les génogroupes GI et GII l'existence d'une région génomique hautement conservée incluant une région consensus de 18 nucléotides qui s'étend de la région C terminale de la polymérase à la partie N terminale de la région codant pour la protéine de capside. Cette séquence serait un signal d'emballage pour le génome des NoVs ou un site d'initiation de la transcription [71] ou un point privilégié de recombinaison [57][55].

Norovirus (NV)

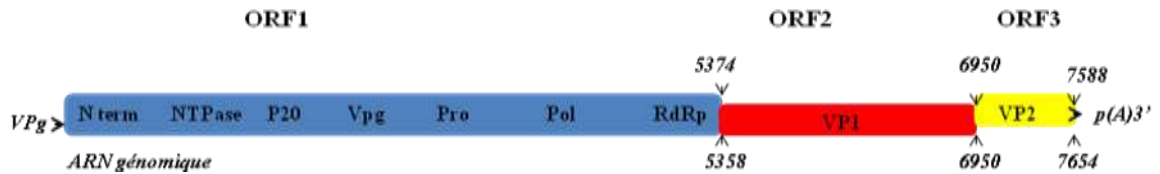


Figure 2 : Organisation du génome de norovirus (souche NV)

Nterm = N terminal, *NTPase* = nucléoside triphosphatase 2C-like; *P20* ou *P22* dépendant du génogroupe *Vpg*=protéine du virus lié au génome *Pro* = Protéinase 3C-like; *Pol*= polymérase, *RdRp* = ARN polymérase ARN dépendante; *VP1* = *VP60* = capside = protéine structurale majeure ; *VP2* = *VP10* = protéine structurale mineure.

L'organisation génomique des norovirus humains et animaux est similaire (Tableau III).

Tableau III : Organisation génomique des NoVs animaux et humains

D'après Scipioni et al 2008 [72]

Souches	Génogroupe	N°accès Genbank	Longueur du génome	Position nucléotidique		
				ORF1	ORF2	ORF3
Hu / Norwalk	I	M87661	7654	5-5374	5358-6950	6950-7588
Hu / Hawaï	II	U07611	7513	5-5104	5085-6692	6692-7471
Bo / Jena	III	AJ011099	7338	22-5064	5051-6610	6600-7271
Bo / Newbury2	III	AF097917	7311	22-5076	5063-6631	6423-7271
Mu / MNV-1	V	NC-08311	7382	6-5069	5056-6681	6682-7307

I.3.2 Capside virale

I.3.2.1 Production des pseudoparticules (virus like particles VLPs)

Jusque dans les années 1990, l'étude des NoVs a été limitée par l'impossibilité de cultiver ces virus *in vitro* et par l'absence de modèles animaux. Les outils de la biologie moléculaire et notamment la possibilité de produire à partir de baculovirus des particules virales recombinantes (VLPs) en grande quantité et morphologiquement identiques aux virus natifs ont permis d'enrichir nos connaissances (Figure 3).

En effet, la protéine VP1 exprimée en système baculovirus s'autoassemble spontanément pour former des pseudoparticules virales (virus-like particles, VLPs) structurellement, morphologiquement et antigéniquement semblables aux NoVs d'origine [37][73][74][75]. Ces VLPs constituent un outil précieux pour étudier les propriétés structurales et biologiques de ces virus et la possibilité de les produire en très grande quantité a été principalement exploitée dans le secteur du diagnostic, dans les études de l'immunité vis à vis des NoVs et aussi dans les études d'interactions de ces virus avec les cellules de leurs hôtes.

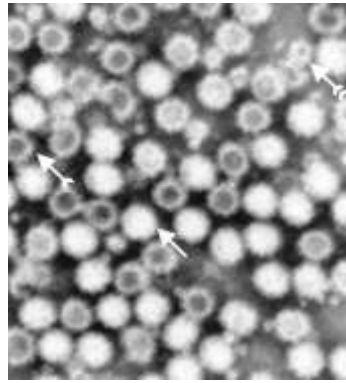


Figure 3 : Photographie en microscopie électronique de VLPs du virus Norwalk

Les VLPs entiers sont en blancs indiqués par une flèche. Les VLPs dégradés sont en noirs indiqués par une flèche avec un arc, et les particules de 20-22 nm sont indiquées par un autre modèle de flèche. (D'après Belliot 2001)[76]

I.3.2.2 La capside virale et la protéine majeure (VP1)

La capside des NoVs est composée de 180 sous unités de la protéine majeure VP1 (58 kDa). Sa structure a été étudiée par Prasad et ses associés en 1999 à partir des VLPs de virus Norwalk (NV) [77]. Il a été mis en évidence en cryo-microscopie électronique et par cristallographie aux rayons X que la capside virale du virus NV est formée de 90 dimères de la protéine VP1 et qu'elle présente une symétrie icosaédrique ($T=3$) (Figure 4). La protéine VP1 s'organise en 3 domaines, un domaine relativement bien conservé, le bras N-terminal, un domaine S (Shell) et un domaine P (Protruding) exposé à la surface de la capside. Chez le NV, le domaine S est localisé à l'extrémité N-terminale et s'étend sur 225 a.a. (1-217 a.a.). Ce domaine S est impliqué dans la formation en icosaèdre de la capside et forme la coque qui est reliée par une charnière peptidique flexible au domaine P. Il participe aussi aux interactions intermoléculaires entre les dimères, trimères et pentamères. Le domaine P qui s'étend de la position 225 à l'extrémité C-terminale forme la partie protubérante de la capside et participe aussi à la dimérisation de la protéine VP1 indispensable à l'assemblage de la capside. Ce domaine P est quant à lui divisé en deux sous-domaines, le sous-domaine P1 et le sous-domaine P2, localisé vers l'extérieur et dont la séquence est très variable. Ce domaine P2 est impliqué dans les liaisons avec les cellules hôtes et donc dans la spécificité d'hôtes. Le sous-domaine P1 se compose des chaînes β en grande partie antiparallèles et d'une α -spirale, considérant que P2 est une insertion dans P1 et forme une chaîne β antiparallèle [78].

Il a été démontré que des mutations dans la partie N-terminale du domaine S empêchent l'assemblage des VLPs de NV [78] et que l'histidine en position 91 est importante pour les interactions entre les domaines P1 et P2 et le bon assemblage des VLPs [74]. L'étude de Chen montre pour plusieurs Calicivirus NV (GI), Grimsby (GII), Parkville (Sapovirus) et SMSV4 (San Miguel Sea lion virus) que la protéine de capside intègre différentes fonctions comme l'assemblage correct de la capside, la reconnaissance du récepteur, la spécificité d'hôte, la diversité de souches et l'immunogénicité [79]. Chaque domaine semble donc avoir un rôle précis : le domaine conservé S permettrait l'échafaudage icosaédrique, le domaine P1 servirait de plate-forme pour positionner le domaine P2 qui conférerait les fonctions d'antigénicité, de spécificité d'hôte et de diversité de souches [80][79].

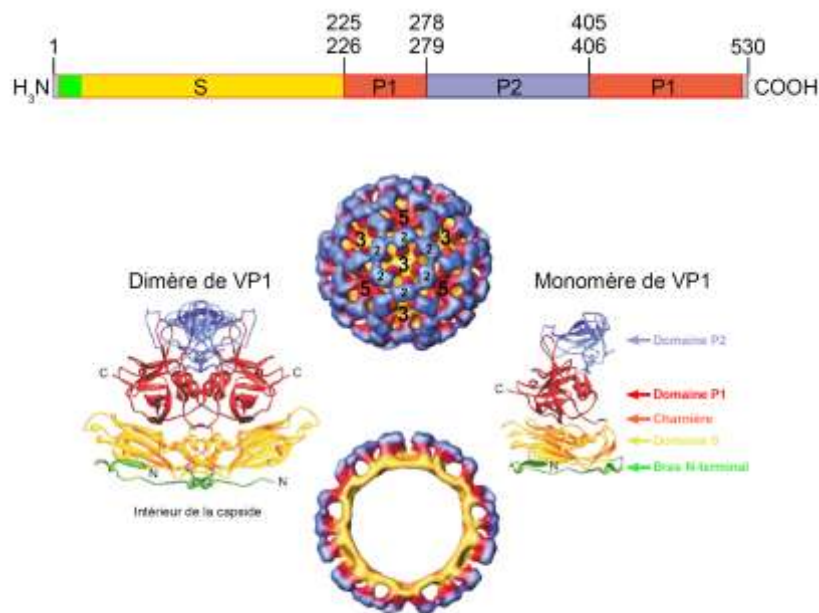


Figure 4 : Structure d'une pseudoparticule virale du virus Norwalk

En haut structure primaire de la VP1. En bas organisation des monomères en dimères et assemblage des 90 dimères en capside (D'après Hutson et al.) [81]

I.3.2 Propriétés physiques

Les norovirus sont des virus très résistants et extrêmement stables dans l'environnement [82]. Ils montrent une résistance à la congélation, à la chaleur (37°C pendant 120 heures, ou 100°C pendant 1 min), aux variations de température de -20 °C à +60 °C, aux rayons UV

jusqu'à 103 mJ/cm², aux différentes conditions de pH acides (pH 2, 30 min à 37°C) ou basiques (pH 12, 30 min à 37°C) [83]. Leur résistance aux radiations gamma fait que les doses de 2 à 4 kGy souvent utilisées pour contrôler les bactéries dans l'industrie agroalimentaire pourraient ne pas être suffisantes pour les détruire.

Une étude récente a montré l'effet des alcools, des solutions aseptiques pour les mains (Sterilium, Aniosgel 85NPC, Purell) et des désinfectants utilisés dans les hôpitaux (Asphène 381, eau de javel, Bétadine) sur les norovirus murins (MNV) utilisé comme modèle car il est le seul norovirus à être cultivable. Parmi les produits aseptiques testés, le Sterilium et l'Aniosgel 85NPC réduisent le titre de 4log₁₀ après 30 secondes d'exposition alors que le Purell nécessite une durée de 60 min pour réduire ce titre. En ce qui concerne les désinfectants, l'asphène 381 réduit le titre de 1log₁₀ après 3 min d'exposition, le titre restant toujours le même après 1h d'exposition, alors que la Bétadine, l'eau de javel et l'iode sont efficaces et réduisent le titre de 4log₁₀ suite à une exposition de 30 sec. Le MNV est sensible à 0,26% d'eau de javel [84].

La stabilité virale dans l'environnement contribue à un taux élevé de transmission car il est souvent extrêmement difficile d'éliminer le virus, et quelques virions seulement sont nécessaires pour infecter un nouvel individu.

I.4 Cycle de Multiplication

I.4.1 Les Calicivirus

Bien que les NoVs humains aient été décrits la première fois en 1968, la réplication *in vitro* de ces virus demeure toujours impossible malgré les nombreux essais réalisés par diverses équipes [83]. Il en est de même pour les NoVs animaux (bovin, porcin, canin) sauf pour le NoV murin qui se multiplie dans les cellules dendritiques du tractus gastro-intestinal et les macrophages [85]. De ce fait, la stratégie de la réplication virale des NoVs est peu documentée, mais se rapproche très probablement de celle des autres virus à ARN. En résumé, les virus ARN de simple brin positif à l'exception des rétrovirus cèdent directement leur ARN génomique au ribosome cellulaire, compartiment de synthèse des virions au moment de la traduction. Les virus à ARN positif se divisent en deux groupes en fonction de la présence ou non de l'ARNm subgénomique.

Pour les virus dépourvus d'ARNm subgénomique, l'ARN génomique contrôlera la synthèse du précurseur de la polyprotéine qui donnera alors les protéines structurales et non

structurales en quantité équivalente. Après clivage par elles-mêmes, les protéines non structurales catalysent la réplication de l'ARN pour produire des petites particules s'assemblant en virions pour se libérer ensuite.

Pour les autres types de virus dont les Calicivirus font partie, l'ARN génomique dirige la synthèse du précurseur qui ne produira que des protéines non structurales, dont la RdRp. Cette enzyme transcrit alors un ou plusieurs ARNm subgénomiques qui code pour des protéines structurales. Les protéines structurales produites s'assemblent en particules empaquetant l'ARN génomique et se libèrent ensuite pour l'infection. Le schéma général de cette réplication est montré sur la Figure 5.

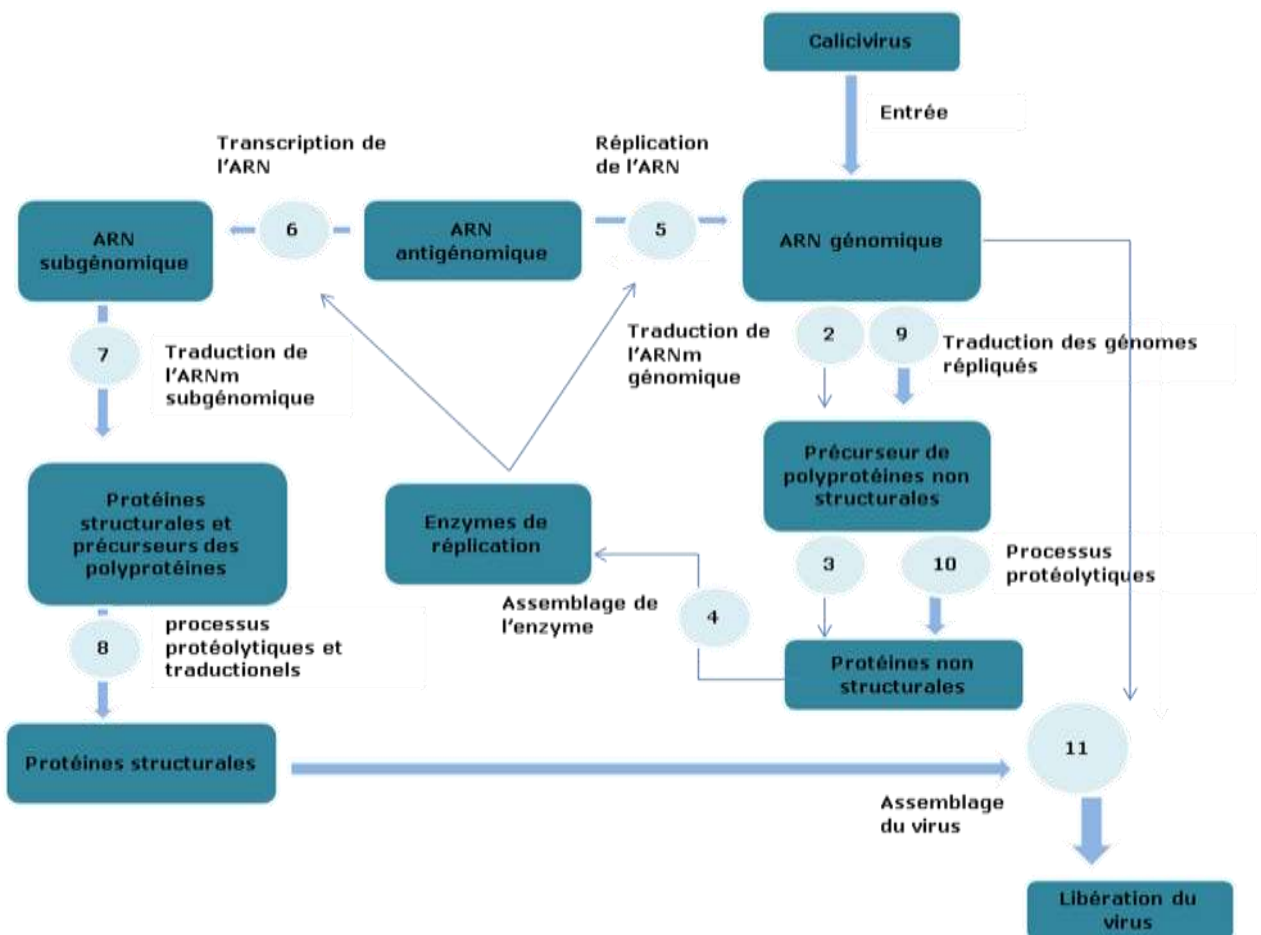


Figure 5 : Schéma de réplication des virus ARN simple brin positif produisant un ou plusieurs ARNm subgénomiques

Après l'entrée du virus (1), l'ARN génomique est utilisé pour la synthèse des protéines non structurales : RdRp (étapes 2 et 3). Cette dernière catalyse la réplication de l'ARN par la synthèse de l'ARN antigénomique (4 et 5) et la transcription des ARN subgénomiques (6) qui dirigent la synthèse des protéines structurales (7 et 8). Les génomes répliqués traduits en protéines non structurales (9 et 10) sont assemblés avec les protéines structurales en virions (11) (D'après Green 2007, Fields virology)

1.4.2 Les norovirus

La première étape de l'infection est l'attachement spécifique du virus sur la surface cellulaire. Les NoVs humains reconnaissent à la surface des cellules épithéliales digestives des structures glycaniques appartenant à la famille des antigènes tissulaires de groupe sanguin (HBGAs) [86][87]. Le site de reconnaissance de ces glycannes sur la capsid du virus NV est situé dans la région P2 de la protéine VP1 [88]. Après être entré dans la cellule par un mécanisme qui reste à définir, l'ARN génomique est libéré dans le cytoplasme suite à la décapsidation. La protéine virale VPg induirait la traduction par les ribosomes cellulaires en formant avec le facteur d'initiation eIF3 un complexe d'initiation de la traduction [89][90]. L'ORF1 est traduit en une polyprotéine constituée des protéines non-structurales qui est clivée par la protéase virale 3CLpro [91][92]. L'activité de clivage de cette protéase induirait l'inhibition de la synthèse protéique cellulaire et jouerait un rôle dans la régulation de l'expression génique virale et cellulaire [93]. L'ARN polymérase virale permet la réplication de l'ARN (+) génomique viral en une molécule d'ARN (-) qui va servir de matrice pour la synthèse de l'ARN génomique et des ARN subgénomiques viraux. Ce sont ces derniers qui servent à la synthèse des protéines issues des ORF 2 et 3 à savoir, la protéine de capsid et la protéine mineure structurale VP2. En effet, le travail développé par l'équipe de Mary Estes qui a réussi à produire des particules virales *in vitro* dans des cellules embryonnaires de rein humain (lignée 293T) à l'aide d'un vecteur vaccine montre que les cellules infectées par un vecteur codant l'ARN génomique du NV expriment uniquement la protéase virale et l'ARN polymérase et aucune expression de protéine de capsid. Il faut pour obtenir des particules virales que les cellules 293T soient infectées simultanément par le vecteur codant pour l'ARN génomique et le vecteur codant pour l'ARN subgénomique. Ces observations confirment que l'expression des protéines structurales est contrôlée par un ARN subgénomique produit au cours de la réplication virale et observée *in vitro* pour le Calicivirus félin [94]. L'encapsidation, la maturation et la sortie des virions sont des étapes non documentées en ce qui concerne les NoVs.

I.5 Pathogénie, signes cliniques et lésions

I.5.1 Chez l'Homme

L'infection par les norovirus chez l'Homme est possible pour toutes les classes d'âge [70][95]. Après une incubation courte de 15 à 50h (24h en moyenne) la maladie se caractérise par un début soudain sans prodrome, avec des vomissements (plus de 50% des cas) parfois incoercibles accompagnés ou non de diarrhée, de fièvre, de crampes abdominales, de nausées, de céphalées [96][97]. Ces symptômes disparaissent spontanément en 2 à 3 jours [98][99]. Mêmes si elles sont généralement considérées comme bénignes, les gastroentérites causées par les NoVs peuvent chez les personnes âgées ou les individus porteurs d'une pathologie chronique sous jacente [80], se manifester de façon sévère. Une prostration ou une atteinte importante de l'état général sont observées et parfois des complications graves (CIVD, perte de conscience...) nécessitent une hospitalisation [100][101]. Des cas mortels ont été signalés [102]. Chez les immunodéprimés, des cas de gastroentérites chroniques ont été décrits [63][103][80][104]. Une étude épidémiologique récente suggère que dans les pays en voie de développement, les NoVs pourraient causer la mort par déshydratation d'environ 220.000 enfants/an [20].

Les données existantes sur le pouvoir lésionnel des NoVs humains proviennent principalement d'études réalisées aux Etats Unis chez des volontaires sains infectés expérimentalement par différentes souches (NV, Montgomery, Hawaï). Les NoVs se répliquent dans l'intestin grêle [105]. Les biopsies intestinales collectées avant et après exposition aux agents viraux ont permis de mettre en évidence des lésions sur la muqueuse intestinale des individus malades [106][107]. La muqueuse présente des lésions inflammatoires, une hyperplasie des cellules des cryptes est observée, mais l'intestin retrouve un aspect normal en deux semaines chez ces volontaires [108]. Au microscope électronique, des altérations du réticulum endoplasmique, un raccourcissement des microvillosités, un œdème en position intercellulaire, et une hypertrophie des mitochondries sont observés [107][106]. Cependant, l'étendue des lésions chez des personnes plus fragiles comme les enfants et les personnes âgées reste largement méconnue. Ces auteurs notent que des individus infectés n'expriment aucun signe de maladie ni aucune lésion. En revanche, ils décrivent des lésions de la muqueuse chez d'autres individus infectés n'exprimant pas de

signes de maladie.

Une étude plus récente montre les changements fonctionnels et structuraux du duodénum suite à une infection par un norovirus humain. L'infection provoque une réduction de la surface des villosités parallèlement à l'infiltration intraépithéliale des lymphocytes CD8+. Ces cellules T se localisent entre les cellules épithéliales de l'intestin grêle et du gros intestin. De plus, cette infection conduit au dysfonctionnement de la barrière épithéliale parallèlement à l'élargissement de la jonction membranaire et de l'apoptose épithéliale.

Au niveau électro-physiologique, le dysfonctionnement de la barrière épithéliale est évident. Il est caractérisé par un flux d'eau et d'ions à partir des capillaires subépithéliaux jusqu'à la lumière intestinale via une diffusion para cellulaire due à une augmentation de la perméabilité de la jonction serrée. Une sécrétion active d'anion est fortement stimulée. Ainsi la diarrhée est alors déclenchée [109].

1.5.2 Chez les bovins

L'impact des infections par les NoVs chez les bovins est peu documenté. Les premières souches de norovirus bovins (NB2 et JV) ont été identifiées dans des fèces diarrhéiques de bovin respectivement en 1978 par Woode et Bridger [110] en Grande Bretagne et en Allemagne en 1980 par Gunther et Otto [111]. L'infection expérimentale de veaux gnotobiotiques (germ-free) entraîne l'apparition d'une diarrhée non hémorragique bénigne accompagnée d'une anorexie passagère [112]. Cette diarrhée semble plus sévère chez les veaux de plus de trois mois que chez le nouveau né. Les lésions d'entérite observées se limitent à l'intestin grêle [113][114] avec des lésions particulièrement marquées dans la région moyenne du jéjunum [115][111]. Chez les veaux, des lésions d'atrophie des villosités associées à une hyperplasie des cryptes sont observées [115][114].

1.5.3 Chez les porcins

En 1998, par RT-PCR en utilisant des amorces dérivant de la région de l'ARN polymérase de NoVs humains, l'équipe de Sugieda au Japon met en évidence dans le contenu caecal de porc sain la présence de souches de NoVs porcines qu'elle classe dans un nouveau cluster du génogroupe II [116][43]. Depuis, d'autres auteurs ont retrouvés ces NoVs chez le porc en Europe [117][118][119], aux Etats Unis [48], au Venezuela [120]. Jusqu'à présent ces souches ont été identifiées exclusivement chez des porcs de plus de trois mois à l'engrais et

semblent n'entraîner aucun signe clinique [121].

Jusqu'à présent, seule l'équipe de Linda Saif a réalisé une infection expérimentale de porc avec une souche humaine GII.4 [122]. Suite à l'inoculation, une diarrhée bénigne a été observée chez la plupart des porcs inoculés avec des HuNoVs. La période d'incubation est de 24 à 48 h, et la diarrhée dure (1 à 3 jours), ce qui est semblable à ce qui a été décrit chez les volontaires humains. Au contraire de la vache, aucun changement pathologique n'a été vu du jéjunum à l'iléon. Ils sont restreints au duodénum. Semblable à la population humaine, les porcs infectés par des norovirus humains peuvent présenter diverses réponses : différents degrés de résistance et de sensibilité, présence ou absence de séroconversion, et sévérité et durée des signes cliniques et du rejet viral. Pour ces raisons, le modèle de porc peut être utile pour étudier la pathogénie des infections de HuNoVs.

L'élargissement de la jonction serrée ainsi que la prolifération de cellules épithéliales apoptotiques décrites chez l'Homme lors de l'infection ont été observés. De même d'autres changements ont lieu comme une atrophie modérée des villosités (30 à 40% des villosités), une déformation des entérocytes des villosités, et une inflammation de la lamina propria du duodénum.

1.5.4 Chez les autres espèces

-Le norovirus murin

Le NoV murin (MNV-1) a été découvert en 2003 à l'université de Washington par le groupe de Virgin [45]. Le pouvoir pathogène du MNV-1 semble ne s'exprimer que sur un nombre limité de lignées de souris dont l'immunité innée est déficiente (Souris RAG2 et STAT1 déficientes). Ces souris montrent des signes d'encéphalite, de pneumonie et d'hépatite. Sur d'autres lignées de souris immunodéficientes infectées par le MNV-1, une infection généralisée avec des signes d'inflammation dans différents tissus (foie, poumon, cavités péritonéale et pleurale) a été reproduite [123]. Chez les souris immunocompétentes, MNV-1 n'entraîne pas de signes cliniques, seules des modifications histopathologiques sont observables au niveau de l'intestin (inflammation) et de la rate [124]. En 2006, d'autres souches MNV-2, MNV-3 et MNV-4 ont été isolées dans des colonies de souris de laboratoire en Amérique du Nord. Deux profils d'infection semblent se distinguer : En effet, sur des souris immunocompétentes, l'infection par le MNV-1 est transitoire alors que les souches MNV-2, MNV-3 et MNV-4 entraînent des signes d'infection chronique associées à une longue période d'excrétion fécale (huit semaines contre une pour le MNV-1) [125].

-Le norovirus du Lion (GIV.2)

La souche (NoV 387/06) a été caractérisée chez un lion présentant des symptômes entériques sévères dans le zoo de Pistoia en Italie. La capside de cette souche présente une similarité de 69.3 à 70.1% à celle des souches humaines GIV.1. Elle a donc été classée dans le même génogroupe GIV mais dans un cluster distinct : GIV.2. Le potentiel pathogénique de cette souche n'est pas encore clair car le lion malade présentait une infection à la fois virale et bactérienne [46].

-Les norovirus canins

Des particules de Calicivirus ont été occasionnellement identifiées par la microscopie électronique à partir des échantillons fécaux des chiens présentant une diarrhée. Les deux premières souches mises en évidence étaient des vésivirus ou des Calicivirus félins. En 2008, Vito Martella caractérise la souche 170/07 qui ressemble génétiquement à la souche identifiée chez le lion classé dans le génogroupe GIV. Cette souche peut être considérée comme un variant de la souche GIV.2. Le potentiel pathogénique de cette nouvelle souche n'est pas encore connu [118].

I.6 Immunité

I.6.1. Chez l'Homme

Les anciennes études sur l'immunité acquise lors d'infections naturelles ou expérimentales montrent l'existence d'une immunité homologue à court terme [106][126][127], par contre cette immunité ne semble pas perdurer sur du long terme [128][129]. Par ailleurs, des études sur des volontaires sains réalisées aux Etats Unis pour tester le pouvoir pathogène et immunogène des NoVs ont révélé que parmi les individus dépourvus d'anticorps avant infection, certains développaient une maladie associée à une réponse en anticorps alors que d'autres restaient asymptomatiques mais présentaient une séroconversion et excrétaient du virus pendant plusieurs semaines, et que d'autres encore restaient insensibles à l'infection et ne présentaient aucune séroconversion [128][130][98]. L'existence de ce dernier groupe a conduit à émettre l'hypothèse d'une résistance génétique aux infections de NoVs qui a été démontrée par l'étude de Lindesmith [131]. En effet, elle

démontre que l'infection dépend notamment du polymorphisme génétique des individus aux loci *ABO* et *FUT2*. Un travail de la même équipe réalisé à partir des volontaires a permis de montrer que la réponse en anticorps contre une souche GII.2 n'est que partiellement cross-réactive avec une souche GII.1 et pas du tout avec une souche GI.1. Par ailleurs, l'infection s'accompagne d'une augmentation de l'IFN- γ et de l'IL2 sérique mais pas de l'IL6 ou de l'IL10. De même la stimulation de PBMC par des VLPs entraîne une réponse de type Th1 [132]. En conclusion, il semble que l'infection par un NoV, chez les individus génétiquement sensibles, entraîne une réponse cellulaire de type Th1 et une réponse Th2 avec la production d'anticorps spécifiques de la souche infectante, les anticorps présentent aussi un degré de réactivité croisée avec des souches génétiquement proches, et pour lesquelles la protection conférée serait de courte durée.

1.6.2 Chez les animaux

Suite à un challenge avec la souche Newbury2, les vaches ont développé des anticorps anti-GIII.2 3 semaines après l'inoculation [133]. L'étude de Mauroy montre que les anticorps apparaissent très rapidement après la naissance et persistent, suggérant que les infections sont précoces et que les ré-infections dans les élevages sont fréquentes [134]. Cependant les norovirus animaux n'affectant pas fortement la santé des animaux, aucune étude sur la durée de l'immunité n'a été réalisée avec des souches animales. Deux études d'immunité ont été faites chez le porc [122] et la vache [135] suite à leur inoculation par une souche humaine (HS66). Chez le porc, l'infection par cette souche induit une réponse Th2 moins élevée que celle de type Th1, et une faible sécrétion de l'interleukine proinflammatoire [122]. Chez la vache, les anticorps et les cytokines TNF- α , IL-12, IFN- γ , IL-4, IL-10 ont été détectés dans le sérum, dans les fèces et l'intestin suite à l'inoculation de la souche humaine [135].

I.7 Épidémiologie

1.7.1 Chez l'Homme

Il est admis aujourd'hui que les norovirus représentent la cause majeure des gastroentérites aiguës non bactériennes chez l'Homme. Ainsi aux Etats Unis, les données épidémiologiques indiquent que les NoVs sont responsables de 93% des épidémies non bactériennes avec 23 millions de cas annuels. En Europe (Tableau IV), comme au Japon, les

études signalent aussi une prévalence élevée de ces infections [136][137][138][139].

Tableau IV : Nombre d'épidémies de gastroentérite virales en Europe et importance des gastroentérites à NoV en Europe

Pays	Durée de l'étude (mois)	Nombre d'épidémies de gastroentérites virales	% Positif pour NoV	Références
Espagne	72	194	87.1	[140]
Suède	48	676	89	[95]
Allemagne	48	159	95	[141]
Hongarie	84	491	76.8	[142]
Pays Bas	12	281	55	[143]
Pays Bas	132	941	78.1	[144]

Ces infections sont observées à tous les âges même si chez les enfants de moins de 5 ans, une incidence plus forte est notée [10][11]. Ces infections sont aussi marquées par une saisonnalité hivernale avec des pics épidémiques ponctuels qui peuvent être observés au printemps et en été [145]. De part leur fréquence et le grand nombre des sujets atteints, les épidémies à NoVs chez l'Homme constituent un problème important en santé publique.

Les données d'épidémiologie moléculaire montrent qu'à l'heure actuelle les souches appartenant au génogroupe II circulent préférentiellement, même si un grand nombre de génotypes différents co-circulent [145][146][39]. Actuellement, le génotype GII.4 est le plus souvent mis en cause dans les épidémies hivernales [145][147], avec des sub-génotypes (Tableau V) qui semblent se succéder [148] alors que le génotype GI semblent quant à lui impliqué toute l'année mais à une fréquence bien moindre [149].

Des NoVs humains ont aussi été mis en évidence chez des animaux de production en particulier chez les bovins et les porcins [117][150][151][133][152][116]. Ces découvertes ont soulevé d'importantes questions sur une éventuelle transmission inter-espèce qui sera présentée dans le chapitre suivant.

Tableau V : Évolution des principales souches circulant dans le monde

Le mécanisme d'évolution et de persistance des souches GII.4 dans la population humaine est mal connu. Les analyses phylogénétiques et immunologiques du domaine P2 indiquent que les virus GII.4 ont évolué linéairement durant ces 20 dernières années semblablement aux virus de la grippe, avec des remplacements périodiques permettant un échappement à l'immunité de groupe.

Année	Souche	Épidémies	Références
1995-1996	GII.4 (US95/96)	55% des infections aux Etas Unis 85% des infections aux Pays bas	[153]
2000-2004	GII-4 (Farmington Hills)	80 % des infections aux Etas Unis	[154] [39]
2000-2004	GII-4 b	Europe, Japon	[145] [155] [64]
2004	GII-4 hunter	Europe Australie (85,5%) Asie (77,7%)	[64] [147] [156]
2006	Saïka Minerva	Europe, Asie et aux Etats-Unis	[157] [158]
2008	Apeldoorn 317 Stockholm 19685	Pays Bas Suède	* **

*Sibenga JJ, Venema H and Koopmans M. 2008 (published only in database)

** Sibenga JJ, Hedlund K., Thorhagen M. and Venema H. 2009 (published only in database)

L'infectiosité des NoVs apparaît très élevée avec une dose infectieuse estimée inférieure à 10 particules virales [145][39][159]. Chez les personnes infectées, la concentration en virus dans les selles est très élevée. Elle a été estimée entre 10^5 et 10^6 particules/g de selles [160] par microscopie électronique et entre 10^5 et 10^9 particules/g de selles par RT-PCR [161][162][163]. Le développement de la RT-PCR quantitative a permis de montrer une grande variabilité d'excrétion selon les génogroupes avec des concentrations variants de 10^4 à 10^{10} particules/g de selles et de 10^7 à 10^{10} particules/g de selles respectivement pour les NoVs GI et les GII [164]. L'excrétion virale varie de 2 jours à 3 semaines mais peut persister plusieurs mois chez des patients immunodéprimés [80]. Après rejet dans le milieu extérieur, les virus vont s'agréger entre eux ou sur des particules et du fait de leur grande résistance

intrinsèque, et de cette adsorption, ils vont persister dans les rejets et résister aux différents traitements d'épuration. Une étude de quantification par RT-PCR des NoVs dans les eaux brutes et épurées de station d'épuration a montré un abattement de la charge virale d'environ 2log par les traitements des stations d'épuration [165]. Il reste que de grandes quantités de particules virales peuvent donc être déversées et résister dans l'environnement [166]. Des NoVs ont été fréquemment retrouvés dans les eaux minérales et les boissons [167][168][169], les eaux usées [170][171][172][173], les eaux de surface [174][175] et les eaux récréatives [176][177]. Dans ces différentes études, les souches détectées appartiennent le plus souvent au GII reflétant les données cliniques chez l'Homme. Les fruits et les végétaux peuvent aussi être contaminés par l'eau d'irrigation, l'eau de lavage ou la manipulation par des individus infectés. Ainsi des framboises contaminées en provenance de Slovénie ont été incriminées dans des épidémies au Canada et en Europe [178][70][179]. Les NoVs peuvent aussi se retrouver dans les coquillages qui ne constituent pas un hôte de réplication pour les virus entériques humains, mais un simple transporteur passif permettant de les concentrer [180]. La présence de NoVs dans les coquillages a été démontrée dans de nombreuses études. En Angleterre, 21% des échantillons prélevés en zones insalubres, 8% des coquillages prélevés sur les étals et 56% des coquillages prélevés chez un producteur étaient contaminés par des NoVs [181][182]. Le séquençage de ces virus a montré une grande diversité de souches avec parfois des contaminations multiples [182]. En France, une étude réalisée sur 3 ans a également mis en évidence la présence de NoVs dans 35 % d'échantillons de moules et 23 % d'échantillons d'huîtres prélevées en zones insalubres essentiellement pendant les mois d'hiver [183]. Une étude plus récente montre aussi la présence de souches variées de NoVs dans 10% des huîtres testées (53/507) importées à Hong-Kong entre 2000 et 2003 [184]. Ces différentes sources de contamination de l'Homme sont illustrées sur la Figure 6. En effet la source primaire de contamination de l'Homme est la consommation d'aliments contaminés qui est souvent à l'origine du déclenchement des épidémies. Entre 1994 et 1998 en Suède, entre 1992 et 1999 en Angleterre et aux pays bas 16%, 5% et 17% respectivement des épidémies à NoVs ont été attribuées à la consommation d'aliment. Aux Etats Unis, ce mode de contamination serait à l'origine de 40% des cas [19].

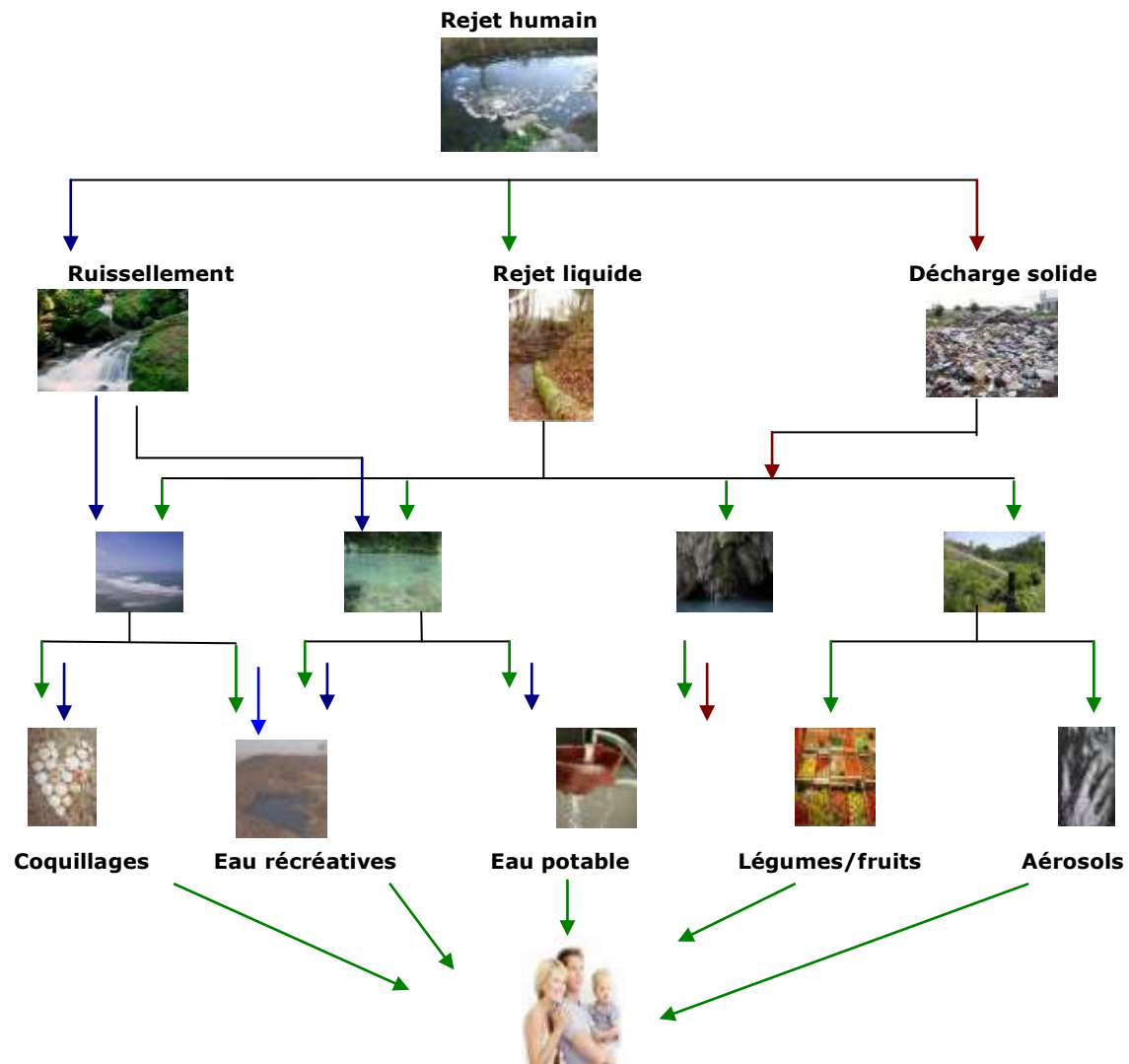


Figure 6 : Voies de contamination de l'environnement par les NoVs et sources primaires d'infection chez l'Homme

Les aliments fréquemment incriminés dans les épidémies sont l'eau, les fruits et légumes [178][70][179] et les coquillages [185][186]. En effet, de nombreuses épidémies liées à la présence de NoVs dans les coquillages et plus particulièrement les huîtres ont été répertoriées [187][185][186]. Cependant, peu d'études retrouvent le même virus dans les huîtres et les selles des malades. En effet, une diversité est observée entre les souches détectées chez les malades et celles trouvées dans les coquillages incriminés [188][189][186]. Les coquillages sont généralement contaminés par des eaux usées [189], et peuvent contenir des mélanges de souches humaines appartenant aux GI et/ou GII [188] ne montrant pas la nette prédominance des souches GII et en plus particulièrement GII.4 retrouvée dans les épidémies non liées aux coquillages. La transmission interhumaine se réalise principalement par voie oro-fécale [130][190][191]. La fréquence élevée des vomissements augmente la probabilité d'émission

d'aérosol infectieux permettant une transmission de personne à personne [45][137]. Les différentes observations naturelles et expérimentales suggèrent en effet l'importance de la voie respiratoire par inhalation de gouttelettes de vomissures [192]. Ces modalités de transmission expliquent pourquoi les épidémies sont souvent décrites dans des collectivités comme les crèches, les écoles, les hôpitaux, les maisons de retraites, les bateaux de croisière (Figure 7) [193][194][195][196].

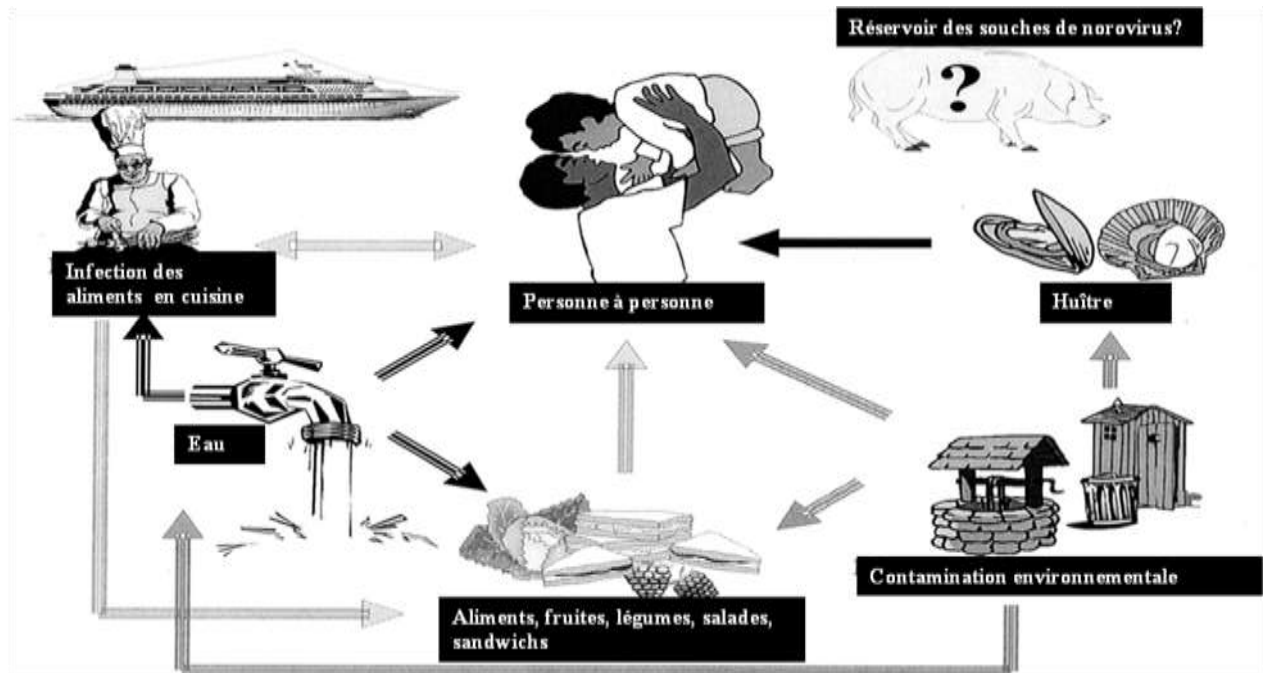


Figure 7 : Schéma épidémiologique

1.7.2 Porteurs asymptomatiques

L'hypothèse de risque de transmission des norovirus à travers des personnes porteuses de ce virus et asymptomatiques a été testée par différentes équipes. L'équipe de G. Kang a montré que les infections asymptomatiques constituent un réservoir important d'infection dans la communauté et pourront agir comme une source de maladies endémiques et épidémiques [197] alors que celle de P. Wright s'oppose à ces résultats en se référant à deux autres études faites en Angleterre [11][198][116] et aux Pays Bas [10] où la détection des norovirus chez des individus sains était inférieure à 0,8%, d'où la conclusion que les personnes asymptomatiques ne jouent qu'un rôle minime dans la transmission des norovirus dans les communautés.

1.7.3 Chez les bovins

Le développement d'outils de RT-PCR permet aujourd'hui d'apprécier la prévalence d'infection des bovins par les NoVs bovins, mais les résultats sont très variables et peuvent difficilement être comparés. En effet, le recueil des échantillons (bovins avec ou sans diarrhée, l'âge des animaux...), mais aussi les amorces ainsi que les conditions de RT-PCR sont très différentes d'une étude à l'autre.

Aux Etats Unis, une prévalence de 72%, 80% et de 25% sur des échantillons de matières fécales obtenues dans des fermes respectivement d'Ohio, du Michigan, et du Wisconsin a été observée [199] alors que Mattison et ses collaborateurs obtiennent une prévalence de 1,6% sur des fèces prélevés au hasard au Canada [151]. En Europe, la première étude conduite par Van der Poel estime la prévalence d'infection chez les veaux à 32% et chez les vaches laitières à 4%, et indique que l'excrétion des NoVs semble être associée à un épisode de diarrhée [42].

En Europe, c'est la souche NB2 (GIII.2) qui est la plus fréquemment identifiée. Une étude récente en Belgique estime la prévalence à 7,5% (10/133) sur des échantillons de fèces obtenus sur des vaches présentant des diarrhées [134]. Cette prévalence est en accord avec les résultats obtenus en Grande Bretagne [200] et en Corée [201]. En Allemagne, l'étude de Deng rapporte une prévalence de 9% pour le virus Jena chez des vaches présentant également de la diarrhée [73].

Par ailleurs, les différentes études de séroprévalence chez les bovins montrent que celle-ci peut être très élevée en Europe, de même qu'en Nouvelle Zélande ou au Venezuela puisqu'environ 99.1% des vaches présentent des anticorps anti-GIII.1 dans leur sérum [73][134][202][203]. Ces données suggèrent que les NoVs bovins circulent largement dans les élevages étudiés.

1.7.4 Chez les porcins

Chez les porcins, la prévalence des norovirus porcins dans les fèces semble faible, mais là encore les résultats sont très variables en fonction des amorces utilisées. Ainsi dans des fèces non diarrhéiques de porcs, au Japon et aux Pays Bas, la présence de NoVs porcins est retrouvée respectivement dans 0,35% (4 positifs / 1117 échantillons) [116] et 2% (2 positifs / 100 échantillons) [117] des échantillons testés. Aux Etats Unis, 0,2% (5/275) ou 23% (63/275) des fèces se révèlent positives [204]. Au Venezuela, 19,1% (27 positifs / 141 prélèvements) de fèces normales et 14,3% (9/63) de fèces diarrhéiques sont positives [120]. Récemment, des

NoVs porcins ont également été détectés en Hongrie [119], en Belgique [205] et en Corée [206]. En revanche, la séroprévalence est élevée vis-à-vis de la souche SW918 (souche prototype GII.11) aux Etats Unis (71%, soit 78 sérums positifs sur 110 testés) et au Japon (36%, soit 95/266 sérums) [207]. De plus, 63% des sérums américains sont également positifs vis-à-vis du virus humain NV (GI) et 52% vis-à-vis du virus Hawaï (GII), laissant supposer que les porcs peuvent être infectés par des norovirus humains et éventuellement servir de réservoirs aux NoVs humains.

II-Les antigènes de groupes sanguins ABH

Au cours de ma thèse, je me suis intéressée particulièrement aux interactions des norovirus avec les cellules de leurs différents hôtes et plus particulièrement avec les HBGAs. J'ai cherché à identifier précisément les ligands cellulaires des norovirus animaux afin d'évaluer le potentiel zoonotique de ces virus sur la base de la reconnaissance glycanique des glycoconjugués présents à la surface des cellules.

Les glycoconjugués sont des molécules composées de chaînes oligosaccharidiques (ou glycannes) associées de façon covalente à des protéines ou à des lipides. Le développement des méthodes d'analyse de ces glycoconjugués a permis de mettre en évidence la grande diversité des glycannes et des réactions de glycosylation permettant leur synthèse. Le remarquable potentiel d'informations que représentent ces glycoconjugués a ainsi pu être révélé. Parmi eux, les antigènes tissulaires de groupe sanguin ABH découverts au début du 20ème siècle par Landsteiner sont très importants. Ces antigènes sont le résultat de glycosylations en chaîne réalisées par des enzymes codées par des gènes extrêmement polymorphes [208]. Ils sont présents à la surface des érythrocytes, des cellules épithéliales et/ou excrétés sous forme libre ou complexe dans les sécrétions de nombreuses espèces. Leur structure, leur synthèse et leur distribution seront décrites dans ce chapitre en insistant sur les particularités connues chez les espèces animales puis nous présenterons le rôle de ces antigènes et plus particulièrement les interactions qu'ils entretiennent avec les microorganismes dans le chapitre suivant.

II.1 Les antigènes tissulaires de groupe sanguin ABO(H), Lewis et apparentés

Le système ABO a été découvert par Karl Landsteiner en 1900. Dans ce système, les individus peuvent être classés en 4 groupes différents en fonction de la présence sur leurs hématies, des antigènes A ou B définissant respectivement les sujets de groupe A, B, AB, ou O si les deux antigènes sont absents (O=Ohne pour absent). Ce qui caractérise particulièrement le système ABO est le fait que lorsque l'antigène A ou B est absent, l'individu possède des anticorps correspondant à l'antigène qui fait défaut. Ainsi les sujets A ont tous des anticorps anti-B, les sujets B des anticorps anti-A et les sujets O des anticorps anti-A et des anti-B, alors que les sujets AB n'ont aucun anticorps (Figure 8).

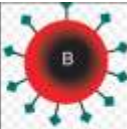
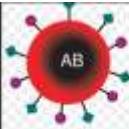
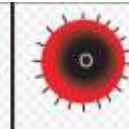
Globule Rouge				
Anticorps	 Anti-B	 Anti-A	Aucun	 Anti-A et Anti-B
Antigène	Antigène A	Antigène B	Antigène A et B	Pas d'antigène

Figure 8 : Les antigènes ABO sur les érythrocytes et leurs anticorps correspondants
D'après Dorota Smolarek [209]

Un peu plus tard, en 1941, Hartman démontre que ces antigènes présentent une large distribution tissulaire. En effet, ils ne sont pas seulement présents sur les globules rouges mais aussi sur d'autres types cellulaires et dans les sécrétions, ce qui a conduit à utiliser préférentiellement le terme «histo-blood group antigen» (HBGAs) plutôt que celui d'antigènes de groupe sanguin. C'est dans les années 1950-1960, que les structures antigéniques A, B, H ont été caractérisées par Watkins et Morgan. Depuis, de nombreux antigènes appartenant à la famille des HBGAs ont été identifiés. Parmi ceux-ci, nous pouvons citer les antigènes Lewis, l'antigène Forssman, l'antigène α Gal et tous les antigènes dérivés (antigènes sialylés) qui partagent les caractéristiques avec les antigènes ABH d'être portés par des protéines ou des lipides et d'être exprimés à la surface des érythrocytes et d'autres types cellulaires, tout particulièrement des cellules épithéliales. Les antigènes ABH, Lewis et

apparentés sont des antigènes résultant de l'ajout successif de monosaccharides (Fuc, Gal ou GalNAc) par des glycosyltransférases sur des chaînes précurseurs présentes sur des glycolipides ou glycoprotéines cellulaires [210].

Nous allons donc présenter la structure et la biosynthèse de ces HBGAs, puis le polymorphisme de ces gènes pour décrire ensuite leur distribution tissulaire dans les différentes espèces animales. Ces descriptions sont issues des nombreuses études réalisées chez l'Homme, et nous verrons au fil de ce chapitre, que les connaissances des HBGAs chez les animaux sont très pauvres notamment en ce qui concerne leur génétique et leur répartition tissulaire.

II.2 Les précurseurs

Six chaînes précurseurs ont été identifiées pour porter les antigènes ABH ou Lewis. Il s'agit de chaîne de disaccharides portant un résidu galactose (Gal) en position terminale et constituant la région périphérique des glycolipides, des N- ou O-glycannes, des glycoprotéines. Ces précurseurs sont classés en fonction de la structure du disaccharide terminal (Tableau VI).

Tableau VI : Structure de différentes chaînes précurseurs et localisation

Gal=Galactose, GlcNAc= N-acétylglucosamine, GalNAc=N-acétylgalactosamine, R=Reste de la molécule

Nom	Structure	Type de glycoconjugués porteurs			
		Glycosphingolipides	N glycoprotéines	O glycoprotéines	Distribution tissulaire
Type 1	Gal β 1-3GlcNAc β 1-R	+	+	+	Tissus dérivés de l'endoderme.
Type 2	Gal β 1-4GlcNAc β 1-R	+	+	+	érythrocytes, sécrétions des individus, tissus de l'ectoderme et mésoderme. sécrétions, plasma [211].
Type 3	Gal β 1-3GalNAc α 1-R	+	-	+	Erythrocytes du groupe A1, mucines.
Type 4	Gal β 1-3GalNAc β 1-R	+	-	-	érythrocytes [212] et reins [213].
Type 5	Gal β 1-3Gal β 1-R	+	-	-	quantités minimales au niveau de rein [214].
Type 6	Gal β 1-4Glc β 1-R	+	-	-	Nombreux types cellulaires et non complexé dans le lait [215] et l'urine [216].

Les précurseurs de Type 1 et 2 ont été initialement identifiés sur les glycoprotéines purifiées à partir de kyste ovarien humain [217]. Ils sont formés par l'association d'un résidu Gal en liaison β sur un résidu GlcNAc et se distinguent par la position de l'hydroxyle du GlcNAc engagé dans la liaison. Ces chaînes sont trouvées sur des glycolipides et sur des glycannes O- et N-liés des glycoprotéines. Le précurseur de Type 1 est uniquement présent dans les tissus dérivant de l'endoderme comme les cellules épithéliales des tractus digestif, respiratoire et urinaire. Quant au précurseur de Type 2, il est plus largement distribué puisqu'on le trouve également dans les tissus dérivés du mésoderme comme les érythrocytes et ceux dérivés de l'ectoderme comme l'épiderme [218]. Ces deux types de précurseurs sont les principaux supports des antigènes ABH et Lewis détectables sur les protéines et les lipides des sécrétions et autres fluides de l'organisme.

Les chaînes de Type 3 et 4 sont obtenues par l'enchaînement d'un résidu Gal en configuration β à un résidu GalNAc. Les hydroxyles engagés dans la liaison sont les mêmes, mais le GalNAc présente une configuration en α pour le Type 3 et en β pour le Type 4. Le précurseur Type 3 a été retrouvé sur des glycolipides et sur des O-glycannes liés à des sérines ou des thréonines alors que de Type 4 n'a été retrouvé que sur des glycosphingolipides. Le précurseur de Type 3 est exprimé essentiellement dans les mêmes tissus que le Type 1. Le Type 4 est surtout présent sur les glycolipides du rein et des globules rouges [219].

Le précurseur de Type 5 n'a été trouvé qu'en faible quantité au niveau du rein et le Type 6 a été décrit dans l'intestin humain [220] et dans le rein [221] ainsi que sur diverses lignées cellulaires. On le trouve en grande quantité dans le lait et dans une moindre mesure dans l'urine sous forme d'oligosaccharides libres.

Les enzymes nécessaires à la synthèse des antigènes A, B et H peuvent venir greffer les résidus saccharidiques sur les 6 chaînes précurseurs alors que pour les antigènes Lewis, seuls les précurseurs 1 et 2 sont utilisés.

II.3 Biosynthèse des antigènes A, B et H

La biosynthèse de ces antigènes est réalisée par l'addition séquentielle de monosaccharides sur les chaînes précurseurs grâce à l'intervention de glycosyltransférases spécifiques du sucre, du substrat accepteur et du type de liaison (Figure 9).

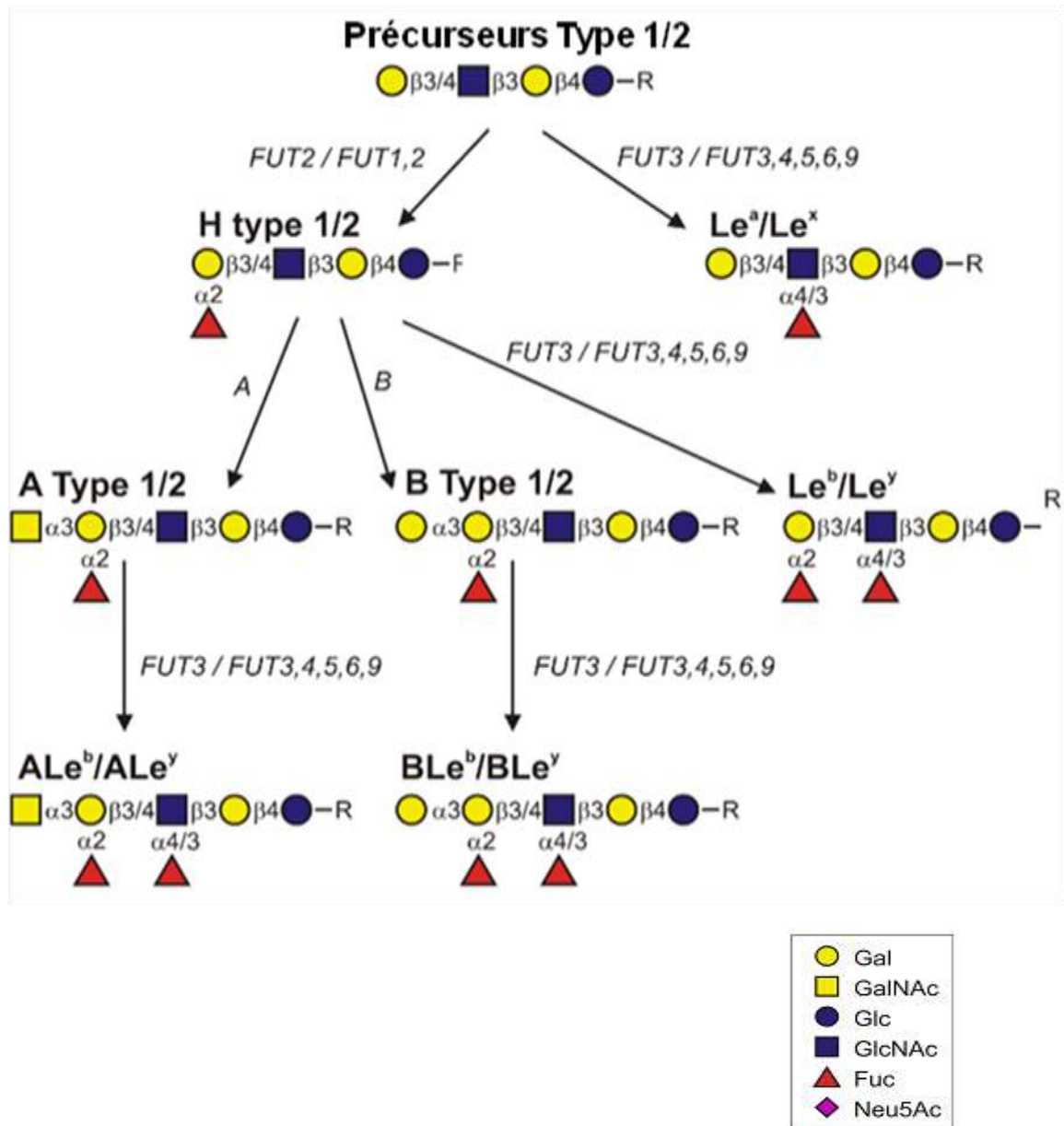


Figure 9 : Biosynthèse des antigènes ABH et Lewis

Les enzymes qui sont principalement responsables du polymorphisme sont notées séparément en premier.

II.3.1 Les antigènes H

L'addition par une α 1,2fucosyltransférase (FUT2) d'un fucose en position α 1,2 sur le galactose terminal des précurseurs précédemment décrits donne l'antigène H (Fuc α 2Gal β -R). Chez l'Homme, cette fucosylation peut être réalisée par deux α 1,2fucosyltransférases, l'une d'elles étant le produit du gène H (*FUT1*) et l'autre celui du gène Sécréteur (*FUT2*). Ces α 1,2fucosyltransférases possèdent des affinités différentes pour les précurseurs oligosaccharidiques. FUT1 catalyse l'addition d'un résidu fucose sur le Gal terminal des précurseurs avec une préférence pour les Types 1 et 2. FUT2 catalyse la même réaction mais

avec une préférence pour les précurseurs de Type 1 et 3 [222].

II.3.2 Les antigènes A et B

La nouvelle structure trisaccharidique terminale (antigène H) peut ensuite recevoir sur le même galactose en position $\alpha 1,3$ une N-acétylgalactosamine ou un galactose grâce à l'action d'une $\alpha 1,3$ N-acétylgalactosaminyltransférase codée par l'allèle A ou d'une $\alpha 1,3$ galactosyltransférase codée par l'allèle B pour donner respectivement l'antigène A [GalNAc $\alpha 3$ (Fuc $\alpha 2$)Gal] et l'antigène B [Gal $\alpha 3$ (Fuc $\alpha 2$)Gal]. L'expression des antigènes A et B se traduit par les phénotypes A ou B, la coexpression de ces antigènes par le phénotype AB. Les séquences nucléiques codant pour ces enzymes sont situées sur le locus *ABO*, pour lequel de nombreuses mutations ont été décrites expliquant l'existence de sous groupes A, B et O [223].

II.3.3 Les antigènes Lewis

Les motifs antigéniques Lewis sont synthétisés à partir des précurseurs Type 1 et 2 et des structures H Type 1 et H Type 2. Ils sont construits par l'action des enzymes $\alpha 1,3$ et $\alpha 1,4$ fucosyltransférases. La chaîne de Type 1 est à l'origine des structures Le^a et Le^b, la chaîne Type 2 des motifs Le^x et Le^y. Les structures Le^b et Le^y sont des antigènes difucosylés obtenus par l'addition d'un fucose en $\alpha 1,3$ ou $\alpha 1,4$ respectivement sur les antigènes H Type 1 et 2. La biosynthèse des antigènes Lewis apparaît complexe puisque plusieurs enzymes sont en compétition sur les mêmes précurseurs. Ainsi, l'intervention directe d'une $\alpha 1,3$ ou $\alpha 1,4$ fucosyltransférase sur le résidu N-acétylglucosamine des précurseurs 1 ou 2 ne permet plus l'intervention d'autres glycosyltransférases. En revanche, après l'intervention d'une $\alpha 1,2$ fucosyltransférase, il peut y avoir l'intervention d'une glycosyltransférase A ou B donnant les antigènes A ou B, ou encore celle d'une $\alpha 1,3$ ou $\alpha 1,4$ fucosyltransférase donnant les antigènes Le^b et Le^y. L'obtention des structures difucosylés ALe^b, ALe^y, BLe^b et BLe^y n'est possible que par l'intervention séquentielle des $\alpha 1,2$ fucosyltransférases, d'une glycosyltransférase A ou B, puis des $\alpha 1,3$ ou $\alpha 1,4$ fucosyltransférases.

II.3.4 Les antigènes sialylés

Les précurseurs de Type 1 et 2 peuvent également être directement sialylés par l'action d'une $\alpha 2,3$ sialyltransférase aboutissant à une structure NeuAc $\alpha 2,3$ Gal β -R reconnue par la lectine MAA et accepter dans un second temps l'action d'une $\alpha 1,4$ ou $\alpha 1,3$ fucosyltransférase pour donner respectivement les antigènes sialyl-Le^a et sialyl-Le^x. La synthèse de l'antigène sialyl-Le^a nécessite la présence d'un gène FUT3 fonctionnel, alors que pour la synthèse de l'antigène sialyl-Le^x plusieurs $\alpha 1,3$ fucosyltransférases peuvent intervenir (Figure 10) [224].

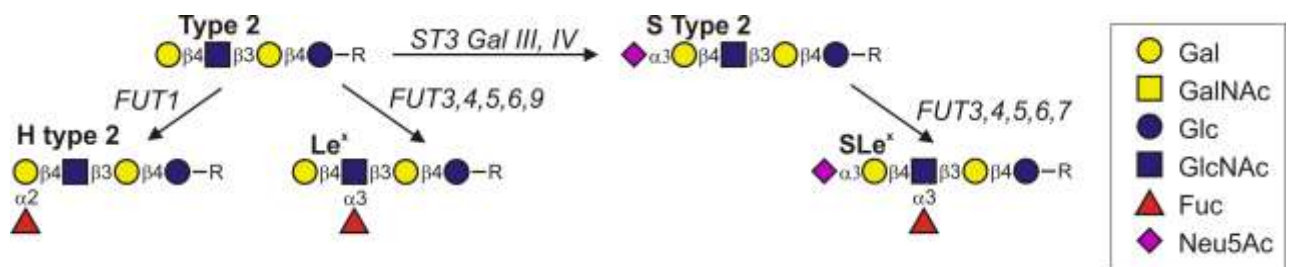


Figure 10 : Biosynthèse de l'antigène Sialyl-Le^x

II.3.5 Les antigènes proches structurellement des antigènes ABH et Lewis

D'autres glycosyltransférases apparentés aux enzymes A et B ont été identifiées permettant la synthèse d'antigènes proches des antigènes A ou B comme l' α Gal ou antigène de Galili que nous développons ici car il présente un intérêt majeur dans notre travail, l'iGb3 et l'antigène Forssman.

-L'antigène α Gal

Une $\alpha 1,3$ galactosyltransférase ($\alpha 3$ GalT) est responsable de la synthèse du motif Gal $\alpha 3$ Gal $\beta 4$ GlcNAc-R à partir du précurseur Type 2. Ce trisaccharide est présent dans toutes les espèces excepté l'Homme et les singes de l'ancien monde. Il est proche de l'antigène B par la présence d'un galactose terminal en position $\alpha 3$, mais en diffère par l'absence de fucose (Figure 11).



Figure 11 : Biosynthèse du xénoantigène $\alpha 3$ Gal

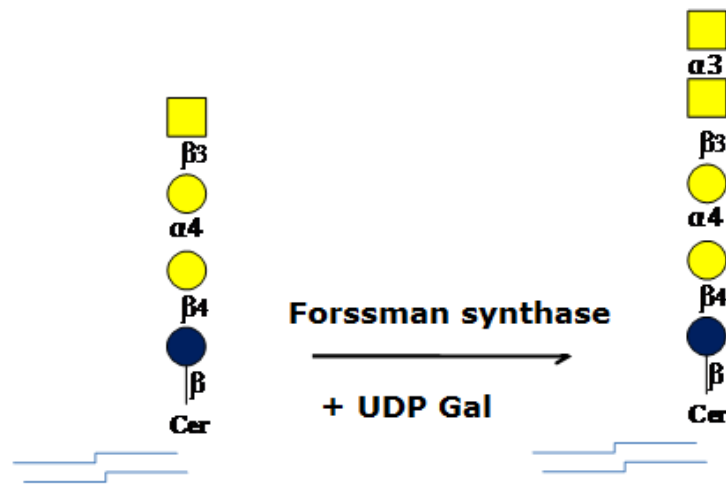
L'expression de l'enzyme $\alpha 1,3$ galactosyltransférase dans différentes espèces a permis d'établir une corrélation entre l'activité enzymatique et la présence d'anticorps contre cet épitope $\alpha 3$ Gal. En effet, comme pour le système ABO, les espèces n'exprimant pas l'antigène produisent naturellement des anticorps dirigés contre l'épitope $\alpha 3$ Gal [225]. Cet antigène pose donc un problème majeur dans les xénogreffes tissulaires du fait de la présence de forts titres en anticorps anti- $\alpha 3$ Gal dans le plasma humain. D'après Galili, l' $\alpha 1,3$ galactosyltransférase serait apparue il y a plus de 125 millions d'année, et suite à la séparation des continents américain «nouveau monde» et africain « ancien monde » une pression de sélection différente sur les populations aurait conduit à l'inactivation de cette enzyme chez les singes de l'ancien monde et l'Homme et à une conservation de sa fonctionnalité chez les autres mammifères. Cette pression de sélection aurait été exercée par un agent infectieux exprimant l'épitope $\alpha 3$ Gal. La perte par mutation de l'expression de l' $\alpha 3$ Gal a entraîné une perte de tolérance à cet antigène et l'apparition d'anticorps dirigés contre cet épitope. Ces anticorps auraient alors servi de défense naturelle vis-à-vis du pathogène permettant à la population de résister à l'infection. Les singes du nouveau monde n'ayant pas été soumis à cette pression de sélection auraient conservé l' $\alpha 1,3$ galactosyltransférase fonctionnelle [225].

-L'antigène iGb3

L'antigène iGb3 ou isoglobotriosylceramide est un antigène qui résulte de l'action d'une $\alpha 1,3$ galactosyltransférase qui greffe un galactose sur le précurseur Type 5 lactosylceramide. Cette enzyme est codée par le gène de l'iGb3S qui a été cloné chez le rat [226] mais qui n'est pas fonctionnel chez l'Homme. En conséquence l'iGb3 n'est pas décelé dans notre espèce bien que ce point soit débattu [227][228].

-L'antigène Forssman

Le dernier gène de cette famille code pour une $\alpha 1,3$ N-acétylgalactosaminyltransférase qui agit sur le globoside ou sur l'antigène P pour donner l'antigène Forssman (Figure 12). Les humains appartiennent à la catégorie des Forssman négatifs, alors qu'il a été trouvé chez la plupart des animaux domestiques [229].



Cer : céramide

Figure 12 : Biosynthèse de l'antigène Forssman

L'antigène Forssman, nommé aussi globopentaosylceramide est un glycolipide contenant le N-acétylgalactosamine (GalNAc) liée en $\alpha 1,3$ au GlcNAc du globoside grâce à l'action d'une $\alpha 1,3$ N-acétylgalactosaminyltransférase. Cet antigène a été retrouvé chez la plupart des espèces domestiques durant les stades embryonnaires et adultes mais en très faible quantité sur l'épithélium gastro-intestinal de l'Homme ainsi que sur plusieurs lignées humaines de carcinomes pulmonaires et gastrointestinaux (Essentials of Glycobiology, structures common to different glycans, Pamela Stanley and Richard D. Cummings). Le mécanisme de biosynthèse de cet antigène chez l'Homme est inconnu car le clonage du gène de la Forssman synthase a démontré que cette enzyme était inactive chez l'Homme [230]. La fonction de cet antigène est inconnue, alors que celle de l'anticorps perturbe la formation des jonctions serrées, la polarisation apicale-basale et l'adhérence des cellules. Cette molécule pourra participer alors au processus d'adhérence cellule-cellule et au processus de communication inter-cellulaire (Essentials of Glycobiology, structures common to different glycans, Pamela Stanley and Richard D. Cummings). Chez l'Homme des anticorps anti-Forssman peuvent être détectés dans le sérum en accord avec l'absence ou la très faible expression.

II.4 Les gènes des glycosyltransférases et leur polymorphisme

Comme nous venons de le voir, les antigènes ABH et Lewis et antigènes apparentés sont le résultat de l'action séquentielle de différentes enzymes (fucosyltransférases,

galactosyltransférases, galactosaminyltransférases) codées par de multiples gènes. Le polymorphisme de ces gènes est bien décrit chez l'Homme, mais reste encore très peu documenté chez les espèces animales, c'est pourquoi pour chaque enzyme nous décrirons les polymorphismes majeurs connus chez l'Homme et présenterons les connaissances actuelles dans les différentes espèces.

L'ensemble des glycosyltransférases a été classé sur la base des réactions qu'elles catalysent et de leurs homologues de séquence dans la base de données CAZY (carbohydrates Active Enzymes-<http://www.afmb.cnrs-mrs.fr/Cazy>). Les enzymes auxquelles nous nous intéressons plus particulièrement appartiennent aux familles GT6, GT10 et GT11.

II.4.1 Les gènes *FUT1* (H/h), *FUT2* (Se/se) et *SEC1* (famille GT11).

-Description chez l'Homme

Chez l'Homme, les α 1,2fucosyltransférases sont codées par deux gènes : le gène *FUT1* (gène H/h) et le gène *FUT2* (gène sécréteur, Se/se) situés sur le chromosome 19 dans la région q13.3 [231][232]. Le gène *FUT1* est composé de 8 exons et possède 3 sites possibles d'initiation de la transcription [233] et plusieurs variants d'épissage. *FUT2* n'est constitué que de 2 exons, présente un seul site d'initiation ATG et n'est pas épissé. Toutefois, pour ces deux gènes, la région codant l' α 1,2fucosyltransférase est comprise dans un exon unique : l'exon 8 pour *FUT1* et l'exon 2 pour *FUT2* [234]. Il existe un troisième gène d' α 1,2 fucosyltransférase le gène *Sec1*. Chez l'Homme, ce gène est un pseudogène qui code pour une protéine inactive de 246 acides aminés [235].

L'organisation des gènes *FUT1*, *FUT2* et *Sec1*, et le produit de ces gènes chez l'Homme sont représentées par la Figure 13. La même organisation générale est trouvée dans le génome des autres espèces de mammifères.

La non-fonctionnalité du gène *Sec1* observée chez d'autres espèces comme le chimpanzé, le gorille, le porc [236] et le rat [237] est le résultat de multiples mutations dégénératives (délétion, insertion, codon stop prématuré). Par contre, chez la vache, le gène *Sec1* est encore fonctionnel [238] comme chez le lapin [239].

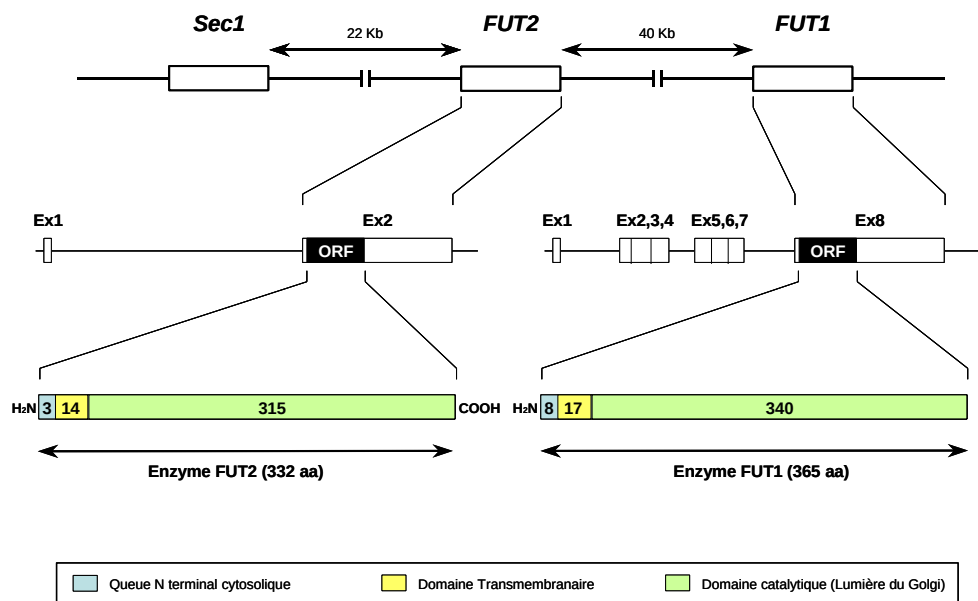


Figure 13 : Organisation des gènes des α 1,2fucosyltransférases dans le génome humain
 Structure des gènes *FUT1* et *FUT2* et représentation schématique des enzymes *FUT1* et *FUT2*.

D'après (Koda, 2001)[240]

Chacun des gènes *FUT1* et *FUT2* possède des allèles dominants (H et Se) codant pour une α 1,2fucosyltransférase et des allèles récessifs non fonctionnels (h et se). Ainsi, un individu présentant au moins un allèle Se fonctionnel (Se/se ou Se/Se) est défini comme « sécréteur » et présente les antigènes ABH dans sa salive et sur ces cellules épithéliales, alors que les sujets présentant le double allèle récessif (se/se) sont dits «non sécréteurs». Pour ce gène (*FUT2*) de nombreuses mutations responsables de l'inactivation de l'allèle Se ont été relevées. Ainsi, 20% de la population caucasienne est non sécrétrice liée principalement à la mutation G428A qui introduit un codon stop prématuré, alors que dans la population asiatique c'est la mutation non synonyme A385T qui est la plus fréquemment observée [240].

Pour le gène *FUT1*, les allèles non fonctionnels (h) sont beaucoup plus rares. Les individus homozygotes (h/h) ne présentent pas d'antigène H à la surface de leurs érythrocytes. Si ces mêmes individus sont non sécréteurs (se/se), ils sont dits de phénotype «Bombay» car l'antigène H est totalement absent de leur organisme. S'ils sont de statut sécréteur, ils sont dits de phénotype «parabombay». La fréquence de ces deux derniers phénotypes est très rare (1 individu / 400.000).

Particularités des gènes *Fut1*, *Fut2* et *Sec1* dans les différentes espèces animales

-Rat

L'expression des gènes *Fut1*, *Fut2* et *Sec1* a été bien caractérisée chez le rat. Piau et al ont été les premiers à isoler les deux gènes *FUTA* (=FUT1) et *FUTB* (=FUT2) codant pour une α 1,2fucosyltransférase [241], et plus tard Bureau et ses associés mettent en évidence un troisième gène, le gène *FUTC* (=Sec1) [237]. Ces gènes présentent la même organisation chromosomique que chez l'Homme et sont localisés sur le chromosome 1 [237]. Seuls les gènes *FUTA* et *FUTB* sont fonctionnels. En effet, le gène *FUTC* présente une délétion sur son premier codon ATG décalant l'initiation de la traduction et générant une enzyme inactive.

-Souris

Le premier gène d'une α 1,2 fucosyltransférase chez la souris a été cloné en 1997 par Domino et al [242]. L'homologie de séquence de 75% et de 55% avec les gènes *FUT1* et *FUT2* humains respectivement a conduit ces auteurs à considérer ce gène murin comme l'orthologue de *FUT1*. *Fut1* murin est localisé sur le chromosome 7. L'ARN messager est transcrit dans de nombreux tissus (Thymus, poumon, estomac, pancréas, intestin grêle, colon, utérus et épидидyme) [242]. En 2001, deux nouveaux gènes *MFUT-II* (=Fut2) et *MFUT-III* (=Sec1) codant pour une α 1,2fucosyltransférase sont identifiés. *MFUT-II* et *MFUT-III* présentent respectivement 79% et 74,9% d'homologie avec leurs orthologues humains. *MFUT-III* code une enzyme inactive [243].

-Porc

En 1996, Cohney est le premier à cloner un gène porcin d' α 1,2fucosyltransférase orthologue du gène *FUT1* humain et présentant une homologie de séquence peptidique de 81% [244]. Dans la même région du génome sur le chromosome 6, deux autres gènes, présentant une homologie de 85% avec la séquence nucléique de *FUT2* ont été identifiés. Le premier est l'orthologue de *Fut2* et l'autre n'est qu'un pseudogène *Sec1* (sFut2P) [236].

-Lapin

Trois gènes *RFT-I* (=Fut1), *RFT-II* (=Sec1) et *RFT-III* (=Fut2) codant pour une

α 1,2fucosyltransférase ont été mis en évidence [245]. *RFT-I* présente une homologie de séquence de 80% avec *FUT1* humain. L'ARN messager de *RFT-1* est détecté exclusivement dans le cortex cérébral, alors que ceux de *RTF-II* sont retrouvés dans les glandes salivaires et mammaires. L'activité enzymatique et l'expression tissulaire de RTF-II conduit Hitoshi et ses associés à proposer que ce gène soit l'orthologue de *FUT2*. Toutefois, la même équipe met en évidence un troisième gène RTF-III dont le produit présente plus d'homologie peptidique avec son orthologue *FUT2* (83%) que RFT-III (67%)[245]. RFT-III correspond en réalité à un orthologue fonctionnel du pseudogène humain *Sec1*. L'expression tissulaire de RFT-III semble être essentiellement localisée dans le côlon et dans une moindre mesure dans l'estomac et l'intestin grêle. Le lapin possède une expression tissulaire restreinte et spécifique pour chacun de ces trois gènes. Le polymorphisme des trois gènes d' α 1,2fucosyltransférase a été étudié dans des populations des lapins de régions Françaises par Guillon et ses associés [246]. *Fut1* semble peu polymorphe, *Fut2* présente un grand polymorphisme mais tous les allèles décrits codent pour des enzymes actives. Enfin *Sec1* est très polymorphe, les différents allèles codant pour des protéines dont les activités enzymatiques sont faibles ou nulles.

-Vache

Localisés sur le chromosome 18q24, les gènes codant pour les orthologues de *Fut1*, *Fut2* et *Sec1* avec respectivement 81%, 84% et 83% d'homologie dans leurs séquences nucléiques par rapport aux séquences humaines ont été identifiés et les produits de ces trois gènes caractérisés [238]. Ils codent tous pour une α 1,2 fucosyltransférase active. Par la technique de Northern blot, les transcrits du gène *Fut2* ont été décrits dans de nombreux tissus (rein, intestin, poumon, cerveau, cœur et rate), et c'est seulement grâce à la RT-PCR, technique plus sensible, que les auteurs ont mis en évidence des ARN messagers issus des gènes *Fut1* (rein, intestin, cerveau) et *Sec1* (Rein). L'organisation génomique de ces gènes est similaire à celle retrouvée chez l'Homme [247].

II.4.2 Le gène ABO des glycosyltransférases A et B (Famille GT6)

-Description chez l'Homme

Le locus *ABO* a été localisé chez l'Homme en 1976 par Fergusson sur le bras long du chromosome 9. Le gène *ABO* comprend 7 exons et 6 introns et s'étend sur plus de 18 kb. Le domaine catalytique est codé par les exons 6 et 7 (Figure 14).

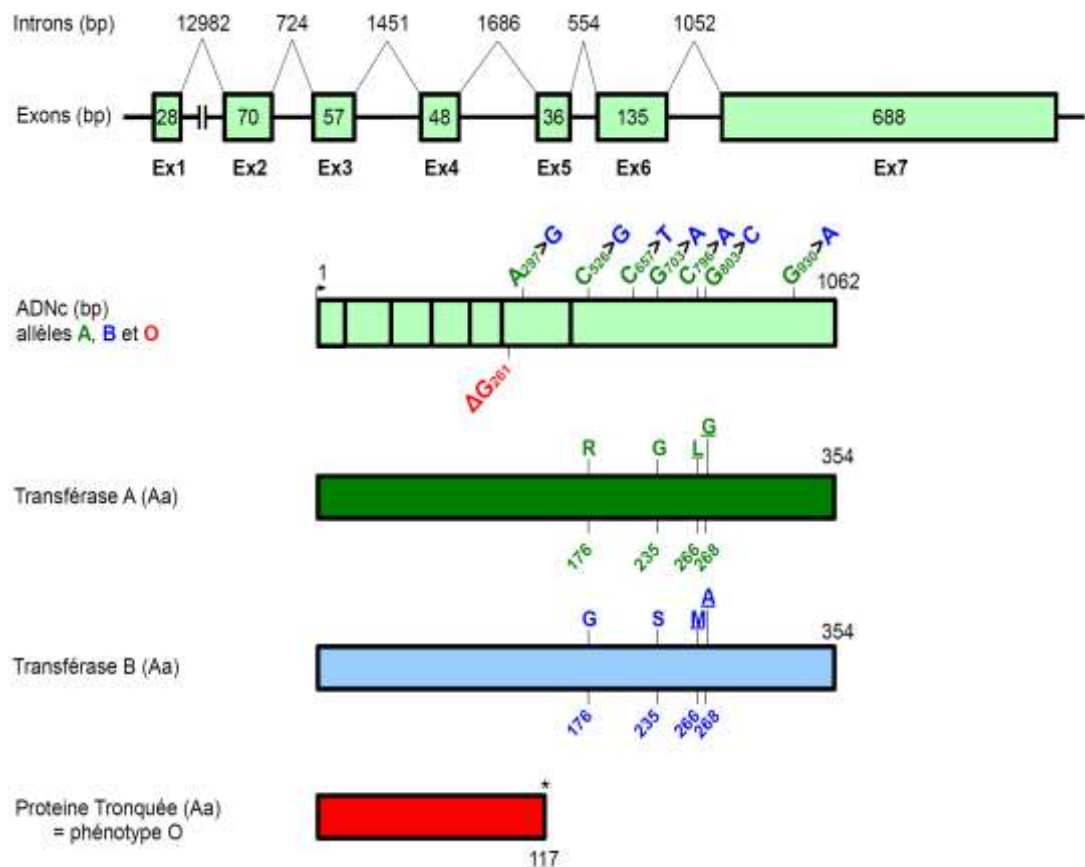


Figure 14 : Représentation schématique du locus *ABO*, de l'ADN complémentaire des allèles A, B et O, ainsi que de leur produit de traduction respectif

Les allèles A et B codent directement pour les glycosyltransférases A et B actives, alors que l'allèle O code pour une protéine inactive. L'analyse des séquences des allèles A et B montre une différence de 7 nucléotides aboutissant à la substitution de 4 acides aminés sur la séquence protéique [Résidu 176 : A = arginine et B glycine, Résidu 235 : A= glycine et B= sérine, Résidu 266 : A= leucine et B= méthionine, Résidu 268 : A= glycine et B= alanine] sur laquelle repose leur différence de spécificité, la glycosyltransférase A transférant un GalNAc et la glycosyltransférase B un Gal sur l'antigène H. La première délétion de l'allèle O décrite est celle d'un simple nucléotide en position 261 (ΔG) impliquant un changement de cadre de lecture, qui fait apparaître un codon stop. La protéine tronquée de 117 acides aminés n'a plus de domaine catalytique et donc d'activité enzymatique. Depuis, de nombreux autres allèles O ont été décrits [248].

Des études de mutagenèse dirigée ont permis de montrer que la nature des acides aminés en position 266 et 268 de la séquence de l'allèle A est critique quant à la spécificité de l' $\alpha 1,3$ glycosyltransférase [249]. En effet, la modification Leu/Met en 266 et plus encore celle en

268 Gly / Ala permettent de faire basculer la spécificité de l'enzyme vers l'un ou l'autre substrat (Gal ou GalNAc transférase) mais autorise aussi leur utilisation combinée dans certains cas conférant une activité A et B transférase (cis AB). Le séquençage du locus *ABO* a permis de mettre en évidence de nombreuses autres mutations expliquant l'existence chez l'Homme des nombreux sous groupes A et B ainsi que de nombreux allèles O. On distingue actuellement onze phénotypes A, six phénotypes B et quatre phénotypes Cis (AB).

Parmi les différents variants de A, les plus fréquents sont A₁ et A₂ ; A₁ étant plus dominant que A₂. Les deux enzymes A transfèrent la N-acétylgalactosamine sur H Type 1 ou H Type 2 mais l'enzyme A₁ est plus efficace que l'enzyme A₂. En outre, en plus de la différence de la quantité d'épitopes, les érythrocytes A₁ expriment le A Type 3 alors qu'ils ne sont pas exprimés sur les érythrocytes A₂. L'allèle A₂ présente une délétion d'un seul nucléotide avant le codon stop de l'allèle A₁, ayant pour résultat la rupture de ce codon non-sens et l'ajout de 21 acides aminés [249].

Parmi les individus de groupe O, les allèles les plus répandus sont O₁ et O₁ var (respectivement 54% et 40% des individus en Europe) présentant une délétion dans la partie N-terminale de l'ADNc au niveau de la position 261 entraînant un changement du cadre de lecture et donc la synthèse d'une protéine tronquée. O₂ est un deuxième type d'allèle produit par une délétion d'un nucléotide au niveau de la position 268, (la fréquence de cet allèle varie entre 2 et 7% dans la population en Europe, en Australie et aux Etats Unis [250][251]. O₂ n'a pas été trouvé chez les japonais ou les chinois [252][253].

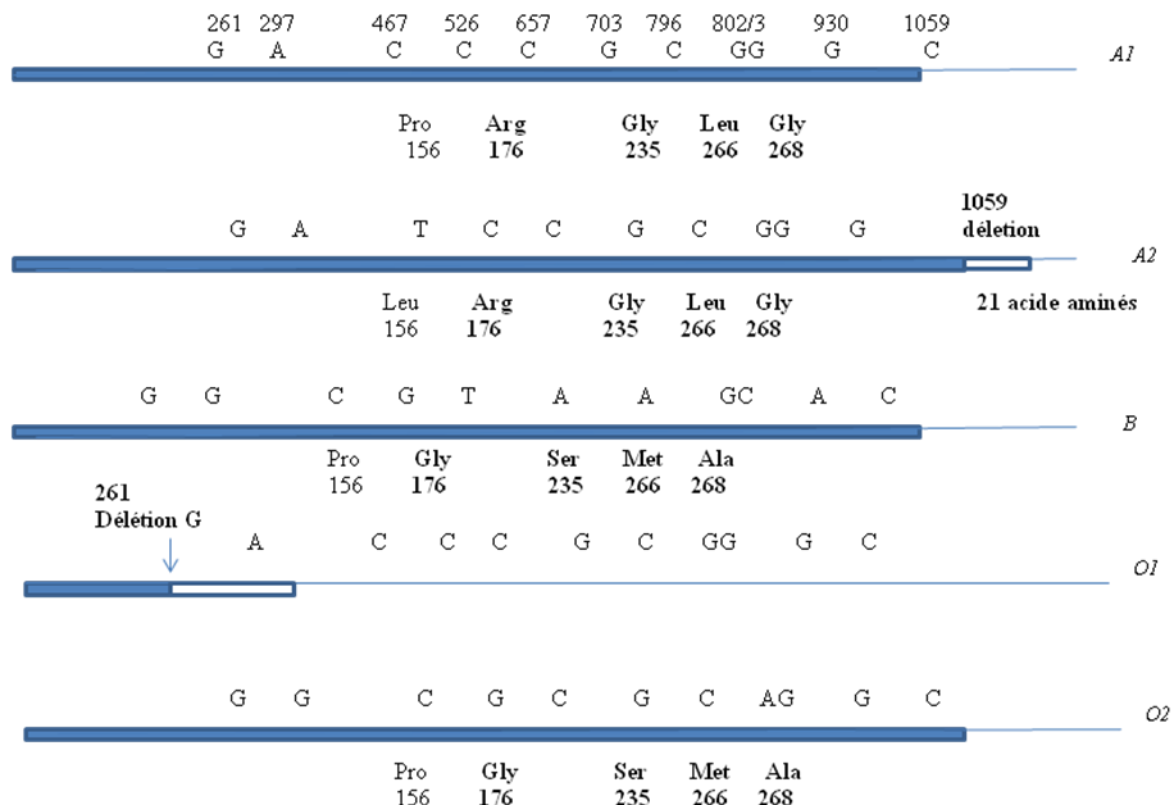


Figure 15 : Diagramme représentant l'ADNc des principaux allèles du gène ABO

7 nucléotides distinguent les allèles A des allèles B donnant lieu à 4 acides aminés différents entre la A-transférase et la B-transférase

Récemment, Yazer et ses collaborateurs (2008) ont montré que le système ABO n'est pas aussi simple. Bien que la majorité des allèles O produisent des protéines inactives, quelques exceptions peuvent apparaître occasionnellement et ces allèles peuvent alors conduire à la synthèse des antigènes A à des degrés faibles [254]. D'autres allèles O peuvent entraîner une confusion entre le génotype et le phénotype. Comme par exemple l'allèle O3 qui présente une insertion du nucléotide G au niveau 804 qui est également présente chez l'allèle A^{el}. Le phénotype A^{el} correspond à l'expression la plus faible de l'antigène A. O3 présente comme différence avec A^{el} un simple nucléotide caractérisant l'allèle A2. Cela signifie que si le système de génotypage ABO est conçu pour détecter le polymorphisme du simple nucléotide ajouté, l'allèle O3 apparaîtra par erreur comme un allèle A2. Le même principe peut être appliqué pour les allèles O4, O5, O6.

-Particularités du gène ABO dans les différentes espèces animales

La présence d'orthologues du gène *ABO* chez d'autres espèces que l'Homme a été mise en évidence pour la première fois en 1992 par Kominato. Il a utilisé pour ceci une technique d'hybridation entre l'ADN génomique de différents organismes et la séquence d'ADN complémentaire codant la transférase A humaine [255]. Il a observé une très bonne fixation de cette sonde sur le génome des singes de l'Ancien Monde (= Catarrhiniens), du marmouset, du chien, du chat, du lapin, du bœuf, du mouton, du rat, de la souris et du hamster, une plus faible hybridation sur le génome du poulet et une absence totale d'hybridation avec le génome d'espèces situées plus loin sur l'arbre phylogénétique (bactérie, levure, nématode, palourde, homard, mouche, oursin, grenouille). La structure du gène *ABO* est bien conservée entre l'Homme, le rat et le porc, alors que chez la souris l'exon 4 a été perdu.

-Rat

Chez le rat, le gène *ABO* est localisé sur le chromosome 3 en position q11-q12. L'étude de Cailleau Thomas sur l'expression du gène *Abo* chez le rat BDIX montre que les antigènes A et B peuvent être exprimés chez un même animal dans de nombreux organes et parfois même co-exprimés dans un organe mais avec une localisation cellulaire différente [256]. En réalité, il est apparu que le rat possède plusieurs copies du gène *ABO* présentes en tandem sur le chromosome 3 [257][258], dont une code pour la B transférase. Ce dernier gène a perdu l'exon 4. Chez cette espèce les antigènes A et B ne sont donc pas synthétisés par des enzymes codées par des allèles au même locus, mais par des produits de gènes paralogues.

-Souris

En 2001, Yamamoto a identifié le gène *Abo* murin et mis en évidence une enzyme possédant deux activités transférases A et B comme les produits des allèles Cis (AB) humains [259]. Le gène *Abo* de la souris est localisé sur le chromosome 2.

-Porc

La description du gène *Abo* chez le porc a été faite par Yamamoto et Meijerink en 2001 [260][261]. Ils montrent que ce gène présente 77% d'homologie avec la séquence nucléique du gène *ABO* humain et qu'il est localisé sur le chromosome 1. Dans cette espèce, le phénotype O est toujours associé à une délétion du gène *Abo* et aucun allèle B n'a été décrit.

-Lapin

La génétique du système ABO chez cette espèce n'est pas encore décrite. Il semble que tous les lapins expriment sur leur cellules épithéliales l'antigène B, et certains animaux sont aussi capables d'exprimer l'antigène A. Des travaux en cours de notre équipe indiquent qu'à l'instar du rat, le génome du lapin possède une série de paralogues *Abo* (K. Nyström, communication personnelle)

-Vache

Le gène *Abo* n'a pas été encore cloné chez les bovins. Cependant lors du séquençage du génome du bœuf, une séquence présentant une forte homologie avec le gène *ABO* humain a été décelée (NM-001077926) [262]. A l'heure actuelle, le polymorphisme de l'expression des antigènes ABH n'est pas décrit chez cette espèce.

II.4.3 Les autres gènes de la famille ABO (GT6)

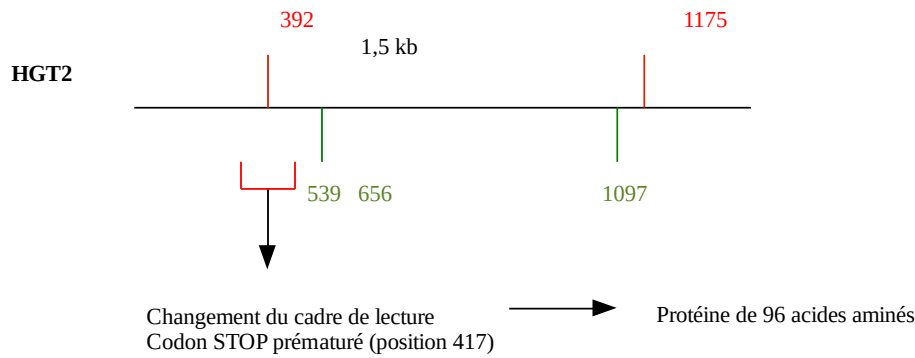
La comparaison de la séquence humaine du gène *ABO* avec celle d'espèces phylogénétiquement éloignées a montré de fortes similitudes avec d'autres gènes qui ne sont pas des orthologues du gène *ABO*. En plus des glycosyltransférases A et B, la famille GT6 regroupe actuellement 6 membres dont 3 nouveaux caractérisées par notre équipe en 2007. Cette famille peut être divisée en deux sous groupes principaux : *Abo* et *FS* d'une part, et *Gta1*, *iGb3S*, *GT6m5*, *GT6m6*, *GT6m7* et *GT6m8* d'autre part [263].

Description chez l'Homme

L' α 1,3 Galactosyltransférase

Chez l'Homme deux gènes homologues de l' α 1,3galactosyltransférase (*GGTA1*) ont été identifiés, un sur le chromosome 12 et un autre sur le chromosome 9 dans l'environnement du gène *ABO* [263]. Il s'agit de deux pseudogènes en accord avec l'observation que chez l'Homme aucun antigène α 3Gal n'a été mis en évidence sur les tissus par l'intermédiaire de la lectine Griffonia simplicifolia (GS1-B4) spécifique des groupements galactose terminaux en position α 1,3.

Chromosome 12



Chromosome 9

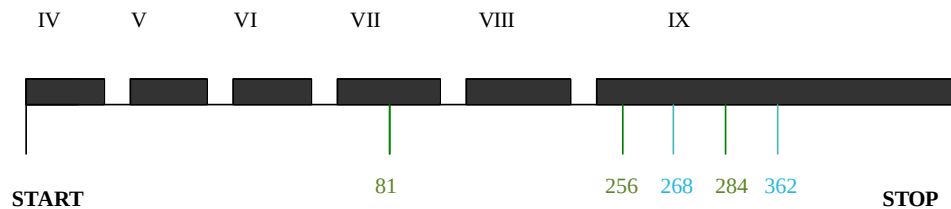


Figure 16 : Schématisation des gènes humains de l' α 1,3galactosyltransférase (GGTA1)

A: pseudogène rétrotransposé situé sur le chromosome 12. Cette séquence correspond au clone HGT. Elle est flanquée de deux séquences ALU de 21 acides aminés. Les délétions sont indiquées en vert et les insertions en rouge. B : pseudogène situé sur le chromosome 9. La notation des exons se fait par homologie avec la notation des exons de marmouset. Les délétions (changement du cadre de lecture) sont indiquées en vert et les mutations entraînant l'insertion d'un codon STOP précoce en bleu. D'après Joziassse et al. 1991[263] ; Koike et al. 2002)[264]

Sur le chromosome 12, le pseudogène est organisé comme un pseudogène issu de l'insertion d'un rétrovirus. De nombreuses mutations ont été identifiées, mais une insertion au niveau du nucléotide 392 entraîne un changement de cadre de lecture et un codon stop prématuré en position 417 conduisant à une protéine de 96 acides aminés beaucoup plus petite que l' α 1,3galactosyltransférase bovine (368 a.a.). D'autres délétions de nucléotides en position 539, 656, 1097 ou insertion en position 1175 ont été identifiées.

Sur le chromosome 9, l'équipe de Trucco a montré que ce pseudogène présentait une organisation exonique similaire au gène *GGTA1* de marmouset. Il présente aussi plusieurs

délétions entraînant un changement de cadre de lecture aux positions 81, 256 et 284 et deux codons STOP prématurés. Ce gène n'est donc pas fonctionnel chez l'Homme [264].

La Forssman Synthase

La Forssman synthase présente 42% d'homologie avec la glycosyltransférase A et 35% d'homologie avec l' α 1,3galactosyltransférase [265]. En 1999, la même équipe identifie le gène codant pour la Forssman synthase humaine, il est localisé sur le chromosome 9q34 et est organisé en 7 exons comme les autres familles de GT6 [230]. Aucune activité enzymatique n'a pu être mise en évidence. Une mutation dans le domaine catalytique de l'enzyme humaine était responsable de son inactivation expliquant pourquoi l'antigène Forssman n'est pas exprimé chez l'Homme.

L'isoglobotrihexosylcéramide synthase

Un orthologue du gène de l'iGb3 synthase est présent chez l'Homme sur le chromosome 9q34. Il n'a pas été possible jusqu'à présent de cloner des ADNc correspondant à des ARNm correctement épissés (J Le Pendu, communication personnelle). Une étude récente du groupe de M. Sandrin a montré que le produit de fusion du domaine catalytique de l'enzyme humaine avec les domaines complémentaires de l'iGb3S du rat est dépourvu d'activité catalytique [266]. Ces résultats suggèrent que le gène *iGb3S* humain est un pseudogène [228].

-Particularités du gène de l' α 1,3galactosyltransférases dans les différentes espèces animales

L' α 1,3galactosyltransférase a été purifiée la première fois à partir du thymus d'un veau [267]. Elle a été ensuite identifiée chez d'autres espèces comme la souris, le cochon, le chien, le rat [266].

Rat et souris

Les travaux de Taylor chez le rat ont permis de mettre en évidence qu'il existait deux gènes, l' α 1,3GT et l'*iGb3S* codant pour une α 1,3galactosyltransférase, l' α 1,3GT étant l'orthologue de l' α 1,3GT décrit dans d'autres espèces [266][268][269][270]. La séquence

génomique et la structure génétique chez le rat est très proche de celle de la souris. Ce gène est organisé en 9 exons dont 6 codants et présente une large région 3' non codante. L' α 1,3galactosyltransférase codée par ce gène présente une homologie de séquence peptidique supérieure à 70% avec celle des autres espèces (souris, porc) alors que l'homologie de séquence est inférieure à 40% avec l'iGb3S synthase. L'ARNm de ces deux gènes est exprimé dans les mêmes tissus (cœur, cerveau, rate, poumon, rein).

-Porc

L' α 1,3galactosyltransférase porcine est localisée sur le chromosome 1 (1q2.10-q2.11). La région codante est formée de six exons comme chez la souris et la longueur de chaque exon est conservée entre les deux espèces. Les exons porcins sont désignés de 4 à 9. Les introns tendent à être plus longs, la distance de l'exon 4 à la région 3' de l'exon 9 est de 24 kb alors que cette région chez la souris est de 18 kb [271].

Bovin

L' α 1,3galactosyltransférase bovine est localisée sur le chromosome 11q26. Elle contient six acides aminés liés à un domaine transmembranaire de 16 acides aminés. La région E80-V368 de l' α 1,3galactosyltransférase partage un grand degré d'homologie avec les α 1,3glycoltransférases responsables de la synthèse de l'antigène Forssman, de l'isogloboside et des antigènes A et B (44-50% d'identité) [230][226][249].

II.4.4 Nouveaux membres de la famille GT6 (GT6m5, m6, m7 et m8)

Les 3 gènes *GT6m5*, *GT6m6*, *GT6m7* sont présents chez le rat et la souris. Les transcrits de *GT6m5* et *GT6m6* sont détectés dans les différents tissus de rat : langue, foie, glandes salivaires, bulbe olfactif [262].

Le gène *GT6m5* est constitué de 5 exons codants pour une protéine transmembranaire de type II, qui présente 49% d'homologie avec *GGTA1*. Le gène *GT6m6* est réparti sur 5 exons codants et présente 57% d'homologie avec *GGTA1* et le gène *GT6m7* est réparti sur 6 exons. Une localisation chromosomique a montré que *GT6m5* et *GT6m6* sont situés sur le chromosome 3p11 du rat, proche de *GGTA1*. Le gène *GT6m7* est localisé sur le chromosome 3p13, proche des gènes *Abo* et *FS*. Ce chromosome est orthologue du chromosome humain

9q34, qui porte les gènes de la famille GT6. Chez l'Homme, seul le gène *GT6m7* est présent, mais il possède un codon stop précoce. Chez les poissons, un troisième sous groupe *GT6m8* qui ne semble pas avoir d'orthologue chez les autres vertébrés est mis en évidence [262].

II.4.4 Les gènes des α 1,3/ α 1,4fucosyltransférases (Famille GT10)

-Description chez l'Homme

Huit gènes d' α 3/4 fucosyltransférases ont été identifiés (*FUT3*, *FUT4*, *FUT5*, *FUT6*, *FUT7*, *FUT9*, *FUT10* et *FUT11*) correspondant à des α 1,3 ou α 1,4fucosyltransférases possédant des propriétés catalytiques et des profils d'expression tissulaire distincts (Tableau VII).

Les deux fucosyltransférases *FUT3* (Enzyme Lewis) et *FUT5* peuvent utiliser les précurseurs de Type 1 et de Type 2 permettant la synthèse des antigènes Le^a (fucose en α 1-4), Le^x (fucose en α 1-3). *FUT3* a cependant une affinité supérieure pour les chaînes de Type 1 alors que *FUT5* présente une affinité supérieure pour les chaînes de Type 2. Ces deux enzymes peuvent aussi utiliser des précurseurs sialylés pour donner les antigènes sialyl- Le^a , sialyl- Le^x [285]. L'activité de *FUT3* se retrouve principalement dans l'épithélium digestif et les sécrétions alors que *FUT5* est exprimée principalement dans le pancréas, le colon, les testicules et sous forme de traces dans le foie.

Les enzymes *FUT4*, *FUT6*, *FUT7* et *FUT9* sont capables de greffer un résidu fucose exclusivement sur le précurseur Type 2 [283]. L'activité de *FUT4* a été retrouvée dans le cerveau et les leucocytes [272], celle de *FUT6* (enzyme plasmatique) dans les tubules proximaux du rein et dans les hépatocytes, *FUT7* dans les leucocytes et *FUT9* dans le cerveau, l'estomac, la rate et les leucocytes. Bien qu'elles transfèrent toutes une fucose en position α 1,3 sur le GlcNAc du précurseur de Type 2, ces quatre enzymes présentent des différences de spécificité. Ainsi *FUT9* synthétise préférentiellement l'antigène Le^x ou ses formes répétitives sur des polylactosamines, tandis que *FUT7* ne peut utiliser que le précurseur de Type 2 sialylé contribuant à la synthèse exclusive de sialyl- Le^x [286]. Le rôle de *FUT10* et *FUT11* n'est pas très clair. Mollicone et ses associés ont récemment démontré que ces deux enzymes partagent les deux principaux motifs de l' α 1,3fucosyltransférase et sont

plus anciennes que les α 1,3fucosyltransférases monoexoniques (FUT3-FUT7-FUT9). FUT10 transfère un α -L-fucose sur le GlcNAc des chitobioses, à la glycoprotéine conalbumine ou aux dérivés de glycopeptides mais pas à un lactosamimyl, l'accepteur de FUT3, FUT7 et FUT9. L'accepteur de FUT11 est inconnu jusqu'à présent [284].

Les études de la localisation chromosomique des gènes des α 1,3/ α 1,4 fucosyltransférases montrent qu'ils sont localisés sur 3 chromosomes différents. Les gènes *FUT3* (*Lewis*), *FUT5* et *FUT6* sont regroupés sur le bras court du chromosome 19 en position 13.3, le gène *FUT4* se situe sur le bras long du chromosome 11 et le gène *FUT7* sur le chromosome 9. Les gènes *FUT3* (*Lewis*), *FUT5* et *FUT6* présentent une forte homologie (identité de 90% entre eux), et une homologie de 40% avec *FUT4* et *FUT7*. De nombreuses mutations ont été à ce jour décrites sur ces gènes; et particulièrement sur les gènes *FUT3*, *FUT5* et *FUT6*. Ces mutations peuvent être silencieuses ou au contraire entraîner un phénotype Lewis négatif. Pour *FUT3*, la fréquence de ces mutations inactivantes est élevée, alors qu'elle est rare pour *FUT6* et *FUT7*. Aucune mutation inactivante n'a été actuellement décrite pour *FUT4* et *FUT9*. *FUT10* est localisé sur le chromosome 8 et présente 3 variants codant pour 3 α -L-fucosyltransférases isomorphes et deux variants pour la FUT11, dont le gène est localisé sur le chromosome 10. Comme nous l'avons déjà vu, les antigènes Lewis peuvent être mono ou difucosylés, ce qui implique une interaction entre les fucosyltransférases FUT2 et FUT3 et donc entre leurs polymorphismes génétiques respectifs. Les gènes *FUT2* (*SE*) et *FUT3* (*Le*) s'expriment dans les mêmes types cellulaires, la combinaison de ces deux systèmes Se/se et Le/le donne lieu à une variété de phénotypes chez l'Homme.

Tableau VII : Caractéristiques des gènes et enzymes de la famille Lewis (*GT10*)

Nom	Enzymes			Gènes	
	Précurseur reconnu	Antigènes synthétisés	Expression tissulaire	Localisation chromosomique	Polymorphismes (nucléotides mutés)
FUT3 Lewis	Type 1++++; Type2 : +/- [272]	Le ^a , Le ^b , SLe ^x >> Le ^x , et Le ^y , SLe ^x	Plasma Sécrétions	19 p13.3 [272]	59T-G [273][274] 202T-C [275][276] 314C-T [277] 455C-A [273][274] 508G-A [273][274] 1047T-A [278] 1067T-A [274][278][276] 304C-A 484G-A, 667G-A, 808G-A [279]
FUT4 Myeloïde	Type 2 [272]	Le ^x SLe ^x	Leucocytes, cerveau embryon	11q21 [272]	
FUT5	Type 2 +++ Type 1+/- [272]	Le ^x , Le ^y , SLe ^x >> Le ^a Le ^b , SLe ^x	Pancréas, colon, testicule, traces dans le foie	19p13.3 [272]	12C-A, 517T-C, 560T-C 1013T-C [280], 1155del G- Stop [280]
FUT6 Plasmatique	Type 2 [272]	Le ^x , Le ^y , SLe ^x	Plasma, foie, rein	19p13.3 [272]	370T-C [275] 738C-T [281] 739G-A [280] 855G-A [281] 945A-C [280]977G-A [281]
FUT7 Leucocytaire	Type 2 [272]	SLe ^x	Plasma, foie, leucocytes	9q34 [232]	329G-A
FUT9	Type 2 [282]	Le ^x , et Le ^y	Cerveau	9q16 [283]	-
FUT10	-		Embyon cerveau, langue, tube digestif	8p12 [284]	FUT10-391 FUT10-419 FUT10-479 [284]
FUT11	-		-	10q22.2 [284]	FUT11-476 FUT11-492 [284]

-Particularités des gènes Lewis dans les différentes espèces animales

-Bovin

Un seul gène chez le bovin (*Futb*) correspondant au cluster des gènes *FUT3*, *FUT5* et *FUT6* de l'Homme et du chimpanzé a été identifié [287][288]. Les orthologues de *Futb* ont été identifiés chez la souris [289] et le hamster [290]. Il est localisé sur le chromosome 7 (7q15). L' α 1,3fucosyltransférase codée par ce gène présente une homologie de séquence peptidique de 67.3, 69 et 69.3 respectivement avec les fucosyltransférases *FUT3*, *FUT5* et

FUT6 humaines [290][291]. L'enzyme Fuc-Tb bovine agit sur le précurseur de Type 2 comme une enzyme FUT6 (α 1,3fucosylation); la liaison α 1,4 étant absente chez cette espèce. Dans le règne animal de façon générale, elle semble restreinte notamment aux primates. Une mutation ponctuelle dans une séquence hautement conservée conduisant à la substitution d'une arginine par un tryptophane a été à l'origine de l'apparition de la fonction d' α 1,4fucosylation au cours de l'évolution du gène *FUT3* chez les primates. Cette fonction serait apparue tardivement au cours de l'évolution animale puisque seulement rencontrée chez certains primates à la suite de deux évènements de duplication [292].

-Porcin

Un gène d' α 1,3 / α 1,4fucosyltransférase (FUT3; galactoside 3(4)-L-fucosyltransférase) a été identifié chez le porc (Meijereink E, 1999 unpublished). Ce gène est localisé sur le chromosome 2 (2q2.1-q2.2). Toutefois, l'activité catalytique de l'enzyme correspondante n'a pas été caractérisée.

II.4.5 Les gènes des sialyltransférases

Les mammifères possèdent trois types d'activité sialyltransférases l'une générant des résidus acides sialiques en position α 2,3 lié à un β -galactoside, une autre en position α 2,6 lié à un β -N-acétylgalactosaminy (GalNAc) ou à un β -N-acétylglucosaminy (GlcNAc). Les acides sialiques peuvent également être liés en position α 2,8 à un autre résidu d'acide sialique sur certains gangliosides et dans un acide polysialique. Au cours de ma thèse je me suis intéressée à l'acide sialique lié en position α 2,3 généré par l'enzyme ST3Gal (Tableau VIII).

Tableau VIII : Les différentes ST3Gal
D'après Anne Harduin-Lepers [293]

Sialyltransférases	Structure formée	Location du gène (chromosome)	cDNA	Références
ST3GalI	Neu5Aca2-3Galβ1-3GalNAc	8q24	Placenta	[294]
			Gène	[295]
ST3GalII	Neu5Aca2-3Galβ1-3GalNAc	16	Foie	[296]
			CEM	[297]
ST3GalIII	Neu5Aca2-3Galβ1-3/4GlcNAc	1(p34-p33)	Placenta	[298]
ST3GalIV	Neu5Aca2-3Galβ1-4GlcNAc	11(q23-24)	Placenta	[298]
	Neu5Aca2-3Galβ1-3GalNAc		Lymphome B	[299]
ST3GalIV	Neu5Aca2-3Galβ1-4Glc-Cer	2	Gène	[300]
			HL60	[301]
ST3GalVI	Neu5Aca2-3Galβ1-4GlcNAcβ	3	SK-MEL-37	[302]

Six sialyltransférases ST3Gal I à VI ont été identifiées chez l'Homme. Comme pour les fucosyltransférases, la spécificité des sialyltransférases diffère vis-à-vis des précurseurs. ST3GalI et II préfèrent les précurseurs Type 3 et Type 4, ST3GalIII préfère le type I alors que ST3GalIV préfère le Type II. ST3GalIII génère l'antigène sialyl-Le^a, ST3GalIV et VI génèrent plutôt la synthèse de sialyl-Le^x (voir Figure 10). Les séquences codantes des sialyltransférases sont contenues dans de multiples exons et dispersées dans le génome humain à l'exception des gènes de la ST6GalNAc qui sont regroupés sur le chromosome 17 (17q25.1). ST3GalIII et ST3GalIV sont exprimés dans la plupart des cellules adultes des mammifères. ST3GalI est plutôt exprimé dans le foie, la rate, le thymus, les glandes salivaires. ST3GalII est abondante plutôt dans le cerveau, le squelette, le muscle et le foie.

II.5 Distribution tissulaire des antigènes ABH, Lewis et apparentés

L'étude de l'expression des HBGAs montre que d'un point de vue phylogénétique, ils sont présents tout le long de la chaîne animale depuis les batraciens jusqu'aux mammifères [272]. Chez l'Homme, leur expression est régulée au cours du développement. Aussi, la conservation de ces antigènes au cours de la phylogenèse laisse à penser que ces antigènes ne sont pas de simples marqueurs mais ont réellement un rôle ou des rôles biologiques à jouer. Nous étudierons donc dans cette partie la répartition tissulaire de ces antigènes chez l'Homme et les différentes espèces animales pour envisager ensuite leurs éventuelles fonctions.

II.5.1 Distribution tissulaire chez l'Homme

Très rapidement après leur découverte à la surface des globules rouges, les HBGAs ont été mis en évidence dans la salive puis dans de nombreux tissus humains en particulier sur les cellules épithéliales et endothéliales. Leur distribution dans les tissus humains est sous le contrôle de processus complexes résultant de l'interaction des différentes glycosyltransférases codées par des gènes différents suivant les tissus. Cependant, le contrôle génétique de l'expression de ces antigènes d'après Oriol suit leur origine embryonnaire [287]. Ainsi, les tissus épithéliaux et les sécrétions exocrines dérivés des tissus de l'endoderme expriment les antigènes ABH sous le contrôle des gènes *ABO* et *Se/se* (*FUT2*) et *Le/le* (*FUT3*), alors que les tissus d'origine mésodermique les expriment sous le contrôle des gènes *ABO* et *H/h* (*FUT1*). Sur les cellules musculaires, dans le tissu conjonctif, dans le cerveau et dans le parenchyme hépatique, ces antigènes sont totalement absents. Il faut aussi noter que l'expression tissulaire varie au cours du développement et peut aussi varier en fonction de l'état de maturation des cellules. Nous décrivons ici la répartition tissulaire chez l'adulte. Une analyse détaillée de l'expression de ces antigènes a conduit Ravn et Dabelsteen à remettre en cause cette hypothèse et à proposer que le contrôle génétique de l'expression de ces antigènes dépendait non pas de l'origine embryonnaire des cellules mais de leur type de différenciation [211].

-Tissus épithéliaux et sécrétions exocrines.

La quasi-totalité des muqueuses du tractus digestif sauf la partie terminale de la muqueuse du colon exprime les épitopes ABH sous le contrôle des gènes *ABO* et *FUT2*. Le gène *FUT3* est exprimé tout au long du tractus digestif, on trouve alors les antigènes Lewis (Le^b ou Le^a) dans ces tissus. Seules, les glandes pyloriques et les glandes de Brünner expriment les antigènes ABH Type 2 indépendamment du gène *FUT2* et de *FUT3* et donc vraisemblablement sous contrôle de *FUT1* et d'une α 1,3fucosyltransférase comme *FUT5*, *FUT6* ou *FUT9*. Ces antigènes sont également retrouvés dans les canaux pancréatiques et biliaires, les grosses bronches, l'épithélium urinaire, la muqueuse conjonctivale, la prostate, les vésicules séminales, les glandes sudoripares, les glandes mammaires et dans les sécrétions de ces tissus. Dans la majorité de ces organes, on retrouve à la fois des antigènes basés sur des précurseurs de Type 1 et 2 synthétisés par l'intermédiaire des gènes *ABO*, *FUT2* et *FUT3*.

-Cellules sanguines et endothélium vasculaire.

Les épitopes ABH sur le précurseur de Type 2 sont majoritaires à la surface des globules rouges et des plaquettes, même si une faible quantité d'épitope A Type 3 ou 4 peut être détectée sur certaines hématies [219]. Ils sont sous le contrôle des gènes *ABO* et *FUT1*. Les globules blancs n'expriment pas d'antigènes ABH intrinsèques. Sur la totalité de l'endothélium vasculaire humain, des antigènes ABH Type 2 sont exprimés. Par ailleurs des glycolipides circulants porteurs des spécificités ABH ou Lewis sont adsorbés en quantité limitée sur tous les types de cellules sanguines.

-Autres tissus

Ces antigènes ont également été retrouvés sur l'épiderme humain ainsi que dans le bulbe olfactif. Aucune expression n'a été mise en évidence dans le système nerveux périphérique, sauf sur certains neurones des ganglions dorsaux para-vertébraux. Les muscles lisses ou striés, le squelette et les tissus conjonctifs sont totalement dépourvus d'HBGAs.

II.5.2 Distribution tissulaire dans les autres espèces animales

La présence d'équivalents des HBGAs et antigènes apparentés ont été décrits dans de nombreuses espèces (félins, ovins, caprins, marsupiaux, reptiles, rongeurs, oiseaux...) cependant pour la majorité des espèces peu de données précises sont disponibles.

En fonction de la présence ou non de ces antigènes sur l'endothélium vasculaire et/ou sur les cellules épithéliales exocrines mis en évidence à l'aide de lectines spécifiques, 3 catégories d'espèces peuvent être définies (Tableau IX) [287].

Tableau IX : Distribution tissulaire des antigènes A, H, α Gal et NeuAc

La présence des HBGAs est mise en évidence respectivement par les lectines HPA, UEA, GS1B4 et MAA dans différentes espèces. D'après Oriol 1999 [287]

Espèce	Endothélium vasculaire				Cellules épithéliales exocrines			
	A	H	α Gal	Neu Ac	A	H	α Gal	Neu Ac
Homme	+++	++	-	+	+++	++	-	+++
Singes ancien monde (Babouin, singe vert)	+++	+/++	-	+	+++	++	-	+/+++
Singes nouveau monde	-	-	+	+	+++	++	++	+++
O. Rongeurs (hamster, rat, souris)	-	-	+	++	+++ /++	+++ /++	+++ /+	+++
O. Carnivores (Chien)	-	-	++	++	+++	++	+++	+++
F. des bovidés (Vache, mouton, chèvre)	-	-		++	+++	+++ /++	+++	+++
F. des suidés (Porc)	-	-	++	++	+++	++	+++	+++
O. Lagomorphe (lapin)	-	-	+	++	+++	++	+++	+++
O. Marsupiaux (Wallaby)	-	-	+	++	++	-	+++	+++
O. Gallinacées (dindon, poulet)	-	-	-	++	+++	-	-	+++
O. Ratite (Autruche, emeu)	-	-	-	+	++	-	-	+++
O. Crocodile (Alligator)	-	-	-	+	+++	+++	-	+++

La première catégorie regroupe les Hommes et les singes de l'ancien monde qui expriment tous ces antigènes sauf l'antigène α 3Gal sur les cellules endothéliales vasculaires et les cellules épithéliales. La seconde catégorie regroupe des mammifères exprimant tous ces antigènes sur les cellules épithéliales, et qui expriment uniquement les antigènes α 3Gal et sialylés sur les cellules de l'endothélium vasculaire. La troisième catégorie regroupant les oiseaux et les reptiles n'exprime aucun de ces antigènes sur les cellules de l'endothélium vasculaire qui présente des antigènes sialylés. Les cellules épithéliales de reptile peuvent

exprimer l'antigène H. Concernant la réactivité de la lectine HPA, il convient de noter qu'elle ne reconnaît pas exclusivement l'antigène A. La réactivité de cette lectine chez les oiseaux et reptiles est vraisemblablement due à l'antigène Forssman dont le gène est présent chez ces espèces [262].

Chez l'Homme, la localisation précise des antigènes ABH au niveau des différents tissus est bien documentée, et de nombreuses études montrent que l'expression de ces antigènes est sous le contrôle de processus génétique complexe. En revanche, dans les espèces animales, les études précises concernant l'expression tissulaire des antigènes ABH et éventuellement Lewis chez les animaux sont limitées, hormis les primates pour lesquels ces études apportent des données fondamentales dans le cadre du développement des xénotransplantations.

		Epithélium digestif	Epiderme	Récepteurs olfactifs	Endothélium vasculaire	Erythrocytes
Anoures		+	-	-	-	-
Reptiles		+	-	-	-	-
Rat		+	+	+	-	-
Lapin		+	-	-	-	-
Marmousets		+	+	+	-	-
Babouins		+	+	+	+	-
Grands singes anthropoïdes		+	+	+	+	+

Figure 17 : Distribution tissulaire des antigènes de groupe sanguin chez différentes espèces de vertébrés.
(D'après Oriol et coll. 1992)[303]

-Etudes spécifiques documentées dans les différentes espèces (rat, bovin, porcin)

Chez le rat, l'expression tissulaire des gènes *Abo* a particulièrement été étudiée par notre équipe sur des rat BDIX [256][258]. L'étude de l'expression de l'ARNm des gènes *Abo* et des antigènes ABO montre que l'antigène A s'exprime nettement dans certains tissus : langue, œsophage, estomac, colon, caecum, pancréas, glandes parotides, glandes sous maxillaires, glandes thyroïde et parathyroïde, le thymus et l'utérus. En revanche, au niveau de l'intestin

grêle, du foie, de la trachée, du poumon, de l'ovaire, du testicule, du cerveau, de la peau et des ganglions, aucune expression de l'antigène A, et d'ARNm n'est mise en évidence. Au niveau du rein, de la vessie, et plus faiblement au niveau du muscle et de la rate, des ARNm sont détectées. L'antigène B quant à lui semble être exprimé dans un moins grand nombre d'organes (estomac, caecum, colon, pancréas, glandes sous maxillaires). Il est par contre exprimé dans le rein, organe où l'antigène A n'a pas été retrouvé. Dans les tissus où les antigènes A et B coexistent, leur distribution cellulaire est en général différente. De manière surprenante l'expression de l'ARNm du gène B (*Abo*) semble ubiquitaire.

Chez les porcs, l'étude de Linda Saif montre la distribution des antigènes H et A dans les tissus intestinaux et buccaux [304]. Les porcs A⁺ présentent une positivité de cet antigène au niveau de la surface apicale des entérocytes, du cytoplasme des cellules caliciformes, des cryptes cellulaires, des glandes de Brünner du duodénum mais pas au niveau des tissus de jéjunum et de l'iléon bien que chez certains porcs, cet antigène soit présent dans certaines cellules caliciformes et entérocytes. La présence des HBGAs dans les parties distales n'est pas identifiée chez les porcs âgés de 5 à 50 jours. Dans les tissus buccaux, l'expression de l'antigène A est observé dans les couches épineuses de l'épithélium buccal et dans les glandes salivaires. Chez les porcs H⁺, l'antigène H est exprimé au niveau des surfaces apicales, des cryptes cellulaires, des cytoplasmes des cellules caliciformes et des glandes de Brunner. Les porcs H⁺ n'expriment pas l'antigène A. Il n'a pas été identifié des porcs H⁺ et A⁺ indiquant que chez les porcs A⁺, le précurseur H Type 2 est masqué par l'ajout du terminal GalNAc [305]. On distingue entre des porcs A⁺, H⁺ et A-H⁻. L'expression de H Type 1 et H Type 2 varie en terme de distribution et de quantités dans les tissus buccaux et intestinaux pour chaque porc. H Type 2 est exprimé fortement au niveau de la couche des cellules parabasales et faiblement dans les glandes salivaires. H Type 1 est exprimé dans les mêmes sections que H Type 2 ou dans les mêmes tissus mais dans certains cas H Type 1 n'est pas exprimé [304]. L'antigène Le^y n'a pas été décelé chez porc.

Chez les bovins, une seule étude présente la distribution des HBGAs [306]. Ces auteurs montrent la présence d'ARNm du gène *Futb* (= *FUT3*, *FUT5*, *FUT6*) dans le foie, les reins, les poumons et le cerveau et décrivent la présence d'HBGAs sur les différents organes (tableau X). Ils notent que l' α 1,3fucosyltransférase bovine ne peut greffer des résidus fucose que sur des précurseurs de Type 2.

Les données chez les deux espèces d'intérêt pour notre travail (vache et porc) étant peu documentées, une partie de notre travail a consisté à caractériser par immunohistochimie en utilisant des anticorps monoclonaux l'expression des HBGAs le long du tube digestif chez ces deux espèces (partie expérimentale).

Tableau X : Détection des épitopes oligosaccharides dans les tissus bovins
D'après Oulmouden 1997 [306]

Chaîne		Type 1			Type 2					
Épitope		Le ^a	Le ^b	Sialyl Le ^a	Le ^x	Le ^y	Sialyl Le ^x	H	αGal	Antigène A
Ac ou lectine		9Le	2.25 Le	19.9	82H5	75.12	KM93	UEAI ⁽¹⁾	GSIB4 ⁽²⁾	O13
Endothélium vasculaire, érythrocytes et leucocytes		-	-	-	-	-	-	-	++	-
Pancréas	Acini	-	-	-	-	-	-	-	+	-
	Canaux	-	-	-	-	-	-	+/-	+++	-
Tubules rénaux	Proximal	-	-	-	-	-	-	-	+	-
	Distal	-	-	-	-	-	- ⁽³⁾	-	-	-
Foie	Hépatocytes	-	-	-	-	-	-	-	+++	-
	Canaux biliaires	-	-	-	-	-	+	-	+/-	-
Poumon	Épithélium bronchique	-	-	-	-	-	-	+/-	+++	-
Intestin grêle	Bordures en brosse	-	-	-	+++	++	-	-	+++	-
	Cellules caliciformes	-	-	-	-	-	-	-	++	+
Côlon	Bordures en brosse	-	-	-	++	++	-	+/-	+	+++
	Cellules caliciformes	-	-	-	-	-	-	+	+++	+++

(1) Iso-lectine UEA-I (*Ulex europaeus*) reconnaît principalement H Type 2

(2) Iso-lectine GSI-B4 (*Griffonia simplicifolia*) reconnaît l'épitope Galα3Gal

(3) Les cellules épithéliales de la macula densa sont +/- positives

III-Interaction Norovirus-HBGAs

L'infection par des agents pathogènes est généralement initiée par la reconnaissance spécifique et l'adhérence sur les cellules épithéliales. Ces deux processus sont essentiels pour l'invasion. Dans leur stratégie d'infection, les micro-organismes utilisent souvent des protéines telles que des lectines et des adhésines, pour reconnaître et s'attacher aux glycoconjugués présents sur la surface des cellules-hôtes.

La plupart des glycanes récepteurs ou corécepteurs viraux sont chargés négativement dépendant de la charge des acides sialiques, des sulfates d'héparane ou des glycosaminoglycannes, comme on le voit dans le Tableau XI. En revanche, on connaît peu d'exemples de virus se fixant sur des sucres non chargés (dits neutres), ce qui est pourtant commun chez les bactéries. A ce jour, seules les familles des *Caliciviridae* et des *Parvoviridae* comptent des membres capables de reconnaître respectivement les antigènes ABH et l'antigène P. Dans la famille des Calicivirus, le ligand cellulaire du virus de la maladie hémorragique du lapin (RHDV) a été le premier à être caractérisé par notre équipe qui a démontré que ce virus se fixait sur l'HBGA H Type 2 au niveau de l'épithélium intestinal et trachéal du lapin [21]. Cette observation a encouragé la recherche d'éventuels ligands glycaniques pour les autres membres de la famille des Calicivirus. En 2002, notre équipe a observé que le trisaccharide H Type 1 (Fuc α 2Gal β 3GlcNAc) permet la fixation du virus Norwalk sur la cellule hôte initiant une importante série de travaux sur les interactions entre norovirus et HBGAs qui sera développée ci-dessous [86].

Tableau XI : Exemples de glycanes servant de récepteurs ou co-récepteurs viraux
D'après Oloffson et Bergstrom [348]

Récepteur	Famille	Sous famille ou genre	Virus	Références
Glycosaminoglycane	Parvoviridae	Dependovirus	Virus associés aux Adénovirus, AAV Type 2	[307]
Héparane sulfate Chondroïtine sulfate	Adenoviridae		Adénovirus 2, 5	[308]
	Flaviviridae	Hepacivirus	Virus hépatite C	[309]
		Flavivirus	Virus de la dengue	[309]
			Virus de l'encéphalite japonaise, Virus West Nile	[310]
	Herpesviridae	Herpesvirus	Herpes simplex Type 1 et 2	[311]
		Herpesvirus	Virus de la varicelle	[312]
		Herpesvirus	Cytomegalovirus	[313]
		Herpesvirus	Herpes virus humain type 6 et 7	[314]
		Herpesvirus	Herpes virus humain type 8	[315]
	Papillomaviridae	Papillomavirus	Papillomavirus humain Type 11,16 et 33	[316][317]
	Paramyxoviridae	Pneumovirus	Virus respiratoire syncytial	[318][319][320]
		Metapneumo-virus	Metapneumovirus humain	[321]
	Poxviridae	Orthopoxvirus	Virus de la vaccine	[322][323]
Héparane sulfate, Chondroïtine sulfate, Sulfatide, Galactosylcéramide	Retroviridae	Lentivirus	HIV-1	[324][325]
Acide sialique (α2-3) (α 2-6) 9-O-acetyl acide sialique	Poxviridae Reoviridae	Orthovirus	JC BK virus	[326][327] [328]
	Polyomaviridae	Polyovirus	Réovirus Type 3	[331]
	Picornavirus	Enterovirus	Enterovirus 70	[332]
		Enterovirus A	Enterovirus 71	[333]
		Enterovirus B	Coxsackievirus A24	[334][335]
		Rhinovirus	Rhinovirus 87	[336]
	Parvoviridae	Respirovirus	Paramyxovirus 1-3	[337][338]
	Paramyxoviridae	Dependovirus	Virus associés au Adénovirus AAV type 4 AAV Type 5	[336]
	Orthomyxoviridae	Influenza A	Influenza A aviaire Influenza A humain	[339][340][341]
		Influenza B	Influenza B	[342]
		Influenza C	Influenza C	[343]
	Coronaviridae		Coronavirus OC43	[344]
	Adenoviridae		Adeno 37	[345]
Dystroglycane	Arenaviridae		Virus de Lassa	[346]
Antigène de groupe sanguin (globoside, antigène P)	Parvoviridae	Erythrovirus	B19	[347]
Antigène tissulaire de groupe sanguin (ABH, Le)	Caliciviridae	Lagovirus Norovirus	RHDV NV	[21][86]

III.1 Caractérisation du ligand des norovirus sur les tissus humains

III.1.1 Étude de la souche Norwalk

Suite à l'identification du ligand tissulaire du RHDV [21] et en absence de modèle de culture cellulaire pour les norovirus, le recours à l'immunohistochimie a permis d'observer la fixation des pseudoparticules (VLPs) de la souche Norwalk (NV) sur les cellules épithéliales de surface de la jonction gastroduodénale humaine. Cette fixation a pu être inhibée par un traitement au périodate de sodium qui détruit sélectivement les glycanes. Un traitement par une fucosidase qui clive spécifiquement les résidus fucoses liés en position alpha 1,2 a également inhibé la fixation. La présence d'un fucose dans cette position caractérise les antigènes H.

La spécificité de cette fixation a été démontrée par une inhibition de la fixation des VLPs en présence des trisaccharides synthétiques H Type 1 ou 3, mais également en pré-incubant les coupes histologiques avec des anticorps monoclonaux anti-H Type 1 ou 3/4. D'autres anticorps ou sucres synthétiques ont été testés indiquant que cette souche se fixe préférentiellement sur les antigènes H et A Type 1 et Le^b [349].

Dans les mêmes années d'autres équipes ont abouti à des résultats très voisins en testant la fixation de ces VLPs sur les érythrocytes et sur une série d'oligosaccharides synthétiques [87] [350].

Sur les cellules épithéliales de la surface de l'estomac et de l'intestin grêle, la présence des antigènes A, B et H dépend non seulement du gène *ABO* mais également du gène *FUT2* [351]. Des cellules transfectées pour exprimer l' α 1,2fucosyltransférase *FUT2* sont devenues capables de fixer et d'internaliser des VLPs NV. Par ailleurs le polymorphisme du gène *FUT2* a été utilisé pour démontrer que la fixation sur l'antigène H est bien nécessaire à l'infection. La fixation des VLPs n'a été observée que sur les tissus des individus sécréteurs (*FUT2* +/- ou *FUT2* +/+). Aucune fixation n'étant décelée chez les nonsécréteurs (*FUT2* -/-) [86]. L'ingestion du virus NV par des volontaires a ensuite permis de montrer que les individus non sécréteurs sont effectivement résistants à l'infection par cette souche GI.1 [131][352]. L'implication du gène *ABO* a également été démontrée puisque la souche NV ne reconnaît pas l'antigène B et se fixe donc peu sur les tissus ou mucines salivaires des individus B sécréteurs

[353][349]. En accord avec cette observation, les études chez les volontaires ont montré que parmi les individus de phénotype sécréteur, ceux du groupe B étaient moins sensibles à l'infection [131][354].

III.1.2 Études d'autres souches de norovirus

Le répertoire des mucines dans la salive ressemble à celui des cellules épithéliales dans le tube digestif. Un grand nombre d'études ultérieures a permis d'élucider la fixation de nombreuses souches de norovirus en se basant sur la technique d'ELISA par analyse de la fixation de VLPs sur des salives phénotypées ABO, Lewis et Sécréteurs ainsi que sur un panel d'oligosaccharides synthétiques immobilisés. Les résultats de ces études ont montré que la plupart des souches se fixent sur des HBGAs mais qu'elles peuvent présenter des spécificités différentes. Si par exemple le NV (GI.1) reconnaît préférentiellement les HBGAs H et A, la souche VA387 (GII.4) se fixe sur les salives et les sucres de tous les individus sécréteurs quel que soit leur groupe sanguin, A, B ou O, alors que les VLPs Snow Mountain (GII.2) se fixent exclusivement sur les salives des individus sécréteurs type B et AB mais pas O [87][353]. La fixation d'une série de pseudoparticules testées sur les antigènes HBGAs est résumée dans le Tableau XII. De manière très intéressante on peut remarquer qu'il existe des souches comme la souche OIF capables de reconnaître préférentiellement les individus non-sécréteurs. Ces souches reconnaissent les antigènes Le^a et Le^x présents en plus grandes quantités chez les individus non-sécréteurs que chez les sécréteurs [354][355][356]. L'analyse du Tableau XII, qui présente un ensemble représentatif des souches testées à l'heure actuelle, montre que la combinaison des polymorphismes aux loci *ABO*, *FUT2* et *FUT3* détermine la capacité des souches de NoVs à reconnaître des sous groupes de la population. Ceci suggère qu'une souche donnée ne devrait pas pouvoir infecter toute la population bien que collectivement les norovirus aient presque réussi à couvrir la diversité génétique humaine définie par les HBGAs. La seule exception notable concerne le sous-groupe d'individus qui sont *FUT2*^{-/-} et *FUT3*^{-/-} [240]. Ces individus n'ajoutent pas de fucose au précurseur de Type 1 sur leurs cellules épithéliales et jusqu'à présent, aucune des souches étudiées n'a montré de fixation en l'absence d'au moins un résidu de fucose. Les individus possédant ce génotype sont rares, en Europe, environ 2% de la population et il n'existe aucune population décrite avec une fréquence beaucoup plus haute de ce génotype. Ainsi on s'attend à ce que collectivement les norovirus puissent infecter presque tout le monde, ce qui est en accord avec la présence d'IgG anti-NoVs dans le sérum de 95-100% des adultes [357]. On note également

qu'il n'y a pas de relation entre le profil de fixation sur les HBGAs et la classification génétique des souches. Ainsi deux souches de NoVs appartenant à un même génogroupe, voire à un même cluster peuvent présenter différents profils de fixation tandis que des souches éloignées génétiquement peuvent avoir les mêmes profils de fixation [354]. Toutefois certaines souches comme Desert Shield (DSV, GI.3), Hawaï ou Hunter ne semblent reconnaître aucun glycanne de type HBGAs [354][148][355]. Il est difficile de savoir à ce stade si cette absence de réactivité est due à une réelle absence de reconnaissance de ces glycannes ou à une incapacité méthodologique à mettre en évidence cette reconnaissance. Les tests s'effectuent sur des VLPs et non sur des particules virales infectieuses, il est possible que certains VLPs n'aient pas la structure exacte de la capsid virale. Il est également possible que les glycannes salivaires ou les oligosaccharides synthétiques immobilisés utilisés pour mettre en évidence la fixation des VLPs ne soient pas parfaitement représentatifs des glycannes de l'épithélium digestif.

Tableau XII : Profils de fixation des souches de norovirus en fonction du phénotype ABO et Se

	Génotype	Non sécréteur	Sécréteur		
			O	A	B
Norwalk virus	G.1	-	++	++	-
MOH	GII.5	-	-	++	+
OIF	GII.13	++	+	-	-
VA207	GII.9	+	+	+	-
VA387	GII.4	-	+	++	++
Snow Mountain	GII.2	-	-	-	+
2002a	GII.4	+	++	++	++
1987	GII.4	-	++	++	++
1997	GII.4	-	++	++	++
2002	GII.4	-	++	++	++
Paris Island	GII.3	-	-	+	+
Grimbsy	GII.4	-	+	++	++
Mexico	GII.3	-	-	++	-
C59	GI.2	-	-	+	-
BUDS	GII.2	-	-	++	-
DSV	GI.3	-	-	-	-
Hawaï	GII.1	-	-	-	-
Hunter	GII.4	-	-	-	-
VA115	GI.3	-	-	-	-

D'autres études ont également montré une fixation des VLPs de génogroupe II sur l'héparane sulfate [358] ainsi que sur des structures sialylées [359]. Il se pourrait que certaines souches utilisent d'autres ligands glycaniques que les antigènes ABH et Lewis, ou bien qu'elles utilisent des ligands non glycaniques qui restent à identifier.

III.2 Propriétés structurales de l'interaction norovirus-HBGAs

III.2.1 *Modèle d'interaction norovirus-HBGAs*

A partir de l'observation de la diversité des souches en termes de reconnaissance des HBGAs, des modèles simples ont été proposés pour tenter de rendre compte de cette diversité. Un premier modèle d'interaction norovirus-HBGA a été proposé par Huang et ses collaborateurs [354]. Ce modèle est illustré par la Figure 18. Chaque souche présente une interface de fixation accommodant deux des trois épitopes des HBGAs (A/B, H ou Lewis). La fixation d'un ou d'une combinaison de deux ou de trois monosaccharides détermine le profil de fixation de chaque souche. Les combinaisons d'affinités des épitopes A/B et ou H déterminent la fixation des souches appartenant au groupe A/B alors que les combinaisons d'affinités aux épitopes Lewis et/ou H déterminent celle des souches appartenant au groupe Lewis. Ainsi les souches de chaque groupe peuvent être divisées selon leurs activités de fixation correspondantes aux épitopes. En se référant à ce modèle, les différences de fixation peuvent être expliquées: La souche VA387 et GrV ont une haute affinité aux antigènes A/B et H, ainsi elles se fixent aux salives de type A/B et O. Les souches PiV, MxV et HV ont une haute affinité à A/B mais qu'une faible affinité pour H, et donc réagissent fortement aux antigènes A/B mais faiblement aux antigènes H. Les souches MOH et BUDS présentent un seul site pour les épitopes A/B et fixent alors les individus sécréteurs A et B seulement. Le virus Norwalk et le C59 reconnaissent A mais pas B, alors que le SMV reconnaît B et pas A [360]. En conclusion, toutes les souches du groupe A/B ont un emplacement commun pour les épitopes A/B et quelques souches ont un emplacement additionnel pour les épitopes H. Dans le groupe Lewis, toutes les souches ont un accepteur pour les épitopes Lewis et quelques souches ont un emplacement additionnel pour les épitopes H. Les souches du groupe Lewis ne reconnaissent pas les épitopes A et B; par contre la présence des épitopes A/B pourrait exercer un effet négatif (épitope masquant) sur la fixation de ces souches aux épitopes Lewis et H [361].

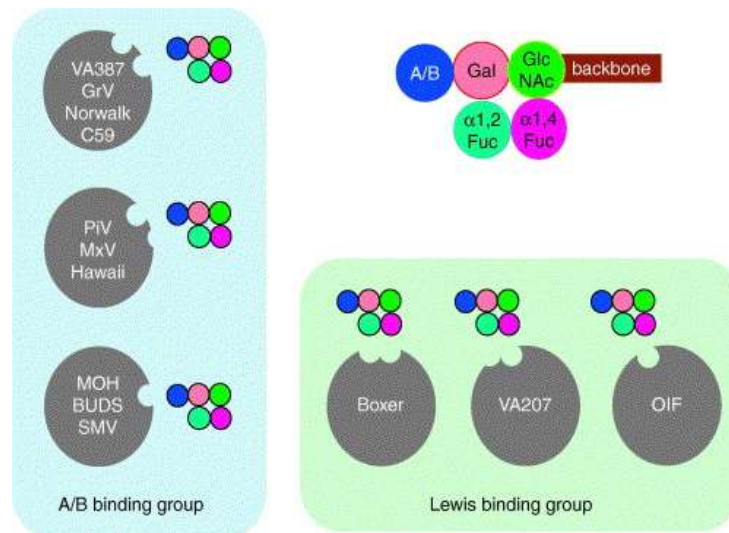


Figure 18 : Modèle d'interface de fixation des différentes souches de norovirus
(D'après Tan et Xiang 2005)[361]

Un autre modèle a été suggéré par Le Pendu et coll en 2006. Dans ce modèle les souches sont réparties en trois groupes montrés sur la Figure 19. Le premier groupe reconnaissant tous les sécréteurs plus ou moins indépendamment des phénotypes ABO fixerait préférentiellement le fucose en $\alpha 1,2$ en s'accommodant plus ou moins bien la présence des épitopes A et B. Le second groupe se fixerait préférentiellement au Gal ou au GalNAc des antigènes B et A. Enfin le troisième groupe utiliserait préférentiellement le fucose en $\alpha 1,3$ ou $\alpha 1,4$ des antigènes Lewis en s'accommodant plus ou moins bien de la présence du fucose en $\alpha 1,2$.

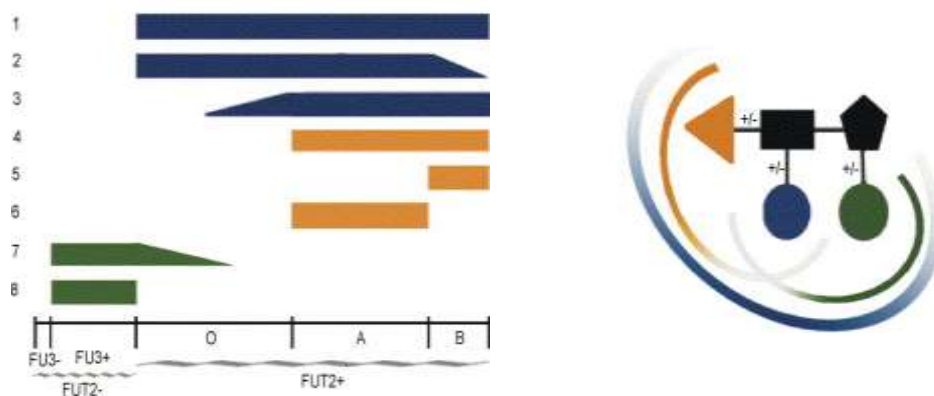


Figure 19 : Représentation schématique des huit profils de fixation observés chez les NoVs
Le groupe 1 correspond aux deux souches VA387 et Grimsby, Le groupe 2 à NV, le groupe 3 à la souche Mexico, le groupe 4 à la souche MOH, le groupe 5 au SMV, le groupe 6 au BUDS, le groupe 7 aux deux souches VA207 et Boxer et le groupe 8 à la souche OIF. (D'après Le Pendu et coll. 2006) [357]

III.2.2 P2 domaine de fixation des norovirus

Deux souches de NoVs appartenant à un même génogroupe, voire à un même cluster peuvent présenter différents profils de fixation sur les différents HBGAs, comme par exemple les virus Boxer et VA115 [354][357] ou les souches GII.4 [148]. La très grande variabilité génétique de la capsid des NoVs peut être à l'origine de ces modulations, notamment le polymorphisme observé dans le domaine P2. Ce dernier contient en effet la poche de liaison au récepteur cellulaire car il a été possible d'inhiber la reconnaissance du récepteur des VLPs de NV en les pré-incubant avec un anticorps monoclonal spécifique de la région comprise entre les acides aminés 300 et 384 de la capsid [362]. De plus, des expériences de mutagenèse dirigée ont permis de mettre en évidence une série d'acides aminés du domaine P2 important pour la fixation aux HBGAs. En étudiant différentes mutations au niveau de cette région, Tan et ses associés ont caractérisé une poche contenant le motif RGD et 3 acides aminés nécessaires à la fixation d'une souche GII.4 sur les HBGAs [88]. En 2005, en utilisant une approche similaire sur la capsid NV (GI.1), Hutson et ses collaborateurs [191] ont identifié un autre site de fixation distinct d'environ 10Å de celui précédemment décrit par Tan et al. Il a aussi été proposé que les deux sites de fixation puissent appartenir à une seule interface et agiraient coopérativement avec des chaînes respectives des sucres. Cette hypothèse était compatible avec le modèle d'interaction norovirus-HBGA proposé par Huang et ses collaborateurs dans lequel chaque interface de fixation est composée de deux sites de fixation [354].

III.2.3 Analyse structurale de la reconnaissance HBGA-GI.1 et HBGA-GII.4

Une réponse concrète concernant la localisation du domaine de liaison au récepteur a été apportée récemment grâce à la co-cristallisation des trisaccharides synthétiques A et B sur les dimères de protéine de capsid du virus GII.4 VA387 [363] mais également par la co-cristallisation du pentasaccharide H Type 1 et du trisaccharide A sur les dimères de la protéine de capsid du NV (GI.1) [356][364]. Il a notamment été mis en évidence pour la souche VA387 que l'HBGA vient s'insérer au niveau du domaine P2 de la capsid, à l'interface des protéines du dimère. Pour cette souche, la formation du dimère n'a pas donc qu'une fonction structurale mais permet également la création du domaine de liaison aux HBGAs. De manière surprenante, le site de fixation de la souche GI.1 ne présente pas la même localisation

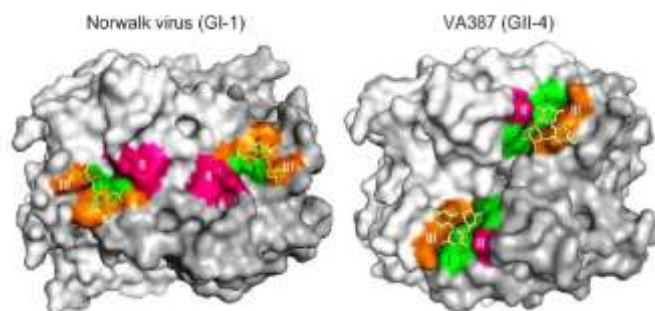


Figure 20 : Les structures cristallographiques d'interaction norovirus- HBGAs: Norwalk virus (GI.1) et VA387 (GII.4)

L'interaction norovirus-HBGA est localisée dans la même région de P2 mais les positions, la composition des acides aminés et le mode de fixation des HBGAs diffèrent d'un génogroupe à un autre. L'interface d'interaction HBGA- GI.1 est localisée dans un seul monomère du P dimère alors que celle de GII.4 est localisée à l'interface des deux monomères. D'après Tan 2009 [365]

Bien que GI.1 et GII.4 se fixent sur les deux antigènes A et H, les séquences primaires des sites d'interaction ainsi que le mode de fixation sont différentes. La souche GI.1(NV) utilise une région étroite pour la fixation alors que GII.4 (VA387) utilise une région plus large. Il interagit avec l' α GalNAc et l' α Fuc de l'antigène A ou l' α Fuc et le GlcNAc de l'antigène H [356][364] alors que VA387 interagit avec les 3 sucres terminaux de l'antigène A (α GalNAc β Gala α Fuc) et B (α Gal β Gala α Fuc) mais avec une implication particulièrement marquée du résidu fucose [363]. La localisation différente des poches suggère une évolution convergente des NoVs pour fixer les HBGAs. Les trois acides aminés Thr344, Arg345, Asp374, et Gly442 sont essentiels à la souche VA387 pour la formation des liaisons hydrogène permettant l'interaction glycanne/protéine. Dans le cas de NV les acides aminés essentiels à la formation des liaisons hydrogènes et hydrophobes et donc à leur fixation sur les antigènes A ou H sont Asp327, His329, Trp375, Ser377 et Pro378. Les acides aminés de ces différents domaines de liaison au récepteur sont très conservés à l'intérieur de leur génogroupe respectif, alors qu'ils ne le sont pas du tout entre les deux génogroupes. On remarque qu'au sein de chaque génogroupe ces acides aminés sont conservés y compris pour des souches n'ayant pas fixé les HBGAs.

Il semble donc que chacun des génogroupes subit une pression de sélection négative afin de maintenir les acides aminés essentiels à la fixation du virus sur les HBGAs. Un exemple de conservation au sein du même génogroupe est celui de génogroupe GII la souche VA207 et sa fixation sur les oligosaccharides Lewis x et Lewis y dans laquelle l'interface de fixation de VA207 est constituée par des acides aminés conservés qui agissent avec le fucose α 1,3/4 Fuc

de l'antigène Lewis y de la même façon que VA387 [366].

III.3 Importance des HBGAs pour l'infection

La reconnaissance des antigènes tissulaires de groupe sanguin par les norovirus est une interaction protéine-glycane, le P domaine de la capside virale forme une interface avec la chaîne d'oligosaccharide des antigènes tissulaires. Cette interface est variée entre les différentes souches de norovirus.

Le système HBGA est polymorphe et il est contrôlé par de familles des gènes multiples avec des allèles silencieux. La présence de ces molécules diverses au niveau de la surface cellulaire indique un mécanisme de défense de l'hôte contre l'environnement externe. Les norovirus ont développé des stratégies uniques pour surmonter ce système. Ceci a été démontré par les variations génétiques et structurales qui expliquent la majorité gastroentérites associées aux norovirus [367].

Ces hypothèses ont été validées *in vitro* en inoculant le NV à des volontaires dont les phénotypes ABH, sécréteur et Lewis étaient connus [131]. Cette expérience a mis en évidence que parmi les individus inoculés avec le NV, 50 à 69% de ceux présentant le phénotype sécréteur déclarent la pathologie alors qu'aucun symptôme de la maladie n'est détecté chez les volontaires de phénotype non-sécréteur. Ces données apportent pour la première fois la preuve que le NV a besoin que l'hôte exprime l'antigène H à la surface de ses cellules épithéliales intestinales pour pouvoir l'infecter, ce qui revient à dire que les individus de phénotype non sécréteur sont génétiquement résistants à l'infection par le NV, du fait de leur homozygotie pour des allèles *FUT2* non-fonctionnels. Parmi les sécréteurs, seuls les individus de phénotype B sont résistants à cette souche [368][369].

En outre, Svensson et ses collaborateurs ont montré la corrélation entre la séroprévalence vis-à-vis des souches GII et *FUT2*, les individus non-sécréteurs sont moins sensibles à l'infection par GII. La souche GII.4 Lordsale est capable d'infecter tous les sécréteurs indépendamment de leur phénotype ABO mais elle n'infecte pas les non sécréteurs [353][370].

Toutefois, certaines exceptions sont présentes, l'exemple le plus connu est celui de la souche GI.3 qui pourrait infecter les sécréteurs et les non sécréteurs [369]. Néanmoins dans cette étude, les individus n'ont pas été génotypés et le phénotypage est douteux. Un autre exemple est celui de la souche SMV qui reconnaît l'antigène B et qui pourtant a infecté des individus sécréteurs et non sécréteurs indépendamment du phénotype ABO [131].

La variation du domaine HBGA-capside est tolérée en raison du grand répertoire des récepteurs semblables, pourtant distincts des HBGA et qui sont disponibles à la surface des muqueuses. La souche GII.4, principale cause des gastroentérites dans le monde a évolué durant les 14 ans (1987-2006) afin de persister tout en échappant à l'hôte par le changement de leurs cibles d'HBGAs. Le choix du ligand HBGA nécessaire à la fixation du norovirus évolue probablement pour échapper à l'immunité. Les principaux changements sont illustrés dans la figure 21.

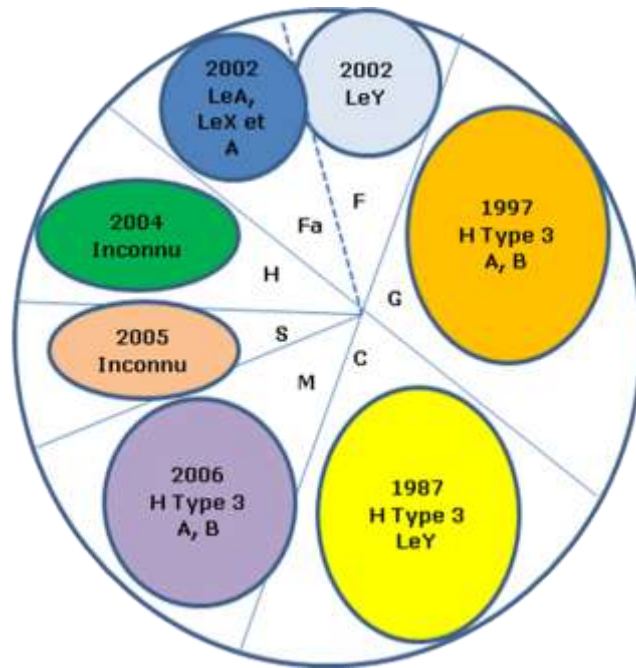


Figure 21 : Evolution de la souche GII.4 depuis l'année 1987 jusqu'à 2006

C : Souche Camberwell, G : Grimsby, F et Fa : Farmington Hills, Fa : H : Hunter, S : Sakai, M : Minerva

D'après Donaldson 2008 [371]

Les analyses phylogénétiques et évolutives du P2 suggèrent que les virus GII.4 ont évolué linéairement durant ces 20 dernières années de façon similaire à l'évolution des virus Influenza. Dans l'étude de Donaldson six souches ont été étudiées, notamment le profil glycanique et le domaine P2. Bien que chacun des six génotypes soit distinct, il y a un chevauchement entre eux. Cette variation suggère que des souches antérieures continuent à circuler, tout en causant une maladie asymptomatique ou en persistant dans la population pour finalement disparaître. Deux mécanismes ont été proposés pour expliquer la persistance des souches GII.4 : Le premier correspond à un changement au niveau du récepteur ou dans les régions proches du site de fixation qui pourra alors altérer la fixation aux HBGA. Le virus

utilisera alors de nouveaux HBGAs pour infecter une population non immunisée. Le deuxième, par une variation antigénique permettant alors d'avoir des virus compétents infectant la même population. En plus de ces deux mécanismes d'évolution, les anticorps anti-NoVs jouent un rôle dans l'évolution des NoVs. Des études de cross-réaction ont démontré que les anticorps peuvent reconnaître des antigènes hétérologues de NoVs, particulièrement dans le même génogroupe. Les anticorps homotypiques de l'antisérum humain peuvent bloquer la fixation de VLPs aux HBGAs, l'antisérum hétérotypique aux souches du même génogroupe est moins efficace [371].

III.4 Etudes de la fixation des norovirus sur les tissus bovins, porcins et huîtres

Mattison et ses associés ont été les premiers à identifier des souches GII.4 dans des échantillons de selles et de viandes bovines et porcines. Ce résultat ajouté à la mise en évidence des souches animales dans le génogroupe II (GII.11, GII.18, GII.19) ainsi que dans les génogroupes III, IV et V conduisent à se poser la question de transmission inter-espèce des NoVs [151].

III.4.1 Etude de la fixation des souches GI.1 et GII.4 sur les tissus de porcs

Les porcs peuvent exprimer les antigènes A et H sur leurs tissus, sur leurs tissus épithéliaux de manière similaire à ce qui a été observé chez l'Homme. Ils sont réceptifs à l'infection par une souche humaine appartenant au GII.4. La fixation des VLPs correspondantes sur les tissus porcins a été inhibée par les anticorps anti-A et anti-H. De plus cette étude réalisée par l'équipe de Linda Saif a montré la relation entre l'expression de ces antigènes sur la muqueuse intestinale et la forte diarrhée, la séroconversion en réponse à la souche humaine GII.4 HS66 et l'excrétion fécale élevée [122]. La fixation des VLPs humaines chez le porc se caractérise surtout au niveau du duodénum et rarement sur le jéjunum ou l'iléon. Cela peut être dû au fait que la plupart des porcs expriment les antigènes tissulaires surtout au niveau du duodénum ou qu'il existe d'autres facteurs facilitant l'infection de cette partie du tube digestif en plus de la présence des antigènes A et H. Les résultats de Tian ont confirmé la reconnaissance de glycanes porcins par des NoVs humains en testant la souche Norwalk (GI.1) sur des mucines digestives porcines [372]. En outre, des anticorps sériques anti-GI.1 et GII.4 ont été détectés aux Etats Unis chez respectivement sur 63% et 52% des porcs testés, suggérant alors le rôle possible de cette espèce comme réservoir de

transmission [207].

III.4.2 Étude de la fixation des souches GI.1 et GII.4 sur les tissus bovins

La vache pourrait être également un réservoir des norovirus humains. La souche GII.4 a été détectée par RT-PCR dans des selles bovines [151]. De plus, Linda Saif et ses collaborateurs ont montré la réplication de cette souche chez des veaux gnotobiotiques [135]. Il se pourrait que cette souche se fixe sur les antigènes HBGAs partagés entre l'Homme et la vache mais aucune étude n'est venue étayer cette hypothèse jusqu'à présent. Concernant les souches GI, aucune étude n'a encore montré leur présence ou celle d'anticorps chez la vache.

Toutefois deux études ont suggéré que la vache ne partagerait pas avec l'Homme les HBGAs qui permettent la fixation de la souche Norwalk GI.1 [372][207]. Ces données sont en accord avec les résultats d'agglutination obtenus par Huston et ses collaborateurs, une agglutination par la souche Norwalk ayant été observée avec les érythrocytes du chimpanzé et de l'Homme mais pas de la vache [350]. Or la vache n'exprime pas sur ses érythrocytes les HBGAs à l'exception de l'antigène α Gal.

III.4.3 Relations entre l'Homme et les souches bovines et porcines

Jusqu'à présent aucune souche animale porcine ou bovine n'a été trouvée chez l'Homme. La fixation de la souche porcine SW918 (GII.11) a été testée sur 52 salives humaines phénotypées ABO, Lewis et sécréteur. Bien que les norovirus porcins (SW918) soient génétiquement proches des norovirus humains GII, aucune salive n'a permis la fixation de cette souche, même à de hautes concentrations [207]. Ces résultats indiquent que le norovirus porcine n'utilise pas les mêmes récepteurs que les norovirus humains. Le ligand de cette souche demeure inconnu. Bien que ces résultats ne soient pas en faveur d'une transmission inter-espèce, la proximité génétique du GII.11 aux souches humaines n'exclut pas la possibilité d'émergence de nouvelles souches recombinantes ou mutées capables de franchir la barrière inter-espèce. Ainsi une simple mutation au niveau du domaine P2, dans la poche de fixation, pourrait permettre la fixation de cette souche aux tissus humains.

Les souches bovines paraissent représenter un risque moindre pour les humains par le fait qu'elles forment un troisième génogroupe génétiquement distinct des NoVs humains [53][26]. Néanmoins, des anti-GIII ont été retrouvés dans le sérum humain [139]. La présence de ces

anticorps pourrait s'expliquer par une infection par des souches bovines GIII ou par l'existence d'épitopes cross-réactifs entre NoVs humains et bovins [373][374].

III.4.4 Fixation des norovirus dans l'huître

Les huîtres s'alimentent par filtration de grand volume d'eau qui leur permet d'ingérer de petites particules de matière organiques qui leur servent de nourriture. L'hypothèse que les huîtres concentrent les particules virales pendant leur processus d'alimentation a donc été émise. Ce mécanisme d'accumulation virale dans l'huître n'a pas été caractérisé. On a d'abord considéré que les particules virales pouvaient s'accumuler dans les huîtres par des liaisons mécaniques ou par des liaisons chimiques directes, ou par des liaisons de Van der Waals, par des liaisons hydrogène ou toute autre liaison ionique [375]. Différentes familles de virus ont été détectées dans les huîtres ; les rotavirus, les aichivirus, les poliovirus, les norovirus et d'autres. Une première caractérisation des ligands de ces virus a été réalisée par l'équipe de J. Matches qui a montré que l'attachement de poliovirus sur les huîtres se fait par l'intermédiaire des radicaux sulfates des mucopolysaccharides [376]. Plus tard, en 2006, les équipes de Soizick Le Guyader et Jacques. Le Pendu ont démontré que la fixation de la souche Norwalk (GI.1) sur les cellules digestives des huîtres se faisait par l'intermédiaire d'un antigène A-like[22]. En 2007, Tian et ses collaborateurs ont confirmé ces résultats et ont montré que les mêmes antigènes peuvent être présents chez les moules et d'autres mollusques comme les palourdes et qu'ils permettent la fixation de souches GI et GII par reconnaissance d'HBGAs sur les tissus de coquillages (Figure 22) [377][378].

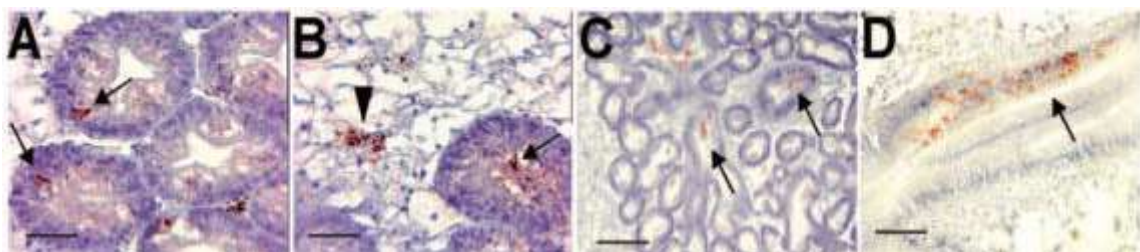


Figure 22 : Caractérisation du ligand de la souche Norwalk sur les tissus d'huîtres

Les VLPs dans le tube digestif 12h après bioaccumulation de 10⁹ particules. B. ou de 10¹² particules. C et D. Fixation de VLPs GI.1 dans le tube digestif de l'huître. D'après Le Guyader et al; 2006 [22]

Chez l'Homme, suite à la consommation de coquillages contaminés, on observe fréquemment la présence simultanée de souches GI et GII dans les selles de malades [96][380][22]. Aussi, la présence simultanée de plusieurs souches peut alors favoriser les recombinaisons génétiques [50][14]. Une étude réalisée sur des marchés régionaux le long des 3 côtes aux Etats Unis a démontré la présence dans les huîtres des souches porcines GII.18 (2/45 échantillons), des souches humaines GII.4 (5/45 échantillons) [380]. Ces observations soulèvent l'inquiétude concernant le risque de co-infection des humains par des NoVs humains et animaux, ce qui rendrait possible des recombinaisons et l'apparition de nouvelles souches.

La fixation d'un pathogène sur son récepteur représente une première étape nécessaire à l'infection [381]. Il nous est donc apparu essentiel de mieux définir les relations entre NoVs humains et animaux et HBGAs exprimés par l'Homme d'une part et d'étudier l'expression des HBGAs partagés et par plusieurs espèces animales, d'autre part. Le travail expérimental qui suit a été focalisé sur la vache et le porc car ces espèces sont en contact avec la population humaine et sont susceptibles de déverser de grandes quantités de particules virales dans l'environnement et en particulier dans l'environnement marin. C'est dans ce contexte que nous nous sommes également intéressés à l'interaction des souches humaines et animales avec les HBGAs présents dans les tissus d'huîtres.

Objectifs et Contexte du travail

Le travail que j'ai réalisé pour ma thèse s'intéresse à l'étude du potentiel zoonotique des norovirus et s'intègre dans un projet qui a pour principal objectif de comprendre le rôle des coquillages sur la sélection des souches humaines ou animales de norovirus.

Les similitudes de séquences des norovirus bovins et porcins avec les souches humaines suggèrent que ces animaux pourraient constituer un réservoir de norovirus pour l'Homme et passer la barrière d'espèce. Bien que les mécanismes moléculaires nécessaires au franchissement de la barrière d'espèce soient très divers et complexes, la présence de récepteurs cellulaires compatibles représente un élément indispensable au franchissement de cette barrière. Notre équipe a démontré pour deux membres de la famille des Calicivirus, le NV et le RHDV, que malgré l'importante distance génétique qui les sépare, ces virus partagent la capacité de se fixer sur des glycanes très semblables de la famille des HBGAs. Nous ignorions au début de mon travail si cette propriété était partagée par les norovirus bovins et porcins. Or, la capacité éventuelle des norovirus bovins ou porcins à se fixer sur de tels récepteurs partagés pourrait contribuer à faciliter le passage de la barrière inter-espèce car on sait que ce risque est plus élevé quand les récepteurs sont phylogénétiquement conservés [382]. Nous avons donc recherché si les capsides de norovirus animaux sont capables de se fixer sur les cellules épithéliales en inter-espèce via la reconnaissance de motifs glycaniques et tenté de caractériser précisément les ligands cellulaires pour apporter des «éléments concrets» à une évaluation du risque zoonotique.

Inversement, nous avons cherché à savoir si des souches humaines peuvent reconnaître des HBGAs sur les tissus animaux de façon à mieux appréhender les possibilités d'échange inter-espèces de norovirus.

Notre équipe a également démontré antérieurement que la souche de virus NV se fixait sur des sucres apparentés du tube digestif de l'huître, suggérant un rôle sélectif de ce coquillage dans la concentration de norovirus [22]. Nous avons donc émis l'hypothèse que l'huître pourrait sélectionner des souches virales d'origine animale capables de reconnaître des récepteurs glycaniques phylogénétiquement conservés entre les bovidés, les suidés et l'Homme, d'où notre travail sur la reconnaissance glycanique des différentes souches sur les tissus de l'huître.

IV. Publications

IV.1 Caractérisation du ligand de la souche bovine GI.2 NB2

Article 1: the α Gal epitope of the histo-blood group antigen family is a ligand for bovine norovirus Newbury2 expected to prevent cross-species transmission

Plusieurs auteurs suggèrent que du fait de la similitude de séquences des souches de NoV bovins et porcins avec les souches humaines, ces deux espèces pourraient constituer un réservoir de virus pour l'Homme.

Mêmes si les mécanismes de passage de barrière d'espèce sont très divers et complexes, une première limite au passage du virus animal à l'Homme est la présence du ou (de) récepteur(s) de ce virus chez l'Homme, sachant que du côté du pathogène des mutations peuvent lui permettre de reconnaître un (nouveau) récepteur sur les cellules de la nouvelle espèce cible.

Vu que les Calicivirus, aussi divers que les norovirus et les lagovirus s'attachent aux antigènes tissulaires du groupe sanguin et que les HBGAs sont phylogénétiquement conservés, nous avons souhaité vérifier si GI.2 (Bo/Newbury2/76/UK) utilise un ligand conservé chez l'Homme, la vache et le porc et ainsi détecter son éventuelle capacité à infecter ces espèces afin de fournir des éléments à l'évaluation du risque zoonotique.

Nos résultats ont montré la fixation des VLPs NB2 sur la surface épithéliale du duodénum et de l'estomac par reconnaissance de l'épitope α Gal appartenant à la famille des antigènes tissulaires de groupe sanguin mais non conservé chez l'Homme. Chez le porc, ce ligand est présent uniquement sur la partie endothéliale de ces tissus. Cette étude est basée sur plusieurs observations : la distribution des VLPs NB2 sur les tissus des différentes espèces qui sont en corrélation avec la fixation de la lectine GS1-B4 reconnaissant l' α Gal, le test de ces capsides sur un panel d'oligosaccharides ; seuls les sucres présentant l'épitope α Gal supportent la fixation de ces VLPs, le traitement par l' α galactosidase des salives et des tissus bovins qui abolit la fixation, la transfection de cellules humaines avec l'ADNc de l' α 1,3galactosyltransferase permettant la fixation des VLPs rNB2.

L'ensemble de ces données a permis de conclure que les rNB2 VLPs reconnaissent spécifiquement comme ligand cellulaire un antigène de la famille des HBGAs, l'épitope α Gal (Gal α 3Gal β 4GlcNAc β -R). Cet antigène est proche de l'antigène B. En effet, ces deux

antigènes possèdent un résidu Gal en position $\alpha 3$ sur le galactose terminal du précurseur Type 2 (Gal β 4GlcNAc β -R) sur lequel on retrouve en plus pour l'antigène B le résidu fucose en position en $\alpha 1,2$. Ce résidu fucose provoque probablement un encombrement stérique ne permettant plus l'accessibilité des rNB2 VLPs à la liaison $\alpha 3$ Gal, élément déterminant de la reconnaissance ainsi que l'ont confirmé des expériences de résonance magnétique nucléaire. D'autre part, l'absence d'antigène B chez les bovins rend peu probable une évolution des souches de NB2 vers une reconnaissance croisée des épitopes α Gal et B.

Nos résultats ne montrent pas que l' α Gal est nécessaire à l'infection des vaches par le GIII.2, mais plusieurs aspects soutiennent cette possibilité. Des souches humaines se lient aux HBGA pour infecter leur hôte d'une façon HBGA-dépendante. Ainsi, la conservation de la capacité d'une fixation d'un HBGA par la souche Newbury2 suggère qu'elle sera également exigée pour l'infection. En outre, l'analyse histopathologique des lésions des veaux expérimentalement atteints de NB2 a indiqué qu'elles sont été limitées à la partie proximale de l'intestin grêle, ce qui coïncide avec le lieu principal d'expression de l'antigène α Gal sur les cellules épithéliales digestives.

Nous décrivons aussi dans cet article l'expression des HBGA le long du tube digestif d'un bovin. Outre l'expression de l' α Gal, nous mettons en évidence de l'omasum jusqu'au duodénum uniquement l'expression des antigènes A et H Type 2. La présence de ce type d'oligosaccharides à la surface des cellules épithéliales laissent à penser que certains virus humains pourraient s'y fixer et une co-infection du bovin par un NoV bovin (GIII.2) et un NoV humain (GI-1 or GII-4) conduire à l'émergence d'un virus recombinant.

En conclusion, il n'y a aucune indication claire que le norovirus bovin pourrait infecter d'autres espèces. De tels virus n'ont été jamais détectés dans les échantillons humains ou porcins, suggérant qu'ils ne circulent pas dans ces espèces.

The α Gal Epitope of the Histo-Blood Group Antigen Family Is a Ligand for Bovine Norovirus Newbury2 Expected to Prevent Cross-Species Transmission

Maha Zakhour¹, Nathalie Ruvoën-Clouet^{1,2}, Annie Charpilienne³, Brigitte Langpap⁴, Didier Poncet³, Thomas Peters⁴, Nicolai Bovin⁵, Jacques Le Pendu^{1*}

1 INSERM, U892, Université de Nantes, Institut de Biologie, Nantes, France, **2** Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes, Nantes, France, **3** INRA UMR 1157, CNRS UMR 2472, IFR 115, Gif sur Yvette, France, **4** University of Luebeck, Institute of Chemistry, Luebeck, Germany, **5** Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Moscow, Russia

Abstract

Among *Caliciviridae*, the norovirus genus encompasses enteric viruses that infect humans as well as several animal species, causing gastroenteritis. Porcine strains are classified together with human strains within genogroup II, whilst bovine norovirus strains represent genogroup III. Various GI and GII human strains bind to carbohydrates of the histo-blood group family which may be shared among mammalian species. Genetic relatedness of human and animal strains as well as the presence of potentially shared ligands raises the possibility of norovirus cross-species transmission. In the present study, we identified a carbohydrate ligand for the prototype bovine norovirus strain Bo/Newbury2/76/UK (NB2). Attachment of virus-like particles (VLPs) of the NB2 strain to bovine gut tissue sections showed a complete match with the staining by reagents recognizing the Gal α 1,3 motif. Alpha-galactosidase treatment confirmed involvement of a terminal alpha-linked galactose. Specific binding of VLPs to the α Gal epitope (Gal α 3Gal β 4GlcNAc β -R) was observed. The binding of Gal α 3Gal α OME to rNB2 VLPs was characterized at atomic resolution employing saturation transfer difference (STD) NMR experiments. Transfection of human cells with an α 1,3galactosyltransferase cDNA allowed binding of NB2 VLPs, whilst inversely, attachment to porcine vascular endothelial cells was lost when the cells originated from an α 1,3galactosyltransferase KO animal. The α Gal epitope is expressed in all mammalian species with the exception of the Hominidae family due to the inactivation of the α 1,3galactosyltransferase gene (*GGTA1*). Accordingly, the NB2 carbohydrate ligand is absent from human tissues. Although expressed on porcine vascular endothelial cells, we observed that unlike in cows, it is not present on gut epithelial cells, suggesting that neither man nor pig could be infected by the NB2 bovine strain.

Citation: Zakhour M, Ruvoën-Clouet N, Charpilienne A, Langpap B, Poncet D, et al. (2009) The α Gal Epitope of the Histo-Blood Group Antigen Family Is a Ligand for Bovine Norovirus Newbury2 Expected to Prevent Cross-Species Transmission. PLoS Pathog 5(7): e1000504. doi:10.1371/journal.ppat.1000504

Editor: Ralph S. Baric, University of North Carolina, United States of America

Received: February 27, 2009; **Accepted:** June 5, 2009; **Published:** July 3, 2009

Copyright: © 2009 Zakhour et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported in part by a grant 2006 SEST 08 01 ((Coquenpath)) from the Agence Nationale pour la Recherche (ANR), by the Region des Pays de la Loire (JLP) and by RAS Presidium grant "Molecular and cell biology" (NB). TP thanks the University of Luebeck and the DFG for support (Grants PE 494/8-1 and HBFG 101/192-1). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: jlependu@nantes.inserm.fr

Introduction

Caliciviruses are small non enveloped viruses approximately 27–35 nm in diameter with a positive-sense single-stranded RNA genome of 7.4 to 8.3 kb in size. Based on genomic organization and genetic analysis, the *Caliciviridae* family is divided into five genera, norovirus, sapovirus, vesivirus, lagovirus and becovirus (or nabovirus), and a sixth genus "recovirus" has been recently proposed [1]. Animal caliciviruses are suspected and confirmed causes of a wide spectrum of diseases including gastroenteritis (pigs, calves, cats, dogs and chickens), vesicular lesions and reproductive failure (pigs and sea lions), respiratory infections (cats and cattle) and a fatal hemorrhagic disease (rabbits and hares) [2]. Human and animal caliciviruses associated with gastroenteritis belong to the norovirus and sapovirus genera. The genus norovirus (NoV) has been divided into five genogroups, genogroups I to V [3]. More recently, a classification including two additional genogroups (VI and VII) has been suggested [4].

Human strains are classified into genogroups I, II, IV, VI and VII. Analysis of the complete ORF2 sequences, encoding the capsid protein, of genogroups I and II demonstrates high diversity and at present, 8 clusters have been defined within genogroup I (GI-1 to GI-8) and 19 within genogroup II (GII-1 to XII-19). Porcine NoV have been classified into GII-11 and recently into two novel genotypes (GII-18 and XII-19) [5]. NoV are also detected in calves. The first bovine NoV strain, Bo/Newbury2/1976/UK, was isolated from calves with diarrhea in the United Kingdom [6]. Later, another distinct genotype of bovine NoV, Bo/jena/78/GER was identified in Germany [7]. They belong to genogroup III [8,9,10], in which the Jena virus and the Newbury2 (NB2) are respectively the prototype of genotypes GIII-1 and GIII-2. Two other enteric bovine caliciviruses have been described, the Newbury agent 1 in the UK [11] and Nebraska strain in the USA [12]. Thus, a fifth genus named becovirus (or nabovirus) includes these two bovine viruses since they present significant differences with the other genera of the *Caliciviridae* family [13].

Author Summary

Noroviruses are a major cause of gastroenteritis in humans and other mammals such as pigs and cows. Various human strains are known to bind complex sugar structures related to ABO blood groups. A single strain does not recognize all people owing to the individual variation in ABO-related antigens. Binding to these molecules is required for infection since individuals lacking the appropriate sugar structures are not infected by a given strain. We now report that a cow-specific strain binds very specifically to the so-called xenoantigen, a sugar motif resembling B blood group antigen, present at the surface of the small intestine of cows. This antigen is absent from all human tissues since the human gene encoding an enzyme required for its synthesis has been inactivated by mutations during evolution of the Hominidae lineage. Although present in other mammals such as pigs, we observed that this sugar motif is not expressed at the right location to allow infection, that is, the surface of the small intestine. Thus, the cow virus should not infect humans or pigs. Its adaptation to cows would prevent transmission to other species living in close contact with cows such as man and pig.

Human NoVs (HuNoV) have been found to recognize histo-blood group antigens (HBGAs), with different strains showing distinct specificities [14,15]. HBGAs are complex glycans present on many cell types including red blood cells and vascular endothelial cells, as well as on the epithelia of the gastrointestinal, uro-genital and respiratory tracts. They can also be present in a soluble form in biologic fluids such as saliva and milk. HBGAs are synthesized from a series of precursor structures by stepwise addition of monosaccharide units via a set of glycosyltransferases. According to the CAZY classification (<http://www.cazy.org/>), three glycosyltransferases families are involved in their biosynthesis. The GT11, GT10 and GT6 families which encode α 1, 3/4fucosyltransferases, α 1,2fucosyltransferases and enzymes related to the A and B enzymes of the ABO system, respectively. Some of the corresponding genes are polymorphic whilst others are expressed in a species-specific manner. In humans, the pleiotropic interaction of alleles at three loci, *FUT3*, *FUT2* and *ABO* determines the Lewis, Secretor, and ABO phenotypes, respectively [16]. The corresponding antigens are involved in HuNoV recognition of human digestive tissue and are required for infection [14,15]. The GT6 gene family (*ABO* family) comprises three other members which encode α 1,3galactosyl or N-acetylglactosaminyltransferases. An α 1,3galactosyltransferase acts on the type 2 precursor disaccharide (Gal β 4GlcNAc) to give the α Gal epitope, also called Galili antigen (Gal α 3Gal β 4GlcNAc), which is expressed in all mammalian species except hominids since in humans, gorilla and chimpanzee the *GGTA1* (glycoprotein, alpha-galactosyltransferase 1) gene has been inactivated by several mutations and is therefore a pseudogene [17]. Another gene of the same family encodes a distinct α 1,3galactosyltransferase which acts on the glycosphingolipid lactosylceramide to generate the isoglobotrihexosylceramide (iGb3: Gal α 3Gal β 4Glc β -Cer). The corresponding iGb3 synthase gene does not appear to be functional in humans, although this is actively debated [18,19]. Finally, the last enzyme of the GT6 family known at present is an α 1,3N-acetylglactosaminyltransferase which acts on the glycosphingolipid called globoside (Gb4) or P blood group antigen to generate the Forsmann antigen (GalNAc α 3GalNAc β 3Gal α 4-Gal β 4Glc-Cer). This enzyme, the Forsmann synthase, is not

active in humans [20]. Recently, our group described other genes of the GT6 family (GT6m5 to GT6m8). However, they are not present in all vertebrate or mammalian genomes and the enzyme activity of the corresponding proteins have not been characterized as yet [21].

The genetic and antigenic relatedness of human and animal noroviruses suggests the possibility for inter-species transmission as illustrated by the recent detection of sequences close to GII-4 HuNoV in swine and cattle in Canada [22,23]. Although animal NoVs have not yet been isolated from human, human infection with NoV related to genogroup III bovine NoV has been suggested by the presence of serum antibodies against bovine GIII-2 among veterinarians in the Netherlands [23]. Moreover the use of phylogenetically conserved cellular receptors appears as another risk factor for cross-species transmission. Attachment of the virus to a host ligand constitutes a first step of the viral infection process, and it has been observed that when the receptor is conserved between several species, these are more likely to be infected by viruses that use the shared receptor [24]. HBGAs can be conserved across high phylogenetic distances as shared epitopes have been found between bacteria, invertebrates, plants and mammal [25]. ABH-related structures have been characterized in the gut of all mammalian species tested so far [26]. The use of such molecules as primary ligands by HuNoV strains as well as by RHDV [27], a rabbit calicivirus of the lagovirus genus, prompted us to look for the ability of a bovine NoV to recognize HBGAs potentially present on bovine, as well as on porcine and human digestive epithelial cells. Such a shared ligand could help these viruses to propagate between the three species which live in close contact and at high densities in areas of intensive breeding.

Results

Recombinant NB2 VLPs bind to bovine digestive tract cells through a carbohydrate ligand distinct from A, B, H or Lewis histo-blood group antigens

We previously demonstrated the binding of VLPs of caliciviruses to carbohydrate epitopes using immunohistochemistry as a starting method [27,28]. We now used the same method in order to determine if the bovine NB2 strain of norovirus could similarly bind to a carbohydrate ligand expressed in the gut. Tissue sections prepared from the entire bovine gut were thus incubated with rNB2 VLPs and their binding was detected using antibodies. Specific staining, only visible in the presence of VLPs, was readily observed as shown on Fig. 1. In the duodenum, rNB2 VLPs attached to the epithelial cells of the crypts of Lieberkühn located at the surface of the mucosa (Fig. 1A), but not to the epithelial cells of the Brünner's glands which are located deeper in the mucosa (Fig. 1B). Unlike what was previously observed for other caliciviruses, binding of the VLPs was not restricted to epithelial cells. It was also observed on vascular endothelial cells and erythrocytes. These are clearly visible surrounding Brünner's glands (Fig. 1B) or in the serosa layer (Fig. 1C). In addition, other cell types such as smooth muscle cells were labelled, albeit less strongly. In order to determine if the binding involved recognition of carbohydrate epitopes, tissue sections were pretreated with sodium periodate prior to incubation with the VLPs since periodate oxidation cleaves C-C bonds with vicinal hydroxyl groups as found on sugars. Sialic acid residues are more sensitive to mild oxidation than other sugars. Since many viruses are known to use sialic acids as ligands [29], bovine duodenal tissue sections were first treated with 1 mM sodium periodate. This treatment did not affect the staining after incubation of the rNB2 VLPs (data not shown). Tissue sections were thus pretreated with 10 mM

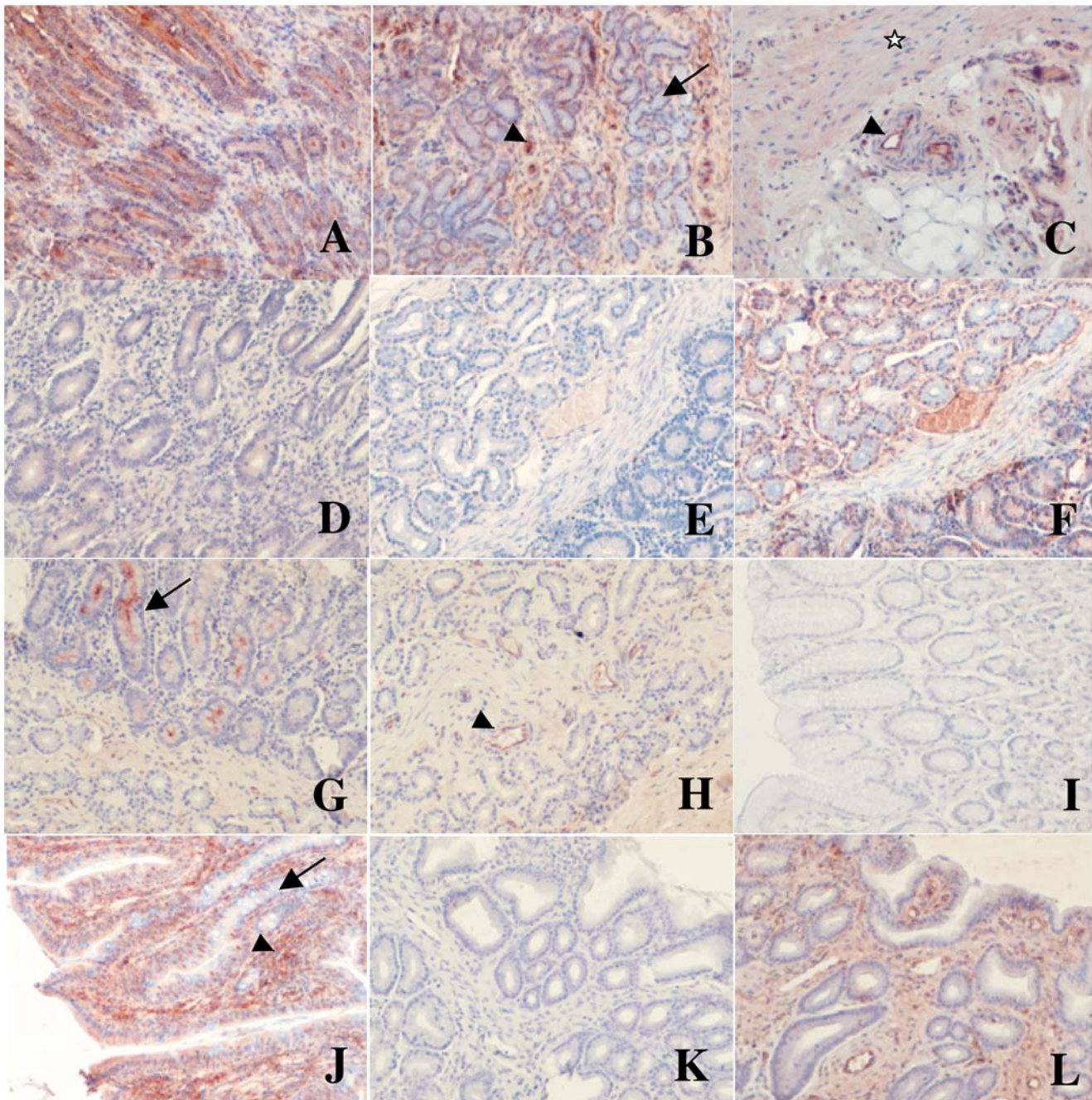


Figure 1. Analysis of rNB2 VLPs binding and of their ligand expression by immunohistology. VLPs at 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ were incubated on tissue sections and detected as described in the Materials and Methods section. Binding of rNB2 VLPs to bovine duodenum surface epithelium (A), glands (B), smooth muscle (C) and negative control in absence of rNB2 VLPs (D). Effect of a 10 mM sodium periodate treatment prior to VLPs incubation (E) and serial control section pretreated in the same conditions without periodate (F). Staining of the surface epithelium (G) and vascular endothelium in connective tissue (H) of bovine duodenum by an anti- αGal mAb. Lack of binding of rNB2 VLPs on human duodenum (I). Binding of rNB2 VLPs to porcine duodenum (J). Effect of α -galactosidase treatment prior to rNB2 VLPs incubation on a porcine duodenum tissue section (K) and control section pretreated in the same conditions in absence of enzyme (L). Epithelial cells are indicated by arrows, vascular endothelium cells by small arrowheads, and smooth muscle cells by a star.
doi:10.1371/journal.ppat.1000504.g001

periodate. At that concentration, the staining was completely lost (Fig. 1E and 1F), suggesting that rNB2 VLPs recognize a neutral glycan structure expressed both on digestive surface epithelial cells and other cell types including vascular endothelial cells.

Since other norovirus strains are known to bind to neutral carbohydrates of the histo-blood group family, we next sought to

determine the expression of such epitopes throughout the bovine gut in order to relate it to the binding of rNV VLPs. To this aim, a set of antibodies as well as the UEA-I and GS1-B4 lectins were used and we observed that some, but not all, of these reagents clearly labeled bovine gut tissue sections. The A histo-blood group antigen was detected, but not the B antigen. Strong positivity was

also observed using reagents that detect H type 2/LeY epitopes. In contrast, very little or no staining was detected using reagents specific for type 1 or type 3 based structures. Only the anti-Le^a antibodies stained scattered goblet cells in the duodenum and colon, whereas the anti-H type 1, anti-H type 3 and anti-Le^b did not give detectable specific labeling. Similar to that observed for rNB2 VLPs ligands, the A and H type 2/LeY expression was most intense in the pyloric and duodenal surface epithelia and gradually decreased from distal duodenum to disappear from the distal part of the digestive tract (Fig. 2). Yet, the expression of these fucosylated structures was observed on epithelial cells only and therefore did not match with that of the VLPs. In addition to A and H histo-blood group epitopes, the α Gal epitope detected by either a mAb or the GS1-B4 lectin was detected in the bovine gut. The staining obtained with these reagents matched that of the VLPs since, as with the anti-A and H type 2/LeY, it was maximal in the gastro-duodenal area and absent from the distal part of the gut (Fig. 2), but more specifically, since the labeled cells and the relative intensities of labeling were the same as those observed following incubation with rNB2 VLPs as described above (Fig. 1G and 1H). The pattern of labeling obtained with the anti- α Gal reagents was thus indistinguishable from that obtained with the

VLPs, suggesting that the latter might recognize a carbohydrate structure related to the α Gal epitope.

Characterization of the Newbury2 recombinant VLPs ligand

HBGAs were first characterized on human erythrocytes and it has been previously shown that hemagglutination (HA) can be used to define the HBGA specificity of human noroviruses [30]. We thus tested the ability of rNB2 VLPs to agglutinate bovine or human red blood cells. A strong agglutination of bovine erythrocytes was obtained both at 4°C and room temperature, but no agglutination at all was detected using human erythrocytes at either temperature, irrespective of their ABO phenotypes. In contrast, a GII.4 strain agglutinated human O blood group red blood cells, but not bovine erythrocytes (Fig. 3A). Since HBGAs are also present in saliva, we next assayed the binding of rNB2 VLPs to bovine and human saliva samples. When human saliva samples were assayed, no signal above background was obtained. In contrast, using the same amount of VLPs from a GII.4 strain, all human saliva samples from secretor individuals were strongly recognized, irrespective of their ABO phenotype. As previously observed for other human GII.4 strains, saliva samples from

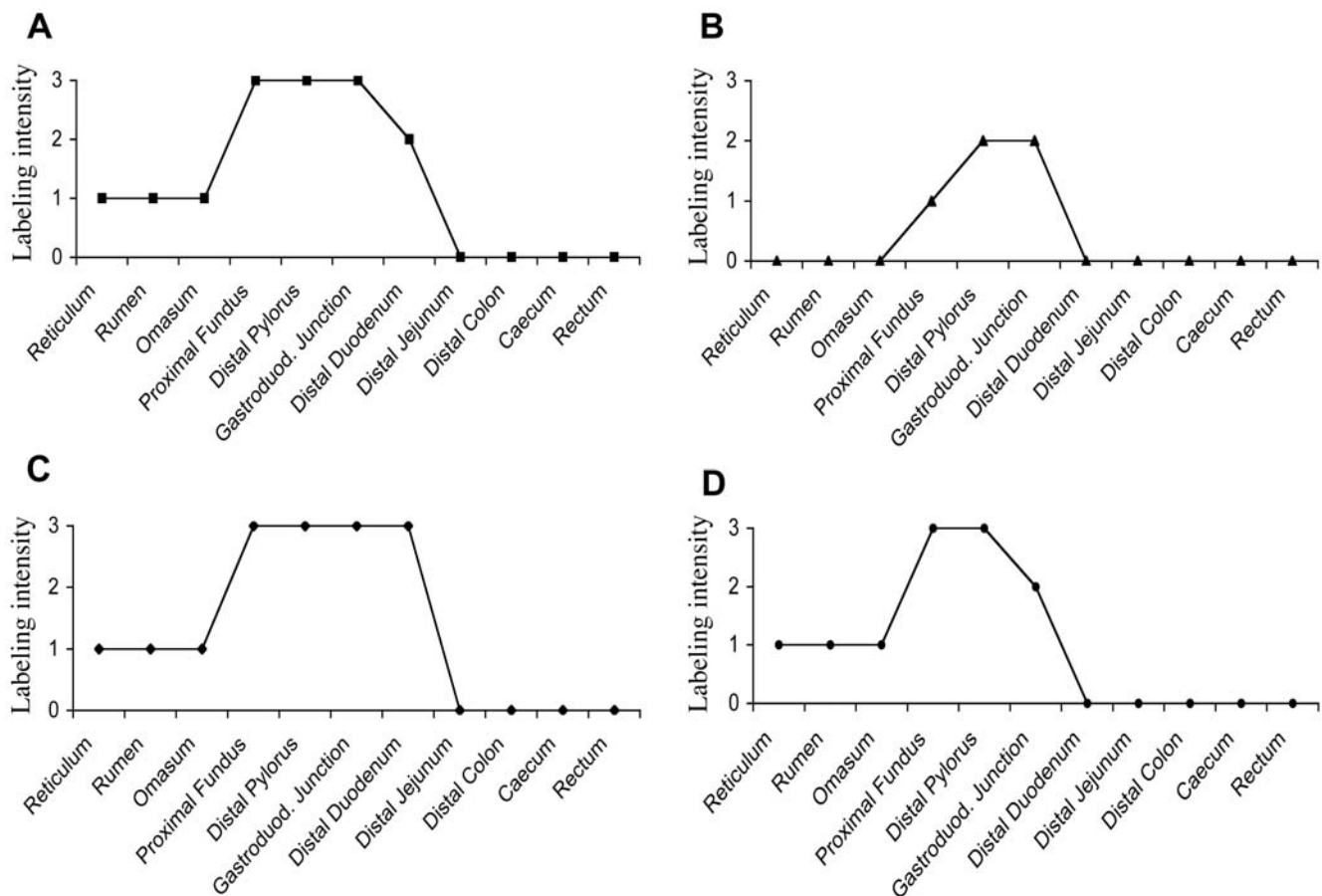


Figure 2. Expression of rNB2 VLPs ligands and of HBGAs along the bovine digestive tract. Expression of rNB2 VLPs epithelial ligands and HBGAs on the various parts of the digestive tract was determined by immunohistochemistry (see Fig. 1). Intensity of labeling shown on the y axis was visually graded from strongly positive (grade 3), moderately positive (grade 2) to weakly positive (grade 1) and negative (grade 0). (A) NB2 VLPs ligands; (B) α Gal epitope detected using either the GS1-B4 isolectin or the 4F102c2 mAb; (C) A blood group antigen detected using mAb 9113D10 which recognizes all types of A epitopes; (D) H type 2/LeY epitopes detected using either the UEA-I lectin, or the 19-0LE mAb. *In addition to epithelial cells, rNB2 VLPs, GS1-B4 and the 4F102c2 mAb stained the vascular endothelium throughout the digestive tract.
doi:10.1371/journal.ppat.1000504.g002

nonsecretor individuals were not recognized, showing specificity of the binding (Fig. 3B). On bovine saliva samples, rNB2 VLPs binding was readily detected, albeit with highly variable OD values, some samples giving a strong signal and others a signal at background level only (Fig. 3C). Nearly identical results were obtained with human natural anti- α Gal antibodies (Fig. 3E). The binding of the UEA-I lectin and of anti-A and anti-B mAbs were assessed on the same set of samples. No binding of the anti-B was detected (data not shown). As depicted on Fig. 3D and 3F, the binding of the UEA-I lectin and of the anti-A mAb were heterogeneous too, but they were not related to each other, nor to that of the rNB2 VLPs. This indicates that individual bovine saliva samples are polymorphic with regard to the presence of either the A or H antigens. In addition, the lack of concordance between either the A or H antigens expression and the binding of rNB2 VLPs or human natural antibodies shows that individual differences in rNB2 VLPs binding were not due to non specific

heterogeneity of the total amount of salivary glycans but were due to a true heterogeneity of the expression of the capsids ligand and of the α Gal epitope. Taken together, these results clearly indicate that the ligand recognized by rNB2 VLPs is distinct from A, B or H antigens, but not from the α Gal epitope and that it is not present on human red blood cells or in human saliva.

In order to define the carbohydrate specificity of rNB2 VLPs, their ability to recognize a set of HBGAs related oligosaccharides was determined using an ELISA-based binding assay. The structure of all the oligosaccharides tested is given in Table 1. Binding was observed on two structures which share a common terminal galactose in α 1,3 linkage, contrasting with the binding pattern of the human NV strain (Fig. 4A). None of the other tested oligosaccharides allowed binding above background. One of the α Gal-terminated structures recognized by the bovine VLPs is fucosylated on the N-acetylglucosamine residue, generating a Lewis X epitope (α Gal-Le^x). The presence of this fucose residue

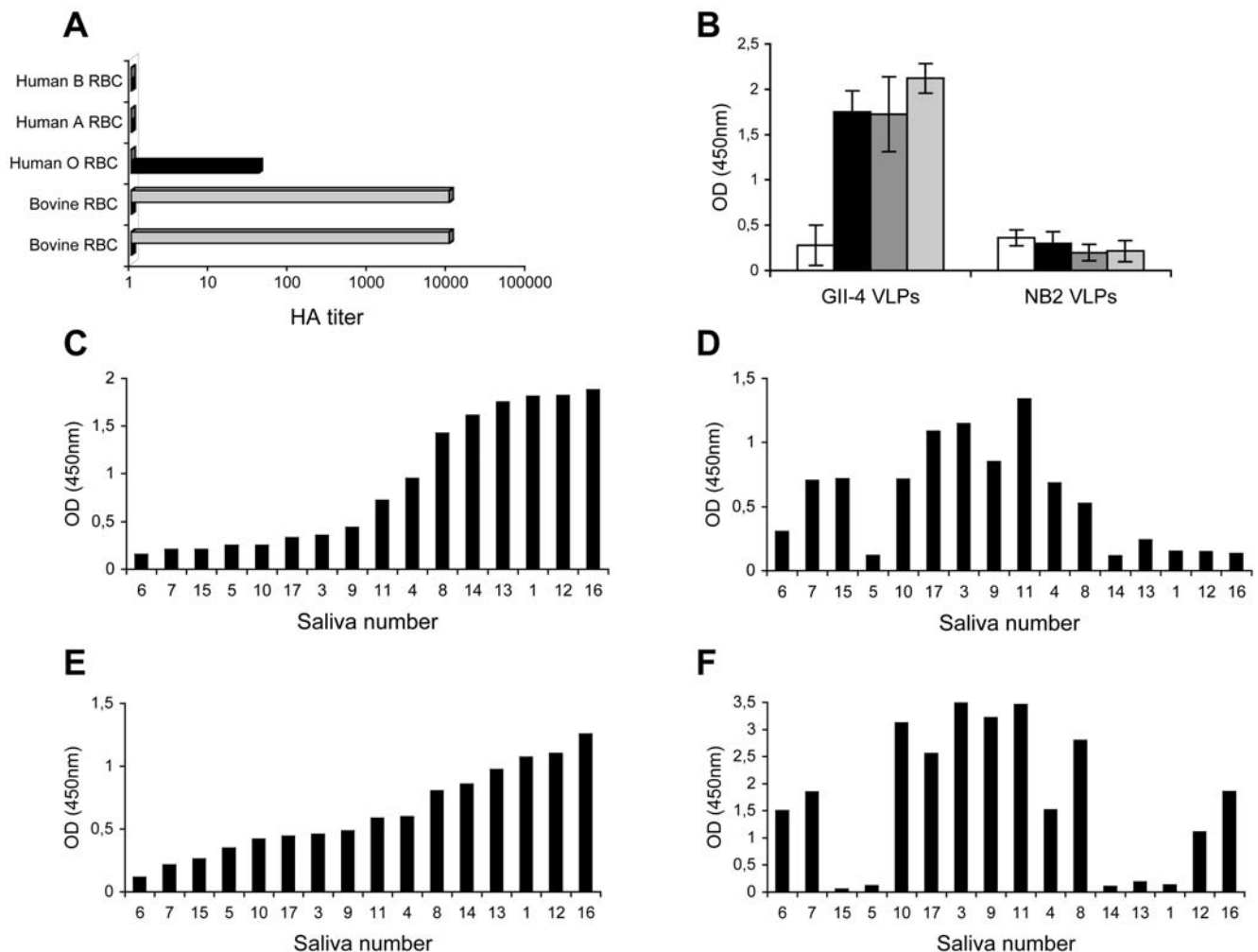


Figure 3. Red blood cell agglutination and saliva recognition. (A) Agglutination of bovine and human erythrocytes by VLPs from the bovine NB2 strain (gray bars) and from a human GII.4 strain of the Grimsby type which binds to Le^x (black bars). Erythrocytes from 2 individual cows and human erythrocytes from A, B or O blood group individuals were used. Results are shown as hemagglutination titers (HA titers). (B) Recognition of human saliva by VLPs from the bovine NB2 strain and the human Dijon (GII.4) strain determined by ELISA. Saliva samples were grouped into nonsecretors (white bars), A secretors (black bars), B secretors (dark gray bars) and O secretors (light gray bars) with 4 samples in each group. (C) Binding of rNB2 VLPs to individual bovine saliva samples determined by ELISA. Individual samples are numbered from 1 to 17 and ranked according to increasing OD 450 nm values. (D) Expression of the A blood group antigen in individual bovine saliva samples. (E) Expression of the α Gal epitope detected by human natural anti- α Gal antibodies in individual bovine saliva. (F) Expression of H/Le^x epitopes detected by the UEA-I lectin in individual bovine saliva samples. In D, E and F, samples are ranked as in C.
doi:10.1371/journal.ppat.1000504.g003

Table 1. Neoglycoconjugates used to determine the carbohydrate specificity of rNB2 VLPs.

Trivial name	Oligosaccharide structure ^a
Tn	GalNAc α -R1
α -galactose monosaccharide	Gal α -R1
α -fucose monosaccharide	Fuc α -R1
A disaccharide	GalNAc α 3Gal β -R1
B disaccharide	Gal α 3Gal β -R1
	Gal α 2Gal β -R1
	Gal α 6Glc β -R1
Core 5	GalNAc α 3GalNAc α -R1
H disaccharide	Fuc α 2Gal β -R1
Forsmann disaccharide	GalNAc α 3GalNAc β -R1
Core 8	Gal α 3GalNAc α -R1
Type 2 precursor	Gal β 4GlcNAc β -R1
T α β	Gal α 3GalNAc β -R1
A trisaccharide	GalNAc α 3(Fuc α 2)Gal β -R1, R2
B trisaccharide	Gal α 3(Fuc α 2)Gal β -R1, R2
H type 1	Fuc α 2Gal β 3GlcNAc β -R1
H type 2	Fuc α 2Gal β 3GlcNAc β -R1, R2
H type 3	Fuc α 2Gal β 3GalNAc α -R1
α Gal trisaccharide	Gal α 3Gal β 4GlcNAc β -R1
Gb3 (Pk)	Gal α 4Gal β 4Glc β -R1
iGb3	Gal α 3Gal β 4Glc β -R1
P1 trisaccharide	Gal α 4Gal β 4GlcNAc β -R1
Lewis a	Gal β 3(Fuc α 4)GlcNAc β -R1
Lewis x	Gal β 4(Fuc α 3)GlcNAc β -R1
3'-Sulfo-Lewis a	Su-O-3Gal β 3(Fuc α 4)GlcNAc β -R1
3'-Sulfo-Lewis x	Su-O-3Gal β 4(Fuc α 3)GlcNAc β -R1
A type 2	GalNAc α 3(Fuc α 2)Gal β 4GlcNAc β -R1
B type 2	Gal α 3(Fuc α 2)Gal β 4GlcNAc β -R1
Lewis b	Fuc α 2Gal β 3(Fuc α 4)GlcNAc β -R1, R3
Lewis y	Fuc α 2Gal β 4(Fuc α 3)GlcNAc β -R1, R2
Sialyl-Lewis a	NeuAc α 2,3Gal β 3(Fuc α 4)GlcNAc β -R1, R3
Sialyl-Lewis x	NeuAc α 2,3Gal β 3(Fuc α 4)GlcNAc β -R1, R3
6-sulfo Sialyl-Lewis x	NeuAc α 2,3Gal β 3(Fuc α 4)(Su-O-6)GlcNAc β -R1
Tk	GlcNAc β 3(GlcNAc β 6)GlcNAc β 3Gal β -R1
Lacto-N-tetraose (LNT)	Gal β 3GlcNAc β 3Gal β 4Glc β -R3
Lacto-N-neotetraose (LNnT)	Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β -R3
α -Gal-Lewis x	Gal α 3Gal β 4(Fuc α 3)GlcNAc β -R1
α -Gal pentasaccharide	Gal α 3Gal β 4GlcNAc β Gal β 4Glc β -R1
Sialyl-Lewis x pentasaccharide	NeuAc α 2,3Gal β 3(Fuc α 4)GlcNAc β 3Gal β -R1
Sialyl-lacto-N-neotetraose (Sia-LNnT)	NeuAc α 2,3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β -R1
Lactoneofucopentaose I (LNF I)	Fuc α 2Gal β 3GlcNAc β 3Gal β 4Glc β -R1, R3
Lacto-N-fucopentaose II (LNF II)	Gal β 3(Fuc α 4)GlcNAc β 3Gal β 4Glc β -R3
Lacto-N-fucopentaose III (LNF III)	Gal β 4(Fuc α 3)GlcNAc β 3Gal β 4Glc β -R3
A hexasaccharide	GalNAc α 3(Fuc α 2)Gal β 3GlcNAc β 3Gal β 4Glc β -R3
A heptasaccharide	GalNAc α 3(Fuc α 2)Gal β 3(Fuc α 4)GlcNAc β 3Gal β 4Glc β -R3

^aOligosaccharides were used coupled to either polyacrylamide via an 3 carbon spacer (R1), or to human serum albumin via either a p-aminophenylethyl spacer (R2) or an acetyl phenylenediamine spacer (R3).

doi:10.1371/journal.ppat.1000504.t001

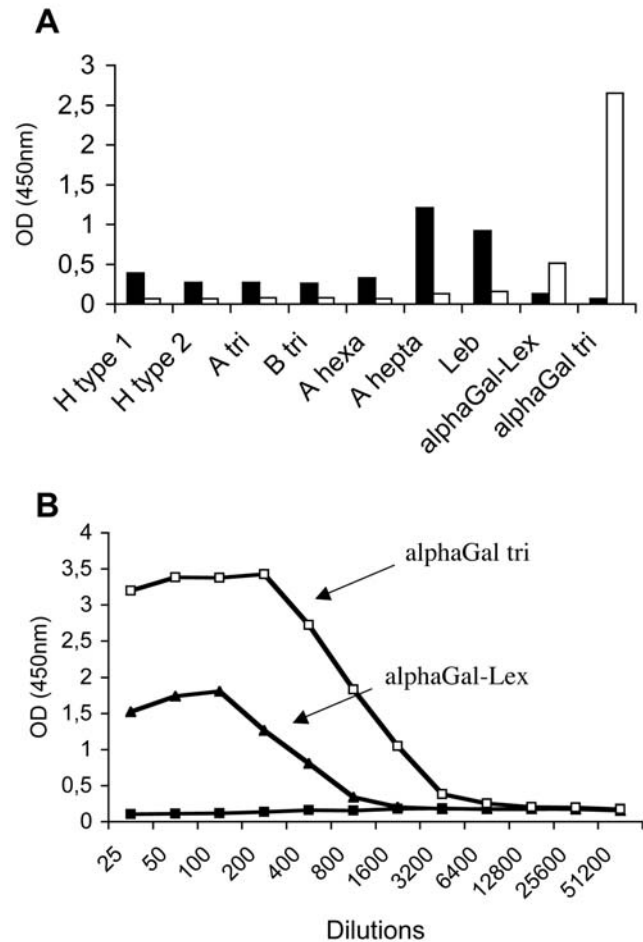


Figure 4. Binding of rNB2 VLPs to immobilized synthetic oligosaccharides. (A) A panel of neoglycoconjugates was coated on ELISA plates at 10 μ g/ml and binding of either NB2 (white bars) or NV VLPs (black bars) was detected as described in the Materials and Methods section. OD 450 nm values on selected glycoconjugates are shown. No positive values were recorded for any of the other glycoconjugates listed in Table 1. (B) Binding of rNB2 VLPs to serially diluted structurally related PAA-conjugates. White squares: α Gal trisaccharide; black triangles: α Gal-Lex; black squares: mean of other PAA-conjugates (see Table 1 for structures). Results are shown as OD 450 nm as a function of the reciprocal of PAA-conjugate dilutions with 1/25 corresponding to 40 μ g/ml.

doi:10.1371/journal.ppat.1000504.g004

partially impairs recognition as shown on Fig. 4B. Thus the preferred structure recognized by rNB2 VLPs among those tested is the trisaccharide Gal α 3Gal β 4GlcNAc. Noticeably, the B blood group antigen which also presents a terminal galactose in α 1,3 linkage was not recognized, consistent with the lack of agglutination of human B blood group erythrocytes and with the lack of binding to human saliva samples from B secretors.

In order to determine if the ligand recognized in bovine saliva and digestive tissues corresponds to the α Gal antigen, the effect of α -galactosidase treatment was tested. A saliva sample that allows good binding of rNB2 VLPs was chosen (sample # 8). The binding of VLPs was completely lost following the enzyme treatment. Activity of the enzyme was controlled using the Gal α 3Gal β 4GlcNAc conjugate and binding to the treated conjugate was similarly lost after α -galactosidase treatment (Fig. 5A). The same treatment was applied to a bovine duodenal tissue section and staining completely disappeared (data not

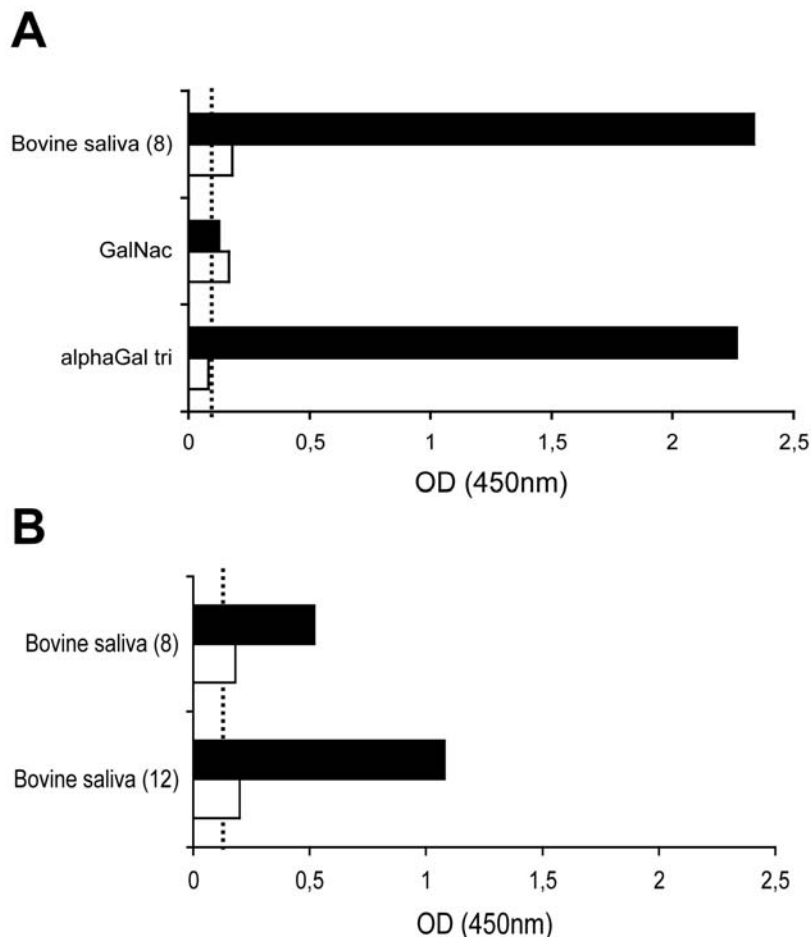


Figure 5. Inhibition of binding to bovine saliva by α -galactosidase treatment or by human natural anti- α Gal antibodies. (A) Bovine saliva from a positive individual (#8) or PAA-conjugates (α Gal trisaccharide and α GalNAc, see Table 1 for structures) were coated at a 1/1000 dilution or 10 μ g/ml respectively and either treated with α -galactosidase from green coffee beans (white bars) or enzyme buffer only (black bars). (B) Bovine saliva from 2 positive individuals (#8 and #12) were coated as above and incubated with purified human anti- α Gal (white bars) or blocking buffer only (black bars) for 2 hours prior to addition of rNB2 VLPs. Binding of VLPs was detected as described in the Materials and Methods section and shown as OD 450 nm values. Dashed lines indicate background level.
doi:10.1371/journal.ppat.1000504.g005

shown, see below for porcine tissues). In addition, human natural anti- α Gal antibodies could inhibit the binding of rNB2 VLPs to bovine saliva samples (Fig. 5B). These results indicate that rNB2 VLPs specifically recognize the α Gal antigen of the HBGAs family in bovine saliva and digestive tract.

The binding epitope of Gal α 3Gal β OMe at atomic resolution

Binding of the Galili disaccharide (Gal α 3Gal β OMe) to rNB2 VLPs was studied using saturation transfer difference (STD) NMR experiments [31]. This technique allows identification and characterization of ligand binding to large receptor proteins and yields binding epitopes of the ligand molecules at atomic resolution. It has been shown lately that the technique is well suitable for the investigation of carbohydrate receptor recognition by caliciviruses [32]. STD NMR spectra of Gal α 3Gal β OMe and of the methyl glycoside of the blood group B trisaccharide in the presence of rNB2 VLPs at a saturation time of 2 s are shown in Fig. 6. The Galili disaccharide yielded sizable STD effects whereas no response at all was observed for the B-trisaccharide. This is in accordance with the biological assays that could not detect any binding to the B-antigen and underlines the strict specificity of the

VLPs for the disaccharide moiety Gal α 3Gal β OMe. STD NMR experiments of Gal α 3Gal β OMe in the presence of rNB2 VLPs with increasing saturation times yielded STD build-up curves for individual protons. Fitting of these data to a single-exponential function (cf. Materials and Methods) delivered the binding epitope. It has been shown that strong spin-diffusion within large virus like particles requires the acquisition of build-up curves instead of single point measurements in order to generate reproducible binding epitopes. The binding epitope of Gal α 3Gal β OMe derived from this analysis is shown in Fig. 7. It is remarkable that the protons around the glycosidic linkage received the largest fraction of saturation. This suggests that the α 3-glycosidic linkage is in intimate contact with the VLP binding pocket. Obviously, the Galili disaccharide represents the central recognition element.

Species specificity of the rNB2 VLPs ligand

The α Gal is not expressed in apes due to inactivation of the *GGTA1* gene encoding the α 1,3galactosyltransferase. Yet, it has been detected in all other mammalian species tested so far [17]. The lack of agglutination of human red blood cells and of binding to human saliva by rNB2 VLPs is consistent with the inability of humans to synthesize this antigen. In addition, no binding to the

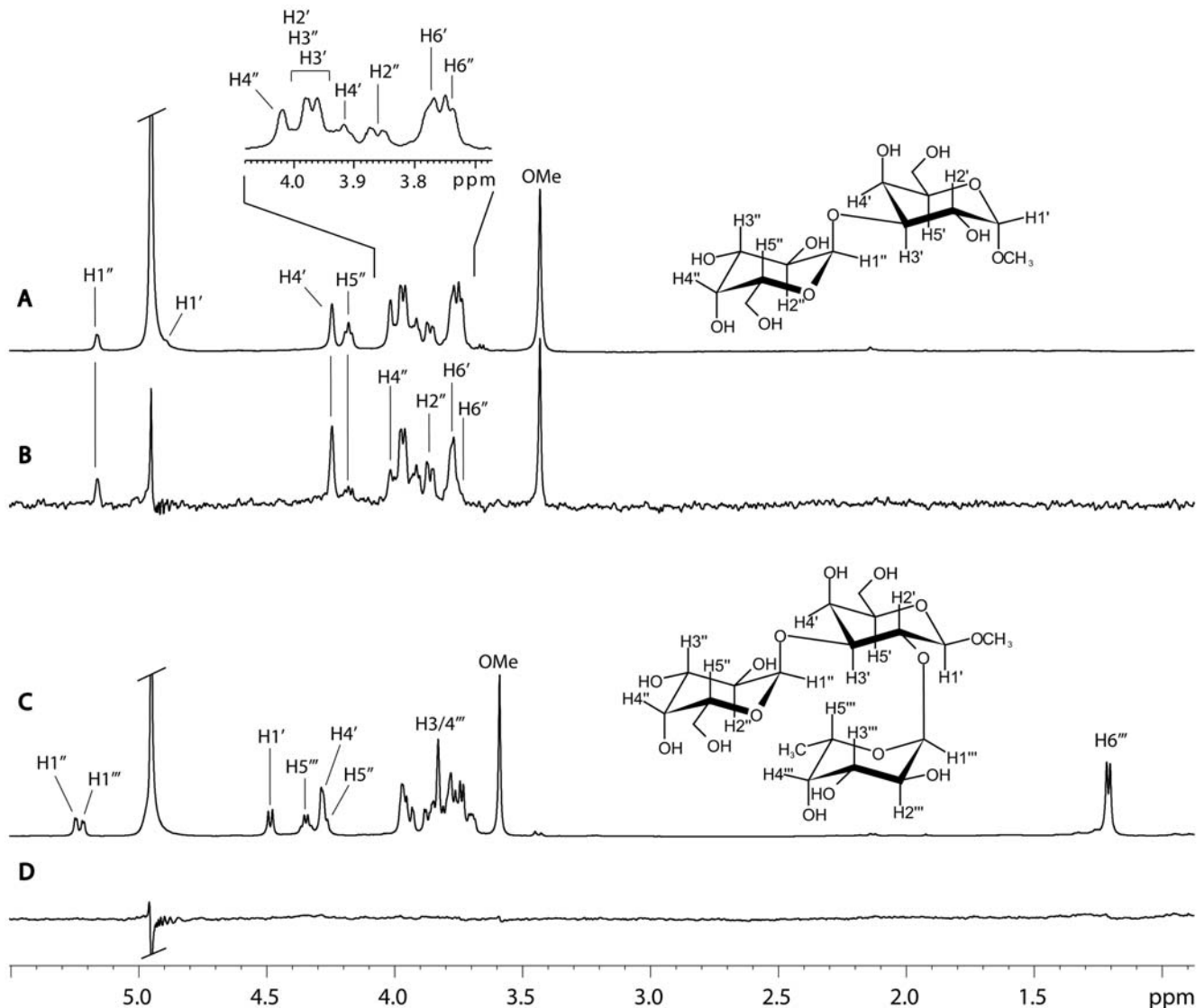


Figure 6. Observation of STD signals for the α Gal disaccharide and the blood-group B trisaccharide. (A) Reference ¹H NMR spectrum and (B) STD NMR spectrum of Galα3GalβOMe in the presence of bovine norovirus VLPs. (C) Reference ¹H NMR spectrum and (D) STD NMR spectrum of the methyl glycoside of the blood group B trisaccharide in the presence of bovine norovirus VLPs. STD signals are only observed for Galα3GalβOMe. The blood group B trisaccharide shows no STD effects, and is therefore not recognized by the VLPs. Spectra were recorded at 500 MHz at a temperature of 282 K with 256 and 816 scans, respectively. doi:10.1371/journal.ppat.1000504.g006

human duodenal mucosa was observed, confirming that rNB2 VLPs do not cross react with a human epitope present in the human gut (Fig. 1I).

Since pigs are known to be infected by noroviruses, and since they are known to express the α Gal antigen, we tested the binding of rNB2 VLPs to the porcine gut by immunohistochemistry. A specific staining was readily observed throughout the digestive tract but surprisingly, it was restricted to non epithelial cells, including the vascular endothelium and to a lesser extent smooth muscle cells (Fig. 1J). Porcine duodenal tissue sections were then treated with the α -galactosidase from green coffee beans. Like on bovine tissue sections, the treatment completely abolished the binding of rNB2 VLPs to these cell types (Fig. 1K and 1L). The distribution of the α Gal antigen in porcine digestive tract was then tested using an anti- α Gal mAb and the GS1-B4 lectin. We observed that the two reagents gave stainings completely parallel

with that obtained with the rNB2 VLPs (data not shown). This indicates that in porcine tissues, the α Gal epitope is not expressed by digestive epithelial cells although it is present on other cell types recognized by the bovine viral capsids.

Since the lack of α Gal antigen in humans is due to inactivation of the *GGTA1* gene, we tested whether this event was sufficient to have caused the lack of recognition of human cells by rNB2 VLPs. Transfection of human HEK 293 cells with the functional rat *Ggta1* cDNA allowed expression of the α Gal antigen as detected by flow cytometry using the GS1-B4 lectin. Control HEK 293 cells that lacked the α Gal antigen were barely recognized by rNB2 VLPs. In contrast, a clear binding was observed on the *Ggta1* transfected human cells. Inversely, pig vascular endothelial cells spontaneously express the α Gal antigen as documented from the labeling by the GS1-B4 lectin. The attachment of rNB2 VLPs to such cells was clearly detected by flow cytometry. However, we

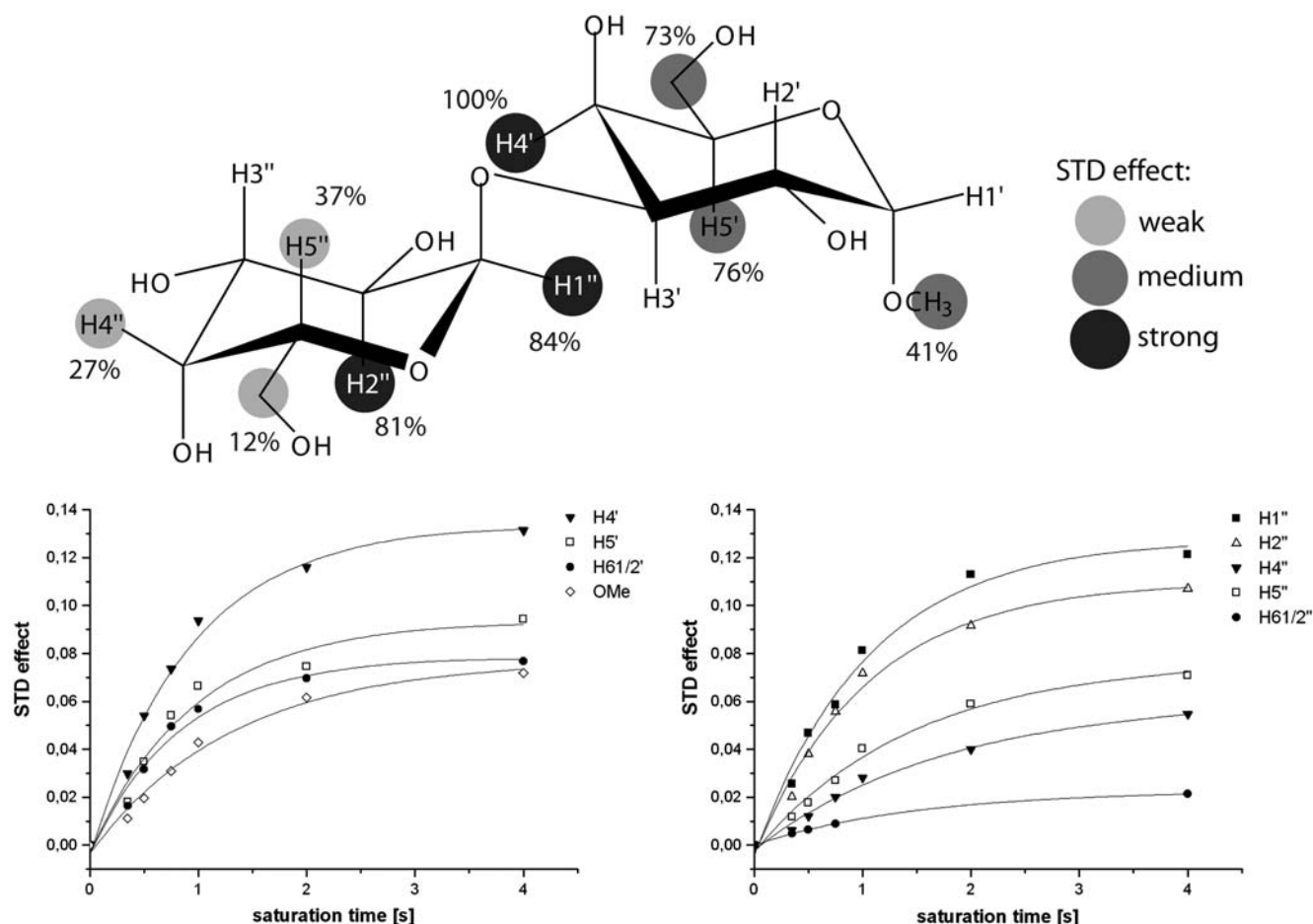


Figure 7. Binding epitope of Gal α 3Gal α OMe binding to rNB2 VLPs (top) as derived from STD build-up curves (bottom). Greyscale circles encode the relative size of the saturation transfer and reflect the vicinity to protons in the binding pocket of rNB2 VLP. The larger the saturation transfer, the closer are the ligand protons to protons of the VLP binding pocket. From the Figure it is seen that the region around the glycosidic linkage is essential for recognition by the VLPs.
doi:10.1371/journal.ppat.1000504.g007

observed that pig vascular endothelial cells from a *Ggta1* KO pig, which accordingly are not stained by GS1-B4, were no longer recognized by the bovine VLPs (Fig. 8). These results confirm that rNB2 VLPs bind to the α Gal antigen and that the expression of a functional α 1,3galactosyltransferase is necessary and sufficient to allow their attachment to mammalian cells.

Discussion

RNA viruses present a high risk of cross-species transmission since they are over-represented in the list of pathogens known to have crossed the species barrier [33]. This is most likely due to their particularly high mutation rate which allows them to evolve fast, providing rapid adaptation to a new host species. The use of phylogenetically conserved ligands facilitates the crossing of the species barrier. Since among Caliciviruses, human strains of norovirus and the rabbit hemorrhagic disease virus bind to HBGAs and since HBGAs can be phylogenetically conserved, we tested the possibility that the prototype of the bovine NoV, the Newbury2 strain classified in the GIII.2 cluster, could use such a conserved carbohydrate ligand to bind to bovine, porcine or human digestive epithelial cells. Our results demonstrated that VLPs from NB2 attach to the surface of the bovine duodenal epithelium by recognition of the α Gal epitope of the HBGAs

family and that this ligand cannot be used to infect either man or pig. This conclusion is based on the following observations: (1) the tissue distribution of rNB2 VLPs binding sites in the three species perfectly matched that of reagents specific for the α Gal epitope which is absent from human and pig duodenal epithelial cells; (2) among many immobilized HBGAs-related synthetic oligosaccharides, only those presenting the α Gal epitope supported binding of the VLPs; (3) α -galactosidase treatment of either tissue sections or bovine saliva completely impaired the binding of rNB2 VLPs; (4) STD NMR experiments confirmed recognition of the α Gal epitope at the atomic level; (5) transfection of human cells with an α 1,3galactosyltransferase cDNA allowed binding of rNB2 VLPs whilst inversely, their binding to porcine vascular endothelial cells was lost on cells from an α 1,3galactosyltransferase KO pig.

The α Gal epitope is structurally related to the histo-blood group antigen B type 2 since both share a terminal galactose in α 1,3 linkage and the type 2 backbone structure (Gal β 4GlcNAc). They only differ by the fucose residue of the B antigen, allowing some reagents such as some anti-B mAbs or the GS1-B4 isolectin to cross-react. Nevertheless, the possibility that rNB2 VLPs could recognize a B blood group epitope in addition to the α Gal antigen is very unlikely since it failed to agglutinate human B blood group erythrocytes and to bind to human saliva from B blood group individuals of the secretor phenotype who strongly express B

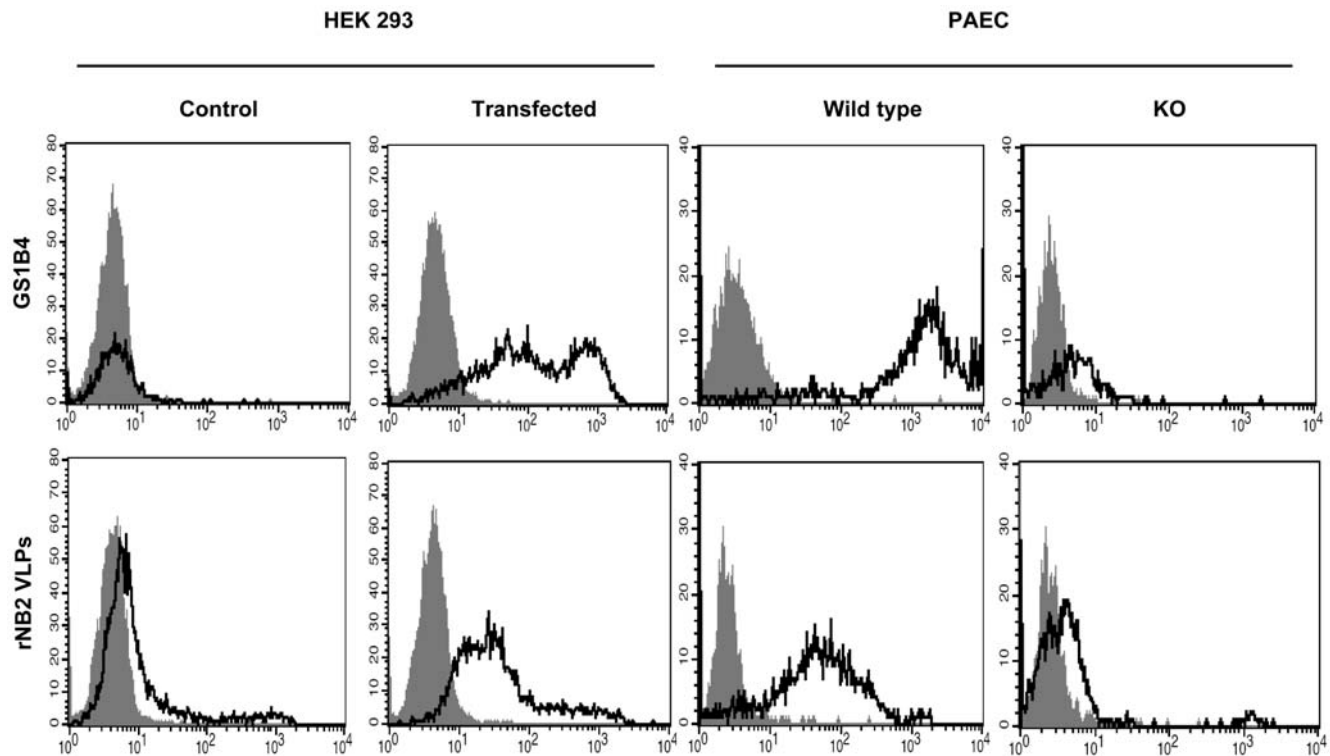


Figure 8. Cytofluorimetric analysis of the binding of rNB2 VLPs and the GS1-B4 lectin to rat Ggta1 transfected or control mock transfected HEK 293 cells and to porcine aortic endothelial vascular cells (PAEC) from wild type or Ggta1 KO pigs. Cells were incubated with either the GS1-B4 lectin or rNB2 VLPs and binding was detected as described in the materials and methods section. The respective negative controls (grey plots) correspond to either cells incubated in absence of the lectin or to cells incubated in the absence of VLPs. Another negative control performed in the presence of VLPs followed by incubation with an irrelevant immune rabbit antiserum and FITC-labeled anti-rabbit IgG yielded similar results. The log of fluorescence intensities in arbitrary units is plotted against the cell number.
doi:10.1371/journal.ppat.1000504.g008

epitopes in their saliva. In addition, at the atomic level it was found by STD NMR experiments that the α 3-glycosidic linkage serves as the central recognition element. Any disturbances close to this region such as the addition of a fucose residue in the 2-position of the reducing galactose moiety to yield the B-antigen would therefore impede with the binding process. One may speculate whether other positions that are more remote from the glycosidic linkage may be modified so as to obtain a better binder. Interestingly, we did not detect B blood group reactivity on cow tissue sections or saliva, making less likely the possibility for GIII.2 strains to evolve toward cross-recognition of the α Gal and the B epitopes. Besides the species-specific expression of the α Gal antigen on bovine digestive epithelial cells, another species-specific bovine characteristic was evidenced with regard to HBGAs expression. Indeed, we failed to detect HBGAs based on type 1 precursor (Gal β 3GlcNAc) in bovine tissues or saliva, consistent with the results from earlier structural analyses of O-linked oligosaccharides from bovine salivary mucins which described the presence of type 2-based structures only [34,35]. Those studies also failed to detect the α Gal epitope. However, it could either be carried by N-linked glycans of salivary glycoproteins or the saliva studied could have originated from animals that did not express the epitope, consistent with our observation that not all bovine saliva samples could support attachment of rNB2 VLPs. Human NoV of either the GI or GII genogroups recognize HBGA motifs based on both type 1 and type 2 precursors, but show stronger binding to type 1-based structures, particularly at 37°C [36,37]. Human small intestine presents HBGA motifs based on type 1 as well as

on type 2 backbones, suggesting adaptation of these strains to their host glycans. Even though cows can express A and H type 2 or Le^x antigens in their digestive tract, they may be less sensitive to infection by human NoV strains due to the lack of type 1-based structures. Interestingly, using saliva samples, we observed that similar to man and pig, cows are polymorphic regarding expression of the A and H antigens since some cows did not express either A, H or both. As these polymorphisms were unrelated to the α Gal expression, the combination of the A, the H and the α Gal polymorphisms is expected to generate eight subgroups of bovine and therefore significant individual variation which may be related to host-pathogens interactions.

Regardless, our results do not prove that the α Gal ligand is necessary for infection of cows by GIII.2 strains, but several aspects support that possibility. Various human NoV strains that bind to HBGA motifs have been shown to infect their host in an HBGA-dependent manner [15]. Likewise, we recently obtained indirect evidence that the binding of RHDV, a lagovirus, to the H type 2 antigen is necessary for infection [38]. Thus, the conservation of the binding ability of an HBGA motif by the Newbury2 strain suggests that it may also be required for infection. Furthermore, histopathological analysis of the lesions of calves experimentally infected with NB2 indicated that they were restricted to the proximal small intestine [11], which coincides with the main site of expression of the α Gal antigen on digestive epithelial cells. Finally, there is no clear evidence that bovine NoV can infect an other species [8]. Such viruses have never been detected in human or porcine samples, suggesting that they do not circulate in those

species. This is to be expected if the α Gal antigen serves as a receptor for infection. Nonetheless, one study described the presence of anti-GIII.2 antibodies in the serum of veterinarians in the Netherlands [23]. Bovine NoVs share cross-reactive epitopes with human NoVs [39,40]. This cross-reactivity may explain the detection of anti-GIII.2 in some human serum samples.

In absence of cell culture models, it is very difficult to prove that a ligand is truly a receptor. The above described demonstrations that HBGAs can be compulsory ligands have been obtained through the analysis of the effect of their polymorphism on infection [41,42,43,44]. Interestingly, we observed that the rNB2 VLPs salivary binding assay could distinguish between binder and non binder cows. If that polymorphism is also present at the level of digestive epithelial cells, it could be used to experimentally assay the sensitivity of either group to infection by the Newbury2 strain.

To date recombinants of bovine NoV and HuNoV have been identified and appear to be of frequent occurrence [4,45,46,47,48]. Cattle co-infection by a GIII.2 bovine strain and a human NoV could thus lead to the emergence of recombinant strains able to infect humans. However, this seems unlikely since as discussed above, the lack of type 1-based HBGAs in cow digestive epithelium may decrease recognition by HuNoVs, and since GI, GII and GIII strains are genetically distant and accordingly, inter-genogroup recombination, although recently observed, should be much less frequent than intra-genogroup recombination [4,49].

Recent crystallographic analyses of the capsid protein domain of a GI.1 and a GII.4 NoV interacting with oligosaccharides showed that the two strains use distinct binding sites on the capsid protein protruding domain, although they bind to very similar oligosaccharides [50,51]. A fucose residue is involved in both instances, although it is more essential to the GII.4 binding site than to the GI.1 binding site. Here we showed that the best binder of a GIII.2 strain is a related carbohydrate structure devoid of fucose and that addition of an α 1,3-linked fucose to the backbone N-acetylglucosamine impaired recognition. It will thus be interesting to define the mode of recognition of the α Gal trisaccharide by the NB2 strain in order to know if its binding site corresponds to one of those already characterized for either GI or GII strains. This knowledge should provide crucial information to understand how NoVs adapt to their host species and evolve to maintain recognition of diverse HBGAs that allow binding to allotypic and/or xenotypic host molecules.

The Galili antigen has mainly been studied in the context of xenotransplantation since it was originally observed that humans naturally produce antibodies against it and since these antibodies were shown to be the primary cause of hyperacute rejection of pig xenografts organs in human and hominids [17]. But the reason why the *GGTA1* gene has been inactivated in the Hominidae lineage an estimated ~ 28 MA ago is unclear. The loss of the α Gal epitope allows the generation of so-called natural antibodies, similar to the generation of anti-A or anti-B natural antibodies in the ABO allogenic system, probably because some bacteria express identical or cross-reactive epitopes. These anti- α Gal antibodies can recognize pathogens that carry the xenogenic epitope. Thus, enveloped viruses produced in animal cells that express a functional α 1,3galactosyltransferase carry the α Gal antigen on their envelope glycoproteins and the presence of natural antibodies directed against this epitope in human serum leads to their rapid elimination [52,53]. For this reason it has been proposed that inactivation of the *GGTA1* gene in the Hominidae lineage may have allowed escape from a highly pathogenic virus thanks to the natural anti-carbohydrate antibodies [17]. Our observation that

an animal pathogen can use the α Gal antigen as a ligand additionally suggests that the loss of *GGTA1* may have allowed escape from some NoV strains. Clearly, at present GIII NoVs are of moderate or low pathogenicity. Nevertheless virulence evolves and past NoVs may have been much more virulent than present ones. The loss of the α Gal ligand may have contributed to escape dreadful past NoV epidemics in hominids. Alternatively, the loss of the *GGTA1* enzyme may have been completely independent from NoV infection. In this case, NoVs would have more recently evolved carbohydrate-binding specificities adapted to a broad spectrum of mammalian species. Regardless, the exquisite specificity of the NB2 strain for the α Gal epitope is well adapted to its bovine host, but inversely should restrict its possibilities of cross-species transmission.

Materials and Methods

Ethics statement

All animals were handled in strict accordance with good animal practice as defined by the relevant national and/or local animal welfare bodies.

Reagents

The BG-4 anti-H type 1 specific monoclonal antibody (mAb) was purchased from Signet laboratories (Dedham, CA) and mAbs 19-OLE, 7-LE and 2-25LE were obtained from Dr. J. Bara (CNRS, Villejuif, France). They are an anti-H type 2 showing a slight cross-reactivity with Le^y (unpublished results), an anti-Le^a and an anti-Le^b, respectively. The anti-H types 3 and 4 mAb MBr1 was purchased from Covalab (Villeurbanne, France). The anti-A (all types) mAb 9113D10 was obtained from Diagast (Loos, France). The anti-B mAb ED3 was a kind gift from Dr. A. Martin (CRTS, Rennes, France). The anti- α Gal 4F102c2 was a kind gift from Dr. A. Bendelac (Howard Hughes Medical Institute, Chicago, IL). The lectin from *Griffonia simplicifolia* B4 isolectin 1 (GS1-B4), either peroxidase or fluorescein isothiocyanate (FITC) conjugated, which recognizes α 1,3-linked terminal galactosyl residues, was purchased from EY Laboratories (San Mateo, CA USA) and Vector Laboratories (Burlingame, CA USA), respectively. The lectin from *Ulex europaeus* (UEA-1) peroxidase conjugated, which recognizes H type 2 and Le^y was obtained from Sigma (St Louis, MO). Alpha-galactosidase from green coffee beans was purchased from Sigma. The anti-GII and anti-GIII rabbit polyclonal antisera were prepared at the Veterinary School of Nantes by immunizing rabbits with VLPs from GII.4 (Dijon 171/96) and GIII.2 (NB2) strains, respectively.

Synthetic oligosaccharides as polyacrylamide conjugates were prepared as described previously [54,55]. Oligosaccharides coupled to HSA (human serum albumin) were obtained from IsoSep AB (Tulligen, Sweden). The structure of all oligosaccharides used is given on Table 1. The disaccharide Gal α 3Gal α OME was obtained from Calbiochem. The methyl glycoside of the B antigen has been synthesized enzymatically [56].

Preparation of VLPs

The recombinant virus-like particles were prepared by infecting High-five insect cells with recombinant baculoviruses according to a previously described method [57]. The Dijon GII.4 171/96 strain [58] and the GI.1 Norwalk strain (NV) constructs were kind gifts of Dr. E. Kohli (University of Burgundy, Dijon, France) and Dr. X. Jiang (Cincinnati Children's Hospital Medical Center, Cincinnati, Ohio, USA), respectively. Five days post-infection High-Five lysed cells and media were centrifuged at 4500 rpm for 15 min and the supernatants collected and centrifuged at 25,

000 rpm for 3h30 in a SW28 rotor. The pellets were resuspended in distilled water and submitted to 2 rounds of purification on a sucrose gradient. The gene encoding the capsid protein of the NB2 norovirus cloned into pFastBac vector (Invitrogen) was a kind gift of Drs S. Oliver and J. Bridger (Royal Veterinary College London). Competent *E. coli* DH10BAC cells, containing baculovirus shuttle vector plasmid were used to generate recombinant bacmids according to the manufacturer's instructions (Invitrogen). Bacmids were introduced into *Spodoptera frugiperda* 9 (Sf9) insect cells by lipofection and recombinant baculovirus were recovered. NB2 VLPs were produced by infection of *Spodoptera frugiperda* 9 (Sf9) insect cells at a MOI~5 PFU/cell. VLPs were purified as described previously [59] by double CsCl density gradient centrifugation. The composition of the VLPs was confirmed by polyacrylamide gel electrophoresis with Coomassie blue staining and VLP integrity was monitored by negative stain electron microscopy using 1% uranyl acetate stain. VLPs were stored in CsCl at 4°C.

Tissue samples and immunohistochemical analysis

Bovine and porcine tissues samples from the oesophagus to the rectum were obtained from healthy animals autopsied at the National Veterinary School of Nantes. Human gastroduodenal junction samples had been obtained from organ donors before the law 88-1138 of December 20, 1988 concerning resection of human tissues after death for scientific investigations. Animal tissues were fixed in formalin and human tissues were fixed in ethanol 95% for 48 hours, and paraffin embedded. Sections (5 µm) were rehydrated in graded ethanol and washed in phosphate-buffered saline (PBS). Endogenous peroxidase was inhibited by using methanol/H₂O₂ 0.3% for 20 minutes. Sections were then washed in PBS for 5 minutes and covered with PBS/bovine serum albumin (BSA) 1% for 30 minutes at room temperature in a humid atmosphere. After washing in PBS, sections were covered with either the primary antibodies (HBGAs mAbs), with the peroxidase-conjugated GS1-B4 or UEA-I lectins at 10 µg/mL, or with rNB2 VLPs at 1 µg/mL, diluted in PBS/BSA 1% and left at 4°C overnight. Sections were then rinsed 3 times with PBS and incubated with either biotinylated anti-mouse immunoglobulin IgG (Vector Labs, Burlingame, CA) or with rabbit anti-NB2. After washing in PBS, the sections were covered with either peroxidase-conjugated avidin (Vector laboratories) or with peroxidase conjugated anti-rabbit IgG (Uptima, Montluçon, France) for 45 minutes. Reactions were revealed with 3-amino-9-ethylcarbazol, and counterstaining was performed with Mayer's hemalum.

Periodate treatment was performed immediately after the endogenous peroxidase quenching step by incubating sections with either 1 mM or 10 mM sodium periodate in 50 mM sodium acetate buffer, pH 5.0, for 30 minutes at room temperature, followed by a 10 minutes incubation with 1% glycine in PBS. Control sections were treated similarly with the same buffer but without sodium periodate. Alpha-galactosidase treatment was performed on some sections by incubation at 37°C with 4 mU galactosidase in 50 mM citrate-phosphate buffer pH 4.6 for a total of 18 hours with a renewal after 6 hours. Control sections were incubated in parallel in the same buffer without the enzyme. Following treatments, rNB2 VLPs (1 µg/mL) were added for 1 hour at room temperature and the detection of binding was performed as described above.

Hemagglutination assay

Bovine blood samples were obtained from the National Veterinary School of Nantes and human blood samples were

provided by ABO phenotyped volunteer donors at INSERM U892 (Nantes, France). After collection, whole blood samples were stored at 4°C. Red Blood Cells (RBC) were packed in PBS pH 7.2 (without Ca²⁺) by centrifugation for 5 minutes at 2500 rpm. The hemagglutination activity (HA) of rNB2 VLPs and GII.4 VLPs was tested in microtitration plates with V bottomed wells (Nunc, Roskilde, Denmark). Equal volumes (25 µl) of VLPs (2.5 µg/mL) serially diluted in PBS and 1% packed RBCs in PBS were mixed and the plates were incubated for 1 hour at either room temperature or 4°C. The HA titer was the reciprocal of the greatest VLPs dilution that did allow sedimentation of the RBCs compared to negative control wells that contained buffer only.

Purification of human natural anti-αGal antibodies

The synthetic trisaccharide Galα3Galβ4GlcNAc covalently linked to Sepharose® FF (Fast Flow 6B, Pharmacia Biotech) was obtained from Lectinity (Moscow, Russia). A chromatography column (Biorad Richmond, CA) was packed with 15 ml of immunoadsorbent and rinsed with 250 ml PBS. Thirty ml pooled human plasma were then passed through the column at a 1 ml/h flow rate. After extensive washing with PBS, bound antibodies were eluted with 20 ml of CH₃COOH 0.58% in NaCl 0.9%, pH 2.8. The eluate was immediately neutralized with 20 ml of 100 mM Tris/HCl, pH 8.8 and dialyzed against PBS. The reactivity and specificity of the purified antibodies was then controlled by ELISA on coated PAA neoglycoconjugates.

ELISA-based carbohydrate and saliva microtiter plate assays

Oligosaccharides as PAA and HSA conjugates were coated at 10 µg/mL or serially diluted onto NUNC Maxisorp immunoplates in 100 mM carbonate buffer pH 9.6 by overnight incubation at 37°C in a wet atmosphere. After blocking with 5% defatted dried cow's milk in PBS for 1 hour, VLPs (4.6 µg/mL) in PBS 5% milk were added. After incubation for 2 hours at 4°C in the case of oligosaccharides-PAA or at 37°C for oligosaccharides-HSA, rabbit anti rNB2 VLPs serum at 1/1000 dilution in PBS 5% milk was added and incubated for 1 hour at 4°C. Then, peroxidase anti-rabbit IgG (Uptima) at a 1/2000 dilution in PBS 5% milk were added and incubated for 1 hour at 4°C. Between each step, the plates were washed 3 times with PBS 5% Tween 20. The enzyme signals were detected using TMB (3, 3', 5, 5' tetramethylbenzidine) as substrate (BD Bioscience, San Jose, CA) and then read at 450 nm.

Saliva samples were collected from 16 human individuals of known ABO and secretor phenotypes [37], and from 16 cows from the National Veterinary School of Nantes, respectively. After collection, samples were boiled for 10 minutes and centrifuged for 5 minutes at 13,000 g. To assay rNB2 VLPs binding to saliva, microplates were coated with either human or bovine saliva diluted 1/1000 in 100 mM carbonate buffer, pH 9.6 and the assay was performed as described above using rNB2 VLPs at a 1 µg/mL concentration and a 1 h incubation at 37°C.

To detect HBGAs in bovine saliva, after coating, a blocking step was performed with ELISA Synblock reagent (Serotec, Kidlington, UK) for 2 hour at 37°C. Either peroxidase-conjugated UEA-I lectin at 2 µg/mL, monoclonal antibodies at a 1/1000 dilution, or purified human natural anti-αGal antibodies at 50 µg/mL were then added to the wells. Reagents incubations were performed at 37°C for 1 h. Binding was detected either immediately following PBS washings for the UEA-I lectin, or following a 1 h incubation at 37°C with either anti-mouse or human anti-IgG peroxidase conjugates (Uptima), at a 1/2000 dilution.

Inhibition of binding of rNB2-VLPs by human natural anti- α Gal was performed by mixing VLPs at 1 μ g/ml with the purified antibodies at 50 μ g/ml for 2 h at 37°C prior to incubation onto the coated bovine saliva samples. After a 1 h incubation at 37°C, binding of the rNB2-VLPs was detected as above.

NMR experiments

NMR samples contained 0.24 μ g/ μ l or 22.5 nM VLPs in 23 mM phosphate buffer pH 7, 154 mM sodium chloride. Assuming a number of 180 monomers and 90 binding sites per capsid, this corresponds to a 4.06 μ M concentration of monomers, and to a 2.03 μ M concentration of binding sites. Samples contained 0.5 mM carbohydrate ligand, resulting in a ~1:250 molar ratio of binding sites to ligand. All experiments were carried out on a Bruker Avance 500 MHz NMR spectrometer equipped with a TCI cryogenic probe. The temperature was set to 282 K. STD NMR experiments [31] were recorded with a 3-9-19 watergate sequence and an inter-scan delay of 25 s [60]. On- and off- resonance frequencies were set at -4 and 300 ppm, respectively [32]. A train of Gaussian pulses with a pulse length of 49 ms, an inter-pulse delay of 1 ms, and an attenuation level of 50 dB was applied for selective saturation of the protein. Spectra of Gal α 3Gal α OMe were recorded with increasing saturation times from 0.35 to 4 s, and a total of 64 to 1k scans. The resulting STD build-up curves were subjected to non-linear fitting to a mono exponential equation: $STD = STD_{max}(1 - e^{(-k_{sat} t)})$ with STD being the STD signal intensity at saturation time t , STD_{max} being the maximal STD intensity at infinite saturation times, and k_{sat} being the observed saturation rate constant [61]. The curve fitting was done with Origin (Microcal) and yielded the relative binding epitope [62]. STD spectra of the B antigen were recorded at only one saturation time of 2 s with 816 scans.

Cell culture and transfection

The complete coding sequence of the *Ggtal* gene encoding the rat α 1,3galactosyltransferase was cloned as previously described [21] and inserted into the PCR3.1 eukaryotic expression vector (Invitrogen, Paisley, UK). Human Embryonic Kidney (HEK) 293 cells, maintained in D-MEM/F-12 supplemented with 10% (v/v) fetal calf serum (FCS) 2 mM L-glutamine, free nucleotides (10 μ g/ml), 100 U/ml penicillin and 100 μ g/ml streptomycin (Gibco, Paisley, UK) were transfected with the rat *Ggtal* using lipofectAMINTM (Invitrogen) according to the manufacturer's

instructions. Stable transfectants were obtained by selection with 0.5 mg/ml G418 (Gibco). Cells were then cultured in the presence of 0.1 mg/ml G418, passaged at confluence after dispersal with 0.025% trypsin in 0.02% EDTA and routinely checked for mycoplasma contamination by Hoechst 33258 (Sigma) labeling.

Porcine aortic endothelial cells (PAEC) from a wild type pig, and from a *Ggtal* knockout pig, were obtained from Dr. B. Charreau (INSERM U643, ITERT, Nantes, France). The cells were cultured in RPMI supplemented with 10% (v/v) FCS, 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin and 100 μ g/ml streptomycin (Gibco) at 37°C in a 5% CO₂ humid atmosphere. They were passaged at near confluence as described above.

Flow cytometry analysis

Cells at near confluence were detached by a brief 0.025% trypsin/0.02% EDTA treatment. Viable cells, 2×10^5 per well of 96 culture microtiter plates were incubated with either FITC-labelled GS1-B4 lectin at 10 μ g/ml in PBS 0.1% gelatin or with rNB2 VLPs at 4.6 μ g/ml in PBS 1% BSA for 45 min at 4°C. In the former case fluorescence analysis was performed immediately following 3 washes. In the latter case, after 3 washes, incubation was performed with the rabbit anti-NB2 serum at a 1/1000 dilution for 30 min. Following 3 washings, a 30 min incubation was then performed with FITC-labeled anti-rabbit IgG (Sigma) diluted 1/500. Finally after 3 more washings, fluorescence analysis was performed on a FACSCalibur (Becton Dickinson, Heidelberg, Germany) using the CELLQUEST program.

Acknowledgments

We thank Drs. J. Bara and A. Martin for their generous gifts of antibodies. We are also very grateful to Dr. B. Charreau for the gift of PAEC from wild type and KO pigs as well as to Drs. J.C. Bridger and S.L. Oliver (Royal Veterinary College, London, UK) for the gift of pfastbac NB2, and to X. Jiang and E. Kohli for their gifts of recombinant baculoviruses. We thank Pr. M.M. Palcic (Carlsberg Research Laboratory, Copenhagen) for a sample of the B-trisaccharide.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: NRC TP JLP. Performed the experiments: MZ NRC BL. Analyzed the data: MZ NRC BL TP JLP. Contributed reagents/materials/analysis tools: AC DP NB. Wrote the paper: TP JLP.

References

- Farkas T, Sestak K, Wei C, Jiang X (2008) Characterization of a rhesus monkey calicivirus representing a new genus of Caliciviridae. *J Virol* 82: 5408–5416.
- Green KY (2007) Caliciviridae: The Noroviruses. In: Knipe DM, Howley PM, eds. *Fields Virology*, 5th edition: Lippincott Williams and Wilkins.
- Zheng DP, Ando T, Fankhauser RL, Beard RS, Glass RI, et al. (2006) Norovirus classification and proposed strain nomenclature. *Virology* 346: 312–323.
- Phan TG, Kaneshi K, Ueda Y, Nakaya S, Nishimura S, et al. (2007) Genetic heterogeneity, evolution, and recombination in noroviruses. *J Med Virol* 79: 1388–1400.
- Wang QH, Costantini V, Saif IJ (2007) Porcine enteric caliciviruses: Genetic and antigenic relatedness to human caliciviruses, diagnosis and epidemiology. *Vaccine* 25: 5453–5466.
- Woode GN, Bridger JC (1978) Isolation of small viruses resembling astroviruses and caliciviruses from acute enteritis of calves. *J Med Microbiol* 11: 441–452.
- Liu BL, Lambden PR, Gunther H, Otto P, Elschner M, et al. (1999) Molecular characterization of a bovine enteric calicivirus: relationship to the Norwalk-like viruses. *J Virol* 73: 819–825.
- Oliver SL, Asobayire E, Dastjerdi AM, Bridger JC (2003) Molecular characterization of bovine enteric caliciviruses: a distinct third genogroup of noroviruses (Norwalk-like viruses) unlikely to be of risk to humans. *J Virol* 77: 2789–2798.
- Ando T, Noel J, Frankhauser RL (2000) Genetic classification of "Norwalk-like viruses". *J Infect Dis* 181: S336–348.
- van der Poel WHM, van der Heide R, Verschoor F, Gelderblom H, Vinjé J, et al. (2003) Epidemiology of Norwalk-like virus infections in cattle in The Netherlands. *Vet Microbiol* 92: 297–309.
- Bridger JC, Hall GA, Brown JF (1984) Characterization of a calici-like virus (Newbury agent) found in association with astrovirus in bovine diarrhea. *Infect Immun* 43: 133–138.
- Smiley JR, Chang KO, Hayes J, Vinjé J, Saif IJ (2002) Characterization of an enteropathogenic bovine calicivirus representing a potentially new calicivirus genus. *J Virol* 76: 10089–10098.
- Oliver SL, Asobayire E, Dastjerdi AM, Bridger JC (2006) Genomic characterization of the unclassified bovine enteric virus Newbury agent-1 (Newbury1) endorses a new genus in the family Caliciviridae. *Virology* 350: 240–250.
- Tan M, Jiang X (2005) Norovirus and its histo-blood group antigen receptors: an answer to a historical puzzle. *Trends Microbiol* 13: 285–293.
- Le Pendu J, Ruvöen-Clouet N, Kindberg E, Svensson L (2006) Mendelian resistance to human norovirus infections. *Seminars in Immunology* 18: 375–386.
- Marionneau S, Cailleau-Thomas A, Rocher J, Le Moullac-Vaidye B, Ruvöen-clouet N, et al. (2001) ABH and Lewis histo-blood group antigens, a model for the meaning of oligosaccharide diversity in the face of a changing world. *Biochimie* 83: 565–573.
- Macher BA, Galili U (2008) The Gal α 1,3Gal β 1,4GlcNAc-R (α -Gal) epitope: A carbohydrate of unique evolution and clinical relevance. *Biochem Biophys Acta* 1780: 75–88.

18. Li YTS, Thapa P, Bendelac A, Lavery SB, Zhou D (2008) Sensitive detection of isoglobulin and globulin series tetraglycosylceramides in human thymus by ion trap mass spectrometry. *Glycobiology* 18: 158–165.
19. Christiansen D, Milland J, Mouhtouris E, Vaughan H, Pellicci DG, et al. (2008) Humans lack iGb3 due to the absence of functional iGb3-synthase: implications for NKT cell development and transplantation. *PLoS Biol* 6: e172. doi:10.1371/journal.pbio.0060172.
20. Haslam DB, Baenziger JU (1996) Expression cloning of Forssman glycolipid synthetase: a novel member of the histo-blood group ABO gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 10697–10702.
21. Turcot-Dubois AL, Le Moullac-Vaidye B, Despiau S, Roubinet F, Bovin N, et al. (2006) Long-term evolution of the CAZY glycosyltransferase 6 (ABO) gene family from fishes to mammals—a birth-and-death evolution model. *Glycobiology* 17: 516–528.
22. Mattison K, Shukla A, Cook A, Pollari F, Friendship R, et al. (2007) Human noroviruses in swine and cattle. *Emerg Infect Dis* 13: 1184–1188.
23. Widdowson M, Rockx B, Schepp R, van der Poel WHM, Vinje J, et al. (2005) Detection of serum antibodies to bovine norovirus in veterinarians and the general population in the Netherlands. *J Med Virol* 76: 119–128.
24. Woolhouse MEJ (2002) Population biology of emerging and re-emerging pathogens. *Trends Microbiol* 10: S3–S7.
25. Bishop JR, Gagneux P (2007) Evolution of carbohydrate antigens—microbial forces shaping host glycomes? *Glycobiology* 17: 23R–34R.
26. Oriol R, Mollicone R, Couillin P, Dalix AM, Candelier JJ (1992) Genetic regulation of the expression of ABH and Lewis antigens in tissues. *APMIS* 100, Supp 27: 28–38.
27. Ruvoën-clouet N, Ganière JP, André-Fontaine G, Blanchard D, Le Pendu J (2000) Binding of Rabbit Hemorrhagic Disease Virus to antigens of the ABH histo-blood group family. *J Virol* 74: 11950–11954.
28. Marionneau S, Ruvoën-Clouet N, Le Moullac-Vaidye B, Clement M, Cailleau-Thomas A, et al. (2002) Norwalk virus binds to histo-blood group antigens on gastro-duodenal epithelial cells of secretor individuals. *Gastroenterology* 122: 1967–1977.
29. Olofsson S, Bergström T (2005) Glycoconjugate glycans as viral receptors. *Annals of Medicine* 37: 154–172.
30. Hutson AM, Atmar RL, Marcus DM, Estes MK (2003) Norwalk virus-like particles hemagglutination by binding to H histo-blood group antigens. *J Virol* 77: 405–415.
31. Mayer M, Meyer B (1999) Characterization of ligand binding by Saturation Transfer Difference NMR Spectroscopy. *Angew Chem Int Ed Engl* 38: 1784–1788.
32. Rademacher C, Krishna NR, Palcic MM, Parra F, Peters T (2008) NMR experiments reveal the molecular basis of receptor recognition by a calicivirus. *J Am Chem Soc* 130: 3669–3675.
33. Woolhouse MEJ, Haydon DT, Antia R (2005) Emerging pathogens: the epidemiology and evolution of species jump. *Trends ecol evol* 20: 238–244.
34. Savage AV, D'Arcy SM, Donoghue CM (1991) Structural characterization of neutral oligosaccharides with blood group A and H activity isolated from bovine submaxillary mucin. *Biochem J* 279: 95–103.
35. Chai W, Hounsell EF, Cashmore GC, Rosankiewicz JR, Feeney J, et al. (1992) Characterization by mass spectrometry and ¹H-NMR of novel hexasaccharides among the acidic O-linked carbohydrate chains of bovine submaxillary mucins. *Eur J Biochem* 207: 973–980.
36. Shirato H, Ogawa S, Ito H, Sato T, Kameyama A, et al. (2008) Noroviruses distinguish between type 1 and type 2 histo-blood group antigens for binding. *J Virol* 82: 10756–10767.
37. Marionneau S, Airaud F, Bovin NV, Le Pendu J, Ruvoën-Clouet N (2005) Influence of the combined ABO, FUT2 and FUT3 polymorphism on susceptibility to Norwalk virus attachment. *J Infect Dis* 192: 1071–1077.
38. Guillon P, Ruvoën-Clouet N, Le Moullac-Vaidye B, Marchandeau S, Le Pendu J (2009) Association between expression of the H histo-blood group antigen, α 1,2 fucosyltransferases polymorphism of wild rabbits, and sensitivity to rabbit hemorrhagic disease virus. *Glycobiology* 19: 21–28.
39. Batten CA, Clarke IN, Kempster SL, Oliver SL, Bridger JC, et al. (2006) Characterization of a cross-reactive linear epitope in human genogroup I and bovine genogroup III norovirus capsid proteins. *Virology* 356: 179–187.
40. Oliver SL, Batten CA, Deng M, Elschner M, Otto P, et al. (2006) Genotype 1 and genotype 2 bovine noroviruses are antigenically distinct but share a cross-reactive epitope with human noroviruses. *J Clin Microbiol* 44: 992–998.
41. Lindesmith L, Moe CL, Marionneau S, Ruvoën-clouet N, Jiang X, et al. (2003) Human susceptibility and resistance to Norwalk virus infection. *Nat Med* 9: 548–553.
42. Hutson AM, Airaud F, Le Pendu J, Estes MK, Atmar RL (2005) Norwalk virus infection associates with secretor status genotyped from sera. *J Med Virol* 77: 116–120.
43. Kindberg E, Akerlind B, Johnsen C, Knudsen JD, Heltberg O, et al. (2007) Host genetic resistance to symptomatic norovirus (GGII.4) infections in Denmark. *J Clin Microbiol* 45: 2720–2722.
44. Larsson MM, Rydell GE, Grahm A, Rodriguez-Diaz J, Akerlind B, et al. Antibody prevalence and titer to norovirus (genogroup II) correlate with secretor (FUT2) but not with ABO phenotype or Lewis (FUT3) genotype. *J Infect Dis* 194: 1422–1427.
45. Oliver SL, Brown DWG, Green J, Bridger JC (2004) A chimeric bovine enteric calicivirus: evidence for genomic recombination in genogroup III of the Norovirus genus of the Caliciviridae. *Virology* 326: 231–239.
46. Bull RA, Tanaka MM, White PA (2007) Norovirus recombination. *The Journal of General Virology* 88: 3347–3359.
47. Phan TG, Nishimura S, Sugita K, Nishimura T, Okitsu S, et al. (2007) Multiple recombinant noroviruses in Japan. *Clin Lab* 53: 567–570.
48. Waters A, Coughlan S, Hall WW (2007) Characterisation of a novel recombination event in the norovirus polymerase gene. *Virology* 363: 11–14.
49. Nayak MK, Balasubramanian G, Sahoo GC, Bhattacharya R, Vinje J, et al. (2008) Detection of a novel intergenogroup recombinant Norovirus from Kolkata, India. *Virology* 377: 117–123.
50. Choi J-M, Hutson AM, Estes MK, Prasad BV (2008) Atomic resolution structural characterisation of recognition of histo-blood group antigens by Norwalk virus. *Proc Natl Acad Sci* 105: 9175–9180.
51. Cao S, Lou Z, Tan M, Chen Y, Liu Y, et al. (2007) Structural basis for the recognition of blood group trisaccharides by norovirus. *J Virol* 81: 5949–5957.
52. Rother RP, Fodor WL, Springhorn JP, Birks CW, Setter E, et al. (1995) A novel mechanism of retrovirus inactivation in human serum mediated by anti-alpha-galactosyl natural antibody. *J Exp Med* 182: 1345–1355.
53. Takeuchi Y, Porter CD, Strahan KM, Preece AF, Gustafsson K, et al. (1996) Sensitization of cells and retroviruses to human serum by (α 1-3)galactosyltransferase. *Nature* 379: 85–88.
54. Shilova NV, Galanina OE, Pochechueva TV, Chinarev AA, Kadykov VA, et al. (2005) High molecular weight neoglycoconjugates for solid phase assays. *Glycoconj J* 22: 43–51.
55. Bovin NV, Yu-Korchagina E, Zemlyanukhina TV, Byramova NE, Galanina OE, et al. (1993) Synthesis of polymeric neoglycoconjugates based on N-substituted polyacrylamide. *Glycoconj J* 10: 142–151.
56. Seto NO, Compston CA, Szpacenko A, Palcic MM (2000) Enzymatic synthesis of blood group A and B trisaccharide analogues. *Carbohydr Res* 324: 161–169.
57. Jiang X, Wang M, Graham DY, Estes MK (1992) Expression, self-assembly, and antigenicity of the Norwalk virus capsid protein. *J Virol* 66: 6527–6532.
58. Nicollier-Jamot B, Ogier A, Piroth L, Pothier P, Kohli E (2002) Recombinant virus-like particles of a norovirus (genogroup II strain) administered intranasally and orally with mucosal adjuvants LT and LT(R192G) in BALB/c mice induce specific humoral and cellular Th1/Th2-like immune responses. *Vaccine* 22: 1079–1086.
59. Libersou S, Siebert X, Ouldali M, Estrozi LF, Navaza J, et al. (2008) Geometric mismatches within the concentric layers of rotavirus particles: a potential regulatory switch of viral particle transcription activity. *J Virol* 82: 2844–2852.
60. Rademacher C, Peters T (2008) Molecular recognition of ligands by native viruses and Virus-like Particles as studied by NMR experiments. *Top Curr Chem* 273: 183–202.
61. Mayer M, James TL (2004) NMR-based characterization of phenothiazines as a RNA binding scaffold. *J Am Chem Soc* 126: 4453–4460.
62. Mayer M, Meyer B (2001) Group epitope mapping by saturation transfer difference NMR to identify segments of a ligand in direct contact with a protein receptor. *J Am Chem Soc* 123: 6108–6117.

IV.2 Caractérisation du ligand de la souche bovine GIII.2 BEC CH131

Article 2: Can oysters' consumption favor bovine norovirus cross species transmission?

De nombreuses épidémies de gastroentérites à NoVs ont été reliées à la consommation de coquillages filtreurs comme les huîtres. Ces coquillages ne permettent pas la réplication des virus entériques humains mais jouent un rôle de «concentrateur» [383]. Généralement ces coquillages sont contaminés par les eaux usées et peuvent contenir des mélanges de souches des génogroupes GI et GII reflétant généralement la circulation des souches circulantes dans la population humaine. De plus, il a également été démontré que des souches humaines GI et GII se fixent sur le tube digestif de l'huître par l'intermédiaire d'HBGAs [22][378], mais aucune étude n'a été réalisée avec des souches d'origine animale. En effet, nous avons émis l'hypothèse que l'huître est un coquillage qui pourrait concentrer et sélectionner par reconnaissance glycanique des souches de NoVs d'origines différentes capables de reconnaître des récepteurs phylogénétiquement conservés entre les bovins, les porcins et l'Homme et favoriser les transmissions inter-espèces.

Dans cet article sont présentés dans un premier temps les résultats de la recherche de souches d'origine animale dans les différentes espèces considérées (bovins, porcins, huîtres) et dans l'environnement (eau), de leur «circulation potentielle» dans une région, la Bretagne où cohabitent ostréiculture, élevage porcin et élevage bovin, puis dans un second temps une étude sur la fixation des NoVs GIII.2 sur les tissus de l'huître.

Nous avons mis en évidence (équipe de Soizick Le Guyader principalement), par RT-PCR pour la première fois en France, la présence de souches GIII dans des fèces de bovins présentant des diarrhées (25 positifs / 136 échantillons), dans des huîtres (1 positif / 27 échantillons) et dans des échantillons d'eau (6 positifs / 52 échantillons) de rivières ou d'estuaires situés dans des zones où coexistent des élevages bovins et des parcs ostréicoles. Ces résultats illustrent que dans les zones où les bovins sont élevés en «système ouvert» comme en Bretagne, les eaux de rejets des exploitations et prairies situées sur les bassins versants peuvent probablement contaminer les eaux de rivières et d'estuaire dans lesquelles ces virus peuvent persister. Par compte, les huîtres prélevées dans ces eaux semblent peu contaminées par ces souches.

Ayant identifié précisément le ligand de la souche Bo/newbury2/1976/UK du génogroupe

GIII.2, nous avons recherché si ce ligand était présent sur les tissus d'huître et si par son intermédiaire, ce coquillage pouvait concentrer différentes souches de norovirus d'origine bovine, comme la souche Bo/newbury2/1976/UK et la souche BEC/28IT caractérisée dans le Nord de l'Italie. Dans un premier temps nous avons démontré que la souche Italienne présente le même profil de fixation sur les tissus bovins, porcins, et humains et reconnaît l'épitope α Gal des sucres synthétiques et des cellules humaines transfectées *GGTA1*. Cette souche peut être classée comme GIII.2 mais elle pourrait être GIII.3 car elle se distingue nettement de la souche prototype des GIII.2. Puis, nous avons regardé si le ligand α Gal et l'antigène B structurellement voisin sont présents sur les différents tissus de l'huître. Aucun marquage sur les tissus digestifs de l'huître n'a pu être mis en évidence avec la lectine GS1-B4 et un anticorps monoclonal anti-B alors qu'un très faible marquage a été observé avec les deux souches GIII.2 testées. L'absence de l'épitope α Gal sur les tissus digestifs de l'huître n'est pas en faveur de notre hypothèse selon laquelle l'huître pourrait concentrer de façon spécifique des virus d'origine animale et favoriser le passage de la barrière d'espèce. Afin de compléter notre étude il sera nécessaire d'étudier avec précision le site de fixation des souches GIII.2 et vérifier si comme les souches humaines des génogroupes I et II, le domaine P2 est impliqué. En effet, ce point est important pour estimer les modifications structurales nécessaires aux souches GIII.2 pour reconnaître les HBGAs de l'Homme (ex : Antigène B) et évaluer le risque de transmission inter-espèce.

Can Oysters Consumption Favor Bovine Norovirus Cross-species Transmission?

Maha Zakhour¹, Haifa Maalouf², Ilaria Di Bartolo³, Larissa Haugarreau², Nathalie Ruvoën-Clouet^{1,4}, Franco Maria Ruggeri³, Françoise S. Le Guyader² and Jacques Le Pendu¹.

¹INSERM, U892, Nantes, France; Université de Nantes, Nantes, France.

²IFREMER, Nantes, France.

³Istituto Superiore di Sanità, Rome, Italy.

⁴Ecole Nationale Vétérinaire, Nantes, France.

Corresponding author: Jacques Le Pendu

Institut de Recherche Thérapeutique de l'Université de Nantes

Inserm, U892

8 quai Moncousu

BP 70721

44007 Nantes Cedex 1

Tel. 33 2 28 08 03 17 ; Fax. 33 2 28 08 03 09

e-mail: jlependu@nantes.inserm.fr

Running title

Oysters in Bovine NoV Transmission to Humans ?

Summary

Noroviruses are major agents of acute gastroenteritis in humans and the primary pathogens of shellfish-related outbreaks. Previous studies showed that some human strains bind to oyster tissues through carbohydrate ligands similar to their human receptors. It suggested that based on presentation of shared norovirus carbohydrate ligands, oysters could selectively concentrate animal strains with increased ability to overcome species barriers. Looking for GIII strains, we observed that although frequently detected in bovine feces and waters of two estuaries of Brittany, they were seldom detected in oysters grown in these estuaries. Characterization of the carbohydrate ligand from a new GIII strain indicated that, similar to the GIII.2 Newbury 2 strain, it recognized the alphaGal epitope not expressed by humans. This ligand was not detectable on oysters tissues, suggesting that oysters may not be able to accumulate substantial amounts of GIII strains due to the lack of shared carbohydrate ligand.

1 **INTRODUCTION**

2 Environmental sources of animal pathogens, and most specifically of RNA viruses, may
3 constitute substantial risk factors for cross-species transmission to humans (Heeney, 2006). In
4 this context, noroviruses infecting cattle could be of importance owing to the high densities of
5 cows bred in areas of human activities. Noroviruses (NoVs) are small non enveloped viruses
6 approximately 30 nm in diameter with a positive-sense-single-stranded RNA genome. They
7 belong to the *Caliciviridae* family and in humans, they are the most frequent cause of diarrhea
8 outbreaks in all age groups (Green, 2007; Patel *et al.*, 2008). They have been recently classified
9 into seven genogroups. Human strains belong to genogroups I to IV and recently, a classification
10 including two new genogroups (VI and VII) has been proposed (Phan *et al.*, 2007). Based on
11 analysis of the ORF2 sequence encoding the capsid protein, high diversity has been observed so
12 that genogroups have been subdivided into clusters, up to nineteen for GII strains. Porcine NoVs
13 have been classified into three clusters of GII (GII-11, GII-18, GII-19), whilst all bovine strains
14 of NoV described so far belong to GIII (Zheng *et al.*, 2006; Phan *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2007).
15 The first bovine strain Bo/Newbury2/1976/UK was isolated from calves with diarrhea in the UK
16 (Woode and Bridger, 1978). Later, another distinct genotype of bovine NoV, Bo/Jena/1978/GER
17 was identified in Germany (Liu *et al.*, 1999). These two strains represent the prototypes of the
18 GIII-2 and GIII-1 genotypes respectively.

19 Human NoV strains attach to various carbohydrates of the ABH and Lewis histo-blood
20 group family and evidence accumulated from volunteer studies and outbreaks indicate that
21 binding to these carbohydrates is required for infection (Le Pendu *et al.*, 2006; Tan and Jiang,
22 2007). In addition, it was recently shown that the prototype bovine GIII.2 strain binds to a related
23 carbohydrate structure which is absent from human tissues (Zakhour *et al.*, 2009). NoVs are
24 commonly associated with foodborne and waterborne outbreaks and are the primary pathogens

1 associated with shellfishborne outbreaks (Butt *et al.*, 2004; Koopmans, 2008). Human strains
2 have been shown to accumulate in oysters where they can persist for up to several weeks and it
3 has been observed that some strains of either the GI or GII genogroups specifically attach to
4 oysters tissues through recognition of histo-blood group antigens (HBGAs) (Le Guyader *et al.*,
5 2006; Tian *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2008). This observation suggests that oysters may not
6 merely act as passive filters randomly accumulating virus particles, but instead, may act as
7 selective filters specifically concentrating strains that can recognize carbohydrate epitopes shared
8 with humans.

9 To evaluate the potential risk of emergence of bovine NoVs into the human population,
10 we looked for the presence GIII strains in bovine feces, river or estuarine waters and shellfish
11 from an area of both high cattle and high oysters breeding. We additionally examined the
12 possibility of GIII strains specific binding to carbohydrate ligands of oysters tissues that may be
13 shared with cows and humans.

1 **RESULTS**

2 **Detection of GIII NoVs in feces and environmental samples.** BoNoV was detected in

3 25 samples out of the 136 stool samples analyzed. A total of 52 water samples were collected (27
4 from site A and 25 from site B) on June, September, November 2008, January and March 2009
5 (about five samples per month). BoNoV were detected in six samples. On one site, one sample
6 was detected positive in January and one in April. On the second site, three water samples were
7 detected positive on March and one in April. Of the 27 oyster samples collected, only one was
8 found contaminated with BoNoV on site A in November 2008.

9 **Characterization of the BEC28 VLPs ligand.** We previously used

10 immunohistochemistry to show the binding of VLPs from several calicivirus strains, including
11 the bovine GIII.2 Bo/Newbury2/76/UK norovirus strain (NB2), to carbohydrates expressed on
12 epithelial digestive cells (Ruvoën-clouet *et al.*, 2000; Marionneau *et al.*, 2002; Le Guyader *et al.*,
13 2006; Zakhour *et al.*, 2009). To determine if the ligand specificity of NB2 is conserved among
14 GIII.2 strains, we sought to characterize a potential carbohydrate ligand of the newly described
15 strain BEC28. This strain is clearly distinct from NB2, yet it can be classified as GIII.2 (see
16 Figure 1 of Supporting Information). To this aim, BEC28 VLPs were incubated on tissue sections
17 from the gastroduodenal junction of bovine, porcine and humans. As for the NB2 capsid, distinct
18 results were obtained for each species. In bovine tissues, we observed a staining on both
19 endothelial and epithelial cells from the gut. In porcine tissues, the BEC28 capsids attached
20 exclusively to non epithelial cells of the digestive tract, mainly vascular endothelial cells,
21 whereas staining was completely absent on human tissue sections (Fig.1 A-D). To determine if
22 the binding involved carbohydrates, bovine tissue sections were pretreated with sodium periodate
23 prior to incubation with the VLPs. At a 10 mmol/L concentration, but not at 1 mmol/L, the

staining was completely lost, suggesting that BEC28 VLPs recognize a neutral glycan structure expressed both on bovine digestive surface epithelial cells and vascular endothelial cells (Fig.1 E and F). Since these results were reminiscent of what we previously observed with VLPs from the bovine NB2 strain which bind to the α Gal epitope (see below), the effect of α -galactosidase treatment was tested. We observed that following treatment, the staining completely disappeared, indicating recognition of glycans with a terminal galactose residue in alpha linkage.

To define more precisely their carbohydrate specificity, binding of BEC28 VLPs was tested on a set of HBGA-related oligosaccharides by ELISA. A signal 4 to 5 times above background, was observed on a single structure terminated by a galactose in α 1,3 linkage, the Gal α 3Gal β 4GlcNAc trisaccharide called the α Gal or galili epitope (Fig. 2). Since HBGAs are also present in saliva, we next assayed the binding of BEC28 VLPs to bovine and human saliva samples. On bovine saliva samples, binding was readily detected, albeit with very heterogeneous OD values, some samples giving a strong signal and others a signal at background level only, whereas no binding at all could be detected on human saliva samples, similar to what was previously observed with NB2 VLPs and human anti-alphaGal natural antibodies (Zakhour *et al.*, 2009). We next transfected human HEK 293 cells with the rat *Ggta1* cDNA to allow expression of the α Gal antigen as detected by flow cytometry with the GS1-B4 lectin. Control HEK cells that lacked the α Gal antigen were not recognized by BEC28 VLPs. In contrast, a clear binding was observed on the *Ggta1* transfected human cells (Fig. 3). Collectively these results indicate that BEC28 VLPs have a carbohydrate specificity similar to that of NB2 VLPs, specifically recognizing the α Gal antigen.

GIII.2 ligands from oysters tissues. Searching for the α Gal epitope on oysters tissues, tissue sections allowing analysis of all organs were covered by the GS1-B4 lectin, but no staining

1 was observed, contrasting with the strong staining obtained on bovine gut tissue sections (Fig.4).
2 Since the α Gal epitope is closely related to the B blood group antigen (compare α Gal
3 trisaccharide and B type 2 in Table 1 of Appendix), we looked for the presence of the B antigen
4 in oyster tissues. An anti-B mAb that strongly binds to human tissue sections from B blood group
5 persons did not react with oysters tissues (data not shown). Since oysters may present a GIII
6 ligand distinct from the α Gal epitope that could be recognized by the VLPs, we tested the
7 binding of the NB2 recombinant capsids to oyster soluble tissue extracts. No specific signal could
8 be detected by ELISA on seven soluble extracts of three types of tissues (mantle, gills and gut)
9 each prepared from at least eight oysters, whereas in the same assays, these VLPs attached to the
10 synthetic α Gal epitope and GI.1 VLPs used as positive controls readily attached to oysters gut
11 soluble extracts (data not shown). Likewise, although a clear binding of both NB2 and BEC28
12 VLPs was observed on bovine duodenum tissue sections used as positive controls in parallel
13 assays, only a slight occasional labeling of some digestive tubules surface by either type of VLPs
14 could be detected (Fig.4). In control experiments no staining could be observed in absence of
15 GIII VLPs, whereas strong unambiguous stainings were obtained by using GI.1 VLPs detected
16 with a specific antiserum, consistent with previous reports (data not shown). These results
17 indicate that oysters tissues do not express the α Gal epitope in detectable amounts, but may
18 nevertheless either express small amounts of another ligand yet to be characterized or bind small
19 amounts of GIII VLPs in a non specific manner.

DISCUSSION

Cows are bred at very high densities in some areas such as Brittany on the west coast of France which is also a major area of shellfish production. The ability of shellfish to concentrate pathogens released in sea water raises questions about the transmission of animal NoVs to humans through oyster consumption, but so far very few studies compared water and shellfish contamination. One of the first such studies, conducted thirty years ago, comparing enterovirus by cell culture in water and oysters yielded about the same frequency of positive water (59%) and shellfish samples (35%) (Goyal *et al.*, 1979). Recently, phages of *B. fragilis* and *Salmonella* detected in sewage effluent were also detected in receiving water and oysters (Chung *et al.*, 1998). Human NoVs were detected in 75% of river water samples and in 60% of oyster beds (Ueki *et al.*, 2005). Only one study reported the detection of porcine norovirus in 15% of shellfish collected from the US market without any information from the surrounding water (Costantini *et al.*, 2006).

Tracing viral contamination in the open environment is quite difficult due to several factors such as source identification, dilution, currents and finally sampling strategy (Riou *et al.*, 2007). This study represents a first approach to evaluate the prevalence of bovine NoVs in environmental waters and their effect on shellfish contamination. Two sites from Brittany were selected based on their bovine population at least a hundred fold superior to their human population in terms of sewage input (10^6 inhabitants equivalents for bovine compared with 10^4 and 10^3 inhabitants equivalents for humans, respectively). The shellfish growing areas of these two sites (mainly oysters) are classified as B areas (European Community regulation). The BoNoV prevalence in stool of 18% found here is comparable with those from other studies widely ranging from 2% to 50% (van der Poel *et al.*, 2003; Mattison *et al.*, 2007; Park *et al.*, 2007; Scipioni *et al.*, 2008; Mauroy *et al.*, 2009). Bovine NoVs were detected in 11% of water

1 samples collected at both sites, confirming the impact of the bovine production on water
2 contamination. In Brittany bovines are bred in open fields most of the year and thus feces may
3 directly be dragged along towards small nearby rivers. Considering the substantial percentage of
4 water positive samples and the long persistence of human NoVs in contaminated oysters, we
5 were surprised to find only one shellfish positive sample. Because extraction and inhibitor
6 controls were used, we trust that negative samples were truly negative (Le Guyader *et al.*, 2009).
7 The other factor that may influence results is the primers and probe set used. Here, it was selected
8 from the literature and we demonstrated its efficiency on bovine stools collected in the same area.
9 Specific binding of human NoV strains to oysters tissues was previously shown to occur through
10 interaction with carbohydrate ligands shared with humans (Le Guyader *et al.*, 2006; Tian *et al.*,
11 2007; Wang *et al.*, 2008). Contamination of sea water by animal NoVs could thus lead to a
12 selection of strains recognizing shared carbohydrate motifs, thereby facilitating cross-species
13 transmission to humans.

14 We have shown here, that similar to the GIII.2 prototype NB2 strain (Zakhour *et al.*,
15 2009), BEC28 VLPs recognize the α Gal epitope ($\text{Gal}\alpha 3\text{Gal}\beta 4\text{GlcNAc}\beta\text{-R}$) expressed on bovine
16 surface stomach and duodenal epithelial cells. Its synthesis requires an $\alpha 1,3$ galactosyltransferase
17 which is lacking in all human cells since the *GGTA1* gene encoding this enzyme has been
18 inactivated in apes. This GIII ligand is therefore completely absent from human tissues (Macher
19 and Galili, 2008). In addition, it was not detectable on porcine digestive epithelial cells making it
20 unlikely that either humans or swine could be infected by these NoV strains since binding to
21 HBGAs appears necessary for infection by various human strains (Le Pendu *et al.*, 2006; Tan
22 and Jiang, 2007). Moreover, we observed that the α Gal epitope and the closely related B blood
23 group antigen are not expressed on oysters tissues, suggesting that oysters should not be able to

1 specifically concentrate bovine strains through binding to these carbohydrate structures which
2 share a terminal Gal α 3Gal-R motif. Nevertheless, a weak binding of both NB2 and BEC28 VLPs
3 to unidentified structures of oysters digestive epithelial cells was detectable, consistent with the
4 rare and quantitatively weak detection of GIII sequences in oysters samples compared with the
5 quite frequent water contamination discussed above.

6 Human NoV strains of the GI and GII genogroups use distinct binding sites on the P2
7 domain of the capsid protein to attach to HBGAs (Cao *et al.*, 2007; Choi *et al.*, 2008). The
8 binding site of GIII strains and their mode of recognition of the α Gal epitope is not known as yet,
9 but to more precisely evaluate the risk of cross-species transmission, it will be important in future
10 studies to determine the structural changes necessary for GIII strains to recognize HBGA motifs
11 expressed on the human gut and potentially shared with cows and oysters. Likewise,
12 bioaccumulation experiments will be necessary to precisely determine the ability of oysters to
13 accumulate and maintain GIII NoV strains. Regardless, we have shown here that a new approach
14 to investigate the possible transmission of animal viruses to human through oyster consumption
15 that combines in vitro studies and environmental samples analysis may be of great help for risk
16 evaluation.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Reagents. The lectin from *Griffonia simplicifolia* B4 isolectin 1 (GS1-B4) fluorescein isothiocyanate (FITC) conjugated, which recognizes α 1,3-linked terminal galactosyl residues, was purchased from EY Laboratories (San Mateo, CA USA) and Vector Laboratories (Burlingame, CA USA), respectively. Alpha-galactosidase from green coffee beans was purchased from Sigma (St Louis, MO). The anti-B mAb ED3 was a kind gift from Dr. A. Martin (CRTS, Rennes, France). The anti-GIII rabbit polyclonal antiserum was prepared at the Veterinary School of Nantes by immunizing a rabbit with VLPs from the GIII.2 Bo/Newbury2/76/UK strain (Zakhour *et al.*, 2009). This antiserum reacts nearly equally well with the BEC28 VLPs and the immunizing Newbury2 VLPs. Synthetic oligosaccharides as polyacrylamide conjugates were kindly provided by Dr. N. Bovin (Moscow, Russia). Oligosaccharides coupled to HSA (human serum albumin) were obtained from IsoSep AB (Tulligen, Sweden). The structure of all oligosaccharides used is given on Table 1 of Appendix.

GIII RNA detection and environmental analysis. Bovine stool samples were collected from cattle in Brittany (North west of France). For analysis a 10% suspension was prepared and then nucleic acids (NA) were extracted and purified by using a QIAmp Viral RNA kit (QIAGEN, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions (Ambert-Balay *et al.*, 2008).

Environmental samples were collected from two small estuaries of Brittany, selected for high bovine and shellfish productions. One liter water samples, as well as oysters samples, from each estuary were obtained from five streams or small rivers located on both sites. Water samples were concentrated by using ultrafiltration membrane (Vivaflow 50, Sartorius), to 40 mL and then by polyethylene glycol precipitation (da Silva *et al.*, 2008). For oysters, after dissection of six grams of digestive tissues, addition of Mengovirus as viral extraction control and

homogenisation, viral particles were eluted before concentration by polyethylene glycol precipitation. Then nucleic acids (NA) were extracted by using Nuclisens kit (BioMerieux), and inhibitor elimination was verified (Le Guyader *et al.*, 2009). Bovine NoVs were detected by a one step real time RT-PCR (Ultrasens, Invitrogen) with primers SW GIII forw (5'-cggtccatgttygcbtgg), SW GIII rev (5'-tcagtcattcttcatttacaatac) and the probe SWGIII (5'-tgtgggaaggtagtcgacgacryc) (Wolf *et al.*, 2007).

Preparation of VLPs. Total RNA was extracted with QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen) from 170 µl of intestinal content sample from an Italian calf infected with BEC strain BEC/28IT identified in a survey performed in Northern Italy. The poly(A)-containing RNA was subjected to reverse transcription using the oligo(dT)20 and SuperScript® III First-Strand Synthesis System (Invitrogen), following the manufacturer's instructions. Amplification of the entire capsid region by PCR was performed by a first PCR with primers J11U (5'-CCATCAACCATTGGATTTTGAC (Smiley *et al.*, 2003) and FwVP (5'-ataagaatg cgg ccg cgt aaa tga aga tga ctg ac-3'), followed by a second PCR, semi-nested, with primers FwVP and RORF2 (5'-Cggggt accgaattcagaagccatcaag-3') containing *NotI* and *KpnI*, respectively. The DNA fragment obtained, flanked by restriction enzyme sites *NotI* and *KpnI*, was ligated into the transfer vector, pFastBac™1 (Invitrogen) digested with the same enzymes. The sequence of the vector obtained confirmed the proper frame of the ORF2 and the close relationship, 92% identity, of the Italian strain with a previously described dutch BEC CH131-like strain (van der Poel *et al.*, 2003). The bacmid with the entire BEC ORF2 (called BACBEC28) was transfected into the Sf9 insect cell line and the high titre BACBEC28 virus stock solution obtained was used to purify assembled VLPs, as confirmed by EM visualization. Sf9 cells were infected with high titre BACBEC28 and incubated at 27°C. Seven days postinfection, when a diffuse cytopathic effect

was observable, cells and supernatant were collected. The VLPs were purified from cell culture supernatant and cell lysate by ultracentrifugation through a 30% sucrose cushion, followed by CsCl density gradient (1.3 g/cm^3) at 30.000 rpm for 24 hours at 12°C . Quality of the purified BEC28 VLPs was controlled by Western blotting and electron microscopy.

VLPs from the GIII.2 Bo/Newbury2/76/UK (NB2) strain prepared as previously described (Zakhour *et al.*, 2009) were a kind gift from Dr. D. Poncet (CNRS, Gif/Yvette, France). VLPs from the GI.1 Norwalk strain were prepared as previously described (Marionneau *et al.*, 2002).

Tissue samples and immunohistochemical analysis. Bovine and porcine tissues samples from the gastroduodenal junction were obtained from healthy animals autopsied at the National Veterinary School of Nantes. Animals were handled in strict accordance with good animal practice as defined by the French national guidelines. Human gastroduodenal junction samples had been obtained from organ donors before the law 88-1138 of December 20, 1988 concerning resection of human tissues after death for scientific investigations. Oysters tissues were prepared so as to visualize all organs on a single section. Animal tissues were fixed in formalin and human tissues were fixed in ethanol 95% for 48 hours, and paraffin embedded. The attachment of VLPs to $5 \mu\text{m}$ tissue sections was tested with BEC28 VLPs at $10 \mu\text{g/mL}$ or NB2 VLPs at $1 \mu\text{g/mL}$, followed by sequential incubations with a rabbit anti-GIII.2 antiserum, peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG and the 3-amino-9-ethylcarbazol peroxidase substrate as previously described (Zakhour *et al.*, 2009). Periodate treatment and alpha-galactosidase treatment were performed immediately after the endogenous peroxidase quenching as previously described (Zakhour *et al.*, 2009).

ELISA-based carbohydrate microtiter plate assays. Oyster tissue extracts were prepared according to Tian *et al.* (Tian *et al.*, 2007). For each tissue (digestive tissue, gills,

mantle), extracts were prepared from 7 samples, each constituted by at least 8 oysters, collected throughout the year. Tissue extracts at 40 µg/mL were coated onto NUNC Maxisorp immunoplates in 100 mmol/L carbonate buffer pH=9.6 by overnight incubation at 4°C. After blocking with 10% defatted dried cow's milk in PBS for 1 hour, NB2 VLPs (1 µg/mL) or NV VLPs (1 µg/mL) in PBS 5% milk were added and incubated for 1 h at 37°C. Plates were then incubated with rabbit anti-GIII.2 serum or anti-GI.1 serum at 1/1000 dilution in PBS 5% milk for 1 hour at 37°C. Then, peroxidase anti-rabbit IgG (Uptima, Montluçon, France) at a 1/2000 dilution in PBS 5% milk were added and incubated for 1 hour at 37°C. Between each step, the plates were washed 3 times with PBS 5% Tween 20. The enzyme signals were detected with TMB (3, 3', 5, 5' tetramethylbenzidine) as substrate (BD Bioscience, San Jose, CA) and then read at 450 nm.

Oligosaccharides as PAA and HSA conjugates were coated at 10 µg/mL at 37°C in a wet atmosphere. After blocking with 5% defatted dried cow's milk in PBS for 1 hour, BEC28 VLPs (9,2 µg/mL) in PBS 5% milk were added. After incubation for 2 hours at 4°C, binding of VLPs was detected as above using rabbit anti-GIII.2 serum and then peroxidase anti-rabbit IgG with 1 hour incubations at 4°C.

Cell transfection and flow cytometry analysis. The complete coding sequence of the *Ggtal1* gene encoding the rat α 1,3galactosyltransferase was cloned as previously described (Turcot-Dubois *et al.*, 2006) and inserted into the PCR3.1 eukaryotic expression vector (InVitrogen, Paisley, UK). It was used to transfect Human Embryonic Kidney (HEK) 293 cells with lipofectAMINTM (InVitrogen). Forty eight hours later, cells were labeled with either FITC-labelled GS1-B4 lectin at 10 µg/mL or BEC28 VLPs at 9.2 µg/mL as previously described (Zakhour *et al.*, 2009). In the former case fluorescence analysis was performed immediately

1 following washes. In the latter case, cells were sequentially incubated with the rabbit anti-GIII.2
2 serum at a 1/1000 dilution and with FITC-labeled anti-rabbit IgG (Sigma) for 30 min. After final
3 washing, fluorescence analysis was performed on a FACSCalibur (Becton Dickinson,
4 Heidelberg, Germany) with the CELLQUEST program.

5
6
7 **Acknowledgments**

8 This work was supported in part by a grant 2006 SEST 08 01 « Coquenpath » from the Agence
9 Nationale pour la Recherche (ANR), by a grant (CIMATH) from the Région des Pays de la Loire
10 and by the European Commission, DG Research Quality of 314 Life Program 6th Framework
11 (EVENT, SP22-CT-2004-502571) “EVENT” (FP6-2002-SSP-315 1). The authors are grateful to
12 Jean Claude Le Saux for collection of field samples and to Monique Pommepuy for helpful
13 discussions and management.

1 REFERENCES

- 2 Ambert-Balay, K., Lorrot, M., Bon, F., Giraudon, H., Kaplon, J., Wolfer, M. et al. (2008)
- 3 Prevalence and genetic diversity of Aichi virus strains in stool samples from community and
- 4 hospitalized patients. *J Clin Microbiol* **46**: 1252-1258.
- 5 Butt, A., Aldrige, K.E., and Sanders, C.V. (2004) Infections related to the ingestion of seafood.
- 6 Part I: viral and bacterial infections. *Lancet Infect Dis* **4**: 201-212.
- 7 Cao, S., Lou, Z., Tan, M., Chen, Y., Liu, Y., Zhang, Z. et al. (2007) Structural basis for the
- 8 recognition of blood group trisaccharides by norovirus. *J Virol* **81**: 5949-5957.
- 9 Choi, J.-M., Hutson, A.M., Estes, M.K., and Prasad, B.V. (2008) Atomic resolution structural
- 10 characterisation of recognition of histo-blood group antigens by Norwalk virus. *Proc Natl*
- 11 *Acad Sci* **105**: 9175-9180.
- 12 Chung, H., Jaykus, L.A., Lovelace, G., and Sobsey, M.D. (1998) Bacteriophages and bacteria as
- 13 indicators of enteric viruses in oysters and their harvest waters. *Water Sci Technol* **38**: 37-44.
- 14 Costantini, V., Loisy, F., Joens, L., Le Guyader, F., and Saif, L.J. (2006) Human and animal
- 15 enteric caliciviruses in oysters from different coastal regions of the United States. *Appl*
- 16 *Environ Microbiol* **72**: 1800-1809.
- 17 da Silva, A.K., Le Guyader, F., Le Saux, J.C., Pommepuy, M., Montgommery, M.A., and
- 18 Elimelech, M. (2008) Norovirus removal and particle association in a waste stabilization pond.
- 19 *Environ Sci Technol* **42**: 9151-9157.
- 20 Goyal, S.M., Gerba, C.P., and Melnick, J.L. (1979) Human enteroviruses in oysters an their
- 21 overlaying waters. *Appl Environ Microbiol* **37**: 572-581.
- 22 Green, K.Y. (2007) Caliciviridae: The Noroviruses. In *Fields Virology, 5th edition*. Knipe, D.M.,
- 23 and Howley, P.M. (eds): Lippincott Williams and Wilkins, pp. 949-979.
- 24 Heeney, J.L. (2006) Zoonotic viral diseases and the frontier of early diagnosis, control and
- 25 prevention. *J Intern Med* **260**: 399-408.
- 26 Koopmans, M. (2008) Progress in understanding norovirus epidemiology. *Cur Op Infect Dis* **21**:
- 27 544-552.
- 28 Le Guyader, F., Parnaudeau, S., Schaeffer, J., Bosch, A., Loisy, F., Pommepuy, M., and Atmar,
- 29 R.L. (2009) Detection and quantification of noroviruses in shellfish. *Appl Environ Microbiol*
- 30 **75**: 618-624.
- 31 Le Guyader, F., Loisy, F., Atmar, R.L., Hutson, A.M., Estes, M.K., Ruvöen-Clouet, N. et al.
- 32 (2006) Norwalk-virus specific binding to oyster digestive tissues. *Emerg Infect Dis* **12**: 931-
- 33 936.
- 34 Le Pendu, J., Ruvöen-Clouet, N., Kindberg, E., and Svensson, L. (2006) Mendelian resistance to
- 35 human norovirus infections. *Sem Immunol* **18**: 375-386.
- 36 Liu, B.L., Lambden, P.R., Gunther, H., Otto, P., Elschner, M., and Clarke, I.N. (1999) Molecular
- 37 characterization of a bovine enteric calicivirus: relationship to the Norwalk-like viruses. *J*
- 38 *Virol* **73**: 819-825.
- 39 Macher, B.A., and Galili, U. (2008) The Gal α 1,3Gal β 1,4GlcNAc-R (α -Gal) epitope: A
- 40 carbohydrate of unique evolution and clinical relevance. *Biochem Biophys Acta* **1780**: 75-88.
- 41 Marionneau, S., Ruvöen-Clouet, N., Le Moullac-Vaidye, B., Clement, M., Cailleau-Thomas, A.,
- 42 Riuz-Palacios, G. et al. (2002) Norwalk virus binds to histo-blood group antigens on gastro-
- 43 duodenal epithelial cells of secretor individuals. *Gastroenterology* **122**: 1967-1977.
- 44 Mattison, K., Shukla, A., Cook, A., Pollari, F., Friendship, R., Kelton, D. et al. (2007) Human
- 45 noroviruses in swine and cattle. *Emerg Infect Dis* **13**: 1184-1188.

- 1 Mauroy, A., Scipioni, A., Mathijs, E., Saegerman, C., Mast, J., Briger, J.C. et al. (2009)
2 Epidemiological study of bovine norovirus infection by RT-PCR and a VLP based antibody
3 ELISA. *Vet Microbiol* **12**: 243-251.
- 4 Park, S.I., Jeong, C., Kim, H.H., Park, S.H., Park, S.J., Hyun, B.H. et al. (2007) Molecular
5 epidemiology of bovine noroviruses in South Korea. *Vet Microbiol* **124**: 125-133.
- 6 Patel, M.N., Widdowson, M.A., Glass, R.I., Akazawa, K., Vinje, J., and Parashar, U.D. (2008)
7 Systematic literature review of role of noroviruses in sporadic gastroenteritis. *Emerg Infect*
8 *Dis* **14**: 1224-1231.
- 9 Phan, T.G., Kaneshi, K., Ueda, Y., Nakaya, S., Nishimura, S., Yamamoto, A. et al. (2007)
10 Genetic heterogeneity, evolution, and recombination in noroviruses. *J Med Virol* **79**: 1388-
11 1400.
- 12 Riou, P., Le Saux, J.C., Dumas, F., Caprais, M.P., Le Guyader, F., and Pommepuy, M. (2007)
13 Microbial impact of small tributaries on water and shellfish quality in shallow coastal areas.
14 *Water Res* **41**: 2274-2286.
- 15 Ruvoën-clouet, N., Ganière, J.P., André-Fontaine, G., Blanchard, D., and Le Pendu, J. (2000)
16 Binding of Rabbit Hemorrhagic Disease Virus to antigens of the ABH histo-blood group
17 family. *J Virol* **74**: 11950-11954.
- 18 Scipioni, A., Bourgot, I., Mauroy, A., Ziant, D., Saegerman, C., Daube, G., and Thiry, E. (2008)
19 Detection and quantification of human and bovine noroviruses by a taqMan RT-PCR assay
20 with a control for inhibition. *Mol Cell Probes* **22**: 215-222.
- 21 Smiley, J.R., Hoet, A.E., Traven, M., Tsunemitsu, H., and Saif, L.J. (2003) Reverse transcription-
22 PCR assays for detection of bovine enteric caliciviruses (BEC) and analysis of the genetic
23 relationship among BEC and human caliciviruses. *J Clin Microbiol* **42**: 5214-5224.
- 24 Tan, M., and Jiang, X. (2007) Norovirus-host interaction: implications for disease control and
25 prevention. *Expert Rev Mol Med* **9**: 1-22.
- 26 Tian, P., Engelbrektson, A.L., Jiang, X., Zhong, W., and Mandrell, R.E. (2007) Norovirus
27 recognizes histo-blood group antigens on gastrointestinal cells of clams, mussels and oysters:
28 a possible mechanism of bioaccumulation. *J Food Prot* **70**: 2140-2147.
- 29 Turcot-Dubois, A.L., Le Moullac-Vaidye, B., Despiiau, S., Roubinet, F., Bovin, N., Le Pendu, J.,
30 and Blancher, A. (2006) Long-term evolution of the CAZY glycosyltransferase 6 (ABO) gene
31 family from fishes to mammals--a birth-and-death evolution model. *Glycobiology* **17**: 516-
32 528.
- 33 Ueki, Y., Sano, D., Watanabe, T., Akiyama, K., and Omura, T. (2005) Norovirus pathway in
34 water environment estimated by genetic analysis of strains from patients of gastroenteritis,
35 sewage, treated wastewater, river water and oysters. *Water Res* **39**: 4271-4280.
- 36 van der Poel, W.H.M., van der Heide, R., Verschoor, F., Gelderblom, H., Vinjé, J., and
37 Koopmans, M.P.G. (2003) Epidemiology of Norwalk-like virus infections in cattle in The
38 Netherlands. *Vet Microbiol* **92**: 297-309.
- 39 Wang, D., Wu, Q., Kou, X., Yao, L., and Zhang, J. (2008) Distribution of norovirus in oyster
40 tissues. *J Appl Microbiol* **105**: 1966-1972.
- 41 Wang, Q.H., Costantini, V., and Saif, L.J. (2007) Porcine enteric caliciviruses: Genetic and
42 antigenic relatedness to human caliciviruses, diagnosis and epidemiology. *Vaccine* **25**: 5453-
43 5466.
- 44 Wolf, S., Williamson, W.M., Hewitt, J., Rivera-Aban, M., Lin, S., Ball, A. et al. (2007) Sensitive
45 multiplex real-time reverse transcription-PCR assay for the detection of human and animal
46 noroviruses in clinical and environmental samples. *Appl Environ Microbiol* **73**: 5464-5470.

- 1 Woode, G.N., and Bridger, J.C. (1978) Isolation of small viruses resembling astroviruses and
2 caliciviruses from acute enteritis of calves. *J Med Microbiol* **11**: 441-452.
- 3 Zakhour, M., Ruvoën-Clouet, N., Charpilienne, A., Langpap, B., Poncet, D., Peters, T. et al.
4 (2009) The alphaGal epitope of the histo-blood group antigen family is a ligand for bovine
5 norovirus Newbury2 expected to prevent cross-species prevention. *PLoS Pathogens* **5**:
6 e1000504.
- 7 Zheng, D.P., Ando, T., Fankhauser, R.L., Beard, R.S., Glass, R.I., and Monroe, S.S. (2006)
8 Norovirus classification and proposed strain nomenclature. *Virology* **346**: 312-323.

For Peer Review Only

FIGURE LEGENDS

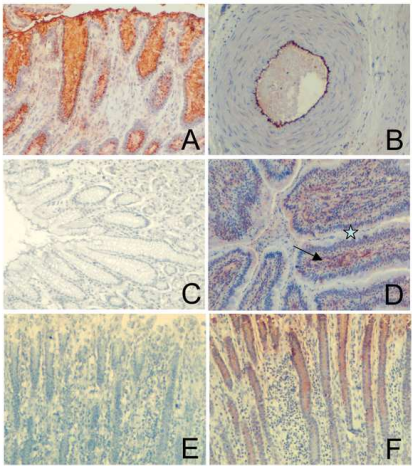
Figure 1: Analysis of BEC28 binding to tissues. VLPs were incubated on tissue sections and detected as described in the material and method sections. Binding to bovine pyloric surface mucosa (A) and to the vascular endothelium of a bovine artery (B). Lack of binding to human pyloric surface mucosa (C). Binding to porcine duodenal surface mucosa with lack of staining of epithelial cells is shown by a star and staining of vascular endothelial cells of the lamina propria is shown by an arrow (D). Effect of α -galactosidase treatment prior to VLPs incubation on a bovine duodenum section (E) and serial control section incubated in the same condition in absence of enzyme (F).

Figure 2: Binding of BEC28 VLPs to immobilized synthetic oligosaccharides. A panel of neoglycoconjugates was coated on ELISA plates and the binding of BEC28 VLPs was detected as described in the materials and methods section. Results for a selected set of neoglycoconjugates with a terminal galactose in alpha linkage are shown as signal to noise ratios from one experiment representative of three independent ones. None of the other neoglycoconjugate tested showed a signal to noise ratio above 1 (see the list and structures in Table 1 of Appendix).

Figure 3: Flow cytometric analysis of the binding of BEC28 VLPs and the GS1-B4 isolectin to rat Ggta1 transfected or control mock transfected human HEK 293 cells. The respective negative controls correspond to either cells incubated in the absence of the lectin or to cells incubated in the presence of the VLPs followed by incubation with an irrelevant rabbit antiserum and FITC-labeled anti-rabbit IgG. The log of fluorescence intensities in arbitrary units is plotted against the cell number.

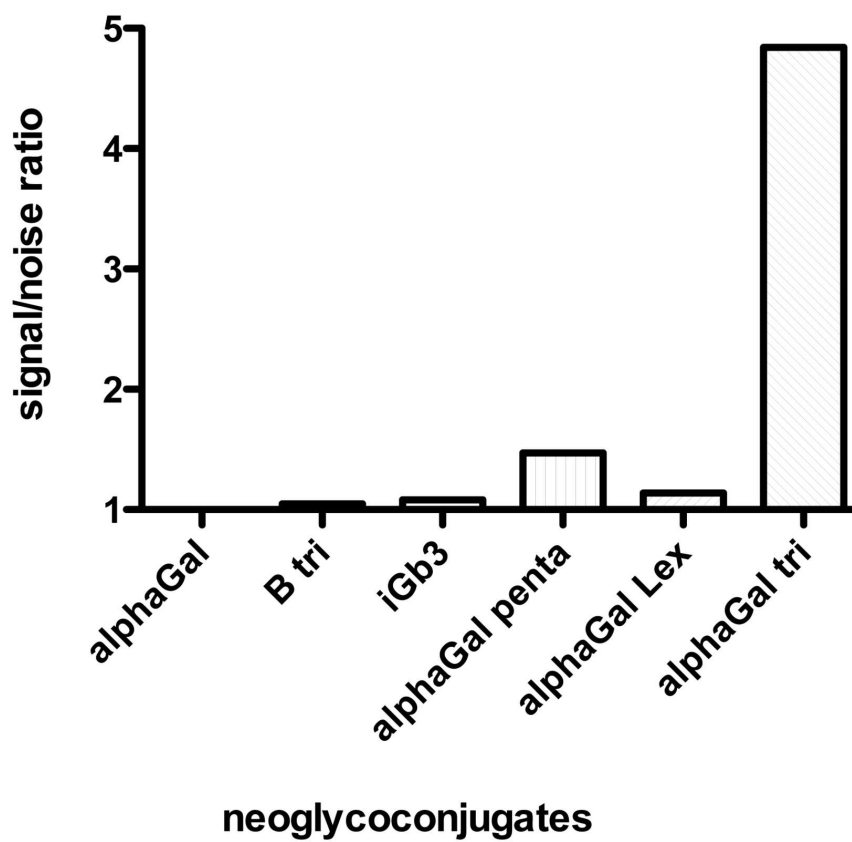
1
2 **Figure 4:** Expression of GIII ligands in oysters digestive tract. Staining of bovine pyloric mucosa
3 by the GS1-B4 isolectin (A), BEC28 VLPS (C), NB2 VLPs (E) and comparison with oyster
4 digestive tract. Absence of staining of staining of oysters tissue by GS1-B4 (B), and slight
5 staining of the lumen of oyster digestive tubules by BEC28 VLPs (D) and NB2 VLPs (F) shown
6 by arrows.
7

For Peer Review Only

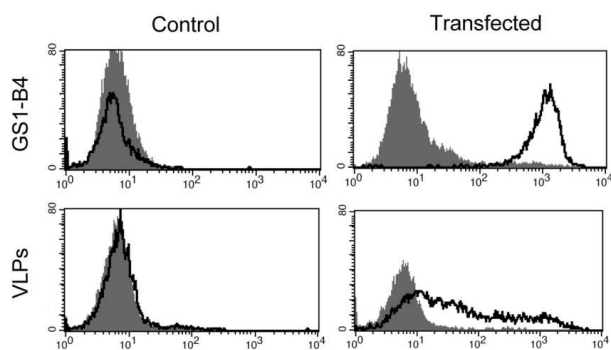


Analysis of BEC28 binding to tissues
59x41mm (600 x 600 DPI)

view Only

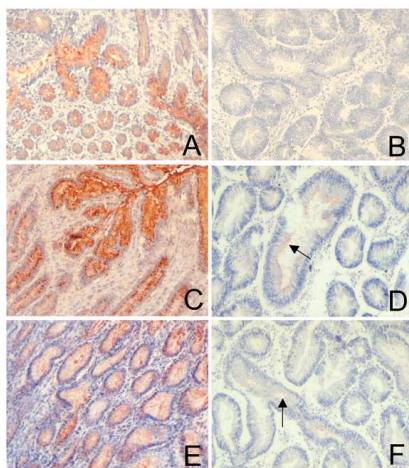


Binding of BEC28 VLPs to immobilized synthetic oligosaccharides
80x77mm (600 x 600 DPI)



Flow cytometric analysis of the binding of BEC28 VLPs and the GSI-B4 isolectin to rat Ggta1 transfected or mock transfected human HEK cells
59x41mm (600 x 600 DPI)

new Only



Expression of GIII ligands in oysters digestive tract
59x41mm (600 x 600 DPI)

Figure 1: Dendrogram, drawn using Bionumerics software packages (Applied Maths, Belgium) method UPGMA, was based on the entire ORF2. GenBank accession no., origin, and genotype are reported for all strains. Strains involved in this study are indicated in boldface type.

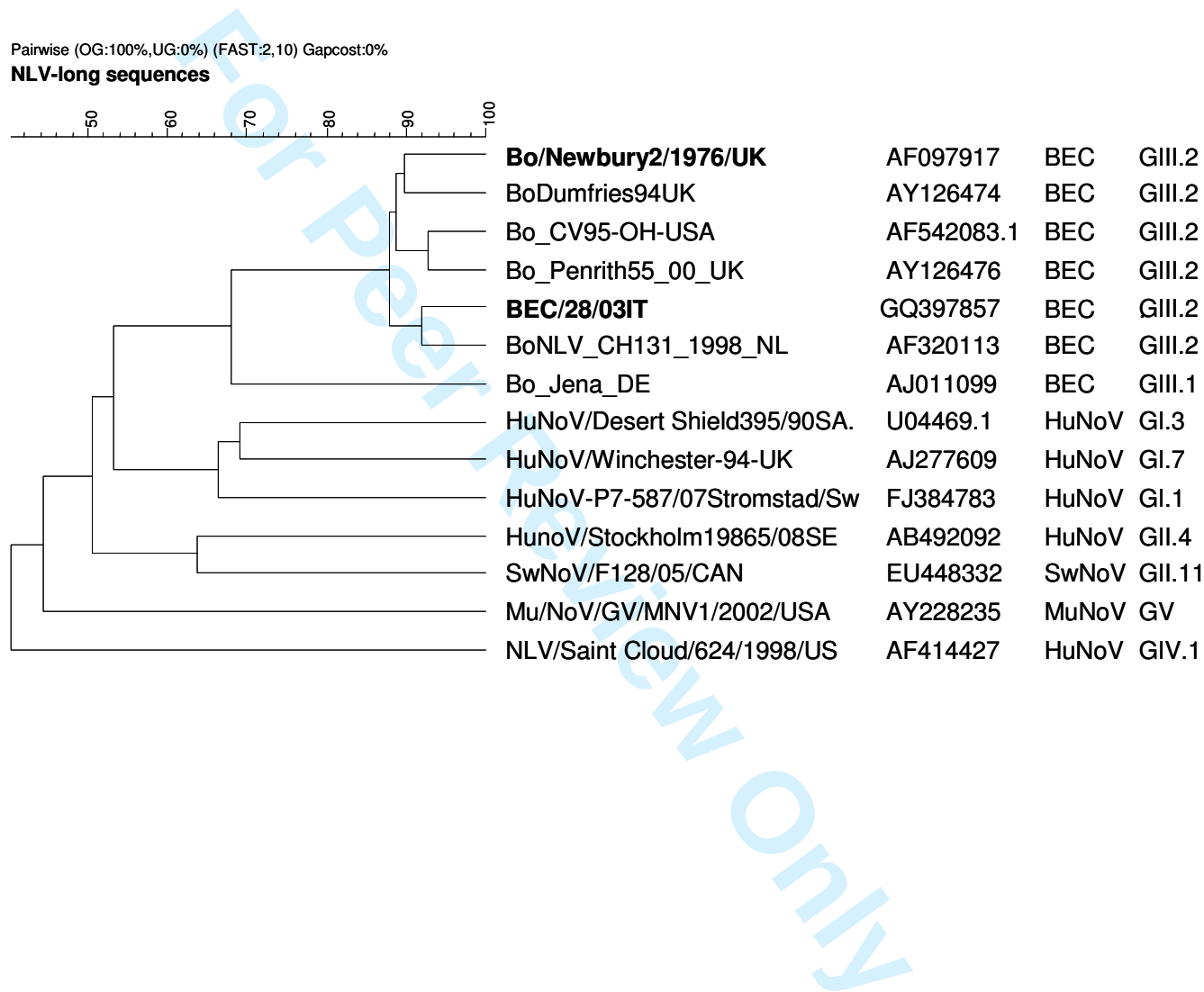


Table 1. Neoglycoconjugates used to determine the carbohydrate specificity of BEC28 VLPs

Trivial name	OLIGOSACCHARIDE STRUCTURE ^A
Tn	GalNAc α -R1
α -galactose monosaccharide	Gal α -R1
α -fucose monosaccharide	Fuc α -R1
A disaccharide	GalNAc α 3Gal β -R1
B disaccharide	Gal α 3Gal β -R1
	Gal α 2Gal β -R1
	Gal α 6Glc β -R1
Core 5	GalNAc α 3GalNAc α -R1
H disaccharide	Fuc α 2Gal β -R1
Forsmann disaccharide	GalNAc α 3GalNAc β -R1
Core 8	Gal α 3GalNAc α -R1
Type 2 precursor	Gal β 4GlcNAc β -R1
T α β	Gal α 3GalNAc β -R1
A trisaccharide	GalNAc α 3(Fuc α 2)Gal β -R1, R2
B trisaccharide	Gal α 3(Fuc α 2)Gal β -R1, R2
H type 1	Fuc α 2Gal β 3GlcNAc β -R1
H type 2	Fuc α 2Gal β 4GlcNAc β -R1, R2
H type 3	Fuc α 2Gal β 3GalNAc α -R1
α Gal trisaccharide	Gal α 3Gal β 4GlcNAc β -R1
Gb3 (Pk)	Gal α 4Gal β 4Glc β -R1
iGb3	Gal α 3Gal β 4Glc β -R1

P1 trisaccharide	$\text{Gal}\alpha 4\text{Gal}\beta 4\text{GlcNAc}\beta\text{-R1}$
Lewis a	$\text{Gal}\beta 3(\text{Fuc}\alpha 4)\text{GlcNAc}\beta\text{-R1}$
Lewis x	$\text{Gal}\beta 4(\text{Fuc}\alpha 3)\text{GlcNAc}\beta\text{-R1}$
3'-Sulfo-Lewis a	$\text{Su-O-3Gal}\beta 3(\text{Fuc}\alpha 4)\text{GlcNAc}\beta\text{-R1}$
3'-Sulfo-Lewis x	$\text{Su-O-3Gal}\beta 4(\text{Fuc}\alpha 3)\text{GlcNAc}\beta\text{-R1}$
A type 2	$\text{GalNAc}\alpha 3(\text{Fuc}\alpha 2)\text{Gal}\beta 4\text{GlcNAc}\beta\text{-R1}$
B type 2	$\text{Gal}\alpha 3(\text{Fuc}\alpha 2)\text{Gal}\beta 4\text{GlcNAc}\beta\text{-R1}$
Lewis b	$\text{Fuc}\alpha 2\text{Gal}\beta 3(\text{Fuc}\alpha 4)\text{GlcNAc}\beta\text{-R1, R3}$
Lewis y	$\text{Fuc}\alpha 2\text{Gal}\beta 4(\text{Fuc}\alpha 3)\text{GlcNAc}\beta\text{-R1, R2}$
Sialyl-Lewis a	$\text{NeuAc}\alpha 2,3\text{Gal}\beta 3(\text{Fuc}\alpha 4)\text{GlcNAc}\beta\text{-R1, R3}$
Sialyl-Lewis x	$\text{NeuAc}\alpha 2,3\text{Gal}\beta 3(\text{Fuc}\alpha 4)\text{GlcNAc}\beta\text{-R1, R3}$
6-sulfo Sialyl-Lewis x	$\text{NeuAc}\alpha 2,3\text{Gal}\beta 3(\text{Fuc}\alpha 4)(\text{Su-O-6})\text{GlcNAc}\beta\text{-R1}$
Tk	$\text{GlcNAc}\beta 3(\text{GlcNAc}\beta 6)\text{GlcNAc}\beta 3\text{Gal}\beta\text{-R1}$
Lacto-N-tetraose (LNT)	$\text{Gal}\beta 3\text{GlcNAc}\beta 3\text{Gal}\beta 4\text{Glc}\beta\text{-R3}$
Lacto-N-neotetraose (LNnT)	$\text{Gal}\beta 4\text{GlcNAc}\beta 3\text{Gal}\beta 4\text{Glc}\beta\text{-R3}$
α -Gal-Lewis x	$\text{Gal}\alpha 3\text{Gal}\beta 4(\text{Fuc}\alpha 3)\text{GlcNAc}\beta\text{-R1}$
α -Gal pentasaccharide	$\text{Gal}\alpha 3\text{Gal}\beta 4\text{GlcNAc}\beta\text{Gal}\beta\text{-R1}$
Sialyl-Lewis x pentasaccharide	$\text{NeuAc}\alpha 2,3\text{Gal}\beta 3(\text{Fuc}\alpha 4)\text{GlcNAc}\beta\text{-R1}$
Sialyl-lacto-N-neotetraose (Sia-LNnT)	$\text{NeuAc}\alpha 2,3\text{Gal}\beta 4\text{GlcNAc}\beta 3\text{Gal}\beta 4\text{Glc}\beta\text{-R1}$
Lactoneofucopentaose I (LNF I)	$\text{Fuc}\alpha 2\text{Gal}\beta 3\text{GlcNAc}\beta 3\text{Gal}\beta 4\text{Glc}\beta\text{-R1, R3}$
Lacto-N-fucopentaose II (LNF II)	$\text{Gal}\beta 3(\text{Fuc}\alpha 4)\text{GlcNAc}\beta 3\text{Gal}\beta 4\text{Glc}\beta\text{-R3}$
Lacto-N-fucopentaose III (LNF III)	$\text{Gal}\beta 4(\text{Fuc}\alpha 3)\text{GlcNAc}\beta 3\text{Gal}\beta 4\text{Glc}\beta\text{-R3}$
A hexasaccharide	$\text{GalNAc}\alpha 3(\text{Fuc}\alpha 2)\text{Gal}\beta 3\text{GlcNAc}\beta 3\text{Gal}\beta 4\text{-R3}$

A heptasaccharide

GalNAc α 3(Fuc α 2)Gal β 3(Fuc α 4)GlcNAc β 3Gal β 4Glc β -R3

^aOligosaccharides were used coupled to either polyacrylamide via an 3 carbon spacer (R1), or to human serum albumin via either a p-aminophenylethyl spacer (R2) or an acetyl phenylenediamine spacer (R3).

For Peer Review Only

IV.3 Ligands des souches GI.1, GII.4 et GIII.2 sur les tissus d'huître

Article 3: Norovirus genogroups I, II and III strains ligands in oysters: Characterization, tissue distribution and seasonal variation

Les épidémies de gastroentérite dues à la contamination de l'eau et des huîtres représentent un problème de santé publique important dans le monde. Plusieurs études ont montré la stabilité des souches GI dans l'environnement [384]. D'un autre côté les souches GII.4 circulent et évoluent plus rapidement [148][371]. Elles sont particulièrement impliquées dans les épidémies de gastroentérites collectives, transmissibles d'une personne à une autre alors que les souches GI caractérisent les gastroentérites liées à la consommation d'aliments contaminés.

On ignore jusqu'à présent les raisons de ces différences de circulation entre ces deux types de souches [385][386]. Soizick Le Guyader a montré la fixation de la souche Norwalk sur un antigène A-like présent au niveau de tube digestif de l'huître [22]. D'autres études ont montré la fixation de la souche GII.4 sur le même type d'antigènes tissulaires [378]. Récemment l'équipe de Larson en collaboration avec notre équipe a montré une différence de fixation de ces deux souches en les testant sur un panel d'oligosaccharides immobilisés. Les souches GII se fixent sur deux types de récepteurs, les antigènes ABH et l'antigène sialyl-Le^x (SLe^x) [359]. Dans cet article, nous avons étudié la fixation des VLPs des souches GI.1, GII.4 et GIII.2 dans l'ensemble des tissus d'huître et mis en évidence un nouveau ligand pour la souche GII.4.

La souche GIII.2 ne se fixe que très légèrement sur les tissus d'huîtres, ce qui est en accord avec l'absence de l'épitope α Gal qui lui sert de ligand chez la vache. Les souches GI.1 et GII.4 présentent des profils de fixation distincts. En utilisant le test d'immunohistochimie, nous avons observé que la fixation des VLPs, GI se limite au niveau de tube digestif, alors que celle des VLPs GII.4 est trouvée au niveau du manteau, des branchies et du tube digestif. Suite à un traitement périodate de 1 mM, seule la souche GII.4 a été affectée, ce signal positif disparaissant au niveau des branchies et du manteau. A 10 mM, on ne détectait plus aucun signal pour GI.1 et GII.4. Ces résultats nous ont amené de proposer l'existence d'un deuxième ligand pour la souche GII.4. En effet, GII.4 pourrait se fixer sur un ligand sensible à l'oxydation périodique 1 mM, comme un acide sialique et sur un glycanne neutre comme celui qui est reconnu par la souche GI.1.

Afin de détecter la présence d'un motif acide sialique, la lectine MAA (reconnaissant le motif $\alpha 2,3$ acide sialique) a été testée sur les tissus des huîtres. Une forte positivité a été démontrée indiquant que l'huître exprime sur ses tissus à la fois l'antigène A-like [22] et un acide sialique en liaison $\alpha 2,3$.

Pour confirmer nos résultats, une inhibition par la lectine MAA ou par traitement à la neuraminidase a permis d'inhiber la fixation de la souche GII.4 sur le tissu de l'huître au niveau des branchies et du manteau. En conclusion, les souches GI et GII ne se fixent pas de la même manière sur les tissus des huîtres. Il apparaît que GII se fixe sur deux types de ligands, l'un présentant un motif $\alpha 2,3$ acide sialique et l'autre appartenant à la famille des antigènes ABH présent sur les cellules épithéliales digestives. Cette différence entre les deux types de souches pourrait contribuer à expliquer leur différence de comportement en termes de transmission environnementale ou de personne à personne.

**Ligands of norovirus genogroups I, II and III strains in oysters: characterization,
tissue distribution and seasonal variations.**

Haifa Maalouf¹, Maha Zakhour², Jacques Le Pendu², Jean-Claude Le Saux¹, Robert L.
Atmar³, Françoise S. Le Guyader^{1*}.

1: IFREMER, Laboratoire de Microbiologie, Nantes France,

2: INSERM, U892, Université de Nantes, Nantes, France

3: Department of Molecular Virology and Microbiology, Baylor College of Medicine,
Houston, Texas, USA.

*Corresponding author. Mailing address: Soizick F. Le Guyader,
Laboratoire de Microbiologie, IFREMER, BP 21105, 44311 Nantes cedex 03, France.
Tel: 33 2 40 37 40 52, Fax: 33 2 40 37 40 27, e-mail : sleguyad@ifremer.fr

ABSTRACT

Bivalve molluscan shellfish, such as oysters, can filter large volumes of water as part of their feeding activities and are able to accumulate and concentrate different types of pathogens from fecal human pollution and particularly norovirus, agents of acute gastroenteritis in humans. Based on our previous observation of a specific binding of the Norwalk strain (prototype norovirus genogroup I) to the oyster digestive tract through an A-like carbohydrate structure indistinguishable from human blood group A antigen, and on the large between strains variations in terms of carbohydrate-binding specificities, we evaluated the different ligands implicated in attachment to oysters tissues of strains representative of three main genogroups of norovirus. Clear differences between the three strains were observed. The bovine strain showed no specific binding. The human GI.1 and GII.4 strains differed in that the latter recognized a sialic acid-containing ligand, present in all tissues, in addition to the A-like ligand of the digestive tract shared with the GI.1 strain. Moreover, a seasonal effect on the expression of these ligands was detected, most visible for the GI.1 strain, with a peak in late winter and spring, a period when GI strains are regularly involved in oyster-related outbreaks. These observations may contribute to explain some of the distinct epidemiological features of strains from different genogroups.

INTRODUCTION

A large variety of human enteric viruses is discharged into sewage and the environment and among them, noroviruses being very resistant to inactivation have been detected in wastewater treatment plant effluents and in surface waters (35). The sanitary consequences include contamination of drinking water, of foods such as vegetables, and of molluscs (43).

Bivalve molluscan shellfish, such as oysters, can filter large volumes of water as part of their feeding activities and are able to accumulate and concentrate different types of pathogens from fecal human pollution. Bacteria and virus show distinct behavior in terms of concentration, accumulation and purification of the contaminated shellfishes as already reported forty years ago (27). As a consequence, the monitoring for virus contamination cannot be deduced from a follow up of bacteria, requiring a better understanding of the virus-specific modes shellfish contamination. Since then, various factors such as water temperature, mucus production, glycogen content of connective tissue or gonadal development have been proposed to explain enterovirus or phages bio-accumulation in oysters (6, 11). Regarding noroviruses (NoVs), the viruses most often responsible for shellfish related outbreak nowadays (12), we previously observed a specific binding of the Norwalk prototype strain to the oyster digestive tract through an A-like carbohydrate structure indistinguishable from human blood group A antigen (16). This was confirmed latterly on different oyster species or for other NoV strains by Tian et al. (39, 40). Human A blood group antigen is one of the histo-blood group antigens (HBGA) receptors of NoVs that are involved in the infection process (21, 38), suggesting that oysters may have the ability to specifically accumulate and concentrate a human pathogen based on recognition of a shared ligand between the two species rather than through non specific interactions only. However, different NoV strains show different specificities for HBGAs, suggesting that all strains may not be captured equally well by oysters. Additionally, the relative importance of various NoV strains in shellfish-

1 related outbreaks and in other outbreaks is quite different. For the last fifteen years, it has
2 become clear that strains of the GII.4 genogroup were largely dominating in community
3 outbreaks where strains of the GI genogroup seldom found (22). In contrast the latter are
4 found regularly in shellfish-related outbreaks. These observations raise the possibility that
5 oysters may be preferentially contaminated by some NoV strains based on their expression of
6 carbohydrate ligands.

7 This new concept where the relationship between the shellfish carbohydrate ligands and
8 the virus strain specificity is taken into account may be used as a tool to discriminate within
9 different viruses, bivalve molluscan shellfishes and seasons both in terms of risk analysis and
10 for shellfish producers. The objectives of this present study are to extend the study NoV
11 binding to all oysters tissues rather than to the digestive tract only, to develop an ELISA
12 approach for quantification of the virus binding, to compare the binding of three different
13 NoV genogroups (GI.1, GII.4 and GIII.2) with known HBGAs specificities to oyster tissues,
14 and finally to evaluate the influence of seasonal variations.

15

16

MATERIALS AND METHODS

Reagents and Virus like particles (VLPs). The *Helix pomatia* (HPA) lectin, which is specific for terminal N-acetylgalactosamine residues in alpha linkage, and biotinylated Maackia Amurensis Agglutinin (MAA), specific for sialic acid residues in $\alpha 2,3$ linkage, were obtained from Biovalley SA, (Marne la Vallée, France) and Oxford Glycosystems (Abingdon, UK), respectively. The CSLEX-1 monoclonal antibody was obtained from BD Pharmingen (San Diego, CA). Peroxidase-labeled avidin was purchased from Vector Labs (Burlingame, CA) and the neuraminidase from *Arthrobacter tumefaciens* was purchased from Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Germany). Synthetic oligosaccharides as polyacrylamide conjugates (PAA) or coupled to human serum albumin (HSA) were obtained from Dr. N. Bovin (Moscow, Russia) and IsoSepAB (Tullingen, Sweden), respectively. The neoglycoconjugates examined in this study were: H type 1-PAA ($\text{Fuc}\alpha 2\text{Gal}\beta 3\text{GlcNAc}\beta\text{-R}$), H type 2-PAA ($\text{Fuc}\alpha 2\text{Gal}\beta 4\text{GlcNAc}\beta\text{-R}$), H type 3-PAA ($\text{Fuc}\alpha 2\text{Gal}\beta 3\text{GalNAc}\alpha\text{-R}$), Le^{Y} -PAA ($\text{Fuc}\alpha 2\text{Gal}\beta 4[\text{Fuc}\alpha 3]\text{GlcNAc}\beta\text{-R}$), alphaGal-PAA ($\text{Gal}\alpha 3\text{Gal}\beta 4\text{GlcNAc}\beta\text{-R}$), A tri-PAA ($\text{GalNAc}\alpha 3[\text{Fuc}\alpha 2]\text{Gal}\beta\text{-R}$), Le^{X} -HSA ($\text{Gal}\beta 4[\text{Fuc}\alpha 3]\text{GlcNAc}\beta\text{-R}$), Sialyl- Le^{X} -HSA ($\text{NeuAc}\alpha 2,3\text{Gal}\beta 4[\text{Fuc}\alpha 3]\text{GlcNAc}\beta 3\text{Gal}\beta 4\text{Glc}\beta\text{-R}$), and Sialyl-LNnT-HSA ($\text{NeuAc}\alpha 2,3\text{Gal}\beta 4\text{GlcNAc}\beta 3\text{Gal}\beta 4\text{Glc}\beta\text{-R}$).

Constructs containing open reading frames 2 and 3 were used to produce recombinant VLPs for genogroup I.1 (Norwalk virus, strain 8FIIa) and genogroup II.4 (Houston strain) as previously described (5). VLPs from genogroup III.2 were prepared as previously described from the capsid region of a strain identified in a survey in Northern Italy (BEC/28/03IT) (44). Corresponding antibodies were produced by immunizing rabbits with the GI.1, the GII.4 or the GIII.2 purified VLPs respectively.

Oyster samples. A large batch of oysters (*Crassostrea gigas*) was bought at the beginning of the study and placed in a clean area in Brittany. All samples constituted by at

1 least eight oysters were then randomly collected from this batch and shipped within 24 hours
2 to the laboratory at 4°C.

3 **ELISA-based carbohydrate microtiter plate assays.** Every month, eight oysters were
4 shucked and stomach and digestive tissue (DT), gill and mantle were dissected separately.
5 One gram of each tissue was homogenized in 2 ml of phosphate-buffered saline (PBS, pH
6 7.4), heated for 10 min at 95°C, centrifuged at 13,000 x *g* for 7min at 4°C and the supernatant
7 recovered. Protein concentration was estimated using BC Assay kit using bovine serum
8 albumin as a standard (Uptima, Montluçon, France). After adjustment at 40 µg/ml, tissues
9 extracts were coated onto NUNC Maxisorp immunoplates in 100 mmol/L carbonate buffer
10 (pH= 9.6) by overnight incubation at 4°C. After blocking with 10% no-fat dried cow's milk in
11 PBS for one hour, VLPs were added at a final concentration of 10⁹ particles per well and
12 incubated at 37°C for 1h. Plates were then incubated with specific antibodies at 1/1000
13 dilution in PBS 5% milk for 1 hour at 37°C, and then peroxidase anti-rabbit IgG (Uptima,
14 Montluçon, France) at 1/2000 in PBS 5% milk were added and incubated for 1h at 37°C.
15 Between each step, plates were washed 3 times with phosphate-buffered saline (PBS)
16 containing 5% Tween 20 (Sigma Aldrich, France). The enzyme signals were detected with
17 TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine; Sigma Aldrich, France) as substrate and read at 450 nm
18 with a spectrophotometer (Safire, Tecan, France).

19 Sodium periodate treatment was performed on the coated material using 10 mmol/L
20 sodium periodate in 50 mmol/L sodium acetate buffer, pH 5.0, for 30 minutes at room
21 temperature, followed by a 10 minutes incubation with 1% glycine in PBS. Control wells
22 were treated similarly without sodium periodate. Inhibition of VLPs binding with the HPA
23 lectin was performed by preincubation of the lectin diluted at 50 µg/ml in PBS for 30 min at
24 room temperature. After washings, VLPs were added and their binding detected as above.

For each tissue extract, negative controls without VLPs but with primary or secondary antibodies were included. Coated human secretor type A, B and O saliva samples, as well as the polyacrylamide-conjugated Gal α 3Gal β 4GlcNAc trisaccharide constituted additional positive controls in each plate. The GI.1 VLPs are known to bind well to A and O secretor saliva but poorly to B secretor saliva (24), the GII.4 VLPs used here to bind well to secretor saliva irrespective of the ABO type (unpublished results) and the GIII.2 VLPs bind to the α Gal trisaccharide (44). For the HPA inhibition test, positive (without HPA preincubation) and negative controls (without VLPs), as well as positive controls on saliva samples were performed in the same plate. In all cases, after validation of the saliva and α Gal positive controls and of the negative controls, OD values were collected for all samples. All samples were analyzed in duplicates on the same plates and in case of discordance the result was not accepted. The ratio of the assay was obtained dividing the OD value of the assay by the OD value of the negative control (same tissue without VLPs). A sample was considered positive if this ratio was ≥ 2 .

Binding of VLPs to immobilized neoglycoconjugates. Briefly, oligosaccharides conjugated to either polycrylamide (PAA) or human serum albumin (HSA) were coated onto NUNC Maxisorp immunoplates as previously described (24). After blocking with 5% defatted dry cow's milk, VLPs at 4 μ g/ml were added for 2h at 37°C. The binding was detected by incubation with the respective anti-GI.1, anti-GII.4 and anti-GIII.2 rabbit antisera diluted at 1/1000 followed by incubation with peroxidase-conjugated goat anti-rabbit immunoglobulins (Uptima, Montluçon, France). The peroxidase substrate TMB (BD Bioscience, San Jose, CA) was used and O.D. values determined by reading at 450 nm.

Immunohistochemical analysis. Oysters (uncontaminated or after bioaccumulation) were shucked and the body was cut horizontally so as to visualize all organs (from the mouth to the anus) on a single section. Sections were fixed in 10% formaldehyde (Gurr, VWR,

France) for 24 hours, paraffin embedded, and sliced into thin sections (5 μm). After preparation of tissue sections as described previously (25), sections from uncontaminated oysters were covered with 10^{11} particles/ml of GI.1, GII.4 or GIII.2 VLPs and left overnight at 4°C and washed three times for 5 min in PBS at room temperature. The presence of VLPs bound to the oyster tissue was detected using respective antibodies as previously described (16, 25). Negative controls included sections from uncontaminated samples not exposed to VLPs, and exposed sections without primary antibody. Staining with MAA was performed by incubating sections with the biotinylated lectin diluted at 10 $\mu\text{g/ml}$ overnight at 4°C, followed by a second incubation with peroxidase-labeled avidin at 1/1000 for 45 min at room temperature. Immunoreactivity, detected under microscopic analysis, was considered as strong (intense brown red coloration), weak (pale brown red coloration) or negative (no coloration).

Neuraminidase treatment was performed on some oysters sections by incubation at 37°C with 15 mU neuraminidase in 50 mmol/L sodium acetate buffer pH 5.3 for a total of 18 hours with a renewal after 6 hours. Serial control sections were incubated in parallel in the same buffer without the enzyme. Following treatments, rGII VLPs and rGI VLPs were added for 1 hour at room temperature and the detection of binding was performed as above.

Blocking of VLPs binding by the MAA lectin was performed by preincubating tissue sections with the lectin diluted at 50 $\mu\text{g/mL}$ in PBS/ BSA 1% at 4°C overnight. Sections were then rinsed 3 times with PBS and incubated GI or GII VLPs for 1 hour at room temperature, and the detection of binding was performed as above. Serial control sections were preincubated in the same conditions in absence of the lectin prior to addition of the VLPs.

1 **RESULTS**

2 **ELISA set-up and controls.** Based on a method previously elaborated for human
 3 saliva, several conditions were compared prior the elaboration of the method presented here.
 4 The two factors found important for reproducibility of the test were, firstly to boil the tissue
 5 supernatants and secondly, to adjust the protein concentration of each supernatant. Other
 6 important parameters such as VLPs concentration and antibody dilution were adjusted so as to
 7 use the same number of particles and the same primary antiserum dilution for each type of
 8 VLPs and yet obtain positive controls with signal to noise ratio above 10. These positive
 9 controls used known human saliva samples and neoglycoconjugates and were introduced in
 10 each assay to validate the experiment. Each tissue supernatant was tested in duplicate and
 11 results were expressed as the geometric mean of the two OD values divided by the geometric
 12 mean value of the two OD values of the negative controls referring to this tissue (without
 13 VLP, but with primary and secondary Ab). A sample was considered as positive if this ratio
 14 value was ≥ 2 .

15 **Comparison of the genogroups binding capacity to oysters tissue extracts.** By using
 16 representative VLPs GI.1, GII.4 and GIII.2, the three main NoV genogroups GI, GII and GIII,
 17 were compared in their capacity to bind to different oysters tissues, namely the digestive
 18 tissue (DT), the gills and the mantle (Fig. 1). GI.1 VLPs bound readily to DT but not to the
 19 gills or the mantle. GII.4 VLPs bound strongly to DT but also to the gills and the mantle.
 20 Although the mean binding to the gills was somewhat lower than to the DT or the mantle, the
 21 difference did not reach statistical significance ($p > 0.3$). Interestingly, GIII.2 VLPs did not
 22 bind to any of the tissues, showing values always under the positive threshold (Fig.1).

23 In a previous study we demonstrated on tissues sections that GI.1 VLPs bind
 24 specifically to carbohydrate ligands of oysters DT (16). Since periodate oxidation cleaves C-C
 25 bonds with vicinal hydroxyl groups of carbohydrates, we treated the coated tissue extracts in

the ELISA plate with 10 mmol/L sodium periodate and observed a total loss of binding capacity for GI.1 VLPs (Fig. 2A). Similarly, periodate treatment completely abolished binding of GII.4 VLPs to all oysters tissue extracts, indicating that GII.4 binding was carbohydrate-dependent, similar to that of GI.1 (Fig. 2B).

Since the HPA lectin, that recognizes α -linked N-acetylgalactosamine terminal residues prevented binding of GI.1 to tissues sections (16), the ELISA plate was incubated with this lectin prior incubation with GI.1 or GII.4 VLPs. As expected, the GI.1 binding to DT was completely inhibited (Fig. 2C) ($p=0.0124$). At variance, for GII.4 (Fig. 2D), the binding to DT was only partially inhibited by about 50% on DT ($p=0.0182$) and no significant inhibition was observed on mantle and gills ($p=0.453$ and $p=0.315$, respectively). This suggested that GII.4 VLPs bind to two distinct ligands, one mainly or exclusively present in DT and shared both those of HPA of GI.1 VLPs and the other present in all three tissues, but not shared with either HPA or GI.1 VLPs.

In order to get insights into the structure of the second carbohydrate ligand of GII.4 VLPs, we first tested the binding of the three strains (GI.1, GII.4 and GIII.2) to a selected set of neoglycoconjugates (Fig. 3). As previously shown, GI.1 VLPs recognized H type 1, and the A epitope (8, 24). The GII.4 VLPs attached to H type 3 and Le^y as well as to the A epitope, consistent with the recognition of a ligand shared with the HPA lectin on oyster DT. In addition and similar to what was previously observed with other GII strains (33), the GII.4 VLPs used in this study attached to sialylated structures, fucosylated (Sialyl-Le^x) or not (Sialyl-LNnT). As to the GIII.2 VLPs, we controlled that they could bind specifically to the αGal epitope as previously described (Fig. 3). These results suggested that the GII.4 VLPs may recognize a sialylated carbohydrate motif present in various oysters tissues.

To test this hypothesis, we used an immunohistochemistry approach. Oriented tissue sections allowing to see all organs on the same slide were incubated with the different VLPs.

1 The GI.1 VLPs bound mainly to oesophagus, midgut, main and secondary ducts of the
 2 digestive diverticula and tubules as previously described (16, 40) (Fig. 4A). No binding was
 3 observed on gills, mantle or labial palps (Fig. 4A and 4C). The GII.4 VLPs also bound to the
 4 different digestive organs, but a strong binding was additionally observed on labial palps, gills
 5 and mantle (Fig. 4B and 4D). At variance with the GI.1 VLPs, those from the GII.4 strain
 6 stained non epithelial histological structures from all organs in addition to the digestive
 7 epithelial cells. The GIII.2 VLPs did not bind to any tissue or bound only very weakly to
 8 some digestive tubules as previously shown, consistent with a lack of α Gal epitopes in oysters
 9 tissues (Fig. 4E). Bovine duodenum sections tested in parallel were used as positive controls
 10 (not shown). This set of observation is perfectly in accordance with the results obtained by
 11 ELISA and shown on Fig. 1.

12 After treatment of tissues sections with 1 mmol/L sodium periodate, GI.1 binding was
 13 not clearly decreased (not shown) and some binding was still observed on the epithelial part
 14 of the DT for GII.4, although it was no longer detectable on gills or other tissues (Fig. 4 F and
 15 G). However, when tissues sections were treated with a higher periodate concentration (10
 16 mmol/L), both GI.1 and GII.4 binding were completely lost (Fig. 4H). This result is consistent
 17 with the possible presence of two GII.4 ligands on oysters tissues, one localized in all tissues
 18 and sensitive to 1 mmol/L periodate, as expected for a sialic acid containing epitope and the
 19 second, restricted to the TD and sensitive to a higher periodate concentration only, as
 20 expected for a neutral carbohydrate epitope. Thus, to determine if sialic acid residues in α 2,3
 21 linkage were indeed present in *Crassostrea gigas* oysters, tissue sections were first incubated
 22 with the MAA lectin and an anti-sialyl-Le^x mAb. Although no reactivity was detected using
 23 the anti-sialyl-Le^x, a strong staining, largely overlapping with that of the GII.4 VLPs, was
 24 observed to most tissues with MAA (Fig. 4I). In addition, following treatment of the tissue
 25 sections with neuraminidase, MAA binding was completely lost, except on the mantle single

epithelial cell layer, indicating that on most histological structures, the lectin recognized neuraminidase-sensitive sialylated structures, as expected (Fig. 4J). When tissue sections were incubated with the MAA lectin prior GII.4 VLPs incubation, the VLPs binding was drastically reduced, showing a competition between the lectin and the VLPs for their binding sites (Fig. 4 K and L). To confirm the involvement of sialic acid residues in GII.4 VLPs binding, tissues sections were then treated with neuraminidase before VLPs incubation. The attachment of GII.4 VLPs was largely decreased (Fig. 4M and N). In contrast, no effect was observed on GI.1 VLPs binding (Fig. 4O).

Seasonal variations. Oysters collected every month were assayed in the ELISA test at least three times each, and on separate experiments. A clear seasonal effect was observed for GI.1 VLPs with an increased binding capacity during the months January to May that correspond to the end of winter and most of spring (Fig. 5A). A comparison of the two periods thus defined, January-May vs June-December, revealed a highly statistically different level of GI.1 binding to oysters DT ($p=4.8 \times 10^{-12}$). In contrast, for GII.4 VLPs, seasonal variation of binding to tissue extracts was far less visible (Fig. 5B) although the difference between these two seasons, were statistically significant in the TD ($p=0,001$) and mantle ($p=0.004$) but not in gills ($p=0.11$). If no statistical difference was observed between GI.1 and GII.4 in their binding to the TD during period A (January-May) ($p=0.167$), the difference was statistically significant during period B (months May to December) ($p=1.282 \times 10^{-12}$) (Fig. 5C).

DISCUSSION

Norovirus are genetically and antigenically diverse (1). Since the first characterization of the Norwalk virus in 1992, a large number of strains have been described worldwide and they are now recognized as the principal agents of acute non bacterial gastroenteritis in all human age groups. The genetic classification systems based on relatedness of the complete VP1 capsid protein, allowed to distribute them into five genogroups, and a large number of unclassified strains (45). Among these five genogroups, humans may be infected by GI, GII and GIV strains, GIII and GV strains infecting cows and mice, respectively. For some years the GII strains, particularly those of the GII.4 cluster, have been by far the predominant viruses detected in different parts of the world (22, 37). Beside this high prevalence of GII.4 NoV in the human population, another important distinctive feature of GII.4 is their way of transmission since they appear to be mainly transmitted via person-to-person contact in community outbreaks, other strains and more importantly GI strains being more often transmitted via food or environmental contamination (23, 29). Fecal viral load, which is higher for GII compared to GI strains (7), shedding by asymptomatic subjects (3), and distinct behaviors during waste water treatments (10) may partially explain some of the observed differences between GI and GII epidemiology. More general parameters such as global climate change may also have an impact on outbreak seasonality and strain transmission (32) and the overall impact of environment on infectious diseases needs to be considered (34).

The epidemiological difference between genogroups implicated in outbreaks is even clearer when considering oyster-related outbreaks where NoV GI may constitute up to 30% of strains detected in patients stools or shellfish samples (13, 15, 17-20, 28). For a long time, oysters were believed to act as filters or ionic traps, passively concentrating particles. However depuration failure, long-term persistence in shellfish and the above mentioned difference in strain transmission argue in favor of more specific mechanisms for NoV

1 bioaccumulation in oysters. We previously demonstrated a specific binding of Norwalk virus
2 via a carbohydrate structure very similar to human histo-blood group A antigen in
3 *Crassostrea gigas* oysters (16), as latterly confirmed in another oyster species (*Crassostrea*
4 *virginica*) (40). Interestingly, characterization of a blood group A activity in the acidic
5 polysaccharide fraction from *craossostera gigas* viscera was reported quite a long time ago
6 (31). Data presented here confirmed that GI.1 VLPs bind mainly to digestive tissues but not to
7 other organs, and were consistent with the results of bioaccumulation studies, performed with
8 Norwalk virus (GI.1) and RT-PCR detection, that led to a major method improvement (2).
9 However, genetic diversity of NoVs is also reflected in their binding capacity to various
10 HBGAs structures (21, 38). Differences observed between GI.1 and GII.4 binding to human
11 HBGAs, also exist in oyster tissues. Our data demonstrate that the distribution of GII.4 is not
12 restricted to digestive tissues as for GI.1, in accordance with reports demonstrating the
13 presence of GII.4 in gills albeit at a lower extent than in digestive tissues (26, 42). Our
14 quantitative analysis is consistent with a lower expression of GII.4 binding sites in gills as
15 compared to the digestive tissue, yet, the difference was not statistically significant. In
16 addition, we demonstrate here that the binding to gills and mantle tissue sections involves a
17 sialic acid in α 2,3 linkage, whereas in digestive tissues the interaction involves both the sialic
18 acid and an A-like carbohydrate ligand. Differential recognition of these ligands by GII and
19 GI strains may lead to distinct outcomes in terms of viral particles persistence within the
20 different organs. In other words, recognition of the sialylated ligand by GII strains could lead
21 to quick degradation, whereas recognition of the A-like ligand could lead to persistence.
22 Although this remains speculative and requires further evaluation, it may partly explain why
23 GII strains that are shed in the environment in far larger amounts than GI strains are not so
24 obviously dominating in oyster-related outbreaks. .

1 In addition to ligand-specific recognition, binding of NoVs to oyster tissues may
2 involve non specific interactions as suggested in the past for enterovirus or reovirus (4, 6, 11).
3 For example bovine norovirus, that clearly did not bind specifically to any of the tissues
4 analyzed here were detected both in oysters collected in Brittany (same climatic conditions
5 and water temperature as oysters collected for the study presented here) (44) or in the US (9).
6 However, it is likely that these non specific mechanisms of attachment are less efficient than
7 specific ligand-mediated binding and we may predict that viruses captured through non
8 specific interactions only will be less efficiently concentrated and/or that their persistence
9 within oyster bodies will be shorter. Only *in situ* studies of bio-accumulation in shellfish will
10 allow to clarify this matter. Yet the data presented here clearly suggest that the risk of bovine
11 NoV bioaccumulation by oyster should be low. This is important regarding the potential
12 zoonotic aspect of NoVs, suggesting that oysters, despite their exposure to potential bovine
13 contamination, should not be a risk factor for bovine strain transmission.

14 The second major interest of the data presented here concerns the observed seasonal
15 variation. Oysters are able to bind much more efficiently GI.1 VLPs during the first five
16 months of the year (January to May) as compared to the rest of the year. At variance with our
17 results, a lack of seasonal variation was reported for three oyster species using GI.1 VLPs
18 (41). Different parameters such as the number of replicates, sensitivity of the test, or
19 environmental conditions may explain this discrepancy. Regardless, the seasonal variation
20 that we observed parallels the occurrence of oyster-related outbreaks in France which take
21 place at the beginning of the year (18-20), whereas the peak of consumption lies between
22 December 24-31 (36). Moreover, the end of winter/beginning of spring period also
23 corresponds to the highest concentration of NoVs in sewage, which may really increase the
24 risk of oysters contamination in case of failure of sewage treatment plant or of heavy rainfall
25 that lowers the sewage treatment efficiency (10, 30). Although detected, the seasonal effect

1 was markedly less visible for GII.4 VLPs, suggesting that the corresponding strains may
2 accumulate with more or less similar efficiency all year round.

3 As fundamental studies progress to understand NoVs behavior in humans, basic
4 research on oysters contamination mechanisms will progress too. Understanding processes
5 and mechanisms of virus uptake by molluscan shellfish, in conjunction with environmental
6 studies will help to prevent oysters contamination in the future. These studies initialized more
7 than 40 years ago for other enteric viruses, may be more successful now as new tools are
8 available. Demonstrating here that, as in human, NoVs of distinct genogroups present a
9 different behavior with regard to oyster tissues recognition, that bovine strains did not bind to
10 oyster tissues and that a seasonal variation exists, mainly for GI, are important steps in
11 understanding oysters contamination and should contribute to help protect oysters consumers.

12

13

1 **ACKNOWLEDGEMENTS**

2 This work was supported in part by a grant 2006 SEST 08 01 « Coquenpath » from the
3 Agence Nationale pour la Recherche (ANR), and by a grant (CIMATH) from the Région des
4 Pays de la Loire. The authors are grateful to Monique Pommepuy (Ifremer) for helpful
5 support and project management and Tristan Renault (Ifremer) for shellfish tissues
6 preparation and data interpretation. We acknowledge the helpful assistance of the Cell and
7 tissue imaging core facility of the “Institut Fédératif de Recherche Thérapeutique de Nantes”.
8 H.M. was supported by a fellowship from Ifremer and Conseil Régional des Pays de la Loire,
9 France.

10

REFERENCES

1. **Atmar, R. L., and M. K. Estes.** 2006. The epidemiologic and clinical importance of norovirus infection. *Gastroenterol. Clin. Microbiol. rev.* **35**:275-290.
2. **Atmar, R.L., F.H. Neil, J. L. Romalde, F. Le Guyader, C. M. Woodley, T.G. Metcalf, and M. K. Estes.** 1995. Detection of Norwalk virus and Hepatitis A virus in shellfish tissues with the PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:3014-3018.
3. **Atmar, R.L., A. R. Opekum, M. A. Gilger, M. K. Estes, S. E. Crawford, F. H Neill, and D. Y. Graham.** 2008. Norwalk virus shedding after experimental human infection. *Emerg. Infect. Dis.* **14**:1553-1557.
4. **Bedford, A.J., G. Williams, and A. R. Bellamy.** 1978. Virus accumulation by the rock oyster *crassostrea glomerata*. *Appl. Environ. Microbiol.* **35**:1012-1018.
5. **Bertolotti-Ciarlet, A., S. E. Crawford, A. M. Hutson, and M. K. Estes.** 2003. The 3' end of Norwalk virus mRNA contains determinants that regulate the expression and stability of the viral capsid protein VP1: a novel function for the VP2 protein. *J. Virol.* **77**:11603-11615.
6. **Burkhardt, W., and K. R. Calci.** 2000. Selective accumulation may account for shellfish-associated viral illness. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:1375-1378.
7. **Chan, M.C.W., J. J. Y. Sung, R. K. Y. Lam, P. K. S Chan, N. L. S. Lee, R. W. M. Lai, and W. K. Leung.** 2006. Fecal viral load and norovirus associated gastroenteritis. *Emerg. Infect. Dis.* **12**:1278-1280.
8. **Choi, J.-M., A. M. Hutson, M. K. Estes, and B. V. Prasad.** 2008. Atomic resolution structural characterisation of recognition of histo-blood group antigens by Norwalk virus. *Proc Natl Acad Sci* **105**:9175-9180.

- 1 9. **Costantini, V., F. Loisy, L. Joens, F. S. Le Guyader, and L. J. Saif.**2006. Human
2 and animal enteric caliciviruses in oysters from different coastal regions of the United
3 States. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**:1800-1809.
- 4 10. **da Silva, A. K., J-C. Le Saux, S. Parnaudeau, M. Pommepuy, M. Elimelech, and**
5 **F. S. Le Guyader.**2007. Evaluation of removal of noroviruses during wastewater
6 treatment, using real-time reverse transcription-PCR: different behaviors of
7 genogroups I and II. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**:7891-7897.
- 8 11. **Di Girolamo, R., J. Liston, and J. Matches.**1977. Ionic binding, the mechanism of
9 viral uptake by shellfish mucus. *Appl. Environ. Microbiol.* **33**:19-25.
- 10 12. **Duizer, E., and M. Koopmans** 2009. Gastroenteritis viruses, p. 1161-1192. In: C.W.
11 Blackburn and P. J. McClure (ed), *Foodborne pathogens: hazards, risk analysis and*
12 *control.* CRC Press, Cambridge, UK.
- 13 13. **Gallimore, C., J.S. Cheesbrough, K. Lamden, C. Bingham, and J. Gray.** 2005.
14 Multiple norovirus genotypes characterised from an oyster-associated outbreak of
15 gastroenteritis. *Int. J. Food Microbiol.* **103**:323-330.
- 16 14. **Hutson A.M., A. F., Le Pendu J., Estes M.K., Atmar R.L.** 2005. Norwalk virus
17 infection associates with secretor status genotyped from sera. *J. Virol.* **77**:116-120.
- 18 15. **Kageyama, T., M. Shinohara, K. Uchida, S. Fukushi, F. B. Hoshino, S. Kojima,**
19 **R. Takai, T. Oka, N. Takeda, and K. Katayama.** 2004. Coexistence of multiple
20 genotypes, including newly identified genotypes, in outbreaks of gastroenteritis due to
21 Norovirus in Japan. *J. Clin. microbiol.* **42**:2988-2995.
- 22 16. **Le Guyader, F., F. Loisy, R. L. Atmar, A. M. Hutson, M. K. Estes, N. Ruvöen-**
23 **Clouet, M. Pommepuy, and J. Le Pendu** 2006. Norwalk-virus specific binding to
24 oyster digestive tissues. *Emerg Infect Dis* **12**:931-936.

- 1 17. **Le Guyader, F. S., F. H. Neill, M. K. Estes, S. S. Monroe, T. Ando, and R. L.**
2 **Atmar.** 1996. Detection and analysis of a Small Round-Structured virus strain in
3 oysters implicated in an outbreak of acute gastroenteritis. *Appl. Environ. Microbiol.*
4 **62:**4268-4272.
- 5 18. **Le Guyader, F. S., F. Bon, D. DeMedici, S. Parnaudeau, A. Bertone, S. Crudeli,**
6 **A. Doyle, M. Zidane, E. Suffredini, E. Kohli, F. Maddalo, M. Monini, A. Gallay,**
7 **M. Pommepuy, P. Pothier, and F. M. Ruggeri.** 2006. Detection of multiple
8 noroviruses associated with an international gastroenteritis outbreak linked to oyster
9 consumption. *J . Clin. microbiol.* **44:**3878-3882.
- 10 19. **Le Guyader, F. S., J-C. Le Saux, K. Ambert-Balay, J. Krol, O. Serais, S.**
11 **Parnaudeau, H. Giraudon, G. Delmas, M. Pommepuy, P. Pothier, R. L. Atmar..**
12 2008. Aichi virus, norovirus, astrovirus, enterovirus and rotavirus involved in clinical
13 cases from a French oyster-related gastroenteritis outbreak. *J . Clin. microbiol.*
14 **46:**4011-4017.
- 15 20. **Le Guyader, F.S., F. H. Neill, E. Dubois, F. Bon, F. Loisy, E. Kohli, M.**
16 **Pommepuy, and R. L. Atmar.** 2003. A semi-quantitative approach to estimate
17 Norwalk-like virus contamination of oysters implicated in an outbreak. *Int. J. Food*
18 *Microbiol.* **87:**107-112.
- 19 21. **Le Pendu, J., N. Ruvoen-Clouet, E. Kindberg, and L. Svensson.** 2006. Mendelian
20 resistance to human norovirus infections. *Sem. Immunology* **18:**375-386.
- 21 22. **Lopman, B., M. Zambon, and D. W. Brown.** 2008. The evolution of norovirus, the
22 gastric flu. *PlosMedicine* **5:**1-3.
- 23 23. **L ysen, M., M. Thorhagen, M. Brytting, M. Hjertqvist, Y. Andersson, and K-O.**
24 **Hedlund.** 2009. Genetic diversity among food-borne and waterborne norovirus strains
25 causing outbreak in Sweden. *J. Clin. Microbiol.* **47:**2411-2418.

- 1 24. **Marionneau, S., F. Airaud, N. V. Bovin, J. Le Pendu, and N. Ruvoën-Clouet.**
2 2005. Influence of the combined ABO, FUT2 and FUT3 polymorphism on
3 susceptibility to Norwalk virus attachment. *J. Infect. Dis.* **192**:1071-1077.
- 4 25. **Marionneau, S., N. Ruvöen-Clouet, B. Le Moullac-Vaidye, M. Clement, A.**
5 **Cailleau-Thomas, G. Riuz-Palacios, P. W. Huang, X. Jiang, and J. Le Pendu.**
6 2002. Norwalk virus binds to histo-blood group antigens on gastro-duodenal epithelial
7 cells of secretor individuals. *Gastroenterology* **122**:1967-1977.
- 8 26. **McLeod, C., B. Hay, C. Grant, G. Greening, and D. Day.** 2009. Localization of
9 norovirus and poliovirus in Pacific oysters. *J. Appl. Microbiol.* **106**:1220-1230.
- 10 27. **Metcalf, T.G., B. Mullin, D. Eckerson, E. Moulton, and E. P. Larkin.**1979.
11 Bioaccumulation and depuration of enteroviruses by the soft-shelled clam, *Mya*
12 *arenaria*. *Applied and Environmental Microbiology* **38**:275-282.
- 13 28. **Nenonen, N.P., C. Hannoun, M. B. Olsson, and T. Bergstrom.**2009. Molecular
14 analysis of an oyster-related norovirus outbreak. *J. Clin. Virol.* **45**:105-108.
- 15 29. **Noda, M., S. Fukuda, and O. Nishio.** 2008. Statistical analysis of attack rate in
16 norovirus foodborne outbreaks. *Int. J. Food Microbiol.* **122**:216-220.
- 17 30. **Nordgren, J., A. Matussek, A. Mattsson, L. Svensson, and P-E. Lindgren.** 2009.
18 Prevalence of norovirus and factors influencing virus concentrations during one year
19 in a full-scale wastewater treatment plant. *Wat. Res.*
- 20 31. **Ogamo, A., T. Ogashiwa, and K. Nagasawa.**1976. Purification and properties of
21 blood group A-active glycoprotein from oyster viscera. *Biochem Biophysica Act.*
22 **451**:426-435.
- 23 32. **Rohayem J.** 2009. Norovirus seasonality and the potential impact of climate change.
24 *Clin. Microbiol. Infect.* **15**:524-527.

- 1 33. **Rydell, G. E., J. Nilsson, J. Rodriguez-Diaz, N. Ruvöen-Clouet, L. Svensson, J. Le**
2 **Pendu , and G. Larson.** 2009. Human noroviruses recognize sialyl-lewis x
3 neoglycoprotein. *Glycobiology* **19**:309-320.
- 4 34. **Sansonetti P.** 2009. Framing a concept and an agenda for infectious diseases in
5 EMBO molecular medicine. *EMBO Molecular Medicine* **1**:193-194.
- 6 35. **Schwab K. J.** 2007. Waterborne gastroenteritis viruses. *Perspect. Med. Virol.* **17**: 27-
7 38.
- 8 36. **Secodip-Ofimer.** 2006. Consommation des produits de la pêche et de l'aquaculture.
9 91p.
- 10 37. **Siebenga, J. J., H. Vennela, D-P. Zheng, J. Vinje, B. E. Lee, X-L. pang, E. C. M.**
11 **Ho, W. Lim, A. Choudekar, S. Broor, T. Halperin, N. B. G. Rasool, J. Hewitt, G.**
12 **E. Greening, M. Jin, Z. J. Duan, Y. Lucero, M. O'Ryan, M. Hoehne, E. Schreier,**
13 **R. M. Ratcliff, P. A. White, N. Iritani, G. Reuetr, and M. Koopmans.** 2009.
14 Norovirus illness is a global problem: emergence and spread of norovirus GII.4
15 variants, 2001-2007. *J. Inf. Dis.* **200**:802-812.
- 16 38. **Tan, M., and X. Jiang.** 2007. Norovirus-host interaction: implications for disease
17 control and prevention. *expert Rev. Mol. Med.* **9**.
- 18 39. **Tian, P., A. L. Engelbrektson, X. Jiang, W. Zhong, and R. E. Mandrell.** 2007.
19 Norovirus recognizes histo-blood group antigens on gastrointestinal cells of clams,
20 mussels and oysters: a possible mechanism of bioaccumulation. *J Food Prot* **70**:2140-
21 2147.
- 22 40. **Tian, P., A. H. Bates, H. M. Jensen, and R. E. Mandrell.** 2006. Norovirus binds to
23 blood group A-like antigens in oyster gastrointestinal cells. *Let. Appl. Microbiol.*
24 **43**:645-651.

- 1 41. **Tian, P., A. L. Engelbrektson, and R. E. Mandrell.** 2008. Seasonal tracking of
2 histo-blood group antigen expression and norovirus binding in oyster gastrointestinal
3 cells. *J. Food Prot.* **71**:1696-1700.
- 4 42. **Wang, D., Q. Wang, X. Kou, L. Yao, and J. Zhang.** 2008. Distribution of norovirus
5 in oyster tissues. *J. Appl. Microbiol.* **105**:1966-1972.
- 6 43. **Widdowson M-A., and J. Vinje.** 2008. Food-borne viruses-State of the art. p 29-64.
7 In M. Koopmans, A. Bosch and D. Cliver (ed.), *Food-borne viruses: progress and*
8 *challenges.* ASM Press, Washington, DC.
- 9 44. **Zakhour, M., H. Maalouf, I. Di Bartolo, L. Haugarreau, N. Ruvöen-Clouet, F. M.**
10 **Ruggeri, F. Le Guyader, and J. Le Pendu** Can oyster consumption favor bovine
11 norovirus cross-species transmsion? submitted.
- 12 45. **Zheng D-P, T. Ando, R. L. Fankhauser, R. S. Beard, R. Glass, and S. S. Monroe.**
13 2006. Norovirus classification and proposed strain nomenclature. *Virology* **346**:312-
14 323.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Binding of recombinant GI.1, GII.4 and GIII.2 VLPs to oyster tissues.

The binding of GI.1 (black bars), GII.4 (grey bars) and GIII.2 (white bars) VLPs to extracts of digestive tissues (#1 on x axis), to gills (#2) and to mantle (#3) was studied by ELISA as described in Materials and Methods section. Results are expressed as signal to noise ratio +/- S.D. The positive threshold is indicated by a dashed line.

Figure 2: Inhibition of binding of VLPs to oysters tissues.

The binding of GI.1 (A and C) and GII.4 (B and D) VLPs was tested on tissue extracts pretreated with sodium periodate (A and B) or preincubated with the HPA lectin (B and D). Tissue extracts from the digestive tract (#1 on x axis), gills (#2) and mantle (#3) were tested. Results are expressed as signal to noise ratio +/- S.D with filled bars for controls in absence of inhibitory agent and with empty bars in presence of the inhibitory agents. The positive threshold is indicated by a dashed line.

Figure 3: Binding of recombinant VLPs to neoglycoconjugates.

The binding of GI.1 (white bars), GII.4 (grey bars) and GIII.2 (black bars) VLPs to either PAA or HSA-conjugated synthetic oligosaccharides described in the Materials and Methods section was performed at 37°C using 4 µg/ml VLPs. Results of one representative experiment out of three with similar results are shown as OD mean values of duplicates for each neoglycoconjugate.

Figure 4: Immunohistochemical analysis of GI.1, GII.4 and GIII.2 recombinant

VLPs binding to oyster's tissues. VLPs and the MAA lectin were incubated on tissue sections as described in the Materials and Methods section. Binding of GI.1 VLPs to the

esophagus (arrow) and lack of binding to the labial palps (star) (**A**). Binding of GII.4 VLPs to the esophagus (arrow), the labial palps (star) and connective tissue structures (arrow head) (**B**). Absence of binding of GI.1 VLPs to the gills (**C**). Binding of GII.4 VLPs to connective tissue structures of the gills (arrow head) and weak staining of epithelial cells (arrow) (**D**). Absence of binding to the digestive tissue by GIII.2 VLPs (**E**). Staining of the digestive tissue by GII.4 VLPs on epithelial cells (arrow) and connective tissue (arrow head) in absence of periodate treatment (**F**), after 1 mM periodate treatment (**G**) and after 10 mM periodate treatment (**H**). Staining of the digestive tissue by MAA without (**I**) and with (**J**) neuraminidase treatment. GII.4 VLPs binding to the gills without (**K**) or with MAA preincubation (**L**). GII.4 VLPs binding to the digestive tube without (**M**) and with (**N**) neuraminidase treatment. GI.1 binding to the esophagus after neuraminidase treatment (**O**).

Figure 5: Seasonal variations of VLPs binding to oysters tissue extracts. Binding of VLPs from the GI.1 strain (A) and the GII.4 strain (B) to tissue extracts from the digestive tract (black bars), the gills (grey bars) and the mantle (white bars) prepared monthly from collected oysters was assessed by ELISA as described in the materials and methods section. Comparison of the GI.1 and GII.4 VLPs pooled binding values to the TD extracts from oysters collected January to May (black bars) and from June to December (white bars) (C). The positive threshold is indicated by a dotted line.

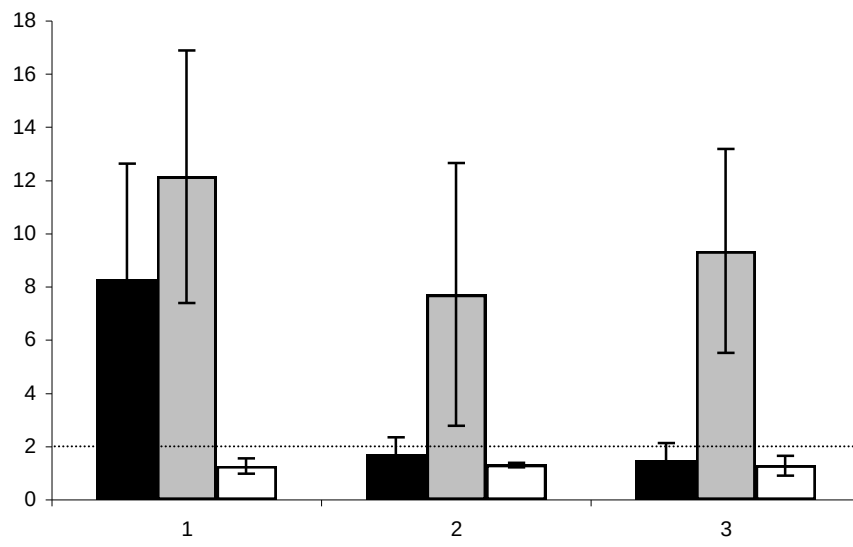


Figure 1

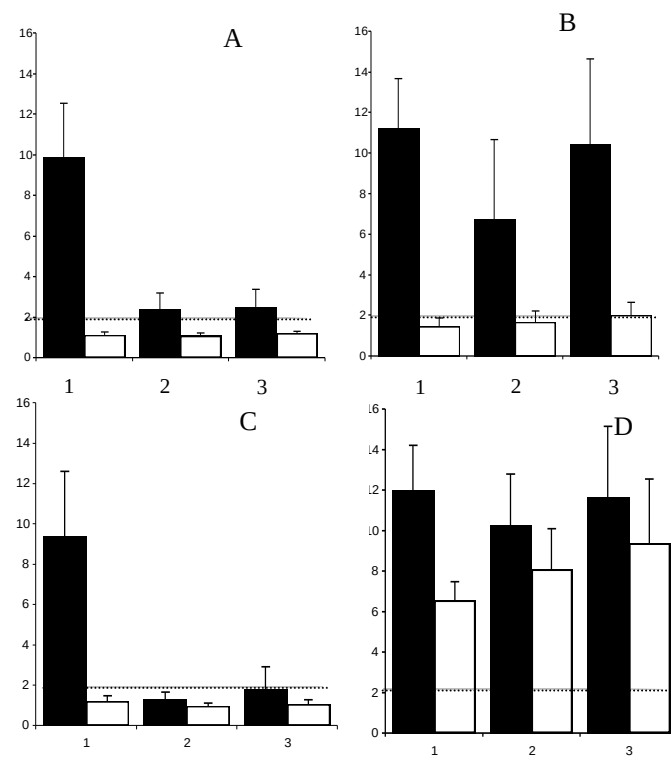


Figure 2

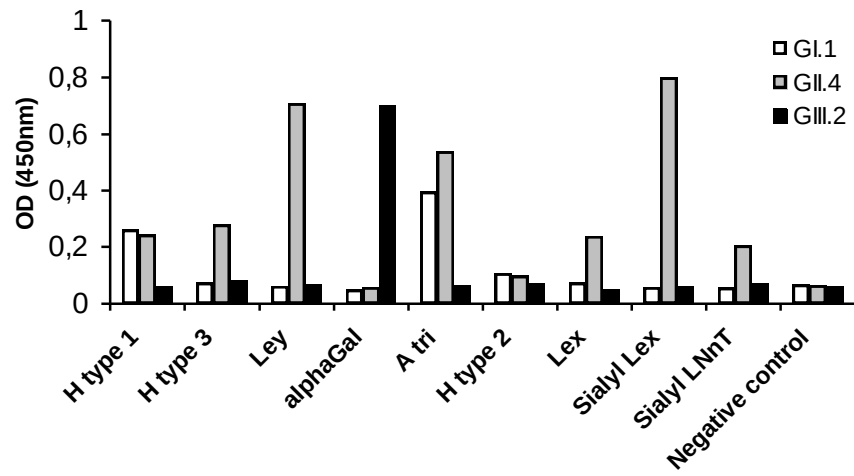


Figure 3

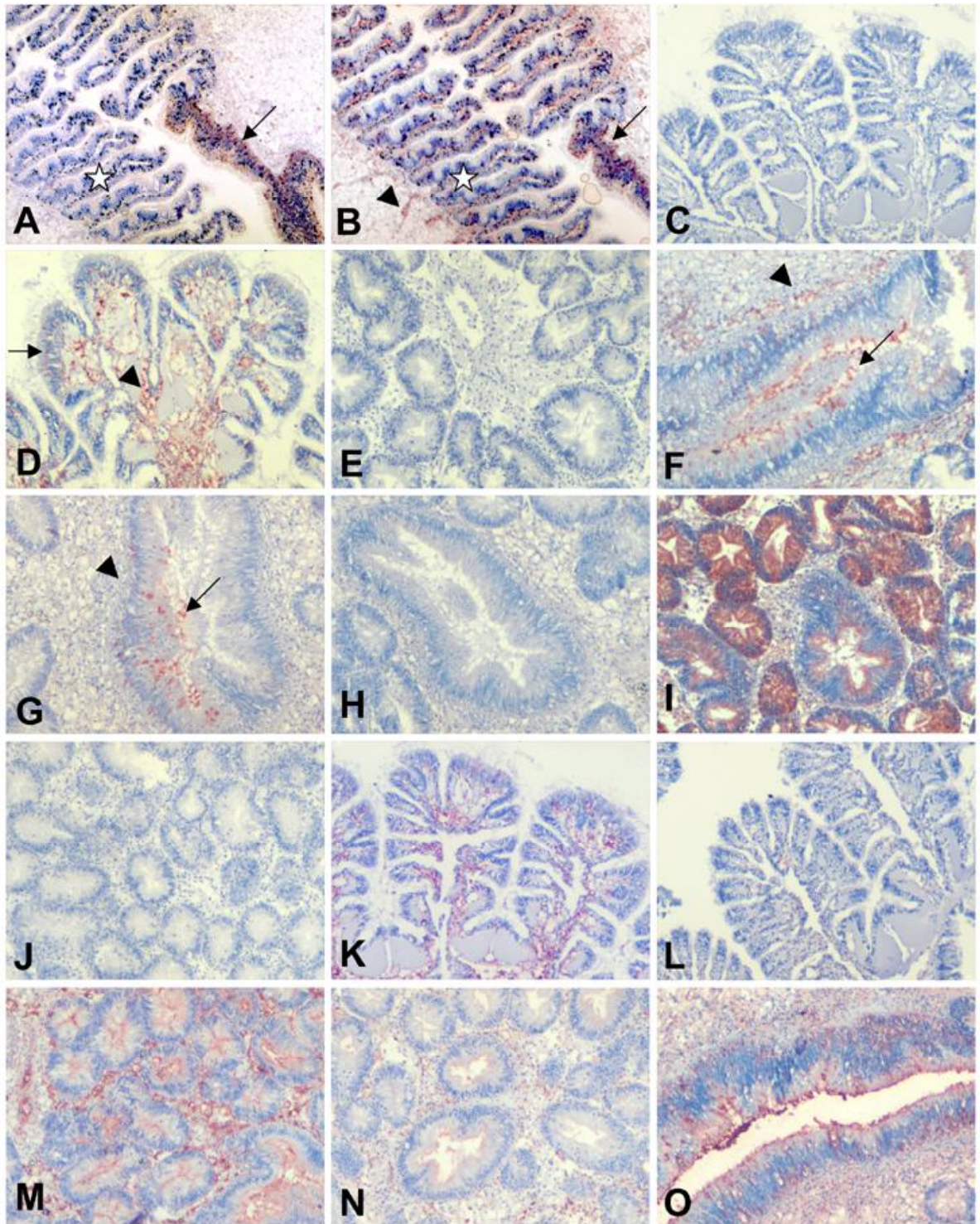


Figure 4

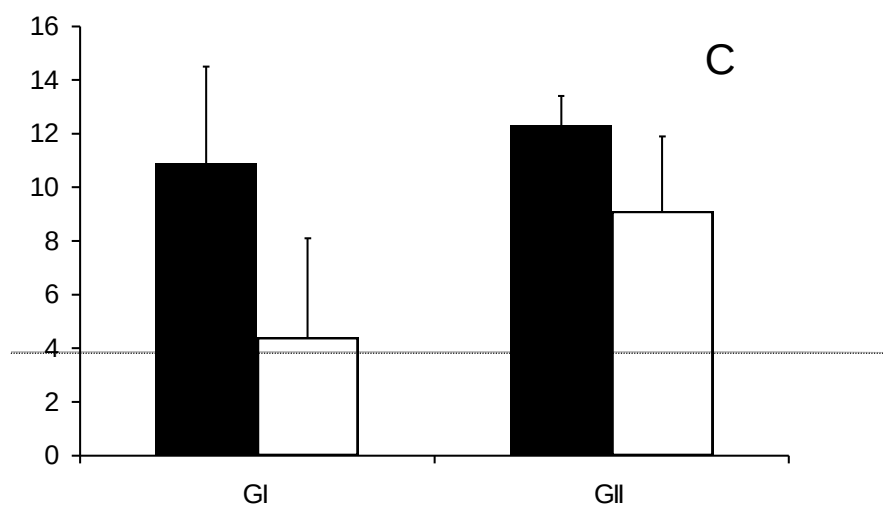
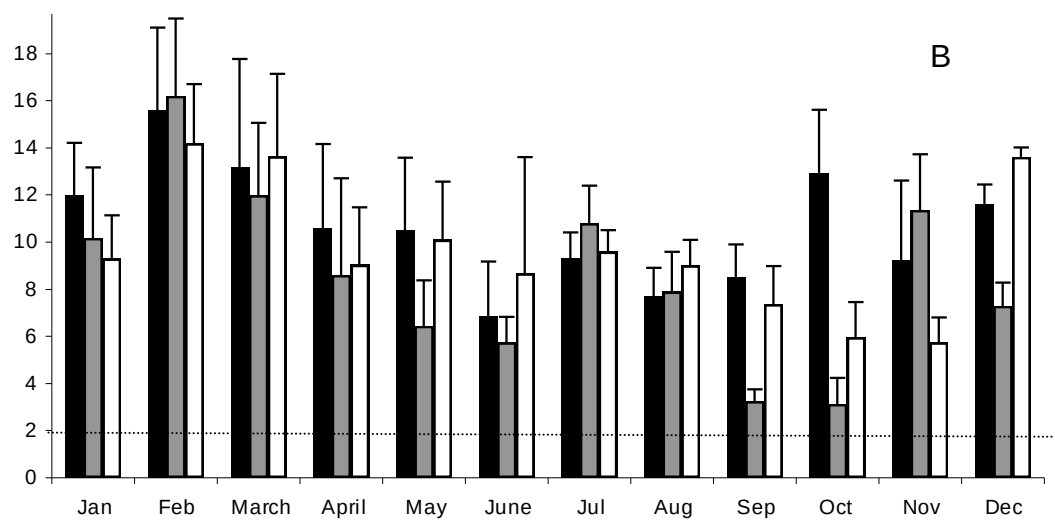
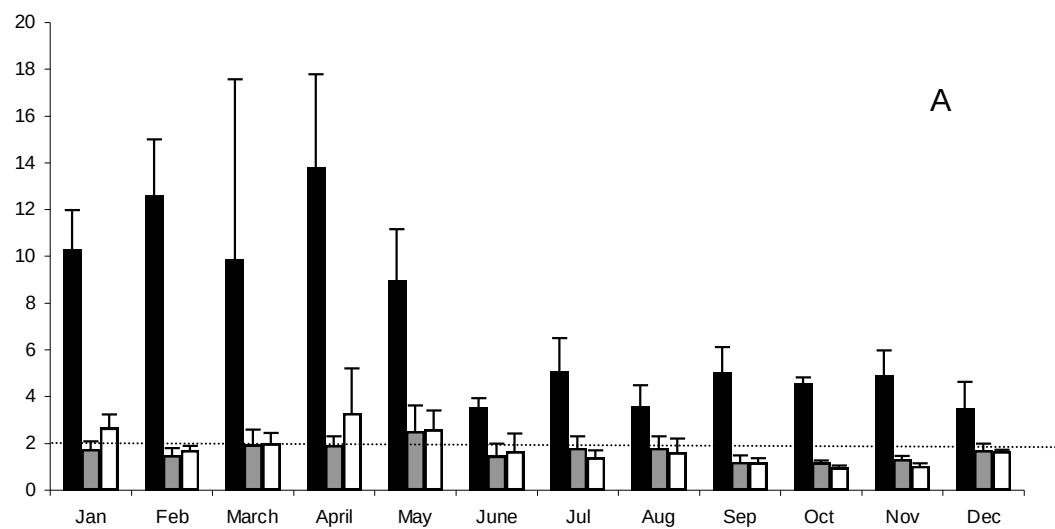


Figure 5

V. Résultats complémentaires

V.1 Matériels et méthodes

Animaux et tissus prélevés

Tubes digestifs

Le tube digestif de 4 porcs et d'un bovin ont été prélevés. Les animaux ont été euthanasiés à l'école Vétérinaire de Nantes et ne présentaient aucune lésion macroscopique sur leur tube digestif. Différentes portions du tube digestif de l'œsophage au rectum (1 cm de long) ont été prélevées et après un lavage rapide dans du PBS froid, recoupées et fixées dans 10 volumes de formol à 10% pendant 48 heures. Après inclusion en paraffine, des coupes sériées ont été réalisées sur le plateau technique d'histologie de l'IFR26 (université de Nantes) pour traitement immunohistochimique.

-9 jonctions gastroduodénales de porcs génotypés *FUT1* ont été fournies par l'équipe d'Erix Cox (Ghent, Belgique)

Salives bovines

17 salives de bovins ont été prélevées dans un élevage de vaches laitières de race française frisonne Holstein. Les salives ont été chauffées au bain marie pendant 5 minutes, centrifugées à 13 000 tours/min pendant 5 min et le surnageant récupéré.

Anticorps, et lectines

Plusieurs anticorps et des lectines de spécificité connue ont été utilisés afin de caractériser l'expression des HBGAs le long du tube digestif des animaux. Dans les tableaux suivants pour chaque anticorps et lectine, la spécificité est présentée ainsi que la dilution à laquelle ils ont été utilisés dans les différents essais (tests immunohistochimiques, ELISA, cytométrie de flux). Pour chaque anticorps ou lectine, les dilutions optimales ont été déterminées par essai sur des coupes de tissus humains ou murins dont l'expression des HBGAs était déjà connue (Tableau XIII et XIV).

Tableau XIII : Tableau des anticorps utilisés

Nom Anticorps	2A21	7W3	BG4	19OLe	MBR1	2.4Le	3E1	2.25Le	7Le
Spécificité	A tous types	A Type 3	H Type 1	H Type 2	H Type 3	Le ^y	Le ^x	Le ^b	Le ^a
Dilution	1000 ^e	10 ^e	100 ^e	1000 ^e	100 ^e	5000 ^e	100 ^e	5000 ^e	5000 ^e
Laboratoire	Diagast	Dr. J. Bara	Signet	Dr. J. Bara	Covalab	Dr. J. Bara	Dr. J. Bara	Dr. J. Bara	Dr. J. Bara

Tableau XIV : Tableau des lectines utilisées

Nom lectine	UEA-1	GS1-B4
Spécificité	Htype2, Le ^y	αGal, B
Dilution	500 ^e	20 ^e
Laboratoire	Sigma	EY

Capsides et antisérums de lapins

Les capsides GI.1 (NV) et GII.4 (Dijon 171/96) utilisées ont été produites en utilisant un système baculovirus selon la méthode précédemment décrite [37]. Les baculovirus recombinants nous ont été fournis par les Drs X. Jiang (Cincinnati, OH, USA) et E. Kohli (Dijon, France) respectivement.

Les domaines P des souches GI.1 et GII.4 ont été produits dans le système bactérien (BL21) selon la méthode de Tan [23][24]. Brièvement, la séquence codant la capside a été amplifiée par une PCR à partir de l'ADNc extrait des cellules insectes exprimant les VLPs. Cette séquence a été clonée dans le vecteur PGEX-4T1 au niveau des sites de restriction *Bam*H1 et *Not*I. Après confirmation de la séquence, l'ADN recombinant a été exprimé dans les bactéries *E. coli* BL21 à température ambiante toute la nuit avec une induction de l'IPTG 0.5 mM. La purification de la protéine recombinante est faite en utilisant la Glutathione Sepharose 4 Fast Flow (Amersham Bioscience, Piscataway, NJ) selon les instructions données par le fournisseur. La capside liée au GST est éluée par le glutathion (Sigma, France).

Notre laboratoire a produit un sérum polyclonal de lapin contre chaque capside (Lp 130 pour NV, Lp 132 pour Dijon). Ces anticorps nous ont permis de vérifier que la spécificité des domaines P pour les HBGAs ne différait pas de celle de leurs VLPs correspondantes.

Les capsides porcines GII.11 ainsi que l'anticorps monoclonal spécifique 3A10 ont été obtenues auprès du Dr. I. Mena (Centro de Investigación en Sanidad Animal, Madrid, Espagne) [387].

Immunohistologie

Les lames sont déparaffinées dans un bain de LMR pendant 10 min puis dans un second bain pendant deux minutes à température ambiante. Elles sont ensuite réhydratées par des bains successifs de 2 min à température ambiante en éthanol absolu, 90%, 70% et 50%. Après rinçage de 5 min en PBS 1X, la peroxydase endogène est bloquée par incubation des lames 20 min en PBS 1X, 0,3% eau oxygénée à température ambiante. Puis, les lames sont rincées et les sites non spécifiques sont bloqués par dépôt de 200 µl de PBS1X sérum de chèvre 5% par incubation à température ambiante de 30 minutes. Puis un anticorps primaire, une lectine ou une capside est déposé sur le tissu une nuit à 4°C.

Anticorps primaires

Les anticorps sont utilisés à la concentration indiquée dans le tableau XIII et après 3 lavages de 5 min en PBS 1X, une anti-immunoglobuline de souris biotinylée diluée au 100^e en PBS 1X BSA 1% est déposée sur la lame qui est incubée pendant 1h à température ambiante. Après 3 lavages de 5 min en PBS 1X, l'avidine couplée à la peroxidase diluée au 1000^e dans 200 µl de PBS 1X BSA 1% est déposée sur les coupes. Après 1h d'incubation, l'excédent d'anticorps est éliminé par 3 lavages et a lieu l'étape de révélation.

Capsides

Les VLPs NV (GI.1), Dijon (GII.4) et porcine (GII.11) sont déposées à une concentration de 10 µg/mL dilués dans 200 µl de tampon PBS 1X BSA 1%. Après 3 lavages de 5 min en PBS 1X, le premier anticorps, l'anticorps de lapin Lp130 ou Lp132 diluée au 1000^e dans 200 µl de PBS 1X BSA 1% est déposé sur les coupes et les lames incubées pendant 1h à température ambiante. L'anticorps anti-GII.11 est déposé au 10^e. Après 3 lavages, le second anticorps, des IgG de chèvre anti-IgG de lapin marqués à la peroxydase dilués au 1000^e ou un anti-souris biotinylé au 100^e suivi de l'avidine peroxidase au 1000^e dans 200 µl de PBS 1X BSA 1% sont déposés avant la révélation.

La révélation se fait par ajout de 200 µl de substrat 3-amino-9,6 éthylcarbozole AEC (Vector Biosys) et une incubation des lames à l'obscurité jusqu'à l'obtention d'une coloration rouge-rosé (45 min). Après 3 lavages, une contre-coloration est réalisée à l'hématoxyline de Mayer

pendant 10sec. Après rinçage des lames à l'eau distillée, celles-ci sont observées au microscope après un montage en milieu aqueux Aquatex. Au microscope, le niveau de marquage est noté qualitativement de 0 (-), 1 (+), 2 (++) ou 3 (+++) selon l'intensité de coloration.

Génotypage des porcs

Polymorphisme de FUT1

Les porcs sont génotypés en utilisant une PCR-RFLP basée sur le polymorphisme de G-A en position 307 du gène *FUT1* en se référant à l'étude d'E. Meijereink [236]. Brièvement, un fragment du gène *FUT1* est amplifié (12 min à 94°C, 34 cycles de 30 s à 94°C, 30 s à 57°C, 30 s à 72°C suivi de 4 min à 70°C pour une extension finale) en utilisant les amorces spécifiques (M307F : 5'-CTTCCTGAACGTCTATCAAGACC-3', M307R : 5'-CTTCAGCCAGGGCTCCTTTAAG-3') et coupé par l'enzyme de restriction *CfoI* donnant 3 fragments de 241, 93 et 87 pb pour le génotype FUT1M307^{G/G}, 4 fragments de 328, 241, 93 et 87 bp pour le génotype FUT1M307^{G/A} et les fragments de 328 et 93 bp pour le génotype FUT1M307^{A/A}.

Génotypage A ou O

Les porcs sont génotypés au niveau du locus *Abo* en utilisant les amorces de l'exon 7. Un fragment du gène *ABO* de 500 pb est amplifié (4 min à 94°C, 34 cycles de 30 s à 94°C, 30 s à 52°C, 30 s à 74°C suivi de 4 min à 74°C pour une extension finale) par les amorces (ABO FW : 5'-TGCTCGTCCCATAGGTACTC6-3', ABO RV : 5'-ACTACTACATCTTCACCGACC). Le génotype O/O se distingue des génotypes A/O ou A/A par l'absence de la bande à 500 pb.

V.2 Etude de l'expression des HBGAs sur les tissus digestifs de bovin et de leur reconnaissance par les norovirus humains (GI.1 et GII.4)

V.2.1 Résultats

L'étude de l'expression des antigènes tissulaires de groupe sanguin chez la vache est détaillée dans l'article numéro 1. En résumé, elle n'exprime pas les antigènes basés sur les précurseurs Type 1 et Type 3. La fixation des souches GI.1 et GII.4 a été étudiée en se référant au test d'immunohistochimie (Figure 23) et par test ELISA, 17 salives bovines phénotypées

A/H (Figure 24). La fixation des particules P GI.1 et GII.4 sur le duodénum de tissu bovin n'était pas identique. L'intensité du signal avec les particules P GII.4 était modérée par rapport à celle des VLPs GIII.2, mais toutefois elle était plus forte que celle obtenue avec les domaines P GI.1.

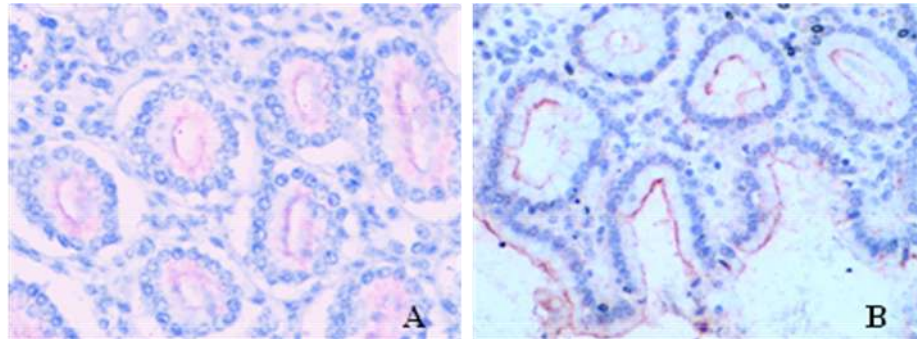


Figure 23 : Analyse de la fixation des VLPs GII.4 et GI.1 sur les tissus bovins
Fixation des souches GI.1(A) et GII.4 (B) au niveau épithélial du duodénum bovin.

Les 17 salives bovines testées ont présenté différents profils de fixation de ces deux souches, en accord avec la présence des antigènes A et H puisqu'on n'a observé aucune fixation sur les salives de type non sécréteur sauf chez un animal (#15). A noter, que le signal de fixation de ces deux souches était faible en le comparant à celui de la souche NB2.

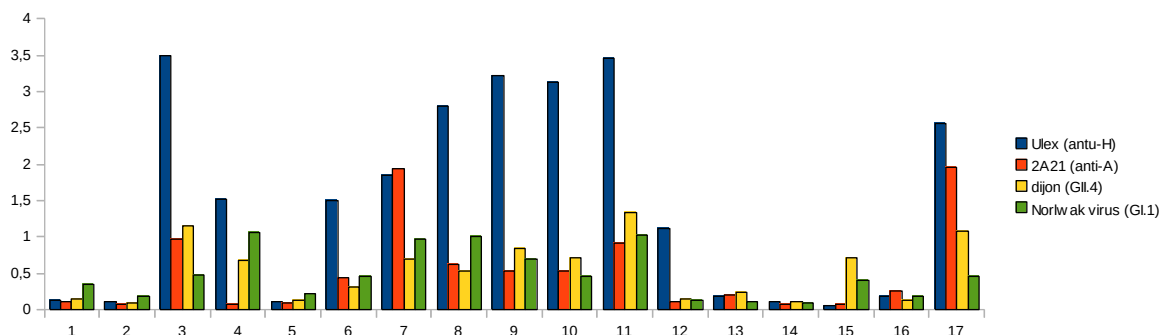


Figure 24 : Phénotypage des salives bovines et test de fixation des souches humaines GI.1 et GII.4.

Les résultats montrent que la fixation des deux souches humaines GI.1 et GII.4 est faible et telle que GIII.2 >>GII.4>GI.1. La souche Norwalk (GI.1) préfère les antigènes H Type 1, H Type 3 et Le^b qui sont absents chez la vache ce qui expliquerait la faible fixation. La souche GII.4 ne reconnaît pas l'antigène H Type 1 mais reconnaît Le^y qui est présent chez la vache, ce qui expliquerait sa fixation sur le tube digestif observée par immunohistochimie.

V.2.2 Conclusion et Discussion

Les norovirus humains de génogroupe GI ou GII reconnaissent les antigènes Type 1 et Type 2, mais s'attachent plus fortement aux structures basées sur le Type 1 [388]. Les bovins ne présentent pas les antigènes Type 1, ils expriment plutôt les antigènes A et H Type 2 ou l'antigène Le^y dans leur tube digestif, d'où l'on peut penser qu'ils seront moins sensibles à l'infection par des souches humaines de norovirus par manque de structures d'HBGAs basées sur le Type 1. Néanmoins la fixation par les souches GII.4 est possible comme l'a montré expérimentalement le groupe de L. Saif [135]. La très faible fixation de la souche GI.1 suggère que les bovins devraient être résistants à cette souche. Par ailleurs les souches de GII et de GIII sont génétiquement éloignées et en conséquence, la recombinaison inter-génogroupe, bien que récemment observés, devrait être beaucoup moins fréquentes que la recombinaison intra-génogroupe [55].

La vache ne présente pas les antigènes Type 1, et donc n'exprime pas les antigènes H Type 1 et A Type 1, pas plus que les antigènes Lewis Le^a et Le^b. Par contre elle exprime les antigènes Type 2 tels que H et A Type 2 et l' α Gal.

Ces résultats sont en accord avec l'étude faite par l'équipe de R. Julien [306] mais avec une exception de l'expression des antigènes Le^x et Le^y. Dans leurs résultats, ils montrent l'expression de ces antigènes au niveau de la bordure en brosse de l'intestin grêle et du côlon alors que mes données ne montrent ces antigènes qu'au niveau de l'appareil de Golgi. Cela peut être dû à une diversité individuelle, à la différence des anticorps utilisés pour détecter cet antigène ou à l'expression importante de l' α Gal. En effet, le tétrasaccharide Gal α 3Gal β 4(Fuc α 3)GlcNAc n'est pas bien reconnu par l'anti-Le^x [389]. En outre l' α Gal est un bon accepteur de l'enzyme α 1,3fucosyltransférase [390].

V.3 Etude de l'expression des HBGAs sur les tissus digestifs de porcs et de leur reconnaissance par les norovirus humains (GI.1 et GII.4) et par la souche porcine GII.11

V.3.1 Expression des HBGAs et fixation des VLPs GI.1 et GII.4

V.3.1.1 Résultats

Les antigènes A et H sont exprimés de façon plus ou moins forte tout le long du tube digestif. Aucune expression de l'antigène B n'est observée. Chez les individus testés, nous remarquons deux catégories de porcs, des porcs A + (2 Porcs / 4 testés) exprimant très

fortement l'antigène A tout le long de leur tube digestif, et des porcs A- (2/4) n'exprimant pas du tout l'antigène A quelque soit la partie du tube digestif étudiée. Nous pouvons noter également un niveau d'expression différent des antigènes H Type 1, H Type 2 et H Type 3 entre les porcs A+ et A-. En effet, chez les porcs phénotypés A-, quelque soit la portion du tube digestif étudiée, aucune expression de H Type 3 n'est observée et dans les parties distales du tube digestif, l'expression de H Type 1 et 2 est plus faible que celle observée pour les animaux phénotypés A+ (Tableau XV).

Tableau XV : Expression des antigènes A et H chez des porcs A- et A+ tout au long du tube digestif

	H Type 2 (UEA-1)		H Type 3		H Type 1		Le ^a		Le ^b	
	A-	A+	A-	A+	A-	A+	A-	A+	A-	A+
Œsophage	+++	+++	-	++	++	++	-	-	-	-
Estomac	+++	+++	-	++	++	++	-	-	-	-
Duodénum	+++	+++	-	++	+++	++	-	-	-	-
Jéjunum	++	+++	-	++	++	++	-	-	-	-
Côlon	+	+++	-	-	-	++	-	+++	+++	-
Caecum	+	+++	-	+	-	++	-	+++	+++	+

+++ : Fort marquage, ++ : marquage modéré, + : marquage faible, - : absence de marquage

Cette observation est surprenante dans la mesure où l'on s'attend à un masquage des épitopes H en présence de l'antigène A. Elle suggère qu'il existe un polymorphisme de l'expression de l' α 1,2fucosylation qui s'exprime de manière différentielle au long du tube digestif. Cette hypothèse est en accord avec l'expression des antigènes Le^a et Le^b. En effet celle-ci est limitée au côlon et au caecum, d'une part et d'autre part les porcs A- que nous avons testés expriment fortement l'antigène Le^a et peu d'antigène Le^b, à l'inverse des deux porcs A+. Ces derniers seraient donc de phénotype sécréteur-like pour les parties proximales et distales du tube digestif, alors que 2 porcs A- seraient sécréteur-like pour la partie proximale mais non sécréteur pour la partie distale. Ceci nous a conduit à vérifier si l'expression des antigènes H dépend du polymorphisme génétique de *FUT1* chez le porc (Tableau XVI).

Tableau XVI : Expression des HBGAs sur le duodénum des porcs génotypés *FUT1*

N° PORC	1-V901	3-V12	5-V25	2-V101	4-V093	10-V056	7-V27	8-V26	9-V936
Génotype de <i>FUT1</i> au niveau de la position 307	FUT1 ; 307AA			FUT1; 307GA			FUT1; 307GG		
H Type 2 (UEA-1)	++	+	+/-	++++	++++	++++	+++	+++	+++
H Type 2 (19OLe)	-	-	-	+++	+++	+++	+	+	+
H type 1	+/-	-	-	++	++	++	-	-/+	-/+
H Type 3	+/-	+	+/-	+++	+++	+++	+++	+++	++/-
A Type 2	-	-/+	-/+	-	-/+	++	+++	+++	++++

Ce tableau montre que l'expression de l'antigène H au niveau de la jonction gastroduodénale chez le porc est associée au polymorphisme du gène *FUT1*. L'analyse de la fixation des capsides NV (GI.1) et Dijon (GII.4) a ensuite été réalisée sur l'ensemble du tube digestif de deux porcs génotypés hétérozygotes pour *FUT1* (307GA). L'un des deux étant A+, l'autre étant A-, au niveau phénotypique et au niveau génotypique (Figure 18 et Tableau XVII).

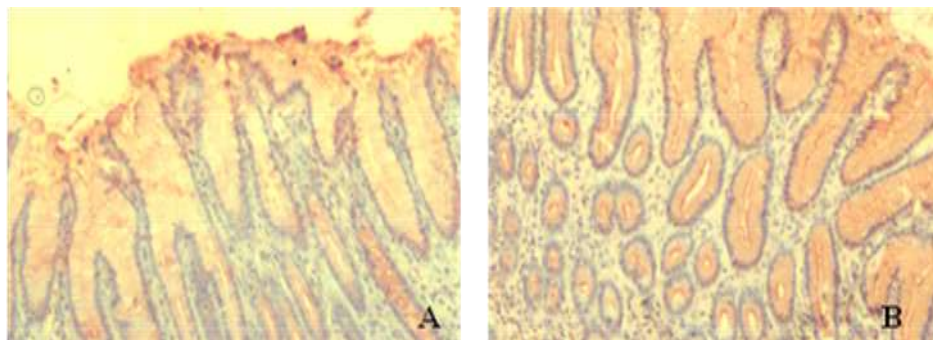


Figure 25 : Analyse de la fixation des VLPs GI.1 et GII.4 sur les tissus porcins

Fixation des souches GI.1(A) et GII.4 (B) au niveau épithélial du duodénum porc. Les deux souches montrent une nette fixation.

Tableau XVII : Fixation des souches GI.1 et GII.4 sur le tube digestif de deux porcs génétiquement différents

Fixation des VLPs	A-		A+	
	GI.1	GII.4	GI.1	GII.4
Oesophage	+	+++	++	++
Estomac	++	++	++	+++
Duodénum	++	+++	++	++
Jéjunum	+	+	++	++
Côlon	+/-	+/-	+	++
Caecum	+/-	+/-	+	++

Les VLPs GI.1 et GII.4 se fixent sur le tube digestif des deux porcs en fonction de la présence des antigènes H et A montré dans le Tableau XVI. La souche NV (GI.1) qui reconnaît les antigènes A, H Type 1 et H type 3, se fixe d'une manière parallèle à l'expression de ces antigènes tout au long du tube digestif de chacun de ces deux porcs. De même pour la souche Dijon (GII.4) qui reconnaît les antigènes H indépendamment de la présence des motifs A et B. Elle se fixe tout au long du tube digestif du porc 07E233 (A+, H type 1+, H type 2+, H type 3+) alors qu'elle se limite à la partie proximale chez le porc 07E232 qui n'exprime pas les antigènes nécessaires à cette fixation dans les régions distales du tube digestif.

Ces résultats sont en accord avec l'étude de Cheetham qui a montré nettement la relation entre l'expression de ces antigènes et la fixation des norovirus humains [122]. Puisque les deux porcs sont hétérozygotes 307 GA, cette différence au niveau de la partie distale ne peut être due au gène *FUT1*. Il se pourrait donc qu'elle soit due au gène *FUT2*. J'ai ensuite testé la fixation des souches GI.1 et GII.4 (Dijon) sur le duodénum des porcs obtenus de l'équipe d'Eric Cox et présentant des génotypes distincts pour le gène *FUT1* (Tableau XVIII).

Tableau XVIII : Fixation des souches GI.1 et GII.4 sur le tube digestif de porcs génotypés *FUT1*

N° PORC	1-V901	3-V12	5-V25	2-V101	4-V093	10-V056	7-V27	8-V26	9-V936
Génotype de <i>FUT1</i> au niveau de la position 307	FUT1 ; 307AA			FUT1; 307GA			FUT1; 307GG		
NV (GI.1)	-	-	-	+	+	+++	++	++	++
Dijon (GII.4)	-	-	+/-	-	+	+	+	+	+

Mes résultats sont identiques à ceux rapportés dans Meijerink [236] concernant la fixation de la bactérie F18 sur la muqueuse intestinale. Celle-ci est dépendante du polymorphisme *FUT1* qui contrôle la synthèse du récepteur ECF18 et nous observons que la fixation des norovirus est dépendante de *FUT1* qui contrôle l'expression des antigènes H au niveau de duodénum (Tableau XVIII). Les individus se répartissent en trois catégories dépendant du polymorphisme de *FUT1*: AA, AG ou GG, tels que les porcs présentant les deux nucléotides AA ne sont pas reconnus par les VLPs des souches NV et Dijon 171/96. A l'inverse les porcs de phénotype AG et GG sont reconnus par ces souches.

V.3.1.2 Conclusion et discussion

En accord avec ce qui avait été précédemment observé par d'autres auteurs, il existe des porcs A+ et des porcs A-. L'antigène A peut être exprimé tout au long du tube digestif, mais

nous n'avons pas observé d'expression de l'antigène B. L'expression des antigènes H est également variable comme précédemment noté par les études des équipes de L. Saif [122] et d'E. Cox [305]. Au niveau du duodénum, l'expression des antigènes H est associée à un polymorphisme de *FUT1* qui conduit à la synthèse d'une enzyme peu active [261]. Au niveau distal, il y a une expression des antigènes Le^a et Le^b associée à un polymorphisme de type sécréteur, non sécréteur qui ne dépend pas de *FUT1*. On peut donc supposer qu'il dépend de *FUT2* puisque chez le porc, *Sec1* est un pseudogène. La fixation des souches de NoVs humains chez le porc au niveau du duodénum dépend donc du polymorphisme de *FUT1*. Il est intéressant de noter que la souche NV présente une spécificité glycanique parfaitement adaptée à cette espèce puisqu'elle reconnaît préférentiellement A et H Type 1 présents chez le porc et chez l'Homme, aussi qu'H Type 3 bien exprimé chez le porc mais pas à la surface des cellules épithéliales humaines, tandis qu'elle ne reconnaît pas l'antigène B qui n'existe pas chez le porc.

V.3.2 Caractérisation du ligand de la souche porcine GII.11 : données préliminaires

V.3.2.1. Résultats

Le recours au test d'immunohistochimie a permis d'identifier une fixation des VLPs GII.11 au niveau de la jonction gastroduodénale porcine et bovine. La fixation est nette sur les cellules de la région du collet de l'estomac et de la surface du duodénum. Elle est également très forte sur des cellules non épithéliales de la lamina propria, du tissu conjonctif et du muscle lisse. Ce marquage rappelle celui que l'on a observé pour les capsides GIII.2 aussi bien chez le porc que chez la vache et semble concerner l'endothélium vasculaire des capillaires. Contrairement à ce que l'on a vu avec les capsides GIII.2, l'endothélium vasculaire des gros vaisseaux n'est pas clairement marqué. Chez l'Homme, aucun signal n'a été détecté.

Suite au traitement à l'alpha-galactosidase utilisé dans les mêmes conditions que dans le cas de la capside NB2 (GIII.2) (article 1), les VLPs GII.11 ne se fixaient plus. En outre, un traitement NaIPO4 à 1 et 10 mM a diminué l'intensité du signal de la fixation des VLPs GII.11 (Figure 26). D'autre part, le test de fixation de la capside GII.11 sur un panel d'oligosaccharides synthétiques (voire article 1), sur une série de salives bovines et humaines ainsi que sur deux salives porcines n'a permis de détecter aucun signal, ce qui indique que les capsides GII.11 reconnaissent une structure terminée par un galactose en position α qui n'est

pas exprimé chez l'Homme, mais distincte de l'antigène α Gal classique.

En outre, différents types de cellules ont été testées par cytométrie de flux, telles que les cellules PEF (cellules porcines endothéliales) et les cellules HEK (cellules humaines) transfectées par le gène *GGTA1* du rat exprimant l' α Gal à leur surface. Aucun marquage par les capsides GII.11 n'a été observé, alors qu'un fort marquage a été obtenu avec les capsides GIII.2 utilisées comme contrôle positif (résultat non montré).

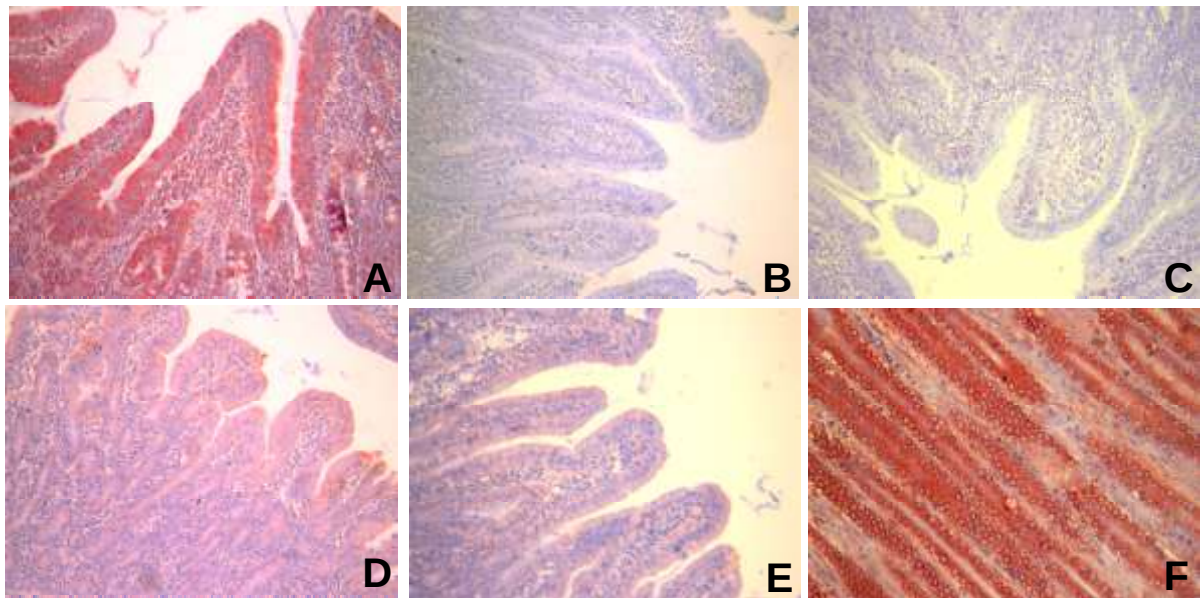


Figure 26 : Analyse de la fixation des VLPs GII.11 porcines sur les tissus porcins et bovins par immunohistologie.

A : Fixation des VLPs sur les cellules épithéliales du duodénum et l'endothélium vasculaire de la lamina propria ; **B :** contrôle négatif en absence des VLPs ; **C :** absence de fixation des VLPs après traitement par l' α -galactosidase de grain de café ; **D :** Effet du traitement par le périodate de sodium à 1 mM ; **E :** Effet du traitement par le périodate de sodium à 10 mM ; **F :** Fixation des VLPs sur l'estomac bovin.

En outre, une fixation des VLPs GII.11 a été observée sur les cellules épithéliales de la bouche et du manteau de l'huître, les branchies étaient aussi marquées positivement, le tube digestif négatif. Cette fixation a disparu suite à un traitement périodate à 1 ou 10 mM (Figure 27).

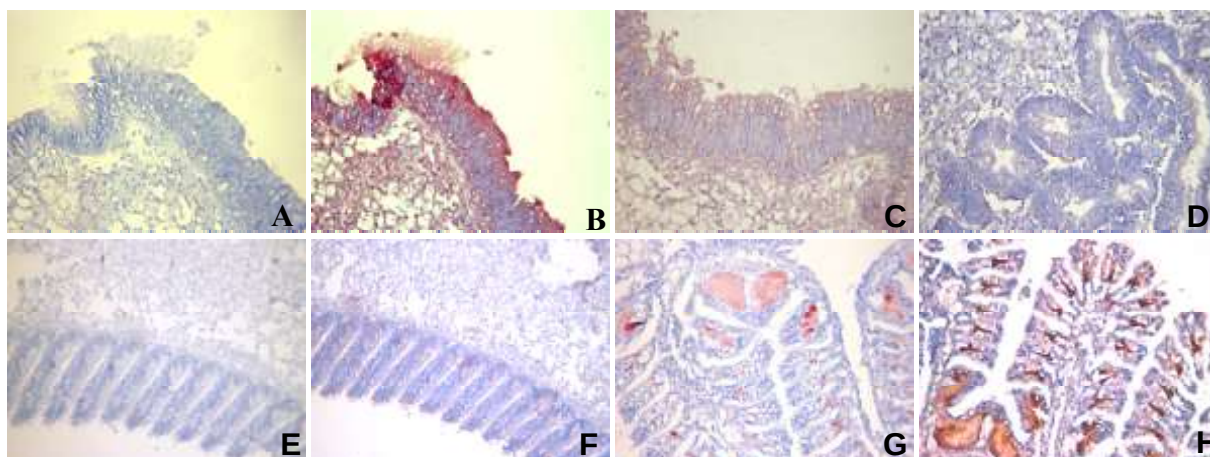


Figure 27 : Analyse de la fixation des VLPs GII.11 porcines sur les tissus d’huîtres par immunohistologie.
A : Contrôle négatif en absence des VLPs (bouche et manteau) ; **B :** Fixation des VLPs sur les cellules épithéliales de la bouche et du manteau; **C :** Effet du traitement par le périodate de sodium à 10 mM ; **D :** absence de fixation dans le tube digestif ; **E :** Contrôle négatif en absence des VLPs (palpes labiaux) **F :** Fixation des VLPs sur les palpes labiaux ; **G :** contrôle négatif en absence de VLPs (branchies) ; **H :** Fixation des VLPs sur les branchies.

V3.2.2. Conclusion et Discussion

Jusqu’à présent, on ignore la structure du ligand cellulaire de la souche porcine GII.11. En accord avec l’étude de Farkas et al. [207], nous observons que ces capsides ne se fixent pas sur la salive humaine. La jonction gastroduodénale humaine n’est pas marquée non plus par ces capsides. Toutefois, celles du porc et de la vache sont marquées d’une manière voisine de celle que l’on a observée pour les capsides GIII.2 bien que leurs salives ne sont pas reconnues. La sensibilité de ce marquage au traitement par l’ α -galactosidase suggère qu’il s’agit d’un glycanne terminé par un résidu galactose en liaison α différent du xénoantigène α Gal et qui reste donc à précisément identifier. En tout état de cause, l’absence de fixation sur les salives et tissus humains suggère que les souches GII.11 porcines ne devraient pas infecter l’Homme. Chez l’huître, on ne retrouve pas le même marquage que celui qu’on a observé dans le cas des souches GI.1, GII.4. Il est plutôt limité au niveau de la bouche et du manteau.

V.4 Comparaison des antigènes et de la fixation des différentes souches de NoVs chez l’Homme, le porc, la vache et l’huître

La présence de norovirus humains a été montrée dans les selles porcines et bovines [151]. La fixation de ces souches sur les tissus animaux est en corrélation avec l’expression

des antigènes A et H [378][304]. Suite à l'étude de l'expression des antigènes chez le porc et la vache ainsi que celle de la fixation des souches humaines on peut dresser ci-après un tableau de comparaison de l'expression des antigènes ABH chez l'Homme, la vache et le porc au niveau de l'épithélium duodénal ainsi que des gènes qui en contrôlent l'expression.

Tableau XIX : Comparaison des antigènes exprimés chez l'Homme, le porc et le bovin au niveau de la jonction gastroduodénale

Duodénum	H Type 1	H Type 2/Le ^y	H Type 3	A	B	Le ^{a/b}	αGal
Homme	+(Fut2)	+(Fut2)	-	+(ABO)	+(ABO)	+(Fut2/3)	-
Porc	+(Fut1?)	+(Fut1?)	+(Fut2?)	+(ABO)	-	-	-(EV+)
Bovin	-	+	-	+(ABO)	-	-	+

EV : endothélium vasculaire

En comparant les différents antigènes testés, on remarque que la vache ne présente pas les antigènes H Type 1; H Type 3, B, ni les antigènes Lewis. Le porc, ressemblant plus à l'Homme, présente les antigènes H et A par contre n'exprime pas les antigènes Lewis et B dans le duodénum bien que les antigènes Le^a et Le^b soient exprimés au niveau du côlon. L'Homme exprimant la majorité des antigènes du groupe sanguin a perdu l'antigène αGal, ce dernier caractérisant les mammifères non anthropoïdes.

Les différents profils d'expression de ces HBGAs permettent de comprendre les différents profils de fixation des norovirus humains et animaux.

-Les souches humaines : GI.1 et GII.4

La souche GI.1, le Norwalk virus se fixe sur les antigènes H type 1, Htype 3, A et Le^b [86] et faiblement sur H Type 2 et Le^y [205]. Les antigènes de Type 1 sont absents chez la vache d'où la faible fixation de cette souche sur les tissus bovins. Le porc présentant les deux types d'antigènes pourrait être susceptible à l'infection par de ces souches humaines.

La souche GII.4, Dijon (génotype Lordsale) se fixe sur les antigènes A, B, H Type 3 et Le^y [371]. Cette souche se fixe vraisemblablement par l'intermédiaire des antigènes Le^y et A chez le porc et chez la vache. Pour s'en assurer, une étude plus précise de l'expression de l'antigène Le^y devra être conduite chez ces espèces en utilisant des anticorps qui ne montrent

pas de réactivité croisée avec H Type 2.

-Les souches bovines: GIII.2 et GIII.3

La souche Newbury2 (GIII.2) et la souche BEC 131 (GIII.2 ou GIII.3) se fixent sur l'antigène α Gal (articles numéro 1 et 2). Cet antigène est présent sur les cellules épithéliales chez la vache, par contre uniquement sur les cellules endothéliales chez le porc et absent chez l'Homme. Il est donc probable que ces souches n'infecteront pas les Hommes ou les porcs.

-La souche porcine: GII.11

La caractérisation du ligand de cette souche reste à faire. Néanmoins les résultats préliminaires nous permettent de conclure que cette souche ne reconnaît pas l'Homme. En revanche, elle reconnaît les porcins et les bovins sans que l'on sache si cette reconnaissance est associée à l'infection. En outre, cette souche se fixe chez l'huître au niveau de la bouche et du manteau bien qu'elle ne reconnaît pas les antigènes du tube digestif.

Le tableau XX montre les possibilités de passage inter-espèces que nous pouvons déduire de cet ensemble d'observations.

Tableau XX : Comparaison de la fixation des souches GI.1, GII.4, GIII.2 et GII.11 chez les différentes espèces

Duodénum	GI.1	II.4	GIII.2	II.11
Homme	+	+	-	-
Porc	+	+	- (+)	+
Bovin	+/-	+	+	+ ?
Huître	+	+	-	+

VI. Discussions et perspectives

VI.1 La coévolution entre l'hôte et le norovirus

Le succès des norovirus est déterminé par un effet complexe entre l'évolution des souches virales et la susceptibilité/résistance de l'hôte déterminée génétiquement et acquise immunologiquement. Concernant la susceptibilité génétique, on a vu que les souches humaines présentent une variété de spécificités pour les HBGAs. Ainsi une protection par un allèle à une souche (un génotype) virale peut conférer la susceptibilité à une autre souche [357]. En d'autres termes, comme indiqué par Woolhouse, un « bon » gène conférant un phénotype résistant, peut devenir « mauvais », c'est-à-dire conférant un phénotype susceptible, dans d'autres circonstances. Ce genre de situation est le résultat typique d'une coévolution hôte pathogène telle que le prédit de la théorie. Dans le cas des norovirus, on peut faire l'hypothèse d'une coévolution avec l'Homme qui a conduit à une situation où les sous-groupes de la population sont résistants à quelques souches mais sensibles à d'autres et où les sous-groupes ne sont pas sensibles ou résistants aux mêmes souches. La population est fractionnée pour n'importe quelle souche donnée du microbe pathogène, ce qui a un coût en termes de transmission. Les souches fortement virulentes seront moins remplaçantes que des souches de virulence modérée ou basse [382]. Le résultat des polymorphismes communs aux loci *ABO*, *FUT2* et *FUT3* serait ainsi non seulement de protéger des parties de la population contre n'importe quelle souche donnée, mais également de stabiliser la virulence à un niveau modéré ou faible. Un tel système contribuerait à protéger la population bien qu'il puisse sembler médiocrement efficace au niveau individuel. Même si ce scénario est spéculatif à l'heure actuelle, il faut noter que les norovirus sont des agents pathogènes de basse virulence. Leur diversité très élevée est fortement suggestive d'une longue coévolution avec l'espèce humaine. En outre, il s'agit d'un cas unique de pathogène où chaque souche ne peut infecter qu'un génotype d'hôte défini par des polymorphismes communs de trois gènes de glycosyltransférases avec des interactions épistatiques. Il est également remarquable que les analyses des polymorphismes de *FUT2* et *ABO* indiquent que la sélection naturelle et pas uniquement les dérives génétiques a été responsable de la génération de leur diversité élevée dans les populations humaines contemporaines [391][392][393][166][394].

VI.2 Le risque zoonotique et le mélange génétique

Les HBGAs sont phylogénétiquement très anciens et peuvent donc être conservés entre espèces. Cette caractéristique pourrait contribuer à faciliter le passage inter-espèce et l'émergence de nouvelles souches par un processus adaptatif où à la suite de coïnfection par recombinaison génétique. Dans ce contexte, l'étude des ligands des souches animales de NoVs est un élément important de l'analyse du risque zoonotique.

L'infection humaine par des norovirus bovins a été suggérée suite à l'identification d'anticorps anti-GIII.2 chez des vétérinaires au Pays Bas [395]. En revanche, deux autres études [373][396] ont montré l'existence d'épitopes partagés entre souches humaines et bovines, ce qui pourrait expliquer la détection de ces anticorps anti-GIII chez l'Homme. Notre caractérisation du ligand des deux souches bovines GIII.2 et GIII.3 est en accord avec ces dernières études. En effet les souches NB2 et BEC 131 se fixent sur l'épitope Gal α 3Gal β 4GlcNAc qui est présent dans le tube digestif bovin mais absent chez l'Homme. Bien que nous ne l'ayons pas démontré formellement, l'absence du ligand de ces souches devrait interdire l'infection de l'Homme. De même l'absence du ligand des cellules épithéliales digestives porcines ainsi que des huîtres devrait limiter les risques de passage inter-espèce. La fixation des norovirus bovins sera limitée à la vache tant que ces souches n'évoluent pas et ne changeront pas de récepteur. En fait, l'antigène Gal α 3Gal β 4GlcNAc est une forme linéaire de l'antigène B sans la présence du fucose. Les deux souches de norovirus bovins n'interagissent pas avec l'antigène B, qui n'est pas exprimé chez la vache. Ces souches ne devraient donc pas subir de pression de sélection pour évoluer vers une reconnaissance de cet antigène. Il sera toutefois intéressant d'étudier le mode de reconnaissance de l'épitope α Gal au niveau moléculaire de façon à pouvoir prédire les changements structuraux qui seraient nécessaire à la reconnaissance d'antigènes comme les antigènes A et Le^y qui sont partagés entre l'Homme et la vache. Par ailleurs, nous avons remarqué que l'expression de l'épitope α Gal dans la salive bovine était très variable. Il serait donc intéressant de déterminer s'il existe un polymorphisme génétique de l'expression du gène *GGTA1* chez cette espèce. Si tel était le cas, certains bovins seraient sensibles aux NoVs et d'autres résistants à l'instar de ce qui a été observé chez l'Homme pour les souches GI et GII. La conséquence d'un tel polymorphisme pourrait être de conduire à la sélection de souches ayant acquis la capacité de reconnaître les HBGAs exprimés chez les animaux déficients en antigène α Gal. Il pourrait donc contribuer à l'élargissement du spectre d'hôte. Il est également intéressant de noter que l'antigène α Gal est synthétisé par l'intermédiaire d'un gène de la famille GT6 (*ABO*) exprimé

chez presque toutes les espèces de mammifères. Il se pourrait que la capacité de fixation à cet antigène correspondrait à celle d'un NoV ancestral qui aurait été conservé chez les souches GIII et perdue chez les autres souches à cause d'une perte d'expression de l'antigène α Gal au moins au niveau épithélial.

L'étude de fixation des souches GIII.2 et GIII.3 sur les tissus d'huître a montré une légère fixation. Ceci est en accord avec l'étude de Costantini [380] ainsi qu'à la notre identifiant des souches bovines dans l'huître. Bien que mes résultats montrent que l'huître n'exprime ni l'antigène Gal α 3Gal, ni l'antigène B, cette souche pourra se fixer d'une manière non spécifique par des liaisons ioniques ou autres. Toutefois on s'attend à ce que cette fixation non spécifique soit beaucoup moins efficace pour entraîner une contamination de l'huître.

Les souches de NoVs porcins n'ont été détectées que dans les selles porcines bien qu'elles soient classées dans le génogroupe humain GII. Les résultats antérieurs de Tibor Farkas [207] montraient que la souche GII.11 ne se fixe pas sur les salives humaines. De même, mes résultats préliminaires n'ont pas montré de fixation de cette souche sur les tissus ou sur les salives humaines bien que j'ai observé une fixation sur l'estomac et le duodénum porcin et bovin. La sensibilité à l'oxydation périodique et au traitement par l' α -galactosidase montrent que son ligand est un glycanne terminé par un résidu galactose en position α qui ne devrait pas être exprimé chez l'Homme. La seule structure glycanne comme à présent et possédant ces caractéristiques est l'antigène α Gal. Toutefois je n'ai pas pu observer de fixation de la souche GII.11 sur cet antigène. La structure du ligand de cette souche reste donc à déterminer. Néanmoins ces premiers résultats indiquent que cette souche ne devrait pas reconnaître les tissus humains et donc ne devrait pas constituer un risque zoonotique important à court terme. La co-infection de ces animaux par leurs propres souches et par des souches humaines pourrait faciliter l'émergence de souches recombinantes possédant de nouvelles caractéristiques biologiques.

Le bilan des possibilités de transmission inter-espèce et du risque zoonotique des NoVs effectué sur la base des interactions virus-glycannes peut se résumer comme l'illustre la Figure 28.

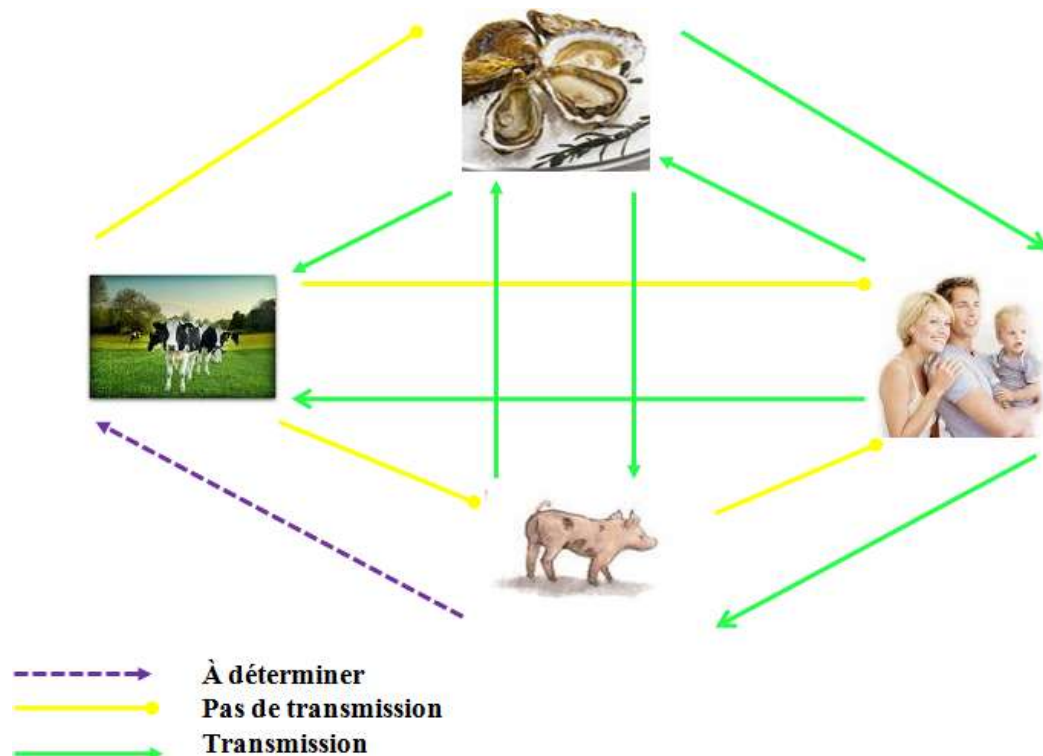


Figure 28 : Schéma de transmission inter-espèce des souches de NoVs

- 1) Certains norovirus humains se transmettent facilement aux vaches et aux porcs et peuvent être concentrés spécifiquement par les huîtres.
- 2) Les norovirus bovins n'infectent que les vaches, l'Homme et les porcs n'expriment pas le récepteur α Gal sur les cellules épithéliales digestives donc ne fixent pas les souches bovines. Il se peut que par des liaisons hydrogène ou ioniques les huîtres captent de faibles quantités de ces souches.
- 3) Les norovirus porcins, selon notre étude préliminaire peuvent se fixer sur les tissus bovins mais pas sur les tissus humains. Ils pourraient être concentrés par l'huître car ils peuvent se fixer au moins sur l'épithélium buccal.
- 4) Dans ce schéma l'Homme apparait comme le facteur de risque principal.

VI.3 Différence d'évolution de GI.1 et GII.4

Si les souches animales GIII et GII.11 ne semblent pas pouvoir infecter l'Homme, à l'inverse les souches humaines GI.1 et GII.4 peuvent reconnaître des HBGAs du porc et ou de la vache, suggérant que le passage de l'Homme vers ces espèces domestiques est possible. De

fait, l'équipe de Linda Saif a montré que les bovins et porcins peuvent être infectés par une souche GII.4 [122][135]. Nous avons également noté que le profil de fixation des HBGAs par la souche GI.1 était parfaitement adapté au porc. Par ailleurs cette souche n'évolue pas de la même façon que les souches GII.4. Il a en effet été montré que ces dernières accumulaient rapidement des mutations. Une étude récente de l'équipe de Kim Green montre que le gène de la protéine de capsid évolue à raison de 4.3×10^{-3} substitutions/site/an [397]. En revanche la souche GI.1 ne semble pas avoir évolué depuis 40 ans. En effet au cours de ma thèse j'ai obtenu la séquence complète du gène de la protéine de capsid d'une souche GI présente dans une selle humaine de 2006 d'une épidémie de gastroentérite liée à la consommation d'huîtres. Cette séquence de plus de 1500 nucléotides était identique à 100% à celle de la souche GI.1 prototype de 1968 (résultat non montré). De même une équipe suédoise a obtenu une séquence de 99.9 % identique à la souche prototype de 1968 sur 3.1 kb à partir de selles liées à une épidémie due à des moules en 2006 [398] ou à des huîtres en 2007 [399]. Ces données suggèrent que la souche GI.1 possède une source environnementale où elle ne se réplique pas ou presque pas. La capacité des huîtres à la concentrer spécifiquement et sa probable grande résistance dans l'environnement expliqueraient pourquoi elle est généralement associée à des épidémies liées à l'environnement plutôt qu'à une transmission inter-humaine. En revanche les souches de type GII.4 qui sont majoritairement impliquées dans les épidémies n'ayant pas d'origine environnementale pourraient être moins stables dans l'environnement. Il serait donc intéressant de comparer la stabilité des capsides GI.1 et GII.4 dans l'eau, en particulier dans l'eau de mer. Par ailleurs la capacité des souches GII à reconnaître des ligands sialylés exprimés dans les tissus d'huître ailleurs que sur le tube digestif pourrait contribuer à leur élimination plutôt qu'à leur rétention. Des expériences de bioaccumulation pourraient contribuer à éclaircir de point.

VI.4 Les norovirus reconnaissent-ils d'autres récepteurs?

Un virus peut présenter plusieurs types de récepteurs, l'un d'eux initie l'attachement du virus à la cellule, puis la reconnaissance d'autres récepteurs induit une série d'évènements qui conduisent à la pénétration du virus à l'intérieur de la cellule. Cette dernière n'est pas une simple fixation sur la surface cellulaire mais induit le virus attaché vers l'interaction avec un autre récepteur de la surface cellulaire nécessaire à l'internalisation. L'exemple le plus connu est celui de HIV-1. La fixation sur son récepteur initial le CD4 induit l'interaction de HIV-1 à

d'autres co-récepteurs CCR5 ou CXCR4 nécessaires pour la fusion de l'enveloppe virale et de la membrane plasmique [400]. En ce qui concerne les NoVs on ne connaît pas encore le mécanisme d'internalisation mais des ligands secondaires ont été identifiés.

-L'héparane sulfate

Tamura et al. ont montré qu'une souche GII.4 se fixe sur l'héparane sulfate, cette fixation étant nettement plus faible pour la souche GI.1. Les auteurs suggéraient que GII présente deux sites de fixations distincts. L'héparane sulfate pourrait servir à concentrer le virus à la surface cellulaire facilitant alors sa fixation sur un autre récepteur associé aux antigènes du groupe sanguin ABO [401].

-Acide Sialique (Sialyl-Le^x)

Plusieurs études ont été conduites pour chercher la fixation des VLPs de souches de NoVs humaines sur l'acide sialique. La première était celle de Mary Etes. Le traitement des érythrocytes par du périodate ou par la neuraminidase a montré que l'hémagglutination dépendait de glycanes neutres et non pas de l'acide sialique. Les VLPs utilisées correspondaient à la souche Norwalk GI.1 qui nous l'avons confirmée ne reconnaît pas de structures sialylées.

En 2006 une autre étude a montré la fixation du FCV, un calicivirus félin du genre *vésivirus*, sur un récepteur [402] comprenant un acide sialique en position $\alpha 2,6$ [403]. Récemment Taube et al. ont montré que les résidus acides sialiques de plusieurs gangliosides étaient impliqués dans la fixation du NoV murin GV (MNV) et dans l'infection de macrophages *in vitro* [404].

En collaboration avec l'équipe suédoise de G. Larsson, notre équipe a étudié la fixation des VLPs de souches humaines sur un panel d'oligosaccharides synthétiques. La première souche étudiée était le GII.3 isolé d'un patient transplanté ayant une infection chronique (Chron). Elle se fixait fortement sur le SLe^x. Ce ligand, marqueur des tissus inflammatoires, a été également identifié en tant qu'antigène associé aux tumeurs. Durant les 20 dernières années, il a été caractérisé aussi par son activité biologique en tant que ligand commun des sélectines impliquées dans la domiciliation des leucocytes. La souche GII.4 se fixait sur le même ligand. Cette nouvelle fixation est spécifique puisque ces VLPs ne se fixent pas sur des structures analogues comme le Lewis x ou le sialyl diLewis x. Cela montre que les souches GII se fixent sur deux récepteurs, l'un dépendant du gène sécréteur lié au glycanes $\alpha 1,2$ fucosylés et

l'autre lié aux structures Type 2, α 2,3 sialylée et SLe^x [359].

Ces résultats nous ont conduits à tester la possibilité que le deuxième ligand de la souche GII.4 sur les tissus d'huîtres corresponde à un motif sialylé. Nous avons observé que malgré l'absence de l'épitope SLe^x, la fixation sur les tissus autres que les cellules épithéliales digestives passaient par la reconnaissance d'un acide sialique. De plus, le même principe a été appliqué sur des cellules humaines gastriques transfectées par la ST3Gal exprimant le SLe^x sur la surface cellulaire. Des résultats préliminaires encourageants nous laissent croire que la fixation de GII.4 est en corrélation à l'expression de cet épitope. Toutefois la signification biologique de ces observations reste à déterminer. Il est en effet peu probable que la capacité de reconnaître des motifs sialylés ait été sélectionnée par des souches GII pour faciliter leur transmission via les coquillages puisque cela ne représente pour elles qu'un mode de transmission mineur. D'autre part, l'antigène SLe^x n'est pas exprimé sur l'épithélium digestif humain non pathologique et pourra donc difficilement être impliqué au premier stade de l'infection. Il restera donc à déterminer où et quand les souches GII seront susceptibles de rencontrer l'antigène SLe^x pour s'y fixer.

Références

1. Desenclos, J. et al. Principles of an outbreak investigation in public health practice. *Med Mal Infect* **37**, 77-94 (2007).
2. Neimann et al. Role of pathogenic colibacilli in gastroenteritis in infants. *Rev Med Nancy* **81**, 321-328 (1956).
3. Laplane, R. Pathogenic colibacilli in intestinal infections in children. *Acquis Med*
4. Sarinana, C. & Navarro, O. [Intestinal perforation in typhoid fever; study of 35 cases in children.]. *Bol Med Hosp Infant Mex* **7**, 178-184 (1950).
5. Gray, J. et al. Rotavirus. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr* **46 Suppl 2**, S24-31 (2008).
6. Kiulia, N.M. et al. The epidemiology of human rotavirus associated with diarrhoea in Kenyan children: a review. *J. Trop. Pediatr* **54**, 401-405 (2008).
7. Wadell, G. Molecular epidemiology of human adenoviruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol* **110**, 191-220 (1984).
8. Glass, R.I. et al. Gastroenteritis viruses: an overview. *Novartis Found. Symp* **238**, 5-19; discussion 19-25 (2001).
9. Goodgame, R.W. Viral infections of the gastrointestinal tract. *Curr Gastroenterol Rep* **1**, 292-300 (1999).
10. de Wit, M.A. et al. A comparison of gastroenteritis in a general practice-based study and a community-based study. *Epidemiol. Infect* **127**, 389-397 (2001).
11. Tompkins, D.S. et al. A study of infectious intestinal disease in England: microbiological findings in cases and controls. *Commun Dis Public Health* **2**, 108-113 (1999).
12. Koopmans, M. & Duizer, E. Foodborne viruses: an emerging problem. *Int. J. Food Microbiol* **90**, 23-41 (2004).
13. Glass, R.I. et al. The epidemiology of enteric caliciviruses from humans: a reassessment using new diagnostics. *J. Infect. Dis* **181 Suppl 2**, S254-261 (2000).
14. Lopman, B.A. et al. Human caliciviruses in Europe. *J. Clin. Virol* **24**, 137-160 (2002).
15. Chikhi-Brachet, R. et al. Virus diversity in a winter epidemic of acute diarrhea in France. *J. Clin. Microbiol* **40**, 4266-4272 (2002).
16. Kapikian, A.Z. et al. Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *J. Virol* **10**, 1075-1081 (1972).

17. Atmar, R.L. & Estes, M.K. Diagnosis of noncultivable gastroenteritis viruses, the human caliciviruses. *Clin. Microbiol. Rev* **14**, 15-37 (2001).
18. Patel, M.M., Hall, A.J., Vinjé, J. & Parashar, U.D. Noroviruses: a comprehensive review. *J. Clin. Virol* **44**, 1-8 (2009).
19. Mead, P.S. et al. Food-related illness and death in the United States. *Emerging Infect. Dis* **5**, 607-625 (1999).
20. Patel, M.M. et al. Systematic literature review of role of noroviruses in sporadic gastroenteritis. *Emerging Infect. Dis* **14**, 1224-1231 (2008).
21. Ruvoën-Clouet, N. et al. Binding of rabbit hemorrhagic disease virus to antigens of the ABH histo-blood group family. *J. Virol* **74**, 11950-11954 (2000).
22. Le Guyader, F. et al. Norwalk virus-specific binding to oyster digestive tissues. *Emerging Infect. Dis* **12**, 931-936 (2006).
23. Tan, M. et al. The P domain of norovirus capsid protein forms dimer and binds to histo-blood group antigen receptors. *J. Virol* **78**, 6233-6242 (2004).
24. Tan, M. et al. E. coli-expressed recombinant norovirus capsid proteins maintain authentic antigenicity and receptor binding capability. *J. Med. Virol* **74**, 641-649 (2004).
25. Green, K.Y. et al. Taxonomy of the caliciviruses. *J. Infect. Dis* **181 Suppl 2**, S322-330 (2000).
26. Oliver, S.L. et al. Molecular characterization of bovine enteric caliciviruses: a distinct third genogroup of noroviruses (Norwalk-like viruses) unlikely to be of risk to humans. *J. Virol* **77**, 2789-2798 (2003).
27. Farkas, T. et al. Characterization of a rhesus monkey calicivirus representing a new genus of Caliciviridae. *J. Virol* **82**, 5408-5416 (2008).
28. L'Homme, Y. et al. Genomic characterization of swine caliciviruses representing a new genus of Caliciviridae. *Virus Genes* **39**, 66-75 (2009).
29. Neill, J.D. et al. Genetic relatedness of the caliciviruses: San Miguel sea lion and vesicular exanthema of swine viruses constitute a single genotype within the Caliciviridae. *J. Virol* **69**, 4484-4488 (1995).
30. Smith, A.W. & Akers, T.G. Vesicular exanthema of swine. *J. Am. Vet. Med. Assoc* **169**, 700-703 (1976).
31. Berke, T. et al. Phylogenetic analysis of the Caliciviruses. *J. Med. Virol* **52**, 419-424 (1997).
32. Smith, A.W. et al. Host range comparisons of five serotypes of caliciviruses. *Am. J. Vet. Res* **38**, 101-105 (1977).

33. Valícek, L. et al. Electron and immunoelectron microscopy of rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV). *Arch. Virol* **112**, 271-275 (1990).
34. Gavier-Widén, D. & Mörner, T. Epidemiology and diagnosis of the European brown hare syndrome in Scandinavian countries: a review. *Rev. - Off. Int. Epizoot* **10**, 453-458 (1991).
35. Chiba, S. et al. An out-break of acute gastroenteritis due to rotavirus in an infant home. *Tohoku J. Exp. Med* **127**, 265-271 (1979).
36. Marcato, P.S. et al. Clinical and pathological features of viral haemorrhagic disease of rabbits and the European brown hare syndrome. *Rev. - Off. Int. Epizoot* **10**, 371-392 (1991).
37. Jiang, X. et al. Expression, self-assembly, and antigenicity of the Norwalk virus capsid protein. *J. Virol* **66**, 6527-6532 (1992).
38. Zheng, D. et al. Norovirus classification and proposed strain nomenclature. *Virology* **346**, 312-323 (2006).
39. Fankhauser, R.L. et al. Epidemiologic and molecular trends of "Norwalk-like viruses" associated with outbreaks of gastroenteritis in the United States. *J. Infect. Dis* **186**, 1-7 (2002).
40. Koopmans, M. et al. Molecular epidemiology of human enteric caliciviruses in The Netherlands. *J. Infect. Dis* **181 Suppl 2**, S262-269 (2000).
41. Ando, T. et al. Genetic classification of "Norwalk-like viruses. *J. Infect. Dis* **181 Suppl 2**, S336-348 (2000).
42. van der Poel, W.H.M. et al. Epidemiology of Norwalk-like virus infections in cattle in The Netherlands. *Vet. Microbiol* **92**, 297-309 (2003).
43. Sugieda, M. & Nakajima, S. Viruses detected in the caecum contents of healthy pigs representing a new genetic cluster in genogroup II of the genus "Norwalk-like viruses". *Virus Res* **87**, 165-172 (2002).
44. Hsu, C.C. et al. Molecular characterization of three novel murine noroviruses. *Virus Genes* **34**, 147-155 (2007).
45. Karst, S.M. et al. STAT1-dependent innate immunity to a Norwalk-like virus. *Science* **299**, 1575-1578 (2003).
46. Martella, V. et al. Norovirus in captive lion cub (*Panthera leo*). *Emerging Infect. Dis* **13**, 1071-1073 (2007).
47. Phan, T.G. et al. Genetic heterogeneity, evolution, and recombination in noroviruses. *J. Med. Virol* **79**, 1388-1400 (2007).
48. Wang, Q. et al. Porcine noroviruses related to human noroviruses. *Emerging Infect. Dis*

- 11**, 1874-1881 (2005).
49. Wang, Q. et al. Porcine enteric caliciviruses: genetic and antigenic relatedness to human caliciviruses, diagnosis and epidemiology. *Vaccine* **25**, 5453-5466 (2007).
 50. Vinjé, J. et al. Genetic polymorphism across regions of the three open reading frames of "Norwalk-like viruses". *Arch. Virol* **145**, 223-241 (2000).
 51. Jiang, X. et al. Design and evaluation of a primer pair that detects both Norwalk- and Sapporo-like caliciviruses by RT-PCR. *J. Virol. Methods* **83**, 145-154 (1999).
 52. Oliver, S.L. et al. A chimeric bovine enteric calicivirus: evidence for genomic recombination in genogroup III of the Norovirus genus of the Caliciviridae. *Virology* **326**, 231-239 (2004).
 53. Han, M.G. et al. Genetic recombination between two genotypes of genogroup III bovine noroviruses (BoNVs) and capsid sequence diversity among BoNVs and Nebraska-like bovine enteric caliciviruses. *J. Clin. Microbiol* **42**, 5214-5224 (2004).
 54. Bull, R.A. et al. Norovirus recombination. *J. Gen. Virol* **88**, 3347-3359 (2007).
 55. Bull, R.A. et al. Norovirus recombination in ORF1/ORF2 overlap. *Emerging Infect. Dis* **11**, 1079-1085 (2005).
 56. Worobey, M. & Holmes, E.C. Evolutionary aspects of recombination in RNA viruses. *J. Gen. Virol* **80** (Pt 10), 2535-2543 (1999).
 57. Katayama, K. et al. Phylogenetic analysis of the complete genome of 18 Norwalk-like viruses. *Virology* **299**, 225-239 (2002).
 58. Hardy, M.E. et al. Human calicivirus genogroup II capsid sequence diversity revealed by analyses of the prototype Snow Mountain agent. *Arch. Virol* **142**, 1469-1479 (1997).
 59. Bon, F. et al. Molecular epidemiology of caliciviruses detected in sporadic and outbreak cases of gastroenteritis in France from December 1998 to February 2004. *J. Clin. Microbiol* **43**, 4659-4664 (2005).
 60. Buesa, J. et al. Molecular epidemiology of caliciviruses causing outbreaks and sporadic cases of acute gastroenteritis in Spain. *J. Clin. Microbiol* **40**, 2854-2859 (2002).
 61. Vidal, R. et al. Novel recombinant norovirus causing outbreaks of gastroenteritis in Santiago, Chile. *J. Clin. Microbiol* **44**, 2271-2275 (2006).
 62. Waters, A. et al. Characterisation of a novel recombination event in the norovirus polymerase gene. *Virology* **363**, 11-14 (2007).
 63. Gallimore, C.I. et al. Chronic excretion of a norovirus in a child with cartilage hair hypoplasia (CHH). *J. Clin. Virol* **30**, 196-204 (2004).
 64. Phan, T.G. et al. Detection and genetic characterization of norovirus strains circulating

- among infants and children with acute gastroenteritis in Japan during 2004-2005. *Clin. Lab* **52**, 519-525 (2006).
65. Fukuda, S. et al. Recombinant norovirus implicated in gastroenteritis outbreaks in Hiroshima Prefecture, Japan. *J. Med. Virol* **80**, 921-928 (2008).
 66. Chaudhry, Y. et al. Caliciviruses differ in their functional requirements for eIF4F components. *J. Biol. Chem* **281**, 25315-25325 (2006).
 67. Hardy, M.E. et al. Substrate specificity of the Norwalk virus 3C-like proteinase. *Virus Res* **89**, 29-39 (2002).
 68. Belliot, G. et al. In vitro proteolytic processing of the MD145 norovirus ORF1 nonstructural polyprotein yields stable precursors and products similar to those detected in calicivirus-infected cells. *J. Virol* **77**, 10957-10974 (2003).
 69. Hardy, M.E. Norovirus protein structure and function. *FEMS Microbiol. Lett* **253**, 1-8 (2005).
 70. Glass, P. et al. Norwalk virus open reading frame 3 encodes a minor structural protein *J. Virol.* **74**, 6581-6591 (2000)
 71. Lambden, P.R. et al. A conserved sequence motif at the 5' terminus of the Southampton virus genome is characteristic of the Caliciviridae. *Virus Genes* **10**, 149-152 (1995).
 72. Scipioni, A. et al. Animal noroviruses. *Vet. J* **178**, 32-45 (2008).
 73. Deng, Y. et al. Studies of epidemiology and seroprevalence of bovine noroviruses in Germany. *J. Clin. Microbiol* **41**, 2300-2305 (2003).
 74. Lochridge, V.P. & Hardy, M.E. Snow Mountain virus genome sequence and virus-like particle assembly. *Virus Genes* **26**, 71-82 (2003).
 75. Han, M.G. et al. Self-assembly of the recombinant capsid protein of a bovine norovirus (BoNV) into virus-like particles and evaluation of cross-reactivity of BoNV with human noroviruses. *J. Clin. Microbiol* **43**, 778-785 (2005).
 76. Belliot, G. et al. Characterization of capsid genes, expressed in the baculovirus system, of three new genetically distinct strains of "Norwalk-like viruses". *J. Clin. Microbiol* **39**, 4288-4295 (2001).
 77. Prasad, B.V. et al. X-ray crystallographic structure of the Norwalk virus capsid. *Science* **286**, 287-290 (1999).
 78. Bertolotti-Ciarlet, A. Structural requirements for the assembly of Norwalk virus-like particles *J. Virol* **76**, 4044-4055 (2002).
 79. Chen, R. et al. Inter- and intragenus structural variations in caliciviruses and their functional implications. *J. Virol* **78**, 6469-6479 (2004).

80. Nilsson, M. et al. Evolution of human calicivirus RNA in vivo: accumulation of mutations in the protruding P2 domain of the capsid leads to structural changes and possibly a new phenotype. *J. Virol* **77**, 13117-13124 (2003).
81. Hutson, A.M. et al. Norovirus disease: changing epidemiology and host susceptibility factors. *Trends Microbiol* **12**, 279-287 (2004).
82. Rzezutka, A. & Cook, N. Survival of human enteric viruses in the environment and food. *FEMS Microbiol. Rev* **28**, 441-453 (2004).
83. Duizer, E. et al. Inactivation of caliciviruses. *Appl. Environ. Microbiol* **70**, 4538-4543 (2004).
84. Belliot, G. et al. Use of murine norovirus as a surrogate to evaluate resistance of human norovirus to disinfectants. *Appl. Environ. Microbiol* **74**, 3315-3318 (2008).
85. Wobus, C.E. et al. Replication of Norovirus in cell culture reveals a tropism for dendritic cells and macrophages. *PLoS Biol* **2**, e432 (2004).
86. Marionneau, S. et al. Norwalk virus binds to histo-blood group antigens present on gastroduodenal epithelial cells of secretor individuals. *Gastroenterology* **122**, 1967-1977 (2002).
87. Harrington, P.R. et al. Binding of Norwalk virus-like particles to ABH histo-blood group antigens is blocked by antisera from infected human volunteers or experimentally vaccinated mice. *J. Virol* **76**, 12335-12343 (2002).
88. Tan, M. et al. Mutations within the P2 domain of norovirus capsid affect binding to human histo-blood group antigens: evidence for a binding pocket. *J. Virol* **77**, 12562-12571 (2003).
89. Daughenbaugh, K.F. et al. The genome-linked protein VPg of the Norwalk virus binds eIF3, suggesting its role in translation initiation complex recruitment. *EMBO J* **22**, 2852-2859 (2003).
90. Daughenbaugh, K.F. et al. VPg of murine norovirus binds translation initiation factors in infected cells. *Virol. J* **3**, 33 (2006).
91. Someya, Y. et al. Characterization of the norovirus 3C-like protease. *Virus Res* **110**, 91-97 (2005).
92. Katayama, K. et al. Investigation of norovirus replication in a human cell line. *Arch. Virol* **151**, 1291-1308 (2006).
93. Parera, M. et al. Lack of evidence for protease evolution in HIV-1-infected patients after 2 years of successful highly active antiretroviral therapy. *J. Infect. Dis* **189**, 1444-1451 (2004).
94. Asanaka, M. et al. Replication and packaging of Norwalk virus RNA in cultured mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **102**, 10327-10332 (2005).

95. Hedlund, K.O. et al. Epidemiology of calicivirus infections in Sweden, 1994-1998. *J. Infect. Dis* **181 Suppl 2**, S275-280 (2000).
96. Kageyama, T. et al. Coexistence of multiple genotypes, including newly identified genotypes, in outbreaks of gastroenteritis due to Norovirus in Japan. *J. Clin. Microbiol* **42**, 2988-2995 (2004).
97. Atmar, R.L. & Estes, M.K. The epidemiologic and clinical importance of norovirus infection. *Gastroenterol. Clin. North Am* **35**, 275-290, viii (2006).
98. Rockx, B. et al. Natural history of human calicivirus infection: a prospective cohort study. *Clin. Infect. Dis* **35**, 246-253 (2002).
99. Estes, M.K. et al. Noroviruses everywhere: has something changed? *Curr. Opin. Infect. Dis* **19**, 467-474 (2006).
100. Ito, S. et al. Norovirus-associated encephalopathy. *Pediatr. Infect. Dis. J* **25**, 651-652 (2006).
101. Lopman, B.A. et al. A summertime peak of "winter vomiting disease": surveillance of noroviruses in England and Wales, 1995 to 2002. *BMC Public Health* **3**, 13 (2003).
102. Much, P. et al. Food borne infectious outbreaks, Austria 2005. *Wien. Klin. Wochenschr* **119**, 150-157 (2007).
103. Kaufman, J.A. et al. Gastric mass. *MedGenMed* **7**, 22 (2005).
104. Westhoff, T.H. et al. Chronic norovirus infection in renal transplant recipients. *Nephrol. Dial. Transplant* **24**, 1051-1053 (2009).
105. Caul, E.O. Viral gastroenteritis: small round structured viruses, caliciviruses and astroviruses. Part I. The clinical and diagnostic perspective. *J. Clin. Pathol* **49**, 874-880 (1996).
106. Dolin, R. et al. Detection and localization of viruses in human fetal intestinal organ cultures by immunofluorescence. *Infect. Immun* **6**, 958-964 (1972).
107. Schreiber, D.S. et al. The mucosal lesion of the proximal small intestine in acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *N. Engl. J. Med* **288**, 1318-1323 (1973).
108. Agus, S.G. et al. Acute infectious nonbacterial gastroenteritis: intestinal histopathology. Histologic and enzymatic alterations during illness produced by the Norwalk agent in man. *Ann. Intern. Med* **79**, 18-25 (1973).
109. Troeger, H. et al. Structural and functional changes of the duodenum in human norovirus infection. *Gut* **58**, 1070-1077 (2009).
110. Dastjerdi, A.M. et al. The bovine Newbury agent-2 is genetically more closely related to human SRSVs than to animal caliciviruses. *Virology* **254**, 1-5 (1999).

111. Günther, H. et al. Diarrhea in young calves. 6. Determination of the pathogenicity of a bovine coronavirus and an unidentified icosahedral virus. *Arch Exp Veterinarmed* **38**, 781-792 (1984).
112. Han, M. et al. Immune responses to bovine norovirus-like particles with various adjuvants and analysis of protection in gnotobiotic calves *Vaccine* **24**, 317-326 (2006).
113. Bergmann, H. & Schirrmeier, H. Virus infections of cattle, their diagnosis and prevention in East Germany. *Arch Exp Veterinarmed* **39**, 653-662 (1985).
114. Woode, G.N. & Bridger, J.C. Isolation of small viruses resembling astroviruses and caliciviruses from acute enteritis of calves. *J. Med. Microbiol* **11**, 441-452 (1978).
115. Günther, H. & Otto, P. Diarrhea in young calves. 7. "Zackenvirus" (Jena agent 117/80) a new diarrhea pathogen in calves. *Arch Exp Veterinarmed* **41**, 934-938 (1987).
116. Sugieda, M. et al. Detection of Norwalk-like virus genes in the caecum contents of pigs. *Arch. Virol* **143**, 1215-1221 (1998).
117. van Der Poel, W.H. et al. Norwalk-like calicivirus genes in farm animals. *Emerging Infect. Dis* **6**, 36-41 (2000).
118. Martella, V. et al. Detection and molecular characterization of a canine norovirus. *Emerging Infect. Dis* **14**, 1306-1308 (2008).
119. Reuter, G. et al. Enteric caliciviruses in domestic pigs in Hungary. *Arch. Virol* **152**, 611-614 (2007).
120. Martínez, M.A. et al. Molecular detection of porcine enteric caliciviruses in Venezuelan farms. *Vet. Microbiol* **116**, 77-84 (2006).
121. Wang, Q. et al. Prevalence of noroviruses and sapoviruses in swine of various ages determined by reverse transcription-PCR and microwell hybridization assays. *J. Clin. Microbiol* **44**, 2057-2062 (2006).
122. Cheetham, S. et al. Pathogenesis of a genogroup II human norovirus in gnotobiotic pigs. *J. Virol* **80**, 10372-10381 (2006).
123. Ward, J.M. et al. Pathology of immunodeficient mice with naturally occurring murine norovirus infection. *Toxicol Pathol* **34**, 708-715 (2006).
124. Mumphrey, S.M. et al. Murine norovirus 1 infection is associated with histopathological changes in immunocompetent hosts, but clinical disease is prevented by STAT1-dependent interferon responses. *J. Virol* **81**, 3251-3263 (2007).
125. Hsu, C.C. et al. Persistent infection with and serologic cross-reactivity of three novel murine noroviruses. *Comp. Med* **56**, 247-251 (2006).
126. Wyatt, R.G. et al. In vitro cultivation in human fetal intestinal organ culture of a

- reovirus-like agent associated with nonbacterial gastroenteritis in infants and children. *J. Infect. Dis* **130**, 523-528 (1974).
127. Johnson, P.C. et al. Multiple-challenge study of host susceptibility to Norwalk gastroenteritis in US adults. *J. Infect. Dis* **161**, 18-21 (1990).
 128. Parrino, T.A. et al. Clinical immunity in acute gastroenteritis caused by Norwalk agent. *N. Engl. J. Med* **297**, 86-89 (1977).
 129. Matsui, S.M. & Greenberg, H.B. Immunity to calicivirus infection. *J. Infect. Dis* **181 Suppl 2**, S331-335 (2000).
 130. Graham, D.Y. et al. Norwalk virus infection of volunteers: new insights based on improved assays. *J. Infect. Dis* **170**, 34-43 (1994).
 131. Lindesmith, L. et al. Human susceptibility and resistance to Norwalk virus infection. *Nat. Med* **9**, 548-553 (2003).
 132. Lindesmith, L. et al. Cellular and humoral immunity following Snow Mountain virus challenge. *J. Virol* **79**, 2900-2909 (2005).
 133. Bridger, J.C. et al. Characterization of a calici-like virus (Newbury agent) found in association with astrovirus in bovine diarrhea. *Infect. Immun* **43**, 133-138 (1984).
 134. Mauroy, A. et al. Epidemiological study of bovine norovirus infection by RT-PCR and a VLP-based antibody ELISA. *Vet. Microbiol* **137**, 243-251 (2009).
 135. Souza, M. et al. Pathogenesis and immune responses in gnotobiotic calves after infection with the genogroup II.4 (HS66) strain of human norovirus. *J. Virol*, **82**, 1777-1786 (2008).
 136. Koopmans, M. Outbreaks of viral gastroenteritis, in particular due to the Norwalk virus: an underestimated problem. *Ned Tijdschr Geneesk* **146**, 2401-2404 (2002).
 137. Lopman, B.A. et al. Viral gastroenteritis outbreaks in Europe, 1995-2000. *Emerging Infect. Dis* **9**, 90-96 (2003).
 138. Inouye, S. et al. Surveillance of viral gastroenteritis in Japan: pediatric cases and outbreak incidents. *J. Infect. Dis* **181 Suppl 2**, S270-274 (2000).
 139. Widdowson, M. et al. Probable transmission of norovirus on an airplane. *JAMA* **293**, 1859-1860 (2005).
 140. Buesa, J. et al. Sequential evolution of genotype GII.4 norovirus variants causing gastroenteritis outbreaks from 2001 to 2006 in Eastern Spain. *J. Med. Virol* **80**, 1288-1295 (2008).
 141. Ike, A.C. et al. Molecular epidemiology of norovirus in outbreaks of gastroenteritis in southwest Germany from 2001 to 2004. *J. Clin. Microbiol* **44**, 1262-1267 (2006).
 142. Reuter, G. et al. Genetic drift of norovirus genotype GII-4 in seven consecutive epidemic

- seasons in Hungary. *J. Clin. Virol* **42**, 135-140 (2008).
143. van Duynhoven, Y. et al. A one-year intensified study of outbreaks of gastroenteritis in The Netherlands. *Epidemiol. Infect* **133**, 9-21 (2005).
 144. Svraka, S. et al. Etiological role of viruses in outbreaks of acute gastroenteritis in The Netherlands from 1994 through 2005. *J. Clin. Microbiol* **45**, 1389-1394 (2007).
 145. Lopman, B. et al. Increase in viral gastroenteritis outbreaks in Europe and epidemic spread of new norovirus variant. *Lancet* **363**, 682-688 (2004).
 146. Vinjé, J. et al. International collaborative study to compare reverse transcriptase PCR assays for detection and genotyping of noroviruses. *J. Clin. Microbiol* **41**, 1423-1433 (2003).
 147. Bull, R.A. et al. Emergence of a new norovirus genotype II.4 variant associated with global outbreaks of gastroenteritis. *J. Clin. Microbiol* **44**, 327-333 (2006).
 148. Lindesmith, L.C. et al. Mechanisms of GII.4 norovirus persistence in human populations. *PLoS Med* **5**, e31 (2008).
 149. Nordgren, J. et al. Novel light-upon-extension real-time PCR assays for detection and quantification of genogroup I and II noroviruses in clinical specimens. *J. Clin. Microbiol* **46**, 164-170 (2008).
 150. König, M. et al. Noroviruses and sapoviruses in man and farm animals. *DTW. Dtsch. Tierarztl. Wochenschr* **111**, 335-338 (2004).
 151. Mattison, K. et al. Human noroviruses in swine and cattle. *Emerging Infect. Dis* **13**, 1184-1188 (2007).
 152. Wolf, S. et al. Molecular detection of norovirus in sheep and pigs in New Zealand farms. *Vet. Microbiol* **133**, 184-189 (2009).
 153. Vinjé, J. et al. The incidence and genetic variability of small round-structured viruses in outbreaks of gastroenteritis in The Netherlands. *J. Infect. Dis* **176**, 1374-1378 (1997).
 154. Widdowson, M. et al. An outbreak of diarrhea in a neonatal medium care unit caused by a novel strain of rotavirus: investigation using both epidemiologic and microbiological methods. *Infect Control Hosp Epidemiol* **23**, 665-670 (2002).
 155. Medici, M.C. et al. Molecular epidemiology of norovirus infections in sporadic cases of viral gastroenteritis among children in Northern Italy. *J. Med. Virol* **78**, 1486-1492 (2006).
 156. Kroneman, A. et al. Increase in norovirus activity reported in Europe. *Euro Surveill* **11**, E061214.1 (2006).
 157. Okada, M. et al. Genetic analysis of noroviruses associated with fatalities in healthcare facilities. *Arch. Virol* **151**, 1635-1641 (2006).

158. Siebenga, J.J. et al. Epochal evolution of GGII.4 norovirus capsid proteins from 1995 to 2006. *J. Virol* **81**, 9932-9941 (2007).
159. Teunis, P. et al. Norwalk virus: how infectious is it? *J. Med. Virol* **80**, 1468-1476 (2008).
160. Kapikian, A.Z. The discovery of the 27-nm Norwalk virus: an historic perspective. *J. Infect. Dis* **181 Suppl 2**, S295-302 (2000).
161. Atmar, R.L. et al. Detection of Norwalk virus and hepatitis A virus in shellfish tissues with the PCR. *Appl. Environ. Microbiol* **61**, 3014-3018 (1995).
162. Koopmans, M. et al. Early identification of common-source foodborne virus outbreaks in Europe. *Emerging Infect. Dis* **9**, 1136-1142 (2003).
163. Marshall, J.A. et al. High level excretion of Norwalk-like virus following resolution of clinical illness. *Pathology* **33**, 50-52 (2001).
164. Höhne, M. & Schreier, E. Detection and characterization of norovirus outbreaks in Germany: application of a one-tube RT-PCR using a fluorogenic real-time detection system. *J. Med. Virol* **72**, 312-319 (2004).
165. Laverick, M.A. et al. Quantitative RT-PCR for the enumeration of noroviruses (Norwalk-like viruses) in water and sewage. *Lett. Appl. Microbiol* **39**, 127-136 (2004).
166. da Silva, A.K. et al. Norovirus removal and particle association in a waste stabilization pond. *Environ. Sci. Technol* **42**, 9151-9157 (2008).
167. Beuret, C. et al. Norwalk-like virus sequences detected by reverse transcription-polymerase chain reaction in mineral waters imported into or bottled in Switzerland. *J. Food Prot* **63**, 1576-1582 (2000).
168. Lamothe, G.T. et al. Reverse transcription-PCR analysis of bottled and natural mineral waters for the presence of noroviruses. *Appl. Environ. Microbiol* **69**, 6541-6549 (2003).
169. Haramoto, E. et al. Detection of noroviruses in tap water in Japan by means of a new method for concentrating enteric viruses in large volumes of freshwater. *Appl. Environ. Microbiol* **70**, 2154-2160 (2004).
170. Brugha, R. et al. A community outbreak of food-borne small round-structured virus gastroenteritis caused by a contaminated water supply. *Epidemiol. Infect* **122**, 145-154 (1999).
171. Lodder, W.J. et al. Molecular detection of Norwalk-like caliciviruses in sewage. *Appl. Environ. Microbiol* **65**, 5624-5627 (1999).
172. Loisy, F. et al. An improved method for the detection of Norwalk-like caliciviruses in environmental samples. *Lett. Appl. Microbiol* **31**, 411-415 (2000).
173. Nygård, K. et al. Emerging genotype (GGIIB) of norovirus in drinking water, Sweden. *Emerging Infect. Dis* **9**, 1548-1552 (2003).

174. Borchardt, M.A. et al. Incidence of enteric viruses in groundwater from household wells in Wisconsin. *Appl. Environ. Microbiol* **69**, 1172-1180 (2003).
175. Fout, G.S. et al. A multiplex reverse transcription-PCR method for detection of human enteric viruses in groundwater. *Appl. Environ. Microbiol* **69**, 3158-3164 (2003).
176. Schvoerer, E. et al. PCR detection of human enteric viruses in bathing areas, waste waters and human stools in Southwestern France. *Res. Microbiol* **151**, 693-701 (2000).
177. Hoebe, C. et al. Norovirus outbreak among primary schoolchildren who had played in a recreational water fountain. *J. Infect. Dis* **189**, 699-705 (2004).
178. Gaulin, C.D. et al. Epidemic of gastroenteritis of viral origin associated with eating imported raspberries. *Can J Public Health* **90**, 37-40 (1999).
179. Ponka, A. et al. Outbreak of calicivirus gastroenteritis associated with eating frozen raspberries. *Euro Surveill* **4**, 66-69 (1999).
180. Rippey, S.R. Infectious diseases associated with molluscan shellfish consumption. *Clin. Microbiol. Rev* **7**, 419-425 (1994).
181. Lees, D.N. et al. Detection of small round structured viruses in shellfish by reverse transcription-PCR. *Appl. Environ. Microbiol* **61**, 4418-4424 (1995).
182. Green, J. et al. A nested reverse transcriptase PCR assay for detection of small round-structured viruses in environmentally contaminated molluscan shellfish. *Appl. Environ. Microbiol* **64**, 858-863 (1998).
183. Le Guyader, F. et al. Three-year study to assess human enteric viruses in shellfish. *Appl. Environ. Microbiol* **66**, 3241-3248 (2000).
184. Cheng, P. et al. Norovirus contamination found in oysters worldwide. *J. Med. Virol* **76**, 593-597 (2005).
185. Dowell, S.F. et al. A multistate outbreak of oyster-associated gastroenteritis: implications for interstate tracing of contaminated shellfish. *J. Infect. Dis* **171**, 1497-1503 (1995).
186. Le Guyader, F.S. et al. A semiquantitative approach to estimate Norwalk-like virus contamination of oysters implicated in an outbreak. *Int. J. Food Microbiol* **87**, 107-112 (2003).
187. Grohmann, G.S. et al. Oyster-associated gastroenteritis in Australia: the detection of Norwalk virus and its antibody by immune electron microscopy and radioimmunoassay. *J. Med. Virol* **6**, 11-19 (1980).
188. Sugieda, M. et al. Outbreaks of Norwalk-like virus-associated gastroenteritis traced to shellfish: coexistence of two genotypes in one specimen. *Epidemiol. Infect* **116**, 339-346 (1996).

189. Miossec, L. et al. Magnitude of rainfall on viral contamination of the marine environment during gastroenteritis epidemics in human coastal population. *Rev Epidemiol Sante Publique* **48 Suppl 2**, 2S62-71 (2000).
190. Cheesbrough, J.S. et al. Widespread environmental contamination with Norwalk-like viruses (NLV) detected in a prolonged hotel outbreak of gastroenteritis. *Epidemiol. Infect* **125**, 93-98 (2000).
191. Hsu, C.C. et al. Development of a microsphere-based serologic multiplexed fluorescent immunoassay and a reverse transcriptase PCR assay to detect murine norovirus 1 infection in mice. *Clin. Diagn. Lab. Immunol* **12**, 1145-1151 (2005).
192. Sawyer, L.A. et al. 25- to 30-nm virus particle associated with a hospital outbreak of acute gastroenteritis with evidence for airborne transmission. *Am. J. Epidemiol* **127**, 1261-1271 (1988).
193. Verhoef, L. et al. Import of norovirus infections in the Netherlands and Ireland following pilgrimages to Lourdes, 2008-preliminary report. *Euro Surveill* **13**, pii: 19025 (2008).
194. Neri, A.J., Cramer, E.H., Vaughan, G.H., Vinjé, J. & Mainzer, H.M. Passenger behaviors during norovirus outbreaks on cruise ships. *J Travel Med* **15**, 172-176 (2008).
195. Cáceres, V.M. et al. A viral gastroenteritis outbreak associated with person-to-person spread among hospital staff. *Infect Control Hosp Epidemiol* **19**, 162-167 (1998).
196. Honish, L. et al. Outbreak of norovirus gastroenteritis at a university student residence--Edmonton, Alberta, 2006. *Can. Commun. Dis. Rep* **34**, 1-7 (2008).
197. Monica, B. et al. Human caliciviruses in symptomatic and asymptomatic infections in children in Vellore, South India. *J. Med. Virol* **79**, 544-551 (2007).
198. Roderick, P. et al. A pilot study of infectious intestinal disease in England. *Epidemiol. Infect* **114**, 277-288 (1995).
199. Smiley, J.R. et al. Reverse transcription-PCR assays for detection of bovine enteric caliciviruses (BEC) and analysis of the genetic relationships among BEC and human caliciviruses. *J. Clin. Microbiol* **41**, 3089-3099 (2003).
200. Milnes, A.S. et al. Retrospective study of noroviruses in samples of diarrhoea from cattle, using the Veterinary Laboratories Agency's Farmfile database. *Vet. Rec* **160**, 326-330 (2007).
201. Park, S. et al. Molecular epidemiology of bovine noroviruses in South Korea. *Vet. Microbiol* **124**, 125-133 (2007).
202. Wolf, S. et al. Sensitive multiplex real-time reverse transcription-PCR assay for the detection of human and animal noroviruses in clinical and environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol* **73**, 5464-5470 (2007).
203. Alcalá, A.C. et al. Molecular identification of bovine enteric caliciviruses in Venezuela. *Acta Cient. Venez* **54**, 148-152 (2003).

204. Wang, Q. et al. Development of a new microwell hybridization assay and an internal control RNA for the detection of porcine noroviruses and sapoviruses by reverse transcription-PCR. *J. Virol. Methods* **132**, 135-145 (2006).
205. Mauroy, A. et al. Noroviruses and sapoviruses in pigs in Belgium. *Arch. Virol* **153**, 1927-1931 (2008).
206. Keum, H. et al. Porcine noroviruses and sapoviruses on Korean swine farms. *Arch. Virol* **154**, 1765-1774 (2009).
207. Farkas, T. et al. Seroprevalence of noroviruses in swine. *J. Clin. Microbiol* **43**, 657-661 (2005).
208. Ohtsubo, K. & Marth, J.D. Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease. *Cell* **126**, 855-867 (2006).
209. Smolarek, D. et al. Molecular background of the ABO blood group system. *Postepy Hig Med Dosw* **62**, 4-17 (2008).
210. Green, C. The ABO, Lewis and related blood group antigens; a review of structure and biosynthesis. *FEMS Microbiol Immunol* **1**, 321-330 (1989).
211. Ravn, V. & Dabelsteen, E. Tissue distribution of histo-blood group antigens. *APMIS* **108**, 1-28 (2000).
212. Kannagi, R. et al. Hybrid type glycolipids (lacto-ganglio series) with a novel branched structure. Their presence in undifferentiated murine leukemia cells and their dependence on differentiation. *J. Biol. Chem* **259**, 8444-8451 (1984).
213. Breimer, M.E. & Jovall, P.A. Structural characterization of a blood group A heptaglycosylceramide with globo-series structure. The major glycolipid based blood group A antigen of human kidney. *FEBS Lett* **179**, 165-172 (1985).
214. Holgersson, J. et al. Blood group type glycosphingolipids of human kidneys. Structural characterization of extended globo-series compounds. *Glycoconj. J* **8**, 424-433 (1991).
215. Kobata, A. & Ginsburg, V. Oligosaccharides of human milk. IV. Isolation and characterization of a new hexasaccharide, lacto-N-neohexaose. *Arch. Biochem. Biophys* **150**, 273-281 (1972).
216. Lundblad, A. Oligosaccharides from human urine. *Meth. Enzymol* **50**, 226-235 (1978).
217. Watkins, W.M. Biochemistry and Genetics of the ABO, Lewis, and P blood group systems. *Adv. Hum. Genet* **10**, 1-136, 379-385 (1980).
218. Oriol, R. Genetics of ABO, H, Lewis, X and related antigens. *Vox Sang.* **53**, 161-171 (1986).
219. Clausen, H. et al. Further characterization of type 2 and type 3 chain blood group A

- glycosphingolipids from human erythrocyte membranes. *Biochemistry* **25**, 7075-7085 (1986).
220. Björk, S. et al. Structures of blood group glycosphingolipids of human small intestine. A relation between the expression of fucolipids of epithelial cells and the ABO, Le and Se phenotype of the donor. *J. Biol. Chem* **262**, 6758-6765 (1987).
 221. Holgersson, J. et al. Blood group A glycolipid antigen expression in kidney, ureter, kidney artery, and kidney vein from a blood group A1Le(a-b+) human individual. Evidence for a novel blood group A heptaglycosylceramide based on a type 3 carbohydrate chain. *J. Biol. Chem* **265**, 20790-20798 (1990).
 222. Le Pendu, J. et al. The presence of at least two different H-blood-group-related beta-D-gal alpha-2-L-fucosyltransferases in human serum and the genetics of blood group H substances. *Am. J. Hum. Genet* **37**, 749-760 (1985).
 223. Hakomori, S. Antigen structure and genetic basis of histo-blood groups A, B and O: their changes associated with human cancer. *Biochim. Biophys. Acta* **1473**, 247-266 (1999).
 224. Marionneau, S. et al. ABH and Lewis histo-blood group antigens, a model for the meaning of oligosaccharide diversity in the face of a changing world. *Biochimie* **83**, 565-573 (2001).
 225. Galili, U. The alpha-gal epitope and the anti-Gal antibody in xenotransplantation and in cancer immunotherapy. *Immunol. Cell Biol* **83**, 674-686 (2005).
 226. Keusch, J.J. et al. Expression cloning of a new member of the ABO blood group glycosyltransferases, iGb3 synthase, that directs the synthesis of isoglybo-glycosphingolipids. *J. Biol. Chem* **275**, 25308-25314 (2000).
 227. Li, Y. et al. Sensitive detection of isoglobo and globo series tetraglycosylceramides in human thymus by ion trap mass spectrometry. *Glycobiology* **18**, 158-165 (2008).
 228. Christiansen, D. et al. Humans lack iGb3 due to the absence of functional iGb3-synthase: implications for NKT cell development and transplantation. *PLoS Biol* **6**, e172 (2008).
 229. Nesse, L.L. Erythrocyte antigens in Norwegian goats: serological and genetic studies. *Anim. Genet* **21**, 303-311 (1990).
 230. Xu, H. et al. Characterization of the human Forssman synthetase gene. An evolving association between glycolipid synthesis and host-microbial interactions. *J. Biol. Chem* **274**, 29390-29398 (1999).
 231. Kelly, R.J. et al. Molecular basis for H blood group deficiency in Bombay (Oh) and para-Bombay individuals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **91**, 5843-5847 (1994).
 232. Reguigne-Arnould, I. et al. Relative positions of two clusters of human alpha-L-fucosyltransferases in 19q (FUT1-FUT2) and 19p (FUT6-FUT3-FUT5) within the microsatellite genetic map of chromosome 19. *Cytogenet. Cell Genet* **71**, 158-162

(1995).

233. Koda, Y. et al. Changing transcription start sites in H-type alpha(1,2)fucosyltransferase gene (FUT1) during differentiation of the human erythroid lineage. *Eur. J. Biochem* **256**, 379-387 (1998).
234. Koda, Y. et al. Missense mutation of FUT1 and deletion of FUT2 are responsible for Indian Bombay phenotype of ABO blood group system. *Biochem. Biophys. Res. Commun* **238**, 21-25 (1997).
235. Rouquier, S. et al. Molecular cloning of a human genomic region containing the H blood group alpha(1,2)fucosyltransferase gene and two H locus-related DNA restriction fragments. Isolation of a candidate for the human Secretor blood group locus. *J. Biol. Chem* **270**, 4632-4639 (1995).
236. Meijerink, E. et al. Two alpha(1,2) fucosyltransferase genes on porcine chromosome 6q11 are closely linked to the blood group inhibitor (S) and Escherichia coli F18 receptor (ECF18R) loci. *Mamm. Genome* **8**, 736-741 (1997).
237. Bureau, V. et al. Comparison of the three rat GDP-L-fucose:beta-D-galactoside 2-alpha-L-fucosyltransferases FTA, FTB and FTC. *Eur. J. Biochem* **268**, 1006-1019 (2001).
238. Barreaud, J. Three bovine alpha2-fucosyltransferase genes encode enzymes that preferentially transfer fucose on Gal beta 1-3GalNAc acceptor substrates *Glycobiology* **10**, 611-621 (2000).
239. Hitoshi, S. et al. Molecular cloning and expression of two types of rabbit beta-galactoside alpha 1,2-fucosyltransferase. *J. Biol. Chem* **270**, 8844-8850 (1995).
240. Koda, Y. et al. Ancient origin of the null allele se(428) of the human ABO-secretor locus (FUT2). *J. Mol. Evol* **50**, 243-248 (2000).
241. Piau, J.P. et al. Evidence for two distinct alpha(1,2)-fucosyltransferase genes differentially expressed throughout the rat colon. *Biochem. J* **300** (Pt 3), 623-626 (1994).
242. Domino, S.E. et al. Molecular cloning, chromosomal assignment and tissue-specific expression of a murine alpha(1,2)fucosyltransferase expressed in thymic and epididymal epithelial cells. *Biochem. J* **327** (Pt 1), 105-115 (1997).
243. Lin, B. et al. Characterization of three members of murine alpha1,2-fucosyltransferases: change in the expression of the Se gene in the intestine of mice after administration of microbes. *Arch. Biochem. Biophys* **388**, 207-215 (2001).
244. Cohnen, S. et al. Molecular cloning of the gene coding for pig alpha1-2fucosyltransferase. *Immunogenetics* **44**, 76-79 (1996).
245. Hitoshi, S. et al. Molecular cloning and expression of a third type of rabbit GDP-L-fucose:beta-D-galactoside 2-alpha-L-fucosyltransferase. *J. Biol. Chem* **271**, 16975-

16981 (1996).

246. Guillon, P. et al. Association between expression of the H histo-blood group antigen, alpha1,2fucosyltransferases polymorphism of wild rabbits, and sensitivity to rabbit hemorrhagic disease virus. *Glycobiology* **19**, 21-28 (2009).
247. Saunier, K. et al. Organization of the bovine alpha 2-fucosyltransferase gene cluster suggests that the Sec1 gene might have been shaped through a nonautonomous L1-retrotransposition event within the same locus. *Mol. Biol. Evol* **18**, 2083-2091 (2001).
248. Roubinet, F. et al. Evolution of the O alleles of the human ABO blood group gene. *Transfusion* **44**, 707-715 (2004).
249. Yamamoto, F. & Hakomori, S. Sugar-nucleotide donor specificity of histo-blood group A and B transferases is based on amino acid substitutions. *J. Biol. Chem* **265**, 19257-19262 (1990).
250. Mifsud, N.A. et al. ABO genotyping-identification of O1, O1*, and O2 alleles using the polymerase chain reaction-sequence specific oligonucleotide (PCR-SSO) technique. *Immunohematology* **12**, 149-153 (1996).
251. Grunnet, N. et al. Absence of glycogen cycling in cultured rat hepatocytes. *Arch. Biochem. Biophys* **309**, 18-23 (1994).
252. Fukumori, Y. et al. Rapid detection of the cisAB allele consisting of a chimera of normal A and B alleles by PCR-RFLPs. *Transfus Med* **6**, 337-344 (1996).
253. Yip, S.P. et al. Identification and characterisation of polymorphisms in human phosphoglucosmutase (PGM1). *Ann. Hum. Genet* **63**, 129-140 (1999).
254. Yazer, M.H. et al. Blood grouping discrepancies between ABO genotype and phenotype caused by O alleles. *Curr. Opin. Hematol* **15**, 618-624 (2008).
255. Kominato, Y. et al. Animal histo-blood group ABO genes. *Biochem. Biophys. Res. Commun* **189**, 154-164 (1992).
256. Cailleau-Thomas, A. et al. Cloning of a rat gene encoding the histo-blood group A enzyme. Tissue expression of the gene and of the A and B antigens. *Eur. J. Biochem* **269**, 4040-4047 (2002).
257. Iwamoto, S. et al. Rat encodes the paralogous gene equivalent of the human histo-blood group ABO gene. Association with antigen expression by overexpression of human ABO transferase. *J. Biol. Chem* **277**, 46463-46469 (2002).
258. Turcot, A.L. et al. Cloning of a rat gene encoding the histo-blood group B enzyme: rats have more than one Abo gene. *Glycobiology* **13**, 919-928 (2003).
259. Yamamoto, M. et al. Murine equivalent of the human histo-blood group ABO gene is a cis-AB gene and encodes a glycosyltransferase with both A and B transferase activity. *J. Biol. Chem* **276**, 13701-13708 (2001).

260. Yamamoto, F. & Yamamoto, M. Molecular genetic basis of porcine histo-blood group AO system. *Blood* **97**, 3308-3310 (2001).
261. Meijerink, E. et al. Isolation of a porcine UDP-GalNAc transferase cDNA mapping to the region of the blood group EAA locus on pig chromosome 1. *Anim. Genet* **32**, 132-138 (2001).
262. Turcot-Dubois, A. et al. Long-term evolution of the CAZY glycosyltransferase 6 (ABO) gene family from fishes to mammals--a birth-and-death evolution model. *Glycobiology* **17**, 516-528 (2007).
263. Joziase, D.H. et al. Characterization of an alpha 1-3-galactosyltransferase homologue on human chromosome 12 that is organized as a processed pseudogene. *J. Biol. Chem* **266**, 6991-6998 (1991).
264. Koike, C. et al. Molecular basis of evolutionary loss of the alpha 1,3-galactosyltransferase gene in higher primates. *J. Biol. Chem* **277**, 10114-10120 (2002).
265. Haslam, D.B. & Baenziger, J.U. Expression cloning of Forssman glycolipid synthetase: a novel member of the histo-blood group ABO gene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **93**, 10697-10702 (1996).
266. Taylor, S.G. et al. Characterization of the rat alpha(1,3)galactosyltransferase: evidence for two independent genes encoding glycosyltransferases that synthesize Galalpha(1,3)Gal by two separate glycosylation pathways. *Glycobiology* **13**, 327-337 (2003).
267. Blanken, W.M. & Van den Eijnden, D.H. Biosynthesis of terminal Gal alpha 1-3Gal beta 1-4GlcNAc-R oligosaccharide sequences on glycoconjugates. Purification and acceptor specificity of a UDP-Gal:N-acetyllactosaminide alpha 1-3-galactosyltransferase from calf thymus. *J. Biol. Chem* **260**, 12927-12934 (1985).
268. Joziase, D.H. et al. The alpha 1,3-galactosyltransferase gene. *Subcell. Biochem* **32**, 25-48 (1999).
269. Larsen, R.D. et al. Frameshift and nonsense mutations in a human genomic sequence homologous to a murine UDP-Gal:beta-D-Gal(1,4)-D-GlcNAc alpha(1,3)-galactosyltransferase cDNA. *J. Biol. Chem* **265**, 7055-7061 (1990).
270. Dabkowski, P.L. et al. Characterisation of a cDNA clone encoding the pig alpha 1,3 galactosyltransferase: implications for xenotransplantation. *Transplant. Proc* **25**, 2921 (1993).
271. Katayama, A. et al. Porcine alpha-1,3-galactosyltransferase: full length cDNA cloning, genomic organization, and analysis of splicing variants. *Glycoconj. J* **15**, 583-589 (1998).
272. Mollicone, R. Molecular genetics of H, Se, Lewis and other fucosyl-transferase genes *Transfus Clin Biol.* **2**, 235-242 (1995).

273. Koda, Y. et al. Analysis of Lewis fucosyltransferase genes from the human gastric mucosa of Lewis-positive and -negative individuals. *Blood* **82**, 2915-2919 (1993).
274. Nishihara, S. et al. Alpha (1,3/1,4)fucosyltransferase (FucT-III) gene is inactivated by a single amino acid substitution in Lewis histo-blood type negative individuals. *Biochem. Biophys. Res. Commun* **196**, 624-631 (1993).
275. Orntoft, T.F. et al. Influence of Lewis alpha1-3/4-L-fucosyltransferase (FUT3) gene mutations on enzyme activity, erythrocyte phenotyping, and circulating tumor marker sialyl-Lewis a levels. *J. Biol. Chem* **271**, 32260-32268 (1996).
276. Elmgren, A. et al. DNA sequencing and screening for point mutations in the human Lewis (FUT3) gene enables molecular genotyping of the human Lewis blood group system. *Vox Sang* **70**, 97-103 (1996).
277. Elmgren, A. et al. Genotypic heterogeneity among Lewis negative individuals. *Biochem. Biophys. Res. Commun* **196**, 515-520 (1993).
278. Mollicone, R. et al. Molecular basis for Lewis alpha(1,3/1,4)-fucosyltransferase gene deficiency (FUT3) found in Lewis-negative Indonesian pedigrees. *J. Biol. Chem* **269**, 20987-20994 (1994).
279. Pang, H. et al. Significance of each of three missense mutations, G484A, G667A, and G808A, present in an inactive allele of the human Lewis gene (FUT3) for alpha(1,3/1,4)fucosyltransferase inactivation. *Glycoconj. J* **15**, 961-967 (1998).
280. Mollicone, R. et al. Molecular basis for plasma alpha(1,3)-fucosyltransferase gene deficiency (FUT6). *J. Biol. Chem* **269**, 12662-12671 (1994).
281. Larson, G. et al. Identification of a new plasma alpha(1,3)fucosyltransferase (FUT6) allele requires an extended genotyping strategy. *Vox Sang* **71**, 233-241 (1996).
282. Kaneko, M. et al. Alpha1,3-fucosyltransferase IX (Fuc-TIX) is very highly conserved between human and mouse; molecular cloning, characterization and tissue distribution of human Fuc-TIX. *FEBS Lett* **452**, 237-242 (1999).
283. Cailleau-Thomas, A. et al. FUT4 and FUT9 genes are expressed early in human embryogenesis. *Glycobiology* **10**, 789-802 (2000).
284. Mollicone, R. et al. Activity, splice variants, conserved peptide motifs, and phylogeny of two new alpha1,3-fucosyltransferase families (FUT10 and FUT11). *J. Biol. Chem* **284**, 4723-4738 (2009).
285. Kukowska-Latallo et al. cloned human cDNA determines expression of a mouse stage-specific embryonic antigen and the Lewis blood group alpha(1,3/1,4)fucosyltransferase. *Genes Dev* **4**, 1288-1303 (1990).
286. Nishihara, S. et al. Alpha1,3-fucosyltransferase 9 (FUT9; Fuc-TIX) preferentially fucosylates the distal GlcNAc residue of polylactosamine chain while the other four

- alpha1,3FUT members preferentially fucosylate the inner GlcNAc residue. *FEBS Lett* **462**, 289-294 (1999).
287. Oriol, R. et al. Major carbohydrate epitopes in tissues of domestic and African wild animals of potential interest for xenotransplantation research. *Xenotransplantation* **6**, 79-89 (1999).
 288. Costache, M. et al. Advances in molecular genetics of alpha-2- and alpha-3/4-fucosyltransferases. *Transfus Clin Biol* **4**, 367-382 (1997).
 289. Gersten, K.M. et al. Molecular cloning, expression, chromosomal assignment, and tissue-specific expression of a murine alpha-(1,3)-fucosyltransferase locus corresponding to the human ELAM-1 ligand fucosyl transferase. *J. Biol. Chem* **270**, 25047-25056 (1995).
 290. Zhang, A. et al. The gain-of-function Chinese hamster ovary mutant LEC11B expresses one of two Chinese hamster FUT6 genes due to the loss of a negative regulatory factor. *J. Biol. Chem* **274**, 10439-10450 (1999).
 291. Wierinckx, A. Complete genomic organization of futb encoding a bovine alpha 3-fucosyltransferase: Exons in human orthologous genes emerged from ancestral intronic sequences. *Mol Biol Evol.* **16**, 1535-1547 (1999).
 292. Dupuy, F. et al. A single amino acid in the hypervariable stem domain of vertebrate alpha1,3/1,4-fucosyltransferases determines the type 1/type 2 transfer. Characterization of acceptor substrate specificity of the lewis enzyme by site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem* **274**, 12257-12262 (1999).
 293. Harduin-Lepers, A. et al. The human sialyltransferase family. *Biochimie* **83**, 727-737 (2001).
 294. Kitagawa, H. & Paulson, J.C. Cloning of a novel alpha 2,3-sialyltransferase that sialylates glycoprotein and glycolipid carbohydrate groups. *J. Biol. Chem* **269**, 1394-1401 (1994).
 295. Chang, M.L. et al. Three genes that encode human beta-galactoside alpha 2,3-sialyltransferases. Structural analysis and chromosomal mapping studies. *Glycobiology* **5**, 319-325 (1995).
 296. Kim, Y.J. et al. Molecular cloning and expression of human Gal beta 1,3GalNAc alpha 2,3-sialyltransferase (hST3Gal II). *Biochem. Biophys. Res. Commun* **228**, 324-327 (1996).
 297. Giordanengo, V. et al. Cloning and expression of cDNA for a human Gal(beta1-3)GalNAc alpha2,3-sialyltransferase from the CEM T-cell line. *Eur. J. Biochem* **247**, 558-566 (1997).
 298. Kitagawa, H. et al. Novel gangliosides containing the sialyl-Le(a) structure from a human rectal adenocarcinoma. *J. Biol. Chem* **268**, 26541-26545 (1993).

299. Sasaki, K. et al. Expression cloning of a novel Gal beta (1-3/1-4) GlcNAc alpha 2,3-sialyltransferase using lectin resistance selection. *J. Biol. Chem* **268**, 22782-22787 (1993).
300. Kitagawa, H. et al. Genomic organization and chromosomal mapping of the Gal beta 1,3GalNAc/Gal beta 1,4GlcNAc alpha 2,3-sialyltransferase. *J. Biol. Chem* **271**, 931-938 (1996).
301. Ishii, A. et al. Expression cloning and functional characterization of human cDNA for ganglioside GM3 synthase. *J. Biol. Chem* **273**, 31652-31655 (1998).
302. Okajima, T. et al. Molecular cloning of a novel alpha2,3-sialyltransferase (ST3Gal VI) that sialylates type II lactosamine structures on glycoproteins and glycolipids. *J. Biol. Chem* **274**, 11479-11486 (1999).
303. Oriol, R. et al. Genetic regulation of the expression of ABH and Lewis antigens in tissues. *APMIS Suppl* **27**, 28-38 (1992).
304. Cheetham, S. et al. Binding patterns of human norovirus-like particles to buccal and intestinal tissues of gnotobiotic pigs in relation to A/H histo-blood group antigen expression. *J. Virol* **81**, 3535-3544 (2007).
305. Coddens, A. et al. The age-dependent expression of the F18+ E. coli receptor on porcine gut epithelial cells is positively correlated with the presence of histo-blood group antigens. *Vet. Microbiol* **122**, 332-341 (2007).
306. Oulmouden, A. et al. Molecular cloning and expression of a bovine alpha(1,3)-fucosyltransferase gene homologous to a putative ancestor gene of the human FUT3-FUT5-FUT6 cluster. *J. Biol. Chem* **272**, 8764-8773 (1997).
307. Opie, S.R. et al. Identification of amino acid residues in the capsid proteins of adeno-associated virus type 2 that contribute to heparan sulfate proteoglycan binding. *J. Virol* **77**, 6995-7006 (2003).
308. Dechecchi, M.C. et al. Heparan sulfate glycosaminoglycans are involved in adenovirus type 5 and 2-host cell interactions. *Virology* **268**, 382-390 (2000).
309. Barth, H. et al. Cellular binding of hepatitis C virus envelope glycoprotein E2 requires cell surface heparan sulfate. *J. Biol. Chem* **278**, 41003-41012 (2003).
310. Lee, E. et al. Common E protein determinants for attenuation of glycosaminoglycan-binding variants of Japanese encephalitis and West Nile viruses. *J. Virol* **78**, 8271-8280 (2004).
311. Tiwari, V. et al. Role for 3-O-sulfated heparan sulfate as the receptor for herpes simplex virus type 1 entry into primary human corneal fibroblasts. *J. Virol* **80**, 8970-8980 (2006).
312. Zhu, Z. et al. Infection of cells by varicella zoster virus: inhibition of viral entry by mannose 6-phosphate and heparin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **92**, 3546-3550 (1995).

313. Kari, B. & Gehrz, R. Structure, composition and heparin binding properties of a human cytomegalovirus glycoprotein complex designated gC-II. *J. Gen. Virol* **74** (Pt 2), 255-264 (1993).
314. Secchiero, P. et al. Role of the extracellular domain of human herpesvirus 7 glycoprotein B in virus binding to cell surface heparan sulfate proteoglycans. *J. Virol* **71**, 4571-4580 (1997).
315. Wang, F.Z. et al. Human herpesvirus 8 envelope glycoprotein K8.1A interaction with the target cells involves heparan sulfate. *J. Virol* **75**, 7517-7527 (2001).
316. Giroglou, T. et al. Human papillomavirus infection requires cell surface heparan sulfate. *J. Virol* **75**, 1565-1570 (2001).
317. Shafti-Keramat, S. et al. Different heparan sulfate proteoglycans serve as cellular receptors for human papillomaviruses. *J. Virol* **77**, 13125-13135 (2003).
318. Krusat, T. & Streckert, H.J. Heparin-dependent attachment of respiratory syncytial virus (RSV) to host cells. *Arch. Virol* **142**, 1247-1254 (1997).
319. Feldman, S.A. et al. Identification of a linear heparin binding domain for human respiratory syncytial virus attachment glycoprotein G. *J. Virol* **73**, 6610-6617 (1999).
320. Shields, B. et al. Multiple heparin binding domains of respiratory syncytial virus G mediate binding to mammalian cells. *Arch. Virol* **148**, 1987-2003 (2003).
321. Wyde, P.R. et al. Comparison of the inhibition of human metapneumovirus and respiratory syncytial virus by NMSO3 in tissue culture assays. *Antiviral Res* **63**, 51-59 (2004).
322. Chung, C.S. et al. A27L protein mediates vaccinia virus interaction with cell surface heparan sulfate. *J. Virol* **72**, 1577-1585 (1998).
323. Hsiao, J.C. et al. Vaccinia virus envelope D8L protein binds to cell surface chondroitin sulfate and mediates the adsorption of intracellular mature virions to cells. *J. Virol* **73**, 8750-8761 (1999).
324. Bomsel, M. & David, V. Mucosal gatekeepers: selecting HIV viruses for early infection. *Nat. Med* **8**, 114-116 (2002).
325. Bobardt, M.D. et al. Contribution of proteoglycans to human immunodeficiency virus type 1 brain invasion. *J. Virol* **78**, 6567-6584 (2004).
326. Pacitti, A.F. & Gentsch, J.R. Inhibition of reovirus type 3 binding to host cells by sialylated glycoproteins is mediated through the viral attachment protein. *J. Virol* **61**, 1407-1415 (1987).
327. Gentsch, J.R. & Pacitti, A.F. Differential interaction of reovirus type 3 with sialylated receptor components on animal cells. *Virology* **161**, 245-248 (1987).

328. Paul, R.W. et al. The alpha-anomeric form of sialic acid is the minimal receptor determinant recognized by reovirus. *Virology* **172**, 382-385 (1989).
329. Sinibaldi, L. et al. Inhibition of BK virus haemagglutination by gangliosides. *J. Gen. Virol* **68 (Pt 3)**, 879-883 (1987).
330. Liu, C.K. et al. Infection of glial cells by the human polyomavirus JC is mediated by an N-linked glycoprotein containing terminal alpha(2-6)-linked sialic acids. *J. Virol* **72**, 4643-4649 (1998).
331. Alexander, D.A. & Dimock, K. Sialic acid functions in enterovirus 70 binding and infection. *J. Virol* **76**, 11265-11272 (2002).
332. Yang, B. et al. Sialylated glycans as receptor and inhibitor of enterovirus 71 infection to DLD-1 intestinal cells. *Virol. J* **6**, 141 (2009).
333. Nilsson, E.C. et al. Sialic acid is a cellular receptor for coxsackievirus A24 variant, an emerging virus with pandemic potential. *J. Virol* **82**, 3061-3068 (2008).
334. Uncapher, C.R. et al. The major and minor group receptor families contain all but one human rhinovirus serotype. *Virology* **180**, 814-817 (1991).
335. Blomqvist, S. et al. Human rhinovirus 87 and enterovirus 68 represent a unique serotype with rhinovirus and enterovirus features. *J. Clin. Microbiol* **40**, 4218-4223 (2002).
336. Kaludov, N. et al. Adeno-associated virus serotype 4 (AAV4) and AAV5 both require sialic acid binding for hemagglutination and efficient transduction but differ in sialic acid linkage specificity. *J. Virol* **75**, 6884-6893 (2001).
337. Ah-Tye, C. et al. Virus-receptor interactions of human parainfluenza viruses types 1, 2 and 3. *Microb. Pathog* **27**, 329-336 (1999).
- 338 Suzuki, T. et al. Receptor specificities of human respiroviruses. *J. Virol* **75**, 4604-4613 (2001).
338. Rogers, G.N. et al. Differential sensitivity of human, avian, and equine influenza A viruses to a glycoprotein inhibitor of infection: selection of receptor specific variants. *Virology* **131**, 394-408 (1983).
340. Webster, R.G. et al. Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol. Rev* **56**, 152-179 (1992).
341. Matrosovich, M.N. et al. Neuraminidase is important for the initiation of influenza virus infection in human airway epithelium. *J. Virol* **78**, 12665-12667 (2004).
342. Suzuki, Y. et al. The hemagglutinins of the human influenza viruses A and B recognize different receptor microdomains. *Biochim. Biophys. Acta* **903**, 417-424 (1987).
343. Rosenthal, P.B. et al. Structure of the haemagglutinin-esterase-fusion glycoprotein of influenza C virus. *Nature* **396**, 92-96 (1998).

344. Künkel, F. & Herrler, G. Structural and functional analysis of the surface protein of human coronavirus OC43. *Virology* **195**, 195-202 (1993).
345. Arnberg, N. et al. Adenovirus type 37 binds to cell surface sialic acid through a charge-dependent interaction. *Virology* **302**, 33-43 (2002).
346. Cao, W. et al. Identification of alpha-dystroglycan as a receptor for lymphocytic choriomeningitis virus and Lassa fever virus. *Science* **282**, 2079-2081 (1998).
347. Brown, K.E. et al. Erythrocyte P antigen: cellular receptor for B19 parvovirus. *Science* **262**, 114-117 (1993).
348. Olofsson, S. & Bergström, T. Glycoconjugate glycans as viral receptors. *Ann. Med* **37**, 154-172 (2005).
349. Marionneau, S. et al. Influence of the combined ABO, FUT2, and FUT3 polymorphism on susceptibility to Norwalk virus attachment. *J. Infect. Dis* **192**, 1071-1077 (2005).
350. Hutson, A.M. et al. Norwalk virus-like particle hemagglutination by binding to h histo-blood group antigens. *J. Virol* **77**, 405-415 (2003).
351. Marionneau S. ABH and Lewis histo-blood group antigens, a model for the meaning of oligosaccharide diversity in the face of a changing world *Biochimie*. **83**, 565-573 (2001).
352. Hutson, A.M. et al. Norwalk virus infection associates with secretor status genotyped from sera. *J. Med. Virol* **77**, 116-120 (2005).
353. Huang, P. et al. Noroviruses bind to human ABO, Lewis, and secretor histo-blood group antigens: identification of 4 distinct strain-specific patterns. *J. Infect. Dis* **188**, 19-31 (2003).
354. Huang, P. et al. Norovirus and histo-blood group antigens: demonstration of a wide spectrum of strain specificities and classification of two major binding groups among multiple binding patterns. *J. Virol* **79**, 6714-6722 (2005).
355. Tan, M. et al. Outbreak studies of a GII-3 and a GII-4 norovirus revealed an association between HBGA phenotypes and viral infection. *J. Med. Virol* **80**, 1296-1301 (2008).
356. Bu, W. et al. Structural basis for the receptor binding specificity of Norwalk virus. *J. Virol* **82**, 5340-5347 (2008).
357. Le Pendu, J. et al. Mendelian resistance to human norovirus infections. *Semin. Immunol* **18**, 375-386 (2006).
358. Tamura, M. et al. Genogroup II noroviruses efficiently bind to heparan sulfate proteoglycan associated with the cellular membrane. *J. Virol* **78**, 3817-3826 (2004).
359. Rydell, G.E. et al. Human noroviruses recognize sialyl Lewis x neoglycoprotein.

Glycobiology **19**, 309-320 (2009).

360. Harrington, P.R. et al. Norovirus capture with histo-blood group antigens reveals novel virus-ligand interactions. *J. Virol* **78**, 3035-3045 (2004).
361. Tan, M. & Jiang, X. Norovirus and its histo-blood group antigen receptors: an answer to a historical puzzle. *Trends Microbiol* **13**, 285-293 (2005).
362. White, L.J. et al. Attachment and entry of recombinant Norwalk virus capsids to cultured human and animal cell lines. *J. Virol* **70**, 6589-6597 (1996).
363. Cao, S. et al. Structural basis for the recognition of blood group trisaccharides by norovirus. *J. Virol* **81**, 5949-5957 (2007).
364. Choi, J. et al. Atomic resolution structural characterization of recognition of histo-blood group antigens by Norwalk virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **105**, 9175-9180 (2008).
365. Tan, M. et al. Conservation of carbohydrate binding interfaces: evidence of human HBGA selection in norovirus evolution. *PLoS ONE* **4**, e5058 (2009).
366. Chen, R. et al. X-ray structure of a native calicivirus: structural insights into antigenic diversity and host specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **103**, 8048-8053 (2006).
367. Tan, M. et al. C-terminal arginine cluster is essential for receptor binding of norovirus capsid protein. *J. Virol* **80**, 7322-7331 (2006).
378. Hutson, A.M. et al. Norwalk virus infection and disease is associated with ABO histo-blood group type. *J. Infect. Dis* **185**, 1335-1337 (2002).
369. Rockx, B. et al. Association of histo-blood group antigens and susceptibility to norovirus infections. *J. Infect. Dis* **191**, 749-754 (2005).
370. Halperin, T. et al. No association between histo-blood group antigens and susceptibility to clinical infections with genogroup II norovirus. *J. Infect. Dis* **197**, 63-65 (2008).
371. Donaldson, E.F. et al. Norovirus pathogenesis: mechanisms of persistence and immune evasion in human populations. *Immunol. Rev* **225**, 190-211 (2008).
372. Tian, P. et al. Porcine gastric mucin binds to recombinant norovirus particles and competitively inhibits their binding to histo-blood group antigens and Caco-2 cells. *Lett. Appl. Microbiol* **41**, 315-320 (2005).
373. Batten, C.A. et al. Characterization of a cross-reactive linear epitope in human genogroup I and bovine genogroup III norovirus capsid proteins. *Virology* **356**, 179-187 (2006).
374. Oliver, S.L. et al. Genotype 1 and genotype 2 bovine noroviruses are antigenically distinct but share a cross-reactive epitope with human noroviruses. *J. Clin. Microbiol* **44**, 992-998 (2006).

375. Di Girolamo, R. et al. Effects of irradiation on the survival of virus in West Coast oysters. *Appl Microbiol* **24**, 1005-1006 (1972).
376. Di Girolamo, R. et al. Ionic bonding, the mechanism of viral uptake by shellfish mucus. *Appl. Environ. Microbiol* **33**, 19-25 (1977).
377. Tian, P. Norovirus binds to blood group A-like antigens in oyster gastrointestinal cells *Lett Appl Microbiol.* **43**, 645-651 (2006).
378. Tian, P. et al. Norovirus recognizes histo-blood group antigens on gastrointestinal cells of clams, mussels, and oysters: a possible mechanism of bioaccumulation. *J. Food Prot* **70**, 2140-2147 (2007).
379. Chan, M.C.W. et al. Fecal viral load and norovirus-associated gastroenteritis. *Emerging Infect. Dis* **12**, 1278-1280 (2006).
380. Costantini, V. et al. Human and animal enteric caliciviruses in oysters from different coastal regions of the United States. *Appl. Environ. Microbiol* **72**, 1800-1809 (2006).
381. Matthews, L. & Woolhouse, M. New approaches to quantifying the spread of infection. *Nat. Rev. Microbiol* **3**, 529-536 (2005).
382. Woolhouse, M.E.J. Your host or mine? *Trends Parasitol* **18**, 202-203 (2002).
383. Pommepuy, M. et al. Sewage impact on shellfish microbial contamination. *Water Sci. Technol* **50**, 117-124 (2004).
384. Gentry, J. et al. A rapid and efficient method for quantitation of genogroups I and II norovirus from oysters and application in other complex environmental samples. *J. Virol. Methods* **156**, 59-65 (2009).
385. Lysén, M. et al. Genetic diversity among food-borne and waterborne norovirus strains causing outbreaks in Sweden. *J. Clin. Microbiol* **47**, 2411-2418 (2009).
396. Noda, M. et al. Statistical analysis of attack rate in norovirus foodborne outbreaks. *Int. J. Food Microbiol* **122**, 216-220 (2008).
387. Almanza, H. et al. Self-assembly of the recombinant capsid protein of a swine norovirus into virus-like particles and evaluation of monoclonal antibodies cross-reactive with a human strain from genogroup II. *J. Clin. Microbiol* **46**, 3971-3979 (2008).
388. Tan, M. et al. Elucidation of strain-specific interaction of a GII-4 norovirus with HBGA receptors by site-directed mutagenesis study. *Virology* **379**, 324-334 (2008).
389. Cho, S.K. et al. Transcriptional regulation of alpha1,3-galactosyltransferase in embryonal carcinoma cells by retinoic acid. Masking of Lewis X antigens by alpha-galactosylation. *J. Biol. Chem* **271**, 3238-3246 (1996).
390. Chandrasekaran, E.V. et al. Specificity analysis of three clonal and five non-clonal alpha 1,3-L-fucosyltransferases with sulfated, sialylated, or fucosylated synthetic

- carbohydrates as acceptors in relation to the assembly of 3'-sialyl-6'-sulfo Lewis x (the L-selectin ligand) and related complex structures. *Biochemistry* **35**, 8925-8933 (1996).
391. Koda, Y. et al. The polymorphisms of fucosyltransferases. *Leg Med (Tokyo)* **3**, 2-14 (2001).
392. Saitou, N. & Yamamoto, F. Evolution of primate ABO blood group genes and their homologous genes. *Mol. Biol. Evol* **14**, 399-411 (1997).
393. Ferrer-Admetlla, A. et al. A natural history of FUT2 polymorphism in humans. *Mol. Biol. Evol* **26**, 1993-2003 (2009).
394. Calafell, F. et al. Evolutionary dynamics of the human ABO gene. *Hum. Genet* **124**, 123-135 (2008).
395. Widdowson, M. et al. Detection of serum antibodies to bovine norovirus in veterinarians and the general population in the Netherlands. *J. Med. Virol* **76**, 119-128 (2005).
396. Oliver, S.L. et al. Genomic characterization of the unclassified bovine enteric virus Newbury agent-1 (Newbury1) endorses a new genus in the family Caliciviridae. *Virology* **350**, 240-250 (2006).
397. Bok, K. et al. Evolutionary Dynamics of GII.4 Noroviruses over a Thirty-four Year Period. *J. Virol* **83**, 11890-11901 (2009).
398. Nenonen, N.P. et al. Tracing of norovirus outbreak strains in mussels collected near sewage effluents. *Appl. Environ. Microbiol* **74**, 2544-2549 (2008).
399. Nenonen, N.P. et al. Molecular analysis of an oyster-related norovirus outbreak. *J. Clin. Virol* **45**, 105-108 (2009).
400. Baleux, F. et al. A synthetic CD4-heparan sulfate glycoconjugate inhibits CCR5 and CXCR4 HIV-1 attachment and entry. *Nat. Chem. Biol* **5**, 743-748 (2009).
401. Tamura, M. et al. Inhibition of attachment of virions of Norwalk virus to mammalian cells by soluble histone molecules. *Arch. Virol* **148**, 1659-1670 (2003).
402. Makino, A. et al. Junctional adhesion molecule 1 is a functional receptor for feline calicivirus. *J. Virol* **80**, 4482-4490 (2006).
403. Stuart, A.D. & Brown, T.D.K. Alpha2,6-linked sialic acid acts as a receptor for Feline calicivirus. *J. Gen. Virol* **88**, 177-186 (2007).
404. Taube, S. et al. Ganglioside-linked terminal sialic acid moieties on murine macrophages function as attachment receptors for murine noroviruses. *J. Virol* **83**, 4092-4101 (2009).

Spécificité glycanique des souches de NoVs humaines et animales : Apport pour l'évaluation du risque de transmission interespèce

Les norovirus (NoVs) responsables de la majorité des gastroentérites virales se divisent en 7 génogroupes GI à GVII. Les génogroupes GI, GIV, GVI et GVII regroupent les souches humaines, le génogroupe GII les souches humaines et porcines et les génogroupes GIII et GV respectivement les souches bovines et murines. La fixation des NoVs humains sur les antigènes tissulaires de groupe sanguin (HBGAs) constitue la première étape de l'infection.

Des NoVs porcins et bovins dont les séquences sont très voisines des séquences des NoVs humains ont été identifiés suggérant que ces animaux pourraient constituer un réservoir pour l'homme, d'autant que ces animaux présentent des HBGAs à la surface de leurs cellules épithéliales. En effet, il est admis que la présence de récepteurs partagés par différentes espèces augmente le risque de transmission inter-espèce, Nous nous sommes donc proposés d'étudier les récepteurs sur les cellules humaines, porcines, bovines et de l'huître, des NoVs humains GI.1 et GII.4, des NoV bovins GIII.2 et NoV porcins GII.11. Nous avons ainsi caractérisé l'expression des HBGAs le long du tube digestif des bovins, du porc et de l'huître, et étudié la fixation des NoVs humains et animaux sur les tissus de ces animaux. Nous avons caractérisé chez le bovin le ligand cellulaire du NoV GIII.2 aboutissant à la conclusion que l'homme ne peut être infecté par ce virus du fait de la perte totale de l'expression de ce ligand. Nous avons aussi démontré que certaines souches humaines peuvent trouver leur ligand chez le porc et le bovin soulignant la possibilité de co-infection de ces espèces qui pourraient être à l'origine de l'émergence de nouvelles souches zoonotiques.

Mots clés : Norovirus, Antigènes tissulaires de groupe sanguin, bovin, porc, huître, barrière d'espèce, zoonose.

Glycan specificity of human and animal noroviruses strains : a contribution for risk assessment of interspecies transmission

Noroviruses (NoVs), most common etiological agent of acute viral gastroenteritis outbreaks worldwide, are divided into 7 genogroups GI to GVII. Genogroups GI, GIV, GVI and GVII contain human strains, the genogroup GII human and porcine strains, and genogroups GIII and GV bovine and mouse respectively. Binding of NoVs to human blood group antigens (HBGAs) constitute the first step of infection.

Pigs and cattle noroviruses whose sequences are very similar to human noroviruses sequences have been identified, suggesting that these animals might constitute a reservoir for humans, as these animals present HBGAs on the surface of their epithelial cells. Indeed, it is known that the presence of receptors shared by different species increases the risk of cross-species transmission. We therefore proposed to study the binding of human NoVs GI.1 and GII.4, bovine NoV GIII.2 and porcine NoV GII.11 on human, pig, bovine and oysters tissues. We have characterized along the digestive tract of cattle, pig and oyster the expression of HBGAs and we studied the binding of human, porcine and bovine noroviruses on human and animal tissues. We have characterized the cellular ligand of the bovine noroviruses GIII.2 leading to the conclusion that humans cannot be infected by this virus because of the total loss of expression of this ligand. We also demonstrated that some human strains can find their ligand in pigs and cattle suggesting the possibility of co-infection of these species that could be responsible for the emergence of new zoonotic strains.

Keywords: Norovirus, Histo-blood group antigens, bovine, pig, oyster, species, barrier zoonosis.