

Thèse de Doctorat

Najoua DROUAZ

Mémoire présenté en vue de l'obtention du
grade de Docteur de l'Université de Nantes
sous le label de L'Université Nantes Angers Le Mans

École doctorale : *Ecole doctorale biologie sante Nantes Angers (ED502)*

Discipline : *Sciences de la Vie et de la Santé*

Spécialité : *Virologie et Environnement*

Unité de recherche : *Laboratoire de Microbiologie, LSEM/SG2M, IFREMER, Nantes*

Soutenue le 26/10/2015

Thèse N° :

Norovirus et coquillages

Approches pour l'évaluation de la persistance et du pouvoir infectieux

JURY

Rapporteurs : **M. Albert BOSCH**, Professeur des Universités, Université de Barcelone
M. Francis DELPEYROUX, Directeur de Recherche, Inserm U994, Institut Pasteur, Paris

Examineurs : **Mme. Nathalie RUVOEN**, Maitre de conférences, Inserm U892-CNRS 6299, Nantes
Mme. Fabienne BON, Maitre de conférences, IUT Dijon, Bourgogne

Directeur de Thèse : **Mlle. Soizick F. LE GUYADER**, Directrice de Recherche, LSEM/SG2M, IFREMER, Nantes

Co-directeur de Thèse : **M. Jacques LE PENDU**, Directeur de Recherche, Inserm U892-CNRS 6299, Nantes

A ma mère et Nassim

A Nabil et ma famille

« La vérité scientifique sera toujours plus belle que les créations de notre imagination et que les illusions de notre ignorance »

« C'est ce que nous pensons déjà connaître qui nous empêche souvent d'apprendre »

Claude Bernard

Remerciement

L'exposé de ce travail, m'offre l'occasion de remercier tous ceux qui m'ont encouragée et aidée dans la réalisation de cette thèse.

Mes remerciements s'adressent tout d'abord à ma directrice de thèse, Soizick LE GUYADER pour m'avoir accueilli dans son laboratoire, pour avoir mis à ma disposition tous les moyens de réaliser ce travail, pour son dynamisme et ses compétences et de m'avoir ouvert la voie de la Recherche.

Je tiens à remercier Jacques LE PENDU pour avoir accepté de co-diriger cette thèse, pour ses conseils avisés, bien que n'étant pas dans le même laboratoire, il est resté à l'écoute de l'avancement de mes travaux.

Mes remerciements sincères à l'IFREMER et la Région « Pays de la Loire » pour la bourse de thèse qui m'a été accordée.

Je remercie également les membres du comité de suivi de ma thèse, Tristan RENAULT et Berthe-Marie IMBERT pour leurs conseils et leurs avis pendant mes trois ans de thèse.

Je suis également très reconnaissant à Albert BOSCH et Francis DELPEYROUX d'avoir accepté le rôle déterminant de rapporteur.

Je remercie Nathalie RUVOEN et Fabienne BON de m'avoir fait l'honneur d'accepter d'examiner ce travail.

Mes remerciements sincères à Joel HAURE, pour son expertise en physiologie des coquillages et son aide si précieuse pour l'élaboration des expériences de persistance virale.

Je tiens à remercier Philippe-Jacques HATT, responsable de la station IFREMER de Bouin pour m'avoir permis de réaliser les expériences de persistance, ainsi que toute l'équipe, particulièrement Hubert PALVADEAU, Béatrice DUPUY, Mathias PAPIN et Karen RIOU, pour leur aide dans les expérimentations, leur disponibilité et leur accueil chaleureux.

C'est à toutes les personnes de l'équipe virologie que j'adresse toute ma reconnaissance. Durant ces trois années, ils ont toujours été là, pour répondre à mes questions, m'accompagner et m'aider dans les expérimentations. Cécile, Estelle, Julien et Sylvain j'ai eu plaisir à travailler avec vous. Un grand merci à toutes les personnes de passage au laboratoire.

Un merci particulier à Jean Claude LE SAUX, pour tous les prélèvements de coquillages et tous ses encouragements.

C'est à toutes les personnes de l'équipe du laboratoire LSEM, aussi bien les Nantais que les Brestois que j'adresse toute ma reconnaissance, pour leur aide et leur soutien.

Je tiens à saluer ici toutes les personnes qui, de près comme de loin, ont contribué à la concrétisation de ce travail de thèse et leur témoigner toute ma gratitude. Je laisse dans ces quelques remerciements une trace de cette collaboration scientifique qui, j'ose croire, s'inscrira dans le temps.

Table des matières

Introduction	1
Première partie: Revue bibliographique	5
Chapitre 1 : Norovirus : définition et caractéristiques virologiques	6
1. Historique	6
2. Classifications	7
3. Structure des particules virales	10
3.1. Organisation génomique	10
3.2. Protéines virales	11
3.2.1. Protéines non structurales	11
3.2.2. Protéines structurales	12
3.2.2.1. Protéine de capsid VP1	12
3.2.2.2. Protéine VP2	14
4. Multiplication in vitro des norovirus	14
5. Propriétés antigéniques	16
6. Infections à norovirus humains et diagnostic biologique	17
6.1. Manifestations cliniques	17
6.2. Immunité et norovirus	18
6.2.1. Réponse immunitaire humorale	18
6.2.2. Réponse immunitaire cellulaire	19
6.3. Méthodes de détection des norovirus humains	19
6.3.1. Microscopie électronique	20
6.3.2. Techniques immunologiques	20
6.3.3. Techniques moléculaires	22
6.3.4. Plateformes de diagnostic	24
6.3.5. Géotypage	25
6.4. Contrôle et prévention	26
7. Épidémiologie des norovirus	28
7.1. Modes de Transmission	28
7.2. Prévalence et incidence	30
7.3. Caractéristiques épidémiologiques	30
7.4. Épidémiologie moléculaire	31
8. Evolution des norovirus	33
8.1. Formes pré-épidémiques des variants GII.4	33
8.2. Dérive antigénique	34
8.3. Recombinaison des norovirus	35
Chapitre 2 : Récepteurs cellulaires des norovirus	38
1. Biosynthèse des antigènes tissulaires de groupes sanguins	39
2. Déterminisme génétique de la résistance aux infections à norovirus	42
3. Structure du site de liaison aux antigènes tissulaires de groupes sanguins	44
4. Antigènes tissulaires de groupes sanguins et évolution des norovirus	48

Chapitre 3 : Environnement, coquillages et norovirus **50**

1. Mollusques bivalves	50
1.1. Anatomie	50
1.1.1. Morphologie externe	50
1.1.2. Organisation interne	51
1.1.2.1. Le manteau	51
1.1.2.2. L'appareil respiratoire	52
1.1.2.3. Le tractus digestif	53
1.1.2.4. L'appareil circulatoire	54
1.1.2.5. Les glandes génitales	55
1.1.2.6. Le système nerveux	55
1.1.2.7. L'appareil excréteur (organe de Bojanus)	55
1.2. Nutrition chez les bivalves	55
1.2.1. Les mécanismes de sélection des particules	56
1.2.2. Processus digestif	57
2. Contamination de l'environnement par les norovirus	58
2.1. Taux d'excrétion dans les selles	58
2.2. Propriétés de persistance	59
2.3. Sources de contamination	59
2.3.1. Les rejets d'eaux usées	60
2.3.2. Apports ponctuels, les rejets des bateaux	62
2.3.3. Réservoirs environnementaux, les eaux souterraines	62
2.3.4. Persistance et transmission dans les eaux de surface	63
3. Contamination des coquillages par les norovirus	64
3.1. Mécanismes d'accumulation par les mollusques bivalves	64
3.2. Méthodes de détection des norovirus dans les coquillages	67
3.2.1. Extraction	67
3.2.2. RT-PCR	69
3.2.3. Standardisation des méthodes spécifiques aux coquillages	70
3.3. Épidémies liées à la consommation de coquillages	71
3.4. Prévention	73
3.4.1. Classement des zones de production conchylicole	73
3.4.2. Purification des coquillages bivalves	75

Chapitre 4 : Substituts des norovirus humains **78**

1. Classification des substituts potentiels des norovirus humains	79
1.1. Norovirus murin	79
1.2. Calicivirus porcins	81
1.3. Norovirus bovins, ovins	82
1.4. Calicivirus félin	82
1.5. Virus de maladie hémorragique du lapin	82
1.6. Autres substituts potentiels	83
2. Virus des primates non humains et les Recovirus	84
2.1. Classification	85
2.2. Structure des particules virales	86
2.2.1. Organisation génomique	86
2.2.2. Protéines virales	87
2.2.2.1. Protéines non structurales	87
2.2.2.2. Protéines structurales	88
2.3. Interactions Recovirus-HBGAs	89
3. Mengovirus	90
3.1. Classification	90

3.2. Structure des particules virales	91
3.2.1. Organisation génomique	91
3.2.2. Protéines virales	92
3.2.2.1. Protéines non structurales	93
3.2.2.2. Protéines structurales	93
3.3. Multiplication in vitro	94
3.4. Propriétés antigéniques	95
4. Etudes de l'inactivation des norovirus humains	95
4.1. Inactivation physique	96
4.1.1. Inactivation à différentes températures	96
4.1.2. Inactivation par irradiation UV	97
4.1.3. Inactivation par les rayonnements ionisants	98
4.1.4. Inactivation à haute pression hydrostatique	99
4.2. Inactivation chimique	100
4.2.1. Inactivation par les Alcools	100
4.2.2. Inactivation par des agents oxydant	101
4.2.2.1. Le chlore	101
4.2.2.2. L'ozone	103
4.2.3. Inactivation acido/basique	104

Deuxième partie : Matériel et méthodes **105**

1. Lignés cellulaires et souches virales	106
1.1. Virus Tulane	106
1.2. Mengovirus	106
1.3. Norovirus GI.1	107
1.4. Etudes de la stabilité des souches virales en eau de mer naturelle	107
2. Bioaccumulations	107
2.1. Echantillons de coquillages	107
2.2. Protocoles de bioaccumulation	108
2.3. Expériences de persistance virale	109
2.4. Dissection	110
2.5. Extraction des acides nucléiques	111
2.5.1. Concentration des virus	111
2.5.2. Purification des acides nucléiques	111
2.6. RT-PCR en temps réel	112
2.7. Contrôles et interprétation	113
2.7.1. Efficacité d'extraction	113
2.7.2. Contrôle et calcul des valeurs de C_T	114
2.7.3. Validation des courbes standards	114
2.7.4. Quantification	115
2.8. Analyse statistique	115
3. Tests Immuno-enzymatiques (ELISA)	115
3.1. Echantillons de coquillage	116
3.2. Dissection et préparation des coquillages	117
3.3. Protocoles de l'ELISA	118

Troisième partie : Résultats **119**

1. Bioaccumulations	120
1.1. Contrôles et conditions de bioaccumulation	120
1.1.1. Etudes de la stabilité des souches virales en eau de mer naturelle	120
1.1.2. Echantillons de coquillage	120
1.1.3. Conditions environnementales	121

1.2. Étude de la distribution tissulaire	121
1.3. Étude de la persistance virale après 8 jours	122
1.4. Étude de la persistance virale après 2 mois	123
2. Fixation des norovirus sur différentes espèces d'huîtres	126
2.1. Étude de la fixation des VLPs GI.1	126
2.2. Étude de la fixation des VLPs GII.4	128
2.3. Étude de la fixation des VLPs GII.3	130
2.4. Paramètres environnementaux	132
3. Bioaccumulation dans les huîtres creuses et plates	134
Quatrième partie: Discussion	139
Conclusion et perspectives	154
Références bibliographiques	170
Annexes	203

Liste des figures

Figure 1 :	Norovirus en immuno-microscopie électronique	7
Figure 2 :	Relation phylogénétique dans la famille des <i>Caliciviridae</i>	7
Figure 3 :	Classification des norovirus basée sur la diversité des séquences en acides aminés de la protéine de capsid VP1 complète	9
Figure 4 :	Organisation génomique des norovirus	10
Figure 5 :	Structure et assemblage de la protéine de capsid VP1	12
Figure 6 :	Représentation du monomère de la protéine VP1	13
Figure 7 :	Régions génomiques ciblées pour la détection et le géotypage des norovirus	26
Figure 8 :	Modes de transmission des norovirus	29
Figure 9 :	Chronologie de l'émergence et la circulation des variantes GII.4 prédominants depuis les années 1990s jusqu'en 2013	31
Figure 10 :	Variation dans le temps des norovirus GII.4	35
Figure 11 :	Un mécanisme simple pour la recombinaison des norovirus	37
Figure 12 :	Images par microscopie électronique à transmission du glycocalyx des cellules épithéliales du petit intestin	39
Figure 13 :	Voies de biosynthèse des HBGAs	42
Figure 14 :	Structures cristallographiques des interfaces de liaison entre les dimères P et les oligosaccharides des HBGAs	46
Figure 15 :	Interactions schématisées et relations entre les différents norovirus humains avec un les résidus spécifiques des HBGAs	47
Figure 16 :	Évolution de la reconnaissance des HBGAs par les souches GII.4	49
Figure 17 :	Organisation générale d'une huître creuse <i>Crassostrea gigas</i>	51
Figure 18 :	Manteau de l'huître creuse <i>Crassostrea gigas</i>	52
Figure 19 :	Branchies de l'huître creuse <i>Crassostrea gigas</i>	52
Figure 20 :	Anatomie du tube digestif de l'huître creuse <i>Crassostrea gigas</i>	53
Figure 21 :	Tube digestif de l'huître creuse <i>Crassostrea gigas</i>	53
Figure 22 :	Frottis de cellules hématocytaires de <i>Crassostrea gigas</i>	54
Figure 23 :	Représentation schématisée des différents sites de la digestion chez <i>Crassostrea gigas</i>	57
Figure 24 :	Les principales voies de transfert des virus entériques dans l'environnement au littoral	60
Figure 25 :	Exigences réglementaires microbiologiques du classement de zone	75
Figure 26 :	Virus Tulane en microscopie électronique	85
Figure 27 :	Classification génétique des Recovirus	86
Figure 28 :	Organisation génomique du virus Tulane	87
Figure 29 :	Sites de clivage prédictifs de la polyprotéine basé sur des alignements de séquences avec des cartes de clivage publiés d'autres CVs	88
Figure 30 :	Cryo-microscopie électronique et reconstruction 3D du virus Tulane	89
Figure 31 :	Classification du virus de l'encéphalomyocardite	90
Figure 32 :	Organisation génomique du virus de l'encéphalomyocardite.	91
Figure 33 :	Représentation schématisée de la région 5' UTR du Mengovirus	92
Figure 34 :	Structure schématisée de la capsid d'un picornavirus et organisation des protéines structurales	94

Figure 35 :	Sites antigéniques de neutralisation du Mengovirus	95
Figure 36 :	Photographies d'expérience de bioaccumulation	109
Figure 37 :	Photographies d'expérience de persistance virale	110
Figure 38 :	Dissection des coquillages	111
Figure 39 :	Test ELISA sur tissus de coquillages	116
Figure 40 :	Localisation des zones d'échantillonnage	117
Figure 41 :	Diminution des concentrations du NV(GI.1), TV et MgV dans les TD des huîtres après 8 semaines	125
Figure 42 :	Fixation des VLPs GI.1 sur différentes espèces d'huîtres	126
Figure 43 :	Fixation des VLPs GI.1 en fonction de la saison	127
Figure 44 :	Fixation des VLPs GII.4 sur différentes espèces d'huîtres	128
Figure 45 :	Fixation des VLPs GII.4 en fonction de la saison	129
Figure 46 :	Fixation des VLPs GII.3 sur différentes espèces d'huîtres	130
Figure 47 :	Fixation des VLPs GII.3 en fonction de la saison	131
Figure 48 :	Comparaison de la fixation des VLPs entre Marseillan et la Pointe du château	133
Figure 49 :	Comparaison de la distribution tissulaire et de la persistance après 8 jours du NV(GI.1) dans les HC et HP	136
Figure 50 :	Comparaison de la distribution tissulaire et de la persistance après 8 jours du TV dans les HC et HP	137
Figure 51 :	Comparaison de la distribution tissulaire et de la persistance après 8 jours du MgV dans les HC et HP	138

Liste des tableaux

Tableau 1 :	Nomenclature des protéines non structurales et leurs fonctions	12
Tableau 2 :	Vue d'ensemble des tests de laboratoire pour la détection des norovirus	21
Tableau 3 :	Propriétés de persistance des NoVs humains en fonction de paramètres physiques et chimiques	59
Tableau 4 :	Taux de réduction des NoVs par les procédés de traitement des eaux usées rapportées dans la littérature	61
Tableau 5 :	Exemples d'épidémies liées aux huitres	74
Tableau 6 :	Comparaison des substituts des NoVs humains	80
Tableau 7 :	Caractéristiques des différentes protéines non structurales de l'EMCV	93
Tableau 8 :	Amorces et sondes utilisées pour les RT-PCR.	112
Tableau 9 :	Mélange réactionnel type pour une amplification par RT-PCR en une étape	113
Tableau 10 :	Distribution tissulaire du NV(GI.1), TV et MgV après une et 24 heures de bioaccumulation	124
Tableau 11 :	Persistance du NV(GI.1), TV et MgV après 8 jours	124
Tableau 12 :	Distribution tissulaire du NV(GI.1), TV et MgV après une et 24 heures de bioaccumulation, persistance après 8 jours dans les HC et HP	135

Liste des abréviations

AA	acide(s) aminé(s)
Ac	anticorps
ADN	acide désoxyribonucléique
Ag	antigène
AN	acides nucléiques
ARN	acide ribonucléique
BoNoV	norovirus bovins (bovine norovirus)
Br	branchies
BSA	albumine de sérum bovin (bovine serum albumin)
Cat-floc	chlorure de polydiallyldiméthylammonium
C _T	cycling threshold
CVs	calicivirus
dNTP	désoxynucléotide triphosphate
DO	densité optique
EV	entérovirus
FCV	calicivirus félin (feline calicivirus)
HBGAs	antigènes tissulaires de groupe sanguin (histo-blood group antigens)
HC	huître creuse
HC2n	huître creuse diploïde
HC3n	huître creuse triploïde
HCS	huître sauvage
HP	huître plate
Ig	immunoglobuline
kDa	kilo dalton
MGB	minor groove binde
min	minute
MNV	norovirus murin (murine norovirus)
Mt	manteau
NoVs	norovirus
nt	nucleotide
NV	virus norwalk (norwalk virus)
pb	paire de base
PBS	tampon phosphate salin (phosphate buffered saline)
PCR	réaction de polymérase en chaîne (polymerase chain reaction)
PEG	polyéthylène glycol
PM	poids moléculaire
R	ratio
ReCV	calicivirus entériques rhésus (rhesus enteric calicivirus)
ROX	carboxy-x-rhodamine
rpm	rotation par minute
RT-PCR	transcription reverse et réaction de polymérase en chaîne
sec	seconde
TD	tissus digestifs
TV	virus Tulane (Tulane virus)
VHA	virus de l'hépatite A
VLPs	pseudo particules virales (virus-like particule)
VP	protéine virale (viral protein)

Introduction

Pour des raisons de diététique, de tradition ou de disponibilité alimentaire, la consommation de mollusques bivalves a augmenté significativement dans le monde entier. Cet aliment très nutritif renferme des protéines animales de haute qualité et diverses vitamines et oligo-éléments. De plus les chairs sont tendres, faciles à digérer sans additifs et peu transformées. Ces caractéristiques en font un produit alimentaire naturel très attrayant pour les consommateurs. La conchyliculture a augmenté de façon exponentielle pour devenir l'une des industries alimentaires les plus dynamiques particulièrement en Asie. La culture de l'huître, notamment *Crassostrea gigas*, domine la production mondiale de mollusques. La palourde japonaise (*Ruditapes philippinarum*), le pétoncle japonais (*Patinopecten yessoensis*), la moule commune (*Mytilus edulis*) et la coque du sang (*Anadara granosa*) sont également des espèces largement produites. La conchyliculture française se classe au 2^{ème} rang européen, avec une production moyenne de 200 000 tonnes de coquillages par an pour une valeur des ventes de l'ordre de 774 millions d'euros selon le rapport 2009 du Comité National de la Conchyliculture (CNC). L'ostréiculture est la première activité aquacole française avec près de 130 000 tonnes d'huîtres par an, suivie par la production mytilicole avec 65 000 tonnes par an (CNC 2009). Près de la moitié de cette production nationale est consommée au moment des fêtes de fin d'année.

Elevées en zones côtières, bon nombre des espèces commerciales sont communes dans les estuaires côtiers, les zones peu profondes ou dans des zones sèches où les niveaux de nutriments sont élevés et les eaux sont abritées. Mais l'augmentation de la densité de la population et le développement des activités humaines dans les régions littorales a augmenté la vulnérabilité des secteurs conchylicoles par l'exposition des coquillages à des contaminants humains et industriels, rejetés par les émissaires de stations d'épurations. Pour leurs activités physiologiques, les huîtres filtrent de grandes quantités d'eau de mer et concentrent de petites particules, comme les algues. Cependant de façon similaire, elles peuvent concentrer et retenir des pathogènes humains présents dans l'environnement, le plus souvent adsorbés sur la matière particulaire. Les risques posés par la bioaccumulation de microorganismes nuisibles sont aggravés par la consommation traditionnelle de certaines espèces de coquillage crues ou peu cuites. De plus la consommation de l'animal entier, conforte son rôle de support potentiel de

transmission d'agents pathogènes, identifié depuis de nombreuses années. Les maladies comprennent un large groupe de pathologies, mais la gastro-entérite constitue le syndrome clinique le plus fréquent. Il y a encore 50 ans, la majorité des épidémies de gastroentérites liées à la consommation des coquillages était attribué à des bactéries. Des normes basées sur des dénombrements bactériens (*Escherichia coli*) ont alors été établies pour assurer la salubrité des produits mis sur le marché, associées à l'amélioration de la qualité de l'eau des zones de croissance et de récolte. Ces normes ont permis une diminution des épidémies d'origine bactérienne mais la consommation de coquillages constitue un encore risque pour la santé humaine. A l'heure actuelle, même si l'origine de ces gastroentérites n'est pas élucidée dans sa totalité (rôle probable des *Vibrios* et d'autres bactéries), les virus jouent un rôle important et leur implication a été clairement établie dans des phénomènes épidémiques.

Les virus humains susceptibles de contaminer les coquillages, ou tout autre aliment sont les virus présentant un cycle de multiplication entérique. Ces virus, excrétés dans les fèces de malades ou de porteurs sains, sont très variés et appartiennent à plusieurs familles virales. Leurs propriétés fondamentales conditionnent leur devenir en milieu marin. Une fois rejetés dans l'environnement, ces virus ne se multiplient pas, mais vont s'agréger entre eux ou sur des particules. Cette adsorption va leur permettre de persister dans les rejets et de résister aux différents traitements d'épuration. Concentrés par les mollusques filtreurs lors des phénomènes de filtration nécessaire à leur développement physiologique, ces virus pourront être présents dans les coquillages mis sur le marché. Les norovirus humains (NoVs) sont connus comme les principaux agents de gastro-entérite aiguë, toutes classes d'âge confondues, dans les pays développés et en voie de développement. Ces virus appartiennent au genre *Norovirus* de la famille des *Caliciviridae*. Une des principales caractéristiques des NoVs réside dans leur extrême diversité génétique et antigénique. Ce sont les premiers virus pour lesquels il a été montré une sensibilité génétique à l'infection par la reconnaissance des antigènes tissulaires de groupe sanguin, avec divers profils de liaisons. Par ailleurs, si le virus prototype Norwalk a été découvert il y a plus de 40 ans (Kapikian *et al.*, 1972) et malgré des décennies d'efforts, aucun vaccin ni traitement antiviral efficace n'est disponible. Ceci est principalement dû à l'absence d'un système de culture cellulaire et/ou d'un modèle animal pour les NoVs humains. La recherche sur les NoVs humains repose sur des études associant des volontaires humains ou sur l'utilisation de Calicivirus animaux

comme substitut et/ou leurs hôtes naturels. Actuellement, seules les techniques de biologie moléculaire permettent la détection et quantification des NoVs humains, en particulier la méthode RT-PCR en temps réel quantitative.

Les premiers soupçons de la présence de NoVs dans des coquillages ont été rapportés en Grande-Bretagne dans les années 1976-1977 (800 personnes atteintes dans 33 foyers épidémiques) (Appleton and Pereira 1977). Depuis, de nombreuses épidémies de gastro-entérites liées à la consommation de coquillages ont été répertoriées partout dans le monde, mais l'analyse conjointe des coquillages incriminés et des selles de malades a été rarement réalisée. Pendant longtemps, l'huître a été considérée comme simple filtre passif ou piège ionique, concentrant passivement les particules virales par des liaisons non spécifiques. Cependant, certaines observations comme les difficultés rencontrées pour la purification des huîtres, a soulevé l'existence d'interactions plus spécifiques. Lors de précédents travaux de thèse au laboratoire, la fixation spécifique du virus Norwalk aux tissus digestifs de l'huître *via* des antigènes A-like très proche de l'antigène humain a été mise en évidence. Une fixation différente selon les génogroupes NoVs a également été démontrée. En effet, une souche de NoV GII.4 se fixe sur les branchies et le manteau, *via* un acide sialique en liaison α 2,3 tandis que la fixation dans les tissus digestifs implique à la fois l'acide sialique et l'antigène A-like humain. Une étude de terrain a confirmé la sélection préférentielle des NoVs du génogroupe I par les huîtres creuses par rapport au NoVs des génogroupes II et III. Par ailleurs, ces ligands varient selon la saison avec une expression maximale pendant les mois d'hiver et le printemps, favorisant ainsi vraisemblablement la concentration des NoVs par les huîtres.

Ce travail propose une alternative nouvelle pour l'étude de la persistance virale et du pouvoir infectieux des NoVs humains dans les huîtres, inspirée de l'utilisation d'un substitut viral récemment décrit. Le virus Tulane (TV), souche prototype du genre *Recovirus* au sein de la famille des *Caliciviridae* découvert en 2008. Depuis lors, plusieurs autres *Recovirus* ont été décrits et adaptés en culture cellulaire. Des études récentes indiquent que l'épidémiologie, les caractéristiques biologiques, leurs diversité, mais également l'évolution de l'infection et la maladie clinique chez des macaques infectés, reflètent plus étroitement les propriétés des NoVs humains que les autres substituts proposés jusqu'à maintenant.

Cet outil novateur, pouvant être multiplié en culture cellulaire, nous a permis de travailler avec des huîtres artificiellement contaminées, et d'étudier la persistance virale dans les coquillages en milieu naturel pendant deux mois. Ce travail a démontré la pertinence du virus Tulane en tant que substitut des NoVs humains dans les huîtres, travail validé par une publication scientifique.

Après une revue bibliographique portant sur les NoVs, la physiologie des mollusques bivalves, notamment l'huître creuse *Crassostrea gigas*, modèle de notre étude et la contamination de l'environnement par ces virus, nous présenterons nos travaux de thèse portant sur l'évaluation du virus Tulane, comme substitut potentiel des NoVs humains pour étudier leur devenir dans le milieu marin. Ce mémoire se terminera par une discussion sur l'intérêt des travaux de cette thèse en termes de connaissance sur la persistance des NoVs dans les coquillages. Pour conclure, nous aborderons plus largement les perspectives sur lesquelles peuvent déboucher nos travaux et les enjeux de santé publique en particulier l'amélioration de la sécurité sanitaire des coquillages.

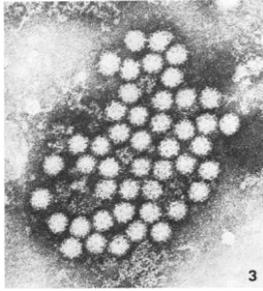
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 1

Norovirus : définition et caractéristiques virologiques

1. Historique

En 1929, Zahorsky fut le premier à décrire le syndrome d'«Hyperemesis hemis» ou «The winter vomiting disease» caractérisé par l'apparition soudaine de diarrhée et vomissements avec une prévalence plus élevée durant les mois les plus froids (Adler and Zickl 1969). En 1968, une épidémie de gastro-entérite se déclara dans une école primaire de la ville de Norwalk (Ohio, Etats-Unis). Cette épidémie atteignit durant deux jours 50 % des élèves et professeurs et 32 % des contacts de ces cas primaires. Malgré de nombreuses analyses aucun agent bactérien, ni autre pathogène connu n'avait pu être identifié dans les prélèvements collectés. Ce n'est qu'en 1972, que Kapikian et coll., ont mis en évidence l'étiologie de ce syndrome. A l'aide de la technique d'immunomicroscopie électronique ils observèrent des particules de 27 nm dans des filtrats d'échantillons de matières fécales provenant de cette épidémie ainsi que dans des prélèvements de volontaires infectés per os par des filtrats de fèces provenant de cette même épidémie (Kapikian *et al.* 1972). Ce petit virus fut baptisé « Norwalk », souche prototype d'un grand groupe de virus non cultivables, constituant à l'heure actuelle les principaux agents d'épidémie de gastro-entérite aiguë chez l'homme. Le clonage moléculaire du génome de la souche Norwalk en 1990, a permis le séquençage du génome complet, ce qui par la suite a conduit à d'importants progrès dans la compréhension d'un point de vue moléculaire, immunologique et épidémiologique de ces virus. La connaissance du génome a permis le développement des premiers tests de diagnostic moléculaire (Xi *et al.* 1990).

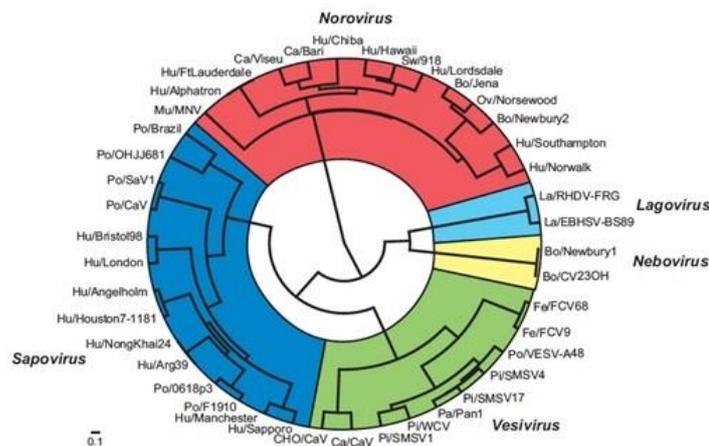


Un agrégat est observé après incubation d'un filtrat de selles avec une dilution au 1: 5 d'antisérum de volontaire. La quantité d'anticorps sur ces particules scintillantes a été marquée comme +1 (X231 500).

Figure 1 : Norovirus en immuno-microscopie électronique (Kapikian *et al.* 1972).

2. Classifications

Ces virus ont dans un premier temps été classés selon des critères morphologiques de microscopie électronique différenciant les «Small Round Structured Viruses» (SRSVs), dont le prototype est le virus de Norwalk. Cette classification était floue et s'est révélée inadéquate lorsque l'on a connu la séquence génomique de ces virus conduisant le Comité International de Taxonomie des Virus (ICTV) à proposer la création d'une nouvelle famille nommée *Caliciviridae*. Le nom de calicivirus vient du mot latin «calyx» qui signifie «calice», la surface des virus présentant, en microscopie électronique des dépressions en forme de calices. Récemment la famille des *Caliciviridae* a été divisée en 5 genres : *Norovirus*, *Sapovirus*, *Vesivirus*, *Lagovirus* et *Nebovirus* basée sur les différences dans l'organisation du génome, les stratégies de codage ou encore la gamme d'hôte (Fig. 2).



Les norovirus sont surlignés en rouge, les lagovirus en bleu clair, les nebovirus en jaune, les vesivirus en vert et les sapovirus en bleu. Deux virus prototypes ont été inclus pour représenter chaque génogroupe, pour certains genres, des souches supplémentaires ont été inclus pour démontrer la circulation dans différentes espèces (par exemple, Po/Sw917 dans norovirus GII).

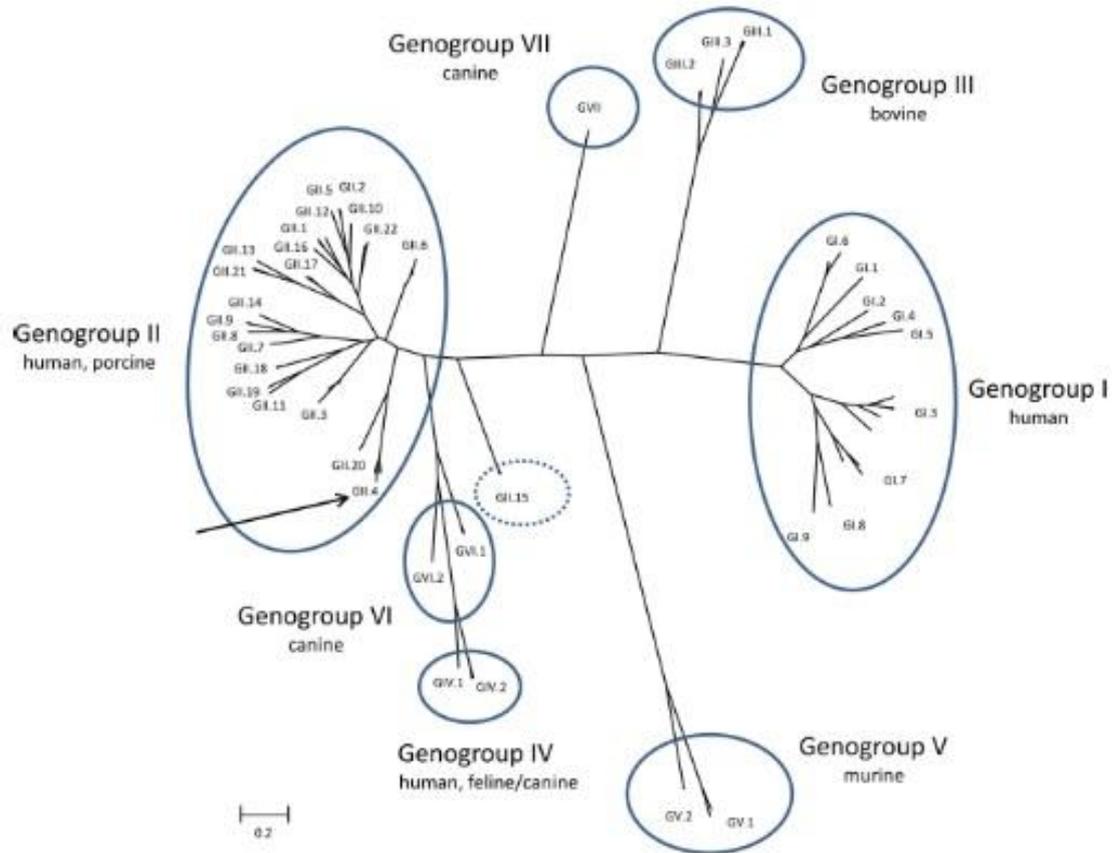
Figure 2 : Relation phylogénétique dans la famille des *Caliciviridae* (ICTV 2012).

Les calicivirus pathogènes pour l'homme sont classés dans deux genres, *Norovirus* et *Sapovirus* qui sont responsables de gastro-entérites aiguës très contagieuses. Les virus du genre *Vesivirus* sont largement distribués dans une grande variété d'espèces de mammifères, où ils provoquent des infections systémiques souvent persistantes associées à des taux élevés de morbidité et mortalité. Les vesivirus se répartissent en deux principaux groupes : les calicivirus félin (FCV) qui infectent les chats domestiques et sauvages, et les «virus de l'océan» comprenant par exemple le virus San Miguel sea lion, largement distribué dans les milieux marins et chez les mammifères terrestres (Neill *et al.* 1995). Le genre *Lagovirus* regroupe les virus de la maladie hémorragique du lapin (RHDV) et les virus du syndrome du lièvre brun européen (EBHSV). Chez ces deux espèces, ces virus provoquent une maladie hémorragique souvent mortelle et des nécroses hépatiques (Thiel H.J. and M. 1999). Les virus du genre *Nebovirus* induisent des diarrhées et des pathologies intestinales aiguës chez les veaux et peuvent également être détectés chez les animaux adultes (Oliver *et al.* 2006; Smiley J.R. 2003; Smiley *et al.* 2002). Plus récemment, d'autres virus ayant des caractéristiques morphologiques et physicochimiques proches de celles des calicivirus ont été identifiés et trois nouveaux genres *Recovirus* (Farkas *et al.* 2008), *Valovirus* (L'Homme *et al.* 2009) et les *Calicivirus du poulet* sont en attente de classification (Farkas *et al.* 2014).

Diversité des norovirus

Les NoVs sont génétiquement et antigéniquement diversifiés. Ils se divisent en génogroupes (G), chaque génogroupe est ensuite divisé en génotypes (Kroneman *et al.* 2013), le GII.4 est divisée en souches ou variants (Siebenga *et al.* 2007). Les comparaisons de séquences de la protéine de capsid VP1 d'un grand nombre de souches de NoVs issus de selles humaines ou de fèces d'espèces animales ont permis de classer les NoVs en 6 génogroupes établies (IG à GVI), tandis qu'un génogroupe provisoire VII est proposé (Fig. 3) (Vinje 2015). Les GI et GII rassemblent les souches les plus fréquemment impliquées dans les infections humaines avec une prédominance importante des souches du GII.4 (White 2014). À ce jour, 9 génotypes ont été reconnus dans le GI, 22 dans le GII, trois génotypes du GII (GII.11, GII.18 et GII.19) ont été détectés uniquement chez les porcs (Wang *et al.* 2007a; Wang *et al.* 2005). Basé sur l'analyse phylogénétique la plus récente, les virus GII.15 pourraient constituer un nouveau génogroupe (Kroneman *et al.* 2013). Le GIII regroupe les souches bovines. Les virus Jena

et Newbury 2 sont les prototypes des génotypes GIII.1 et GIII.2, respectivement (Van der Poel W. 2003; Van Der Poel W.H.M. 2000). Le GIV regroupe des souches humaines peu fréquemment rencontrées, mais aussi des souches isolées chez le lion et le chien (Martella *et al.* 2007; Martella *et al.* 2008). Le GV regroupe des souches murines (Hsu *et al.* 2007; Karst *et al.* 2003) et enfin les GVI et GVII infectent les espèces canines (Vinje 2015).



Pour construire l'arbre phylogénétique, les séquences des capsides de 105 souches représentant la diversité spatiale et temporelle des norovirus provenant de diverses régions géographiques à travers le monde ont été sélectionnées. Les virus appartenant au GI, GII et GIV infectent les humains, à l'exception de GII.11, GII.18 et GII.19 qui infectent les porcins, et GIV.2 qui infectent les canins. Les virus du GII.15 qui ont été détectés que chez les humains, forment un nouveau génotype provisoire (cercle en pointillés). Les virus du GIII infectent les bovins et les ovins. Ceux du GIV.2 infectent les canins. GV.1 et GV.2 infectent des souris et des rats, respectivement et GVI et GVII infectent les canins. Les virus du GII.4 (flèche) sont responsables de la majorité des infections à norovirus à travers le monde. La barre d'échelle reflète le nombre de substitutions d'acides aminés par site.

Figure 3 : Classification des norovirus basée sur la diversité des séquences en acides aminés de la protéine de capsid VP1 complète (Vinje 2015).

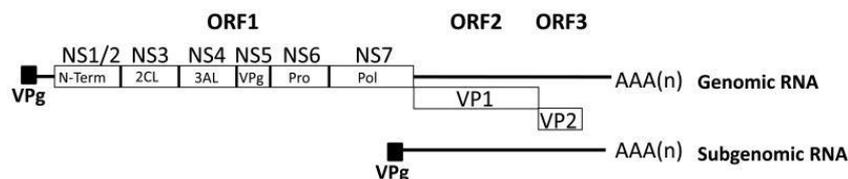
Depuis le milieu des années 1990, pour la classification au sein d'un même génogroupe, des critères basés sur la séquence complète en AA de la protéine majeure de capsid VP1 ont été proposés (Zheng *et al.* 2006). Entre les souches d'un même sous groupe (cluster) la variabilité est comprise entre 0 et 14,1 %. Entre les clusters d'un même génogroupe, cette variabilité est comprise entre 14,3 et 43,8 %. Entre les différents génogroupes, cette variabilité s'étend de 44,9 à 61,4 % (Zheng *et al.* 2006). Considérant les possibilités de recombinaison (Kageyama T. 2004), une classification correcte est particulièrement important pour les NoVs GII.4 en raison de l'émergence de nouveaux variants pandémiques (Bok *et al.* 2009; Zheng *et al.* 2010). L'approche proposée par Zheng et coll., a récemment été complétée avec une proposition pour un système double utilisant à la fois les séquences complètes codant pour la protéine de capsid VP1 et les séquences partielles (1300 nt) codant la polymérase. Avec l'émergence continue de nouveaux génotypes et variants, il est essentiel d'établir une nomenclature standardisée, à travers un groupe de travail internationale sur les NoVs, ce qui permettra une communication efficace sur les lignées épidémiologiquement importantes.

3. Structure des particules virales

Comme les autres membres de la famille des *Caliciviridae*, les NoVs sont des virus sphériques de petite taille 27-40 nm, non enveloppés, ils sont constitués d'un ARN simple brin et d'une capsid à symétrie icosaédrique.

3.1. Organisation génomique

L'ARN génomique des NoVs est un ARN monocaténaire compact de polarité positive dont la taille varie de 7,3 à 7,5 kb à travers le genre (Fig. 4).



Les trois cadres de lecture ouverts codés par les NoVs sont mis en évidence avec les noms des composants individuels matures. Les positions des ARN génomiques et sous-génomiques sont également soulignées.

Figure 4 : Organisation génomique des norovirus d'après (Vashist *et al.* 2009).

Ce génome est organisé en 3 cadres de lecture ouverts (Open Reading Frame, ORF) (Glass *et al.* 2000; Jiang *et al.* 1993; Lambden *et al.* 1993). Les norovirus murins (MNV) possèdent un quatrième ORF chevauchant l'ORF2, mais dans un cadre de lecture alternatif, cet ORF est propre au cluster du MNV au sein du GV et n'a pas encore été identifié chez d'autres NoVs. Le seul membre de la famille des *Caliciviridae* connu pour avoir un quatrième ORF équivalent est le sapovirus humain (Clarke and Lambden 2000; McFadden *et al.* 2011). L'extrémité 5' de l'ARN génomique est liée de manière covalente à une protéine de 15 KDa, codée par le virus, appelé VPg (Viral Protein linked to genome) tandis que l'extrémité 3' est polyadénylée. Les régions non traduites (UnTranslated Region, UTR) à chaque extrémité du génome sont généralement courtes, par exemple, les UTR aux extrémités 5' et 3' dans le génome du MNV contiennent respectivement 5 et 78 nt. L'UTR en région 3' des NoVs humains est constituée d'environ 48 nt (Gutierrez-Escolano A.L. *et al.* 2000; Karst *et al.* 2003; Pletneva *et al.* 2001). Ces UTR contiennent des structures secondaires d'ARN conservées qui s'étendent dans les régions codantes et peuvent être retrouvées dans le génome. Ces structures sont importantes pour la réplication virale, la traduction et la pathogenèse (Bailey *et al.* 2010; McFadden *et al.* 2011; Simmonds *et al.* 2008). L'ORF1 proche de la partie 5' code pour une polyprotéine précurseur, qui par protéolyse donne les protéines non structurales impliquées dans la réplication du virus. Les OFR2 et ORF3, proches de la région 3', sont transcrit en ARNm subgénomique et codent les protéines structurales majeures et mineures respectivement. L'ARN subgénomique est identique au derniers 2,4 kb du génome viral. Il est fixé à l'extrémité 5' de manière covalente à la VPg et en 3' se trouve la queue poly (A) (Herbert *et al.* 1997). L'ORF4 chez le MNV code pour une protéine décrite sous le nom de protéine de virulence 1 (VF1), régulateur de l'immunité inné à localisation mitochondriale (McFadden *et al.* 2011).

3.2. Protéines virales

3.2.1. Protéines non structurales

Pour tous les NoVs, l'ORF1 code une polyprotéine d'environ 200 KDa, clivée par la protéase (NS6) codée par le virus, pour libérer 7 protéines non structurales matures (NS1-NS7) (Seah *et al.* 2003).

Tableau 1 : Nomenclature des protéines non structurales et leurs fonctions.

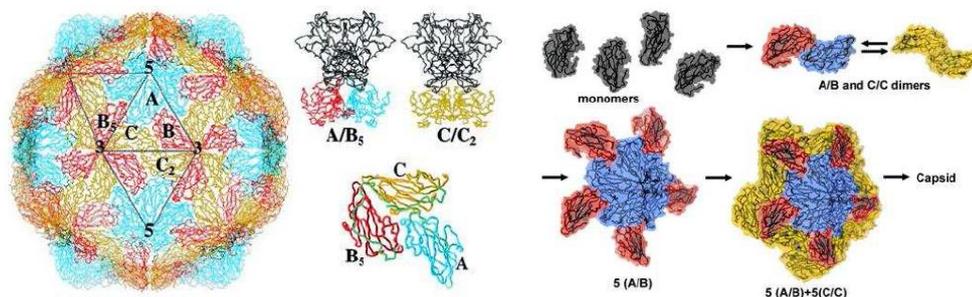
Dénomination		Fonction(s)	Référence(s)
Ancienne	Nouvelle		
P48 (N-term)	NS1/2	Inhibe le trafic des protéines de l'hôte à la surface cellulaire Formation du complexe de réplication*	(Fernandez-Vega <i>et al.</i> 2004)
NTPase (C2-like)	NS3	Fonction ARN hélicase* Fonction NTP ^{ase}	(Pfister and Wimmer 2001)
P22 (3A-like)	NS4	Inhibe la sécrétion des protéines de l'hôte Formation du complexe de réplication*	(Belliot <i>et al.</i> 2005)
VPg	NS5	Protéine liée au génome impliqué dans la traduction et réplication	(Belliot <i>et al.</i> 2008b; Daughenbaugh <i>et al.</i> 2003)
Pro (3-like)	NS6	Protéinase /clivage de la protéine codé par l'ORF1	(Belliot <i>et al.</i> 2003; Kuyumcu-Martinez <i>et al.</i> 2004; Liu <i>et al.</i> 1996)
Pol	NS7	ARN-polymérase ARN-dépendante polymérase et nucléotidylatation de la protéine VPg	(Belliot <i>et al.</i> 2005)

* Fonction proposée mais pas encore démontrée.

3.2.2. Protéines structurales

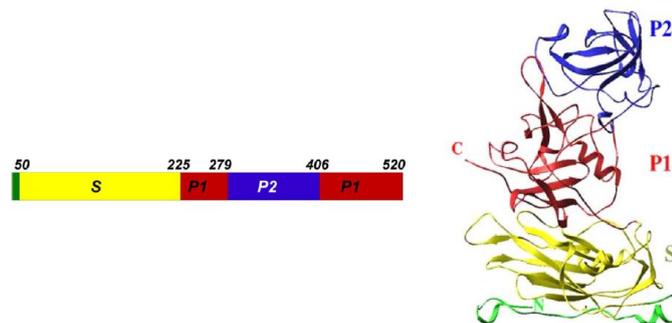
3.2.2.1. Protéine de capsid VP1

La structure de la capsid du virus Norwalk a été déterminée par des études de cryo-microscopie électronique et de cristallographie par rayons X (Prasad *et al.* 1999). Ces études ont montré que la capsid est constituée par l'association de 180 protéines VP1 s'organisant en 90 dimères, formant chacun une arche à la surface de la capsid suivant une symétrie icosaédrique ($T = 3$) (Chen *et al.* 2004; Prasad *et al.* 2001; Prasad *et al.* 1999; Prasad *et al.* 1994). L'assemblage des protéines VP1 ne requiert ni la présence de l'ARN génomique (Jiang *et al.* 1992), ni celle de la protéine mineure de capsid VP2 pour la formation du virion (Fig.5).


Figure 5 : Structure et assemblage de la protéine de capsid VP1 (Prasad *et al.* 1999).

La taille de la protéine VP1 varie de 530 à 555 AA avec un poids moléculaire calculé de 58-60 kDa. Cette protéine ne subit aucune modification post-traductionnelle. La protéine VP1 est organisée en plusieurs domaines: deux domaines conservés, flanqués d'un domaine variable central qui porte les déterminants antigéniques qui définissent la spécificité de souche (Fig.6).

- **Le domaine N** : Constitue la partie N-terminale et se situe sur la face interne de la capsid.
- **Le domaine S (Shell)** : Essentiel à la formation de la capsid et correspond à la région la plus conservée de VP1.
- **Le domaine P (Protruding)**: Protubérant, constituant la partie externe de la capsid qui correspond au domaine variable de VP1. Ce dernier est divisé en deux sous-domaines ; *P1* et *P2* (Chen *et al.* 2006; Chen *et al.* 2004; Prasad *et al.* 1999). Les domaines P interagissent dans les contacts entre les dimères qui augmentent la stabilité de la capsid et forment les saillies observées par microscopie électronique sur les virions
- **Le sous-domaine P1** : La variabilité de séquence est faible.
- **Le sous-domaine P2** : Intégré entre les deux séquences du sous-domaine P1. Cette région est exposée à la surface de la capsid et présente une très grande variabilité de séquences. Cette variabilité génétique est associée à la variabilité antigénique et comporte le site de fixation aux récepteurs cellulaires (Chakravarty *et al.* 2005; Nilsson M. 2003).



Le schéma illustre les domaines de VP1 et les couleurs correspondent à la structure du monomère. Le petit domaine N-terminal (AA 10-49, vert) est tourné vers l'intérieur de la particule. Le domaine Shell (S) est de couleur jaune et s'étend de l'AA 50 à 225. Les sous-domaines P1 sont colorés en rouge et comprennent les AA 226-278 et résidus 406-520. Le sous-domaine P2 (bleu) se compose des AA 279-405. La région hypervariable de VP1 se trouve dans le sous-domaine P2. Les numéros d'AA désignent le premier résidu dans le domaine suivant.

Figure 6 : Représentation du monomère de la protéine VP1 (Hardy 2005).

3.2.2.2. Protéine VP2

La taille de la protéine VP2 varie de 208 à 268 AA avec un poids moléculaire calculé de 22-29 kDa. Sa séquence est très variable entre les souches et peut être présente en une ou deux copies par virion (Seah *et al.* 1999). D'abord décrite chez le virus RHDV (Wirblich *et al.* 1996), elle a ensuite été mise en évidence chez les NoVs et d'autres calicivirus (Glass P.J *et al.* 2000; Sosnovtsev and Green 2000). La protéine VP2 n'est pas nécessaire pour l'assemblage des particules virales, mais est essentiel pour la production de virus infectieux évaluée chez le FCV (Sosnovtsev *et al.* 2005). Le rôle de VP2 dans le cycle de réplication n'est pas encore connu. La VP2 est une protéine basique avec un point isoélectrique calculé > 10 , cette propriété chimique a conduit à la suggestion que VP2 se lirait à l'ARN (Glass *et al.* 2000). Une extension de cette idée est que VP2 pourrait être impliquée dans l'emballage de l'ARN génomique.

4. Multiplication in vitro des norovirus

Actuellement, il n'existe aucun système de culture cellulaire efficace pour multiplier les NoVs humains, mais la littérature rapporte de nombreuses tentatives. Dans une approche expérimentale, Duizer et coll., ont testé des cellules épithéliales gastro-intestinales humaines ainsi que d'autres tissus humains et animaux (A549, AGS, Caco-2, CCD-18, CERFK, CR-PEC, Detroit 551, Detroit 562, FRhK- 4, HCT-8, HeLa, HEC, Hep-2, n Ht- 29, Hutu-80, I-407, IEC-6, CEI-18, Kato-3, L20B, MA104, MDBK, MDCK, RD, TMK, Vero et 293) afin de définir un système de culture cellulaire de routine, sans succès (Duizer E. 2004). De plus, l'induction de la différenciation des cellules avec des substances telles que l'insuline, le DMSO ou l'acide butyrique, l'addition de nombreuses enzymes digestives bioactives, l'utilisation de différentes techniques de préparation de l'inoculum et techniques d'inoculation, ou l'utilisation de différents génotypes pour l'infection, ont toutes échouées (Duizer E. 2004).

Des travaux ont démontré que la transfection des cellules de l'hépatome humain Huh-7 avec un ARN de NoVs donnait lieu à une réplication virale, à l'expression d'antigène viraux et à la production de particules virales, indiquant que l'ARN viral est infectieux (Guix *et al.* 2007). Cependant la réplication de l'ARN transfecté dans les cellules Huh-7 conduit à un seul cycle, les virus nouvellement synthétisés n'étaient pas en mesure d'infecter d'autres cellules, suggérant que le(s) facteur(s) manquant(s) nécessaires à la

culture *in vitro* pourrait être associée à l'entrée virale (Co-recepteur, facteur de décapsidation) (Guix *et al.* 2007).

In vivo, les cellules des tissus et organes se développant dans trois dimensions (3D) sont dans un état de différenciation différent des cellules en culture monocouche. Une des explications possibles de l'incapacité des NoVs humains à croître en culture cellulaire pourrait être l'absence de facteur ou de caractéristique spécifique au cours de la différenciation, comme par exemple une vraie polarisation apicale et baso-latérale des cellules. Cette hypothèse a été testée dans une étude publiée utilisant des modèles de culture en 3D de cellules humaines d'épithélium du petit intestin (RC-407), infectés par une souche de NoVs extraite d'une selle (Straub *et al.* 2007). En utilisant ce modèle Straub et coll., ont pour la première fois, dans un système de culture *in vitro* une infection par les NoVs GI et GII. Les cellules infectées ont présenté un effet cytopathique avec une vacuolisation et un raccourcissement des microvillosités. En outre, la présence de particules dont la taille correspond à celle des NoVs a été identifiée dans les cultures infectées. La PCR associée à l'hybridation *in situ* ont révélé la présence de l'ARN viral sur 5 passages cellulaires, mais ils n'ont pas réussi à différencier l'ARN viral nouvellement synthétisé de celui inoculé. Le facteur essentiel permettant l'infection de cellules cultivées dans le modèle 3D reste à identifier. Si le modèle 3D semble prometteur, des validations supplémentaires sont nécessaires et aucun autre laboratoire n'a pu reproduire ce résultat. En outre, la méthode est coûteuse, techniquement exigeante et nécessite un équipement spécialisé (Straub *et al.* 2007).

Un autre outil disponible pour l'étude des interactions virus-hôte ou pour tester des médicaments antiviraux potentiels est l'utilisation d'un système de réplicon viraux. Ce sont des ARN auto-répliatif qui sont maintenus dans des lignées cellulaires par l'intermédiaire de la sélection d'un marqueur de résistance à un médicament inséré dans le génome de l'ARN viral. En utilisant la ligné humaine Huh-7 ou hamster BHK-21, Chang et coll., ont réussi à générer un système de réplicon stable pour le NV (Chang *et al.* 2006). Ces cellules sont capables d'exprimer de façon stable un ARN auto-répliatif sur plusieurs passages, cet ARN code pour le gène de résistance à la néomycine à la place de la protéine VP1, ce qui a permis la sélection des cellules exprimant l'ARN avec le G418. En utilisant ce système, diverses molécules antivirales potentielles, ont été identifiées comme l'Interféron alpha, l'Interféron gamma, la Ribavirine (Chang and George 2007) ou des oligomères phosphorodiamidiate morpholino peptide conjugué (PPMOs) dirigé contre l'extrémité 5' du génome viral (Bok *et al.* 2008).

Très récemment, Jones et coll., ont mis au point un modèle *in vitro* d'infection pour les NoVs humains en démontrant que ces derniers et les NoVs murins infectent les cellules B *in vitro* et probablement *in vivo*. Après inoculation de la ligné de cellules B humaines BJAB avec un échantillon de selle contenant la souche GII.4-Sydney, une augmentation significative x10 et x25 du nombre de copies du génome virale a été observée après 3 et 5 jours, respectivement. L'infection primaire des cellules BJAB a abouti à la production de nouvelles particules virales infectieuses. Cette infection a été considérablement renforcée par la présence de molécules d'HBGAs libres ou par des bactéries exprimant les HBGAs. Il est donc probable que les tentatives précédentes de cultiver les NoVs humains ont échoué à cause de la nature des cellules testées et l'absence de molécules de stimulation. En outre, la réplication de NoVs murin *in vivo* a été réduite lorsque le microbiote intestinal a été appauvri par l'administration d'antibiotiques par voie orale, démontrant un rôle biologiquement important des bactéries entériques au cours de l'infection à NoVs (Jones *et al.* 2014). Toutefois ces résultats sont controversés.

5. Propriétés antigéniques

Les antigènes des NoVs correspondent aux différents épitopes présents sur la protéine majeure de capsid VP1. La culture n'étant pas disponible, le sérotypage par neutralisation est donc impossible. Mais grâce aux techniques de biologie moléculaire, des pseudos particules virales (VLPs) ont été produites par l'expression de la protéine majeure de capsid VP1 avec ou sans la protéine mineure de capsid VP2 dans un système d'expression. Les protéines produites s'auto assemblent pour former des VLPs qui expriment toutes les caractéristiques morphologiques et structurales des virus natifs. Le plus souvent, ces VLPs sont exprimées dans des cellules d'insectes en utilisant des systèmes d'expression Baculovirus (Green *et al.* 1997; Jiang *et al.* 1992). Des VLPs ont été également produites dans des cellules humaines, soit par transfection directe (Taube *et al.* 2005) ou par l'utilisation de réplicons viraux (Baric *et al.* 2002) ou dans des plantes telles que la tomate (Baric *et al.* 2002) ou la pomme de terre (Tacket *et al.* 2000). L'utilisation de VLPs a grandement facilité les études portant sur l'identification des interactions protéine-protéine entre l'hôte et le virus. De plus, les caractéristiques antigéniques des VLPs sont similaires à celles des particules virales natives, facilitant leur utilisation comme modèle pour les études immunologiques ou le développement de tests diagnostique ou de vaccins (Tacket *et al.* 2000).

6. Infections à norovirus humains et diagnostic biologique

6.1. Manifestations cliniques

Après une courte période d'incubation le plus souvent de 24 à 48 heures, l'infection se caractérise typiquement par des vomissements souvent en jets incontrôlables et une diarrhée (non sanglante) d'apparition brutale. Ces signes peuvent s'accompagner de douleurs abdominales, de nausées, de fièvre peu élevée (dans 37 à 45 % des cas), de douleurs musculaires, de maux de tête et de frissons. Les vomissements sont le plus souvent au premier plan surtout chez les enfants mais des tableaux avec diarrhée prédominante sont aussi possibles principalement chez les adultes. La maladie se résout, le plus souvent spontanément en 2 à 3 jours chez les immunocompétents (Koopmans M. *et al.* 2002). Elle peut durer plus longtemps (4 à 6 jours) chez les enfants de moins de 11 ans et dans les épidémies nosocomiales (Pang X.L. 1999; Rockx B. 2002). Des complications comme la déshydratation avec prostration, altération importante de l'état général peuvent nécessiter une hospitalisation ou entraîner le décès, en particulier chez les personnes âgées, ayant des pathologies chroniques (ex. diabète, cancer, traitement immunosuppresseur) ou chez les immunodéprimés ("Norovirus activity-United States, 2006-2007" 2007; Chehade *et al.* 2012; Gustavsson *et al.* 2011; Mattner *et al.* 2006; Roddie *et al.* 2009). Chez des militaires britanniques engagés en Afghanistan, l'infection a été d'une nature et d'une sévérité inhabituelle au point de justifier un rapatriement d'urgence. Un cas de coagulation intravasculaire disséminée a même été décrit chez ces soldats (Bailey *et al.* 2005). Il est donc probable qu'en situation de stress les NoVs puissent être responsables d'une maladie mortelle en l'absence de soins intensifs. Des études chez des volontaires sains ont montré qu'environ 30 % des personnes infectées restaient asymptomatiques (Atmar *et al.* 2008).

6.2. Immunité et norovirus

6.2.1. Réponse immunitaire humorale

La plupart des données concernant l'immunité protectrice envers les NoVs humains ont été recueillies à partir d'études sur volontaires et d'études de cohorte à partir d'épidémies. L'immunité envers les NoVs est compliquée par les réponses hétérogènes de la population humaine et de la nature transitoire de l'immunité chez certaines personnes. Les données disponibles sur la protection après une infection sont souvent contradictoires. Les premières études sur volontaires ont montré l'existence d'une

immunité à court terme pour le NV (Parrino *et al.* 1977). Une étude récente sur les vaccins a montré que la vaccination par voie intranasale avec des VLPs GI.1, protégeait contre la maladie trois semaines après la vaccination (Atmar *et al.* 2011). L'existence d'une immunité à long terme est plus controversée. Plusieurs études ont montré que des réponses protectrices contre le GI.1 étaient présentes six mois après contact avec le virus, chez certains mais pas tous les individus (Atmar *et al.* 2011; Johnson *et al.* 1990b; Reeck *et al.* 2010). L'étude des réponses en IgA contre le NV indiquent qu'une réponse précoce en IgA salivaire (1-5 jours), plutôt qu'une réponse tardive, est en corrélation avec une protection contre l'infection chez les individus sensibles, ce qui suggère que l'exposition précédente à une souche a suscité une réaction mémoire protectrice contre cette souche (Lindesmith L. 2003). Le remplacement rapide des souches épidémie GII.4 par de nouveaux isolats tous les 3-7 ans est compatible avec une immunité protectrice à long terme dans une partie de la population (Siebenga *et al.* 2010). Les Ac anti-GI et GII sont élevés dans les sérums lors de l'infection aiguë, bien que les schémas de blocage croisé soient spécifiques du génogroupe (Lindesmith *et al.* 2010; Reeck *et al.* 2010). Les sérums prélevés chez des patients infectés par une souche du GI, ont une réaction croisée à l'intérieur du génogroupe et le titre en Ac est parfois plus élevés pour une souche hétérologue après l'infection (Lindesmith *et al.* 2010; Lindesmith *et al.* 2008). Cependant, ces Ac ne protègent pas contre les souches du GII (Cannon *et al.* 2009). Les sérums prélevés chez des patients infectés par une souche du GII, ont des réponses homologues spécifiques de souches beaucoup plus élevés, ces réponses de blocage ne sont pas étendues au GI (Lindesmith *et al.* 2011; Rockx *et al.* 2005a). Ces études sont compliquées par les antécédents d'exposition dans les populations humaines, couplées à une mauvaise compréhension des relations sérologiques entre les souches. L'utilisation de sérums de souris ciblant des souches individuelles, a montré que la réactivité contre le génotype GI est d'environ 5 à 10 % des réponses homotypiques et est inférieure à 5 % entre génogroupes (LoBue *et al.* 2006). L'exposition simultanée de rongeurs ou de lapins à des souches multiples augmente de manière significative les réponses en Ac de réactivité croisée, ce qui suggère que des schémas complexes de réactivité croisée peuvent exister au sein de multiple génotypes du GI ou GII, ou la répétition et/ou l'exposition multivalente sélectionne des anticorps de haute affinité qui tolèrent des variations à l'intérieur des épitopes cibles (LoBue *et al.* 2006; Parra *et al.* 2012). Par ailleurs, des études sur des volontaires réalisées aux États-Unis pour évaluer le pouvoir pathogène et immunogène des NoVs ont révélé que, parmi les individus dépourvus d'anticorps avant

l'ingestion de virus, certains étaient sensibles à l'infection et développaient une réponse en anticorps, alors que d'autres restaient asymptomatiques tout en présentant une séroconversion et en excréant du virus pendant plusieurs semaines, suggérant des contaminations inapparentes. Une troisième catégorie de sujets restait insensible à l'infection expérimentale et ne développait pas d'anticorps (Graham *et al.* 1994; Johnson *et al.* 1990a; Parrino *et al.* 1977; Rockx B. 2002). L'existence de ces différents groupes d'individus suggérait que des facteurs non immunologiques et notamment d'ordre génétique pouvaient jouer un rôle dans la protection et/ou la résistance aux infections par les NoVs humains. Cela a été confirmé dans le courant des années 2000 quand l'implication des antigènes tissulaires de groupe sanguin a été démontrée.

6.2.2 Réponse immunitaire cellulaire

Le rôle joué par les cellules T dans le contrôle de l'infection à NoVs est complexe et n'est pas bien caractérisé. L'infection ou la vaccination par des NoVs humains provoque une réponse principalement de type CD4+ Th1, ce qui conduit à une sécrétion accrue d'IFN-gamma et d'IL-2 (Lindesmith *et al.* 2005; Lindesmith *et al.* 2010). Une étude utilisant des PBMC humains a démontré que les réponses des cellules T montrent plus de réactivité croisée entre les souches GII ayant une parenté antigénique élevée (Lindesmith *et al.* 2005), tandis qu'une autre étude a révélé que chez certains individus, les réponses des lymphocytes T envers les souches GI successives ont été plus robustes que l'immunisation par la souche NV (Lindesmith *et al.* 2010). Des études supplémentaires utilisant un large éventail de génotypes sont nécessaires pour caractériser les réponses des lymphocytes T et de leurs relations dans le contrôle de l'infection humaine.

6.3. Méthodes de détection des norovirus humains

La propagation rapide des NoVs est un enjeu majeur en santé publique, le diagnostic rapide en laboratoire est essentiel pour aider à la mise en œuvre de mesures de contrôle appropriées afin de réduire la propagation du virus et l'ampleur des épidémies. Un test rapide et simple serait une alternative intéressante aux autres techniques plus exigeantes (Tableau 2). Bien que les NoVs puissent être détectés dans les écouvillonnages rectaux et les vomissements, les échantillons de selles restent les échantillons cliniques de choix pour la détection des NoVs car ils contiennent une plus grande quantité de virus.

6.3.1. Microscopie électronique

Bien qu'historiquement la microscopie électronique (ME) ait été la technique de choix, en l'absence de réactifs adéquats, pour la découverte de nombreux virus entériques, cette approche a été progressivement remplacée par les techniques de biologie moléculaire plus simples d'utilisation. Cette technique coûteuse et insensible, n'est donc pas largement disponible dans les laboratoires de diagnostic, elle reste un outil de recherche. La limite de détection de la ME varie de 10^6 à 10^7 particules virales, cette limite peut être plus faible avec l'utilisation d'Ac fluorescents. La ME permet la visualisation directe des particules virales et peut distinguer les particules intactes des coquilles de capsid «vides» qui apparaissent généralement comme des fantômes avec un centre dense aux électrons due à l'accumulation du colorant et une périphérie extérieure brillante. Bien que la technique soit relativement insensible, elle reste utile pour la détection d'agents pathogènes viraux émergents mais présente peu d'utilité pour la détection de la contamination dans les aliments et les échantillons environnementaux (Knight *et al.* 2013).

6.3.2. Techniques immunologiques

Des tests immunoenzymatiques sous forme de trousse commerciales Elisa ou d'immuno-chromatographie sont disponibles. Les dosages immuno-chromatographiques à flux latéral (ICG) ne nécessitent pas de matériel de laboratoire spécialisé et sont conçus pour les tests rapides (15 min) d'échantillons individuels. Dans une évaluation récente des

Tableau 2: Vue d'ensemble des tests de laboratoire pour la détection des norovirus (Vinje 2015).

Test de laboratoire (s)	Avantage	Durée (échantillon → résultat)	Test autorisé par la FDA (510k)	Inconvénient	Marché
Microscopie électronique	Capacité à détecter de multiples pathogènes viraux	15 min		Équipement et formation coûteux; faible débit; insensible	Laboratoires de Référence
Immunologique					
Immunoenzymatique	Haute spécificité, haut débit	60 à 90 min	R-Biopharm	Sensibilité de 57 à 76 %	Santé publique, laboratoires cliniques
Immunochromatographique	Haute spécificité, aucun équipement spéciale un seul échantillon peut être testé	15 min		Sensibilité de 35-52 %	Points de soin
Moléculaires					
RT-PCR classiques	Les produits de PCR peuvent être séquencés et utilisés pour le typage	5-6 h ^a		Les résultats doivent être confirmée par séquençage ou hybridation	Laboratoires de Référence
RT-PCR en temps réel	Haute spécificité, sensibilité et débit; possibilité de multiplex cibles	3h ^a		Équipement PCR requis; spécificité clinique réduite	
Plateformes moléculaires de diagnostique multiple					
xTAG GPP	Haute sensibilité, haut débit; détecte 11 différents pathogènes entériques	5h ^a	Luminex Corporation	Equipement et kit coûteux	Santé publique, laboratoires cliniques
FilmArray GI Panel, Verigene Enteric Pathogens Test	Comprend l'extraction d'acide nucléique; détecte 23 (FilmArray) et 9 (Verigene) différents pathogènes entériques; un seul échantillon peut être testé	2h	Biofire Diagnostics Inc.; Nanosphere Inc.; tests d'autres companies en fonction de l'autorisation 150K	Equipement et kit coûteux	Laboratoires cliniques

^a sans extraction d'acides nucléiques.

4 tests ICG NoVs, en utilisant un panel complet d'une grande variété de génotypes, la spécificité de tous les essais était de 100 %. Cependant, la sensibilité globale a varié de 35 % à 52 % et était dépendante du génogroupe. Ainsi, pour les souches du GI la sensibilité a varié de 17 % à 52 %, tandis que pour les virus GII.4 la sensibilité a varié de 59 % à 78 % (Ambert-Balay and Pothier 2013). Ces résultats étaient significativement inférieurs à ceux présentés par d'autres chercheurs, ainsi que par les différents fabricants de kits ICG, ce qui suggère qu'une évaluation robuste des tests NoVs nécessite une validation avec un panel d'échantillon de selles contenant une grande variété de génotypes GI et GII différent (Ambert-Balay and Pothier 2013). Le développement d'un test immunoenzymatique global pour les NoVs a été difficile en raison du nombre important des génotypes antigéniquement distincts et la dérive antigénique de certaines souches au fil du temps. Bien que des anticorps monoclonaux spécifiques de génogroupe ont été décrits, la plupart des kits commerciaux, y compris le IDEIA Norovirus EIA (Oxoid, Hampshire, Royaume-Uni), SRSV (II)-AD (Denka Seiken Co. Ltd., Tokyo, Japon), et RIDASCREEN (r-Biopharm AG, Darmstadt, Allemagne), comportent une combinaison de plusieurs anticorps mono et polyclonaux de réactivité croisée. La sensibilité de ces kits est typiquement < 70 %, tandis que la spécificité est généralement > 90 %, selon le but du diagnostic (épidémie ou cas sporadiques), le nombre d'échantillons testés par épidémie et le temps entre l'apparition des symptômes et le prélèvement. Le consensus scientifique général est que ces tests sont intéressants pour le diagnostic lors des enquêtes épidémiologiques, avec de nombreux échantillons disponibles, la détection de virus dans quelques cas pouvant être suffisante pour la confirmation étiologique mais en raison de la faible sensibilité, la prudence devrait être exercée dans l'interprétation des résultats sur des cas sporadiques (Costantini *et al.* 2010).

6.3.3. Techniques moléculaires

Au milieu des années 1990, les premières RT-PCR classiques ou en point final ont été développées, ciblant une petite région relativement conservée du gène de l'ARN polymérase dans l'ORF1 (région A). Avec l'augmentation du nombre de séquences disponible au cours de ces dernières années, ces techniques ont été rapidement remplacées par tests de deuxième génération qui se sont avérés plus largement réactifs et capable de détecter la majorité des souches circulantes de NoVs. Un de ces premiers essais est, dans un format légèrement modifié, encore utilisé avec succès pour la détection

et le typage des NoVs (Vennema H. 2002). La mise au point de tests RT-PCR en temps réel a permis d'augmenter la spécificité et la sensibilité. Cette technique présente l'avantage de ne pas nécessiter une analyse en gel d'agarose ni confirmation ultérieure, si une sonde d'hybridation est utilisée et dans la plupart des protocoles des sondes d'oligonucléotide marquées avec un fluorophore sont utilisées. Les techniques de RT-PCR en une étape «One-step RT-PCR», dans lesquels la transcription inverse et l'amplification de l'ADNc sont réalisées en une seule réaction, nécessitant moins d'étapes de traitement des échantillons ce qui a l'avantage de diminuer le risque de contamination croisée. Cette approche constitue le format préféré dans les laboratoires cliniques. Parce que seule une petite région du génome des NoVs est suffisamment conservée pour le développement d'amorces et sondes spécifiques de génogroupe (Katayama H. 2002), la plupart des tests ciblent la région de jonction ORF1-ORF2 (Kageyama T. 2003; Vega *et al.* 2011). Au cours des dernières années, ces tests sont devenus la technique privilégiée pour la détection rapide et sensible des NoVs dans les échantillons cliniques (selles, vomissures, sérum) ainsi que dans les aliments, l'eau et les échantillons environnementaux. De plus, ces tests comprennent des contrôles externes d'extraction permettant de réduire les résultats faussement négatifs et sont capables de détecter simultanément les souches GI et GII (Rolfe *et al.* 2007) ou les souches GI, GII, et les GIV (Miura *et al.* 2013). Ces techniques peuvent également être utilisées pour déterminer la quantité d'acide nucléique dans un échantillon d'une manière semi-quantitative.

Un nombre significatif de patients excrètent le virus 3 semaines après que les symptômes cliniques aient disparus. Les NoVs sont également fréquemment détectés dans les échantillons de selle de patients asymptomatiques en particulier, chez les enfants de moins de 5 ans. Ainsi, la détection de virus par RT-PCR quantitative ne correspond pas toujours à une maladie. Cela rend l'interprétation de résultats positifs, en particulier ceux déterminés à partir d'échantillons avec une faible charge virale difficile. Des données additionnelles provenant d'études portant sur des séries de taille considérable d'échantillons sont nécessaires pour déterminer des valeurs robustes de C_T afin d'interpréter les résultats de RT-PCR quantitative. Ces valeurs limites peuvent dépendre de nombreuses variables telles que la date de prélèvement de l'échantillon, la plate-forme PCR, réactifs ou kits utilisés et la population de l'étude (par exemple, échantillons d'épidémies/cas sporadiques).

6.3.4. Plateformes de diagnostic

Au cours des dernières années, plusieurs plateformes de diagnostic de multi-pathogènes gastro-intestinaux ont été développées pour la détection simultanée de pathogènes entériques: virus, bactéries et parasites (Tableau 2). Les plateformes xTAG GPP (Luminex Corporation, Toronto, Canada), FilmArray GI Panel (BioFire Diagnostics Inc., Salt Lake City, UT, USA), et Verigene Enteric Phogens Test (EP) (Nanosphere, Northbrook, IL, USA) ont été récemment autorisés par la FDA (Food and Drug Administration) et offrent actuellement les tests commercialisés les plus complets pour le diagnostic des gastro-entérites. La version approuvée par la FDA de la plateforme xTAG GPP détecte simultanément les NoVs GI et GII, les rotavirus du groupe A, sept espèces bactériennes et deux espèces de parasites (Navidad *et al.* 2013), tandis que la plateforme FilmArray GI Panel détecte 23 pathogènes entériques, y compris les NoVs GI et GII, les rotavirus du groupe A, adénovirus du groupe F, sapovirus et astrovirus, 14 espèces bactériennes, et quatre espèces de parasites. Le Verigene Enteric Phogens Test détecte 5 espèces bactériennes, 2 Shiga toxines, les rotavirus et NoVs. Les plateformes Biofire et Luminex sont en mesure de faire la distinction entre les NoVs GI et GII. Cependant, il y a des différences significatives entre ces tests, y compris le flux du travail et les différences de débit (Tableau 2). Le xTAG GPP peut compléter l'analyse de 24 échantillons en 5 heures, mais cela ne comprend pas la préparation et l'extraction des échantillons. En revanche les systèmes FilmArray et Verigene ont réduit le temps d'analyse à 2 heures, mais l'inconvénient de ces systèmes dans leurs formats actuels est leur faible débit, puisque sur l'instrument un seul échantillon peut être traité à la fois, ce qui peut poser problème pour les laboratoires cliniques ayant un débit modéré à élevé. Un autre défi pour ces systèmes est celui de l'interprétation des résultats, en particulier avec le nombre élevé d'infections mixtes et le manque de données quantitatives pour déterminer l'agent pathogène responsable de la maladie (Khare *et al.* 2014). Si aucun diagnostic de laboratoire ne peut être effectué (par exemple, en l'absence de prélèvement), les infections à NoVs peuvent aussi être détectées sur la base du profil clinique et épidémiologique, ces critères ont été utilisés avec succès pour différencier les gastro-entérites provoquées par les NoVs des autres causes. Ces critères de Kaplan (Kaplan *et al.* 1982) sont basés sur (i) une durée moyenne de la maladie entre 12 et 60 h, (ii) une période d'incubation moyenne de 24 à 48 h, (iii) des vomissements chez > 50 % des patients et (iv) l'absence de bactéries pathogènes détectés dans les échantillons de selles. Ces critères sont très

spécifiques (99 %) et modérément sensible (68 %) pour les épidémies d'origine alimentaire mais peuvent ne pas être valables pour les épidémies en milieu hospitalier, où la durée des symptômes peut dépasser 72 h (Vinje 2015).

6.3.5. Génotypage

Les NoVs sont classés en génogroupe et génotypes base sur la diversité en AA de la séquence complète de la protéine VP1. Mais comme la recombinaison dans la région de jonction des ORF1-ORF2 est commune et comme certains génotypes de capsidie semblent être plus enclins à la recombinaison que d'autres, un système à double nomenclature a été proposée utilisant à la fois la région de l'ARN polymérase dans l'ORF1 et les séquences de VP1 (Kroneman *et al.* 2013). Le système de nomenclature comprend des informations sur le génogroupe, le génotype, et pour les souches de GII.4 le type de variant. Par exemple, si les deux séquences de POL et capsidie (CAP) sont connues, le nom de la souche doit être rédigé comme suit : norovirus GII/Hu/US/2010/GII.P12-GII.12/HS206. Lorsque seules les séquences CAP sont disponibles, la souche doit être rédigée comme suit : norovirus GII/Hu/AU/2012/GII.4 Sydney/Melbourne 456. Parce que le séquençage complet du gène VP1 n'est pas actuellement une procédure de routine, les séquences nucléotidiques de régions relativement petites de l'ORF1 (POL ou la région A) ou de l'ORF2 (CAP ou régions C et D) du génome des NoVs sont utilisées pour génotyper les souches. Les tests utilisant la région C sont en général plus robuste car les faibles températures (40°C) d'alignement requises pour la région D augmente la probabilité d'amplification non spécifique, de plus la région D est située dans la partie la plus variable de ORF2. Une classification en sous-groupe est déterminée sur la base de la diversité des séquences nucléotidiques dans la région C et la région D, plusieurs génotypes sont composés de quatre sous-groupes différents (par exemple, GI.3a à GI.3d). Par conséquent, les séquences de référence représentative de chaque sous-groupe sont nécessaires pour le typage correct de ces souches. Un outil en ligne de typage des NoVs humains est disponible pour la polymérase et la capsidie (Kroneman *et al.* 2011). Le génotypage des souches de NoVs humains est important, car certains génotypes sont le plus souvent associé à une transmission d'origine alimentaire tandis que d'autres (par exemple GII.4) sont associés à des maladies plus sévères. Grâce à la standardisation du génotypage réalisé par les réseaux de surveillance tels que *CaliciNet* et *NoroNet*, il sera plus facile d'identifier de nouvelles souches émergentes ou d'épidémies avec des sources communes et fournir des informations utiles

sur la répartition des souches dans différentes populations, ce qui est important pour les formulations de vaccin NoVs (Debbink *et al.* 2014).

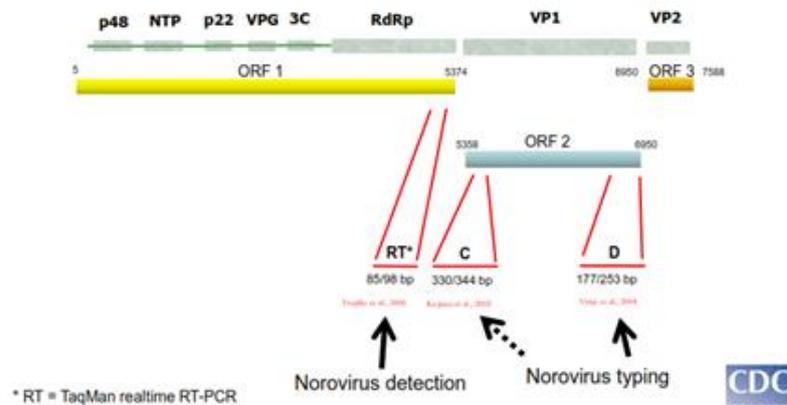


Figure 7 : Régions génomiques ciblées pour la détection et le génotypage des norovirus (Vinje).

6.4. Contrôle et prévention

Il n'existe pas de traitement spécifique contre les infections à NoVs humains, le traitement symptomatique consiste à prévenir la déshydratation. La prévention des épidémies à NoVs repose actuellement sur l'identification du mode de transmission, le contrôle de la contamination de l'eau et des aliments, l'hygiène stricte des manipulateurs de denrées alimentaires et la réduction de la propagation secondaire des épidémies par transmission de personne à personne.

Actuellement, il n'existe aucun vaccin disponible contre les NoVs humains. Les obstacles les plus importants au développement d'un vaccin efficaces sont : le grand nombre de variants antigéniques, une compréhension incomplète des composantes de l'immunité protectrice, l'effet inconnu de l'exposition constante aux virus en circulation sur la réponse vaccinale. En outre, l'effet de la susceptibilité génétique de l'hôte à l'infection sur l'efficacité du vaccin est également indéfini. Une autre limitation est qu'il n'existe toujours pas de système de culture cellulaire ni de modèles animal. Les efforts actuels pour concevoir des vaccins contre les NoVs humains se concentrent sur l'utilisation de VLPs. Les études précliniques chez la souris ont montré que les VLPs sont immunogènes lors de l'administration par voie intranasale, orale ou parentérale, elles induisent une

immunité sérique et muqueuse, avec une meilleure réponse au niveau des muqueuses lorsque les VLPs sont co-administrées avec un adjuvant muqueux (Estes *et al.* 2000). Des études cliniques de phase I ont évalué l'innocuité et l'immunogénicité de la vaccination par voie orale chez l'adulte avec des doses croissantes de VLPs NV (Ball J.M. *et al.* 1999; Tacket *et al.* 2003). Suite à ces études, l'administration de VLPs par voie intranasale a été évaluée. Deux doses d'une formulation poudre sèche avec un adjuvant le monophosphoryl-lipide A (MPL) et le chitosan mucoadherent, ont été testés pour la sécurité et l'immunogénicité chez l'adulte. Le vaccin a été bien toléré sans effets indésirables graves et a été immunogène, montrant une augmentation dose-dépendante des titres d'anticorps sériques (El-Kamary *et al.* 2010). Des anticorps fonctionnels ont été induits, des cellules sécrétant des IgG et IgA ont montré un potentiel de homing de la muqueuse intestinale et des tissus lymphoïdes périphériques. Cette étude a montré, pour la première fois, la production d'une réponse à cellule B mémoire à un agent pathogène entérique en réponse à une immunisation intra-nasale, la fréquence des cellules B mémoire spécifique de l'antigène sont en corrélation avec les réponses des anticorps sériques (Ramirez *et al.* 2012). Ce vaccin a été testé dans une étude en double aveugle sur des adultes en bonne santé, sécréteurs positifs. Ce vaccin a présenté une protection contre l'infection par un virus homologue (Atmar *et al.* 2011). Cependant, le génotype le plus courant dans le monde entier est le GII.4. Les études sur l'immunité croisée GI et GII menées dans les années 1970 ont démontré l'absence de protection croisée, suggérant la nécessité pour avoir un vaccin efficace d'inclure des VLPs des deux génotypes GI et GII. Un vaccin bivalent contenant des VLPs GI.1 et de VLPs GII.4 consensus conçu par l'alignement de la séquence VP1 de trois virus GII.4 humains a été mis au point. Bien qu'une production d'anticorps monoclonaux ayant une réaction croisée contre les NoVs ait été décrite, une protection hétérotypique n'a pas été décrite dans les premières études sans savoir si cela était causé par l'utilisation de doses élevées de virus. Dans ce contexte, les études d'efficacité sur le terrain pourront fournir une estimation précise de la protection de ces vaccins car souvent plusieurs génotypes de NoVs sont présents. Si les avancées dans le développement de vaccin NoVs humains sont prometteuses, de nombreuses questions demeurent :

- Quelle sera la durée de protection après la vaccination ? L'infection naturelle semble ne pas conférer une protection à long terme comme indiqué dans les premières études sur volontaires. Cependant, une étude récente suggère que l'immunité après infection dure 4-9 ans (Simmons *et al.* 2013). Par ailleurs il sera essentiel de définir le fondement de

l'absence de cette protection et de déterminer si un phénomène similaire se produit lors de l'exposition à des vaccins.

- Est-ce que ces vaccins seront efficaces dans les populations pédiatriques ? Des études sur le développement de vaccins combinés à rotavirus et NoVs sont en cours (Blazevic *et al.* 2011).

- Les taux de mortalité les plus élevés sont observés chez les personnes âgées immunodéprimées. Quel serait l'efficacité du vaccin NoVs sur ce groupe d'âge à haut risque?

Les autres obstacles majeurs dans la conception de vaccins est la variabilité génétique au sein de cette famille de virus et le remplacement des souches pandémiques à des intervalles de temps courts, pouvant nécessiter une préparation vaccinale en constante évolution similaire à celle mise en place pour le virus de la grippe.

7. Épidémiologie des norovirus

7.1. Modes de Transmission

Les NoVs ont de multiples modes de transmission. La voie féco-orale est généralement la plus importante. La transmission peut être directe de personne à personne par contact avec un patient infecté. Elle peut survenir par voie aérienne (aérosols) notamment lors des vomissements avec la formation de gouttelettes projetées dans l'air. Ces gouttelettes peuvent pénétrer dans la bouche et être ingérées ou contaminer les surfaces. Elles pourraient se disperser au-delà d'un mètre et demeurer suspendues dans l'air d'une façon prolongée sans être nécessairement un aérosol au sens strict. Ce mode pourrait expliquer la propagation rapide et étendue de la maladie dans les milieux fermés, comme les hôpitaux, les hôtels, les bateaux de croisière et les crèches (Patel *et al.* 2009).

La transmission peut être indirecte par voie alimentaire ou hydrique comme l'ingestion d'aliments contaminés lors de la préparation par une personne excréant le virus, d'eau de boisson ou de distribution ou d'aliments (coquillages, fruits ou légumes consommés crus, etc.) contaminés par des rejets (eau d'égouts, eau d'irrigation etc.). Cette contamination est souvent suivie par une diffusion de personne à personne.

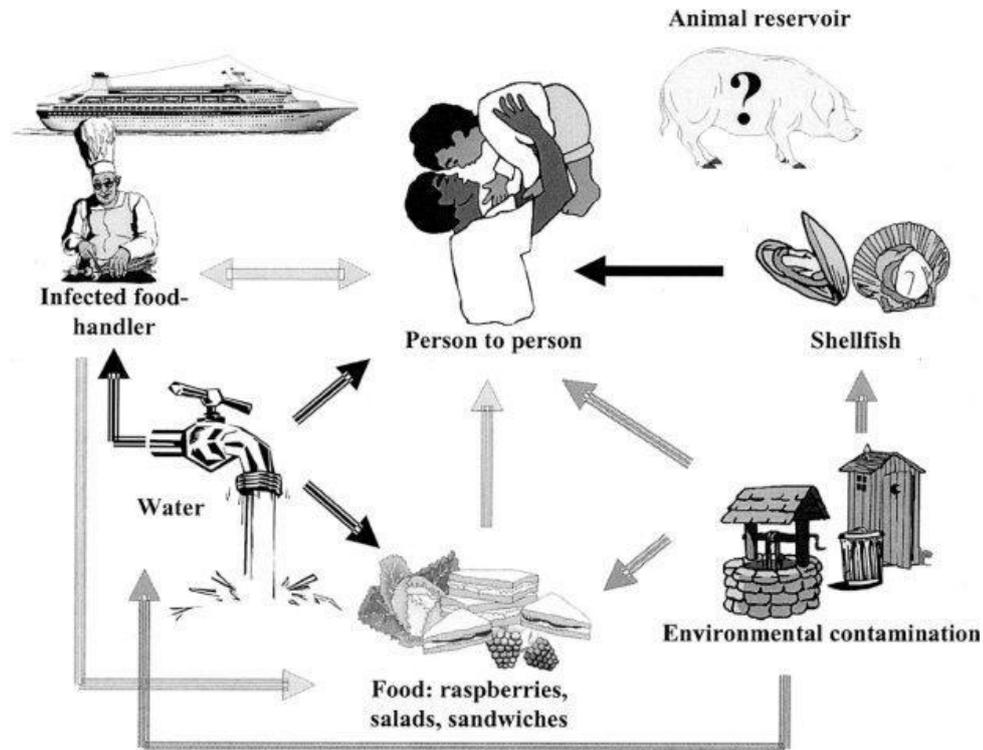


Figure 8 : Modes de transmission des norovirus.

Plusieurs caractéristiques des NoVs humains facilitent leur propagation et compliquent le contrôle des épidémies :

- Dose infectieuses faible (< 10 particules virales) (Teunis *et al.* 2008).
- Grande quantité de particules virales disséminées dans l'environnement (environ 10^9 particules virales/g de selles ou de matières vomies).
- Durée d'excrétion virale prolongée (2 semaines) même après la disparition des symptômes, augmentant le risque de contamination secondaire.
- Existence d'une excrétion pré-symptomatique chez 30 % des personnes exposées et de formes asymptomatiques.
- Stabilité dans les aliments et l'environnement.
- Grande diversité génétique et absence d'immunité à long terme, des infections répétées peuvent se produire tout au long de la vie avec une nouvelle exposition.

L'Homme est le seuls réservoir connu des NoVs humains, il n'existe aucune preuve de transmission zoonotique même si certaines souches présentent des similitudes génétiques, notamment chez le porc (Wang *et al.* 2005).

7.2. Prévalence et incidence

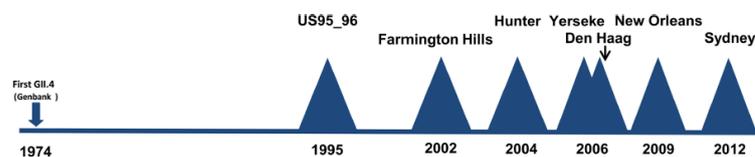
Avant que les tests de détection sensibles ne soient disponibles, l'importance de ces virus a été très largement sous-estimée, la cause de la majorité des épidémies de gastro-entérite était inconnue. Les NoVs humains sont actuellement reconnus comme la première cause de gastro-entérites virales à travers le monde (Siebenga *et al.* 2009) et comme principale cause de toxi-infections alimentaires d'origine virale en Europe (Kroneman *et al.* 2008) et aux États-Unis (Scallan *et al.* 2011). Le nombre d'infections annuelles par ces virus a été récemment estimé à 26 millions dont 5,5 millions transmises par l'alimentation aux États-Unis ("Updated norovirus outbreak management and disease prevention guidelines" 2011; Scallan *et al.* 2011) et à deux millions en Angleterre (Phillips *et al.* 2010). Dans les pays en voie de développement, les NoVs seraient responsables de 200 000 morts/an chez les enfants de moins de cinq ans (Patel *et al.* 2008). Des épidémies s'observent fréquemment dans les collectivités et posent un réel problème dans les hôpitaux et maisons de retraite où en raison de la forte contagiosité, les patients comme les personnels soignants sont infectés. Le pourcentage de malades peut atteindre 50 à 90 % et une épidémie est ainsi susceptible d'entraîner d'importants problèmes d'infrastructure et de logistique dans l'institution touchée comme en témoignent les fermetures temporaires de certains hôpitaux en Grande Bretagne (Lopman *et al.* 2005).

7.3. Caractéristiques épidémiologiques

Les épidémies à NoVs humains sont décrites toute l'année, mais une prévalence plus élevée est notée en hiver (Mounts *et al.* 2000) avec toutefois une intensité variable d'une année sur l'autre. Des personnes de tout âge peuvent être atteintes. Ces virus sont considérés comme des agents importants des gastro-entérites sporadiques, notamment chez l'enfant (Bon F. 1999). La majorité des épidémies a pour origine une transmission de personne à personne ou une transmission hydrique et alimentaire. Ces différents aspects ont été traités de manière détaillée antérieurement. Plusieurs souches peuvent circuler simultanément dans une même zone, mais la circulation de différentes souches dans des régions géographiques distinctes à différentes périodes est également possible. D'une année à l'autre, on n'observe pas nécessairement les mêmes souches dans une zone géographique donnée (Ruvoën-Clouet 2004). A l'heure actuelle le génotype GII.4 serait responsable à lui seule de 80-90 % des infections humaines (Vega *et al.* 2014).

7.4. Épidémiologie moléculaire

Le développement des techniques moléculaires a considérablement fait évoluer les connaissances sur l'épidémiologie moléculaire des infections à NoVs humains. Une caractéristique importante est la prédominance des souches GII.4 qui sont responsables de 55 à 85 % des cas de gastro-entérite dans le monde entier. Le GII.4 est le seul génotype associé à des pandémies mondiales de gastro-entérites (Siebenga *et al.* 2009; Tu *et al.* 2008). Les NoVs GII.3 semblent préférentiellement associés aux gastro-entérites aiguës chez l'enfant, alors que les NoVs GI sont le plus souvent impliqués dans les épidémies dues à la contamination de l'eau ou des aliments. Par exemple, le virus GI.6 qui a émergé en 2012 a été le plus souvent associé à des épidémies d'origine alimentaire que les virus GII.4. Ces GII.4 sont fortement associés à une transmission de personne à personne et des épidémies dans les établissements de soins, conduisant à un risque accru d'infections plus sévères nécessitant une hospitalisation et des cas de décès par rapport aux virus GI et d'autres GII (Desai *et al.* 2012). Les virus GII.4 ont une épidémiologie différente de ceux des autres génotypes GI et GII. Les études phylogénétiques des souches collectées dans le monde au cours des deux dernières décennies ont montré que les GII.4 évoluaient comme le virus de la grippe avec l'émergence de nouveaux variant tous les 2-3 ans remplaçant en grande partie le variant GII.4 précédemment dominant, mais pas les autres souches endémiques (Siebenga *et al.* 2007; White 2014). Depuis le milieu des années 1990, sept variants GII.4 différents ont été associés à des pandémies de gastro-entérites (Fig.9). Ces formes pandémiques provoquent une morbidité importante (Bok and Green 2012; Estes *et al.* 2006; Isakbaeva *et al.* 2005) ainsi qu'une mortalité (Patel *et al.* 2008) et des coûts économiques élevés (Hall *et al.* 2012; Hoffmann *et al.* 2012) à travers le monde chaque année.



De nouveaux variants GII.4 apparaissent approximativement tous les 2-3 ans et remplace les souches précédemment dominantes. Cela a inclus US95_96 en 1995, Farmington Hills en 2002, Hunter en 2004, Yerseke en 2006, Den Haag en 2006, New Orleans en 2009 et Sydney en 2012. La ligne au dessus du nom du variant indique le moment où il a émergé jusqu'il ne soit plus détecté.

Figure 9 : Chronologie de l'émergence et la circulation des variantes GII.4 prédominantes depuis les années 1990s jusqu'en 2013 (Vinje 2015).

La première pandémie décrite et analysée sur la plan virologique s'est déroulée durant les années 1995-96, avec la caractérisation du variant US95/96 isolé aux Etats-Unis et en Australie et dérivant du variant Bristol (Dingle *et al.* 1995; White P.A. 2002). Suivie par l'émergence en 2002 du variant Farmington Hills, souche responsable de la recrudescence d'épidémies de gastro-entérites dans toute l'Europe, telle que rapportée par le réseau européen de surveillance (Lopman B.A. 2004). Cette souche a été caractérisée aux Etats-Unis durant la même période où une vague épidémique était constatée avec plus de 80 % des cas rapportés (Widdowson M-A. 2004). Ce même phénomène d'émergence a été observé par la suite et, à chaque fois, une souche présentant des caractéristiques génétiques nouvelles, était impliquée. Ainsi, en 2004, sont apparus de manière concomitante les variants Hunter et Chiba (Bull *et al.* 2006), puis au printemps 2006 les variants Den Haag et Yerseke (Koopmans *et al.* 2006). En 2009 le variant New Orleans (Yen *et al.* 2011) et plus récemment le variant Sydney 2012. Ce variant a été d'abord identifié en mars 2012 en Australie (Eden *et al.* 2013) et en août 2012, il était responsable de 25 % des épidémies de gastro-entérites aiguës associées aux NoVs en Australie (Eden *et al.* 2014). Entre novembre 2012 et janvier 2013, il a rapidement et simultanément remplacé le variant New Orleans 2009 en Australie et Nouvelle-Zélande (Eden *et al.* 2014), Asie (Kim *et al.* 2013), Europe (Allen *et al.* 2014; Giammanco *et al.* 2014; van Beek *et al.* 2013), Canada (Hasing *et al.* 2013) et aux États-Unis (Vega *et al.* 2014) conduisant à une augmentation du nombre de foyers de gastro-entérites dans le monde entier. Le variant GII.4 Sydney 2012 est actuellement le plus répandu dans le monde, bien que, sur la base du modèle évolutif des GII.4, cette situation va durer encore seulement 1-2 ans avant qu'il ne soit remplacé par un autre variant GII.4.

Entre 2009 et 2013, plusieurs souches non-GII.4 (GII.12, GII.1, GI.6) ont émergé et co-circulé avec les virus GII.4 prédominants et ont causé 11 % à 15 % des épidémies, mais aucune souche n'a circulé pas plus d'une saison (Vega *et al.* 2014). La répartition des génotypes dans les cas sporadiques suit généralement les mêmes tendances que dans les épidémies (Payne *et al.* 2013), bien que des génotypes rares soient souvent signalés chez les enfants de moins de 5 ans. La surveillance continue des épidémies à NoVs par des réseaux comme *NoroNet* et *CaliciNet* sera importante afin d'identifier l'évolution des tendances dans la distribution des génotypes et d'identifier de nouvelles souches émergentes (Leshem *et al.* 2013).

8. Evolution des norovirus

Outre leur diversité génétique et antigénique, les NoVs possèdent un potentiel évolutif important. Les souches appartenant au génotype GII.4 semblent posséder un potentiel évolutif supérieur aux autres NoVs. Ce potentiel peut être attribué à plusieurs facteurs, notamment la capacité à se lier à un éventail plus large d'HBGAs que les autres génotypes, et sont donc susceptibles d'infecter une plus grande population (de Rougemont *et al.* 2011; Shanker *et al.* 2011). De plus, le fitness épidémiologique élevé de cette lignée de virus pourrait être le résultat de réplication et de taux de mutation élevée leur donnant une plus grande capacité à évoluer que les autres génotypes. Des travaux ont montré que le taux d'erreur de la polymérase des variants pandémiques GII.4 est cinq à 40 fois supérieur à celui des souches non pandémiques (GII.b et GII.7). Cependant d'autres travaux rapportent que la vitesse d'évolution des NoVs GII.4 est 1,7 fois plus élevée que chez les NoVs GII.3 et GII.7 (Bull *et al.* 2010). D'autres travaux ont montré que le taux de mutation des NoVs GII.3 ($4,2 \times 10^{-3}$ à $7,4 \times 10^{-3}$ substitutions nucléotidiques par site par an) est comparable à celui des GII.4 ($4,3 \times 10^{-3}$ à $6,5 \times 10^{-3}$ substitutions nucléotidiques par site par an) (Boon *et al.* 2011).

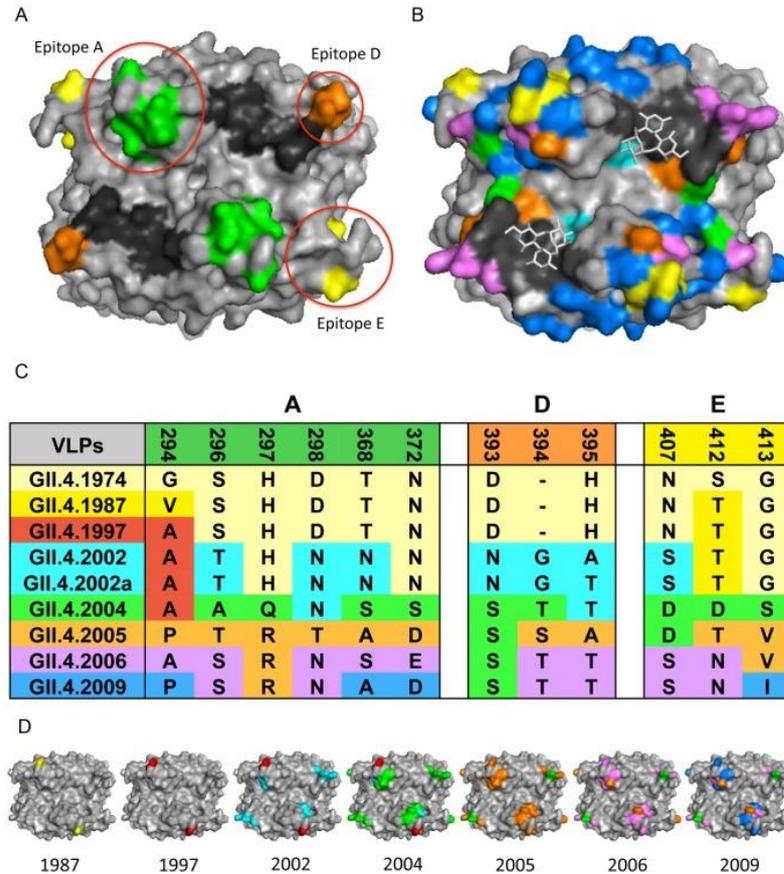
8.1. Formes pré-épidémiques des variants GII.4

Des études ont révélé que les formes pré-épidémiques des variant New Orléans 2009 (Orange 2008, GQ845367) et Sydney 2012 (Auckland 2010, KF060124) ont circulé pendant au maximum deux années avant leur propagation mondiale (Eden *et al.* 2010; Eden *et al.* 2013; Giammanco *et al.* 2014; Hasing *et al.* 2013). Le variant Sydney 2012 pré-épidémique a été identifié en Nouvelle-Zélande en 2010 (Eden *et al.* 2013), au Canada (Hasing *et al.* 2013) et en Italie (Giammanco *et al.* 2014) en 2011. Ces variant pré-épidémiques ont été associés à des épidémies limitées, et n'avaient pas eu de prévalence globale. L'analyse des principaux épitopes A-E du domaine P2 de la capsidie du variant Sydney 2012 a révélé que plusieurs changements ont été nécessaire avant que cette forme pré-épidémique n'acquiert un potentiel pandémique (Eden *et al.* 2013). Ceci suggère que de nouveaux variant GII.4 circuleraient à faible niveau dans la population avant d'acquérir les mutations nécessaires dans le domaine P2 de la capsidie leur permettant d'échapper à l'immunité collective. De telles mutations faciliteraient probablement leur émergence en tant que virus pandémiques. Cela implique que les

variants GII.4 nouvellement émergents pourraient être surveillés et détectés bien avant qu'ils ne se transforment en nouvelles variantes échappant à l'immunité collective. Des vaccins pourraient donc être produits avant qu'une pandémie de gastroentérite ne se déclenche.

8.2. Dérive antigénique

La variation antigénique est un mécanisme important contribuant à l'émergence de nouveaux variants GII.4 pandémiques. Les variations observées entre les différents variants GII.4 sont majoritairement localisées sur cinq épitopes (A-E) évolutifs dans le domaine P2 de la capsid (Lindesmith *et al.* 2008; Siebenga *et al.* 2007). L'épitope A est considéré comme le plus important déterminant dans la variation antigénique (Lindesmith *et al.* 2012). Par l'accumulation de mutations sur ces cinq épitopes, les NoVs sont capables de générer de nouveaux variants antigéniques pandémiques qui ont le potentiel d'échapper à l'immunité (Bull *et al.* 2010; Lindesmith *et al.* 2011). Ceci explique pourquoi le domaine P2 subit la plus grande pression de sélection (Allen *et al.* 2009; Lindesmith *et al.* 2011; Lindesmith *et al.* 2008). Un exemple pour illustrer ceci sont les changements dans le domaine P2 entre le variant pandémique précédant New Orléans 2009 et le variant Sydney 2012. Quatre sites dans le domaine P2 (294, 368, 373 et 376) ont été identifiés avec des mutations spécifiques à chaque variant, et ces résidus ont été soumis à une sélection positive significative (Eden *et al.* 2014). Deux de ces sites (294 et 368) se trouvent dans l'épitope A, un (376) dans l'épitope C, le site (373) n'a été associé à aucun épitope. Il est donc possible que le changement adaptatif dans ces sites ait contribué à l'émergence de Sydney-2012. Ceci est cohérent avec le travail de Debbink *et al.*, (Debbink *et al.* 2013), qui ont montré, en utilisant des anticorps monoclonaux et des sérums polyclonaux humains, que la souche Sydney-2012 était antigéniquement distincte de celle de New Orléans 2009. En outre, les études de mutation ont montré que les résidus 294 et 368 étaient des déterminants critiques de la spécificité antigénique de Sydney-2012 (Debbink *et al.* 2013), et étaient en effet deux des quatre résidus présentés sous sélection positive, comme mentionné ci-dessus (Eden *et al.* 2014). Il semble que la sélection immunitaire entraîne l'évolution des capsides des NoVs, ce qui se traduit par le remplacement des variants dominants par de nouveaux virus émergents possédant des sites antigéniques au niveau de la capsid qui ne sont pas sensibles à l'immunité collective circulante (Rougemon *et al.* 2011).



A : épitopes de blocage des NoVs GII.4 : Trois épitopes de blocage ont été identifiées dans les NoVs GII.4. Épitope A (résidus 294, 296-298, 368 et 372; vert), l'épitope D (résidus 393-395; orange), et l'épitope E (résidus 407, 412-413; jaune) tous se situent sur le sous-domaine P2 à la surface du virion. Les sites d'interaction avec les HBGAs sont représentés en noir.

B : variation dans le temps du sous-domaine P2 des NoVs GII.4 : Résidus colorés indiquent le changement au fil du temps depuis 1974; changements présents en 1987 = jaune, 1997 = rouge, 2002 = bleu clair, 2004 = vert, 2005 = orange, 2006 = violet, 2009 = bleu foncé, sites d'interaction avec les HBGAs = noir, glucides = cannes blanches.

C : variation dans le temps des épitopes de blocage NoVs GII.4 : Les épitopes de blocage subissent des changements au fil du temps, probablement en réponse à l'immunité de groupe humaine. Les couleurs indiquent dans quelle souche épidémique l'origine d'un changement particulier de résidus.

D : Cartographie des variations des NoVs GII.4 au fil du temps dans les régions des épitopes de blocage : Chaque VLP montre les zones au sein des épitopes de blocage qui changent au fil du temps. Le jaune indique les différences de 1974 présente en 1987, 1997 = rouge, 2002 = bleu clair, 2004 = vert, 2005 = orange, 2006 = violet, et 2009 = bleu foncé. Ces épitopes de blocage ont continué à évoluer dans de nouvelles souches épidémiques depuis 2009.

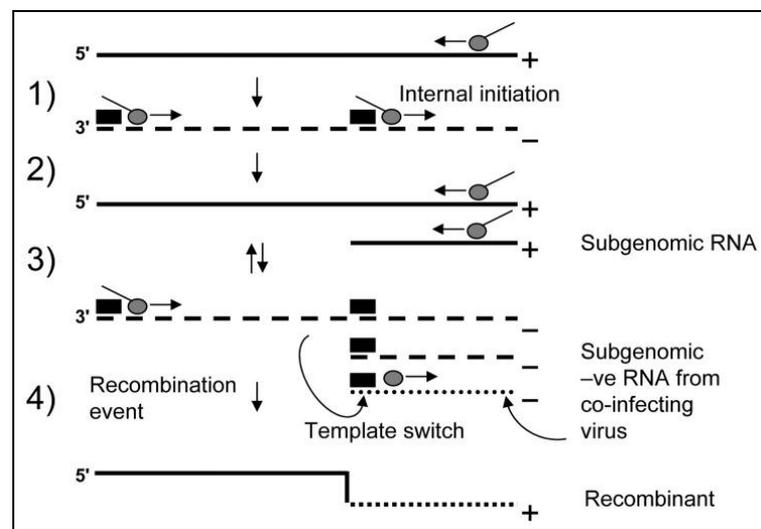
Figure 10 : Variation dans le temps des norovirus GII.4 (Debbink *et al.* 2012).

8.3. Recombinaison des norovirus

La recombinaison de l'ARN est l'un des principaux mécanismes à l'origine de l'évolution des virus, et constitue un mécanisme puissant pour créer de grands changements dans le génome viral. La majorité des recombinaisons inter-génotype et intra-génotype surviennent à un seul endroit, le chevauchement des ORF1-ORF2 (Bull *et al.* 2005; Bull *et al.* 2007), qui est aussi le site de départ pour la transcription de l'ARN

subgénomique. Un second point de recombinaison se situe à l'intérieur de la jonction des ORF2-ORF3 chez les NoVs GII.4 (Eden *et al.* 2013). Le point d'arrêt ORF1-ORF2 est intéressant, car il sépare la région NS responsable de la réplication du virus de la région structurale qui code pour la capsid. En effet, la recombinaison au niveau de cette jonction permet au virus d'échanger sa capsid tout en conservant la région impliquée dans la réplication du génome viral. Cette recombinaison pourrait donc aider aussi à échapper à l'immunité de groupe. De façon intéressante, presque tous les NoVs non-GII.4 contemporains sont des virus recombinants, et ils comprennent des types recombinants tels que GIIPb/GII.3, GII.Pb/GII.13, GII.Pg/GII.12, GII.P4/GII.10, GII.P6/GII.14, et GII.P16/GII.2. Dans une étude récente à Singapour, dans l'ensemble des NoVs non-GII.4 identifié, seuls les génotypes GII.6 et GII.7 étaient des virus sauvages non-recombinants (Lim *et al.* 2013). Les GIIB sont le produit de la recombinaison d'un ORF1 spécifique d'origine inconnu associé à l'ORF2 d'un génotype déjà identifié, le plus souvent GII.3 ou GII.4 (Ambert-Balay *et al.* 2005; Buesa J. 2002; Jiang X. 1999). Le variant GII.Pb/GII.3 est l'un des plus répandue NoVs en circulation. Ce variant a causé des centaines d'épidémies de gastro-entérites à travers l'Europe en 2000 et 2001 (Ambert-Balay *et al.* 2005; Gallimore C.I. 2004; Gallimore *et al.* 2005), et ultérieurement des foyers à travers l'Australie (White P.A. 2002) et l'Asie (Phan *et al.* 2006a; Phan *et al.* 2006b). Contrairement aux variants GII.4, qui sont remplacés environs tous les trois ans, les NoVs GII.Pb/GII.3 sont encore répandus aujourd'hui chez les enfants (Mahar and Kirkwood 2011; Puustinen *et al.* 2012). Depuis l'émergence du variant GII.Pb/GII.3, la GII.b polymérase a subi d'autres événements de recombinaison, et a été associée à ce jour à cinq génotypes capsidiques différents, soit GII.1, GII.2, GII.3, GII.4 et GII.13 (Lim *et al.* 2013; Reuter *et al.* 2006), dont aucun n'est susceptible de contenir la séquence capsidique originale de la polymérase GII.b. Néanmoins, cela montre aussi l'éminent rôle de la recombinaison dans l'évolution des NoVs liée à des infections mixtes. De façon intéressante, dans une étude récente, le variant GII.P16/GII.2, qui a été identifié en 2010, était plus répandu que l'ancien variant GII.Pb/GII.3 (Lim *et al.* 2013), et ce virus a également été identifié surtout chez les enfants. Ceci pourrait suggérer le déplacement et la fin des > 10 ans de prévalence des GII.Pb/GII.3 dans les infections infantiles. Une approche pangénomique pour reconstruire les recombinaisons des virus pandémiques GII.4 a été entreprise en vue de déterminer leurs tendances évolutives (Eden *et al.* 2013). Cela a révélé l'impact des deux recombinaisons inter-génotype et intra-génotype sur l'émergence d'un grand nombre des 12 variants principaux GII.4, y compris les deux plus

récents: New Orléans 2009 et Sydney 2012. Un total de 11 événements de recombinaison potentiel a été détecté dans les virus GII.4 examinés, et neuf étaient situés près de la zone de chevauchement de l'ORF1-ORF2 (entre les positions 5085 et 5100) (Eden *et al.* 2013). Il a été démontré que la région ORF1 de Sydney-2012 a dérivé d'Osaka 2007 (GPe/GII.4), tandis que la région ORF2-ORF3 est liée à Apeldoorn 2008 (GII.4). Ces deux variantes GII.4 ancestrales ont causé des épidémies, mais ils n'ont pas été associés à des pandémies de gastro-entérite. Toutefois, la recombinaison entre ces deux virus GII.4 «inférieurs» a entraîné l'émergence d'une souche pandémique, démontrant la signification des cassures antigéniques pour l'évolution des NoVs.



- 1) La transcription de l'ARN par l'ARN polymérase ARN-dépendante (RdRp) (cercle gris) génère un brin intermédiaire de polarité négative (tirets).
- 2) La liaison de la RdRp aux séquences promoteurs quasi identiques (carré noir) génère des brins d'ARN de polarité positive génomiques et subgénomiques.
- 3) Ces brins servent directement comme modèles pour la synthèse d'ARN à partir de leur extrémité 3' et cela conduit à la génération d'ARN génomique complet et subgénomique de polarité négative.
- 4) La recombinaison se produit quand l'enzyme qui initie la synthèse de l'ARN de polarité positive à partir de l'extrémité 3' de l'ARN génomique complet, est bloquée par le promoteur situé au début de l'ARN subgénomique et se déplace sur un ARN subgénomique présent généré par une co-infection par un autre NoVs. Le résultat est un virus recombinant qui a acquis des nouveaux ORF2 et 3.

Figure 11 : Un mécanisme simple pour la recombinaison des norovirus (Bull *et al.* 2005).

Chapitre 2

Récepteurs cellulaires des norovirus

Le premier stade de l'infection par un virus implique l'attachement du virion sur les cellules hôtes, permettant son internalisation et sa réplication. L'attachement survient suite à la reconnaissance par le virus d'un récepteur spécifique et correspond classiquement à une protéine de surface des cellules cibles. L'expression de ce récepteur est souvent limitée à certains types de cellules ou de tissus. Ce récepteur est donc généralement un déterminant crucial du tropisme d'un virus. Très souvent, les virus utilisent des oligosaccharides présents sur les glycoprotéines ou glycolipides des cellules hôtes. La grande majorité des glycanes impliqués sont chargés négativement comme par exemple l'héparane sulfate pour le virus herpes simplex ou les glycanes composés d'au moins un acide sialique en position terminale pour les virus Influenza (Olofsson and Bergstrom 2005). Toutefois, certains glycanes neutres peuvent être utilisés comme récepteurs viraux et notamment les antigènes de groupe sanguin comme l'antigène Pk pour le Parvovirus B19 (Clausen and Hakomori 1989). Comme le système ABO de groupe sanguin, découvert par Karl Landsteiner sur les globules rouges il y a plus d'un siècle, ces antigènes et les structures glycaniques apparentées sont également distribués sur d'autres types cellulaires et largement présents dans de nombreux tissus, d'où leur nom d'antigènes tissulaires de groupe sanguins (HBGAs) (Brown *et al.* 1993).

La découverte des ligands cellulaires des NoVs humains s'est faite grâce à l'étude sur les *Lagovirus*. Le ligand cellulaire du RHDV a été identifié comme étant un trisaccharide de la famille des HBGAs (Ruvoen-Clouet *et al.* 2000). Cette observation a encouragé la recherche d'éventuels ligands glycaniques pour les autres membres de la famille des *Caliciviridae*. Par analogie, il a été ensuite montré que des VLPs du NV pouvaient agglutiner des érythrocytes humains exprimant l'antigène H (Hutson *et al.* 2002). Une étude de l'infection expérimentale des NoVs humains a montré qu'il existait un lien direct entre la présence des HBGAs dans l'intestin des individus sécréteurs et l'infection (Lindesmith L. 2003). De nombreuses études ont ensuite démontré l'interaction spécifique de souche de NoVs et les HBGAs à l'aide de VLPs de divers génotypes ou de particules P (Donaldson *et al.* 2008; Harrington P.R. 2002; Huang *et al.* 2003; Huang *et al.* 2005; Shirato *et al.* 2008; Tan M. 2004).

1. Biosynthèse des antigènes tissulaires de groupes sanguins

Les HBGAs sont des sucres complexes qui regroupent entre autres les antigènes ABH et Lewis présents sur les érythrocytes de l'homme et de quelques espèces de grands singes, et à la surface des cellules épithéliales de différents tissus chez un large spectre d'espèces allant des amphibiens aux mammifères. Ils sont également sécrétés sous forme libre ou complexée dans certains fluides biologiques comme la salive et le lait (Ruvoën and Le Pendu 2013).

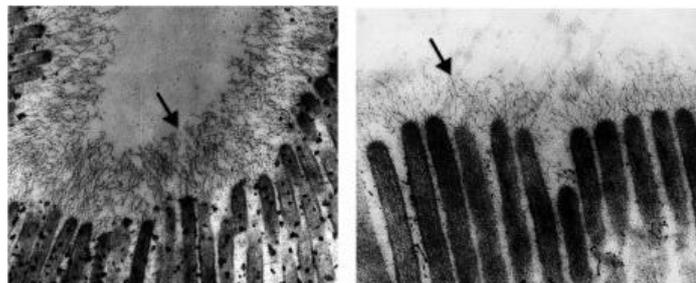


Figure 12 : Images par microscopie électronique à transmission du glycocalyx des cellules épithéliales du petit intestin (flèche) (Le Pendu *et al.* 2014).

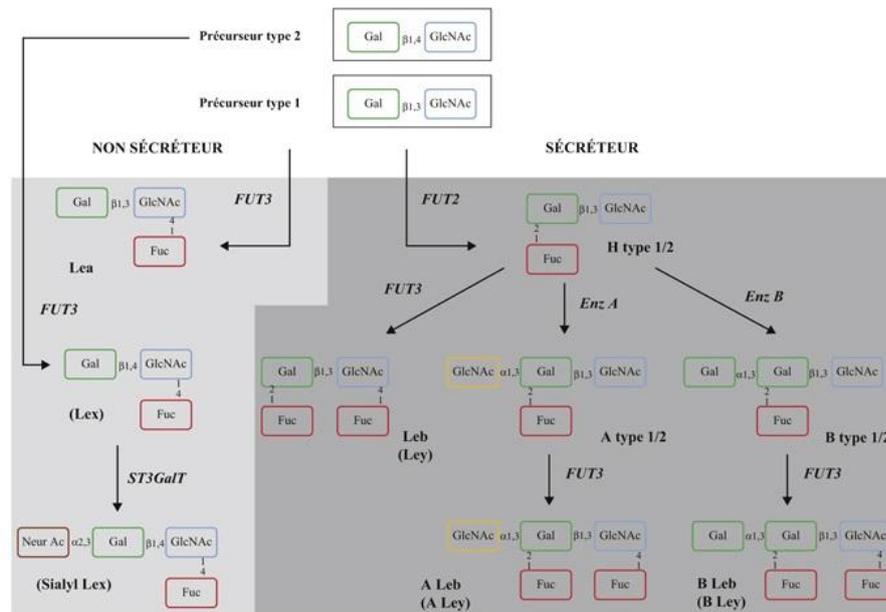
La synthèse de ces antigènes est sous la dépendance de plusieurs gènes codant pour les glycosyltransférases permettant l'addition spécifique des monosaccharides sur quatre principales chaînes précurseurs oligosaccharidiques (précurseurs types 1 à 4) constituant

la région périphérique des glycolipides ainsi que des O- et N-glycannes des glycoprotéines. La biosynthèse de ces antigènes ABO (H) et Lewis est illustrée sur la figure 13.

La biosynthèse des antigènes ABH débute par l'addition d'un fucose en position $\alpha 1,2$ sur le galactose terminal des chaînes précurseurs pour donner les antigènes H. Chez l'Homme, deux $\alpha 1,2$ fucosyltransférases participent à la synthèse de ces antigènes (Le Pendu *et al.* 1985). Elles sont codées par les gènes *FUT1* (H) et *FUT2* (Se) (Kelly *et al.* 1995; Rajan *et al.* 1989). L'expression des antigènes H sur les érythrocytes et sur l'endothélium vasculaire est sous la dépendance de *FUT1*, alors que leur expression sur les cellules épithéliales et dans les sécrétions est très majoritairement sous la dépendance de *FUT2* (Mollicone *et al.* 1995). Il existe un troisième gène codant une $\alpha 1,2$ fucosyltransférase dans le génome des mammifères (*Sec1*), mais chez l'Homme et plusieurs autres espèces il s'agit d'un pseudogène (Abrantes *et al.* 2009; Rouquier *et al.* 1994). Les gènes *FUT1* et *FUT2* possèdent chacun des allèles dominants (H et Se) et des allèles récessifs non fonctionnels (h et se). Les individus homozygotes pour l'allèle nul h (h/h) ne possèdent pas l'antigène H à la surface de leurs érythrocytes. Ce phénotype dit « bombay » est rare. Sa fréquence est de l'ordre de 10^{-5} dans la population indienne et de 10^{-6} dans la population européenne (Blumenfeld and Patnaik 2004). Les individus présentant au moins un allèle *FUT2* fonctionnel (Se/se, Se/Se) sont dits « sécréteurs » et présentent les antigènes ABH sur leurs cellules épithéliales et dans leurs salives, alors que les sujets présentant un allèle récessif à l'état homozygote sont dits « non sécréteurs » et n'expriment pas les antigènes A, B, H, Le^b ou Le^y à la surface de leurs cellules épithéliales. Dans le cas de *FUT2*, la fréquence des allèles non fonctionnels est relativement élevée puisqu'environ 20 % des individus présentent le phénotype non sécréteur. Dans les populations caucasiennes et africaines, ce phénotype est lié principalement à la mutation G428A (Kelly *et al.* 1995) qui introduit prématurément un codon stop, alors que dans les populations asiatiques il est dû le plus souvent aux substitutions C357T et A385T qui conduisent à la synthèse de protéines de très faible activité enzymatique (Koda *et al.* 2001)

L'épitope H est l'accepteur des glycosyltransférases A et B codées par le gène *ABO*. L' $\alpha 1,3$ -N-acétylgalactosaminyl-transférase, codée par les allèles A au locus *ABO*, greffe un résidu N-acétylgalactosamine pour former l'antigène A et l' $\alpha 1,3$ galactosyl-transférase, codée par les allèles B au locus *ABO*, greffe un résidu galactose pour former l'antigène B. Les allèles O correspondent à des allèles non fonctionnels. Le gène *ABO* présente un très

grand polymorphisme puisque pas moins de 180 allèles sont actuellement décrits (Blumenfeld and Patnaik 2004; Patnaik *et al.* 2012). L'addition en position $\alpha 1,3$ ou $\alpha 1,4$ d'un fucose sur le résidu N-acétylglucosamine des précurseurs de type 1 ou 2 donne respectivement les antigènes Le^a et Le^x . L'addition sur les antigènes H type 1 et 2 d'un fucose sur les mêmes positions donne les antigènes Le^b et Le^y . Les antigènes A ou B Le^b et A ou B Le^y sont obtenus respectivement par l'addition d'un fucose sur A/B type 1 et A/B type 2. Six enzymes peuvent catalyser l'addition du fucose en position $\alpha 1,3$ et $\alpha 1,4$. Ces enzymes $\alpha 3/4$ fucosyltransférases, sont codées par les gènes *FUT3*, 4, 5, 6, 7, 9. Les enzymes *FUT3* et *FUT5* peuvent utiliser comme accepteurs les précurseurs de types 1 et 2, *FUT3* ayant une affinité supérieure pour les chaînes de type 1 et *FUT5* pour les chaînes de type 2, alors que les enzymes *FUT4*, *FUT6*, *FUT7* et *FUT9* catalysent uniquement l'addition de fucose sur les précurseurs de type 2 (Cailleau-Thomas *et al.* 2000). Comme pour les gènes *FUT1* et *FUT2*, des polymorphismes ont été décrits pour les gènes *FUT3*, *FUT5*, *FUT6* et *FUT7* (Patnaik *et al.* 2012). Les individus homozygotes possédant les mutations inactivatrices du gène *FUT3* sont dépourvus d'antigènes Le^a et Le^b et sont caractérisés par le phénotype Lewis négatif. Les individus de phénotype Lewis positif $Le^{(a-b+)}$, $Le^{(a+b-)}$ possèdent au moins un allèle *FUT3* fonctionnel et sont respectivement sécréteur et non sécréteur. Dans la population caucasienne, environ 10 % des individus sont de phénotype Lewis négatif (Koda *et al.* 2001). Le phénotype ABH et Lewis de chaque individu dépend donc du polymorphisme combiné aux trois loci *ABO*, *FUT2* et *FUT3*. L'analyse phylogénétique de l'*ABO* et de la famille des 1, 2 fucosyltransférases, a montré qu'ils ont évolué à travers un processus de naissance et de mort au cours de l'évolution des vertébrés et de la conversion des gènes au cours de l'évolution des mammifères. Ces processus sont connus pour être caractéristique des gènes impliqués dans les interactions avec l'environnement. L'analyse des polymorphismes des gènes *ABO* et *FUT 2* a montré des signaux forts de sélection équilibrée, fréquence dépendante, en accord avec un rôle important de leur diversité génétique pour faire face à la pression des agents pathogènes (Le Pendu *et al.* 2014).



Gal: galactose ; GlcNAc: N-acétylgalactosamine ; Fuc: fucose ; GalNAc: N-acétylgalactosamine ; FUT2: α 1,2-fucosyltransférase 2 ; FUT3: α 1,4-fucosyltransférase 3.

Figure 13 : Voies de biosynthèse des HBGAs (Ruvoën and Le Pendu 2013).

2. Déterminisme génétique de la résistance aux infections à norovirus

Suite à la mise en évidence en 2000, de la fixation sur l'antigène H type 2 du RHDV (Ruvoën-Clouet *et al.* 2000) appartenant également aux *Caliciviridae*, les antigènes A, H et Le^b, ont été également identifiés comme ligands du NV. En revanche, les antigènes B et Le^a ne sont pas reconnus par cette souche virale (Le Pendu *et al.* 2006). Des tests sur volontaires sains ont démontré que les individus non sécréteurs sont résistants à l'infection par le NV (Hutson *et al.* 2005; Lindesmith L. 2003). En effet, ces individus ne présentaient pas de signe clinique, ni de réponse immunitaire à l'infection, le virus étant également absent des selles. Lors de ces travaux, il a également été observé que parmi les individus de phénotype sécréteur, ceux du groupe sanguin B n'étaient pas infectés ou restaient asymptomatiques. Les résultats de ces études ont permis de faire le lien entre l'absence de fixation sur les glycanes chez les individus non sécréteurs avec la résistance à l'infection par la souche NV. Quant à la faible fixation observée sur l'antigène de groupe sanguin B, elle pouvait être associée à une absence d'infection ou à

une infection asymptomatique. Il apparaît donc que la combinaison des allèles *FUT2* et *ABO* détermine la sensibilité ou la résistance à l'infection par le NV.

Au vu de ces observations réalisées à partir de la souche prototype NV, plusieurs équipes ont cherché à déterminer si la diversité observée chez les NoVs pouvait être reliée à la variabilité génétique de l'hôte. Comme le répertoire des glycanes salivaires ressemble à celui du tube digestif (Ravn and Dabelsteen 2000) et grâce à l'utilisation de VLPs, la fixation de NoVs appartenant à tous les génotypes a été étudiée sur des panels de salives d'individus phénotypés pour les antigènes ABH et Lewis. Ces essais ont été complétés par des études de fixation sur des oligosaccharides synthétiques. De ces travaux ressort que les différentes souches de NoVs ne reconnaissent pas toutes les mêmes motifs glycaniques. La plupart d'entre elles reconnaissent les glycanes présents à la surface des cellules épithéliales des individus sécréteurs (*FUT2*^{+/+} ou *FUT2*^{+/-}) avec une influence plus ou moins marquée du phénotype ABO. Cependant, certaines souches peuvent reconnaître des individus de phénotype non sécréteur à condition que l'antigène Lewis soit présent (*FUT3*^{+/+} ou *FUT3*^{+/-}) (de Rougemont *et al.* 2011; Huang *et al.* 2003; Huang *et al.* 2005; Lindesmith *et al.* 2008). Il semble ainsi que les différentes souches de NoVs peuvent être classées en trois sous-groupes selon leur préférence pour les motifs H, A/B ou Lewis (Le Pendu *et al.* 2006; Tan and Jiang 2011). Toutefois, l'appartenance à l'un de ces trois sous-groupes est indépendante de la classification phylogénétique des souches.

Parallèlement à ces travaux réalisés *in vitro*, une série d'étude a porté sur la relation entre le phénotype sécréteur/non sécréteur des individus infectés et les souches virales incriminées lors d'épidémies. Une relation a presque toujours été remarquée entre le caractère sécréteur et l'infection (Carlsson *et al.* 2009; Kindberg *et al.* 2007; Le Guyader *et al.* 2010; Tan *et al.* 2008a). Certaines études soulignent cependant que certains individus non sécréteurs peuvent être infectés, soit par des souches GII.4 (Carlsson *et al.* 2009) ou des souches GI.3 (Nordgren *et al.* 2010). Ce constat peut s'expliquer par la capacité de ces souches de NoVs à reconnaître les antigènes Le^a ou Le^x présents en grande quantité sur les cellules épithéliales des individus non sécréteurs et Lewis positif (*FUT3*^{+/+} ou *FUT3*^{+/-}). Une étude récente réalisée chez des volontaires a effectivement montré qu'une souche de GII.4 capable de reconnaître préférentiellement les antigènes A, B et H, mais également les antigènes Lewis infecte les individus sécréteurs indépendamment de leur phénotype ABO et peut occasionnellement infecter un individu non sécréteur (Frenck *et al.* 2012). Il existe enfin plusieurs rapports faisant état de

résultats contradictoires concernant l'association entre le phénotype ABO et l'infection. Dans ce cas, il faut signaler que ces études n'ont pas tenu compte des souches impliquées et de leur spécificité pour les HBGAs. Elles sont par conséquent difficilement interprétables. Il est fort probable que les différences observées lors de ces épidémies proviennent de différences de spécificité pour les antigènes ABH des souches incriminées. Par ailleurs, une corrélation a été observée entre la présence d'anticorps sériques contre des souches GI ou GII et le phénotype des individus que ces souches sont capables de reconnaître (Larsson *et al.* 2006).

L'ensemble de ces observations montre que l'interaction NoVs/HBGAs détermine la résistance ou non à l'infection. Cette reconnaissance est spécifique du génotype au lieu du génogroupe. Il en découle que pour une souche donnée, une partie plus ou moins importante de la population peut être infectée, alors que collectivement ces virus peuvent infecter la population entière. Les HBGAs sont donc des facteurs d'attachement nécessaires à l'infection. En absence de système de culture cellulaire pour les NoVs humains, il n'est toutefois pas possible de déterminer s'il s'agit de véritables récepteurs viraux et si d'autres récepteurs ou co-récepteurs sont également impliqués (Ruvoën and Le Pendu 2013).

3. Structure du site de liaison aux antigènes tissulaires de groupes sanguins

Une très grande variabilité est décrite dans le sous-domaine P2 de la capsid des NoVs et plusieurs études ont montré que le(s) site(s) de fixation aux cellules sont localisés dans cette zone (Chakravarty *et al.* 2005; Tan *et al.* 2003; White *et al.* 1996). L'expression du domaine P recombinant dans un système bactérien a permis de produire seulement cette partie de la protéine «particules P » qui conservent la capacité de fixation aux glycannes. Ces propriétés ont permis d'étudier les interactions entre le domaine P et les HBGAs. Il a été également possible de co-cristalliser les particules P du virus NV (GI.1), et d'autres souches GI.2, GII.4, GII.9, GII.10 et GII.12 avec leurs ligands oligosaccharidiques respectifs. L'analyse structurale de l'interaction du domaine P2 NV avec les trisaccharides A et H a mis en évidence l'existence d'un site de fixation formé par des acides aminés projetés à partir d'un feuillet β localisé sur un seul monomère à la surface la plus externe de la capsid de la souche NV (Bu *et al.* 2008; Choi *et al.* 2008). Dans ce site, les résidus terminaux de l'antigène A se lient spécifiquement par

l'intermédiaire de six AA (Ser380, Pro378, Ser377, Asp327, His329, Trp375) et ceux de l'antigène H par l'intermédiaire de sept AA (Pro378, Ser377, Asp327, His329, Asp344, Gln342, Trp375) (Fig.14). Ces interactions impliquent principalement le résidu α 1,3 N-acétylgalactosamine pour l'antigène A et le résidu β 1,3 galactose pour l'antigène H, le résidu α 1,2 fucose commun à ces deux antigènes intervenant peu dans la liaison. Le positionnement de l'oligosaccharide dans le site de fixation se fait alors de manière perpendiculaire à la surface du domaine P. Des expériences de mutagenèse dirigée sur des AA situés près du site de liaison montrent également l'importance de trois autres résidus (Ser 338, Ala430 et Tyr431) dans l'accroche spécifique de la souche NV (Tan *et al.* 2009).

Les études de l'interaction du domaine P2 de la souche VA387 (variant US95/96) appartenant au GII.4, et reconnaissant un spectre plus large de glycanes (A, B, H, Leb, Ley) montrent que si le site de reconnaissance est également situé dans le sous-domaine P2, il est essentiellement formé par deux boucles peptidiques localisées à l'interface des deux monomères, alors qu'il est positionné sur chacun des monomères dans le cas de la souche GI.1 (Fig. 14). Le nombre et la nature des acides aminés impliqués, ainsi que le mode de fixation des résidus glycaniques sont différents selon les souches (Cao *et al.* 2007). L'oligosaccharide est positionné « à plat » par rapport à la surface du domaine P alors qu'il est orienté « perpendiculairement » à la capsid dans le cas de la souche GI. À l'inverse de ce qui a été observé pour la souche GI, c'est le résidu fucose des trisaccharides A, B ou H qui est au cœur de la liaison (Fig.14). Celui-ci interagit avec les résidus Ser 343, Thr344, Arg345, Asp374 d'un monomère et avec les résidus Ser441, Gly442 et Tyr443 du second monomère. Tous ces résidus forment une poche hydrophobe au fond de laquelle se trouvent les acides aminés Thr344, Arg345 et Gly 442. Une analyse par modélisation a montré que la moitié de l'énergie de fixation était due à l'interaction avec le résidu fucose (Koppisetty *et al.* 2010).. D'autres résidus, notamment les AA Ala346, Ser441, Lys348, Asp391 situés en dehors de cette poche interviennent également dans la reconnaissance du résidu α 1,3 galactose de l'antigène B, et de l' α 1,3 N-acétylgalactosamine de l'antigène A. C'est ainsi que les mutations des acides aminés en position 346, 441 et 391 abolissent la fixation du virus aux antigènes A et B. L'absence de fixation montre l'importance de ces AA dans la reconnaissance des antigènes A et B, alors que des mutations sur le résidu Lys348 n'entraînent qu'une perte de reconnaissance de l'antigène A mais pas de l'antigène B (Tan *et al.* 2008b). Des études complémentaires du profil de fixation de VLPs GII.4 mutantes ont également montré des

changements quantitatifs et qualitatifs dans les profils de reconnaissance aux HBGAs. Ainsi, l'analyse des profils de fixation des VLPs présentant une substitution par une alanine ou une délétion des AA intervenant directement dans les interactions avec les HBGAs a montré une disparition de la fixation des VLP sur les mucines salivaires et sur les oligosaccharides synthétiques. En outre, la délétion d'une thréonine en position 395, caractéristique des variants GII.4 apparus après 2002 ne modifie pas la reconnaissance de l'antigène H mais abolit celle des antigènes A et B et entraîne l'acquisition d'une capacité de fixation sur les antigènes Sialyl-Lex et Lex, indiquant que des AA voisins du site de fixation peuvent aussi influencer la reconnaissance des HBGAs (de Rougemont *et al.* 2011).

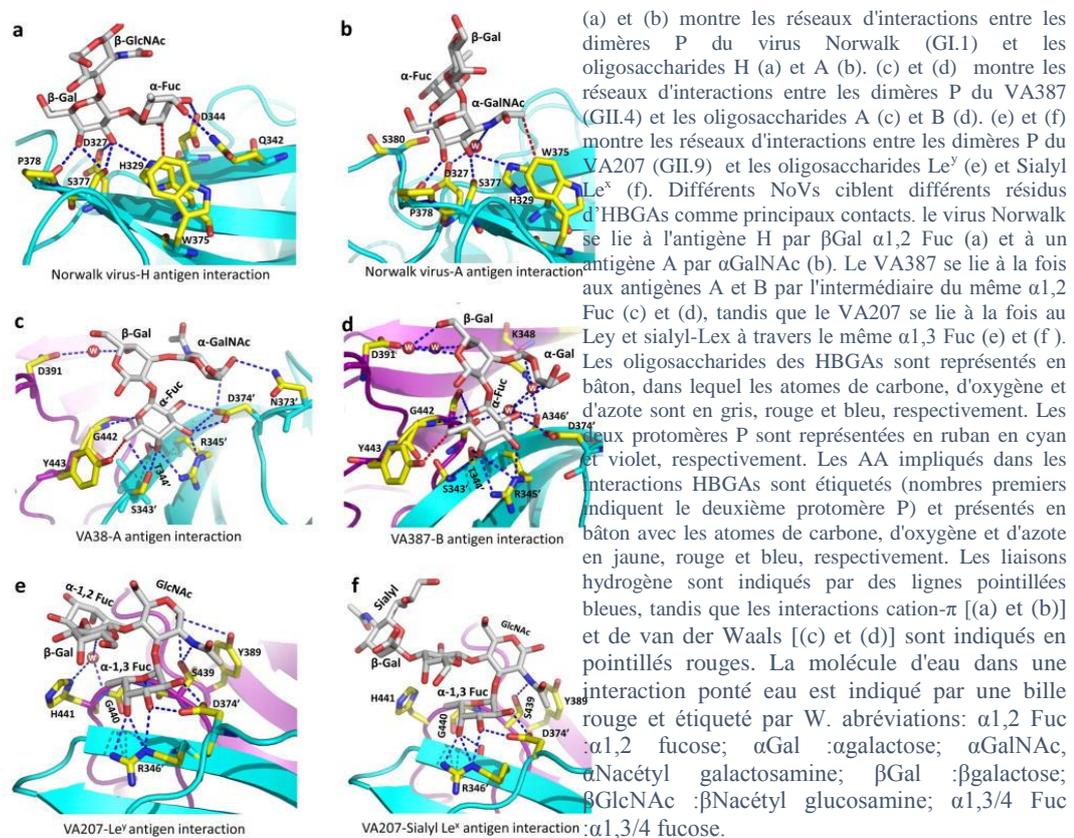
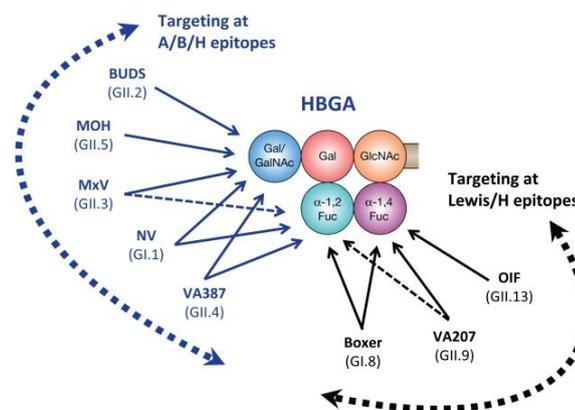


Figure 14 : Structures cristallographiques des interfaces de liaison entre les dimères P et les oligosaccharides des HBGAs (Tan and Jiang 2011).

Pour les souches GII.10 et GII.12, le site et le mode de fixation des oligosaccharides A, B, H, Le^y et Le^b est semblable à celui observé pour la souche GII.4 VA387, avec une implication majeure du résidu fucose en liaison α1,2 (Hansman *et al.* 2011). Cela n'est cependant pas vérifié pour la souche VA207 appartenant au GII.9. L'analyse des

interactions de la souche VA207 avec les oligosaccharides de la famille des HBGAs montre que le site de fixation est le même que celui des autres NoVs GII et que la majorité des AA impliqués sont conservés. En revanche, c'est le résidu α 1,3 fucose des antigènes Le^y et Sialyl- Le^x qui est à l'origine de l'interaction. Cela explique comment un NoVs GII peut reconnaître préférentiellement des individus de phénotype non sécréteur (Chen *et al.* 2011). De plus, les mutations des AA S439 et Y389 qui interagissent avec le résidu N-acétylglucosamine du précurseur H, entraînent un changement de spécificité avec une perte de reconnaissance des antigènes Le^y et Sialyl- Le^x et l'acquisition d'une reconnaissance des antigènes Le^b et H type 3. Ces résultats démontrent que la modification de l'interaction avec le résidu N-acétylglucosamine du précurseur oligosaccharidique peut transformer la capacité de reconnaissance exclusive des individus sécréteurs par les NoVs GII vers une reconnaissance préférentielle des individus non sécréteurs (Chen *et al.* 2011).

L'ensemble de ces résultats montre que les souches GI et GII utilisent des modes de fixation très différents pour interagir avec les HBGAs et infecter les différents sous-groupes dans la population. Par ailleurs, la mise en évidence de la diversité de reconnaissance des HBGAs par les NoVs suggère que ces antigènes glycaniques ont pu jouer un rôle dans l'évolution de ces virus et que le polymorphisme des HBGAs pourrait impacter la capacité de transmission des différentes souches.



Les souches représentatives des différents génotypes dans les deux génogroupes majeurs (GI et GII) des NoVs humains sont présentés selon leurs oligosaccharides cibles. Les flèches indiquent les interactions entre les souches NoVs et les résidus spécifiques des HBGAs. Les lignes en pointillées indiquent une interaction plus faible. Les cinq cercles de couleurs différentes représentent les cinq résidus osidiques d'une molécule complète HBGAs H liés (H, A, B, Le^b , ou Le^y). Les flèches courbes en pointillés indiquent deux grands groupes de liaison, l'A/B/H (bleu) et Lewis/H (noir), en fonction de leurs résidus cibles sur les HBGAs.

Figure 15 : Interactions schématisées et relations entre les différents norovirus humains avec un les résidus spécifiques des HBGAs (Tan and Jiang 2010).

4. Antigènes tissulaires de groupes sanguins et évolution des norovirus

Au sein d'un même génogroupe, les AA impliqués dans la fixation des HBGAs sont remarquablement conservés dans le domaine hypervariable P2 (Tan *et al.* 2009). L'analyse chronologique des profils de mutations des domaines P2 des variants GII.4 circulants entre 1974 et 2006 montre que les résidus impliqués dans la liaison avec le fucose sont toujours conservés au sein des souches de GII.4 quel que soit le variant (Bok *et al.* 2009; Lindesmith *et al.* 2008). En revanche, lorsque l'on compare les séquences des différents génogroupes entre elles et notamment au niveau du sous-domaine P2, celles-ci sont très variables (Tan *et al.* 2009). Ces observations suggèrent que les différents génogroupes de NoVs, notamment les GI et les GII les plus étudiés actuellement, ont évolué de manière convergente pour interagir avec les HBGAs. Cela laisse aussi supposer que cette interaction est essentielle au maintien de leur «fitness».

Étant donné leur très forte prévalence et leur pouvoir infectieux supérieur à celui des autres génotypes, l'évolution des NoVs GII.4 a été particulièrement bien étudiée. Les analyses phylogénétiques réalisées sur les GII.4 montrent une dérive génétique avec l'apparition de nouveaux variants comme décrit au paragraphe précédent (8.2) compatible avec une évolution périodique par échappement à l'immunité de population comme cela est observé pour le virus Influenza de type A (Lindesmith *et al.* 2008; Siebenga *et al.* 2007). Les souches pandémiques reconnaissent toujours les HBGAs mais présentent une affinité augmentée pour les antigènes A, B, H, voire pour certaines un élargissement de leur spectre d'hôtes aux individus non sécréteurs/Lewis positifs (de Rougemont *et al.* 2011). De par leur spectre élargi d'interactions avec les HBGAs, les NoVs GII.4 peuvent infecter de 80 à 95 % de la population facilitant ainsi leur transmission, alors que les autres génotypes de NoVs circulent de façon limitée car leur profil d'attachement aux HBGAs est plus restreint comme les souches GI.1 (sécréteur H et A) ou GII.9 (non sécréteurs/Lewis positifs). Notons enfin que certaines souches de NoVs GII.3 et GII.4 se caractérisent également par la capacité d'interagir avec le motif Sialyl-Lex qui est un marqueur cancéreux ne s'exprimant pas sur les cellules épithéliales digestives saines (Rydell *et al.* 2009). La signification biologique de cette observation reste cependant à déterminer.

Ces observations semblent indiquer que l'augmentation d'affinité pour les HBGAs ait été le résultat de la pression immunitaire. Une affinité plus forte pour les HBGAs peut perturber la reconnaissance du virus par des anticorps neutralisants par un phénomène de

compétition. L'attachement accru des NoVs GII.4 aux HBGAs expliquerait en partie leur prédominance. Ainsi l'acquisition de ces nouvelles propriétés ont permis aux nouveaux variants GII.4 de diffuser plus largement dans la population. Leur émergence semble donc être pilotée à la fois par l'immunité de population et par le polymorphisme génétique de l'hôte. La combinaison de ces deux facteurs ayant pu s'accompagner dans certains cas d'un spectre élargi d'interactions avec les HBGAs.

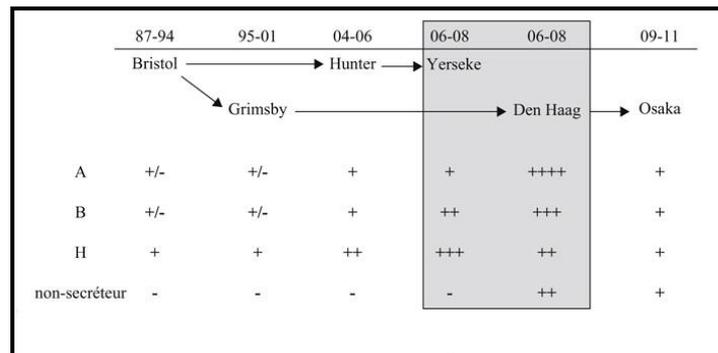


Figure 16 : Évolution de la reconnaissance des HBGAs par les souches GII.4 (Ruvoen-Clouet *et al.* 2013).

Chapitre 3

Environnement, coquillages et norovirus

1. Mollusques bivalves

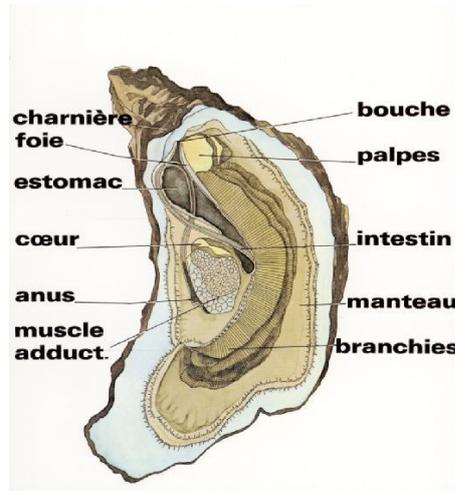
L'ensemble des "coquillages" -95 000 espèces- appartient à l'embranchement des Mollusques, ce terme désigne des espèces caractérisées par un corps mou (*mollusca*). Ce sont des invertébrés qui ne possèdent pas de squelette interne. Les huîtres appartiennent à la classe des bivalves ou lamellibranches, à l'ordre des fillibranches et à la famille des ostréidés (His and Cantin 1995).

1.1. Anatomie

1.1.1. Morphologie externe

La coquille est allongée, irrégulière et dépourvue de dents, sauf chez *Ostrea edulis*. Les valves sont très inégales (valve gauche creuse, valve droite operculaire) et la forme générale de la coquille dépend fortement du type de sol et du mode d'élevage utilisé. Les individus sont en général fixés au substrat par la valve gauche, légèrement convexe. La coquille est secrétée de l'intérieur par les bords du manteau, elle est composée de Conchyoline et de Calcite. Les deux valves sont reliées par la charnière et le ligament qui prolonge cette dernière. La charnière commande l'ouverture de l'huître tandis que le muscle adducteur la maintient fermée. Les huîtres sont des animaux acéphales, la masse céphalique n'est plus représentée que par la bouche et les palpes labiaux. Il existe une chambre promyale, qui est une expansion de la cavité palléale sur le côté droit uniquement, qui connecte la chambre inhalante et la chambre exhalante en amont du muscle adducteur. Cette particularité anatomique traduit encore une meilleure adaptation

des *Crassostrea sp.* à des eaux plus turbides que les *Ostrea sp.* (His and Cantin 1995) (Fig.17).



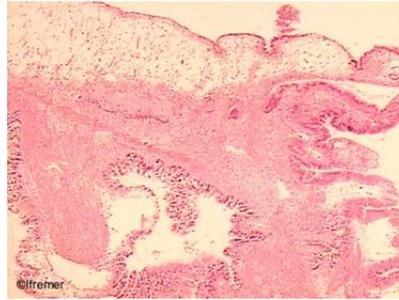
(<http://www.ostreiculteurtraditionnel.fr/biologie/bio.html>)

Figure 17 : Organisation générale d'une huître creuse *Crassostrea gigas*.

1.1.2. Organisation interne

1.1.2.1. Le manteau

Le manteau est composé de deux lobes palléaux qui se rejoignent dans la partie dorsale pour former l'isthme, le long de la charnière, et le capuchon céphalique recouvrant la bouche et les palpes labiaux. Il est constitué de tissus mous enveloppant tous les organes auxquels il est rattaché au niveau du muscle adducteur, de la masse viscérale et des branchies. Il se compose de l'hémolymphe (équivalent du sang chez les vertébrés), des nerfs et des muscles entourés par du tissu conjonctif. La structure, l'histologie et la cytologie du manteau sont sensiblement identiques chez tous les mollusques bivalves (Gosling 2007). Outre sa fonction première de sécréter la coquille et le ligament, le manteau joue un rôle important dans plusieurs mécanismes. Ainsi, il assure des fonctions sensorielles tactiles et visuelles ; Il transfère de nombreux stimuli extérieurs au système nerveux et intervient dans la nutrition en participant au premier tri des particules extérieures ; Il participe au stockage des matériaux de réserve comme les lipides et le glycogène ou encore à la fonction respiratoire, à la dissémination des gamètes et à la défense de l'organisme par la sécrétion du mucus (Grizel 2003) (Fig.18).

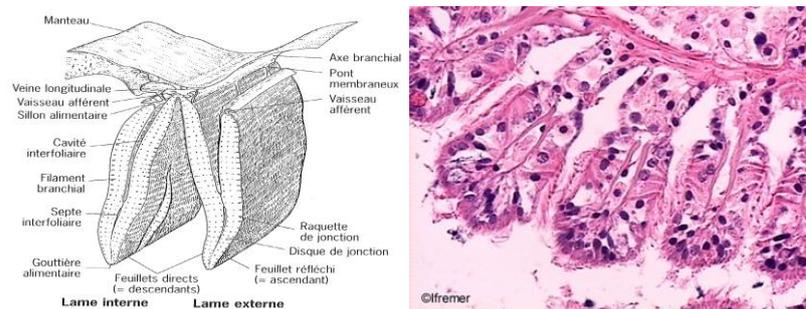


Coupe colorée à l'hématoxyline-éosine (H&E) ×8.

Figure 18 : Manteau de l'huître creuse *Crassostrea gigas* (Grizel *et al.* 2003).

1.1.2.2. L'appareil respiratoire

Les mollusques lamellibranches se distinguent par l'hypertrophie de leur cavité palléale et leur appareil branchial. Chacune de leurs deux branchies est constituée de deux paires d'hémibranchie (une interne et l'autre externe), qui divise la cavité palléale en une chambre inhalante et une chambre exhalante. Chaque hémibranchie semble formée par l'accolement imparfait de deux lamelles (une ascendante et l'autre descendante), en réalité il s'agit de la même lamelle qui se réfléchit pour doubler ainsi l'épaisseur. Chaque lamelle est formée par la juxtaposition de toute une série de filaments très fins ; des groupes de filaments très fins « ordinaires » tubulaires, sont séparés par un filament « principal », plus important, non tubulaire. Tous les filaments sont réunis par les jonctions inter filamentaires (étroite bandes de tissu vasculaire connectif) laissant entre elles des ouvertures libres ovales, appelées « ostia » (un ostium) ou « perforations ». Les branchies sont à la fois les organes de la respiration et les organes collecteurs de la nourriture (His and Cantin 1995).



A : Représentation schématique de la branchie de bivalve.
 B : Coupe colorée à l'hématoxyline-éosine (H&E) ×8.

Figure 19 : Branchies de l'huître creuse *Crassostrea gigas* (Grizel *et al.* 2003).

1.1.2.3. Le tractus digestif

Le tube digestif possède deux orifices la bouche et l'anus. Dans la cavité buccale (pharynx) débouchent les glandes salivaires, à la bouche fait suite à un court œsophage, cilié intérieurement. L'estomac est allongé, entouré par une glande très volumineuse : l'hépatopancréas qui consiste en un grand nombre de tubules à extrémité aveugle communiquant avec l'estomac par une série de canaux ramifiés. La partie de l'estomac allongée en cæcum pylorique contient un cylindre cuticulaire, le stylet cristallin. Celui-ci tourne à l'intérieur de l'estomac et joue un rôle mécanique. Il libère également des enzymes digestives. Dans sa partie terminale prend naissance un intestin qui, après une boucle entourant la glande digestive, se termine par un rectum accolé au muscle adducteur (His and Cantin 1995).

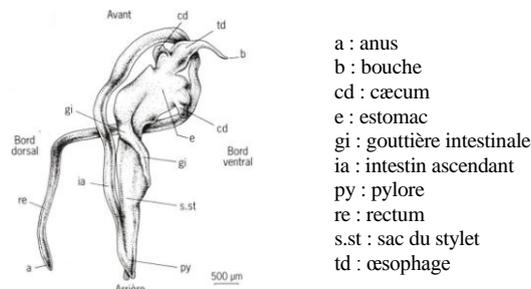
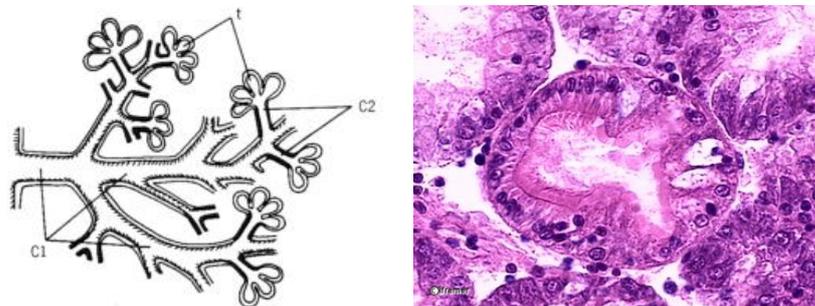


Figure 20 : Anatomie du tube digestif de l'huître creuse *Crassostrea gigas* (Grizel *et al.* 2003).

Sur le plan histologique à l'exception du bouclier gastrique, le tractus est tapissé par un épithélium cilié et par de nombreuses cellules glandulaires à sécrétion glycoprotéique. Les tubules digestifs au niveau de la glande digestive contiennent deux catégories de cellules, les cellules digestives et des cellules sécrétrices (Gosling 2007).



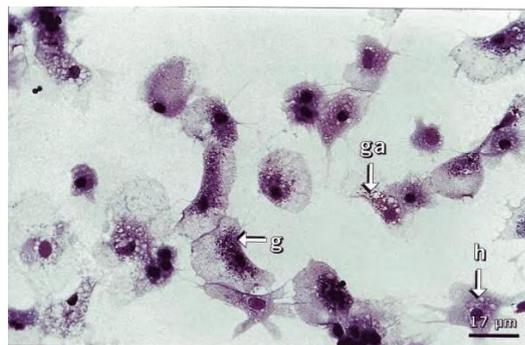
A : Schéma de la structure de la glande digestive. (t) : tubules aveugles ;(C1) : conduits primaires ; (C2) : conduits secondaires.
B : Glande digestive, coupe du canal s'ouvrant dans l'estomac, coupe colorée à l'hématoxyline-éosine (H&E) ×1200.

Figure 21 : Tube digestif de l'huître creuse *Crassostrea gigas* (Grizel *et al.* 2003).

1.1.2.4. L'appareil circulatoire

Les mollusques bivalves disposent d'un système circulatoire de type semi-ouvert, comprenant un cœur et des vaisseaux, par lesquels circule l'hémolymphe contenant des hémocytes. Le cœur est situé dans la cavité péricardique, contre le muscle adducteur. Il est composé d'un ventricule et de deux oreillettes. Du ventricule part l'aorte, qui se divise en une branche antérieure et une branche postérieure, conduisant toute deux l'hémolymphe dans un système lacunaire (sinus conjonctif péri organique), depuis les lacunes (particulièrement développé dans les lobes du manteau et dans les filaments branchiaux) puis l'hémolymphe revient aux oreillettes par une veine efférente commune. L'hémolymphe renferme un pigment respiratoire à base de cuivre : l'hémocyanine. Les huîtres ne possèdent pas de transporteurs d'oxygène dans l'hémolymphe. L'oxygène est donc véhiculé vers les organes dissout dans l'hémolymphe.

Les hémocytes, cellules clés du système de défense, sont les composants primaires de la réponse immunitaire des mollusques bivalves. L'immunité de type inné, est basée sur des réactions cellulaires comme la phagocytose, la formation de nodules et l'encapsulation. Ces mécanismes sont souvent associés à des réactions humorales comme la coagulation, la mélanisation ou des mécanismes antibactériens. Tous ces systèmes contribuent ensemble à l'élimination des microorganismes pathogènes. De nombreuses études ont montré que les peptides antimicrobiens jouaient un rôle primordial dans les organismes et a fortiori dans les organismes dépourvus d'immunité adaptative (Gosling 2007).



Les granulocytes (g), les granulocytes acidophiles (ga) et des hyalinocytes (h).

Figure 22 : Frottis de cellules hémocytaires de *Crassostrea gigas* (Grizel et al. 2003).

L'huître possède un organe musculaire, le muscle adducteur, servant à l'ouverture et à la fermeture de la coquille. Il s'agit d'un organe massif, situé dans la partie postéro-dorsale

du corps. Il est fermement attaché à chaque valve par une couche de cellules spécialisées. L'ensemble de l'organe est soutenu par une enveloppe de tissu conjonctif. L'huître possède également de nombreux faisceaux musculaires dans le manteau pour sa rétraction, dans les branchies pour assurer les courants d'eau et la circulation de l'hémolymphe, dans le cœur et autour des artères pour assurer la distribution de l'hémolymphe et autour de l'estomac et dans les palpes labiaux probablement pour participer à la digestion (His and Cantin 1995).

1.1.2.5. Les glandes génitales

Les huîtres sont des organismes hermaphrodites successifs. Les gonades sont situées au niveau de la masse viscérale, entre le manteau et la glande digestive. Elle s'étend de l'œsophage jusqu'à la zone péricardique formant deux lobes englobant la glande digestive. La gamétogenèse reprend à partir des cellules germinales, pour arriver à maturité sexuelle au cours de l'été (His and Cantin 1995).

1.1.2.6. Le système nerveux

Il comprend trois paires de ganglions. L'élément le plus volumineux du système nerveux est accolé sous le muscle adducteur : c'est le ganglion viscéral. A partir de lui rayonnent plusieurs nerfs s'irradiant dans toute la masse viscérale et dont douze sont consacrés à l'innervation du manteau et aboutissent au nerf circum-palléal. Le manteau est donc la partie la plus sensible de l'huître (His and Cantin 1995).

1.1.2.7. L'appareil excréteur (organe de Bojanus)

Une paire de néphridies naissant dans la cavité péricardique se déversant dans la cavité palléale (His and Cantin 1995).

1.2. Nutrition chez les bivalves

La plupart des lamellibranches sont des organismes benthiques (fond de la mer). Les uns sont fixés à l'état naturel de façon stable sur un support (huîtres), d'autres sont fixés temporairement et ne sont susceptibles que de faibles déplacements (moules), tandis que certains vivent enfouis dans le sédiment (palourdes, coques). Ces types de vie impliquent un mode particulier de collecte des aliments. Les mollusques bivalves sont

dépourvus de tout appareil buccal permettant le broyage ou le broutage (radula, bec de perroquet). Ils ne peuvent se nourrir qu'en captant les particules ou les éléments présents dans l'eau. Ce sont essentiellement des microphages ou des planctonophages, au sens large du terme. Les lamellibranches assurent leurs échanges avec le milieu hydrique dans lequel ils vivent en maintenant une circulation permanente à travers leur cavité palléale. L'eau qui traverse l'animal permet d'assurer la prise en charge de la nourriture, les échanges gazeux respiratoires et l'expulsion des déchets ou des éléments indésirables (His and Cantin 1995).

1.2.1. Les mécanismes de sélection des particules

Deux organes sont impliqués dans le tri des particules avant l'ingestion. Ce sont les branchies et les palpes labiaux. Les particules en suspension sont entraînées par le courant créé par les cils vibratils des branchies vers l'orifice buccal. Les particules sont plaquées sur les filtres branchiaux avant d'être entraînées par le jeu des cils frontaux qui transporte les aliments vers l'orifice buccal. Ce courant ne se crée qu'en présence de nourriture, ce qui implique la présence de récepteurs sensoriels. Il faut ajouter que le mucus qui recouvre les branchies retient les plus petites particules qui sont ensuite reprises par les mouvements ciliaires pour être transportées vers les palpes labiaux. Au voisinage de la bouche, les particules sont triées par les palpes labiaux. Les plis des faces internes des palpes sont garnis de cils qui déterminent une grande diversité de parcours :

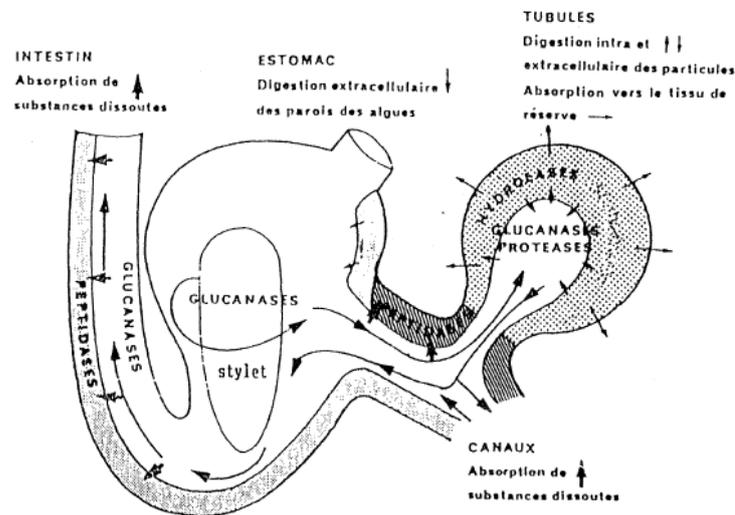
- Les petites particules passent de crête en crête et sont dirigées vers la bouche.
- Les gros éléments descendent généralement au fond des sillons d'où ils sont dirigés vers les bords libres des palpes, puis vers leur pointe postérieure et rejetés sur les bords du manteau.

La viscosité du mucus serait un facteur de tri important, Les particules enrobées de mucus sont éliminées soit par les palpes, soit par les branchies sans être ingérées, constituant les pseudofèces, contrairement aux pelotes fécales ou fèces qui sortent du tube digestif. Il existerait une corrélation entre la taille des palpes labiaux et l'efficacité de sélection: plus les palpes sont développés, plus grosses sont les particules rejetées dans les pseudofèces. De même, les cils branchiaux, par le jeu de leurs battements jouent un rôle non négligeable. Selon les besoins de l'organisme, ils peuvent accélérer leurs battements et détourner les particules les plus grosses. En dehors du critère de taille, il est généralement admis que les particules ingérées (observations des contenus stomacaux), reflètent toujours plus ou moins la composition du milieu en matière particulaire. Il n'existerait pas

de sélection des particules selon la nature chimique. Néanmoins, certains auteurs ont pu observer que chez les huîtres en particulier, lorsqu'elles sont mises en présence de différentes algues unicellulaires, il peut exister une sélection de certaines d'entre elles, qui ne peut être mise en relation avec aucun critère de taille ou de morphologie (His and Cantin 1995).

1.2.2. Processus digestif

Les particules alimentaires pénétrant dans l'estomac sont entraînées par les mouvements du stylet cristallin et distribuées sur la surface ridée de l'aire de triage postérieure. Les plus grosses particules sont dirigées vers l'intestin, tandis que les plus petites sont dirigées sur la paroi postérieure de l'estomac, puis transportées par de forts courants vers la glande digestive. C'est dans les tubules digestifs que la plus grande part de la digestion extracellulaire (déjà commencée dans l'estomac) sera réalisée. Les particules alimentaires parcourent en un temps relativement réduit toute la longueur du tractus digestif : entre 15 et 150 minutes selon l'espèce et les quantités de la nourriture consommée. On voit ainsi qu'une fraction non négligeable de nourriture peut traverser le tractus digestif sans subir, de façon efficace, la digestion et ressortir intacte au niveau du rectum (His and Cantin 1995).



←Trajet des aliments ; ↑absorption transmembranaire ; ↑Absorption par pinocytose ; ↓Sécrétion d'enzymes

Figure 23 : Représentation schématique des différents sites de la digestion chez *Crassostrea gigas* (His and Cantin 1995).

2. Contamination de l'environnement par les norovirus

2.1. Taux d'excrétion dans les selles

Lors d'une infection à NoVs, un nombre élevé de virus est excrété dans les selles. Deux études ont été menées afin d'évaluer la durée et le taux d'excrétion virale chez des personnes infectées expérimentalement par le NV. Ces études ont montré une hétérogénéité considérable du nombre de virus dans les selles des sujets infectés (Atmar *et al.* 2008). Une autre étude sur une infection nosocomiale à NoVs dans une maison de retraite a montré une gamme de concentrations et de durées d'excrétion (Aoki *et al.*). Récemment, une étude comprenant un plus grand nombre de sujets que les études antérieures, dont certains présentaient une infection asymptomatique, au cours d'une étude sur la transmission nosocomiale de NoVs aux Pays-Bas a été publiée (Sukhrie *et al.* 2012). Dans cette étude, ils ont quantifié l'excrétion des NoVs humains et utilisé un modèle longitudinal pour généraliser les profils d'excrétion. Cette étude a montré que le nombre de virus dans les fèces augmente rapidement, atteignant des pics dans les quelques jours suivant le début de l'infection, et qu'il est suivi d'un déclin lent pendant plusieurs semaines. Les résultats ont indiqué que l'excrétion chez les sujets asymptomatiques est similaire à celle des sujets symptomatiques, montrant à la fois des variations considérables dans les niveaux des pics (en moyenne 10^5 - 10^9 /g fèces) ainsi que la durée de l'excrétion virale (moyenne 8-60 jours).

Les enfants et les personnes immunodéprimées excrètent généralement du virus pendant des périodes plus longues que les adultes, ce qui constitue une source potentielle de dissémination du virus (Furuya *et al.* 2011). Dans une autre étude, Milbrath et coll., ont développé un modèle de transmission des NoVs sur la base des données de la littérature sur l'excrétion virale de longue durée (moyenne de 105 à 136 jours). Ce modèle de transmission prédit que cette sous-population augmente le potentiel épidémique (mesurée par le nombre de reproduction) de 50-80 %, la probabilité d'une flambée de 33 %, la gravité de la transmission (mesurée par le taux d'attaque) de 20 %, et la durée de transmission de 100 % (Milbrath *et al.* 2013). L'analyse d'infections nosocomiales a permis de montrer que la plupart des cas secondaires étaient liés à l'excrétion par des patients symptomatiques, mais comme les symptômes ne durent généralement pas plus de 2 semaines, la contribution de cette longue durée d'excrétion virale à la transmission peut rester faible (Sukhrie *et al.* 2012).

2.2. Propriétés de persistance

Les NoVs possèdent des propriétés physico-chimiques qui leur permettent de résister pendant des périodes plus ou moins longues aux conditions environnementales (Rzesutka and Cook 2004). Le tableau 3 résume les principales données de résistance des NoVs en milieu aqueux en fonction de différents paramètres physiques et chimiques. La majorité des expériences ont été réalisées à l'échelle du laboratoire.

Tableau 3 : Propriétés de persistance des NoVs humains en fonction de paramètres physiques et chimiques.

	Paramètres	Souche	Traitement	Effet	Références
Traitements physiques	Température	GI.1	60°C, 30 min	persistance	(Shin G-A. 2003)
		GII.4	3 min, 100°C	- 2 log ₁₀	(Duizer <i>et al.</i> 2004)
	UV	GII.4	206 mJ/cm ² , 0 C°	-1 log ₁₀	(Duizer <i>et al.</i> 2004)
		GI.1	0,37 mL/L, pH 7,5°C	- 4 log ₁₀	(Shin G-A. 2003)
Paramètres chimiques	Composés chlorés	GI.1	chlore 3,75mg/L, 30 min 10 mg/L, 30 min	Résistant 5 malades* 1 malade**	(Keswick <i>et al.</i> 1985)
		GI.1	monochloramine 2 mg/L, pH 8, 5°C, 3 h	- 1 log ₁₀	(Shin G-A. 2003)
		GII.4	6 000 ppm, 10 min, 20°C	- 2 log ₁₀	(Duizer <i>et al.</i> 2004)
	pH	GI.1	pH 3, 3 h à TA	persistance	(Dolin <i>et al.</i> 1972)
		GII.4	pH 12, 30 min, 37°C	- 2 log ₁₀	(Duizer <i>et al.</i> 2004)
	Ether	GI.1	20 %, 18 h, 4°C	persistance	(Dolin <i>et al.</i> 1972)

* après ingestion par 8 volontaires humains, 5 ont été malades

** après ingestion par 8 volontaires humains, 1 a été malade

2.3. Sources de contamination

Les principales voies d'entrée des NoVs humains dans les eaux côtières sont les cours d'eau et les rejets des stations d'épuration d'eaux usées. Différents polluants dont des microorganismes potentiellement pathogènes pour l'homme, peuvent être déversés.



Figure 24 : Les principales voies de transfert des virus entériques dans l'environnement au littoral (www.ifremer.fr).

2.3.1. Les rejets d'eaux usées

D'importantes quantités de NoVs peuvent être introduites dans le milieu marin depuis les rejets des stations de traitement d'eaux usées municipales et privées (Futch *et al.* 2011), à plus petite échelle depuis les fosses septiques (Borchardt *et al.* 2011) et depuis les débordements de ces systèmes (Rodriguez *et al.* 2012). Ces rejets peuvent être directement déversés dans les eaux conchylicoles ou dans des cours d'eau plus élevés dans le bassin versant. Les souches de NoVs (GI, GII) tracées dans les échantillons environnementaux ont clairement montré les liens entre les NoVs dans les effluents d'eaux usées, dans l'eau douce, les coquillages et les gastro-entérites (Nenonen *et al.* 2008; Ueki *et al.* 2005; Wall *et al.* 2011). Les eaux usées non traitées peuvent contenir des niveaux totaux moyens de NoVs (GI, GII) variant de 10^2 à 10^4 copies de génome/ml (Campos and Lees 2014). Les études quantitatives sur le taux de réduction des NoVs par les différentes étapes de traitement des eaux usées sont résumées dans le tableau 4. Cependant, il est possible que des méthodes d'analyse basées sur la PCR puissent sous-estimer le degré d'inactivation du virus pour les méthodes de traitement des eaux usées employant la désinfection plutôt que l'élimination physique (Hunter 2003).

Tableau 4 : Taux de réduction des NoVs par les procédés de traitement des eaux usées rapportées dans la littérature.

Processus de traitement		Taux d'abattement log ₁₀		Référence
		G I	G II	
Eaux usées non traitées	Etabli depuis le débordement d'eaux usées lors de tempête	0,5	0,3	(Campos <i>et al.</i> 2013)
Traitement primaire	Décantation primaire	0,2-0,7	0,7-0,8	(Nordgren <i>et al.</i> 2009)
Traitement secondaire	Étang de stabilisation	1,2 (max~4,5) ^a	1,8 (max~6) ^a	(da Silva <i>et al.</i> 2007)
	Boues activées classique	0,3-0,9	0,3-1,6	(Flannery <i>et al.</i> 2012; Nordgren <i>et al.</i> 2009)
	Boues activées optimisées (modifié Ludzack-Ettinger)	1	0,8	(Campos <i>et al.</i> 2013)
Traitement tertiaire	Lit bactérien	0,0	0,3	(Nordgren <i>et al.</i> 2009)
	Bioréacteur à membrane	1,5 à 3,3		(Francy <i>et al.</i> 2012)
	Désinfection par rayonnement ultraviolet	max.> 0,8	0,1	(Campos <i>et al.</i> 2013; Francy <i>et al.</i> 2012)
	Désinfection au chlore	0,74	-	(Francy <i>et al.</i> 2012)

a : Obtenu à partir de données graphiques.

Il est clair que les eaux usées brutes, et potentiellement d'autres sources de matières fécales humaines non traitées, sont un risque très élevé de contamination par les NoVs de l'environnement marin. Le risque que les eaux usées contiennent des NoVs est susceptible d'être lié à la taille de la population contribuant à l'effluent. Dans la pratique, l'incidence élevée des infections à NoVs dans la communauté détermine que les eaux usées municipales sont inévitablement contaminées, indépendamment des symptômes présentés par les personnes infectées (Iwai *et al.* 2009). Dans de nombreux pays avec des infrastructures de réseaux collectifs vieillissants, les eaux de ruissellement et des égouts peuvent être combinés et participer à la contamination des zones côtières. Pendant les périodes de fortes pluviométrie, les capacités des installations de traitement des eaux usées sont dépassées, ceux-ci débordent entraînant le rejet directement dans l'environnement d'une combinaison d'eau de pluie, d'eaux usées non traitées et éventuellement des déchets industriels et des débris (Passerat *et al.* 2011; Rose *et al.* 2001). Une étude a montré que les concentrations en NoVs (GI + GII) dans les effluents lors de débordement d'égouts sont en moyenne de 1690 copies de génome/ml et sont semblables aux niveaux de NoVs dans les influentes brutes rejetées par les stations (Campos and Lees 2014). Les niveaux moyens de NoVs à proximité des points de rejet

peuvent augmenter de 10 fois ou plus par temps de pluie (Rodriguez *et al.* 2012). Les coquillages recueillis près des zones de décharge peuvent contenir en moyenne 103 unités PCR de NoVs/g de tissu (Hata *et al.* 2014; Rodriguez *et al.* 2012). Des investissements importants dans les systèmes de stockage des eaux pluviales, de traitement et contrôle des débits sera nécessaire pour réduire l'impact de ces rejets sur la conchyliculture (Rose *et al.* 2001).

2.3.2. Apports ponctuels, les rejets des bateaux

Si ces apports sont négligeables en comparaison à ceux des stations d'épurations, l'impact d'une telle contamination peut être important au voisinage des eaux conchylicoles. Le rejet à la mer de matières fécales non traitées, a été impliqué dans des épidémies de grande ampleur suite à la consommation d'huîtres aux Etats-Unis (Berg *et al.* 2000; Kohn *et al.* 1995). Au cours d'une enquête épidémiologique menée en Louisiane (Etats-Unis), les équipages de 22 (85 %) des 26 bateaux de récolte d'huîtres travaillant dans la zone ont déclaré rejeter en routine à la mer des matières fécales (Kohn *et al.* 1995). La plupart des grands navires, y compris les bateaux de croisière, possède à bord une certaine forme de système de collecte et traitement des eaux usées. Toutefois, les rejets de ces navires peuvent présenter un risque important car les épidémies à NoVs au sein de communautés fermées de voyageurs surviennent relativement fréquemment et les effluents peuvent être fortement contaminés (Widdowson *et al.* 2004). Des concentrations stables de NoVs à partir des rejets des navires de croisière rejetés dans les eaux de surface dans le bassin principal du Puget Sound (Etats-Unis) ont été estimées contenir 10^4 virus/L. De toute évidence, à la fois les grands navires et petits bateaux peuvent poser un risque significatif lorsqu'ils rejettent des effluents dans les eaux conchylicoles. La protection contre la contamination est tributaire de l'efficacité du système de traitement des eaux usées à bord des navires. Le moyen le plus efficace pour réduire les risques est clairement d'interdire l'évacuation en mer des deux effluents, traités et non traités dans le voisinage des eaux conchylicoles (Campos and Lees 2014).

2.3.3. Réservoirs environnementaux, les eaux souterraines

Les études sur les eaux souterraines contaminées suggèrent que les NoVs peuvent rester détectable pendant plus de 3 ans et infectieux pendant au moins 61 jours (Seitz *et al.* 2011). Par conséquent, les fosses septiques mal entretenues, ou les fuites dans les

infrastructures d'assainissement pourraient contaminer les eaux souterraines par des matières fécales qui peuvent à leur tour contaminer les eaux de surface par infiltration (Borchardt *et al.* 2011). Au Royaume-Uni, des NoVs ont été détectés dans des bassins de captage à une profondeur d'environ 40 m dans les aquifères confinés de grès avec une prévalence saisonnière concomitante à la saisonnalité des décharges de NoVs par le réseau d'assainissement (Powell *et al.* 2003). Les aquifères de sable et de gravier sont plus susceptibles d'être contaminés que les autres types d'aquifères (Campos and Lees 2014) car la granulométrie du sable et du gravier ne gêne pas la circulation du virus (Borchardt *et al.* 2004). La chimie du sol peut également affecter la migration des NoVs par voie souterraine et des souches peuvent montrer des caractéristiques différentes (da Silva *et al.* 2011). La liaison des NoVs GI.1 et GII.4 à la silice augmente avec la force ionique dans les solutions de chlorure de sodium à un pH 8. En plus des composés minéraux, les matières organiques du sol diminuent habituellement l'attachement du virus par la compétition pour les mêmes sites de liaison (Redman J.A. 1997). Les matières organiques du sol retiennent et conservent de grandes quantités d'eau. Des expériences avec des VLPs ont suggéré que le pH de l'eau influencerait significativement la filtration des NoVs dans le quartz du sable sur une gamme de pH allant de 5 à 7 (Hernroth *et al.* 2002). De plus fortes concentrations d'ion hydrogène H⁺ (pH bas) neutraliseraient la proportion de charges négatives et l'échange de cations (Ca²⁺ et Mg²⁺) sur les colloïdes. Da Silva *et coll.*, ont constaté que des concentrations plus élevées de ces cations augmentaient l'attachement des NoVs GI et GII. Par conséquent, les sols salins qui contiennent des quantités élevées de sels solubles, en particulier Calcium et Magnésium, sont susceptibles de filtrer de grandes quantités de NoVs. Le sable fin, les limons et les limons argileux ont une capacité d'échange cationique faible et donc sont beaucoup moins aptes à retenir les NoVs que l'humus et les argiles (da Silva *et al.* 2011).

2.3.4. Persistance et transmission dans les eaux de surface

Les NoVs sont très résistants à la dégradation dans les milieux aquatiques et leur concentration et distribution dépend de manière significative des conditions de survie dans l'eau recevant les eaux usées (Seitz *et al.* 2011). Plusieurs études ont rapporté des données sur la zone et la durée d'impact des NoVs sur les coquillages par rapport aux sources de pollution comme les conduits d'égout. En Nouvelle-Zélande, un gradient de concentration de NoVs a été observé dans des huîtres se trouvant à différentes distances d'un point de rejet, la concentration totale était d'environ 1000 unités PCR/g de tissu dans

les huitres adjacentes, diminuant à 130 unités PCR/g à 10 km et 100 unités PCR /g à 24 km. Dans une autre étude en Irlande, et en fonction des conditions hydrodynamiques locales, l'étendue de la zone touchée pourrait être de plus de 4 km depuis le point de rejet impliqué (Campos and Lees 2014). Dans les estuaires recevant un apport d'eau douce polluée de 1,5 m³/s en moyenne, les NoVs ont persisté jusqu'à six semaines, tandis que avec des volumes plus bas (0,96m³/s) les NoVs ont persisté pendant environ un mois. Ces données démontrent que des décharges d'eaux usées peuvent avoir un impact sur la contamination en NoVs sur des distances importantes du point de rejets et sur des périodes assez longues (Campos and Lees 2014). Cependant un certain nombre d'études a échoué pour démontrer une corrélation significative entre les concentrations en NoVs dans l'eau, dans les coquillages et les variations de salinité et de température (Hernandez-Morga *et al.* 2009). Ceci peut être lié aux variations des propriétés physico-chimiques des eaux et/ou à la possibilité que les coquillages, relativement proches des points de rejets, sont en dehors de la trajectoire des effluents, ce positionnement leur évite de bioaccumuler les virus autant que les coquillages qui sont plus loin, mais dans la trajectoire de l'effluent (Campos and Lees 2014).

Certaines données suggèrent que les sédiments, les éponges (Futch *et al.* 2011) et le plancton (Gentry *et al.* 2009) peuvent fournir des réservoirs pour une persistance accrue des NoVs, qui peut à son tour augmente la probabilité de bioaccumulation par les coquillages. Cela soulève la question de savoir si l'adsorption des NoVs sur la matière organique est un facteur important dans la bioaccumulation des ces virus par les coquillages bivalves (Katayama *et al.* 2008).

3. Contamination des coquillages par les norovirus

3.1. Mécanismes d'accumulation par les mollusques bivalves

Les coquillages par leurs activités physiologiques, filtrent d'importantes quantités d'eau de mer et de ce fait sont susceptibles de concentrer différentes particules, polluants et microorganismes présents dans ces eaux. Pendant longtemps, l'huître a été considérée comme simple filtre passif ou piège ionique, concentrant passivement des particules telles que des bactéries ou des virus par des liaisons non spécifiques. Mais les observations sur la contamination et la persistance des NoVs dans les huitres, à la différence des autres micro-organismes soulevaient l'hypothèse de ligands spécifiques (Le Guyader *et al.* 2008; Schwab K.J. 1998; Ueki *et al.* 2007).

Les premiers travaux réalisés ont démontré que les VLPs NoVs se lient spécifiquement aux glycanes des tissus d'huîtres *Crassostrea gigas* avec des variabilités de liaison entre les souches virales. Le virus NV se fixe au niveau des organes digestifs (conduits primaires et secondaires, tubules digestifs) mais pas au niveau des branchies ou du manteau, alors que des souches NoVs GII.3 et GII.4 se lient à l'ensemble de ces tissus. Les salives humaines sécrétées de type A et O, ont inhibé la liaison des VLPs NV, mais pas le type B, conformément à la spécificité de liaison de la souche aux HBGAs. En outre, l'introduction d'une mutation dans le site de liaison aux glycanes qui a aboli ainsi la liaison des VLPs était suffisante pour éliminer la liaison aux tissus de l'huître démontrant la spécificité de la liaison (Le Guyader *et al.* 2006a). La liaison a été également inhibée par une Lectine et des Ac anti-groupe A, indiquant que le NoVs GI.1 se lie aux tissus d'huîtres *Crassostrea gigas* ainsi que *Crassostrea virginica* par un antigène A-like (Tian, Bates *et al.* 2006). L'antigène A-like est également impliqué dans la liaison des souches GII.3 et GII.4 aux tissus digestifs d'huîtres. La fixation de ces souches GII aux branchies et manteau de l'huître se fait par un résidu d'acide sialique en liaison α 2,3 (Maalouf *et al.* 2010). L'influence de l'expression du ligand sur la fixation des NoVs aux tissus d'huîtres a été démontrée en utilisant d'abord les VLPs GI.1, ces VLPs ont été très efficacement bioaccumulés par l'huître *Crassostrea gigas* et ont été détectés par immunohistochimie, même à un niveau d'exposition faible, alors que des VLPs mutantes ont été incapables de reconnaître l'antigène A-like, elles ont été détectées uniquement dans les tissus d'huîtres à des concentrations un millier de fois plus élevées (Le Guyader *et al.* 2006a). Ces résultats ont été confirmés en utilisant des virus GI.1 issus d'échantillons de selles positives, les virus ont été efficacement bioaccumulés d'une manière dépendante de la dose. Lorsque ces expériences ont été réalisées à différentes périodes de l'année, il y avait un impact saisonnier clair sur l'efficacité de bioaccumulation qui est parallèle à l'expression du ligand dans les TD de l'huître (Maalouf *et al.* 2010). L'approche quantitative a également montré que les NoVs GI.1 s'accumulent directement dans les TD avec des concentrations négligeables dans les autres tissus. Les bioaccumulations en utilisant deux souches NoVs GII (une souche GII.4 et une souche GII.3) a conduit à des résultats très différents. Ces deux souches se lient aux TD, branchies et manteau avec des tendances similaires (Maalouf *et al.* 2011). La souche GII.4, ainsi que les VLPs GII.4, ont été bioaccumulés à des niveaux très faibles, mais elles ont été trouvées dans un certain nombre de tissus comme aussi rapportés par d'autres (McLeod *et al.* 2009b; Wang *et al.* 2008). En revanche, la souche GII.3 a été

efficacement bioaccumulée, mais moins bien que la souche GI.1, avec une rétention transitoire dans les branchies probablement en raison de la liaison à l'acide sialique (Maalouf *et al.* 2011). Contrairement aux résultats de la souche GI.1, aucun impact saisonnier n'a été observé dans la bioaccumulation des deux NoVs GII ou de l'acide sialique présent dans tous les tissus. Il est probable que la souche GI.1 soit efficacement accumulée et conservée par un ligand A-like présente dans les TD, alors que les souches GII soient moins bien accumulées en raison d'un ligand contenant l'acide sialique exprimé dans tous les tissus qui contribuerait à leur maintien dans les branchies et conduirait à leur destruction (ou l'élimination) par un mécanisme inconnu. Ce dernier processus serait plus efficace dans le cas d'une souche GII.4 que d'une souche GII.3.

Les espèces d'huître peuvent également avoir une influence sur la bioaccumulation. Nappier *et coll.*, en comparant deux espèces d'huître *Crassostrea virginica* et *Crassostrea ariakensis* ont montré que le NV était plus efficacement concentré par *C. ariakensis* et persistait plus longtemps en comparaison avec *C. virginica* (Nappier *et al.* 2008). De nombreuses conditions environnementales peuvent interférer avec la capacité de filtration de l'huître et par conséquent avec la contamination, une étude de terrain a été menée afin de déterminer si les observations réalisées dans des conditions de laboratoire, sont valables dans l'environnement. Ainsi, les concentrations de NoVs GI et GII dans des eaux recueillies au cours d'une année ont été comparées aux concentrations dans les tissus digestifs huîtres. Comme attendu, les concentrations de NoVs GII ont été beaucoup plus élevées que les GI détectés dans les eaux. Les NoVs GI ont été concentrés à un degré plus élevé que les souches GII, avec un rapport entre les copies d'ARN viral /L d'eau et les copies d'ARN viral/g tissus d'huîtres égale à 30 pour GI par rapport à 1 171 pour les souches GII. Ces données apportent une preuve supplémentaire pour la sélection spécifique et la persistance de NoVs GI dans les huîtres. Cette étude de terrain a été menée dans une zone avec une grande quantité des élevages bovins. Les NoVs bovins (GIII) ont été détectés dans 14 % des échantillons d'eau à des niveaux élevés, mais seulement un échantillon de coquillage contenant une souche GIII a été détecté (Zakhour *et al.* 2010). L'épitope α Gal HBGAs, identifié comme le ligand glycaniques spécifique du virus dans les tissus bovins (Zakhour *et al.* 2009), était absent dans les tissus d'huîtres, ce qui explique potentiellement la faible efficacité de bioaccumulation observée pour les souches NoVs GIII.

3.2. Méthodes de détection des norovirus dans les coquillages

Même avec l'application de méthodes moléculaires hautement sensibles, la détection des NoVs dans les coquillages constitue un défi en raison du faible nombre de particules virales posant encore un risque pour les consommateurs, de la forte variabilité génétique et de la présence éventuelle de substances inhibitrices. L'objectif clé pour le développement d'une procédure d'analyse des coquillages, est d'avoir comme résultat un faible volume de concentré viral, et par la suite une préparation d'acides nucléiques hautement purifiée avec aucun effet inhibiteur sur la PCR. L'observation que les virus sont concentrés dans les TD a conduit à l'élaboration d'une méthode qui a représenté une étape importante dans l'amélioration des méthodes de détection (Atmar *et al.* 1995). Cette observation a été confirmée par la détection du VHA (Romalde *et al.* 1994) ainsi que par la quantification spécifique d'adénovirus entériques et de rotavirus dans des moules préalablement bioaccumulés avec ces virus, de la même manière que pour le NV dans les huîtres et les palourdes (Abad FX 1997; Schwab *et al.* 1998). Plus récemment, la démonstration que les NoVs se lient spécifiquement aux TD confirme cette observation, en utilisant la RT-PCR, la concentration observée dans le tissu digestif, qui représentent habituellement environ le dixième du poids total de l'animal pour les huîtres et les moules, était au moins $2 \log_{10}$ (100 fois) supérieure à celle détectée dans d'autres tissus tels que les branchies ou le manteau (Maalouf *et al.* 2010). L'analyse des TD présente plusieurs avantages, y compris une sensibilité accrue, une diminution du temps de traitement et la diminution des interférences avec la RT-PCR par des substances inhibitrices (Atmar *et al.* 1995). A l'exception des petites espèces, telles que les palourdes ou les coques, dont la dissection peut être techniquement difficile, les méthodes récentes sont basées sur les tissus disséqués.

3.2.1. Extraction

L'extraction des virus est basée sur plusieurs étapes: élution des virus à partir des tissus de coquillages, récupération des particules virales puis concentration des virus. Le poids analysé varie généralement de 1,5 à 2 g de TD. Certains procédés proposent l'utilisation d'un poids plus important pour la première étape et d'analyser par la suite seulement une fraction des extraits (Boxman 2006; DePaola *et al.* 2010; Kittigul *et al.* 2008). Les virus sont élués à partir des TD des coquillages en utilisant divers tampons (par exemple chloroforme-butanol ou glycine) avant d'être concentré par précipitation

aves du polyéthylène glycol ou par ultracentrifugation (Atmar *et al.* 1995; Milne *et al.* 2007; Myrnel M. 2004; Nishida *et al.* 2003). La lyse directe des particules virales a également été utilisée, y compris des procédés utilisant la protéinase K ou le Trizol pour détruire les tissus des coquillages ou des billes de zircone et un tampon de dénaturation sans étape de concentration des virus et/ou des acides nucléiques (Greening and Hewitt 2008; Jothikumar *et al.* 2005; Kittigul *et al.* 2008; Lodder-Verschoor *et al.* 2005; Lowther *et al.* 2008; Umesha *et al.* 2008). La deuxième étape majeure consiste en l'extraction et la purification des acides nucléique viraux. Pendant longtemps des protocoles maison ont été utilisés, actuellement des kits commerciaux sont plus utilisés. Les avantages de leur utilisation comprennent leur fiabilité, reproductibilité et facilité d'application (Costafreda *et al.* 2006; de Roda Husman *et al.* 2007; DePaola *et al.* 2010; Fukuda *et al.* 2008; Kingsley *et al.* 2007; Le Guyader *et al.* 2009; Lodder-Verschoor *et al.* 2005; Milne *et al.* 2007; Nenonen *et al.* 2008; Nishida *et al.* 2003; Umesha *et al.* 2008). La plupart de ces kits (bioMerieux, Qiagen..) sont le plus souvent basés sur une lyse au Guanidium suivi par la capture des acides nucléiques sur des colonnes, des billes ou de la silice.

L'un des buts des méthodes d'extraction est d'éliminer suffisamment les inhibiteurs des réactions RT et PCR pour permettre la détection des acides nucléiques viraux. Les polysaccharides présents dans les tissus des coquillages sont des substances qui peuvent inhiber la réaction PCR (Atmar *et al.* 1993). L'élimination des inhibiteurs est difficile à évaluer et est dépendante des périodes de l'année et au cycle de vie des coquillages, différents composés peuvent être présents (Burkhardt and Calci 2000; DiGirolamo *et al.* 1970). Des contrôles externes de l'amplification sont utilisés pour détecter la présence d'une inhibition significative de l'échantillon, le taux et la fréquence d'inhibition des échantillons varie en fonction des tissus analysés (Atmar *et al.* 1995; Le Guyader *et al.* 2000; Schwab *et al.* 1998). L'addition d'un virus externe à l'échantillon de coquillage à analyser a été proposée pour servir de témoin d'efficacité d'extraction (Costafreda *et al.* 2006; DePaola *et al.* 2010; Le Guyader *et al.* 2009; Lowther *et al.* 2008; Nishida *et al.* 2007). Le candidat idéal devrait avoir les propriétés suivantes : il serait un virus à ARN avec des propriétés semblables à celles des virus entériques contaminants les coquillages ; il serait normalement absent dans des échantillons environnementaux et il serait non pathogène. Basé sur ces considérations un certain nombre de virus tels que le Mengovirus ou l'Echovirus type 9 (*Picornaviridae*) (Costafreda *et al.* 2006; Le Guyader *et al.* 2009; Nishida *et al.* 2007) ou des CVs non-humains tels que le FCV ou le virus San Miguel sea

lion (DePaola *et al.* 2010; Lowther *et al.* 2008) ont été proposés comme contrôle de l'efficacité d'extraction.

3.2.2. RT-PCR

La sensibilité de la RT-PCR dépend essentiellement de deux facteurs liés à l'efficacité de l'extraction des acides nucléiques et au degré de pureté de ces derniers. Comme le montre le tableau en annexe 2, certaines méthodes commencent par une grande masse d'échantillon et ensuite extraient seulement une partie, tandis que d'autres protocoles sont basés sur de plus petits poids mais conservent l'intégralité de la prise d'essai jusqu'à la dernière étape. Dans la réaction de RT-PCR, le volume de l'échantillon analysé est toujours très faible, ce qui laisse supposer que tous les tests RT-PCR ont une limite de sensibilité supérieure à 10 unités virales/g de TD. La spécificité des amorces utilisées est d'une importance critique. Les NoVs, comme tous les virus à ARN, sont sujets à des mutations ponctuelles et des recombinaisons, ce qui donne souvent lieu à de nouveaux variants. Il est important que les méthodes PCR s'adaptent à cette variation par la sélection d'amorces consensus permettant de détecter l'ensemble de ces virus. La transcription inverse et la PCR utilisant une méthodologie en une étape simplifie la procédure. Cependant, les kits commerciaux doivent utiliser des enzymes spécialement conçus pour une utilisation avec des cibles de faible abondance. Les chimies TaqMan où l'hybridation avec une sonde spécifique est réalisé en temps réel ont de nombreux avantages; l'amplification est réalisé à partir d'un format tube fermé qui est moins sensible à la contamination; leur logistique est efficace; ils incorporent une étape de confirmation sur la base de la sonde; peuvent être utilisé pour la quantification et ils se prêtent plus facilement à la standardisation que la PCR classique. La contamination dans les coquillages étant très faible et les méthodes d'extraction non spécifiques, de nombreuses autres séquences génomiques peuvent être présentes. De plus considérant la probabilité d'une contamination multiple, des critères de spécificité et de sensibilité sont indispensables (Le Guyader *et al.* 2003; Sugieda M. *et al.* 1996). Grâce aux séquençages des génomes complets, de nouvelles données sont disponibles (Katayama H. 2002). Ainsi une région hautement conservée dans la région 3' de l'ORF1 a permis de désigner deux couples d'amorce a priori consensus pour la RT-PCR temps réel (Kageyama T. 2003). Par la suite diverses variantes ont été développées (Loisy *et al.* 2004; Nishida *et al.* 2003). Les amorces et les sondes de RT-PCR temps réel sont dirigées dans la région de jonction ORF1-ORF2 des NoVs, seule région suffisamment consensus pour détecter les diverses

souches (Jothikumar *et al.* 2005; Le Guyader *et al.* 2009; Loisy *et al.* 2005). Le typage des souches de NoVs, est réalisé ensuite par une amplification classique, permettant après séquençage d'identifier plus précisément la souche de NoVs. Cette approche est surtout importante dans le cas d'échantillons impliqués dans des épidémies.

Un autre intérêt de la RT-PCR temps réel est son application pour la quantification. En effet, la détection se faisant en cours d'amplification il est possible de noter pour chaque échantillon le cycle à partir duquel la fluorescence émise par la sonde lors de sa dégradation devient détectable (au-dessus du seuil constitué par le bruit de fond). Un logiciel, couplé à l'appareil, permet d'enregistrer pour chaque échantillon ce cycle seuil (appelé C_T à partir de l'anglais Cycle Treshold) qui le caractérise et permet de le comparer par rapport aux autres échantillons ou à une gamme d'étalonnage d'ADN plasmidique. Cette gamme étalon, incluse dans chaque série d'amplification permet de déterminer le nombre de copie associée au C_T et ainsi de pouvoir calculer le nombre de copies d'ARN présent dans l'échantillon. Néanmoins la quantification doit tenir compte de nombreux autres paramètres tels que la persistance éventuelle d'inhibiteurs ou la perte de particules virales lors des différentes étapes de l'extraction à partir de matrices complexes tels que les coquillages. Il est donc important de considérer ces paramètres pour estimer le nombre de particules virales présentes dans l'échantillon (Le Guyader *et al.* 2009).

3.2.3. Standardisation des méthodes spécifiques aux coquillages

En 2004, le Comité européen de normalisation (CEN) a entrepris l'élaboration d'une méthode standard pour la détection des NoVs dans les denrées alimentaires, y compris les mollusques bivalves (par exemple, les huîtres), basés sur la RT-PCR en temps réel (Lees et TAG4 CW, 2010). Les TD disséqués sont utilisé comme matériau de départ pour les mollusques bivalves. Les virus sont élués par digestion enzymatique en utilisant la protéinase K (Jothikumar *et al.* 2005). Les acides nucléiques sont extraits à l'aide de thiocyanate de guanidine (GITC) pour dénaturer les protéines de la capsid virale, en combinaison avec des particules de silice magnétiques pour lier les acides nucléiques libérés, purifiés par des étapes successives de lavage, avant l'éluion finale dans un petit volume. La méthode RT-PCR utilisant une approche en une étape avec des amorces et sondes spécifiques est ensuite appliquée sur l'extrait. La séquence des amorces et sondes est flexible pour parer au besoin potentiel de modification due à la variabilité des NoVs. Cependant, la norme exige l'utilisation d'amorces et sondes publiées, capables de détecter

les diverses souches de NoVs, de façon sensible et spécifique. La norme comprend une annexe informative sur les amorces/sondes recommandées appropriées pour la détection de toutes les souches actuelles de NoVs humain. La méthode est très sensible pour détecter les faibles niveaux de virus dans les échantillons environnementaux contaminés, cette sensibilité est cause parfois de contamination croisée (faux positifs) et d'interférences potentielles de la matrice (faux négatifs). Ainsi, un ensemble complet de contrôles a été développé : les contrôles positifs et négatifs du processus; contrôle négatif d'extraction; contrôles d'inhibition de la RT-PCR et les contrôles négatifs et positifs de PCR. Les contrôles positifs du processus mesurent l'efficacité de tout le test en utilisant un ensemble hétérologue d'ARN viral simple brin de polarité positive injectés dans l'échantillon et analysés en parallèle avec les virus ciblés. Lors de l'élaboration des contrôles, les études inter-laboratoires par le groupe de travail ont utilisé avec succès la souche de Mengovirus vMC₀ (Costafreda *et al.* 2006). Le contrôle négatif est un échantillon négatif connu qui est soumis à toute la procédure d'extraction et analysé. Les contrôles d'inhibition de la RT-PCR vérifient la suppression des divers inhibiteurs potentiels issus de la matrice par comparaison de l'amplification d'un ARN externe ajouté à l'échantillon et un puits contrôle. Pris dans leur ensemble, ces contrôles vont générer des données sur tous les aspects de l'essai qui seront utilisés pour déterminer l'acceptabilité du test en fonction des critères de contrôle de qualité établis. Les principaux aspects du développement de la méthode ont été testés par des évaluations inter-laboratoires pour assurer une performance robuste. La validation de cette méthode facilitera la comparaison entre les différents laboratoires et permettra aux autorités compétentes d'établir d'éventuelles futures réglementations (EFSA 2012).

3.3. Épidémies liées à la consommation de coquillages

De nombreuses épidémies de gastro-entérites liées à la consommation de coquillages ont été rapportées. La majorité de ces épidémies concerne les huîtres, mais différentes études ont démontré également l'implication des moules et des palourdes (Kingsley *et al.* 2002b; Morse D.L. *et al.* 1986; Prato *et al.* 2004). Les premiers soupçons de la présence de NoVs dans des coquillages sont rapportés en Grande-Bretagne dans les années 1976-1977 (800 personnes atteintes dans 33 foyers épidémiques) (Appleton and Pereira 1977). L'analyse de ces épidémies est difficile pour de nombreuses raisons :

- Sous-déclaration de la part des consommateurs : la principale difficulté est d’obtenir les informations rapidement, afin de récupérer des coquillages du même lot que ceux impliqués et les selles des patients.
- Absence d’analyse virale dans les selles des malades.
- Lien à établir rapidement entre l’aliment et les cas observés : la démonstration précise de la présence de la même souche dans les coquillages et les selles des patients a rarement été réalisée.

Seule une étroite collaboration entre les médecins, les épidémiologistes, les services vétérinaires et également les ostréiculteurs permet d’intégrer les différents événements expliquant la présence de virus dans les huîtres consommées. Cependant, même lorsque les échantillons sont disponibles, la contamination virale est parfois trop faible pour pouvoir analyser les séquences détectées (Shieh *et al.* 2000). Parfois le virus est décelé dans le seul type d’échantillon clinique ou environnemental disponible, ou alors dans les deux types d’échantillons, mais sans identification précise de la souche (Butt A.A. 2004). Le tableau 5 montre des exemples d’épidémies liées à la consommation de coquillages en mettant l’accent sur les différentes souches de NoVs détectées dans les selles et les coquillages ainsi que sur la source de contamination.

A l’heure actuelle, les données d’épidémiologie moléculaire montrent que les souches transmises dans les épidémies liées aux coquillages sont souvent différentes de celles qui circulent au cours des épidémies communautaires. Si l’on considère les épidémies où des souches précises ont été identifiées, les NoVs GI peuvent constituer jusqu’à 30 % des souches détectées dans les selles des patients ou dans les échantillons de coquillages (Gallimore *et al.* 2005; Kageyama T. 2004; Le Guyader *et al.* 2006b; Le Guyader *et al.* 2008). Le tableau 5 montre qu’on peut également retrouver une grande diversité de souches dans les selles des patients et dans les coquillages, ainsi que la présence de souches simultanément dans les deux échantillons testés. Un exemple qui illustre ce fait, lors d’une épidémie survenue dans le nord de la France, trois souches de NoVs ont été détectées dans les quatre selles analysées, deux patients présentant la même souche que celle détectée dans les coquillages (Le Guyader *et al.* 2003).

Les facteurs entraînant la contamination sont souvent difficiles à élucider (Le Guyader *et al.* 2003; Prato *et al.* 2004; Shieh *et al.* 2000). Toutefois, certaines études ont réussi à identifier la source de la contamination. Une des premières études analysant de manière précise les facteurs ayant conduit à la contamination des huîtres concerne une épidémie survenue aux États-Unis en 1993. Cette épidémie a touché des consommateurs d’huîtres

en Louisiane et dans cinq autres états. En croisant les diverses informations, toutes les huîtres avaient été élevées dans une même zone de production située en Louisiane. L'enquête montra qu'un ostréiculteur, soudainement malade lorsqu'il travaillait sur ses parcs à huîtres, avait déversé ses excréments par-dessus bord contaminant ainsi ses propres coquillages, récoltés quelques jours plus tard (Dowell *et al.* 1995). Considérant la taille de la baie de production, la hauteur d'eau, le volume d'eau journalier filtré par une huître (en moyenne 5 L par heure) et une excrétion d'environ 10^9 particules/g de selle, la démonstration fut faite qu'un seul malade pouvait très facilement expliquer cette contamination massive, d'autant plus que le rejet de fèces était réalisé « directement » sur le site d'élevage (Kohn *et al.* 1995).

3.4. Prévention

3.4.1. Classement des zones de production conchylicole

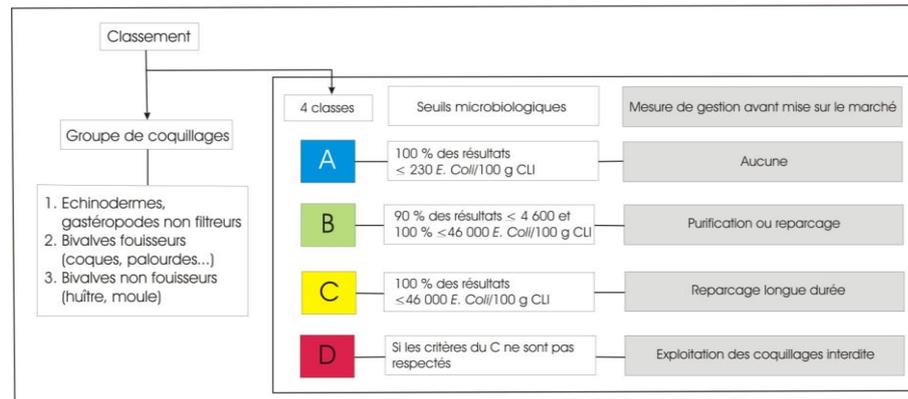
Les zones de production conchylicole sont classées selon la directive de la communauté européenne CE n° 854/2004, relative aux règles régissant la production et la mise sur le marché des mollusques bivalves vivants. Cette réglementation édictée en vue d'harmoniser, au sein des états membres, les conditions de mise sur le marché et les normes de salubrité des coquillages vivants, vise à assurer l'égalité des conditions de libre concurrence tout en limitant les risques sanitaires liés à la consommation de cette denrée. Historiquement, il a été universellement admis que les coquillages répondant au critère « moins de 230 *Escherichia coli*/100g de chair et de liquide intervalvaire » (ou < 300 coliformes fécaux CF/100 g), pouvaient être mis directement sur le marché. La norme a amené les Etats à classer leurs zones de production selon quatre niveaux de salubrité associés à des usages réglementés : la *zone A*, produits pouvant être expédiés directement pour la consommation humaine, la *zone B*, impliquant une purification de la production avant consommation, la *zone C* où l'élevage est interdit sauf dérogation pour l'élevage et/ou la pêche de juvéniles et la *zone D* où tous les usages sont interdits.

Tableau 5 : Exemples d'épidémies liées aux huitres.

Cause	Pays ^a	Nombre de malade	Virus identifié		Facteur identifié comme cause	Références
			Selle	Coquillages		
Accident	États-Unis	132	NoVs GI, GII	NoVs GI	Rejet bateau	(Kohn <i>et al.</i> 1995)
Évènement climatique	France Italie (France)	127 202	NoVs GI, GII	NoVs GI, GII	Inondation et débordement de station d'épuration	(Le Guyader <i>et al.</i> 2006b)
	France	205	NoVs GI, GII, AiV, AV, EV, RV	NoVs GI, GII, AiV, AV, EV, RV	Inondation et débordement de station d'épuration	(Le Guyader <i>et al.</i> 2008)
Non respect zone de production	Japon	-	NoVs GI	NoVs GI et GII	Pêche récréative, zone contaminée	(Sugieda M. <i>et al.</i> 1996)
	Singapour	305	NoVs GII	NoVs GII	Zone de mauvaise qualité sanitaire	(Ng <i>et al.</i> 2005)
	Danemark	356	NoVs, EV	NoVs, EV	Coquillage d'importation, fraude	(Christensen B.F. <i>et al.</i> 1998)
	Suède	30	NoVs GI	NoVs GI, GII	Retrempage dans zone portuaire	(Nenonen <i>et al.</i> 2009)
	France	34	NoVs GII, SaV, AiV	NoVs GII, SaV	Fraude (zone insalubre)	(Le Guyader <i>et al.</i> 2010)
Echec transformation	Australie (Japon)	83	NoVs GI, GII	NoVs GII	Coquillages congelés destinés à la cuisson	(Webby <i>et al.</i> 2007)
	Nouvelle-Zélande (Corée)	115	NoVs GI, GII	NoVs GI, GII	Coquillages congelés destinés à la cuisson	(Simmons <i>et al.</i> 2007)
	États-Unis	117	NoVs GII	NoVs	Coquillages congelés destinés à la cuisson	(Alfano-Sobsey <i>et al.</i> 2012)
	États-Unis	5	NoVs	NoVs GII, VHA	Coquillages congelés destinés à la cuisson	(Kingsley <i>et al.</i> 2002b)

NoVs: norovirus ; AiV: virus Aichi ; AV: astrovirus ; EV: entérovirus ; RV: rotavirus ; SaV: sapovirus ; G : génogroupes.

^a Pays de survenue de l'épidémie et producteur des coquillages impliqués, sauf mention contraire entre parenthèse indiquant le pays producteur.



[1] règlement (CE) n° 854/2004 du Parlement Européen et du Conseil du 29 avril 2004 fixant les règles spécifiques d'organisation des contrôles officiels concernant les produits d'origine animale destinés à la consommation humaine.

[2] Arrêté du 6 novembre 2013 relatif au classement de salubrité et à la surveillance des zones de production et des zones de reparcage des coquillages vivants.

Figure 25 : Exigences réglementaires microbiologiques du classement de zone

Pour intégrer les variations saisonnières, un réseau de contrôle microbiologique des zones de production conchylicoles a été mis en place, en vue de préparer les propositions de classement des zones et d'effectuer la surveillance sanitaire des dites zones dans les conditions prévues par la réglementation. Il comprend un dispositif de surveillance régulière et un dispositif d'alerte. Le dispositif de surveillance régulière vérifie que le niveau de contamination microbiologique de chaque zone de production reste conforme au classement défini dans les arrêtés préfectoraux et dépiste les épisodes inhabituels de contamination. Le dispositif d'alerte est déclenché par les résultats de la surveillance qui dépassent ou risquent de dépasser les normes définissant les classes de qualité, ou en cas de risque de contamination (rejet polluant, orage), voire d'épidémies constatées ou présumées d'origine coquillière.

3.4.2. Purification des coquillages bivalves

Dans le contexte réglementaire précité, seuls les coquillages en provenance des zones classées A peuvent être commercialisés directement pour la consommation humaine. Les coquillages en provenance des zones B nécessitent un traitement de purification. Pour l'origine C, c'est une opération de reparcage dans une zone de qualité satisfaisante pour une durée minimum de 2 mois qui est réglementairement demandée, opération complétée éventuellement par une purification. Du fait de l'absence de zones de

reparcage, classées à cet usage exclusif et sous certaines conditions, cette pratique n'est pas utilisée en France.

La purification (dépuración) est une technique adoptée dans de nombreuses parties du monde qui vise à réduire et à éliminer les micro-organismes pathogènes des mollusques bivalves légèrement à modérément contaminés. Les coquillages vivants sont placés dans des bassins d'eau de mer propre ou rendue propre par un traitement approprié de façon à ce que les coquillages entreprennent leur activité normale de filtration, pendant le temps nécessaire à l'élimination des contaminants microbiologiques. La purification est principalement utilisée pour les coquillages du groupe 2 (bivalves fouisseurs) et du groupe 3 (bivalves non fouisseurs). Selon les systèmes, les temps de purification varient de deux à plusieurs jours. En France le principe retenu est celui des 48 heures, temps semble-t-il suffisant pour limiter le nombre de bactéries, le but de la purification étant d'obtenir des produits conformes à la norme (< 230 E. coli /100 g de chair).

Toutefois, ces critères ne sont pas suffisants pour supprimer complètement les virus entériques humains. Ceci a été documenté en Australie au cours d'essais sur volontaires pour évaluer la sécurité des coquillages épurés (Grohmann *et al.* 1981) et au cours d'épidémies au royaume uni (Ang 1998; Chalmers and McMillan 1995; Perrett and Kudesia 1995) et aux USA (Richards G.P. 1985). Cette observation est étayée par de nombreuses études en laboratoire qui ont examiné les taux d'élimination des virus entériques humains (tels que le poliovirus) ou des substituts de virus entériques humains (notamment diverses espèces bactériophage) au cours du processus d'élimination (Dore and Lees 1995; Power and Collins 1990; Power and Collins 1989; Richards G.P. 1988).

Bien que les taux d'élimination entre les différentes études varient significativement, il ressort que les virus sont éliminés des mollusques bivalves à un rythme beaucoup plus lent que les coliformes fécaux. Les normes relatives aux coliformes fécaux ne fournissent pas une garantie de l'absence de virus entériques dans les coquillages épurés. Le taux de contamination virale est fortement lié au degré de pollution de la zone de récolte ainsi qu'à l'incidence des épidémies liées au site.

La reprise de l'activité de filtration est un processus biologique complexe qui implique le maintien de conditions correctes en termes de salinité, de température, d'oxygène dissous, de disponibilité de la nourriture et état de l'animal (Richards G.P. 1988). Cela implique que les exigences physiologiques pour l'élimination efficace des virus au cours de la purification peuvent être significativement différentes de celles requises pour l'élimination des coliformes fécaux. Des informations divergentes ont été publiées sur

l'importance de la température dans la purification, (Doré *et al.* 1998; Pommeypuy M. 2003; Power and Collins 1990). Les études sur la purification ont été réalisées en laboratoire, ce qui peut constituer un biais car la physiologie des coquillages peut être modifiée, mais l'immersion de coquillages contaminés par des virus humains dans le milieu naturel peut présenter un danger, d'où l'intérêt de l'utilisation de VLPs. Dans une étude, Loisy et coll., en réalisant des contaminations artificielles avec des VLPs de rotavirus ont permis de montrer qu'un \log_{10} de VLPs a été épuré des huîtres après 1 semaine immergée en eau de mer maintenue à 22°C. Les huîtres contaminées ont été également placées dans un estuaire sous l'influence des marées. Les VLPs ont été détectées jusqu'à 82 jours avec 10^{10} et 10^9 VLPs/g de TD et pendant 37 jours pour 10^5 particules (Loisy *et al.* 2005).

Chapitre 4

Substituts des norovirus humains

Depuis la découverte du NV, l'étude de ce groupe de virus a été lourdement handicapée par l'absence d'un système de culture cellulaire ou de modèle animal de l'infection. Les seules données disponibles étaient celles obtenues lors d'épidémies ou d'études sur des volontaires humains. L'essor des techniques de biologie moléculaire et la possibilité de produire sur système Baculovirus des VLPs ont permis d'enrichir les connaissances sur ces virus. Cependant, des progrès restent à faire en ce qui concerne la pathogénèse et les mécanismes moléculaires utilisés pour la traduction et la réplication du génome viral, ainsi que le développement d'antiviraux. La résistance et la persistance dans divers environnements sont aussi une problématique importante pour ces virus. Actuellement, la recherche sur les NoVs humains repose essentiellement sur les études sur des volontaires humains et des modèles de substitution et /ou leurs hôtes. La première approche pour le développement d'un modèle NoVs humains repose sur l'infection expérimentale avec des NoVs humains d'hôtes animaux comme le chimpanzé, le porc et le veau gnotobiotiques (Bok *et al.* 2011; Cheetham *et al.* 2006; Souza *et al.* 2008). Récemment, des données prometteuses sur le développement d'un modèle souris ont été rapportés (Taube *et al.* 2013). L'avantage est l'utilisation de NoVs humains tandis que la principale limitation reste l'absence d'un système de culture de cellules pour des études pluridisciplinaires. D'autres limitations sont variables entre les différents modèles et comprennent l'infection subclinique (Bok *et al.* 2011; Taube *et al.* 2013), l'hôte immunodéprimé (Cheetham *et al.* 2006; Souza *et al.* 2008; Taube *et al.* 2013), la route d'inoculation non conventionnelle (Bok *et al.* 2011; Taube *et al.* 2013), l'infection spécifique de souche NoVs (Taube *et al.* 2013), le coût élevé et l'utilisation restreinte de l'espèce (Bok *et al.* 2011). La seconde approche repose sur l'emploi d'autres membres

de la famille des *Caliciviridae*, multipliable sur culture cellulaire comme le FCV, le MNV et plus récemment le virus Tulane.

1. Classification des substituts potentiels des norovirus humains

La sélection de substituts, au moins en ce qui concerne les NoVs humains, a été basée sur la parenté génétique et propriétés physico-chimique et plus important sur la capacité à se multiplier en culture cellulaire. Les virus appartenant à 7 genres dans la famille des *Caliciviridae* peuvent avoir un potentiel de substituts (*Lagovirus*, *Nebovirus*, *Norovirus* d'animaux, *Sapovirus*, *Vesivirus*, *Recovirus*, *Valovirus*). D'autres virus animaux n'appartenant pas à cette famille ont également été étudiés et peuvent servir de substituts potentiels; notamment les rotavirus et sapovirus porcins, ainsi que les virus des bactéries comme les bactériophages, ou encore les VLPs de NoVs (Hoelzer *et al.* 2013; Richards 2012). Le choix d'un modèle pertinent dépend grandement de l'objectif recherché (Tableau 6).

1.1. Norovirus murin

Depuis sa découverte en 2003, il est rapidement devenu le modèle de choix pour la recherche sur les NoVs humains (Karst *et al.* 2003). Le MNV-1 a été isolé à partir de souris présentant une immunodépression sévère (*RAG2/STAT1^{-/-}*) et succombant éventuellement à une maladie systémique. Par la suite, cet agent s'est montré capable d'infecter expérimentalement des souris de type sauvage ainsi que des souris immunodéprimées et d'infecter naturellement une part importante des souris de laboratoire à l'échelle nationale (Hsu *et al.* 2005). Il a été démontré que le MNV présente un tropisme pour les cellules de la lignée hématopoïétique en particulier les cellules dendritiques et les macrophages permettant sa propagation en routine dans les macrophages de souris RAW264.7 (Wobus *et al.* 2004). Le fait qu'un petit modèle animal soit disponible rend ce virus l'un des modèles les plus compétents pour les études sur les NoVs humains. Le MNV est potentiellement un agent pathogène intestinal se propageant par la voie fécale-orale (Khan *et al.* 2009). L'infection exacerbe l'apparition de la maladie inflammatoire de l'intestin (Lencioni *et al.* 2008). Le modèle MNV fournit la première occasion de comprendre la relation entre les mécanismes de base de la

Tableau 6 : Comparaison des substituts des NoVs humains d'après (Farkas *et al.* 2014; Kniel 2014)

	HuNoV	MNV	PoNoV	BoNoV	PECV	FCV	RHDV	ReCV	Coliphage (ex MS2)
Genre	Norovirus	Norovirus	Norovirus	Norovirus	Sapovirus	Vesivirus	Lagovirus	Recovirus	Levivirus
Génome	(+) ss RNA	(+) ss RNA	(+) ss RNA	(+) ss RNA	(+) ss RNA	(+) ss RNA	(+) ss RNA	(+) ss RNA	(+) ss RNA
	7,5 kb	7,5 kb				7,5 kb		6,7 kb	3,5 kb
	3 ORFs	4 ORFs	3 ORFs	3 ORFs	2 ORFs	3 ORFs	2 ORFs	3 ORFs	
Récepteur / Co-récepteur	HBGAs, heparan sulfate	Acide sialique, glycoprotein E				JAM-1, Acide sialique	HBGAs	HBGAs	F-pilus
Diversité	Elevée	Faible	Faible	Faible	Faible	Faible	Faible	Elevée	
Multiplication sur culture cellulaire	Non	Oui	Non	Non	Oui	Oui	Non	Oui	Milieu bactériologique
Réversion génétique efficace	Non	Oui	Non	Non	Oui	Oui	Oui	Oui	
Transmission	Fécale-orale	Fécale-orale	Fécale-orale	Fécale-orale	Fécale-orale	Respiratoire	Fécale-orale	Fécale-orale	Fécale-orale
Diarrhée chez l'hôte immunocompétent	Oui	Non	Non	Oui	Oui	Non	Non	Oui	
Transmission zoonotique	Suggérée	Non	Suggérée	Suggérée	Non	Non	Non	Suggérée	
Disponibilité dans l'ATCC	Non	Oui	Non	Non	Non	Oui	Non	Non	

réplication des NoVs dans une culture tissulaire et la pathogenèse chez un hôte naturel. Cela a permis d'examiner les réponses de l'hôte nécessaires pour la pathogenèse des NoVs, l'élimination virale et l'établissement de l'immunité (Bailey *et al.* 2008; McCartney *et al.* 2008; Mumphrey *et al.* 2007). Le modèle souris offre également la possibilité d'utiliser des mutations définies dans les gènes de l'hôte pour identifier les composants moléculaires nécessaires à la multiplication virale ainsi la réponse de l'hôte à l'infection. Il est cependant important de souligner que, comme avec n'importe quel modèle animal indirect, des limites à l'utilisation du MNV comme modèle existent. Bien que de nouvelles souches soient identifiées chaque jour, le MNV provoque dans son hôte une maladie différente de celle des NoVs humains. L'infection par ce virus est souvent décrite comme persistante, tandis que les NoVs humains sont caractérisés par leur infection aiguë, rapide et résolutive (Hsu *et al.* 2007; Hsu *et al.* 2006) même si des données récentes indiquent qu'une excrétion plus longue puisse se produire (Atmar *et al.* 2008). Bien qu'il soit étroitement liée aux NoVs humains (génogroupe V), la variabilité génétique des MNV est inférieure à celle des NoVs humains, un fait qui peut entraver le développement de vaccins (Thackray *et al.* 2007).

1.2. Calicivirus porcins

Les calicivirus qui infectent des porcs incluent les NoVs GII qui causent une infection subclinique chez les porcs adulte et les sapovirus comme le calicivirus entérique porcin (PECV) qui infecte les porcs de tous les âges, induisant une diarrhée que chez les jeunes (Wang *et al.* 2007b; Wang *et al.* 2006). Les porcs gnotobiotiques (germ free) ont été évalués comme modèle pour étudier la pathogenèse des NoVs humains et déterminer les cellules cibles pour la réplication virale. Cheetham *et coll.*, en inoculant des porcs gnotobiotiques avec la souche NoV/GII/4/HS66/2001/US ont réussi à induire une infection (Cheetham *et al.* 2006). Ce modèle a été également utilisé afin de modéliser les réponses en anticorps et cytokines (Souza *et al.* 2007). Le calicivirus entérique porcin (PECV) a été utilisé comme un modèle pour leur adaptation en culture cellulaire (Guo *et al.* 2001). Ainsi la souche PECV Cowden a été adaptée en culture sur les cellules de rein de porc (LLC-PK) mais seulement en présence dans le milieu de culture du contenu intestinal à de porcs gnotobiotiques non infectées (Parwani *et al.* 1991). Les NoVs porcins, peuvent se révéler important dans la modélisation de l'évolution si ces virus

représentent un réservoir naturel et peuvent être impliqués dans le transfert zoonotique (Wang *et al.* 2007b).

1.3. Norovirus bovins, ovins

La souche prototype bovine norovirus Newbury agent 2 a été identifiée chez les veaux diarrhéiques en 1984 (Scipioni *et al.* 2008). Si les NoVs bovins sont moins étroitement liés aux NoVs humains que leurs homologues porcins (Oliver *et al.* 2003), ils représentent un modèle attractive *in vivo*, considérant la similitude globale des virus et le potentiel de transfert zoonotique. Récemment des NoVs ont été découverts chez les ovins, ces espèces ont été identifiées comme un autre groupe étroitement lié à l'homme (Wolf *et al.* 2009).

1.4. Calicivirus félin

Les calicivirus félins (FCV) appartiennent au genre *Vesivirus*. Ce sont des agents pathogènes très contagieux qui causent une variété de syndromes d'intensité légère à grave chez les chats (Geissler *et al.* 1997). Ils ont souvent été utilisés comme un modèle de substitution pour les NoVs humains car ils partagent une organisation génomique et des caractéristiques physico-chimiques similaires. Cependant contrairement aux NoVs humains, ils peuvent être cultivés sur les cellules Norden Laboratories Feline Kidney (NLFK) ou les cellules de rein félin (CrFK) (Bidawid *et al.* 2003). En outre, ils peuvent être facilement génétiquement manipulés (Sosnovtsev and Green 1995) ce qui en fait un modèle intéressant pour l'étude des mécanismes moléculaires de la traduction et la réplication du génome des CVs (Makino *et al.* 2006; Willcocks *et al.* 2004). Mais ils représentent un modèle inapproprié pour l'étude de la pathogénèse car la maladie induite est très différente de celle des NoVs humains.

1.5. Virus de maladie hémorragique du lapin

Virus appartenant au genre *Lagovirus*, ils induisent des pathologies potentiellement mortelles caractérisées par des hépatites et des hémorragies (Thiel and Konig 1999) et représentent un problème important pour les industries du lapin dans des pays tels que l'Amérique et la Chine (McIntosh *et al.* 2007). Il représente un substitut, pour lequel un modèle animal et un système génétique inverse adapté en culture cellulaire existe

(Liu *et al.* 2008a). Ce modèle a été utilisé dans l'étude du cycle de réplication des CVs (Liu *et al.* 2008b; Meyers 2003; Meyers 2007; Morales *et al.* 2004). La gravité de la maladie provoquée par ce virus présente une occasion unique d'étudier la virulence des CVs, mais la pertinence du modèle est discutable étant donné les symptômes de la maladie différente de ceux des NoVs humains.

1.6. Autres substituts potentiels

Certains bactériophages comme les coliphages somatiques, les bactériophages à ARN F-spécifiques et les bactériophages de *Bacteroides fragilis*, possèdent une structure et une taille comparables à celles des principaux virus entériques pathogènes. Ils sont proposés comme indicateurs de pollution fécale du milieu hydrique, comme modèles du comportement des virus pathogènes dans l'environnement et comme outil de discrimination de l'origine de la pollution fécale (Formiga-Cruz *et al.* 2002). Les coliphages somatiques constituent un ensemble très hétérogène. Ils infectent certaines souches d'*Escherichia coli*. Ils ont l'avantage d'être abondants dans les selles humaines, et dans les eaux usées, ils sont non pathogènes pour l'homme, ils sont résistants à l'inactivation dans l'environnement marin (Cole *et al.* 2003). Mais la faible spécificité humaine, leur multiplication possible dans l'environnement et leur plus faible résistance vis-à-vis de certains traitements par rapport aux virus, constituent des inconvénients majeurs pour l'utilisation de ce type de phages comme indicateur de contamination virale. Les bactériophages à ARN F-spécifiques appartenant aux familles des *Leviviridae* et *Inoviridae*, sont un groupe de virus de 24 à 27 nm de diamètre, à ARN simple brin avec des capsides cubiques simples qui infectent certaines souches de bactéries. Les propriétés physiques et génomiques de ces phages sont semblables à ceux des NoVs et du VHA (Doré *et al.*, 2000; Doré, Mackie, et Lees, 2003). L'abondance de ces phages dans les eaux usées, et la facilité avec laquelle ils peuvent être énumérés en font des indicateurs attrayants de contamination virale dans l'environnement (Dore *et al.* 2000). Ils ont été utilisés pour modéliser la cinétique d'élimination des virus entériques à partir des coquillages pendant la purification. Ces études ont démontré qu'ils étaient éliminés plus lentement qu'*Escherichia coli* (Hernroth *et al.* 2002). Cependant certains résultats concernant la corrélation entre les bactériophages à ARN F-spécifiques et les NoVs dans l'environnement sont contradictoires.

Les bactériophages spécifiques de *Bacteroides fragilis* (souche HSP40) présentent un certain nombre de propriétés intéressantes en tant qu'indicateurs. En effet, ils sont spécifiques des fèces humaines (Tartera and Jofre 1987; Tartera *et al.* 1989), ils ne se multiplient pas dans l'environnement hydrique (Scott *et al.* 2002) et ils présentent des caractéristiques de survie et de résistance assez proches de celles des virus entériques (Muniain-Mujika *et al.* 2003). Cependant, ils présentent un certain nombre d'inconvénients. Tout d'abord ils sont présents en quantité relativement faible, notamment dans les eaux fortement contaminées, ensuite leur détection nécessite de travailler partiellement en conditions d'anaérobiose et enfin, il semblerait que différentes souches de *Bacteroides fragilis* doivent être utilisées pour leur mise en évidence en fonction de la zone géographique étudiée.

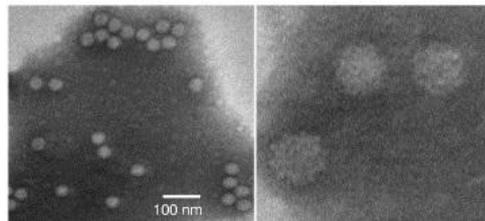
Récemment, les VLPs ont également été proposées comme substitut potentiel pour suivre le comportement du virus dans l'environnement et dans les études d'inactivation (Ausar *et al.* 2006; Caballero S. 2004; Loisy *et al.* 2005). Cependant, étant donné que les VLPs ne contiennent pas d'acides nucléiques, la fiabilité de leur utilisation en tant que substitut pour les NoVs humains est compromise, en particulier dans certains traitements ciblant l'inactivation du génome viral.

2. Virus des primates non humains et les Recovirus

Expérimentalement, les ouistitis communs, les Pinchés à crête blanche et les macaques rhésus sont sensibles à l'infection au NV avec excrétion de virus, même en absence de symptômes cliniques (Rockx *et al.* 2005b). Les limites à l'utilisation des primates non humains pour la recherche sur les NoVs humains sont les mêmes que ceux pour l'Homme et très peu de données publiées sont disponibles.

En 2008, Farkas *et coll.*, ont rapporté la découverte du virus Tulane, isolé à partir d'échantillons de selle de macaques rhésus juvéniles au Centre national de recherches sur les primat de Tulane (USA), en tant que représentant d'un nouveau genre dans la famille des *Caliciviridae*, le genre *Recovirus* (*rhesus enteric Calicivirus*) (Farkas *et al.* 2008). Depuis lors, un grand nombre de ReCVs ont été décrits et adaptés en culture cellulaire. Bien que, les ReCVs représentent un nouveau genre au sein des *Caliciviridae*, leur épidémiologie, caractéristiques biologiques, le spectre d'hôte naturel et la maladie sont plus étroitement liés à ceux des NoVs humains que tous les autres virus de substitution. Ce qui fait du TV un modèle très attractif pour l'étude des NoVs humains.

L'infection zoonotiques de l'Homme par les ReCVs n'est pas clairement établie. Mais plusieurs arguments directs et indirects suggèrent cette infection. La première indication était la détection d'anticorps neutralisants le TV dans des échantillons de sérum archivés recueillies auprès des gardiens d'animaux au Centre national de recherches sur les primates de Tulane (USA), la possibilité de neutralisation croisée par des anticorps anti-NoVs dans ces échantillons de sérum était peu probable (Farkas *et al.* 2010c). La preuve directe de l'infection de l'Homme par les ReCVs a été fournie par la détection moléculaire d'une nouvelle souche ReCVs dans les échantillons de selle de six patients bangladais présentant des symptômes cliniques de gastro-entérite (Smits *et al.* 2012). Les enquêtes sont à poursuivre, y compris l'isolement de souches circulantes chez les primates non humains et les populations humaines, avant que le potentiel zoonotique des ReCVs ne soit définitivement établi.



Particules virales avec une morphologie typique de CV et un diamètre moyen calculé $\approx 35,8$ nm.

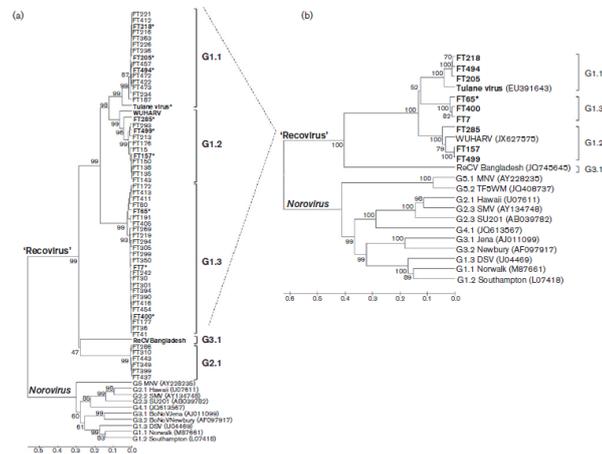
Figure 26 : Virus Tulane en microscopie électronique (Farkas *et al.* 2008).

2.1. Classification

L'analyse d'une partie de l'ARN polymérase des ReCVs détectés dans 500 échantillons de selle de macaques collectés entre mai et octobre 2008 au centre national de recherche sur les primates de Tulane (USA), a révélé deux grands génogroupes ReCVs (G1 et G2) et 3 génotypes pour le GI (Fig.27a). Les distances moyennes entre génogroupes ReCVs GI et GII (0,536 à 0,613) étaient comparables aux distances entre le NoVs GI et GII (0,534 à 0,695). De même, les distances moyennes entre les génotypes des ReCVs GI (0,251 à 0,359) étaient comparables à la distance entre les génotypes NoVs GI ou GII (0,289-0,352 et 0,251 à 0,346, respectivement) (Farkas *et al.* 2010a) Considérant que les échantillons ont été prélevés au cours d'une courte période de temps et d'une seule colonie de macaques, une plus grande diversité, comme pour les NoVs humains, peut être attendue. Récemment, des séquences de capsid pour plusieurs ReCVs

G1.1 et des informations sur les séquences de deux souches ReCVs supplémentaires ont été publiées (Farkas *et al.* 2014; Handley *et al.* 2012; Smits *et al.* 2012).

La souche WUHARV (Handley *et al.* 2012) détectée dans les échantillons de selle de macaques a été regroupée avec les ReCVs G1.2, tandis que la souche Bangladesh /289 (Smits *et al.* 2012) détectée dans des échantillons de selles humaines a été séparée de toutes les souches de macaques avec des distances équivalentes à celles entre les génogroupes de NoVs humains et affectée à un troisième génogroupe (G3) (Fig.27b) (Farkas *et al.* 2014). La comparaison des séquences génomiques des ReCVs a révélé que, bien que tous les ReCVs contiennent 3 ORF, la distance ou les chevauchements et les décalages de cadre entre les ORF présentent une variation importante entre les différents génotypes ReCVs (Farkas *et al.* 2014). Cette variation n'est pas observée chez les NoVs humains.



Classification génétique des ReCVs basé sur la séquence partielle de l'ARN polymérase (268nt) (a), basé sur la séquence complète de VP1(b). Les barres d'échelle indiquent la distance évolutive représentée par les substitutions nucléotidiques ou d'AA par site, respectivement. Les chiffres au niveau des nœuds indiquent le pourcentage de fois qu'un noeud a été soutenu lors de 1000 analyses bootstrap.

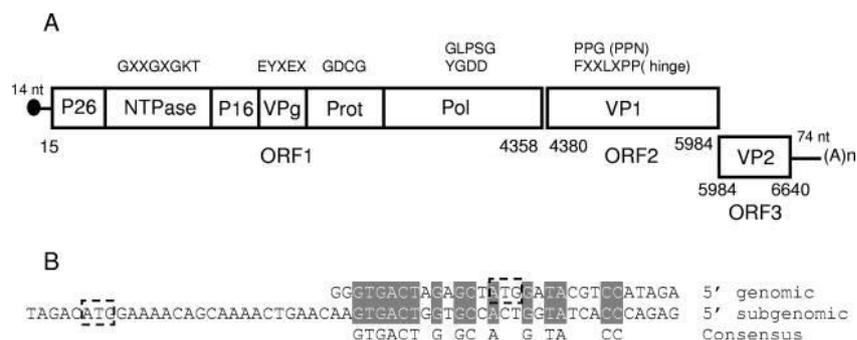
Figure 27 : Classification génétique des Recovirus (Farkas *et al.* 2014).

2.2. Structure des particules virales

2.2.1. Organisation génomique

Le génome complet du TV comprend 6714 nt sans la queue poly A, ce qui en fait le génome le plus court parmi les CVs. La composition en ribonucléotide est de 27,46% en adénine, 24,58% en cytosine, 22,07% en guanine, 25,87% en uracil et commence par trois

résidus G qui font partie des 14 nt en région 5' non traduite (UTR) (GGGTGACTAGAGCTATG). Le génome contient trois ORF (Fig.28 A). L'ORF1 et l'ORF2 sont en phase +2 par rapport au premier nucléotide du génome et séparé par 21 nucléotides, ce qui est différent chez les NoVs ou les ORF1 et 2 sont sur deux cadres différents se chevauchent sur 11 à 17 nt. L'ORF3 se situe dans un cadre +3 et chevauche le dernier nucléotide du codon de terminaison de l'ORF2 (**TAATG** : les lettres en gras indiquent le codon [stop] de l'ORF2, les lettres soulignées indiquent le codon [d'initiation] de l'ORF3), ce qui est similaire chez les NoVs et différente de chez les vesiviruses et sapovirus (**ATGA**), lagovirus (**ATGTCTGA**) et becoviruses (**TAATATG**). L'UTR en 5' n'a pas révélé d'homologies significatives avec la région 5' de l'ARN subgénomique, ce qui est différent chez les NoVs. Cependant, il s'aligne bien à une région de 21 nt en aval du codon d'initiation de l'ORF2 à partir de nt n°4404 (Fig.28 B). Le génome s'achève par un UTR de 74 nt et une queue poly (A) contenant entre 26-62 résidus d'Adénine (Farkas *et al.* 2008).



(A) Organisation génomique du TV. Les motifs en acides aminés conservés sont indiqués.

(B) Alignement des extrémités 5' des ARN génomiques et subgénomiques du TV. Les codons d'initiation de la polyprotéine NS et VP1 sont encadrés.

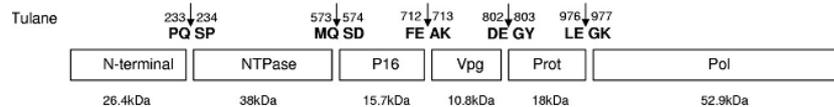
Figure 28 : Organisation génomique du virus Tulane (Farkas *et al.* 2008).

2.2.2. Protéines virales

2.2.2.1. Protéines non structurales

Codée par l'ORF1, la polyprotéine non structurale contient 1447 AA avec une masse moléculaire calculée de 161,9 kDa, ce qui en fait la plus petite chez les CVs. Elle a une organisation typique des CVs, contenant tous les motifs d'AA conservés, y compris GXXGXGKT (NTP^{ase}), EYXEX (Vpg), GDCG (la protéase)

et GLPSG et YGDD (la polymérase). Cette polyprotéine présente la composition en AA la plus proche (22 à 24 %) avec les NoVs. Basé sur des alignements avec les cartes de clivage publiées des polyprotéines d'autres CVs et les résidus d'AA aux sites de clivage, une carte de clivage pour la polyprotéine du TV a été construite, elle contient la protéine N-terminale (24,6 kDa), le NTP^{ase} (38 kDa), P16 (15,7 kDa), la Vpg (10,8 kDa), la protéase (18 kDa) et la polymérase (52,9 kDa) (Fig. 29) (Farkas *et al.* 2008).



Les masses moléculaires calculées des protéines (en kDa) et les positions des AA dans les sites de clivage sont indiqués.

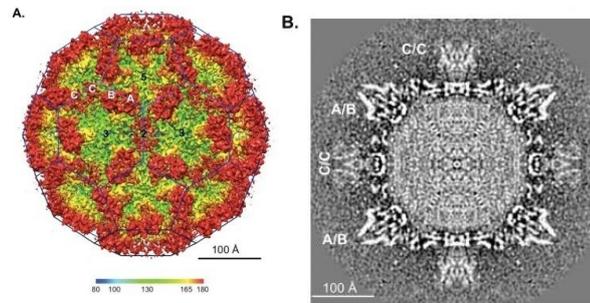
Figure 29 : Sites de clivage prédictifs de la polyprotéine basé sur des alignements de séquences avec des cartes de clivage publiés d'autres CVs (Farkas *et al.* 2008).

2.2.2.2. Protéines structurales

La protéine de capsid VP1 du TV contient 533 AA avec une masse moléculaire calculée de 57,9 kDa et montre l'identité globale en AA la plus proche (20 à 25 %) avec les NoVs. Elle contient le motif conservé PPG (PPN) et une charnière de FXXLXPP entre le domaine S et P caractéristiques de la plupart des capsides protéiques des CVs. La protéine mineure VP2 contient 218 AA avec une masse moléculaire calculée de 22,8 kDa et un point isoélectrique de 10 comme pour les NoVs, Elle montre également l'identité en AA la plus haute (22 à 26 %) avec les NoVs (Farkas *et al.* 2008).

La structure de la capsid du TV a été déterminée par des études de cryomicroscopie électronique à une résolution de 6.3Å. Le virion mesure environ 400 Å. Ces études ont montré que la capsid est constituée par l'association de 180 protéines VP1 s'organisant en deux types de dimères A/B et C/C et forment une fine et lisse coquille parsemée de 90 saillies de dimères. Cette capsid présente une organisation très proche de celle des autres CVs en particulier le NV. La caractéristique la plus distinctive de la capsid du TV réside dans les dimères C/C qui sont dans une conformation très souple avec une réduction significative des interactions entre le domaine S (Shell) et le domaine P (Protruding) de la protéine VP1. Une analyse structurale comparative a indiqué que les domaines P des

dimères C/C sont beaucoup plus souples que ceux des autres CVs. Ces observations, combinées avec des études antérieures sur d'autres CVs, ont conduit à émettre l'hypothèse que la flexibilité accrue du domaine P des dimères C/C est probablement nécessaires pour les interactions avec les cellules hôtes et par conséquent une décapsidation et libération efficace du génome virale (Yu *et al.* 2013).



(A) Représentation de la reconstruction de la surface du TV avec l'icosaèdre à symétrie 2, 3, 5.
(B) Le profil de densité radiale calculé à partir de la carte de densité 3D du TV. (Yu *et al.* 2013)

Figure 30 : Cryo-microscopie électronique et reconstruction 3D du virus Tulane.

2.3. Interactions Recovirus-HBGAs

Les HBGAs ont été impliqués en tant que molécules de fixation aux récepteurs cellulaires pour les ReCVs. Les essais *in vitro* ont démontré la liaison du TV aux échantillons de salive de type A et B et à la BSA conjuguée aux trisaccharides de type A et B. Des études ont démontré que la réplication du TV *in vitro* était bloquée par des salives bouillies de type A et B, mais pas de type O (Farkas *et al.* 2010b). L'évaluation des ReCVs G1 avec un panel ($n = 35$) d'échantillons de salives humaines a révélé l'existence de trois types d'interaction avec les HBGAs. La réplication de toutes les souches G1.1 testées a été bloquée par les échantillons de salive de type A et B, mais pas par le type O, tandis que les souches G1.2 ont été bloquées uniquement par des échantillons de salive de type B. Fait intéressant, deux des trois isolats G1.3 testés ont été bloqués à la fois par le type A et B, tandis qu'un isolat n'a été bloquée par aucun des échantillons de salive (Farkas 2014).

Très récemment une étude a montré que, tandis que le TV se lie aux quatre types d'antigènes B (types 1 à 4), il ne reconnaît que l'antigène A de type 3 parmi les quatre types d'antigènes A testés. Cette étude a également montré une réduction significative de la réplication du TV dans les cellules LLC-MK₂ après traitement avec les antigènes A de type 3 et B (Zhang *et al.* 2015). Mais la susceptibilité à l'infection par les ReCVs et un type (s)

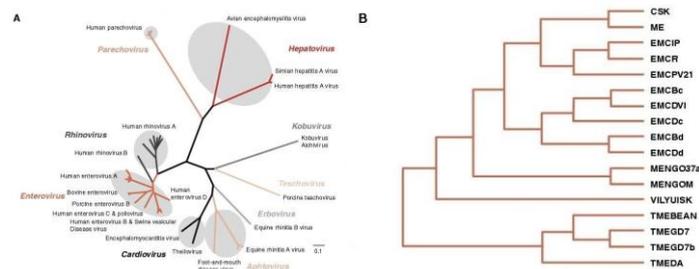
particulier(s) d'HBGAs de n'a pas pu être établie par l'évaluation de 500 macaques car 98 % des animaux appartenait au type B (Farkas *et al.* 2010b).

3. Mengovirus

Le Mengovirus est une souche du virus de l'encéphalomyocardite (EMCV), espèce du genre *Cardiovirus*, membre de la famille des *Picornaviridae*. En 1948, le Mengovirus a été isolé par Dick et coll., (Dick *et al.* 1948) à Entebbe, dans le district Mengo en Ouganda, à partir d'un singe rhésus en captivité ayant développé une paralysie des membres inférieurs. L'EMCV présente une distribution mondiale et infecte différentes espèces animales domestiques et sauvages, en particulier les rongeurs, le porc et les primates non humains. En fonction de la souche virale et de l'espèce infectée, il peut induire différentes maladies, que ce soit des myocardites, des troubles nerveux, des avortements ou un diabète. L'infection de l'homme par l'EMCV n'est pas établie. Cependant, son large spectre d'hôte ainsi que ses caractéristiques biologiques font de ce virus un agent zoonotique potentiel. Par ailleurs, plusieurs arguments directs et indirects suggèrent que l'infection de l'homme ne peut pas être écartée.

3.1. Classification

Le virus de l'encéphalomyocardite (EMCV) appartient au genre *Cardiovirus* au sein de la famille des *Picornaviridae* (Fig.31 A) (Hammoumi 2007). Ce genre est séparé en deux sous-groupes. L'EMCV est le prototype du sous-groupe EMC-like comportant les Mengovirus, MM, Maus-Eberfeld (ME) et Columbia-SK. L'autre sous-groupe contient les virus de Theiler (BeAn, DA et GDVII) auxquels est associé le virus Vilyuisk humain, isolé à partir de patients atteints d'encéphalites aiguës et chroniques (Fig.31B).



(A) Arbre phylogénétique des Picornavirus.

(B) Arbre phylogénétique des Cardiovirus obtenu par l'alignement de la séquence génomique totale.

Figure 31 : Classification du virus de l'Encéphalomyocardite (Hammoumi 2007).

3.2. Structure des particules virales

C'est un virus non enveloppé ayant une capsid à symétrie icosaédrique de 30 nm de diamètre (Luo *et al.* 1987).

3.2.1. Organisation génomique

Le génome est constitué d'un ARN monocaténaire de polarité positive d'environ 7840 nt, composé d'une région codante entourée de deux régions non codantes d'environ 833 à 1199 nt et de 126 nt aux extrémités 5' et 3' respectivement (Fig.32) (Palmenberg *et al.* 1984).

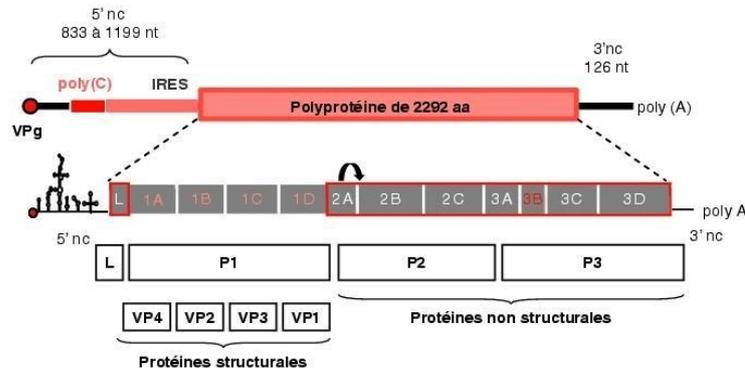


Figure 32 : Organisation génomique du virus de l'encéphalomyocardite

(Hammoumi 2007).

L'extrémité 5' ne possède pas de structure coiffée (cap) mais elle est liée de manière covalente à une petite protéine virale (VPg) de 20 AA. L'extrémité 3' possède une séquence poly A d'environ 20 à 70 nt. L'ARN génomique renferme un seul cadre de lecture ouvert, codant une polyprotéine de 2292 AA qui est scindée par des protéases virales en 12 protéines. L'initiation de la traduction est assurée grâce à un mécanisme coiffe-indépendant dans lequel le ribosome se lie à un site interne d'entrée du ribosome (IRES), situé entre 150 et 330 nt de l'extrémité 5'. À environ 150 bases de l'extrémité 5', le génome de l'EMCV possède, comme celui des aphtovirus, une séquence poly C de longueur variable (LaRue *et al.* 2003). Au niveau de la région 5' non codante, l'ARN est organisé en structures de type tige-boucle, excepté pour le fragment poly C. La majeure partie de ces structures correspond au site interne d'entrée du ribosome (Duke *et al.*

1992). Une fois à l'intérieur d'une cellule hôte, le génome du Mengovirus agit comme un ARNm directement traduit par les ribosomes dans le cytoplasme.

En 1989, Duke et Palmenberg ont créé des ADNc recombinants du Mengovirus (vMC₀ et vMC₂₄) dont la séquence poly C avait été tronquée, la séquence étant (C₄₄UC₁₀) dans le Mengovirus natif (souche-M) (Fig.33) (Duke *et al.* 1990). Les virus ainsi obtenus ont présenté une virulence atténuée chez la souris, le virus recombinant vMC₀, avait une dose létale 50% (DL50) chez la souris au moins 10⁸ à 10¹¹ fois supérieur à celle du type sauvage Mengo-M (Martin *et al.* 1996), tout en se montrant capables d'induire une réponse anticorps importante (Osorio *et al.* 1996b). Le Mengovirus vMC₀ a prouvé être un vaccin sûr et efficace dans presque toutes les espèces d'animaux sauvages et domestiques qui sont couramment exposés aux cardioviruses EMCV-like (Dethlefs *et al.* 1997; Osorio *et al.* 1996a).

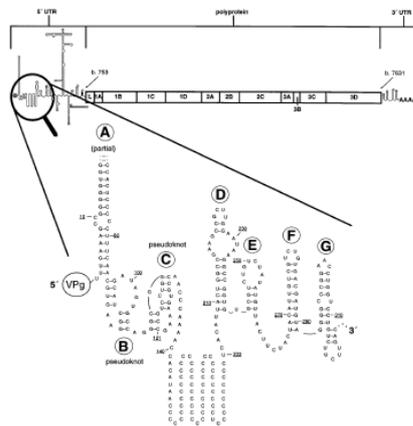


Figure 33 : Représentation schématique de la région 5' UTR du Mengovirus

(Martin *et al.* 1996).

3.2.2. Protéines virales

Les protéines des Picornavirus, ainsi que leurs précurseurs, tirent leurs noms de leur position au niveau de la polyprotéine : L (leader), P1 (précurseur des protéines de capsid 1A, 1B, 1C et 1D, nommées respectivement VP4, VP2, VP3 et VP1 lorsqu'elles sont intégrées au virion), P2 (précurseur des protéines non structurales 2A, 2B et 2C) puis P3 (précurseur des protéines non structurales 3A, 3B, 3C et 3D) (Palmenberg *et al.* 1984) (Fig.32).

3.2.2.1. Protéines non structurales

Issues du clivage des précurseurs P2 et P3, ne sont pas retrouvées dans le virion, sauf VPg (3B) qui est associée à l'extrémité 5' du génome viral.

Tableau 7: Caractéristiques des différentes protéines non structurales de l'EMCV d'après (Aminev *et al.* 2003).

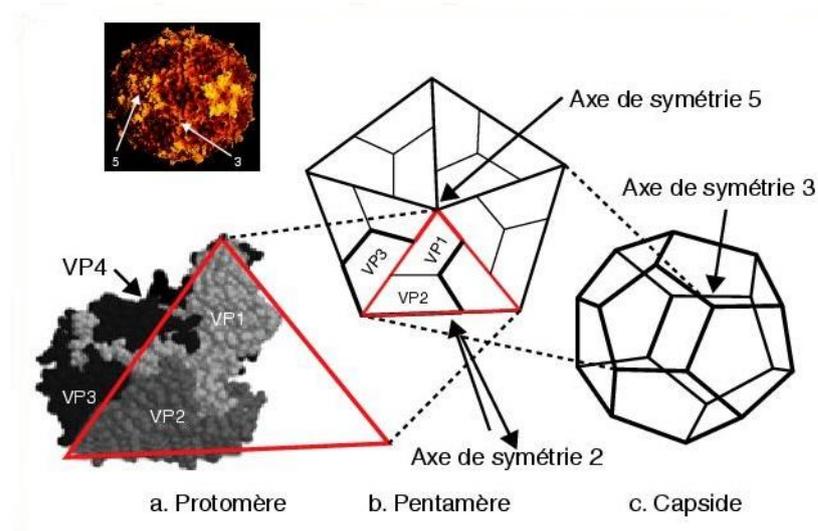
Dénomination	PM (kDa)	Fonction (s)
L (leader)	7	Inhibition de la transcription des gènes IFN α 4 et β Impliquée dans la chute de la synthèse des protéines cellulaires et interférerait avec le trafic nucléocytoplasmique.
P2	2A	pas d'activité protéase. intervenant dans la diminution de la synthèse des ARNm et des protéines des cellules infectées.
	2B	Interviendrait avec la protéine 2C dans la formation des vésicules membranaires lors de la réplication virale
	2C	empêchant le relargage des protéines à la surface cellulaire ATP ^{ase}
3P	3A	Association du précurseur AB aux vésicules membranaires
	3B VPg	Interviens dans l'initiation de la synthèse des brins positifs et négatifs de l'ARN virale
	3C ^{pro}	Protéase (clivage des protéines virales)
	3D ^{pol}	ARN virale ARN dépendent (réplication du génome virale)

3.2.2.2. Protéines structurales

L'analyse par cristallographie et diffraction aux rayons X du Mengovirus a montré que la capsid virale présente une organisation très proche de celle des autres picornavirus (Krishnaswamy and Rossmann 1990; Luo *et al.* 1987). Cette capsid possède une symétrie icosaédrique comportant des axes de symétrie d'ordre 5, 3 et 2. Elle est composée de 60 copies des 4 protéines: VP1, VP2, VP3 et VP4 constituées de 227, 256, 231 et 70 AA respectivement. Composée de 12 pentamères, chaque pentamère est formé par la répétition (5X) de l'unité de base appelée protomère formé de l'association d'un exemplaire de chacune des protéines VP1, VP2, VP3 et VP4. Les protéines VP1, VP2 et VP3 ont une structure assez similaire. Cependant, leur répartition dans la capsid leur confère des situations très différentes. Les protéines VP1 sont regroupées autour des axes de symétrie d'ordre 5. Les protéines VP2 et VP3 alternent autour de l'axe de symétrie d'ordre 3. Pour la plupart des picornavirus, la protéine VP1 contient, d'une part, une partie importante du site de fixation au récepteur cellulaire et, d'autre part, certains sites

antigéniques majeurs. La protéine VP4 est située sur la face interne de la capside et établit probablement des interactions avec l'ARN viral. Elle présente à son extrémité N-terminale un groupement myristate nécessaire pour l'assemblage des protomères en pentamères.

Quatre sites de neutralisation ont été définis sur la capside du Mengovirus, à l'aide d'anticorps monoclonaux neutralisants et après analyse des séquences de vingt mutants d'échappement (Kobasa *et al.* 1995). Ces sites sont situés à la surface de la capside.



L'unité de base est le protomère (a) organisé en pentamère (b) autour des axes de symétrie 5. Chaque protéine VP1 est située au niveau de l'axe de symétrie 5.

Figure 34 : Structure schématique de la capside d'un picornavirus et organisation des protéines structurales (Hammoumi 2007).

3.3. Multiplication *in vitro*

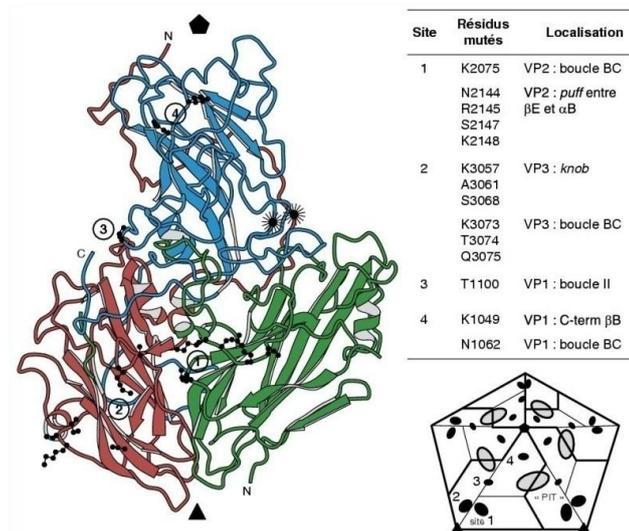
L'EMCV peut se multiplier dans de nombreux types de culture cellulaire comme les fibroblastes primaires d'embryon de souris, les cardiomyocytes humains, la lignée fibroblastique murine L929, les lignées humaines HeLa ou HEP2, les cellules de rein de hamster BHK21, les fibroblastes embryonnaires de cobaye ou les cellules de rein de singe Vero. Les cellules de rat semblent être peu sensibles au virus (Kelly *et al.* 1983).

En microscopie électronique, un des effets cytopathiques caractéristiques est la prolifération de membranes du réticulum endoplasmique lisse ainsi que de vacuoles. Au cours de l'infection, ces vacuoles s'accumulent dans la cellule, déplaçant et comprimant le noyau. Dans celui-ci, la chromatine subit une condensation et une fragmentation

(Wellmann *et al.* 1975). Des quantités importantes de virions peuvent être observées en périphérie du cytoplasme, avant que la membrane cellulaire ne soit rompue à divers endroits et que l'intégrité cellulaire ne soit perdue (8 à 12 heures après infection).

3.4. Propriétés antigéniques

Le Mengovirus et l'EMCV ont la capacité d'agglutiner les érythrocytes humains via l'attachement à la glycopherine A, une sialoglycoprotéine majeure présente à la surface de ces cellules (Burness and Pardoe 1983). Sur les cellules humaines nucléées, le virus semble s'attacher via une sialoglycoprotéine de 70 kDa, différente de la glycopherine A et qui reste à identifier (Jin *et al.* 1994).



Les acides aminés indiqués dans le tableau sont en noir. Le pit est indiqué par les deux étoiles, l'axe de symétrie 5 par un pentagone et l'axe de symétrie 3 par un triangle. Les sites sont aussi indiqués sur la vue d'ensemble, donnée par le pentamère en bas à droite. Le tableau montre les différents acides aminés mutés chez les mutants d'échappement aux anticorps neutralisants ainsi que leur positionnement sur la capsidre.

Figure 35 : Sites antigéniques de neutralisation de Mengovirus (Hammoumi 2007).

4. Etudes de l'inactivation des norovirus humains

Par définition, l'inactivation se réfère à l'élimination ou la réduction de l'infectivité d'un virus. Celle-ci est généralement exprimée par la réduction du titre infectieux du virus calculé en \log_{10} après exposition à l'agent inactivateur. Les CVs et leurs sensibilités ou résistances respectives à l'inactivation ont été étudiés de manière intensive pendant des

années, en raison de leur implication en pathologie humaine et animale. Ces études ont impliqué un ou plusieurs des trois approches suivantes: (1) analyse quantitative de l'ARN génomique des NoVs humains en utilisant la RT-PCR. (2) essais cliniques sur des volontaires humains. (3) étude des réponses obtenues en utilisant des virus de substitution. Différents substituts ont été sélectionnés pour l'étude de l'inactivation des virus dans les aliments, l'eau et les échantillons environnementaux, ainsi que l'inactivation par des désinfectants chimiques. Il existe une abondante littérature sur l'inactivation de divers CVs animaux, particulièrement le FCV et le MNV.

4.1. Inactivation physique

4.1.1. Inactivation à différentes températures

L'utilisation de températures élevées pour la conservation des aliments est basée sur les effets destructeurs de la chaleur sur les micro-organismes. Il existe 2 techniques couramment utilisées: la pasteurisation qui a pour objectif la destruction des organismes pathogènes ou la réduction du nombre d'organismes responsables d'altération et la stérilisation qui implique la destruction de tous les micro-organismes viables. La documentation traitant l'inactivation thermique des CVs remonte au début des années 1960 (Zee and Hackett 1967). Le mécanisme sous-jacent de l'inactivation des virus est probablement dû à des changements dans la capsid. O'Brien et coll., ont montré qu'un traitement thermique à 56°C provoqué un changement dans le point isoélectrique de la capsid (O'Brien and Newman 1979). Dans une autre étude réalisée sur le FCV et les picornavirus, Nuanualsuwan et coll., ont suggéré que l'inactivation est probablement due à des changements conformationnels des protéines virales et des sites antigéniques de fixation aux récepteurs (Nuanualsuwan S. 2003). Les études d'inactivation du MNV effectuées par Baert et coll., ont montré que la présence du MNV détecté par RT-PCR n'était pas corrélée avec l'infectivité des particules virales après traitement thermique, ceci indique que la chaleur a un effet sur l'infectivité plus important que sur le génome viral (Baert *et al.* 2008). Ce phénomène a également été observé avec les VLPs. Ausar et coll., en utilisant des techniques biophysiques ont observé une stabilité des VLP jusqu'à 55°C, mais à des températures supérieures à 60°C, ces VLPs ont subi des transitions de phase, les structures secondaires, tertiaires et quaternaires au niveau des protéines ont été perturbées. Les changements de structure quaternaire se sont révélés être caractérisés par la perte de la symétrie icosaédrique des VLPs (Ausar *et al.* 2006).

De nombreuses études ont évalué l'inactivation thermique des substituts des NoVs humains selon différentes approches. Dans une étude, Hirneisen et coll., ont comparé l'inactivation thermique du MNV et le TV, après traitement dans un master cyclor pendant 2 min à 20, 50, 60, 65,70 et 75°C. Cette étude a montré que les deux virus ont été inactivés au-delà de la limite de détection à 70 et 75°C. Il n'y avait aucune différence significative entre l'inactivation des deux virus à toutes les températures étudiées, les deux virus sont restés infectieux après traitement à 60 et 65°C (Hirneisen and Kniel 2013). L'FCV a montré des caractéristiques d'inactivation thermique similaires (Cannon *et al.* 2006; Duizer *et al.* 2004). Ces résultats sont comparables à ceux observés avec les NoVs humains qui restent infectieux après 30 min à 60°C (Dolin *et al.* 1972). Dans une autre étude, Hewitt et coll., ont rapporté que les NoVs humains sont plus résistants que le FCV et le MNV lorsque les titres sont quantifiés en RT-PCR (Hewitt *et al.* 2009). Mais Dantcho et coll., ont rapporté que cette résistance est similaire entre les 3 virus lorsque la RT-PCR quantitative a été précédée par des capture utilisant les récepteurs, donc une corrélation entre récepteurs et infectiosité, ils ont estimé également que les NoVs humains sont totalement inactivés à 73°C pendant 2 min (Dancho *et al.* 2012).

4.1.2. Inactivation par irradiation UV

La lumière ultraviolette (UV) est un rayonnement électromagnétique avec des longueurs d'onde plus courtes que la lumière visible, qui peut provoquer des dommages dans une variété d'organismes allant des bactéries aux êtres humains. La lumière UV peut être divisée en plusieurs gammes, notamment UVA (400 à 320 nm), UVB (320-280 nm) et UVC (280 à 100 nm). Les UVC, ou UV à courte portée, sont considérés comme germicides (Kowalski *et al.*). Cette technique présente de nombreux avantages y compris le faible coût, l'absence d'irritation ou production de sous-produits toxiques, et la facilité de manipulation et d'utilisation. Les UV sont souvent utilisés dans la désinfection de l'eau (Hijnen *et al.* 2006), plus récemment, ils ont été évalués comme un moyen de désinfection des aliments et des surfaces de préparation des aliments (Fino and Kniel 2008; Jean *et al.* 2011) et en tant que technologie pour atténuer le risque d'introduire un virus dans un processus de bioproduction (Weaver and Rosenthal 2010).

Les UV s'attaquent principalement à l'acide nucléique (Nuanualsuwan *et al.* 2002). Mais à des doses suffisamment élevées ($> 1000 \text{ mW/cm}^2$) ils peuvent également affecter les protéines de capsid, rendant le génome sensibles aux ARN^{ases} présents dans

l'environnement (Smirnov *et al.* 1983). L'efficacité des UVC et UVB a été évaluée pour l'inactivation de nombreux CVs. En 2011, Park et coll., ont évalué l'inactivation du MNV, FCV, echovirus 12 et le coliphage (F +) MS2 par les UVC. Ils ont montré que les doses nécessaires pour atteindre 4 log₁₀ d'inactivation étaient de 29, 25,30 et 70 (mJ/ cm²) pour le MNV, FCV, echovirus 12 et MS2, respectivement. Les taux d'activation entre le FCV et l'echovirus ou entre le FCV et le MNV étaient significativement différents. Ils classèrent les 4 virus du plus résistant au plus faible aux UV comme suite : MS2 > MNV ≈ echovirus 12 > FCV (Park *et al.* 2011). Dans une autre étude, Tian et coll., ont évalué l'inactivation du TV. Ils ont montré que le TV est plus résistant aux UVC que le MNV et le FCV (Tian *et al.* 2013). Récemment, Dancho et coll., ont estimé qu'une dose D'UV de 2J/cm² était nécessaire pour inactiver les NoVs humains basée sur des études de RT-PCR combinée à la capture par récepteur (Dancho *et al.* 2012).

4.1.3. Inactivation par les rayonnements ionisants

Les rayonnements ionisants ont été étudiés depuis 1904 pour leur capacité à détruire les bactéries dans les aliments, et plus tard évalué pour leur capacité à détruire la trichine chez le porc en 1921 (Josephson *et al.* 1921). Il existe différents types de rayonnements ionisants y compris les rayons X, gamma et bêta. Il en existe deux types pour une utilisation potentielle dans la transformation des aliments : source gamma cobalt-60 et les générateurs de faisceaux d'électrons. Les propriétés des aliments irradiés sont similaires aux techniques de pasteurisation classiques, l'avantage est que les produits alimentaires peuvent être traités dans leur emballage, ce qui élimine le risque de contamination après traitement. L'irradiation est également efficace sur les aliments congelés (Farkas 1989). Les rayonnements ionisants provoquent des ruptures dans l'ARN et l'ADN, mais en raison de la petite taille de leur génome, les virus entériques sont plus résistants à l'inactivation par rayonnement ionisant par rapport aux bactéries, aux parasites et aux champignons (Patterson 1993). L'efficacité d'inactivation s'est révélée dépendante de nombreux facteurs, notamment la taille du virus, la dose, la matrice, la présence d'oxygène et la température (Patterson 1993). La littérature sur l'inactivation des CVs par rayonnement ionisant n'est pas extensive. Dans une étude évaluant l'inactivation par les rayons gamma du MNV, de VLPs de NoVs humains et du virus de la stomatite vésiculeuse (VSV) dans des produits frais (fraises, laitue romaine et épinards), Feng et coll., ont démontré que le MNV et les VLPs étaient résistants à l'irradiation gamma. Par

exemple pour le MNV, avec une dose de radiation de 5,6 kGy, seule une réduction de 1,7-2,4 \log_{10} a été observée alors que cette même entraîne une réduction de 3,3 \log_{10} du VSV en milieu Eagle modifié par Dulbecco (DMEM). Ils démontrèrent en outre que l'irradiation gamma perturbait la structure du virion, ce qui a entraîné l'inactivation du virus. Considérant les limites de dose d'irradiation approuvées par la FDA (4,0 kGy), cette étude montre que cette méthode ne peut être utilisée contre les contaminations virales dans les produits frais, cette technologie peut être pratique pour inactiver les virus dans d'autres situations, telles que la stérilisation du matériel médical (Feng *et al.* 2011).

4.1.4. Inactivation à haute pression hydrostatique

Le procédé à haute pression hydrostatique (HPH) consiste à appliquer une haute pression par eau comprimée à un produit alimentaire emballé. C'est une méthode non thermique qui permet d'avoir un produit de haute qualité et avec une durée de vie prolongée et présentant l'avantage d'être microbiologiquement sain (Patterson 2005). L'apport de cette technologie est tout à fait original car les produits obtenus ont un goût plus frais, un meilleur aspect et texture, et ne permet pas de perte de nutriments, en comparaison aux aliments traités par des méthodes thermiques. Les applications de l'HPH à l'industrie agroalimentaire sont nombreuses et variées (Patterson 2005). Divers facteurs peuvent affecter l'inactivation virale : la durée, la température, l'importance de la pression, et les propriétés de la matrice alimentaire. Le traitement par l'HPH peut entraîner la dissociation et/ou la dénaturation des protéines virales (Silva *et al.* 1992). Les modifications induites par la pression sur l'enveloppe virale peuvent être des altérations subtiles des protéines de capsid (Kingsley *et al.* 2002a) ou des protéines de reconnaissance des récepteurs (Pontes *et al.* 2001), qui se traduisent par la perte de l'infectivité. La dénaturation des protéines est un événement complexe et dépend de la structure de la protéine, la gamme de pression, la température, le pH et la composition du solvant (y compris la présence de sucres, de sels et d'autres additifs) (Balny and Masson 1993). Plusieurs études ont révélé la nature hétérogène des réponses des virus à l'HPH. Certains virus sont extrêmement résistant à la pression, tandis que d'autres sont sensibles. Le FCV est complètement inactivée par des pressions aussi basses que 275 MPa pendant 5 min (Kingsley *et al.* 2002a). Dans une autre étude, Li et coll., ont démontré la stabilité du TV et du MNV sur les bleuets et les huîtres. Les résultats ont indiqués que le TV pourrait être efficacement inactivée à des niveaux de pression ≥ 300 MPa et le MNV à

des niveaux de pression ≥ 400 MPa dans le milieu de culture, les bleuets et les huîtres. L'inactivation dans les bleuets et les huîtres avait augmenté lorsque la température de l'échantillon avait diminué ($4 > 21 > 35^{\circ}\text{C}$) (Li *et al.* 2013). Dans une étude plus récente portant sur l'inactivation des NoVs dans des coquillages (*Crassostrea virginica*, *Mercenaria mercenaria*) par la HPH, Ye et coll., en réalisant une extraction des particules virales à l'aide de mucines gastriques porcines (PGM) conjugué à des billes magnétiques suivie d'une quantification en RT-PCR, ont montré que pour avoir une réduction de $4\log_{10}$ dans les huîtres, il faut exercer une pression ≥ 400 MPa à 25 ou 6°C pendant 5 min pour la souche GII.4 et ≥ 450 MPa à 1°C ou ≥ 500 MPa à 6°C pendant 5 min pour la souche GI.1 et que cette inactivation augmente avec une diminution de la température ($1 > 6 > 25^{\circ}\text{C}$). Basé sur les résultats actuels et de l'études mentionnées ci-dessus, Ye et coll., ont conclue que le TV était plus sensible à la pression que les NoVs GI.1 et GII.4 et qu'il ne constitué pas un substitut approprié pour l'étude de l'inactivation des NoVs par l'HPH (Ye *et al.* 2014).

4.2. Inactivation chimique

4.2.1. Inactivation par les Alcools

Les alcools, notamment l'éthanol, sont couramment utilisés comme désinfectants en milieu hospitalier, en laboratoire et pour la désinfection des surfaces. L'inactivation des CVs par les alcools a été abordée dans de nombreuses études. La concentration optimale des alcools (y compris l'éthanol, le 1-propanol et le 2-propanol) pour l'inactivation du FCV a été rapportée dans l'étude de Gehrke et coll., elle s'avère être de 50 à 70%, à la fois lors de l'évaluation en suspension et sur des surface (de la peau). Dans cette étude, le 1-propanol présente l'efficacité maximale parmi les alcools évalués. Malik et coll., ont mené une étude sur des surfaces en acier inoxydable. Ils ont montré que la concentration optimale pour l'éthanol a été dans la gamme de 70 à 90 %, et de 50 à 70 % pour le 2-propanol avec des durées de contact de 1 à 10 min (Malik *et al.* 2006). Les études réalisées par Sattar et coll., (Sattar *et al.* 2011) sur l'inactivation du FCV et du MNV sur la peau ont donné des résultats similaires, avec inactivation optimale de 62 à 75 % d'éthanol. Ce résultat est également en accord avec les résultats de Park et coll., (Park *et al.* 2010). Dans l'étude présentée par Tung (Tung 2011), le MNV a affiché une plus grande sensibilité à l'inactivation par l'éthanol que le FCV. Belliot et coll., ont évalué des

concentrations plus faibles (10 à 60 %) d'éthanol et de 2-propanol pour l'inactivation du MNV en solution. Pour les deux alcools, des concentrations à 10% étaient inefficaces alors que seul le 2-propanol à 30% avec un temps de contact de 3 min semblait avoir une certaine efficacité (Belliot *et al.* 2008a). Une étude similaire a été menée par Magulski et coll., avec le MNV sur des surfaces en acier inoxydable et des concentrations plus faibles (20 à 60%) d'éthanol, de 1-propanol et de 2-propanol. Cette étude a rapporté qu'à des concentrations de 30 à 50 %, le 1-propanol affichait la plus grande efficacité, alors que le 2-propanol avait affiché l'efficacité la plus faible sur toute la gamme des concentrations, par rapport aux deux autres alcools (Magulski *et al.* 2009). L'ajout d'une charge organique (3% p/v de PBS + 3% p/v érythrocytes de mouton lavé) (Magulski *et al.* 2009), ou les selles humaines ou d'excréments artificiels (Tung 2011) ne semblait pas avoir un impact sur l'inactivation des CVs par les alcools (Magulski *et al.* 2009; Tung 2011). Plus récemment, la stabilité du TV aux alcools a été évaluée, le TV était résistant à une faible concentration d'éthanol (< 40 %), mais il a été complètement inactivé ($5 \log_{10}$) avec 50 à 70 % l'éthanol, après une courte exposition (20 sec) (Tian *et al.* 2013). Cromeans et coll., ont démontré que le MNV était le plus sensible à l'inactivation par les alcools (Cromeans *et al.* 2014).

4.2.2. Inactivation par des agents oxydants

Les agents oxydants sont une autre classe de substances qui comprend l'hypochlorite de sodium (eau de Javel), les agents générateurs de chlore et d'iode libre et les agents générateurs d'oxygène actif, comme le peroxyde d'hydrogène, l'acide peracétique et l'ozone.

4.2.2.1. Le chlore

Le chlore est l'agent désinfectant le plus couramment utilisé, l'utilisation de 3 formes a été approuvée : chlore gazeux (Cl_2), hypochlorite de calcium (CaClO_2) et hypochlorite de sodium (NaOCl_2). Le chlore est principalement utilisé dans le traitement de l'eau. Dans l'industrie alimentaire, il est couramment utilisé dans le traitement des produits frais, par pulvérisation afin de réduire le microbiote du sol associée à la laitue et comme additif dans l'eau pour contrôler la contamination croisée des tomates et oignons par exemple. De nombreux facteurs environnementaux ont une incidence sur le processus de désinfection par le chlore, y compris la quantité de chlore libre dans la solution, le pH, la température et la quantité de matière organique. Les inconvénients du chlore

comprennent l'activité liée au pH, la formation de sous-produits chlorés et le potentiel toxique notamment la formation de chlore gazeux. L'efficacité du chlore très dépendante de la charge en produits organique et, par conséquent, la surveillance et le contrôle de la teneur en chlore est critique. Le chlore a également le potentiel de former des sous-produits chlorés qui peuvent être préjudiciables à l'environnement et abîmer l'équipement de traitement.

Le dioxyde de chlore (ClO_2) est un agent oxydant qui est extrêmement soluble dans l'eau. Il est jusqu'à 5 fois plus soluble que le chlore, mais contrairement à ce dernier, il ne réagit pas avec l'ammoniac ou des composés organiques pour former des trihalométhanes (White, 1978; Schnoor et autres 1979). D'autres avantages du ClO_2 comprennent l'oxydation du fer et du manganèse en réduisant la décoloration de l'eau traitée, l'incapacité de réagir avec l'ammoniac, et la stabilité par rapport au pH (Aieta et Berg, 1986). Les principaux inconvénients du ClO_2 sont qu'il doit être produit sur place en raison de son instabilité et il a le potentiel d'être explosif lorsqu'il est concentré (Beuchat, 1998).

Les mécanismes sous-jacents de l'inactivation virale par le chlore ont été décrits par O'Brien et Newman (1979), en étudiant les caractéristiques de sédimentation du poliovirus dans des gradients de glycérol. Ils démontrèrent que l'inactivation est le résultat du clivage de l'ARN associé à la capsidie mais que l'inactivation n'a pas modifié l'état conformationnel des virus (O'Brien and Newman 1979). Plus tard Li et coll., en utilisant le VHA, ont montré que l'antigénicité disparaissait après l'infectivité lors du traitement par le chlore et qu'au niveau de l'ARN viral les différentes régions du génome n'avaient pas la même sensibilité, les régions 5' et 3' non traduites étant les plus sensibles (Li *et al.* 2004). La littérature qui traite de l'efficacité de l'inactivation des CVs est vaste. Une première étude de Keswick et coll., a évalué la résistance des NoVs au chlore sur des volontaires sains. Ils ont suggéré que la chloration de routine (3,75 à 6,25 mg/L) seule n'était pas suffisante pour inactiver les NoVs (Keswick *et al.* 1985). Dans une étude réalisée par Gulati et coll., les concentrations d'hypochlorite de sodium permise par la FDA n'étaient pas suffisantes pour inactiver le FCV, ce dernier étant résistant à tous les désinfectants couramment utilisés pour le rinçage des produits aux concentrations autorisées par la FDA, les auteurs ont démontré qu'à une dose de 5000 mg /L, le FCV a été inactivé de 3 \log_{10} (Gulati *et al.* 2001). Dans une étude visant à comparer le comportement du MNV et du TV sous divers traitements, Hirneisen et coll., ont traité ces deux virus en solution avec des concentrations variables de chlore (0,2 à 2000 ppm)

pendant 5 min à T° ambiante (20°C). Après traitement, il n'y avait pas de différence significative entre les deux virus, à l'exception de 2 ppm, où le titre du TV avait diminué de manière significative par rapport à celui du MNV, ce qui a suggérer que le MNV pouvait être mieux adapté comme substitut des NoVs humains avec une résistance à des niveaux normaux de chlore dans l'eau potable (Hirneisen and Kniel 2013).

4.2.2.2. L'ozone

L'ozone est une molécule d'oxygène triatomique (O₃), une forme naturelle de l'oxygène moins stable que L'O₂, qui existe sous forme de gaz bleuâtre à l'odeur âcre. Il est partiellement soluble dans l'eau et est efficace pour inactiver de nombreux micro-organismes par le biais de l'oxydation des membranes cellulaires. Son potentiel d'oxydation est de 2,07 mV, ce qui en fait l'un des agents oxydants les plus puissants disponibles. L'efficacité antimicrobienne de l'ozone peut être jusqu'à 52 % supérieure que celui du chlore et il est actif sur un spectre beaucoup plus large de micro-organismes que les autres désinfectants. En solution, l'ozone se décompose pour produire les radicaux hydroperoxyde (\cdot HO₂), hydroxyle (\cdot OH) superoxyde (\cdot O₂), la réactivité de l'ozone est due à ces radicaux libres (Hirneisen *et al.* 2010). L'ozone est couramment utilisé en Europe pour le traitement de l'eau publique, aux États-Unis et il est utilisé pour le traitement de l'eau en bouteille. Il a un potentiel pour être utilisé dans de nombreuses applications de transformation des aliments. Il présente l'avantage de ne laisser aucun résidu dangereux sur les denrées alimentaires ou sur les surfaces en contact des aliments (Khadre et autres, 2001). La stabilité de l'ozone est facilement affectée par des facteurs tels que la température, le pH et la présence de substances organiques. Ces facteurs doivent être pris en considération pour l'application de l'ozone à l'inactivation des virus dans l'eau et les aliments. Dans une étude Hirneisen et coll., ont comparé l'inactivation par l'ozone des substituts de NoVs humains : le FCV et le MNV sur des produits frais (oignons verts et laitue) et dans l'eau stérile. Le FCV a montré une inactivation > 6 log₁₀ dans l'eau après 5 min de traitement avec 6,25 ppm alors que sur la laitue et les oignons verts, ils ont noté une diminution ~ 2 log₁₀ dans les mêmes condition. Le MNV inoculé sur les oignons verts et la laitue a montré une réduction > 2 log₁₀ après 1 min de traitement à l'ozone, cette étude a montré que la matrice alimentaire joue le plus grand rôle dans la protection contre l'inactivation à l'ozone (Hirneisen *et al.* 2011).

4.2.3. Inactivation acido/basique

Un grand nombre de CVs sont entériques et sont adaptés à la survie dans des milieux acides afin de cibler l'infection dans les cellules intestinales. Une exception à cette règle est le FCV, qui est un virus respiratoire et non un virus entérique; et comme on pouvait s'y attendre, FCV est plus labile à pH faible que les CVs entériques. Pour cette raison ce virus n'est pas un substitut optimal en raison de son instabilité sur une large gamme de pH en particulier à pH acide et alcalin (Cannon *et al.* 2006). Le MNV et le TV sont plus facilement inactivés à pH alcalin. Cependant, l'inactivation est limitée, même à pH 10 pour le MNV alors que le TV est plus sensible au pH (2, 9,10) (Hirneisen and Kniel 2013).

MATERIEL ET METHODES

1. Lignées cellulaires et souches virales

1.1. Virus Tulane

La souche de référence M033 du virus Tulane (TV) nous a été fournie par Tibor Farkas (Cincinnati Children's Hospital Medical Center, Ohio, Etats-Unis). La souche a été multipliée avec la lignée cellulaire de rein de singe LLC-MK₂ (ATCC® CCL-7™, Manassas, VA) (Farkas *et al.* 2008). Ces cellules ont été maintenues dans le milieu M199 (Gibco/BRL, Bethesda, MD) supplémenté de 10 % de sérum de veau foetal décomplémenté (FBS_D), de pénicilline G (100 U/ml), de Streptomycine (100 mg/ml) et d'Amphotéricine B (0,25 mg/ml). Le virus a été multiplié par inoculation de monocouches cellulaires à 80 % de confluence et incubées à 37°C sous 5 % de CO₂, en réduisant la concentration de sérum à 5 %. Après observation d'effets cytopathiques maximaux, les cellules infectées ainsi que les surnageants ont été récoltés, les cellules ont été lysées par trois cycles successifs de congélation-décongélation. La préparation obtenue a ensuite été centrifugée à 1000 xg pendant 30 min afin d'enlever l'ensemble des débris cellulaires. Le surnageant contenant les virus infectieux a été aliquoté et conservé à -80°C jusqu'à l'utilisation.

1.2. Mengovirus

La souche vMC₀ du Mengovirus (MgV) nous a été fournie par Albert Bosch (Université de Barcelone, Espagne). La souche a été multipliée en utilisant la lignée cellulaire HeLa (ATCC® CCL-2™ Manassas, VA) (Martin *et al.* 1996). Ces cellules ont été maintenues dans le milieu Eagle modifié par Dulbecco (DMEM) (Gibco/BRL, Bethesda, MD) supplémenté de 10 % de sérum de veau foetal décomplémenté (FBS_D), de pénicilline G (100 U/ml) et de Streptomycine (100 mg/ml). Le virus a été multiplié par inoculation de monocouches cellulaires à 80 % de confluence et incubées à 37°C sous 5 % de CO₂, en diminuant la concentration de sérum à 2 %. Après observation des effets cytopathiques maximaux (destruction du tapis cellulaire), le surnageant contenant les virus a été préparé comme pour le TV et conservé à -80°C jusqu'à l'utilisation.

1.3. Norovirus GI.1

Une selle humaine contenant le virus Norwalk (souche 8FIIa, numéro d'accèsion GenBank M87661) nous a été fournie par M.K. Estes (Baylor College of Medicine Houston, Texas, Etats-Unis). Une suspension à 10 % (poids/volume) dans du PBS a été préparée, aliquotée et conservée à -20°C jusqu'à l'utilisation.

1.4. Etudes de la stabilité des souches virales en eau de mer naturelle

Dix ml d'eau de mer naturelle ont été inoculé avec 1 ml de suspension virale et maintenu à 12°C . Des échantillonnages de 1 ml ont été effectués à T_0 , une heure, un, 2 et 8 jours. L'ARN viral a été extrait à l'aide du kit NucliSens (Bio Mérieux®, France) selon les recommandations du fabricant, puis les titre viraux ont été déterminé par RT-PCR temps réel.

2. Bioaccumulations

2.1. Echantillons de coquillages

Des stocks d'huîtres creuses *Crassostrea gigas* et plates *Ostrea edulis* vivantes de taille commerciale ont été achetées directement auprès du même producteur pour toutes les expérimentations. Ces stocks ont été calibrés de manière à avoir une population homogène, permettant ainsi de limiter les variations dues à la taille et aux effets physiologiques des animaux pendant les expérimentations. Les données environnementales du site de prélèvement comme la température et la salinité de l'eau ont été relevées. Dès réception au laboratoire, les coquillages ont été rincés et immédiatement placés dans de grandes cuves contenant de l'eau de mer naturelle, à température similaire à celle mesuré sur le site de collecte. L'eau a été aérée par des bulleurs et les huîtres ont été laissées pendant une nuit afin de permettre leur acclimatation aux conditions expérimentales. Avant expérimentation, les huîtres ont été contrôlées afin de détecter une contamination par les NoVs GI et GII, le TV et le MgV. Tout au long de l'étude, les animaux ont été surveillés et seules les huîtres vivantes présentant une activité de filtration ont été conservées pour analyse. Des paramètres de biométrie tels que le poids total et le poids des chairs ont été relevés. En outre, dans les expériences de

persistance virale, le poids sec de 30 huîtres individuelles par aquarium (y compris l'aquarium contrôle) a été mesuré au jour 0, jour 28 et jour 56 (Bougrier *et al.* 1995).

2.2. Protocoles de bioaccumulation

La bioaccumulation des trois différents virus a été évaluée dans des petites et grandes séries, dans des aquariums séparés. L'eau de mer utilisée pour toutes les expériences de bioaccumulation a été collectée dans une zone propre au large des côtes bretonnes. Lors de la livraison, cette eau a été contrôlée par des mesures de turbidité, concentration en ammonium, nitrate, phosphate chlorophylle A (données non présentées). Ces diverses valeurs sont similaires pour toute la période de l'étude. Cinq expériences de bioaccumulation en petites séries avec des huîtres creuses ont été menées entre janvier et avril 2013, et deux expériences avec des huîtres plates entre février et mars 2013. La température de l'eau de mer a été ajustée en fonction de la saison (8–10°C). Quatre aquariums équipés de bulleurs ont été remplis avec 20 L d'eau de mer, trois d'entre eux ont étéensemencés avec les suspensions virales à une concentration de $7,2 \pm 0,5 \log_{10}$ copies d'ARN/aquarium pour le NV(GI.1); $8,5 \pm 0,2 \log_{10}$ copies d'ARN/aquarium pour le TV et $9,1 \pm 0,4 \log_{10}$ copies d'ARN/aquarium pour le MgV respectivement. L'aquarium restant n'a pas été additionné de suspension virale et a servi de contrôle négatif. Après 5 min d'homogénéisation, 45 huîtres ont été immergées dans chaque aquarium, y compris l'aquarium contrôle négatif, ce qui donne un ratio de 5 litres d'eau/kg de coquillage (y compris le poids de la coquille) (Bougrier *et al.* 1995). 15 huitres ont été échantillonnées dans chaque aquarium après une et 24 heures de bioaccumulation et immédiatement disséqué et congelé. Après 24 heures de bioaccumulation, les huîtres restantes ont été transférées dans des aquariums contenant de l'eau de mer propre, qui a été changée quotidiennement pendant huit jours. Les expériences pour tous les virus ont été réalisées en même temps. Durant toute la durée de l'expérience aucun apport en nutriments n'a été réalisé.



Figure 36 : Photographies d'expérience de bioaccumulation.

Les expériences de bioaccumulation en grandes séries, ont été réalisées séparément pour chacun des trois virus à l'aide de 500-600 huîtres qui ont été contaminées en utilisant les mêmes conditions décrites pour les expériences précédentes. Après 24 heures de bioaccumulation, la concentration virale dans les TD a été vérifiée en testant six huîtres, si cette dernière était inférieure à 5×10^4 copies/g de TD, des doses supplémentaires de virus ont été ajoutées à l'eau de mer, la quantité ajoutée a été estimée sur la base de la concentration détectée dans les TD et la bioaccumulation a été poursuivie pendant 12 heures supplémentaires.

2.3. Expériences de persistance virale

Suite aux bioaccumulations en grandes séries, les huîtres ont été rincées et transportées vers la station Ifremer de Bouin, ferme expérimentale située sur la côte avec un accès direct à de l'eau de mer naturelle et disposant des installations nécessaires en termes de santé animale et sécurité sanitaire pour entretenir les huîtres sur une longue période. Ces huîtres ont été placées dans de grandes cuves (500 litres) situées dans une salle à température contrôlée ($11 \pm 1^\circ\text{C}$). Les cuves ont été alimentées avec un flux constant (200 litres/heure/cuve) d'eau de mer naturelle, aérée, filtrée et maintenue à une température stable ($11 \pm 1^\circ\text{C}$). Par ailleurs, durant les deux mois de l'expérience les huîtres ont été nourries avec du phytoplancton *Skeletonema costatum* (environ 10^{12} cellules/heure/cuve). Des paramètres tels que la température, la salinité, le pH et la concentration en phytoplancton ont été régulièrement mesurés. Deux cuves de contrôle ont été incluses dans toutes les expériences, l'une contenant des huîtres non contaminés et

l'autre ne contenant que l'eau de mer afin d'évaluer la quantité réelle de nourriture disponible pour les huîtres. Des prélèvements hebdomadaires de 20-30 huîtres ont été effectués dans chaque cuve pendant deux mois (8 semaines). Lors de l'échantillonnage, les cuves ont été nettoyées et les particules qui se sont installées sur le fond des cuves ont été enlevées. Avant rejet dans l'environnement, les effluents d'eau de mer des cuves ont été traités conformément aux règles de sécurité en place dans cette ferme expérimentale (acidification, filtration et traitement UV). Ces expériences de persistance virale ont été répétées trois fois entre le 13 novembre 2013 et le 4 avril 2014.



Figure 37 : Photographies d'expérience de persistance virale.

2.4. Dissection

Après échantillonnage, les coquillages ont été lavés, pesés puis ouverts et le poids des animaux sans coquille a été mesuré. Afin d'éviter les retards ou des variations dans les dosages entre les différents virus, les huîtres ont été disséquées en même temps pour les trois virus par différents membres du laboratoire. Pour l'étude de la distribution tissulaire, les tissus digestifs (TD), les branchies (Br) et le manteau (Mt) ont été recueillies à partir d'au moins 10 huîtres par dosage, les gonades et le muscle adducteur ont été éliminés. Les tissus prélevés ont été regroupés, finement hachés à l'aide d'un scalpel stérile, soigneusement mélangés puis répartis en tubes de 1,5 g. Ces aliquotes ont été conservés à -20°C jusqu'à leur analyse. Pour l'étude de la persistance virale seule les TD ont été prélevés et traités comme ci-dessus (Fig.38).

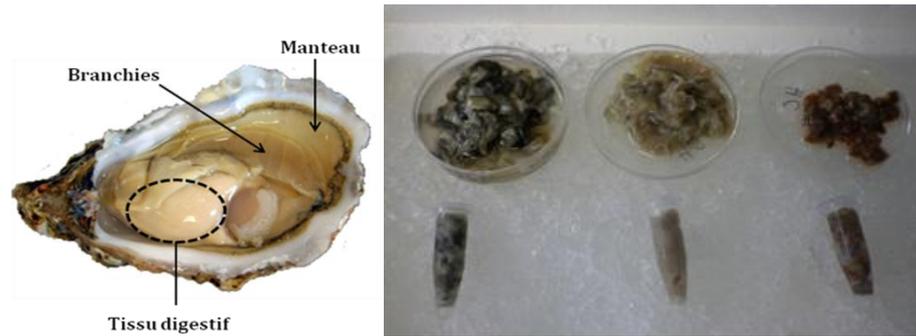


Figure 38 : Dissection des coquillages.

2.5. Extraction des acides nucléiques

2.5.1. Concentration des virus

Les virus ont été extraits à partir des tissus de coquillage selon un protocole mis au point au laboratoire (Le Guyader *et al.* 2009). Chaque échantillon (1,5 g) a été additionné de 2×10^6 copies d'ARN de MgV comme témoin d'efficacité d'extraction sauf pour les tissus de coquillages contaminés par ce même virus. L'ensemble a été broyé dans un potter avec 2 ml de tampon glycine 0,05 M pH 9,5 pendant environ 1 min. Le broyat a été versé dans un tube à usage unique de 50 ml. Le potter a été rincé par 3 ml de tampon glycine puis 3 ml de chloroforme-butanol (50 % volume/volume), le tout étant versé sur le broyat de coquillage. A ce mélange, 173 μ l de cat-floc (Calgon, Ellwood City, Pennsylvanie) ont été ajoutés, le tout vortexé puis agité à température ambiante pendant 5 min. Le mélange a été centrifugé 15 min à 13 500 xg à +4°C. Le surnageant a été transféré dans un tube contenant 3 ml de polyéthylène glycol PEG 6000 (Sigma®, France) à 24 % (poids/volume). Après une heure d'agitation à +4°C suivie d'une centrifugation à 11 000 xg pendant 20 min, le surnageant a été éliminé et le culot utilisé pour l'extraction des acides nucléiques.

2.5.2. Purification des acides nucléiques

Les acides nucléiques (AN) à partir d'échantillons d'huîtres et d'inoculum virale, y compris le surnageant de culture cellulaire et de suspensions de selles à 10 %, ont été extraits et purifiés en utilisant le kit d'extraction Nuclisens (bio Mérieux®, France) selon les recommandations du fabricant, en apportant quelques modifications mineures. Le culot obtenu par concentration virale a été dissout dans 1 ml d'eau stérile exempte

d'ARN^{ase}. La lyse des virus a été réalisée par addition de 2 ml de tampon de lyse (bio Mérieux®, France) puis incubation de 30 min à 56°C. Après une brève centrifugation pour éliminer les particules (si nécessaire), 50 µl de silice paramagnétique ont été ajoutés et le mélange a été incubé pendant 10 min à température ambiante. Les étapes de lavages et purification ont été réalisées avec un extracteur automatique easyMAG (Bio Mérieux®, France). Les AN ont été récupérés dans 100 µl de tampon d'éluion (bio Mérieux®, France) et analysés immédiatement ou stockés à -80°C. Chaque tissu a été extrait trois fois pour déterminer la reproductibilité de l'extraction.

2.6. RT-PCR en temps réel

La RT-PCR temps réel a été réalisée à l'aide du kit Ultrasens One-Step system (Life technologies®, France) en utilisant des amorces et sondes spécifiques (Tableau 8). Les phases de transcription- reverse et d'amplification s'effectuent en une seule étape sur un volume de 5 µl d'ARN. Les amplifications ont été réalisées en utilisant l'appareil Mx3000P PCR quantitative (Agilent Technologies®, France). La composition du mélange réactionnel est donnée dans le tableau 9.

Tableau 8 : Amorces et sondes utilisées pour les RT-PCR.

Virus	Nom	Séquence 5'→ 3'	Références
GI.1	QNIF4 (sens)	CGC TGG ATG CGN TTC CAT	(Le Guyader <i>et al.</i> 2009)
	NVILCR (anti-sens)	CCT TAG ACG CCA TCA TCA TTT AC	
	NVGG1p (Sonde)	FAM-TGG ACA GGA GAY CGC RAT CT-BHQ	
TV	TVIFf (sens)	CTG GGA TAC CCA CCA CAT C	(Drouaz <i>et al.</i> 2015)
	TVIFr (anti-sens)	GCC AGT TAA CAG CTT CAG C	
	TVIFp (Sonde)	FAM-TGT GTG TGC CACTGG ATA GCT AGC ACC-BHQ	
MgV	Mengo110 (sens)	GCG GGT CCT GCC GAA AGT	(Pinto <i>et al.</i> 2009)
	Mengo209 (anti-sens)	GAA GTA ACA TAT AGA CAG ACG CAC AC	
	Mengo147 (Sonde)	FAM-ATC ACA TTA CTG GCC GAA GC-MGB	

Tableau 9 : Mélange réactionnel type pour une amplification par RT- PCR en une étape.

Réactifs	Volume/Réaction (µl)	Concentration finale
Eau PPI	9,12	-
Tampon 5 X RNA Ultrasens	5	1X
Amorce RT anti-sens ou Reverse (10 µM)	2,25	900 nM
Amorce PCR sens ou farward (10 µM)	1,25	500 nM
Sonde (10 µM)	0,625	250 nM
Fluorophore de référence ROX™ 50 X dilué au 10 ^e	0,5	1 X
Enzyme mix RNA Ultrasens	1,25	-
ARN	5	-
Volume final	25	

La réaction de RT-PCR a été réalisée dans les conditions suivantes : transcription- reverse à 55°C pendant 30 min, dénaturation à 95°C pendant 5 min, puis 45 cycles incluant chacun une étape de dénaturation à 95°C pendant 15 sec puis une élongation à 60°C pendant 1 min puis une élongation finale d'une min à 60°C pour le TV et NV(GI.1) et 65°C pour le MgV. Tous les échantillons ont été testés purs et dilués au 1/10^e pour évaluer les effets des inhibiteurs. Pour chaque réaction de RT-PCR, un témoin négatif ne contenant pas d'ARN est réalisé afin de vérifier l'absence de contamination lors des différentes manipulations. Pour estimer la quantité de génome présent, une gamme standard, réalisée à partir de plasmides, est introduite dans chaque plaque d'amplification. Les différentes gammes standards dérivent de plasmides de transcription *in vitro* contenant les nucléotides 146 à 6935 du NV(GI.1) (numéro d'accèsion GenBank M87661), les nucléotides 3300 à 4299 du TV M033 (numéro d'accèsion GenBank EU391643-1) et les nucléotides 209 à 1061 du MgV (numéro d'accèsion GenBank L22089).

2.7. Contrôles et interprétation

Toutes les précautions ont été prises pour éviter l'obtention de résultats faux négatifs ou faux positifs. Les dissections, extractions, amplifications et révélations ont été réalisées dans des pièces différentes; des cônes à filtre ont été utilisés.

2.7.1. Efficacité d'extraction

Le MgV a été utilisé pour évaluer l'efficacité d'extraction. Après extraction et amplifications des échantillons inoculés avec 2x10⁶ copies d'ARN de MgV, les valeurs de

C_T des échantillons ont été comparées à la valeur de C_T du contrôle positif utilisé dans la série d'extraction et à une courbe standard obtenue par dilution en point final. Cette différence (ΔC_T) est utilisée pour déterminer l'efficacité d'extraction en utilisant l'équation $100e^{-0,6978\Delta C_T}$ et exprimée en pourcentage pour chaque échantillon. Seuls les échantillons avec des rendements d'extraction supérieurs à 10 % ont été considérés pour la quantification. Étant donné que les huîtres utilisées dans chaque expérience étaient du même lot initial, l'efficacité d'extraction obtenue pour le NV(GI.1) et le TV ont été utilisés pour estimer l'efficacité d'extraction des huîtres contaminées avec le MgV.

2.7.2. Contrôle et calcul des valeurs de C_T

L'absence d'inhibiteurs pour la détection des virus a été vérifiée pour chaque échantillon en comparant les valeurs des C_T des échantillons testés pures et dilués au $1/10^e$. Si les deux valeurs sont comparables, une valeur moyenne de C_T a été calculée pour chaque échantillon après correction de la valeur de C_T dilué au 10^e par le coefficient de courbe standard. Une différence de <1 unité C_T indique l'absence d'inhibition significative et les extraits ont été vérifiés en utilisant ce calcul. Dans les expériences de persistance dans lesquels trois amplifications indépendantes ont été effectuées, toutes les valeurs de C_T ont été comparées. Si une valeur de C_T a présenté une variation $>1 C_T$, l'amplification a été répétée. Si la différence persistait (pour les concentrations proches de la limite de quantification) cela a été considéré dans l'étape de quantification. Sinon, toutes les trois valeurs de C_T ont été moyennées. Aucun effet inhibiteur significatif n'a été observé (moins de 25 %) et donc aucun ajustement n'a été réalisé pour l'efficacité de la RT-PCR temps réel. Après ces vérifications, le nombre de copies d'ARN présents dans chaque échantillon a été estimé en comparant la valeur du C_T obtenue à la gamme standard introduite dans chaque plaque d'amplification.

2.7.3. Validation des courbes standards

Après la réalisation de toutes les RT-PCR temps réel, les courbes standard pour un virus ont été comparées et des critères de qualité issue de la norme AFNOR NF U47-600-2 (U47-600-2 2015) ont été appliqués. Seules les courbes standard avec une efficacité d'amplification entre 85 à 110 % ont été retenues. Des valeurs moyennes ont été calculées pour chaque point de la courbe standard, ces valeurs ont été utilisées pour estimer

l'incertitude de quantification pour chaque virus avec $0,21 \log_{10}$ pour le TV, $0,14 \log_{10}$ pour le NV(GI.1) et $0,14 \log_{10}$ pour le MgV.

2.7.4. Quantification

La concentration finale est calculée en tenant compte de la quantité d'extrait analysé et du poids de tissus disséqués (1,5 g), elle est exprimée en copies d'ARN par gramme de tissus. Les concentrations des triplicats d'extractions ont été calculées séparément, puis une concentration moyenne géométrique a été calculée. Lorsque la courbe standard d'une série a été jugée non valide, les valeurs de C_T des échantillons ont été comparées à d'autres extractions de la même série (chaque tissu étant extrait 3 fois). Si la valeur du C_T se situait dans la même plage que les deux autres, la concentration a été calculée sur la base des valeurs moyennes de la courbe standard. Si la valeur du C_T ne se situait pas dans la même plage, l'amplification a été répétée.

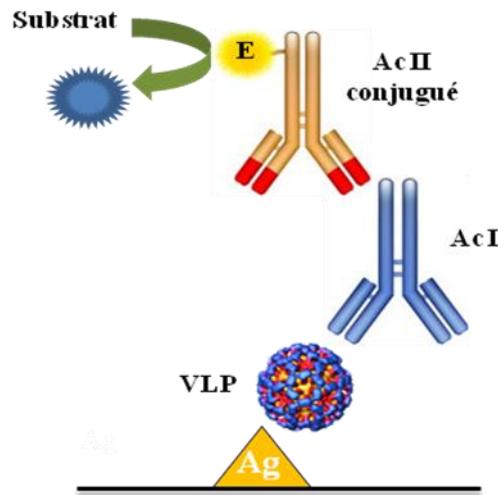
2.8. Analyse statistique

Toutes les concentrations obtenues ont été transformées en logarithme. Les titres moyens géométriques (GMT) et écarts-types géométriques (SDS) ont été calculés. Pour l'analyse statistique, un test de Mann-Whitney a été appliqué pour évaluer l'impact de l'alimentation sur la persistance. Une régression non linéaire avec une décroissance à deux phases a été utilisée pour calculer la demi-vie en utilisant le logiciel statistique Prism 5 (GraphPad Software, Inc).

3. Tests Immunoenzymatiques (ELISA)

La technique ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) est une technique immuno-enzymatique de détection, qui permet de visualiser une réaction antigène-anticorps grâce à une réaction colorée produite par l'action d'une enzyme préalablement fixée à l'anticorps sur un substrat. Lors d'une thèse précédente au laboratoire, un test ELISA a été mis au point pour évaluer l'expression des ligands spécifiques des NoVs par les tissus de coquillages (Maalouf *et al.* 2010). Le principe est basé sur l'extraction des sucres solubles, une incubation avec des NoVs, fixation d'un Ac primaire révélé ensuite par un Ac secondaire sur lequel est fixé une enzyme (peroxydase). Ces tests nécessitent

de grandes quantités de virus, hors les NoVs n'étant pas cultivables sur cellules, on utilise comme alternative des VLPs.



Les VLPs fixées à leur ligand présent sur les tissus des huîtres sont reconnues par l'Ac primaire spécifique de cette VLPs. L'ajout de l'Ac secondaire couplé à la peroxydase va permettre, grâce au TMB, de révéler sa fixation sur l'Ac primaire.

Figure39 : Test ELISA sur tissus de coquillages.

Les VLPs et leurs Ac respectifs, nous ont été fournis par différents collaborateurs : R. L. Atmar et M. K. Estes Baylor College of Medicine, Houston, Texas ; L. Svensson, Université de Linköping, Suède et J. Le Pendu INSERM, U892, Université de Nantes. Ces VLPs ont été obtenues par expression des protéines de capsid VP1 et VP2, codées par l'ORF2 et l'ORF3 respectivement, dans le système d'expression Baculovirus. Les suspensions de VLPs ont été quantifiées en utilisant la méthode de Bradford. Les Ac correspondants ont été produits chez le lapin.

3.1. Echantillons de coquillage

Des lots d'huîtres creuses *Crassostrea gigas* d'élevage diploïdes (2n), triploïdes (3n), d'huîtres plates (*Ostrea edulis*) ont été mis en place dans l'estuaire de Daoulas près de la pointe du château (Bretagne) en décembre 2010. A partir de ces lots, des échantillonnages mensuels ont été réalisés ainsi que des huîtres creuses sauvages naturellement présentes sur le site et expédiées immédiatement au laboratoire à +4°C. Pour compléter cette étude, des lots d'huîtres creuses d'élevage diploïdes et triploïdes ont

été mis en place à Marseillan, dans l'étang de Thau (sud de la France). Ces lots ont également été échantillonnés une fois par mois (Fig. 40).

Afin d'étudier l'influence des paramètres environnementaux, la température et la salinité de l'eau de mer ont été recueillis chaque mois dans les deux sites. Les mesures de température ont été effectuées par une sonde automatique (sonde Marel SMATCH TPS). La salinité a été mesurée par l'étude de la conductivité de l'eau, qui dépend directement de sa charge en sel et est exprimée en g ‰ (effectuée par la sonde).

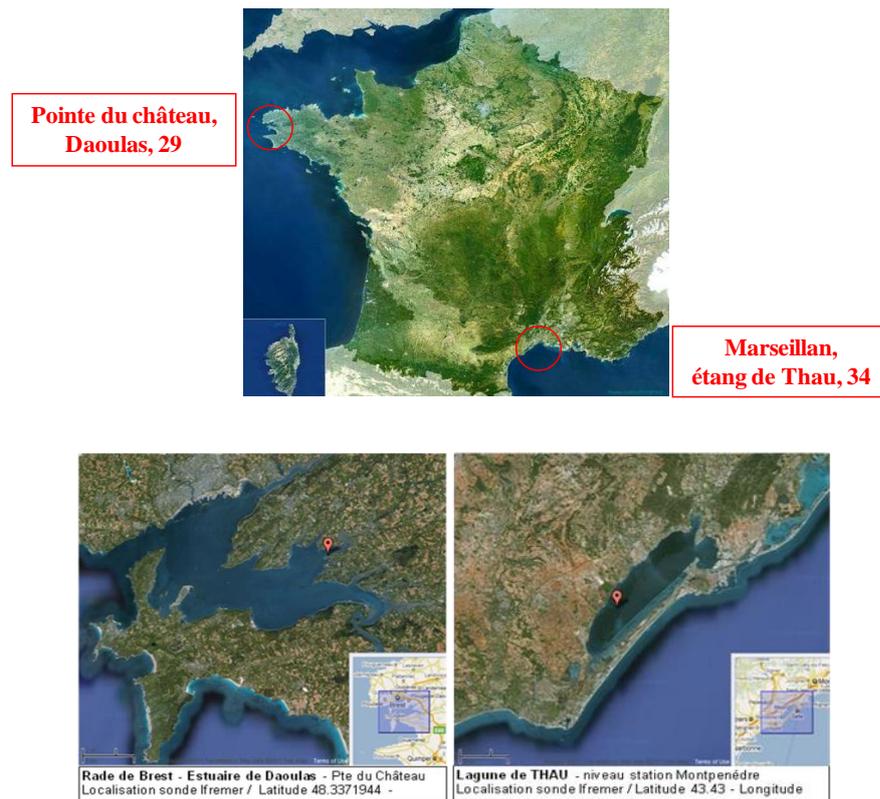


Figure 40 : Localisation des zones d'échantillonnage.

3.2. Dissection et préparation des coquillages

A leur arrivée au laboratoire, les coquillages ont été lavés, comptés puis ouverts. Les tissus digestifs (TD), branchies (Br) et manteau (Mt) ont été disséqués comme décrit précédemment, pesés, répartis en tubes de 1,5 g et congelés à -20°C jusqu'à leur analyse. Pour la préparation des extraits de coquillage, chaque tissu (1,5 g) a été broyé dans un potter en présence de 3 ml de tampon PBS pH 7,4. Le broyat a été chauffé pendant 10 min à 95°C , puis centrifugé pendant 7 min à $13000 \times g$ à $+4^{\circ}\text{C}$. Le surnageant a été

récupéré et la teneur en protéine a été évaluée par le kit BCA (Uptima Interchim®, France) utilisant la BSA comme standard. Après ajustement à 50 µg/ml dans du tampon carbonate/bicarbonate pH 9,5 ; ces extraits tissulaires ont été fixés sur des microplaques ELISA (NuncMaxisorp®, Thermo Fisher Scientific, Danemark) pendant une nuit à +4°C.

3.3. Protocoles de l'ELISA

Les microplaques ont été lavées 3 fois avec du tampon PBS/Tween 20 à 0,05 % (Sigma Aldrich®, France). Les sites de fixation non spécifiques ont été saturés avec 100 µl de tampon PBS additionné de lait demi-écrémé (10 %) pendant une heure à 37°C. Après 3 lavages avec du PBS/Tween 20 à 0,05 %, 10⁹ particules de VLPs diluées dans du tampon PBS/lait demi-écrémé 5 % ont été ajoutées dans chaque puits et les microplaques ont été incubées une heure à 37°C. Après 3 lavages, 100 µl d'Ac primaire spécifique dilué au 1/1000^e en tampon PBS /lait-écrémé 5 % ont été fixés pendant une heure à 37°C. Les plaques ont été lavées 3 fois avant incubation pendant une heure à 37°C avec un Ac secondaire anti-Ig G de lapin développé chez la chèvre, marqué à la peroxydase (Uptima Interchim®, France) et diluée au 1/2000^e en tampon PBS/lait-écrémé 5 %. Après 3 lavages, la révélation a été réalisée par addition de 100 µl/puits de TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine) (Sigma Aldrich®, France). Dès l'apparition d'une coloration bleue, la réaction a été bloquée par addition d'acide phosphorique 1 M. La lecture de la DO a été réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre à 450 nm.

Chaque tissu a été analysé en duplicat. La fixation non spécifique (ou bruit de fond) a été évaluée par la réalisation du même protocole mais sans addition de VLPs, les microplaques sont incubées uniquement avec les anticorps primaires et secondaires. Les contrôles positifs constitués de salive de personnes sécrétrices de groupes sanguins A, B ou O (reconnaissant les VLPs GI.1, GII.4 ou GII.3) ont été inclus sur chaque microplaque, les contrôles négatifs sont ces mêmes salives avec absence d'incubation avec les VLPs. Après lecture de la plaque et validation des contrôles positifs et négatifs un ratio R a été calculé : $R = [DO \text{ échantillon avec VLPs} / DO \text{ échantillon sans VLPs}]$. Un seuil arbitraire fixé à 2 lors des précédentes études permet d'interpréter la lecture et d'obtenir pour chaque échantillon un résultat positif (Si $R \geq 2$) ou négatif (si $R < 2$).

RESULTATS

1. Bioaccumulations

1.1. Contrôles et conditions de bioaccumulation

1.1.1. Etudes de la stabilité des souches virales en eau de mer naturelle

La première étape de notre travail a été de vérifier si le TV et le MgV possédaient les mêmes propriétés de stabilité en eau de mer que le NV(GI.1). La stabilité du NV(GI.1) en eau de mer est connue, elle est de $0,43 \pm 0,5 C_T$ tel que déterminé dans des études précédentes (Maalouf *et al.* 2011). Cependant aucune donnée n'est disponible pour le TV et le MgV. Cette stabilité a été testée sur deux expériences distinctes en utilisant la même eau de mer que celle utilisée pour les bioaccumulations. Au delà du 8^e jour, les variations sont de $0,78 \pm 0,9 C_T$ pour le TV et $1,39 \pm 0,54 C_T$ pour le MgV. Des sous-échantillons de la même suspension de selles pour le NV(GI.1) ou des surnageants de culture cellulaire pour le TV et le MgV ont été congelés et utilisés pour les cinq premières expériences de bioaccumulation. Compte tenu des différences observées dans les concentrations des différents virus (jusqu'à deux \log_{10}) de nouveaux sous-échantillons ont été préparés pour comparer l'efficacité des bioaccumulations et utilisés aussi pour les trois expériences de persistance virale après 2 mois.

1.1.2. Echantillons de coquillage

Toutes les expériences ont été réalisées sur des huîtres adultes de taille commerciale. Les coefficients allométriques (le poids corporel divisé par le poids des TD) sont de $14 \pm 1,79$ pour les cinq expériences sur la distribution tissulaire et $15 \pm 2,58$ pour les trois expériences sur la persistance virale. Pour ces trois expériences ou les huîtres ont été nourries avec du phytoplancton, le poids des chairs a été mesuré au début de l'expérience (J1), au jour 28 (semaine 4) et au jour 56 (semaine 8). Ce poids n'a pas changé pour l'expérience n°2 [NV(GI.1) : $4,9 \pm 1,2$; TV : $5,6 \pm 1,3$ et MgV : $5,3 \pm 1,5$ g] ni pour l'expérience n°3 [NV(GI.1) : $4,5 \pm 1$; TV : $5,4 \pm 1,2$ et MgV : $4,8 \pm 1,2$ g]. Par contre pour l'expérience n°1 [NV(GI.1) : $6,3 \pm 1,3$; TV : $7,8 \pm 1,7$ et MgV : $9,9 \pm 2$] l'augmentation du poids corporel au cours des 3 dernières semaines de l'expérience est corrélée avec une hausse accidentelle des quantités de phytoplancton.

1.1.3. Conditions environnementales

Toutes les expériences ont été réalisées pendant les mois d'hivers considérant l'expression des ligands plus importante à cette période, ainsi que l'état physiologique des huîtres (la maturation sexuelle débutant au cours du printemps).

1.2. Étude de la distribution tissulaire

Cinq expériences distinctes ont été réalisées pour comparer les concentrations du NV(GI.1), TV et MgV dans les TD, branchies et manteau après une et 24 heures. L'efficacité d'extraction est acceptable et varie de 13 à 19 % pour les TD, 55 à 67 % pour les branchies et 51 à 61 % pour les manteaux. Pour être en mesure de comparer l'efficacité de bioaccumulation des différents virus, un coefficient maximal de bioaccumulation dans les TD (MTB-TD) a été calculé pour chaque virus en utilisant les hypothèses suivantes : (1) qu'un \log_{10} de virus sera perdu (adsorption sur les parois des aquariums, sur les coquilles, etc.), comme cela a été démontré en utilisant des virus radioactif (Bedford *et al.* 1978). (2) que 90 % des virus seront concentrés dans les TD comme observés au cours des essais préliminaires et démontrés pour les NoVs et le VHA (Atmar *et al.* 1995). (3) considérant le poids des TD récupérés.

Par exemple pour le NV(GI.1), la doseensemencée dans l'aquarium est de $1,5 \times 10^7$ copies d'ARN. En supposant une perte d'un \log_{10} , $1,5 \times 10^6$ copies d'ARN sont disponibles pour la bioaccumulation dont 90 % de la dose accumulée dans les TD ($1,35 \times 10^6$). Compte tenu du poids des TD récupéré (24 g), le MTB-TD attendu est de $5,6 \times 10^4$ copies d'ARN/g de TD. Le MTB-TD a été calculé pour chaque virus avec pour le TV une valeur de $1,2 \times 10^6$ copies d'ARN/g de TD et pour le MgV une valeur de 5×10^6 copies d'ARN/g de TD (Tableau 10). Cependant, comme le MgV est distribué également dans tous les tissus, le MTB pour tous les tissus (MTB-TT) a été calculé en tenant compte de la perte d'un \log_{10} de virus et en divisant cette concentration par le poids total des chairs de l'huître (poids sans coquille). Pour une plus grande précision dans la quantification, tous les tissus ont été extraits trois fois dans des séries d'extraction indépendantes et tous les AN extraits ont été amplifiés en duplicat, chaque donnée représente un total de 7 à 10 huîtres. Les résultats présentés dans le tableau 10 représentent les concentrations virales dans chaque tissu, chaque concentration représente la moyenne géométrique de cinq expériences indépendantes, chacune étant quantifiée sur trois valeurs de concentrations indépendantes.

Le NV(GI.1) est rapidement bioaccumulé dans les TD mais aussi dans les branchies et le manteau et atteint après une heure de bioaccumulation, une concentration d'environ 100 copies d'ARN/g de tissu. Après 24 heures de bioaccumulation, la concentration dans les TD augmente d'environ 100 fois tandis qu'elle diminue ou demeure stable dans les autres tissus, ce qui confirme les observations antérieures (Maalouf *et al.* 2011). Considérant le coefficient MTB-TD, l'efficacité de la bioaccumulation est d'environ 1% après une heure et atteint 25 % après 24 heures. En supposant que le NV(GI.1) est distribué également dans tous les tissus, l'efficacité de bioaccumulation atteint 13 % après une heure et 350 % après 24 heures confirmant que le NV(GI.1) est plus concentré dans les TD.

Le TV affiche après une heure de bioaccumulation des concentrations légèrement inférieures à celle du NV(GI.1) dans tous les tissus, mais avec une localisation préférentielle au niveau des TD. Après 24 heures, les concentrations du TV augmentent dans les trois tissus, mais dans une plus large mesure dans les TD avec une concentration 10 fois supérieure. Considérant le coefficient MTB-TD, l'efficacité de bioaccumulation est faible (0,5 %), même après 24 heures. Si l'on considère que le TV a été distribué également dans tous les tissus, l'efficacité de bioaccumulation atteint 7 % après 24 heures.

Le MgV a été ensemencé à une concentration supérieure à celle des deux autres virus, ce qui explique les fortes concentrations détectées. Cependant la distribution tissulaire est clairement différente de celle du NV(GI.1) et du TV. Après une et 24 heures, les concentrations sont comparables dans les trois tissus analysés. Considérant le coefficient MTB-TD, le rendement de bioaccumulation après une heure est dans la même plage que celle observée pour le TV et porté à 2 % après 24 heures. Comme les concentrations détectées dans les branchies et le manteau sont dans la même gamme que les concentrations détectées dans les TD, le MTB-TT a été calculé. Dans ce cas, l'efficacité de bioaccumulation est inférieure à 1 % après une heure et augmente à 30 % après 24 heures.

1.3. Étude de la persistance virale après 8 jours

La deuxième étape de cette étude était d'évaluer la persistance de ces trois virus dans les TD après huit jours. Deux approches différentes ont été réalisées. La première fut de maintenir les huîtres dans de l'eau de mer filtrée (très faible concentration en nutriments). La deuxième fut de compléter l'eau de mer de phytoplancton. Les

expériences ont été répétées cinq fois pour la première approche et trois fois pour la seconde approche. Les résultats sont présentés dans le tableau 11.

Après huit jours, une différence statistique est observée pour le TV avec une baisse plus rapide de la concentration dans les TD lorsque les huîtres étaient nourris ($P = 0,035$). Pour le NV et le MgV l'impact de l'alimentation sont non significatif sur la persistance après 8 jours ($P = 0,25$ et $> 0,99$ respectivement).

1.4. Étude de la persistance virale après 2 mois

Les huîtres ont étéensemencées à une concentration de $4,58 \pm 0,42 \log_{10}$ copies d'ARN/g de TD pour le NV(GI.1) ; $4,83 \pm 0,23 \log_{10}$ copies d'ARN/g de TD pour le TV et $5,18 \pm 0,34 \log_{10}$ copies d'ARN/g de TD pour le MgV, puis elles ont été transférées dans une ferme scientifique afin de reproduire autant que possibles les conditions environnementales dans un établissement sécurisé. L'eau de mer pénétrant dans la ferme a été filtrée pour éviter toute contamination d'origine extérieure et traitée après les expériences pour prévenir la contamination de l'environnement. Un lot d'huîtres non contaminées a été ajouté à chaque essai et analysé chaque semaine. Aucun de ces contrôles n'a été trouvé positif pour tous les virus recherchés. Comme l'eau de mer utilisée a été filtrée, cette eau a été supplémentée avec une quantité de phytoplancton à la concentration normalement trouvée dans l'eau de mer. Malheureusement, au cours de la première expérience, vers la semaine 5, un excès de nutriments a conduit à l'augmentation du poids des huîtres. Cependant cela n'a eu aucun impact sur les concentrations virales et les résultats étaient comparables aux deux autres expériences, même pour le TV pour lequel une différence statistique entre les deux protocoles pour l'évaluation de la persistance après 8 jours. La figure 41 représente la cinétique de décroissance des concentrations virales dans les TD.

La concentration du NV(GI.1) diminue lentement dans les TD et atteint la limite de quantification de la méthode après huit semaines (concentration $1,85 \pm 0,48 \log_{10}$ copies d'ARN/g de TD). La concentration du TV diminue plus rapidement, la limite de quantification de la méthode est éteinte à la semaine cinq (concentration $1,78 \pm 0,22 \log_{10}$ copies d'ARN/g de TD). Pour le MgV, la concentration diminue assez rapidement et atteint la limite de quantification après six semaines (concentration $1,90 \pm 0,34 \log_{10}$ copies d'RNA/g de TD). Ces données ont permis de calculer la demi-vie pour le NV(GI.1) (7,56 jours), le TV (4,65 jours) et le MgV (2,17 jours).

Tableau 10 : Distribution tissulaire du NV(GI.1), TV et MgV après une et 24 heures de bioaccumulation.

Virus	Temps	Branchies		Manteau		Tissu Digestif		Efficacité de	
		Efficacité	Moyenne	Efficacité	Moyenne	Efficacité	Moyenne	MTB-TD	MTB-TT
NV(GI.1)	1h	63	187	51	191	14	537	1	13
	24h	55	245	61	161	19	1,4 x 10 ⁴	25	350
TV	1h	65	66	55	< LQ	13	176	0,02	0,2
	24h	67	280	46	181	13	3,0 x 10 ³	0,5	7
MgV	1h	-	1,7 x 10 ³	-	810	-	2,5 x 10 ³	0,05	0,8
	24h	-	2,1 x 10 ⁴	-	7,3 x 10 ³	-	2,9 x 10 ⁴	2	30

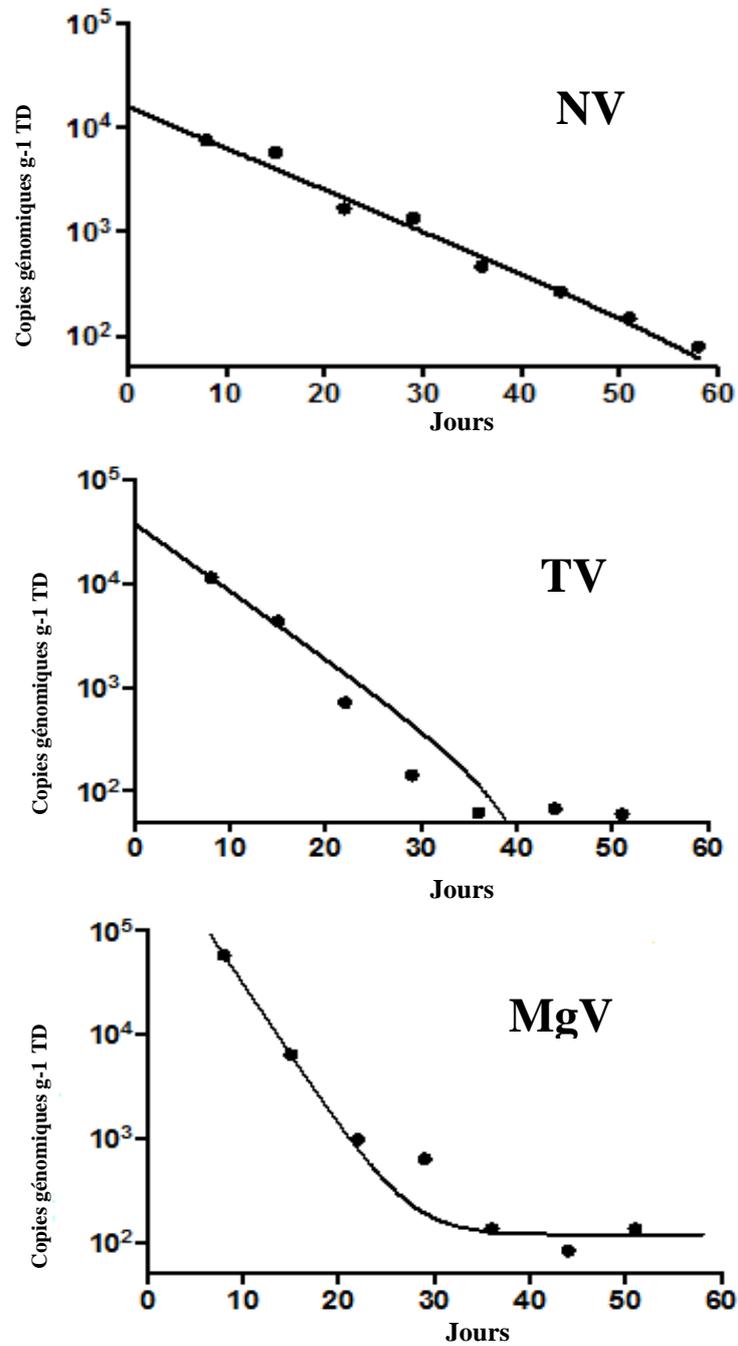
L'efficacité d'extraction moyenne représente les valeurs moyennes des trois extractions de cinq expériences (donc 15 valeurs). La concentration moyenne géométrique a été calculée à partir des cinq expériences, chacune étant déterminée sur la base de trois extractions séparées.

L'efficacité de bioaccumulation dans les TD était calculé sur la base de l'hypothèse d'une perte d'un log₁₀ de virus et que 90% de la contamination était dans le TD (MTB-TD), ou distribué également dans tous les tissus (MTB-TT). LQ = limite de quantification.

Tableau11 : Persistance du NV(GI.1), TV et MgV après 8 jours.

Virus	Sans phytoplancton				Avec phytoplancton			
	Efficacité d'extraction moyenne (%)	Moyenne géométrique Conc/g		Efficacité d'extraction moyenne (%)	Moyenne géométrique Conc/g			
		J1	J8		J1	J8		
NV(GI.1)	16	1,4 x 10 ⁴	4,6 x 10 ³	40	5,9 x 10 ⁴	7,6 x 10 ³		
TV	13	3,0 x 10 ³	1,2 x 10 ³	59	6,9 x 10 ⁴	1,1 x 10 ⁴		
MgV	-	9,2 x 10 ⁴	3,3 x 10 ⁴	-	1,6 x 10 ⁵	5,9 x 10 ⁴		

Les concentrations exprimées sont la moyenne géométrique de cinq essais pour la condition «sans phytoplancton» et trois expériences pour la condition «avec phytoplancton», Les efficacités d'extraction sont des valeurs moyennes. Aucune différence statistique n'a été observée pour le NV (P = 0,25) et le MgV (P > 0,99), mais la différence statistique a été observée pour le TV (P = 0,03).



NV : virus Norwalk (demi-vie: 7,56 jours); TV : virus Tulane (demi-vie: 4,65 jours); MgV : Mengovirus (demi-vie 2,17 jours).

Figure 41: Diminution des concentrations du NV(GI.1), TV et MgV dans les TD des huitres après 8 semaines.

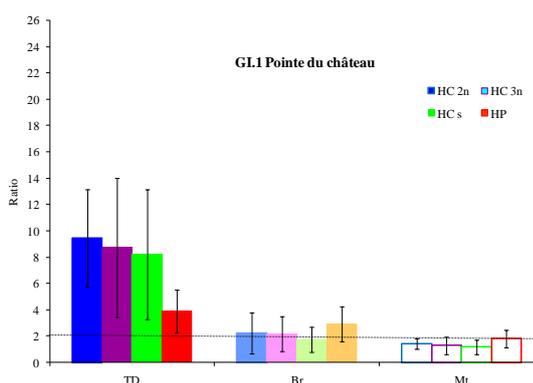
2. Fixation des norovirus sur différentes espèces d'huîtres

Au total, 19 lots d'huîtres creuses diploïdes (HC 2n), triploïdes (HC 3n), sauvages (HCs) et d'huîtres plates (HP) ont été analysés pour comparer la fixation des VLPs GI.1, GII.4 et GII.3 sur les TD, branchies et manteau. Ces huîtres ont été prélevées entre les mois de décembre 2010 et juin 2011 afin de disposer d'une année complète de données. Ce travail a été initialisé au laboratoire (thèse d'H. Maalouf, 2010). Lors de cette thèse le test ELISA a été mis au point (Maalouf *et al.* 2010). Une partie de cette étude a été réalisé par A.Thomas. (Stage Master 2). La plus part des lots ont été testé une fois, d'où l'absence de l'écart type sur certains histogrammes.

2.1. Étude de la fixation des VLPs GI.1

La figure 42 représente la moyenne des ratios de fixation des VLPs GI.1 obtenus dans chaque tissu pour les différentes variétés et espèce d'huîtres étudiées, durant une année d'échantillonnage.

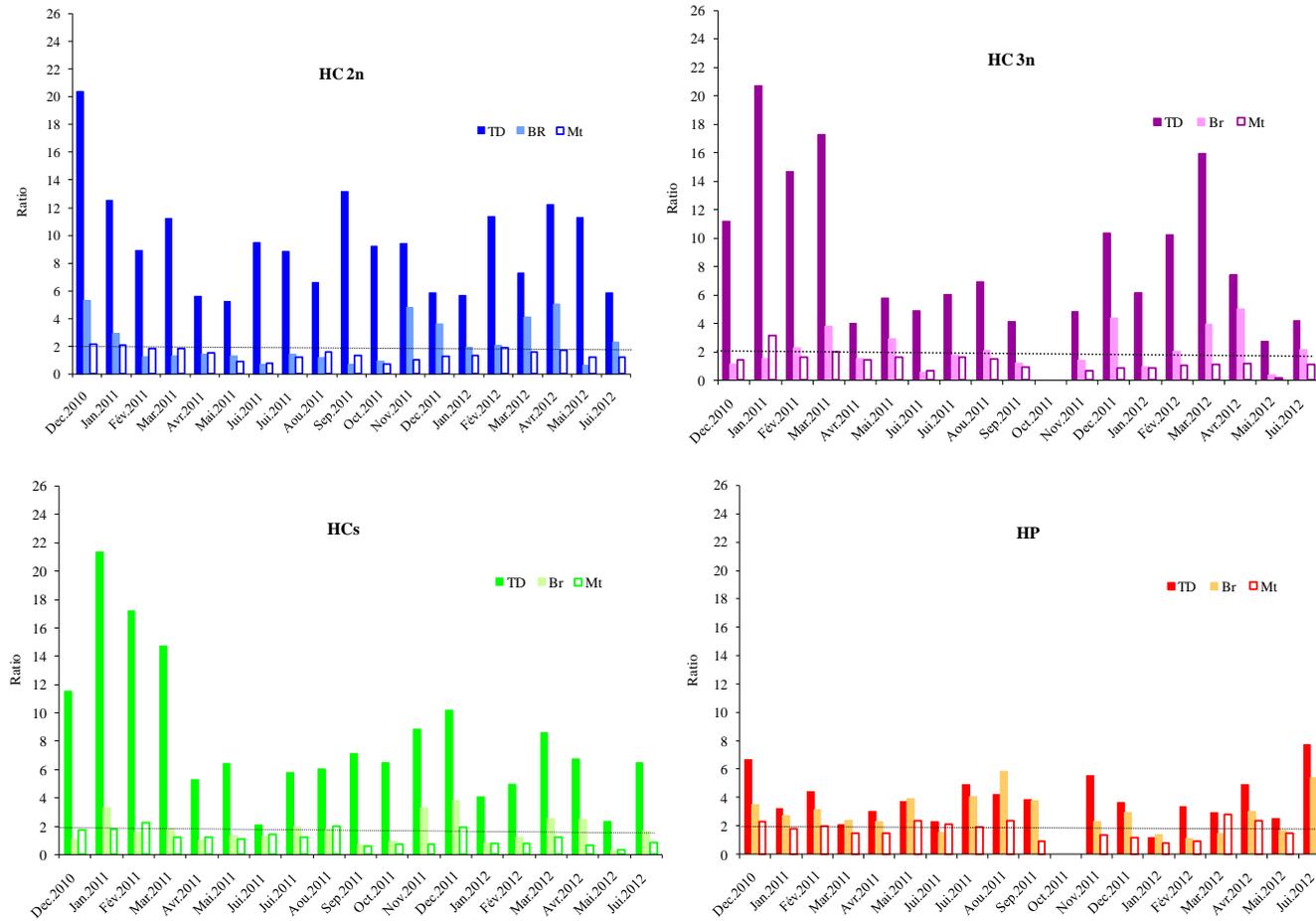
Les VLPs GI.1 ont tendance à se fixer essentiellement sur les TD des huîtres creuses diploïdes, triploïdes et sauvages. Une plus faible fixation de ces VLPs est observée sur les TD des huîtres plates. La fixation aux branchies et au manteau est proche voir inférieure au ratio. Le suivi mensuel montre que cette fixation semble augmenter durant l'hiver notamment entre le mois de janvier et le mois d'avril, pour les huîtres creuses diploïdes, triploïdes et sauvages. Pour les huîtres plates, cette observation n'est pas retrouvée (Fig. 43).



Le seuil de positivité du test ELISA fixé à 2 est représenté par la ligne en pointillé.

TD : tissus digestifs; Br : branchies; Mt : manteau.

Figure 42 : Fixation des VLPs GI.1 sur différentes espèces d'huîtres.



Le seuil de positivité du test ELISA fixé à 2 est représenté par la ligne en pointillé.

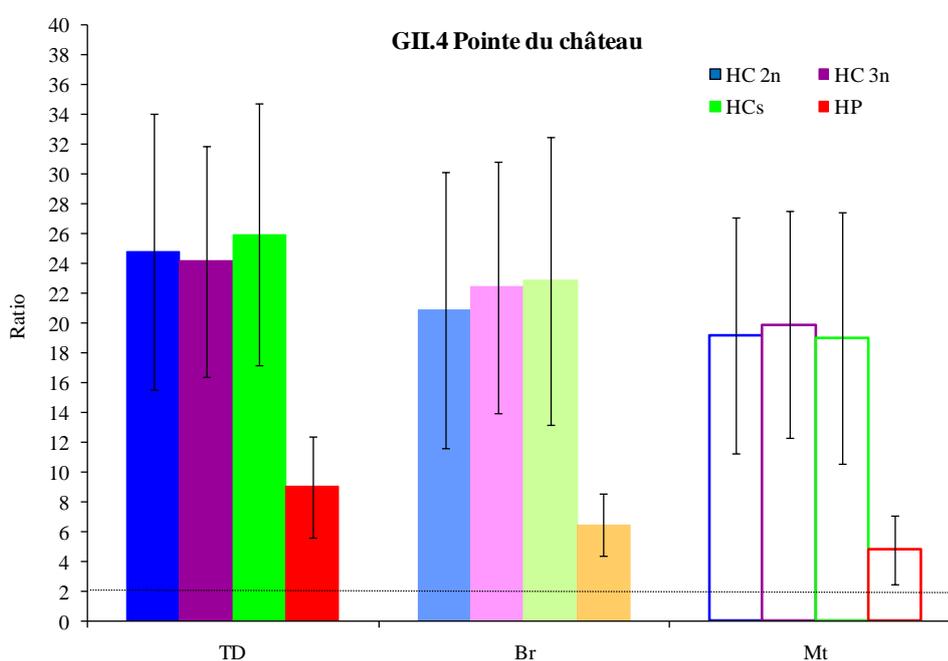
TD: tissus digestifs; Br : branchies; Mt : manteau.

Figure 43 : Fixation des VLPs GI.1 en fonction de la saison.

2.2. Étude de la fixation des VLPs GII.4

La figure 44 représente la moyenne des ratios de fixation des VLPs GII.4 obtenus dans chaque tissu pour les différentes variétés et espèce d'huitres étudiées, durant une année d'échantillonnage.

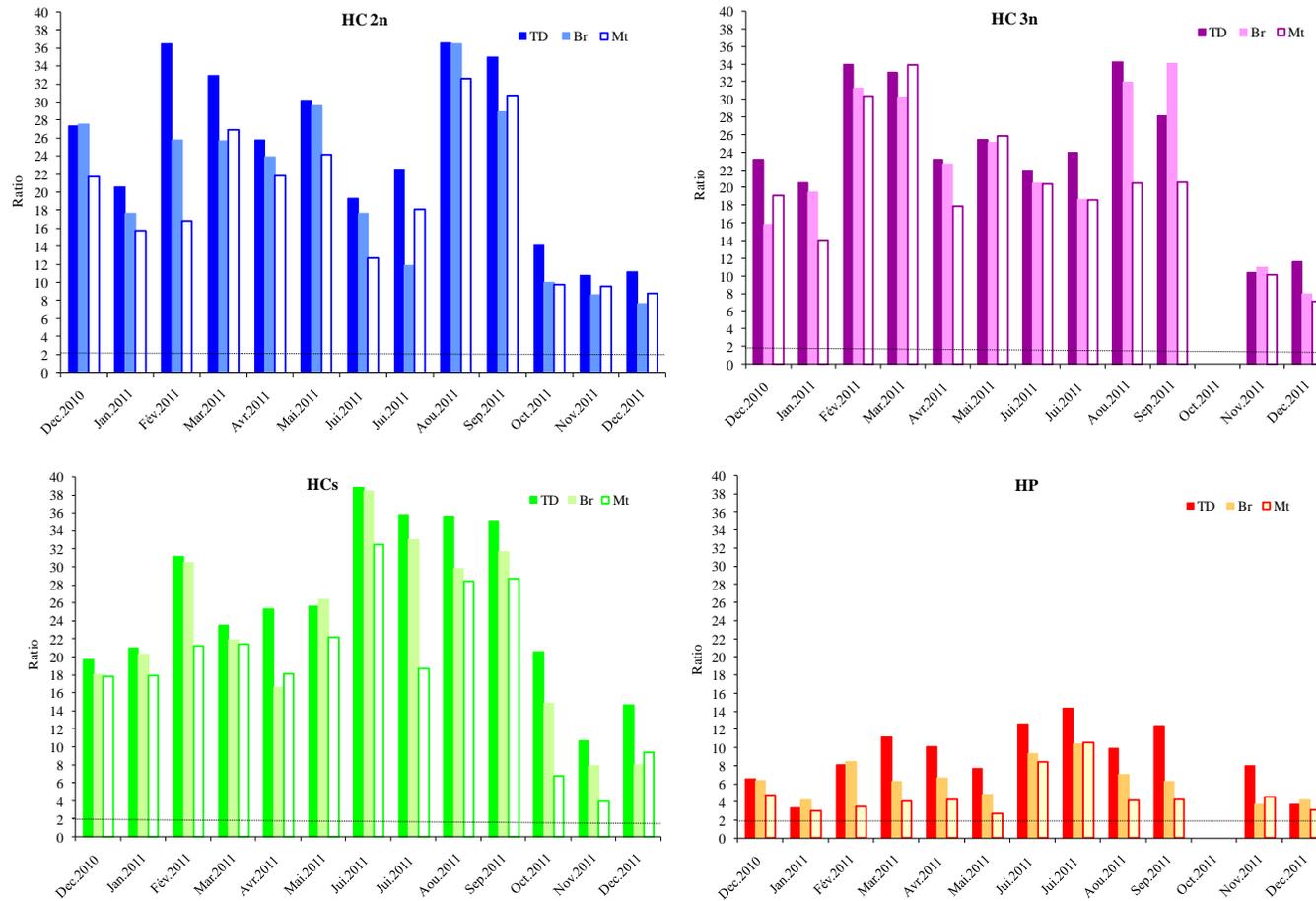
Les VLPs GII.4 ont tendance à se fixer sur tous les tissus des huitres étudiées. Mais les ratios obtenus avec les huîtres plates sont en général quatre fois inférieurs à ceux observés pour les huîtres creuses diploïdes, triploïdes et sauvages. Le suivi mensuel montre que cette fixation ne semble pas varier en fonction des saisons (Fig.45).



Le seuil de positivité du test ELISA fixé à 2 est représenté par la ligne en pointillé.

TD : tissus digestifs; Br : branchies; Mt : manteau.

Figure 44 : Fixation des VLPs GII.4 sur différentes espèces d'huitres.



Le seuil de positivité du test ELISA fixé à 2 est représenté par la ligne en pointillé.

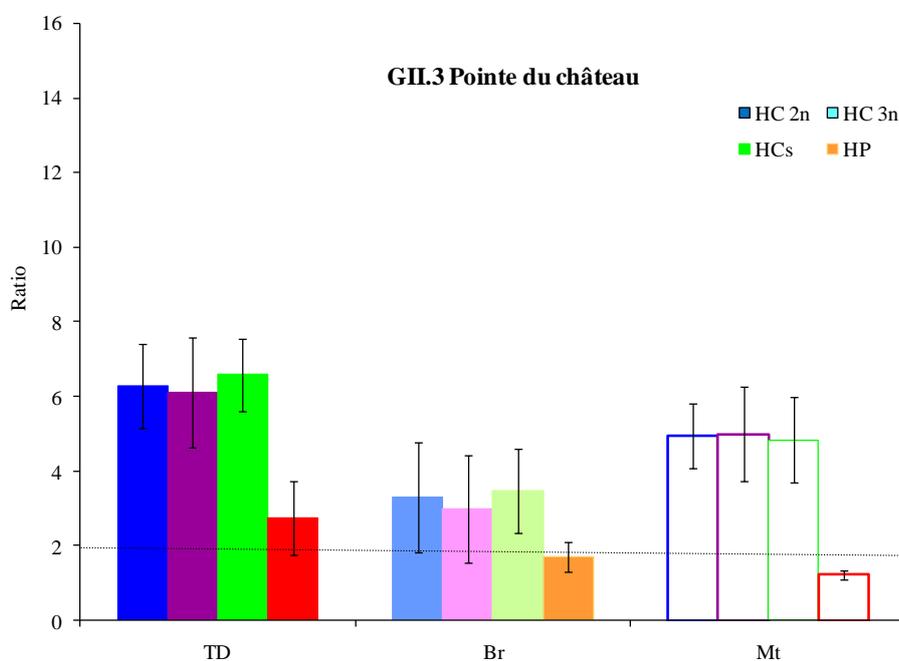
TD : tissus digestifs; Br : branchies; Mt : manteau.

Figure 45 : Fixation des VLPs GII.4 en fonction de la saison.

2.3. Étude de la fixation des VLPs GII.3

La figure 46 représente la moyenne des ratios de fixation des VLPs GII.3 obtenus dans chaque tissu pour les différentes variétés et espèce d'huîtres étudiées, durant une année d'échantillonnage.

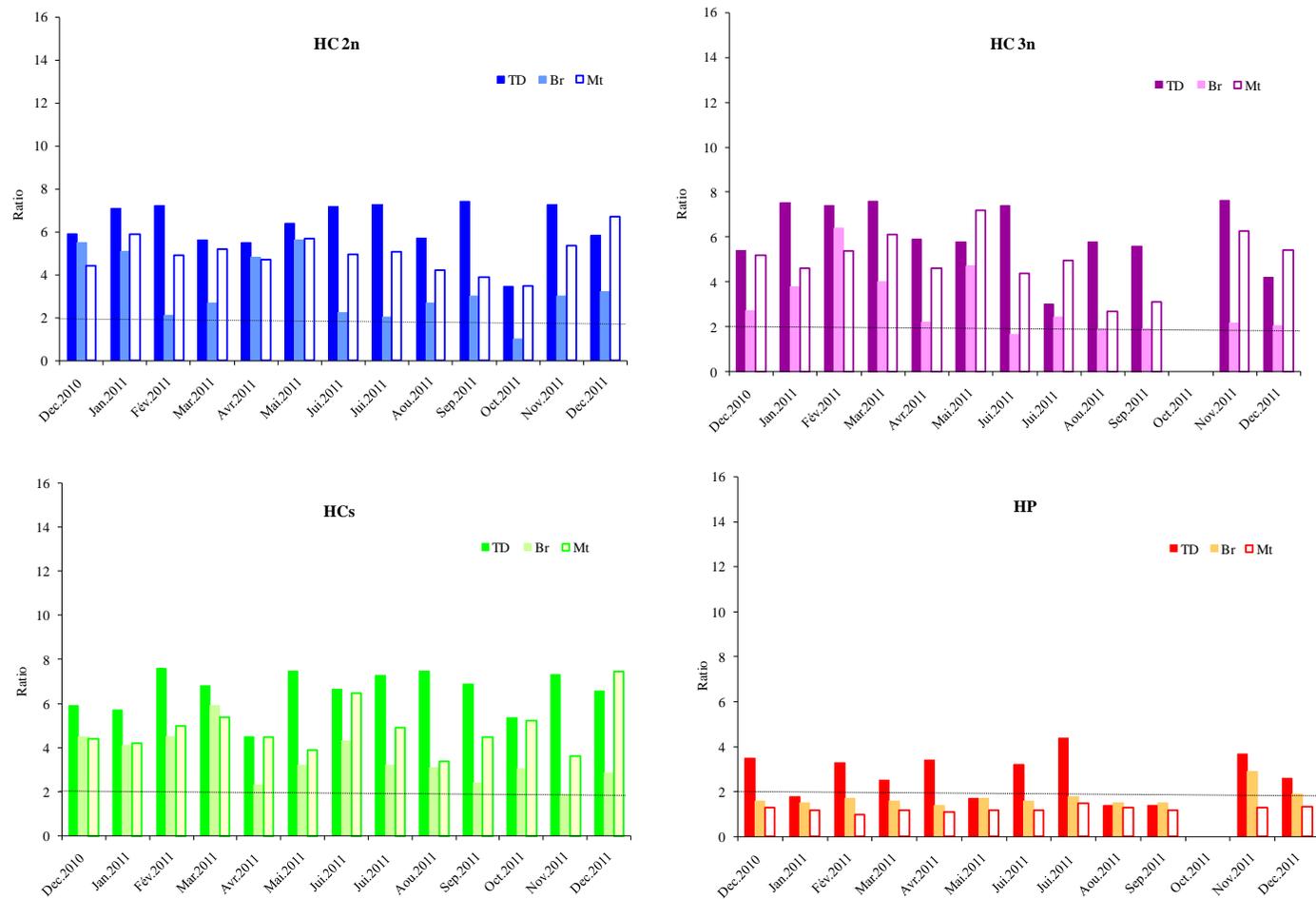
Les VLPs GII.3 ont tendance à se fixer sur tous les tissus des huîtres creuses diploïdes, triploïdes et sauvages. Une faible fixation de ces VLPs est observée sur les TD des huîtres plates avec un ratio proche du seuil de positivité et deux fois moins élevé que celui des huîtres creuses. Ces VLPs GII.3 ne se fixent pas sur les branchies et manteau des huîtres plates. Le suivi mensuel montre que cette fixation ne semble pas varier en fonction des saisons (Fig.47).



Le seuil de positivité du test ELISA fixé à 2 est représenté par la ligne en pointillé.

TD : tissus digestifs; Br : branchies; Mt : manteau.

Figure 46 : Fixation des VLPs GII.3 sur différentes espèces d'huîtres.



Le seuil de positivité du test ELISA fixé à 2 est représenté par la ligne en pointillé.

TD : tissus digestifs; Br : branchies; Mt : manteau.

Figure 47 : Fixation des VLPs GII.3 en fonction de la saison.

2.4. Paramètres environnementaux

Afin d'évaluer l'influence des paramètres environnementaux sur l'expression des ligands, des huîtres creuses diploïdes ont été prélevées dans deux sites présentant des conditions climatiques et environnementales différentes.

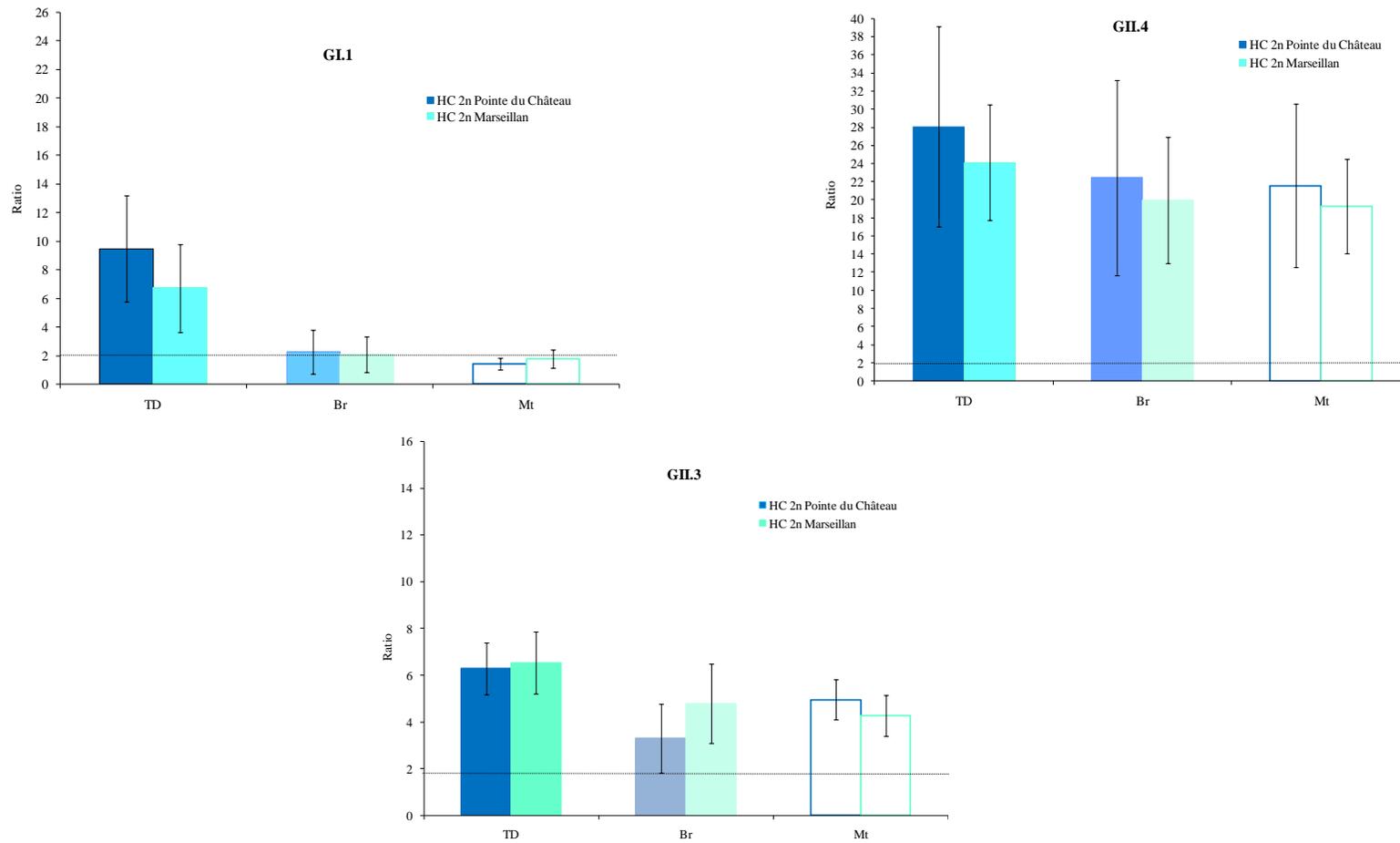
Les VLPs GI.1 ont tendance à se fixer essentiellement sur les TD des huîtres creuses diploïdes quelque soit le site de prélèvement. Les branchies et manteau affichent des ratios proches du seuil de positivité. Bien que le ratio de fixation des huitres prélevées à la pointe du château est supérieure a celui des huitres prélevées à Marseillan, aucune différence significative n'a été observée ($P = 0,0231$).

Les VLPs GII.4 ont tendance à se fixer sur tous les tissus des huitres creuses diploïdes quelque soit le site de prélèvement, avec des rations très proches. Aucune différence significative n'a été observée pour les 3 tissus ($P = 0,1341$).

Les VLPs GII.3 ont tendance à se fixer sur tous les tissus des huîtres creuses diploïdes des deux sites de prélèvement avec des ratios très proches. Considérant ces valeurs aucune analyse statistique n'a été réalisée (Fig.48).

A chaque prélèvement, la température et la salinité de l'eau de mer ont été relevées sur les deux sites. A la Pointe du château, les températures de l'eau de mer a oscillé entre 8 et 16°C entre le mois de janvier à mai. A Marseillan, la température a augmenté entre les mois de février à mai de 6 à 19°C.

La salinité de l'eau de mer est restée stable sur les deux sites de prélèvements durant l'année de l'étude. A la Pointe du château, les données ont varié entre 30 et 33,5 g‰. La salinité est plus élevée à Marseillan variant entre 34 et 37,5 g‰.



Le seuil de positivité du test ELISA fixé à 2 est représenté par la ligne en pointillé.

TD : tissus digestifs ; Br : branchies ; Mt : manteau.

Figure 48 : Comparaison de la fixation des VLPs entre Marseillan et la Pointe du château.

3. Bioaccumulation dans les huîtres creuses et plates

Deux expériences de bioaccumulations distinctes ont été réalisées avec des huîtres creuses *Crassostrea gigas* et des huîtres plates *Ostrea edulis* pour comparer la cinétique de contamination et la distribution tissulaire du NV(GI.1), TV et MgV après une et 24 heures et la persistance virale après 8 jours. Toutes les expériences ont été réalisées sur des huîtres adultes de taille commerciale pendant les mois froids (février-mars). Tous les rendements d'extraction sont acceptables et varient de 8 à 28 % pour les TD, de 39 à 113 % pour les branchies et de 36 à 68 % pour les manteaux. Tous les tissus ont été extraits trois fois dans des essais d'extraction indépendants et tous les AN extraits ont été amplifiés en duplicat, chaque donnée représente un total de 7 à 10 huîtres. Chaque concentration virale représente la moyenne géométrique de deux expériences indépendantes, chacune étant quantifiée sur trois valeurs de concentrations indépendantes.

Dans les huîtres creuses, après une heure de bioaccumulation le NV(GI.1) est détecté dans tous les tissus et atteint une concentration d'environ 100 copies d'ARN/g de tissu. Après 24 heures, cette quantité augmente de $2 \log_{10}$ dans les TD, alors qu'elle reste stable dans les branchies et le manteau. Après 8 jours, on observe une perte d'un \log_{10} dans les TD, les quantités bioaccumulées dans les branchies et le manteau restent relativement stables.

Dans les huîtres plates, la quantité du virus augmente dans les 3 tissus après une heure de bioaccumulation, avec une localisation préférentielle au niveau des TD où elle affiche environ 100 copies d'ARN/g de tissu avec une différence d'un \log_{10} pour les deux autres tissus. Cette concentration augmente après 24 heures de bioaccumulation de $2 \log_{10}$ pour les TD et d'un \log_{10} pour les branchies et le manteau. Après 8 jours, une baisse d'un \log_{10} dans les TD est observée, alors que les concentrations virales dans les branchies et le manteau restent relativement stables. Les tendances de la distribution tissulaire et la persistance virale après 8 jours chez les huîtres plates semblent identiques à celles retrouvées chez les huîtres creuses (Fig.49).

TABLEAU 12 : Distribution tissulaire du NV(GI.1), TV et MgV après une et 24 heures de bioaccumulation, persistance après 8 jours dans les HC et HP.

		1h			24h			8 jours		
		TD	Branchies	Manteau	TD	Branchies	Manteau	TD	Branchies	Manteau
HC	NV	4,32 x10 ²	1,87 x10 ²	3,00 x10 ²	1,82 x10 ⁴	3,38 x10 ²	4,01 x10 ²	4,63 x10 ³	2,00 x10 ²	1,41 x10 ²
HP	NV	1,31 x10 ²	89	6,87 e ⁺⁰¹	1,19 x10 ⁴	1,32 x10 ²	3,00 x10 ²	9,91 x10 ³	1,08 x10 ²	1,75 x10 ²
HC	TV	60	36	63	5,16 x10 ³	4,84 x10 ²	7,38 x10 ²	2,35 x10 ³	1,01 x10 ²	82
HP	TV	< LQ	< LQ	< LQ	3,51 x10 ³	1,30 x10 ²	1,34 x10 ²	1,00 x10 ³	67	42
HC	MgV	3,50 x10 ³	1,31 x10 ³	1,98 x10 ³	2,76 x10 ⁵	1,69 x10 ⁴	4,14 x10 ⁴	8,49 x10 ⁴	6,73 x10 ³	1,84 x10 ³
HP	MgV	2,40 x10 ³	1,96 x10 ³	1,69 x10 ³	1,66 x10 ⁵	1,40 x10 ⁴	8,20 x10 ³	1,48 x10 ⁵	2,06 x10 ³	2,76 x10 ³

La concentration moyenne géométrique a été calculée à partir de deux expériences, chacune étant déterminée sur la base de trois extractions séparées.

LQ = limite de quantification.

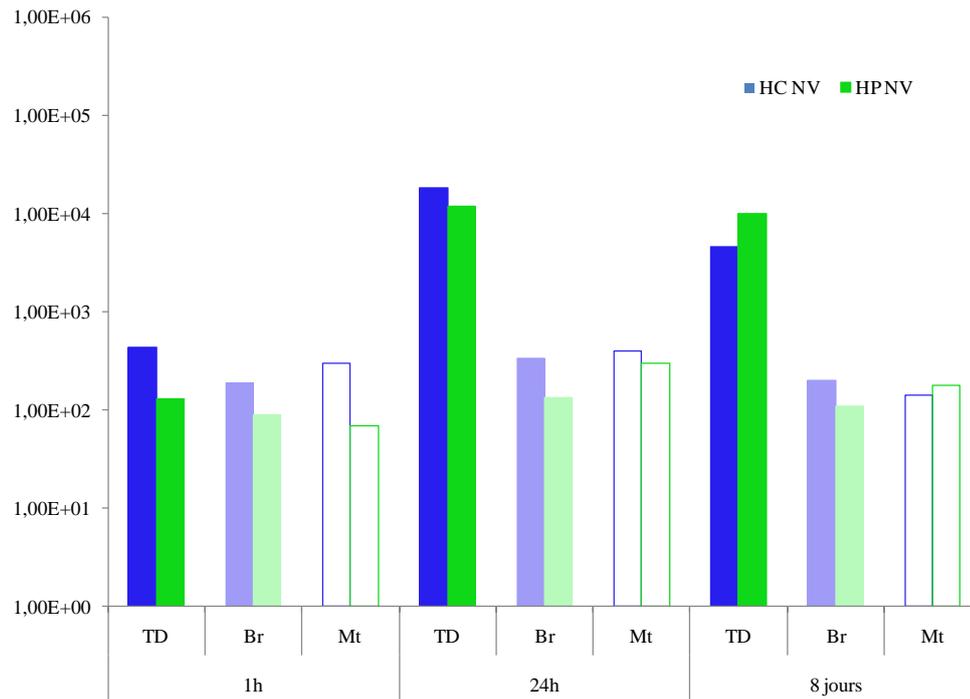


Figure 49 : Comparaison de la distribution tissulaire et de la persistance après 8 jours du NV(GI.1) dans les HC et HP.

Dans les huitres creuses, Le TV affiche après une heure de bioaccumulation des concentrations similaires dans tous les tissus, ces concentrations étant 10 fois inférieures à celles observées avec le NV(GI.1). Après 24 heures, les concentrations augmentent dans les trois tissus examinés et on retrouve cette répartition préférentielle dans les TD, la concentration moyenne dans les TD était 10 fois supérieure à la concentration moyenne détectée dans les branchies et le manteau. Après 8 jours, les concentrations virales restent relativement stables.

Dans les huîtres plates, après une heure de bioaccumulation, le TV n'est pas détecté dans aucun des tissus, mais après 24 heures la concentration du TV dans les TD augmente de 3 log₁₀ alors qu'elle augmente de 2 log₁₀ dans les branchies et le manteau. Après 8 jours, les concentrations dans les TD restent relativement stables alors qu'elles diminuent d'un log₁₀ dans les branchies et le manteau. Les huîtres plates semblent afficher un comportement similaire à celui observé chez les huîtres creuses (Fig.50).

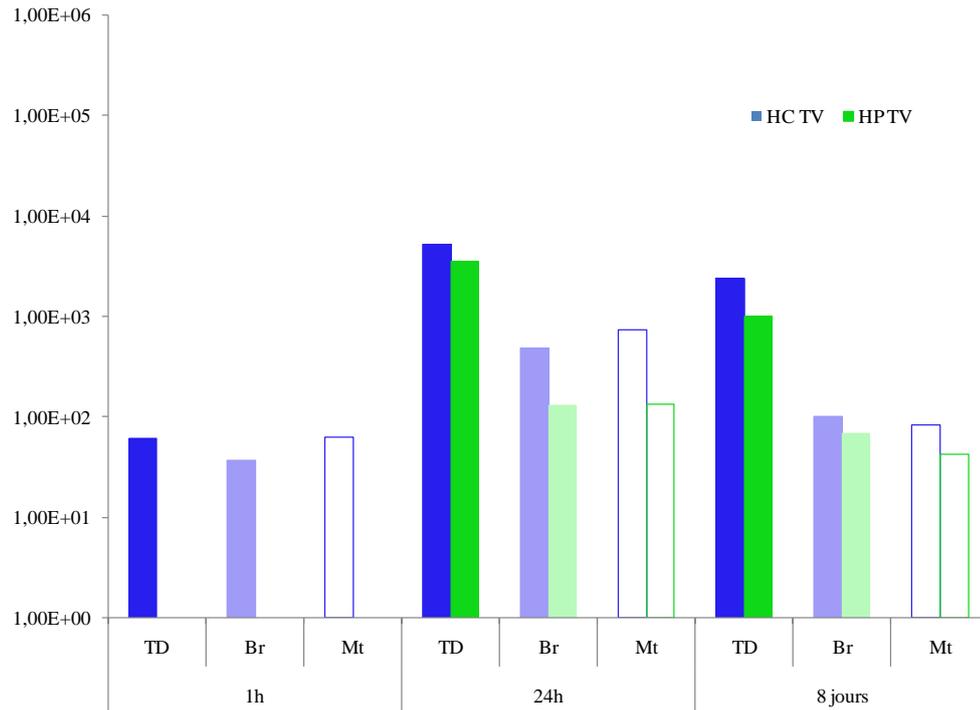


Figure 50 : Comparaison de la distribution tissulaire et de la persistance après 8 jours du TV dans les HC et HP.

Le MgV a étéensemencé à une concentration supérieure à celle des deux autres virus, ce qui explique les fortes concentrations détectées. Après une heure de bioaccumulation le MgV est détecté dans tous les tissus des huîtres creuses avec une concentration autour de $3 \log_{10}$ copies d'ARN/g de tissu. Après 24 heures, cette concentration augmente de $2 \log_{10}$ pour les TD et d'environ un \log_{10} pour les branchies et le manteau. Après 8 jours on observe une perte d'un \log_{10} dans chaque tissu.

Dans les huîtres plates, le MgV semble présenter le même profil de distribution tissulaire que les huîtres creuses. Après une heure de bioaccumulation, le MgV est détecté dans tous les tissus des huîtres plates avec une concentration autour de $3 \log_{10}$ copies d'ARN/g de tissu. Après 24 heures, cette concentration augmente de $2 \log_{10}$ pour les TD et d'environ un \log_{10} pour les branchies mais elle est restée stable pour le manteau. Après 8 jours, les concentrations restent relativement stables sauf pour les branchies où on observe une perte d'un \log_{10} (Fig.51).

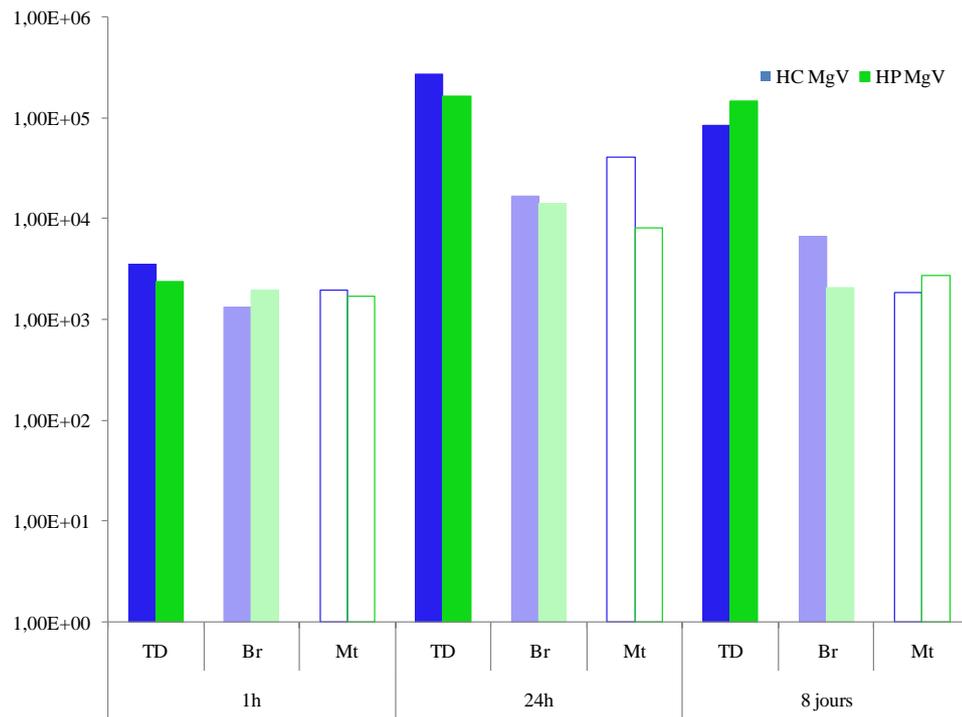


Figure 51 : Comparaison de la distribution tissulaire et de la persistance après 8 jours du MgV dans les HC et HP

DISCUSSION

1. Méthodes expérimentales : avantages et limites

La réglementation actuelle de l'Union européenne (UE) établit l'utilisation de programmes de surveillances bactériologiques basées sur *Escherichia coli* comme indicateur, pour déterminer la qualité sanitaire des mollusques bivalves vendus pour la consommation humaine et de leurs zones de récolte (règlement CE n° 854/2004). Bien que cette législation semble être efficace pour contrôler les maladies d'origine bactérienne (West *et al.* 1985) des coquillages répondant aux normes d'*Escherichia coli* peuvent contenir des virus entériques humains et induire des maladies après consommation (Chalmers and McMillan 1995; Heller D. 1986). Une études a même montré que la contamination par des virus entérique pouvait être détectée dans des zones jugées appropriées par des critères de coliforme (Le Guyader *et al.* 1998). Ceci est probablement dû au fait que les virus entériques sont plus robustes que les bactéries, ils survivent mieux dans le milieu marin et sont plus résistants à l'inactivation ou l'élimination durant la purification ou le reparcage. Pour ces raisons, divers auteurs ont proposé d'autres indicateurs pour une meilleure évaluation du risque viral associé aux coquillages.

Certains des candidats les plus prometteurs sont diverses espèces de bactériophage en raison de leur similitude physique et génomique avec les virus entériques humains, leur abondance dans les eaux usées et la facilité avec laquelle ils peuvent être énumérés. Les bactériophages ARN F-spécifiques sont probablement plus représentatif de la cinétique des pathogènes viraux dans les coquillages qu'*Escherichia coli* (Dore *et al.* 2003). Les bactériophages ARN F-spécifiques semblent être significativement liés à la présence de virus humains dans les coquillages, avec une très faible valeur prédictive pour les adénovirus, entérovirus et le VHA et une capacité prédictive plus forte pour les NoVs (Formiga-Cruz M. 2003). D'autre part, l'absence de bactériophages ARN F-spécifiques semble être un indicateur fiable de l'absence probable de virus entériques comme les NoVs (Dore *et al.* 2000). Cependant, certains auteurs ont présenté des réserves sur la surveillance avec cet indicateur (Reeck *et al.* 2010). De même que pour *Escherichia coli*, les bactériophages ARN F-spécifiques ne sont pas spécifiquement humains, une contamination avec ces phages peut être associée à des rejets animaux (Dore *et al.* 2000). Mais les méthodes d'hybridation par sondes oligonucléotidiques pour génotyper ces phages offrirait la possibilité de différencier les groupes de bactériophage associés aux animaux de ceux associées aux humains (Dore *et al.* 2000). Plus récemment, ces phages

ont été utilisés pour évaluer la réduction des concentrations de NoVs humains de moules expérimentalement contaminées par les pratiques de cuisson domestiques. Cette étude a démontré que de hautes températures étaient nécessaire pour réduire les concentrations de virus infectieux et le risque d'infection chez les consommateurs (Flannery *et al.* 2014).

D'autres virus entériques (VHA, VHE, entérovirus et rotavirus) sont comme les NoVs, impliqués dans des épidémies liées à la consommation de coquillages. Le VHA est un virus à ARN non enveloppé. De nombreuses études ont comparé la cinétique de dépuración du VHA et d'autre virus entériques dans les huîtres artificiellement contaminées. Love *et coll.*, ont montré que les taux de poliovirus et de VHA étaient très stable dans les TD des huîtres *Crassostrea virginica* pendant 5 jours sous différentes conditions de température, salinité, turbidité, pH et nutriments (algues) (Love *et al.* 2010). Une autre étude a montré que les virus entérique humains (poliovirus, VHA et NoVs) sont éliminés et inactivés à des taux différents par les huîtres du Pacifique *Crassostrea gigas* (McLeod *et al.* 2009a). Une étude a montré que le VHA pouvait rester infectieux dans les tissus de coquillages pendant trois semaines (Kingsley and Richards 2003). Le traitement thermique semble être le plus efficace pour l'inactivation des virus. Des souches de VHA adaptées à la culture cellulaire ont été utilisées comme indicateur dans des études visant à élaborer des stratégies d'inactivation thermique pour la plupart des virus entériques (Butot *et al.* 2009), d'autant plus que les efforts visant à cultiver les NoVs humains ont été infructueux. Différentes espèces de coquillages tels que les coques (Millard J. *et al.* 1987), les moules (Crocì *et al.* 2005) et les palourdes (Sow *et al.* 2011) ont été utilisées dans ces études.

L'absence d'essais d'infectiosité pour les NoVs humains a nécessité l'utilisation de substituts viraux pour modéliser la nature infectieuse de ces virus dans les échantillons environnementaux. La recherche d'un substitut approprié a été intensive (Kniel 2014). Les calicivirus des animaux, y compris le FCV et le MNV ont été largement employés comme substitut des NoVs humains. Le FCV a été très utilisé pour l'évaluation de l'efficacité de divers procédés de traitement de l'eau (De Roda Husman *et al.* 2004; Nuanualsuwan *et al.* 2002; Slomka M.J. and H. 1998; Thurston-Enriquez J.A. 2003) et des traitement des eaux usées (Tree *et al.* 2005). D'autres études ont évalué l'inactivation du FCV pour le contrôle des NoVs humains dans certains milieux comme les hôpitaux et les navires de croisière et l'inactivation par l'utilisation de désinfectants chimiques (Gehrke C. 2004; Kampf *et al.* 2005; Steinmann 2004). Le FCV a également été utilisé pour évaluer la stabilité des NoVs humains à l'inactivation thermique dans les moules

marinées (Bozkurt *et al.* 2014; Hewitt J. 2004). Cependant, à la différence des virus entériques, le FCV est un virus respiratoire des félinés, il est sensible au faible pH et aux températures élevées et donc ne constitue pas un substitut approprié pour les NoVs humains (Doultree J.C. *et al.* 1999; Slomka and Appleton 1998). Plus récemment, le MNV a été proposé et utilisé comme substitut aux NoVs humains (Wobus, Thackray, et Virgin, 2006). Le MNV partage avec ces derniers de nombreuses caractéristiques génétiques et biochimiques (Taube *et al.*, 2012; Wobus *et al.*, 2006) que le FCV ne possèdent pas. Une étude comparant la bioaccumulation du MNV, du VHA, du poliovirus et du bactériophage MS2 chez deux espèces d'huîtres a montré l'intérêt du MNV par rapport aux autres substituts pour imiter le comportement des NoVs humains (Nappier *et al.* 2008). De plus, le MNV offre la possibilité d'étudier l'infectiosité dans un modèle animal, fournissant par exemple des informations sur les risques infectieux potentiels d'huîtres expérimentalement contaminées et irradiés par faisceaux d'électrons (Praveen *et al.* 2013). Cependant, des études antérieures ont démontré que le traitement à haute pression d'huîtres expérimentalement contaminées inactivait le MNV alors que les NoVs humains restaient infectieux, suggérant l'inadéquation du MNV comme substitut dans ces études (Gogal RM 2011, Leon JS 2011). De plus, l'infection chez la souris ne provoquant pas les mêmes symptômes que les NoVs humains (Hsu *et al.* 2006). Le MNV utilise comme récepteur fonctionnel l'acide sialique tandis que les NoVs humains utilisent les HBGAs en tant que facteurs de fixation.

Pendant longtemps, l'huître a été considérée comme simple filtre passif ou piège ionique, accumulant passivement les particules virales par des liaisons non spécifiques. Cependant, certaines observations comme la persistance à long terme dans les coquillages et la différence dans la transmission des souches plaident en faveur de mécanismes plus spécifiques pour la bioaccumulation des NoVs humains. La mise en évidence de la fixation des NoVs humains aux HBGAs (Hutson A.M. 2002; Marionneau *et al.* 2002) a offert des nouvelles approches pour étudier ces virus. Une fixation spécifique des NoVs GI.1 sur les TD des huîtres creuses *Crassostrea gigas* via des structures de type antigène A-like a été mise en évidence (Le Guyader *et al.* 2006a). Ceci a été confirmé chez d'autres espèces de coquillages (Tian *et al.* 2006; Tian *et al.* 2007). Plus tard la liaison d'autres souches par le biais de différents ligands a été décrite (Langlet *et al.* 2015). Il a également été démontré que ces ligands avaient un impact sur l'efficacité de bioaccumulation et pour certaines souches un effet saisonnier (Maalouf *et al.* 2011; Maalouf *et al.* 2010). Une

étude de terrain a confirmé la sélection préférentielle des NoVs GI par rapport aux NoVs GII et GIII (Zakhour *et al.* 2010). Ces observations suggèrent que les huîtres ont la capacité d'accumuler et de concentrer un agent pathogène humain en particulier sur la base de la présence d'un ligand commun entre les deux, plutôt que par des interactions non spécifiques (Le Guyader *et al.* 2012). L'hypothèse que ces ligands spécifiques pourraient avoir un impact sur la persistance des NoVs dans les huîtres a été émise.

Pour les expériences de bioaccumulation, de grandes quantités de virus sont nécessaires. Obtenir des quantités suffisantes de matériel contenant une souche particulière de NoVs est un défi de taille en raison de la variabilité génétique des NoVs et parce que seules les selles de personnes infectées peuvent constituer une source de particules virales, avec bien évidemment, les inconvénients associés (taux d'excrétion variables, manipulations difficiles, purification et concentration des particules délicates).

Le TV, prototype du genre *Recovirus* appartient à la famille des *Caliciviridae* (Farkas *et al.* 2008). Les *Recovirus* sont génétiquement plus proche des NoVs que les autres genres connus dans la famille des *Caliciviridae*. L'inoculation de TV cultivé *in vitro* à des singes rhésus a provoqué des manifestations intestinales avec gastro-entérite bénigne, ce qui indique que le TV est un pathogène entérique (Sestak *et al.* 2012). Le TV reconnaît les HBGAs de type A et B, comme les NoVs humains (Farkas *et al.* 2010a). Enfin, ce virus peut être cultivé dans des lignées cellulaires dérivées de rein de singe incluant les LLC-MK₂, Vero et MA104, permettant d'obtenir des quantités suffisantes de virus pour les expérimentations (Farkas *et al.* 2008). Ces caractéristiques font de ce virus un substitut potentiel pour étudier la persistance des NoVs humains dans les huîtres. Pour compléter l'étude, le MgV membre de la famille des *Picornaviridae*, a été utilisé comme un virus contrôle ne reconnaissant pas les HBGAs. La souche vMC₀ du MgV peut être multipliée en culture cellulaire (Martin and Palmenberg 1996 2261). Le MgV reconnaît certains acides sialiques sur les globules rouges (Jin *et al.* 1994). Ces ligands peuvent contribuer à sa bioaccumulation dans les huîtres riches en acide sialique comme cela a déjà été démontré (Le Guyader *et al.* 2009; Mann *et al.* 1992).

Travailler avec les mollusques bivalves vivants dans des conditions de laboratoire peut introduire des paramètres artificiels qui ne tiennent pas suffisamment compte des facteurs environnementaux importants pour l'interprétation des résultats (Kingsley and Richards 2003; Richards G.P. 1988). L'étude du comportement des NoVs humains dans

l'environnement étant limitée en raison de l'impossibilité d'introduire des pathogènes potentiels en milieu ouvert, des alternatives telles que l'utilisation de VLPs ont été proposées. Une des premières études décrites concerne l'environnement et l'investigation de l'influence des interactions électrostatiques sur la filtration des VLPs NV(GI.1) sur des particules de sable et de quartz (Redman J.A. 1997; Redman J.A. 2001). Une étude au laboratoire a montré la stabilité des VLPs de NoVs (GI.1) et de rotavirus en eau de mer (Loisy *et al.* 2004) et l'intérêt de ces dernières pour évaluer la persistance des virus dans des huîtres contaminées et placées dans un estuaire (Loisy *et al.* 2005). Pour les besoins de notre étude, les huîtres ont été placées dans une ferme expérimentale permettant une meilleure fiabilité, reproductibilité et contrôle des différents paramètres environnementaux (oxygénation, salinité, température, contrôle de la qualité de l'eau à l'entrée et traitement des eaux rejetées dans l'environnement). Comme l'eau de mer entrante a été filtrée, nous avons choisi d'ajouter du phytoplancton, considérant qu'en conditions naturelles les huîtres ont accès en continu à la nourriture. Les arguments contradictoires tels que l'impact significatif de l'alimentation sur la persistance après 8 jours pour le TV ou la récente démonstration qu'affamer les huîtres était efficace pour éliminer les particules virales par autophagie (Moreau *et al.* 2015) ont été considérés mais nous avons privilégié la reproduction du milieu naturel plutôt que l'optimisation de l'élimination des virus. Au cours de la première expérience de persistance virale, une suralimentation accidentelle a eu lieu, mais cela n'a pas eu d'incidence sur l'élimination virale observée lorsque l'on compare les trois expériences de persistance virale. Afin de minimiser au maximum les variations dues aux différences physiologiques entre les animaux, les trois expériences ont été répétées sur une courte période de temps, tout en sélectionnant la période de l'année où la contamination des huîtres en France est maximale et l'expression des ligands dans les huîtres est la plus élevée (Maalouf *et al.* 2011; Maalouf *et al.* 2010).

Les NoVs sont le plus souvent détectés en utilisant la RT-PCR en temps réel en raison de sa faible limite de détection (théoriquement une seule copie génomique par réaction de RT-PCR). Elle représente la méthode de choix pour détecter les NoVs dans les échantillons alimentaires et environnementaux, présentant de faibles concentrations virales. Outre les avantages techniques (réaction en une étape incluant l'hybridation) et de sensibilité accrue (sélection d'un fragment court dans une région du génome très conservée), la RT-PCR en temps réel permet d'envisager une approche quantitative. La

quantification des NoVs dans les coquillages est un procédé techniquement complexe qui doit considérer de nombreux paramètres tels la présence d'inhibiteurs des composants des tissus des coquillages, la perte de particules virales lors des différentes étapes d'extraction et le choix des amorces et sondes qui conditionnent la sensibilité et la spécificité de la RT-PCR (Le Guyader *et al.* 2009). L'inclusion, comme contrôle interne d'extraction, d'une quantité connue de MgV, sans impact sur les résultats définitifs de la quantification, offre une détermination plus précise de la charge virale dans les échantillons de coquillage. En effet, ce contrôle permet d'établir si le test n'a pas été perturbé par la présence d'inhibiteurs et si la perte virale n'a pas été trop importante au cours des diverses étapes d'extraction de la méthode. Afin d'éviter le risque de contamination entre les différents échantillons, les précautions et les bonnes pratiques de laboratoire ont été respectées tout au long de l'analyse. La dissection des échantillons a été réalisée dans une salle réservée à cet usage, et des ustensiles stériles ont été utilisés pour la dissection de chaque lot.

Basé sur les pratiques du laboratoire dans la quantification virale, après vérification de l'efficacité de l'étape d'extraction, les concentrations virales sont calculées et exprimées à partir des résultats de trois essais d'extraction indépendants, les AN de chaque essai d'extraction étant analysé en triplicat par RT-PCR. Cette approche est plus précise car elle permet de réduire au maximum les variations dues à l'extraction et l'amplification (Grodzki *et al.* 2014). Basé sur des critères de qualité développés pour valider des courbes standards en pathologie animale, les courbes obtenues ont été analysées permettant d'éliminer celles ne correspondant pas à ces critères (U47-600-2 2015). Dans ce cas de figure, les valeurs de C_T ont été comparées à d'autres extractions du même échantillon, et les amplifications ont éventuellement été répétées. Cette approche a été utile pour consolider l'approche quantitative par l'estimation de l'incertitude de quantification pour chaque virus. Ainsi, l'incertitude de quantification pour le TV est plus élevée en comparaison avec les deux autres virus, point important à considérer pour l'interprétation des résultats, mais suggère également que la RT-PCR mériterait d'être optimisée. Néanmoins, quel que soit le virus considéré, le niveau d'incertitude de quantification lié à la méthode est plus faible que les différences observées au cours du temps et nous permettent d'être confiant dans les résultats présentés.

2. Persistance des norovirus dans les huîtres

Un point important à considérer lors de l'étude du comportement viral dans les coquillages est le mode de contamination. Les virus accumulés dans les coquillages sont généralement adsorbés sur des particules et ont séjournés dans l'environnement. Alors que dans le cas de la contamination artificielle, l'inoculum constitué d'une suspension virale plus ou moins purifiée, est rajouté directement dans un broyat de coquillages avec un temps de contact court. Les tissus des coquillages peuvent offrir une protection passive contre l'inactivation des virus. Dans une étude pour évaluer les conditions et les délais de traitement thermique nécessaire pour l'inactivation complète du VHA, des expériences ont été effectuées en utilisant des suspensions virales et des homogénats de moules expérimentalement contaminés par le VHA. Les résultats ont montré qu'à la même température, les traitements thermiques plus longs sont nécessaires pour inactiver les virus contenus dans un homogénat de coquillages, par rapport aux temps nécessaires pour inactiver la même quantité de virus contenu dans la suspension virale (Crocì *et al.* 2005). Plus récemment le rôle protecteur de la chair des coquillages pour les NoVs a été confirmée (Alfano-Sobsey *et al.* 2012; Flannery *et al.* 2014).

L'étude de la cinétique de contamination, de la distribution tissulaire et de la persistance virale montre des comportements différents entre les trois virus, qui pourraient être liés à la reconnaissance de ligands spécifiques différents. En effet, chez l'huître creuse, le NV(GI.1) se fixe spécifiquement par un ligand A-like, présent uniquement au niveau des TD, entraînant une concentration très efficace et ciblée de cette souche au niveau de ces tissus, comme démontré auparavant (Maalouf, Schaeffer *et al.* 2011) et en accord avec les résultats obtenus dans notre étude. Cette fixation spécifique expliquerait la longue persistance du NV(GI.1) dans les huîtres creuses.

Le TV reconnaît également les HBGAs neutres comme les NoVs. Dans notre étude, il affiche une distribution tissulaire similaire à celle du NV(GI.1), même si l'efficacité de bioaccumulation est plus faible. Dans une étude récente, grâce à des expériences de liaison et de blocage du TV avec des HBGAs, Zhang *et coll.*, ont montré que le TV se lie aux quatre types d'antigènes B (types 1 à 4) alors qu'il ne reconnaît que l'antigène A de type 3 parmi les quatre types d'antigènes A testés. Ces résultats contribuent par ailleurs à la compréhension de la spécificité des types HBGAs reconnus par différents NoVs humains. Par exemple, chez l'homme le NV(GI.1) reconnaît principalement la chaîne de

type 1 des antigènes A et H, tandis que les principaux NoVs GII.4 épidémiques reconnaissent principalement les chaînes de type 3 des antigènes A, B et H (Zhang *et al.* 2015). Des différences existent également concernant la fixation des NoVs sur les tissus d'huîtres. Les approches utilisées (ELISA, Immunohistochimie), ont montré que la répartition d'une souche NoVs GII.4 n'est pas restreinte aux TD comme pour le NV(GI.1). Dans les branchies et le manteau, cette souche GII.4 se fixe *via* un acide sialique en liaison α 2,3 tandis que la fixation dans les TD, implique à la fois l'acide sialique et l'antigène A-like. Étonnamment, la souche GII.4 a montré, après 24 heures, un très faible taux de bioaccumulation ($< 0,1$ %), suggérant l'implication d'autres mécanismes comme une fragilité plus importante de cette souche dans le milieu marin (Maalouf *et al.* 2011). Une souche NoVs GII.3 présente un profil de liaison aux tissus d'huîtres similaire à celui observé pour la souche GII.4, avec des VLPs se liant aux TD, branchies et manteau. Cependant l'efficacité de bioaccumulation est plus élevée que celle observée pour la souche GII.4 avec 0,1-0,5 % à une heure et 0,9-4,1 % à 24 heures (Maalouf *et al.* 2011). L'efficacité de bioaccumulation du TV obtenu dans notre étude, est plus comparable à celle observée pour la souche GII.3. Dans l'état de nos connaissances, il est difficile d'aller plus loin dans l'explication des différences observées car la structure exacte des récepteurs reste à déterminer. Il serait intéressant de poursuivre la caractérisation des différents ligands impliqués dans la fixation aux tissus des coquillages. La disponibilité de divers Recovirus adaptés à la culture cellulaire, représentant différents motifs de liaison aux HBGAs rend ce substitut encore plus attractif pour modéliser les bioaccumulations des NoVs humains dans les coquillages (Farkas *et al.* 2014; Tian *et al.* 2008).

En revanche la cinétique de bioaccumulation et la distribution tissulaire du MgV diffèrent de celles des deux autres virus étudiés. L'étude de la répartition tissulaire montre qu'après plusieurs heures de bioaccumulation, les particules de MgV sont détectées indifféremment dans les trois tissus analysés. Le MgV reconnaît des structures sialylées qui seraient probablement responsables d'une distribution assez homogène du virus dans les divers tissus de l'huître (Mann *et al.* 1992). Chez les coquillages, le rôle de l'acide sialique dans les mécanismes de défense ou dans la physiologie n'est pas clairement élucidé. Peu de données sont disponibles sur la présence et la distribution de l'acide sialique dans les tissus d'huîtres. Dans l'huître creuse *Crassostrea gigas*, ce résidu se trouve majoritairement sous forme libre dans l'hémolymphe, contenant les hémocytes (Tunkijjanukij *et al.* 1998). Chez les coquillages, les hémocytes existent sous formes

diverses et certains types jouent un rôle essentiel dans la défense de l'organisme en phagocytant les agents pathogènes ou en les encapsulant par formation de kystes. Ils interviennent également dans la reconnaissance et la dégradation d'agents extérieurs par la sécrétion intra ou extracellulaire de lectines, d'enzymes et par la production de radicaux libres (Aladaileh *et al.* 2007; Grizel 2003). Il est vraisemblable que l'élimination plus rapide du MgV en comparaison au deux autres virus pourrait être liée à une destruction ciblée de ces particules virales *via* les hémocytes (porteurs de cet acide sialique).

Les comparaisons des résultats de notre étude sont limitées par le peu de données disponibles dans la littérature. Très peu d'études ont été décrites concernant la persistance des NoVs dans les coquillages, en particulier dans un environnement ouvert pour une longue période. Ceci démontre tout l'intérêt des données obtenues. Mais toute comparaison de donnée doit être faite avec prudence intégrant les divers événements qui peuvent influencer les résultats. Dans une étude portant sur la surveillance d'une zone de production conchylicole contaminée avec des eaux usées, les échantillonnages de coquillages réalisés après l'épisode de contamination ont montré une baisse progressive du niveau de contamination virale. Par exemple, la concentration des NoVs GI et GII dans les TD des huîtres a montré des concentrations décroissantes de $8,2 \times 10^3$ copies d'ARN/g de TD à $4,2 \times 10^3$ copies d'ARN/g de TD sur plus de quatre semaines (Le Guyader *et al.* 2008). Dans une autre étude combinant le reparcage et la purification d'huîtres naturellement contaminées et impliquées dans des épidémies de gastro-entérites, la concentration initiale d'environ $2,9 \times 10^3$ copies d'ARN/g de TD est passée à $1,4 \times 10^2$ copies d'ARN/g de TD en 28 jours (Dore *et al.* 2010). Une étude réalisée dans des conditions de laboratoire avec de l'eau de mer artificielle, a rapporté la persistance de NoVs, MNV et VHA sur une période d'un mois (Nappier *et al.* 2008). Notre étude, réalisée pendant une période de temps plus longue, a confirmé la longue persistance du NV(GI.1). La concentration dans les TD des huîtres a diminué seulement de 50 % sur une période de huit jours. Le TV affichant une demi-vie d'environ six jours, semble être un substitut adéquat pour étudier le comportement des NoVs humains dans les huîtres bien que la souche de TV utilisée soit plus proche d'un NoVs GII basée sur la reconnaissance des HBGAs (Zhang *et al.* 2014).

3. Fixation des norovirus dans d'autres espèces d'huitre

Le test ELISA développé au laboratoire permet une approche semi-quantitative grâce au calcul d'un ratio pour évaluer et comparer la fixation entre différentes souches de NoVs. Ce protocole adapté aux coquillages est inspiré de celui développé pour étudier la fixation des VLPs NoVs sur des coupes de tissus humains ou animaux et des salives phénotypées ABO d'individus sécréteurs (Marionneau *et al.* 2002). Toutefois, pour ces études il est important de disposer d'importantes quantités de virus. Comme mentionné ci-dessus, outre leur extrême variabilité génomique, ces virus ne sont pas cultivables. Obtenir des quantités suffisantes de matériel contenant une souche particulière de NoVs est un défi de taille avec, bien évidemment, les inconvénients associés. Ces écueils ont été surmontés par la mise au point, il y a maintenant presque 20 ans, de la production de VLPs de la première souche bien caractérisée : le virus Norwalk. Maintenant étendues à de nombreuses souches, les VLPs sont devenus l'outil de préférence pour étudier les propriétés structurales et biologiques des NoVs. Ces VLPs permettent d'avoir une grande quantité de particules d'une souche donnée, indispensable pour évaluer la fixation virale. Chaque VLPs utilisée étant reconnue par un anticorps spécifique, leur production, caractérisation ainsi que l'obtention de l'anticorps est un travail long et difficile. Ces études n'auraient pas pu être réalisées sans l'aide de nos collègues nous ayant fournis ces VLPs et anticorps. L'étude menée sur des huîtres creuses diploïdes, triploïdes, sauvages et des huîtres plates prélevées dans deux sites (Bretagne et Méditerranée) a permis d'évaluer la capacité de fixation des VLPs NV(GI.1), GII.4 et GII.3 aux tissus de ces différentes variétés et espèces d'huîtres. Très peu d'études sont disponibles sur la fixation des NoVs humains à ces coquillages.

Les huîtres creuses triploïdes, huîtres génétiquement modifiées, possèdent des triplets de chromosomes à la place des doublets des huîtres originelles. L'intérêt de ces huîtres c'est qu'elles ne produisent pas, ou en très faibles quantités, de produits génitaux (spermatozoïdes et ovocytes) appelé laitance qui freine leur consommation les mois autres qu'en hiver. Dans ces conditions, l'énergie dépensée habituellement par l'huître pour sa reproduction est réorientée vers d'autres fonctions comme la croissance. Cela confère aux huîtres triploïdes un avantage commercial. Au vu des résultats obtenus, ce changement génétique semble peu influencer la fixation des VLPs des souches NV(GI.1),

GII.4 et GII.3 étudiées sur les différents tissus analysés. Identiquement, les huîtres creuses sauvages, c'est à dire se développant sans intervention humaine sur le littoral, montrent également les mêmes tendances pour la reconnaissance des VLPs NoVs GI et GII étudiées. Ceci montre que cette fixation semble être liée surtout à l'espèce d'huître considérée. En effet les huîtres creuses diploïdes, triploïdes ou sauvages utilisées pour cette étude appartiennent toutes à l'espèce *Crassostrea gigas*.

Par contre, les huîtres plates, appartenant à l'espèce *Ostrea edulis*, montrent des profils de fixations différents de ceux des huîtres creuses. Les VLPs NV(GI.1) semblent moins se fixer sur les TD des huîtres plates analysées. On pourrait donc émettre l'hypothèse que ces huîtres possèderaient très peu ou pas de ligand proche de l'antigène A-like humain et seraient donc moins capables de concentrer les NoVs NV(GI.1) éventuellement présents dans l'eau de mer. Ces huîtres plates semblent fixer environ 4 fois moins les VLPs GII.4 au niveau des TD, branchies et manteau que les huîtres creuses. Ces données laissent supposer la présence d'un ligand contenant l'acide sialique en plus faible quantité ou la présence d'un autre ligand non identifié à l'heure actuelle. Des études complémentaires seraient nécessaires afin de caractériser les ligands présents chez l'huître plate.

L'impact des saisons sur la contamination des coquillages est difficile à évaluer car de multiples variables telles que la température, la pluviométrie, l'épidémiologie de la population, les contaminants organiques ou inorganiques peuvent avoir une influence, sans compter la physiologie de l'animal lui-même. Une étude antérieure a mis en évidence un impact saisonnier marqué pour la fixation des VLPs NV(GI.1) en ELISA chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*, avec une fixation plus importante pendant les cinq premiers mois de l'année (de janvier à mai) par rapport au reste de l'année. En revanche aucune variation saisonnière n'a été observée pour les VLPs d'une souche GII.4 (Maalouf *et al.* 2010). Pour la période étudiée, la fixation des VLPs NV(GI.1) semble augmenter de fin décembre à début avril 2011 puis de fin janvier jusqu'à fin avril 2012 pour les huîtres creuses (diploïdes, triploïdes et sauvages). Par contre, la fixation des VLPs des souches GII.4 et GII.3 étudiées sur les tissus des huîtres creuses montre peu de variation au cours de la période de l'étude. Ces observations ne sont pas retrouvées chez les huîtres plates prélevées en Bretagne où la fixation des VLPs NV(GI.1) montre une très légère augmentation de mois en mois.

Afin d'évaluer l'influence des paramètres environnementaux sur la fixation des VLPs NV(GI.1), GII.4 et GII.3 des souches étudiées sur les tissus des huîtres creuses diploïdes, des huîtres ont été prélevées dans deux sites présentant des conditions climatiques et environnementales différentes et analysées. Les résultats obtenus ne semblent pas montrer de différence de fixation selon le site de prélèvement.

Il est important de continuer cette étude afin d'avoir des données suffisantes permettant d'évaluer l'influence de l'espèce d'huître, des saisons et des conditions environnementales sur la fixation des NoVs aux tissus des coquillages. Ces résultats restent novateurs dans ce domaine puisqu'ils soulignent la possibilité pour les huîtres plates, dans les zones de productions proches des zones côtières, d'être moins sensibles que les huîtres creuses à la contamination suite à des événements, comme par exemple une décharge d'eaux usées lors de pluies importantes. Par ailleurs, d'autres souches de NoVs devront être testées. Des bioaccumulations avec ces coquillages vivants seront également indispensables pour évaluer la signification biologique des résultats obtenus par ELISA.

4. Bioaccumulation dans les huîtres creuses et plates

En France, seules deux espèces d'huîtres sont produites et sont susceptibles d'être contaminées par les NoVs humains. La majeure partie de la production concerne l'huître creuse, mais l'huître plate reste un met très prisé des consommateurs. Cependant, la comparaison de la bioaccumulation des NoVs entre les huîtres creuses et plates a rarement été étudiée. Une étude comparant les capacités de bioaccumulation, de persistance et de purification de deux espèces d'huîtres : *Crassostrea ariakensis* et *Crassostrea virginica*, envers cinq agents pathogènes viraux, selon des gammes de salinité représentant les conditions de récolte dans la baie de Chesapeake a montré que le NV(GI.1) était plus efficacement concentré par *C. ariakensis* et persistait plus longtemps en comparaison avec *C. virginica* (Nappier *et al.* 2008). Une autre étude a montré que l'adénovirus type 35 (Ad35) a présenté une différence de persistance de viabilité entre les huîtres plates *Ostrea edulis* et les moules bleues *Mytilus edulis* (Hernroth and Allard 2007).

Afin évaluer l'influence de l'espèce d'huître sur l'efficacité de bioaccumulation, la distribution tissulaire et la persistance virale après huit jours des trois virus précédemment

étudiées, des bioaccumulations ont été réalisées en parallèle sur deux espèces d'huîtres *Crassostrea gigas* et *Ostrea edulis* avec le NV(GI.1), le TV et le MgV.

La première observation est que les huîtres creuse et plates présente les mêmes tendances à concentrer les trois souches virales. Dans les huitres creuses, la souche NV(GI.1) est efficacement bioaccumulée dans les TD. Après 24 heures, la différence de concentration entre les TD et les autres tissus varie d'un facteur 100, en accord avec l'absence de ligands dans ces tissus. La forte concentration du NV(GI.1) détectée dans les TD est également compatible avec les observations antérieures. Dans les huîtres plates, les données sont très proches de celles observées dans les huitres creuses, laissant supposer un mécanisme spécifique d'attachement, plus efficace, induisant une concentration plus élevée dans les TD et laissant supposer une persistance plus longue des virus dans les tissus.

L'étude de la cinétique de contamination du TV montre des tendances assez similaires à celles observées pour le NV(GI.1). Dans les huitres creuses, après une heure de contact avec le virus, les concentrations détectées dans les tissus sont très faible, alors que le virus est indétectable dans les huitres plates. Après 24 heures, les concentrations détectées dans les TD sont assez similaires entre les deux espèces d'huîtres. Les branchies et le manteau affichent des concentrations 10 fois plus faibles que celle des TD. Cependant, ces deux essais de bioaccumulation montrent que les huîtres ont tendance à concentrer moins efficacement le TV que le NV(GI.1). Des suivis de contamination montrent que les concentrations accumulées dans les TD restent relativement stables après huit jours. Dans les branchies et le manteau, une diminution progressive en fonction du temps est observée, suggérant l'existence d'un mécanisme plus ou moins spécifique de rétention des particules virales qu'il sera intéressant de caractériser.

En revanche, le MgV montre un comportement différent des deux autres virus. Même si une tendance à une accumulation préférentielle dans les TD est observée au bout de 24 heures, après une heure, une proportion élevée de virus a été détectée dans les branchies et le manteau, probablement par liaison à l'acide sialique comme précédemment détectée par ELISA et immunohistochimie (Maalouf *et al.* 2011). Le suivi de la contamination montre qu'après huit jours, les concentrations restent relativement stables dans les tissus, suggérant une persistance moindre liée aux caractéristiques des récepteurs impliqués dans la fixation du MgV au niveau de ces tissus.

Ces expériences apportent des données novatrices mais restent préliminaire. Il sera donc important de poursuivre les expérimentations pour véritablement conclure. Afin de compléter ces expériences, il sera intéressant de réaliser des études de caractérisation des ligands par des tests ELISA et immunohistochimie, en particulier pour les huitres plates, afin de vérifier si les résultats de distribution tissulaire et de persistance sont due à des interactions plus spécifiques. Ce nouveau concept abordant la relation entre la caractérisation des ligands et la persistance virale prolongée pourrait être utilisé en termes d'analyse de risque.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Cette thèse « Norovirus et coquillages : approches pour l'évaluation de la persistance et du pouvoir infectieux » s'articule essentiellement autour de l'évaluation du potentiel des Recovirus comme substitut viral des NoVs humains afin d'étudier leur comportement dans les coquillages, notamment la persistance virale.

Pendant de nombreuses années, la détection des virus dans les coquillages est restée descriptive mais les avancées méthodologiques et épidémiologiques permettent d'avoir maintenant une approche plus précise de la problématique de la contamination virale des coquillages. Le développement d'une méthode RT-PCR en temps réel quantitative robuste et fiable est un progrès technique majeur. En raison de sa limite de détection très basse, elle représente la méthode de choix pour détecter les NoVs humains dans les échantillons alimentaires et environnementaux, où la concentration virale est généralement assez faible. Cette technique a facilité l'énumération des acides nucléiques viraux et permis d'améliorer l'analyse en passant d'une simple détermination qualitative (présence/absence) à l'approche quantitative par la détermination de la concentration d'acides nucléiques viraux dans les échantillons. Une méthode RT-PCR en temps réel normalisée est disponible depuis peu pour la détection des NoVs humains dans les coquillages. Si l'application de ces méthodes a permis des avancées importantes dans la recherche sur les NoVs humains dans l'environnement, des défis demeurent notamment sur l'évaluation de l'infectiosité des virus détectés.

Malgré de nombreuses tentatives, aucune méthode de multiplication des NoVs humains *in vitro* fiable n'est disponible et il n'existe aucun modèle animal. Des rapports préliminaires décrivant leur culture à l'aide d'un système complexe de culture cellulaire en trois dimensions ou en association avec des bactéries n'ont pu être validés. La recherche sur les NoVs humains repose essentiellement sur des études avec des volontaires humains ou des modèles de substitution. Bien que l'utilisation de sujets humains soit clairement optimale pour certains domaines de recherche, elle a ses propres limites, y compris le temps consommé, les processus hautement réglementés associés à la recherche sur des sujets humains, l'histoire pré-exposition inconnue des volontaires, les procédures d'échantillonnage restrictives, le coût et les installations connexes. La seconde approche repose sur l'emploi d'autres membres de la famille des *Caliciviridae* multipliables en culture cellulaire comme le FCV, le MNV et plus récemment le TV, souche prototype du genre *Recovirus*. Cependant, la capacité des différents substituts pour représenter avec

précision les NoVs humains est souvent remise en question. Un modèle de substitution optimal devrait représenter les caractéristiques biologiques des NoVs humains et leur hôte et fournir les possibilités de réaliser à la fois des études *in vitro* et *in vivo*. Bien que, les Recovirus représentent un nouveau genre au sein des *Caliciviridae*, leur épidémiologie, caractéristiques biologiques, le spectre de la maladie et l'hôte naturel sont plus étroitement liés à ceux des NoVs humains que tous les autres virus de substitution. Ils ont le potentiel de fournir un outil précieux pour évaluer la persistance virale dans les huîtres.

L'une des idées novatrices de ce travail est l'utilisation des installations d'une ferme expérimentale permettant un meilleur contrôle de différents facteurs environnementaux, que les expérimentations au niveau du laboratoire ne permettent pas. Ainsi que la décontamination des eaux avant rejet dans l'environnement. Grâce à ces installations, la persistance des particules virales dans les huîtres, à grande échelle, a pu être étudiée. Les études réalisées ont permis de montrer que les huîtres creuses *Crassostrea gigas* pouvaient rester contaminées par la souche NV(GI.1) pendant deux mois en conditions naturelles, suggérant une séquestration des particules virales dans les tissus des coquillages par liaison spécifique à l'antigène A-like. Par contre la liaison à un ligand contenant de l'acide sialique contribuerait à l'élimination des virus, ou serait moins protecteur des particules virales. Il serait intéressant de poursuivre la caractérisation des ligands impliqués dans ces processus. Les travaux montrent également que le TV est un substitut adéquat pour étudier le comportement des NoVs au cours de la contamination des coquillages, car sa distribution tissulaire et la demi-vie dans les TD sont comparables à ceux du NV(GI.1) dans les huîtres. Bien que d'autres études soient nécessaires pour améliorer notre compréhension du comportement comparative des Recovirus et des NoVs humains, il est important de souligner que les études d'infectiosité peuvent être réalisées avec ces virus adaptés à la culture cellulaire.

Si l'huître creuse *Crassostrea gigas* constituent en France le principal coquillage consommé. Il est important de considérer les autres mollusques bivalves tels l'huître plate *Ostrea edulis*. De même, la modification de la physiologie de l'huître creuse par des manipulations génétiques comme le caractère triploïde, en prenant comme référence les données obtenues sur l'huître *Crassostrea gigas* diploïde, constitue un axe intéressant à développer. Les études réalisées sur la fixation des virus sur les tissus d'huîtres ont une nouvelle fois confirmé le potentiel des VLPs à se substituer au virus. L'étude de la

fixation virale et la caractérisation des ligands impliqués est indispensable pour mieux comprendre les mécanismes de contamination virale en termes d'efficacité, de cinétique de contamination et de distribution tissulaire. Afin d'acquérir de nouvelles données, ce travail devra être complété en associant une approche *in vitro* grâce aux tests immunohistochimiques et *in situ* avec des essais de bioaccumulation sur des huîtres vivantes. Ces diverses approches pourraient conduire à terme, à la sélection d'espèces ou de lignées de coquillages soit moins sensibles à la contamination par les NoVs humains, soit plus sensibles aux processus de purification. La caractérisation des ligands pourrait permettre d'optimiser les techniques de détection mais également d'élaborer de nouvelles techniques de purification des huîtres.

Le développement de la RT-PCR en temps réel pour la détection des NoVs humains constitue une réelle avancée technologique. Toutefois, il faut reconnaître que la méthodologie et l'état actuel des connaissances peut offrir des limites. Les méthodes moléculaires fournissent des informations sur la présence du matériel génétique viral dans des échantillons environnementaux mais ne différencient pas les signaux de RT-PCR provenant de particules virales intactes infectieuses, de particules virales intactes défectueuses et de particules dégradées comprenant des protéines de capsid et de l'ARN virale appelé complexes Ribo-nucléoprotéique (RNP). Ceci est principalement lié à l'amplification et la détection de petites séquences nucléotidiques (environ 100 base) provenant d'acide nucléique génomique viral beaucoup plus important (environ 7600 nt). En outre, certaines publications ont démontré que l'ARN associé à des virus inactivés reste détectable même après perte de l'infectiosité. Néanmoins il est important de considérer la fragilité de l'ARN, aisément dégradé par des enzymes dans le milieu extérieur lorsqu'il n'est plus protégé par la capsid virale.

Par conséquent, l'estimation du potentiel du risque infectieux associé aux NoVs humains à partir d'échantillons détecté positifs reste un challenge. A l'heure actuelle, il est impossible de répondre à cette question, puisqu'il n'existe pas de tests d'infectiosité *in vitro* pour les NoVs humains. Des tentatives ont été faites pour établir une relation entre le nombre de particules virales infectieuses et le nombre de copies du génome virale détectés par RT-PCR en utilisant une approche statistique ou différentes méthodologies. Cependant celles-ci ont été peu concluantes ou ne sont pas pratiques pour une utilisation standardisée en routine. D'autres approches basées sur la sélection des particules virales

infectieuses comme le traitement par des ARN^{ases} ou autres composants détruisant spécifiquement l'ARN libre avant lyse des capsides virales pourraient être mise en œuvre. Par ailleurs la sélection des capsides complète intactes par capture antigénique ou à l'aide de mucines porcines peuvent être envisagés.

L'estimation du risque infectieux doit tenir compte d'un certain nombre de paramètres comme le fait que le rapport particules virales infectieuses/non infectieuses détectées est susceptible de varier d'un échantillon à un autre en fonction de l'impact des conditions environnementales rencontrées avant et pendant la bioaccumulation par les coquillages. Par ailleurs, les traitements nécessaires à l'élimination des effets cytotoxiques d'une matrice aussi complexe que celle des coquillages, peuvent engendrer une sous-estimation de la charge en virus infectieux. De plus, un virus infectieux peut présenter divers niveaux de pathogénicité difficile à estimer selon la population, les conditions d'inoculation et la dose infectante. Il faut également souligner, qu'en plus de la charge en virus infectieux, d'autres facteurs peuvent intervenir dans le déclenchement d'une infection. En effet les personnes immunodéprimées, stressées et les enfants peuvent constituer une population à risque. Enfin, pour les NoVs humains, la sensibilité génétique a été démontrée comme étant un critère important dans la survenue de gastro-entérites. Ces études pourraient fournir de nouvelles données pour les autorités compétentes sur l'analyse des risques en santé publique et la prise de décision au cours de la contamination des coquillages, conduisant à l'amélioration de la qualité des coquillages mis sur le marché et ainsi protéger le consommateur.

La virologie de l'environnement a commencé, il y a environ un demi-siècle, avec la reconnaissance de l'eau comme origine de transmission de la poliomyélite. Cette discipline, relativement récente, s'est surtout développée grâce aux outils de biologie moléculaire. Mais de nombreuses questions persistent concernant l'interprétation et l'extrapolation des résultats en termes de potentiel infectieux. Une des options pour pallier à cet inconvénient réside dans l'utilisation de modèles de substitution. Le développement continu de nouveaux modèles de substitution est important pour surmonter les limitations des systèmes actuels et d'acquérir davantage de données sur le devenir des virus après rejet, et pour mimer plus efficacement leur devenir, non seulement en milieu marin, mais aussi dans diverses filières alimentaires, ce qui permettra un nouvel élan pour cette discipline. Même si la recherche sur les Recovirus n'est pas aussi avancée que celle des

autres systèmes de substitution, les données obtenues démontrent que ce groupe de virus reflète les caractéristiques biologiques et la diversité des NoVs humains plus que les autres substituts actuels. Nos travaux trouveront un impact direct dans la validation de divers procédés d'inactivation des particules virales (cuisson, haute pression, etc.).

Ces travaux sont valorisés par la rédaction d'une publication scientifique, mais aussi par des communications affichées à des congrès internationaux. L'impact de ces nouvelles données apporte un éclairage nouveau sur les travaux et projets à conduire pour améliorer la qualité des coquillages mis sur le marché et ainsi protéger le consommateur.

Publications-communications

Publication

Najoua Drouaz, Julien Schaeffer, Tibor Farkas, Jacques Le Pendu and Françoise S. Le Guyader.

"Tulane Virus as a Potential Surrogate To Mimic Norovirus Behavior in Oysters".

Applied and Environmental Microbiology (AEM). August 2015 Volume 81 Number 15
5249-56.

Communications affichées

N. Drouaz, C. Le Menec, T. Farkas, J. Le Pendu, F.S. Le Guyader.

"Tulane virus: a surrogate to study norovirus behavior in oyster? "

4th International conference on food and environmental virology, 2-5 September 2014
Corfu (Greece).

Le Guyader Soizick, **Drouaz Najoua**, Le Menec Cecile , Farkas Tibor , Le Pendu
Jacques.

" Tulane virus: a surrogate to study norovirus behavior in oyster ?".

10th International conference on molluscan shellfish safety, 15-20 March 2015, Puerto
Varas (Chile).

Tulane Virus as a Potential Surrogate To Mimic Norovirus Behavior in Oysters

Najoua Drouaz,^a Julien Schaeffer,^a Tibor Farkas,^b Jacques Le Pendu,^c Françoise S. Le Guyader^a

IFREMER, Laboratoire de Microbiologie, LSEM-SG2M, Nantes, France^a; Laboratory of Specialized Clinical Studies, Division of Infectious Diseases, Cincinnati Children's Hospital Medical Center, Cincinnati, Ohio, USA^b; INSERM, U892, CNRS, UMR6299, Université de Nantes, Nantes, France^c

Oyster contamination by noroviruses is an important health and economic problem. The present study aimed to compare the behaviors of Norwalk virus (the prototype genogroup I norovirus) and two culturable viruses: Tulane virus and mengovirus. After bioaccumulation, tissue distributions were quite similar for Norwalk virus and Tulane virus, with the majority of viral particles detected in digestive tissues, while mengovirus was detected in large amounts in the gills and mantle as well as in digestive tissues. The levels of persistence of all three viruses over 8 days were comparable, but clear differences were observed over longer periods, with Norwalk and Tulane viruses displaying rather similar half-lives, unlike mengovirus, which was cleared more rapidly. These results indicate that Tulane virus may be a good surrogate for studying norovirus behavior in oysters, and they confirm the prolonged persistence of Norwalk virus in oyster tissues.

Shellfish are filter feeders that can accumulate different types of pathogens from human fecal pollution and were identified as vectors for human enteric pathogen transmission more than a century ago. We have known for almost 40 years that bacteria and viruses show differences in terms of concentration and accumulation in and depuration from contaminated shellfish (1). Nowadays the problem of viral contamination has become dominant, and over the last 10 years about 40% of RASFF (Rapid Alert System for Food and Feed) notifications are related to the detection of norovirus (NoV) in oysters (2). Improvements in detection methods, increased epidemiological surveillance, and efforts by authorities to improve the quality of products put on the market have contributed to better recognition of viral contamination. These improvements have assisted in identifying that increases in human populations in coastal areas, as well as climate change, inducing heavy rainfall and associated sewage overflows, constitute risk factors for shellfish contamination (3, 4).

Among human enteric viruses, NoVs are recognized as the leading cause of epidemics and sporadic cases of gastroenteritis in all age groups of humans (5, 6). NoVs of human origin are excreted in large quantities by ill people, but they may also be present in asymptomatic, healthy individuals (7). As a consequence, they are discharged in large numbers into sewage, and due to their resistance to inactivation, they are frequently detected in wastewater treatment plant effluent and in surface waters (8–10). Sewage treatment which incorporates new technologies, such as membrane filtration, contributes to decreasing the numbers of microorganisms discharged into the coastal environment (11, 12), but this does not prevent accidental contamination. Depuration of shellfish, which was developed to eliminate bacteria, does not efficiently eliminate viruses that persist for several weeks or months in bivalve tissues (13, 14). As a consequence, in most cases of contamination, the only risk management option to prevent consumer infections is the closure of production areas, with viral testing of shellfish to evaluate the level and type of contamination.

NoVs are nonenveloped, single-stranded, positive-sense RNA viruses belonging to the *Caliciviridae* family. The short genome, which is organized into three open reading frames (ORFs), is highly variable (15). Importantly, NoVs were the first viruses for

which it was shown that there is genetic sensitivity to infection through the recognition of histo-blood group antigens (HBGAs) (16). HBGAs, which are complex glycans present on many cell types, are synthesized from a series of precursor structures by stepwise addition of monosaccharide units via a set of glycosyltransferases (17). Evidence accumulated from volunteer studies and from analysis of outbreaks indicates that binding to these carbohydrates is required for infection (18, 19). Moreover, various human NoV strains that bind to HBGAs present distinct specificities for HBGAs. As a result, most strains infect only a subset of the population, based on HBGA expression (20, 21).

Specific binding of NoVs to the oyster digestive tract through an A-like carbohydrate structure (which is indistinguishable from the human blood group A antigen) and other ligands has been described (22–24). It was also demonstrated that these ligands have an impact on bioaccumulation efficiency, and a seasonal effect was observed for some strains (25, 26). A field study confirmed the preferential selection of genogroup I (GI) NoVs over GII and GIII NoVs by Pacific oysters (27). These observations suggest that oysters have the ability to specifically accumulate and concentrate a human pathogen based on the presence of a shared ligand between the two species rather than through nonspecific interactions only (28). Since different NoV strains show different specificities for HBGAs in humans, all strains may not be captured equally well by oysters. We also hypothesize that such specific ligands have an impact on NoV persistence in oysters.

Tulane virus (TV) is the prototype strain of the genus *Recovirus*

Received 1 April 2015 Accepted 20 May 2015

Accepted manuscript posted online 29 May 2015

Citation Drouaz N, Schaeffer J, Farkas T, Le Pendu J, Le Guyader FS. 2015. Tulane virus as a potential surrogate to mimic norovirus behavior in oysters. *Appl Environ Microbiol* 81:5249–5256. doi:10.1128/AEM.01067-15.

Editor: K. E. Wommack

Address correspondence to Françoise S. Le Guyader, sleguyad@ifremer.fr.

Copyright © 2015, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/AEM.01067-15

(ReCV) within the *Caliciviridae* family. The ReCV genome is organized into three ORFs, like the genome of NoV, and also exhibits large genetic variability. Similar to the case for NoVs, the route of ReCV transmission is fecal-oral, and ReCVs are shed in large quantities in the stools of infected animals. Moreover, ReCVs also recognize HBGAs and can be grown to high titers in cultured cells, making them a valuable surrogate for the uncultivable human NoVs (29). Considering these features, in this study, we selected TV as a potential NoV surrogate and mengovirus (MgV) as a virus control to investigate NoV persistence in oysters. MgV, a member of the *Picornaviridae* family, is very stable in the environment, can be propagated in cell culture, and recognizes some sialic acids on red blood cells. This may contribute to the efficient bioaccumulation of MgV in oysters, which are rich in sialic acid (30–33).

The objectives of the present study were to evaluate the persistence of Norwalk virus (NV; the NoV GI prototype) in oysters and to compare it with those of two potential surrogates: TV and MgV.

MATERIALS AND METHODS

Viruses and cell culture. TV strain M033 was propagated in confluent monolayers of LLC-MK2 cells (ATCC CCL-7; ATCC, Manassas, VA) as previously described (34). MgV strain pMC0 (kindly provided by A. Bosch, University of Barcelona) was propagated in HeLa cells as previously described (30). When cytopathic effects (CPE) were complete, cultures were frozen and then thawed (-20°C) three times, and cell debris was removed by centrifugation at $1,000 \times g$ for 30 min. The supernatant, which contained viral particles, was stored at -80°C in aliquots.

Aliquots of a fecal sample containing the Norwalk virus 8FIIa strain (GI.1) were kept at -20°C .

Virus stability in seawater. One-milliliter samples of TV and MgV were diluted in 9 ml of seawater and kept at 12°C . One-milliliter samples were collected at 1 h, day 1, and day 8.

Oysters. Live oysters (*Crassostrea gigas*) were purchased directly from a producer. Environmental data were recorded, including water temperature and salinity. Upon arrival at the laboratory, oysters were immediately rinsed and transferred to large seawater aquariums equipped with constant aeration. After 24 h of immersion at the designated temperature, oysters were individually checked, and only live oysters showing filtration activity were included in the experiments. Before all bioaccumulation experiments, oysters were tested for preexisting GI and GII NoVs, MgV, and TV.

Biometry parameters, such as total weight and flesh weight, were recorded. In addition, for the virus persistence experiments, the dry weights of 30 individual oysters per aquarium (including the control aquarium) were measured on day 0, day 28, and day 56 (35).

Bioaccumulation experiments. Bioaccumulation of the three different viruses was evaluated in both small and large batches, in separate aquariums. Natural seawater, collected from a single clean area in which turbidity and ammonium, nitrate, phosphate, and chlorophyll A concentrations were measured (data not shown), was used for all bioaccumulation experiments.

Small-batch bioaccumulation experiments were conducted between January and April 2013, with the seawater temperature adjusted according to the season (8 to 10°C). Four aquariums were filled with 20 liters of seawater each, and 3 of them were seeded with the virus suspensions, at $7.2 \pm 0.5 \log_{10}$ RNA copies/aquarium for NV, $8.5 \pm 0.2 \log_{10}$ RNA copies/aquarium for TV, and $9.1 \pm 0.4 \log_{10}$ RNA copies/aquarium for MgV. The remaining aquarium was not seeded and served as a control. Forty-five oysters were added to each aquarium, including the control one, yielding a ratio of 5 liters of water/kg of oysters (including the shell weight) (35). Fifteen oysters were collected from each aquarium at 1 and 24 h postseeding and were immediately dissected and frozen. At 24 h postseeding, the remaining oysters were transferred to clean aquariums, in which the sea-

water was changed daily for 8 days. The experiments for all viruses were conducted at the same time and were repeated five times.

Large-batch bioaccumulation experiments were conducted separately for each of the three viruses, using 500 to 600 oysters that were contaminated under the same conditions as those described for the small batches. After 24 h of bioaccumulation, virus concentrations were checked by randomly selecting and testing six oysters; if the concentration was less than 5×10^4 RNA copies/g digestive tissue (DT), more virus was added to the seawater (the amount added was estimated based on the concentration detected in DT), and bioaccumulation was continued for an additional 12 h.

Persistence experiments. Following bioaccumulation, the oysters were rinsed and transported to an experimental farm located on the coast, with direct access to natural seawater and facilities to maintain oysters for prolonged periods. Oysters were placed in clean seawater in large tanks (500 liters) located in a temperature-controlled room ($11 \pm 1^{\circ}\text{C}$) and supplied with constantly circulating (200 liters/h/tank) aerated and filtered natural seawater. Oysters were fed the phytoplankton *Skeletonema costatum* (about 10^{12} cells/h/aquarium). Parameters such as temperature, salinity, and pH were routinely measured. Two control tanks, one with uncontaminated oysters and one without oysters, were included in all experiments.

Twenty to 30 oysters were collected for analysis weekly from each tank, for up to 8 weeks. During sampling, the tanks were cleaned and particles that had settled onto the bottom of the tanks were removed. Prior to release into the environment, seawater was treated according to the safety rules of the experimental farm (which included acidification, filtration, and UV treatment). These persistence experiments were repeated three times between 13 November 2013 and 4 April 2014.

Shellfish processing. Harvested oysters were shucked immediately after collection, and the oyster bodies were weighed. To avoid any delays or differences with subsequent assays, oysters were dissected at the same time for each virus treatment group, by different laboratory members. To determine viral distribution, the DT, gills, and mantle were collected from at least 10 oysters per assay. Corresponding tissues were pooled, finely chopped using a scalpel, and mixed before preparation of 1.5-g aliquots that were stored at -20°C . For the persistence studies, only DT were processed as described above.

Virus recovery. Samples of each tissue type were extracted together (e.g., all gills together), and all tissues were extracted in triplicate as described previously (25, 36). Briefly, MgV (2×10^6 RNA copies) was added as an extraction efficiency control to each dissected tissue (1.5 g) before homogenization, except to oysters contaminated with MgV. Tissues were homogenized, extracted with equal volumes of chloroform-butanol for 30 s, and subjected to Cat-Floc T (173 μl per tube; Calgon, Ellwood City, PA) flocculation before centrifugation for 15 min at $13,500 \times g$. The resulting supernatant was precipitated with polyethylene glycol 6000 (PEG 6000) (Sigma, St. Quentin, France) for 1 h at 4°C and centrifuged for 20 min at $11,000 \times g$ at 4°C as described previously (33).

NA extraction and purification. Nucleic acids (NAs) from oyster samples and viral inocula, including cell culture supernatant and 10% stool suspensions, were extracted using a NucliSens extraction kit and an automatic easyMAG extractor (bioMérieux, Lyon, France) according to the manufacturer's instructions, with minor modifications, as described previously (33). NAs were recovered in 100 μl of elution buffer (bioMérieux) and analyzed immediately or stored at -80°C .

Primers, probes, and rRT-PCR. For NoV and MgV, real-time reverse transcription-PCR (rRT-PCR) was conducted as previously described (37). Primers TVIFf (5'-CTGGGATACCCACAACATC-3') and TVIFr (5'-GCCAGTTAACAGCTTCAGC-3') and probe TVIFp (6-carboxyfluorescein [FAM]-TGTGTGTGCCACTGGATAGCTAGCACC-BHQ) were used to amplify the region from nucleotides 3775 to 3884 of the TV genome (GenBank accession number EU391643.1).

rRT-PCR was carried out by using an UltraSense One-Step quantitative RT-PCR system (Life Technologies, France) with 5 μl of extracted NA

per well (in a 25- μ l reaction mixture) as described previously (33). Amplifications were performed in an Mx3000P quantitative PCR (qPCR) system (Agilent Technologies, France). All samples were analyzed undiluted and after 10-fold dilution. Undiluted NA extracts were analyzed in triplicate.

rRT-PCR controls and quantification. Filter tips and dedicated rooms were used to prevent sample contamination. Two negative controls (sterile, RNase-free water) were included in each amplification series.

(i) Extraction efficiency. MgV was used to evaluate the extraction efficiency. The threshold cycle (C_T) value for the undiluted samples (seeded with 2×10^6 RNA copies of MgV) was compared to the C_T value for the positive control used in the extraction series and to a standard curve made by endpoint dilution. The difference in C_T values between the controls and samples (ΔC_T) was used to determine the extraction efficiency, using the formula $100e^{-0.6978\Delta C_T}$, and the extraction efficiency was expressed as a percentage for each tissue. Only samples with extraction efficiencies above 10% were considered for quantification. Given that the oysters used in each experiment were from the same initial batch, the extraction efficiencies obtained for NoV, TV, and the negative control were used to estimate the extraction efficiency of oysters contaminated with MgV.

(ii) Quantification. The absence of inhibitors of virus detection (for NV, TV, or MgV) was verified for each sample by comparing the C_T values for undiluted and 10-fold-diluted extracts, which were corrected for the dilution factor by using the standard curve coefficient. A difference of <1 C_T unit indicated the absence of significant inhibition, and all extracts were checked by using this control. In the virus persistence experiments, in which triplicate amplifications were performed, all C_T values were compared. If a variation of >1 C_T unit was observed, then the amplification was repeated. If the difference persisted (for concentrations close to the limit of quantification), this was considered in the quantification step. Otherwise, all three C_T values were averaged. After these verification steps, the number of RNA copies in each positive sample was estimated by comparing the C_T value for the sample to standard curves derived from plasmids containing nucleotides 146 to 6935 of Norwalk virus (GenBank accession no. M87661), nucleotides 3300 to 4299 of Tulane virus M33 (GenBank accession no. EU391643.1), or nucleotides 209 to 1061 of menogovirus isolate M (GenBank accession no. L22089).

(iii) Standard curve validation. After completion of all rRT-PCR runs, all standard curves for one virus were compared, and quality criteria were applied (38). Only standard curves with amplification efficiencies of 85 to 110% were kept. Average values were calculated for each point of the standard curves and were used to estimate the uncertainty of quantification for TV (0.21 log), NV (0.14 log), and MgV (0.14 log).

(iv) Quantification. The final concentration was then back calculated based on the volume of NA and expressed per gram of tissue. Triplicate extractions were calculated separately, and then the geometric mean concentration was calculated. rRT-PCR runs showing aberrant standard curves were checked to see if the C_T values for the samples were comparable to those for other extractions from the same series (as all tissues were extracted three times). If the C_T values were in the same range, the concentration was calculated based on the average standard curve values. If not, the run was repeated.

Data calculation and statistical analysis. The geometric mean titer (GMT) was calculated for each sample. For statistical analysis, the Mann-Whitney test was applied to assess the impact of feeding, and a nonlinear regression with a two-phase decay was used to calculate the half-life, using Prism 5 (GraphPad Software, Inc.).

RESULTS

Controls and bioaccumulation conditions. The stability of TV and MgV in the seawater that was used for bioaccumulation was verified in two separate experiments. Over 8 days, the variation observed was 0.78 ± 0.9 C_T unit for TV and 1.39 ± 0.54 C_T units

for MgV. The stability of NV was 0.43 ± 0.5 C_T unit, as determined in our previous study (26).

Subsamples of the same stool suspension for NV or cell culture supernatants for TV and MgV were frozen and used for the first five experiments. Because of the differences observed in the concentrations of the different viruses (up to 2 log), new subsamples were prepared for the three persistence experiments.

All experiments were performed during the colder months (December to the beginning of April), using adult oysters of commercial size. The allometric coefficient (body weight divided by DT weight) was 14 ± 1.79 for oysters used in the six experiments on tissue distribution and 15 ± 2.58 for the three experiments on persistence. For the three persistence experiments, because the oysters were fed plankton, oyster flesh weight was measured at the beginning of the experiment (day 1), on day 28 (week 4), and on day 56 (week 8). The body weight did not change for experiment 2 (4.9 ± 1.2 , 5.6 ± 1.3 , and 5.3 ± 1.5 g, respectively) or experiment 3 (4.5 ± 1 , 5.4 ± 1.2 , and 4.8 ± 1.2 g, respectively), but it changed for experiment 1 (6.3 ± 1.3 , 7.8 ± 1.7 , and 9.9 ± 2 , respectively). The body weight increase during the last 3 weeks was correlated with plankton feeding, which was accidentally increased for 10 days.

Tissue distribution. Five separate experiments were performed to compare NV, TV, and MgV concentrations in the DT, gills, and mantle following bioaccumulation periods of 1 and 24 h. The extraction efficiencies were acceptable and varied from 13 to 19% for DT, 55 to 67% for gills, and 51 to 61% for mantles. For comparison of the different viruses, the maximal theoretical bioaccumulation (MTB) was calculated for each virus, using the following assumptions: (i) 1 log of virus would be lost (by adsorption to aquarium walls, shell, etc.), as demonstrated using radioactive virus (39); (ii) 90% of the viruses would be concentrated in the DT, as observed during preliminary experiments and demonstrated for norovirus and hepatitis A virus (HAV) (40); and (iii) the level of bioaccumulation could be based on the weight of the DT recovered. For example, for NV, the dose seeded in the aquarium was 1.5×10^7 RNA copies, and 24 g of DT was recovered. Therefore, 1.5×10^6 RNA copies were available for uptake (assuming a 1-log loss), of which 90% were assumed to be present in the DT (1.35×10^6). Considering the weight of the DT recovered (24 g), this gave an MTB of 5.6×10^4 RNA copies/g of DT. The MTB was calculated for each virus and was found to be 1.2×10^6 RNA copies/g of DT for TV and 5×10^6 RNA copies/g of DT for MgV. These MTB values were useful for evaluating the efficiency of bioaccumulation in the DT for each virus (Table 1). However, as MgV is distributed equally in all tissues, the MTB for all tissues (MBT-AT) was calculated by considering the loss of 1 log of virus and then dividing this concentration by the total weight of the oyster tissues (oyster weight without shell).

For greater confidence in quantification, all tissues were extracted three times in independent extraction runs, and all NA extracts were amplified in duplicate; each data point represents a total of 7 to 10 oysters. Results presented are based on the geometric mean concentrations obtained for five separate experiments (each of which was quantified using three independent concentration values) (Table 1).

NV accumulated rapidly in the DT and in other tissues, such as the gills and mantle, and it reached a concentration of about 100 copies/g after 1 h. After a bioaccumulation period of 24 h, concentrations in the DT increased about 100 times, while they

TABLE 1 Tissue distributions of NV, TV, and MgV after 1 or 24 h of bioaccumulation^a

Virus	Time (h)	Gills		Mantle		DT		Bioaccumulation efficiency in DT	
		Mean extraction efficiency (%)	Geometric mean concn (copies/g)	Mean extraction efficiency (%)	Geometric mean concn (copies/g)	Mean extraction efficiency (%)	Geometric mean concn (copies/g)	MTB-DT (%)	MTB-AT (%)
NoV	1	63	187	51	191	14	537	1	13
	24	55	245	61	161	19	1.4 × 10 ⁴	25	350
TV	1	65	66	55	<QL	13	176	0.02	0.2
	24	67	280	46	181	13	3.0 × 10 ³	0.5	7
MgV	1		1.7 × 10 ³		810		2.5 × 10 ³	0.05	0.8
	24		2.1 × 10 ⁴		7.3 × 10 ³		9.2 × 10 ⁴	2	30

^a The mean extraction efficiencies represent the average values for three extractions each from five experiments (so 15 values). The geometric mean concentrations were calculated for five experiments, with each concentration determined on the basis of three separate extractions. The bioaccumulation efficiency in DT was calculated based on the assumptions of a 1-log loss of virus and that 90% of the contamination was in DT (MTB-DT) or equally distributed in all tissues (MTB-AT). QL, quantitation limit.

decreased or remained stable in the other tissues, confirming previous observations (26) (Table 1). Considering the MBT, the bioaccumulation efficiency was about 1% after 1 h and reached 25% after 24 h. With the assumption that NV is equally distributed in all tissues, the bioaccumulation efficiency reached 13% after 1 h and 350% after 24 h, confirming that NV is indeed more concentrated in DT.

TV displayed slightly lower concentrations than those of NV in all tissues after 1 h of bioaccumulation, but the results showed that TV accumulated preferentially in DT. After 24 h, TV concentrations increased in the three tissues, but to a larger extent in the DT (the geometric mean concentration in the DT was 10 times greater than the concentration detected in the gills). Nevertheless, the bioaccumulation efficiency was poor (0.5%), even after 24 h. If we considered that TV was equally distributed in all tissues, the bioaccumulation efficiency reached 7% (Table 1).

MgV was seeded at a higher concentration than those of the other two viruses, which explains the higher concentrations detected. However, the tissue distribution was clearly different from that for NV or TV. Concentrations were comparable in all three tissues analyzed after 1 h and increased in all tissues after 24 h. The bioaccumulation efficiency was in the same range as that observed for TV after 1 h and increased to 2% after 24 h. As MgV concentrations detected in the gills and mantle were in the same range as concentrations recorded in the DT, we calculated the bioaccumulation efficiency based on an equal distribution of MgV in all tissues. In this case, the bioaccumulation efficiency was less than 1% after 1 h and increased to 30% after 24 h.

Persistence over 8 days. The second step of this study was to

evaluate the persistence of these three viruses in the DT over 8 days. Two different approaches were undertaken: oysters were kept in filtered seawater (with very low nutrient levels) or in filtered seawater supplemented with phytoplankton. Experiments were repeated five times for trials in which no food was added and three times for those in which plankton was added. A statistical difference was found for TV, with a more rapid decline in the concentration in the DT when oysters were fed ($P = 0.035$) (Table 2). For both NV and MgV, the impact of feeding was not significant over 8 days ($P = 0.25$ and $P > 0.99$, respectively).

Persistence over 2 months. Oysters contaminated with 4.58 ± 0.42 log RNA copies/g DT for NV, 4.83 ± 0.23 for TV, and 5.18 ± 0.34 for MgV were relocated to a scientific farm to closely mimic normal commercial environmental conditions, albeit in a secure facility. Seawater entering the farm was filtered and was treated following experiments to prevent contamination of the environment through seawater release. An uncontaminated batch of oysters was added for each experiment and was analyzed every week. None of the viruses were detected in the control oysters. Because the seawater used was filtered, we added plankton at a concentration normally found in seawater to feed the oysters. Unfortunately, during the first experiment, overfeeding occurred and led to an increase in oyster weight. Nevertheless, this had no impact on virus concentrations, and the results were comparable to those of the other two experiments, even for TV, for which a statistical difference was associated with feeding over 8 days.

NV concentrations decreased slowly in the DT and reached the limit of quantification of the method by week 8 (1.85 ± 0.48 log RNA copies/g DT) (Fig. 1). TV concentrations decreased faster, with the limit of quantification being reached by week 5 ($1.78 \pm$

TABLE 2 Persistence of NV, TV, and MgV in oyster DT over 8 days^a

Virus	No feeding			Feeding		
	Mean extraction efficiency (%)	Geometric mean concn (copies/g)		Mean extraction efficiency (%)	Geometric mean concn (copies/g)	
		1 day	8 days		1 day	8 days
NV	16	1.4 ± 10^4	4.6 ± 10^3	40	5.9 ± 10^4	7.6 ± 10^3
TV	13	3.0 ± 10^3	1.2 ± 10^3	59	6.9 ± 10^4	1.1 ± 10^4
MgV		9.2 ± 10^4	3.3 ± 10^4		1.6 ± 10^5	5.9 ± 10^4

^a Concentrations expressed here are the geometric means for five experiments conducted under "no feeding" conditions and for three experiments conducted under "feeding" conditions. Extraction efficiencies are average values. No statistical difference was observed for NV ($P = 0.25$) and MgV ($P > 0.99$), but the difference was found to be statistically significantly different for TV ($P = 0.03$).

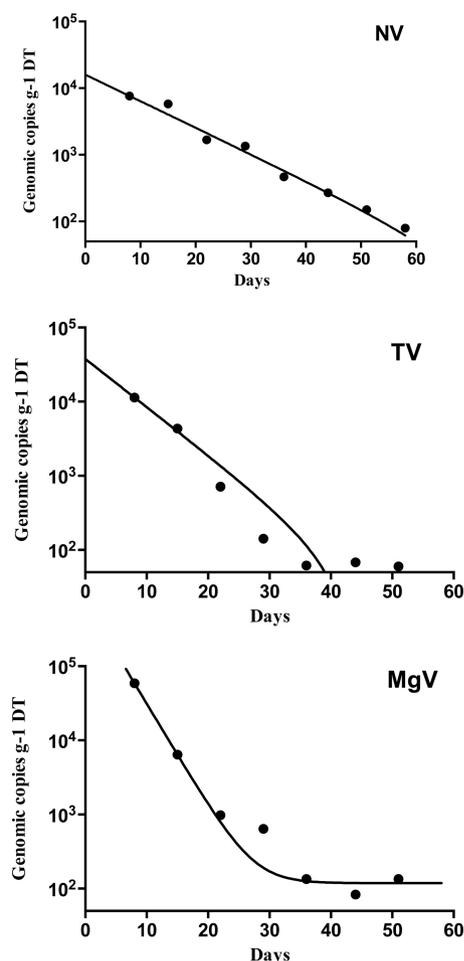


FIG 1 Decreases of NV, TV, and MgV concentrations in oyster DT over 8 weeks. NV, Norwalk virus (half-life, 7.56 days); TV, Tulane virus (half-life, 4.65 days); MgV, mengovirus (half-life, 2.17 days).

0.22 log RNA copies/g DT) (Fig. 1). MgV concentrations decreased quite rapidly and reached the limit of quantification by week 6 (1.90 ± 0.34 log RNA copies/g DT) (Fig. 1). The data allowed for calculations of half-lives, which were 7.56 days for NV, 4.65 days for TV, and 2.17 days for MgV.

DISCUSSION

Viral contamination of oysters is a challenging problem because classical indicators, such as *Escherichia coli* or fecal coliforms, are not satisfactory and depuration is not efficient. Human NoVs cannot be cultivated easily in cell culture systems (41, 42), but in recent years, our understanding of the prevalence and impact of NoV infections has greatly increased, with the advent of molecular diagnostics and by the use of some surrogate animal caliciviruses to improve the knowledge on basic virus biology (43). The combined use of molecular diagnostics and surrogate viruses is an approach that should also help to improve our understanding of NoV behavior, especially persistence, in shellfish.

One important point to consider when studying viral behavior in shellfish is the mode of contamination. For example, a virus that bioaccumulates in shellfish may be protected against heat by the surrounding tissue, in contrast to the same virus artificially seeded

into a shellfish homogenate (44–46). However, large amounts of viruses are needed for bioaccumulation studies. Obtaining sufficient amounts of material containing a particular NoV strain is a significant challenge due to the genetic variability of NoVs and because the viruses can be isolated only from human stools. The search for an appropriate surrogate to study NoV behavior has been intensive (47). Phages have been used in some studies as potential indicators of human enteric viruses in shellfish, and they were shown to persist longer than bacteria (48, 49). More recently, bioaccumulation of an F-specific RNA bacteriophage and NoV in mussels demonstrated that a high temperature is needed to reduce phage infectivity and the amount of NoV RNA present (46). Culturable enteric viruses, such as hepatitis A virus (HAV), have also been used to study the effect of cooking on virus infectivity in shellfish (45). HAV was also compared to poliovirus (PV) in depuration experiments with artificially contaminated oysters over 5 days, and both viruses were very stable in the oyster DT (50). Oysters that had bioaccumulated HAV, NoV, and PV displayed almost no decrease in HAV or NoV over 1 day of depuration; in contrast, >90% of the PV was eliminated (51). Animal caliciviruses, including feline calicivirus (FCV) and murine NoV (MNV), have been used widely as human NoV surrogates. FCV was used to evaluate the stability of NoV in marinated mussels and following thermal inactivation (52, 53). A study comparing the bioaccumulation levels of MNV, a bacteriophage, and HAV in two oyster species reported the superiority of MNV over the other two surrogates in mimicking human NoV behavior (54). MNV offered the possibility of studying NoV infectivity in an animal model and provided information on the potential infection risks in electron beam-irradiated oysters (55). Previous studies using a mouse model demonstrated the inactivation of MNV in contaminated oysters after high-pressure treatment, while NoV stayed infectious, suggesting that MNV might not have been a good model for NoV in this case (56, 57).

Considering the specificity issues associated with human NoV bioaccumulation, including HBGA binding, in this study we evaluated TV as a potential surrogate to mimic NoV persistence in oysters. MgV, a sialic acid-binding virus, was included in the study as a control. However, it is not permissible to place contaminated oysters into the open environment in France, even if the contamination is with animal viruses (TV infects monkeys not naturally present in France) or the avirulent strain of murine MgV (vMCo). To overcome this limitation, oysters were placed in an experimental farm where the quality of intake seawater was controlled and discharge was treated prior to release into the environment. The ability to control experimental conditions in the farm, including plankton feeding, enabled us to closely mimic conditions experienced by oysters in the natural environment. Despite the significant impact of feeding found for TV over 8 days, we chose to add phytoplankton because the seawater entering the farm was filtered. Starving was recently demonstrated to be efficient to eliminate viral particles through autophagy, but oysters have access to food under natural conditions (58). During the first experiment, accidental overfeeding occurred, but this did not affect the final virus concentrations. To avoid variations due to physiological differences between animals, all experiments were repeated over a short time and during the period of the year when the maximum contamination of oysters occurs in France and the HBGA-like ligand expression in oysters is the highest (25, 26).

Based on our experience in viral quantification, and following

steps to verify the efficiency of the extraction step, the concentrations expressed are based on triplicate extractions, with each extraction being analyzed in triplicate by rRT-PCR. We found this approach to be more accurate, as it minimized extraction and amplification variations (36). Based on quality criteria that were developed to validate standard curves for animal diseases, we validated or removed all standard curves that did not fit the criteria (38). For standard curves that were removed, the C_T values for replicate samples were compared to those for other extractions of the same sample, and eventually the rRT-PCR was repeated. This improved the quantitative aspects of the assays, as it allowed us to estimate the uncertainty of quantification, which was found to be higher for TV than for the other two viruses. This may suggest that the rRT-PCR assay needs to be optimized further for TV; however, the level of uncertainty was far lower than the difference observed in the tissue distributions of TV compared to NV and MgV, and also lower than the loss of TV observed in the persistence study.

The difference in ligand recognition may explain the variance observed in tissue distribution; for example, sialic acid residues are detected in all organs, including the gills, mantle, and DT, which is consistent with the poorly selective accumulation of MgV in these three tissues (59). In contrast, NV does not recognize sialic acid but binds to neutral carbohydrates of the HBGA type that are exclusively located in the DT, consistent with the selective bioaccumulation of NV in this organ. TV also recognizes neutral HBGAs and displayed a tissue distribution that was more closely aligned with that of NV than with that of MgV, although it did not bioaccumulate as efficiently as NV. Since there are significant differences in the tissue distribution and retention of different NoV strains in oysters (26), the availability of diverse, cell culture-adapted ReCVs representing different HBGA binding patterns makes this surrogate even more attractive for modeling NoV bioaccumulation in shellfish (29, 60). The TV bioaccumulation efficiency obtained here is more comparable to those obtained for GII NoVs in our previous study, where the bioaccumulation efficiency of a GII.3 NoV was 0.1 to 0.5% at 1 h and 0.9 to 4.1% at 24 h. Moreover, a GII.4 NoV strain (<0.1%) bioaccumulated very poorly in oysters over 24 h (26), consistent with the recent demonstration that TV recognizes the A type 3 and B HBGAs (61).

Previous studies investigating NoV persistence in oysters in the open environment are rare, and comparisons of data should be made with caution, as uncontrolled events may influence the outcome. After a sewage contamination event, we monitored the concentrations of GI and GII NoVs in the DT of oysters over 4 weeks, and the concentrations decreased from 8.2×10^3 RNA copies/g of DT to 4.2×10^3 RNA copies/g of DT (62). In a study combining relaying and depuration, naturally contaminated oysters at an initial concentration of around 2.9×10^3 RNA copies/g of DT displayed a decrease to 1.4×10^2 RNA copies/g of DT in 28 days (63). One study performed under laboratory conditions with artificial seawater reported the persistence of NoV, MNV, and HAV over a 1-month period (54). Our study, which was performed for a longer period, confirmed the persistence of NV, as concentration in the oyster DT decreased only 50% over an 8-day period.

In conclusion, this study demonstrated similar tissue distributions and half-lives of TV and NV in oysters, strongly indicating that TV is an adequate surrogate for studying NoV behavior during shellfish contamination. Although further studies are needed to improve our understanding of the comparative behavior of ReCVs and NoVs, it is important to emphasize that infectivity

studies can be undertaken with cell culture-adapted ReCVs. Such studies may provide useful information for risk analysis and decision-making by authorities during shellfish contamination, lead to improved public safety, and help to identify the mechanisms of NoV persistence in shellfish.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the French Government (DGAL; grant 2014-13/1210720/NF) and by grant 2010 CESA 01003 (HEVECoDyn) from the Agence Nationale pour la Recherche (ANR). N.D. was supported by a fellowship from IFREMER and the Conseil Régional des Pays de la Loire, France.

We are grateful to J. Haure (IFREMER SG2M) for helpful advice on shellfish physiology and to P.-J. Hatt, H. Palvado, and their colleagues (IFREMER SG2M Bouin) for taking care of oysters and for help in dissection. We thank Catherine McLeod (Seafood Safety Assessment) for a critical review of the manuscript.

REFERENCES

1. Metcalf TG, Mullin B, Eckerson D, Moulton E, Larkin EP. 1979. Bioaccumulation and depuration of enteroviruses by the soft-shelled clam, *Mya arenaria*. *Appl Environ Microbiol* 38:275–282.
2. EFSA. 2011. Scientific opinion on an update on the present knowledge on the occurrence and control of foodborne viruses. *EFSA J* 9:1–96.
3. Grodzki M, Ollivier J, Le Saux J-C, Piquet J-C, Noyer M, Le Guyader FS. 2012. Impact of Xynthia tempest on viral contamination of shellfish. *Appl Environ Microbiol* 78:3508–3511. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.07604-11>.
4. Johnson WE, Kimbrough KL, Lauenstein GH, Christensen J. 2009. Chemical contamination assessment of Gulf of Mexico oysters in response to hurricanes Katrina and Rita. *Environ Monit Assess* 150:211–225. <http://dx.doi.org/10.1007/s10661-008-0676-9>.
5. Vega E, Barclay L, Gregorius N, Shirley H, Lee D, Vinje J. 2014. Genotypic and epidemiologic trends of norovirus outbreaks in the United States, 2009–2013. *J Clin Microbiol* 52:147–155. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.02680-13>.
6. Ahmed S, Hall AJ, Robinson AE, Verhoef L, Premkumar P, Parashar UD, Koopmans M, Lopman BA. 2014. Global prevalence of norovirus in cases of gastroenteritis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 14:725–730. [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(14\)70767-4](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(14)70767-4).
7. Teunis PFM, Sukhrie FHA, Vennema H, Bogerman J, Beersma MFC, Koopmans MPG. 2015. Shedding of norovirus in symptomatic and asymptomatic infections. *Epidemiol Infect* 143:1710–1717. <http://dx.doi.org/10.1017/S095026881400274X>.
8. Campos JA, Lees DN. 2014. Environmental transmission of human noroviruses in shellfish waters. *Appl Environ Microbiol* 80:3552–3561. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.04188-13>.
9. Kitajima M, Iker BC, Pepper IL, Gerba CP. 2014. Relative abundance and treatment reduction of viruses during wastewater treatment processes—identification of potential viral indicators. *Sci Total Environ* 488–489: 290–296. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.04.087>.
10. Yang N, Qi H, Wong MML, Wu RSS, Kong RYC. 2012. Prevalence and diversity of norovirus genogroups I and II in Hong Kong marine waters and detection by real-time PCR. *Mar Pollut Bull* 64:164–168. <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.10.037>.
11. Sima LC, Schaeffer J, Le Saux J-C, Parnaudau S, Elimelech M, Le Guyader FS. 2011. Calicivirus removal in a membrane bioreactor wastewater treatment plant. *Appl Environ Microbiol* 77:5170–5177. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.00583-11>.
12. Simmons FJ, Kuo DHW, Xagorarakis I. 2011. Removal of human enteric viruses by a full-scale membrane bioreactor during municipal wastewater processing. *Water Res* 45:2739–2750. <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2011.02.001>.
13. Richards GP, McLeod C, Le Guyader FS. 2010. Processing strategies to inactivate enteric viruses in shellfish. *Food Environ Virol* 2:183–193. <http://dx.doi.org/10.1007/s12560-010-9045-2>.
14. Polo D, Alvarez C, Diez J, Darriba S, Longa A, Romalde JL. 2014. Viral elimination during commercial depuration of shellfish. *Food Control* 43: 206–212. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.03.022>.

15. Atmar RL. 2010. Noroviruses: state of the art. *Food Environ Virol* 2:117–126. <http://dx.doi.org/10.1007/s12560-010-9038-1>.
16. Tan M, Jiang X. 2005. Norovirus and its histo-blood group antigen receptors: an answer to a historical puzzle. *Trends Microbiol* 13:285–293. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2005.04.004>.
17. Ruvoën-Clouet N, Belliot G, Le Pendu J. 2013. Noroviruses and histo-blood groups: the impact of common host genetic polymorphisms on virus transmission and evolution. *Rev Med Virol* 23:355–366. <http://dx.doi.org/10.1002/rmv.1757>.
18. Le Pendu J, Nystrom K, Ruvoën-Clouet N. 2014. Host-pathogen co-evolution and glycan interactions. *Curr Opin Virol* 7:88–94. <http://dx.doi.org/10.1016/j.coviro.2014.06.001>.
19. Atmar RL, Opekum AR, Gilger MA, Estes MK, Crawford SE, Neill FH, Ramani S, Hill H, Ferreira J, Graham DY. 2014. Determination of the 50% human infectious dose for Norwalk virus. *J Infect Dis* 209:1016–1022. <http://dx.doi.org/10.1093/infdis/jit620>.
20. Tan M, Xia M, Chen Y, Bu W, Hegde R, Meller J, Li X, Jiang J. 2009. Conservation of carbohydrate binding interfaces—evidence of human HBGA selection in norovirus evolution. *PLoS One* 4:e5058. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0005058>.
21. Le Pendu J, Ruvoën-Clouet N, Kindberg E, Svensson L. 2006. Mendelian resistance to human norovirus infections. *Semin Immunol* 18:375–386. <http://dx.doi.org/10.1016/j.smim.2006.07.009>.
22. Le Guyader FS, Loisy F, Atmar RL, Hutson AM, Estes MK, Ruvoën-Clouet N, Pommepuy M, Le Pendu J. 2006. Norwalk virus specific binding to oyster digestive tissues. *Emerg Infect Dis* 12:931–936. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1206.051519>.
23. Tian P, Engelbrektson AL, Jiang X, Zhong W, Mandrell RE. 2007. 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.
24. Langlet J, Kaas L, Greening G. 2015. Binding-based RT-qPCR assay to assess binding patterns of noroviruses to shellfish. *Food Environ Virol* 7:88–95. <http://dx.doi.org/10.1007/s12560-015-9180-x>.
25. Maalouf H, Zakhour M, Le Pendu J, Le Saux J-C, Atmar RL, Le Guyader FS. 2010. Norovirus genogroup I and II ligands in oysters: tissue distribution and seasonal variations. *Appl Environ Microbiol* 76:5621–5630. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.00148-10>.
26. Maalouf H, Schaeffer J, Parnaudeau S, Le Pendu J, Atmar RL, Crawford SE, Le Guyader FS. 2011. Strain-dependent norovirus bioaccumulation in oysters. *Appl Environ Microbiol* 77:3189–3196. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.03010-10>.
27. Zakhour M, Maalouf H, Di Bartolo I, Haugarreau L, Le Guyader FS, Ruvoën-Clouet N, Le Saux J-C, Ruggeri FM, Pommepuy M, Le Pendu J. 2010. Bovine norovirus ligand, environmental contamination and potential cross-species transmission via oyster. *Appl Environ Microbiol* 76:6404–6411. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.00671-10>.
28. Le Guyader FS, Atmar RL, Le Pendu J. 2012. Transmission of viruses through shellfish: when specific ligands come into play. *Curr Opin Virol* 2:103–110. <http://dx.doi.org/10.1016/j.coviro.2011.10.029>.
29. Farkas T, Lun CWP, Ley B. 2014. Relationship between genotypes and serotypes of genogroup 1 noroviruses: a model for human norovirus antigenic diversity. *J Gen Virol* 95:1469–1478. <http://dx.doi.org/10.1099/vir.0.064675-0>.
30. Martin LR, Duke GM, Osorio JE, Hall DJ, Palmenberg AC. 1996. Mutational analysis of the mengovirus poly(C) tract and surrounding heteropolymeric sequences. *J Virol* 70:2027–2031.
31. Mann L, Anderson K, Luo M, Bond CW. 1992. Molecular and structural basis of hemagglutination in mengovirus. *Virology* 190:337–345. [http://dx.doi.org/10.1016/0042-6822\(92\)91220-O](http://dx.doi.org/10.1016/0042-6822(92)91220-O).
32. Shumway SE, Cucci TL, Newell RC, Yentsch CM. 1985. Particles selection, ingestion and absorption in filter feeding bivalves. *J Exp Mar Biol Ecol* 91:77–92. [http://dx.doi.org/10.1016/0022-0981\(85\)90222-9](http://dx.doi.org/10.1016/0022-0981(85)90222-9).
33. Le Guyader FS, Parnaudeau S, Schaeffer J, Bosch A, Loisy F, Pommepuy M, Atmar RL. 2009. Detection and quantification of noroviruses in shellfish. *Appl Environ Microbiol* 74:618–624. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.01507-08>.
34. 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. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.00070-08>.
35. Bougrier S, Geairon P, Deslous-Paoli JM, Bacher C, Jonquieres G. 1995. Allometric relationships and effects of temperature on clearance and oxygen consumption rates of *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquaculture* 134:143–154. [http://dx.doi.org/10.1016/0044-8486\(95\)00036-2](http://dx.doi.org/10.1016/0044-8486(95)00036-2).
36. Grodzki M, Schaeffer J, Piquet J-C, Le Saux J-C, Chevè J, Ollivier J, Le Pendu J, Le Guyader FS. 2014. Bioaccumulation efficiency, tissue distribution, and environmental occurrence of hepatitis E virus in bivalve shellfish from France. *Appl Environ Microbiol* 80:4269–4276. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.00978-14>.
37. ISO. 2012. ISO/TS 15216-1. Microbiology of food and animal feed—horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus in food using real-time RT-PCR. Part 1. Method for quantification. ISO, Geneva, Switzerland.
38. Afnor. 2011. Methode d'analyse en santé animale, PCR. Part 2. Exigences et recommandations pour le développement et la validation de la PCR en santé animale. XPU47-600-2. Afnor, La Plaine Saint-Denis, France.
39. Bedford AJ, Williams G, Bellamy AR. 1978. Virus accumulation by the rock oyster *Crassostrea glomerata*. *Appl Environ Microbiol* 35:1012–1018.
40. Atmar RL, Neill FH, Romalde JL, Le Guyader F, Woodley CM, Metcalf TG, Estes MK. 1995. Detection of Norwalk virus and hepatitis A virus in shellfish tissues with the PCR. *Appl Environ Microbiol* 61:3014–3018.
41. Jones M, Watanabe M, Zhu S, Graves CL, Keyes LR, Grau KR, Gonzales-Hernandez MB, Iovine NM, Wobus CE, Vinje J, Tibbetts SA, Wallet SM, Karst SM. 2014. Enteric bacteria promote human and mouse norovirus infection of B cells. *Science* 346:755–759. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1257147>.
42. Katayama K, Murakami K, Sharp TM, Guix S, Oka T, Takai-Tokada R, Nakanishi A, Crawford SE, Atmar RL, Estes MK. 2014. Plasmid-based human norovirus reverse genetics system produces reporter-tagged progeny virus containing infectious genomic RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:E4043–E4052. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1415096111>.
43. Karst SM, Zhu S, Goodfellow IG. 2015. The molecular pathology of noroviruses. *J Pathol* 235:206–216. <http://dx.doi.org/10.1002/path.4463>.
44. Alfano-Sobsey E, Sweat D, Hall A, Breedlove F, Rodriguez R, Pierce A, Sobsey M, Davies M, Ledford ASL. 2012. Norovirus outbreak associated with undercooked oysters and secondary household transmission. *Epidemiol Infect* 140:276–282. <http://dx.doi.org/10.1017/S0950268811000665>.
45. Croci L, De Medici D, Di Pasquale S, Toti L. 2005. Resistance of hepatitis A virus in mussels subjected to different domestic cooking. *Int J Food Microbiol* 105:139–144. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.04.008>.
46. Flannery J, Rajko-Nenow P, Winetrbourn JB, Malham SK, Jones DL. 2014. Effectiveness of cooking to reduce norovirus and infectious F-specific RNA bacteriophage concentrations in *Mytilus edulis*. *J Appl Microbiol* 117:564–571. <http://dx.doi.org/10.1111/jam.12534>.
47. Kniel K. 2014. The makings of a good human norovirus surrogate. *Curr Opin Virol* 4:85–90. <http://dx.doi.org/10.1016/j.coviro.2014.01.002>.
48. Dore W, Henshilwood K, Lees DN. 2000. Evaluation of F-specific RNA bacteriophage as a candidate human enteric virus indicator for bivalve molluscan shellfish. *Appl Environ Microbiol* 66:1280–1285. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.66.4.1280-1285.2000>.
49. Chung H, Jaykus LA, Lovelace G, Sobsey MD. 1998. Bacteriophages and bacteria as indicators of enteric viruses in oysters and their harvest waters. *Water Sci Technol* 38:37–44.
50. Love DC, Lovelace GL, Sobsey MD. 2010. Removal of *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, coliphage MS2, poliovirus, and hepatitis A virus from oysters (*Crassostrea virginica*) and hard shell clams (*Mercenaria mercenaria*) by depuration. *Appl Environ Microbiol* 143:211–217. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.08.028>.
51. McLeod C, Hay B, Grant C, Greening G, Day D. 2009. Inactivation and elimination of human enteric viruses by Pacific oysters. *J Appl Microbiol* 107:1809–1818. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04373.x>.
52. Hewitt J, Greening GE. 2004. Survival and persistence of norovirus, hepatitis A virus, and feline calicivirus in marinated mussels. *J Food Prot* 67:1743–1750.
53. Bozkurt H, Leiser S, Davidson PM, D'Souza D. 2014. Thermal inactivation kinetic modeling of human norovirus surrogates in blue mussel (*Mytilus edulis*) homogenate. *Int J Food Microbiol* 172:130–136. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.11.026>.
54. Nappier SP, Graczyk TK, Schwab KJ. 2008. Bioaccumulation, retention, and depuration of enteric viruses by *Crassostrea virginica* and *Crassostrea ariakensis* oysters. *Appl Environ Microbiol* 74:6825–6831. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.01000-08>.
55. Praveen C, Dancho BA, Kingsley DH, Calci KR, Meade GK, Mena KD, Pillai SD. 2013. Susceptibility of murine norovirus and hepatitis A virus to

- electron beam irradiation in oysters and quantifying the reduction in potential infection risks. *Appl Environ Microbiol* 79:3796–3801. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.00347-13>.
56. Gogal RM, Kerr R, Kingsley DH, Granata LA, LeRoith T, Holliman SD, Dancho BA, Flick GJ. 2011. High hydrostatic pressure processing of murine norovirus 1-contaminated oysters inhibits oral infection in STAT-1 deficient female mice. *J Food Prot* 74:209–214. <http://dx.doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-10-235>.
 57. Leon JS, Kingsley DH, Montes JS, Richards GP, Lyon GM, Abdulhafid GM, Seitz SR, Fernandez ML, Teunis PF, Flick GJ, Moe CL. 2011. Randomized, double-blinded clinical trial for human norovirus inactivation in oysters by high hydrostatic pressure processing. *Appl Environ Microbiol* 77:5476–5482. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.02801-10>.
 58. Moreau P, Moreau K, Segarra A, Tourbiez D, Travers M-A, Rubinsztein DC, Renault T. 2015. Autophagy plays an important role in protecting Pacific oysters from OsHV-1 and *Vibrio aestuarianus* infections. *Autophagy* 11:516–526. <http://dx.doi.org/10.1080/15548627.2015.1017188>.
 59. Maalouf H, Pommepuy M, Le Guyader FS. 2010. Environmental conditions leading to shellfish contamination and related outbreaks. *Food Environ Virol* 2:136–145. <http://dx.doi.org/10.1007/s12560-010-9043-4>.
 60. Tian P, Engelbrektson AL, Mandrell RE. 2008. Seasonal tracking of histo-blood group antigen expression and norovirus binding in oyster gastrointestinal cells. *J Food Prot* 71:1696–1700.
 61. Zhang D, Hunag P, Zou L, Lowary TL, Tan M, Jiang X. 2015. Tulane virus recognizes the A type 3 and B histo-blood group antigens. *J Virol* 89:1419–1427. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.02595-14>.
 62. Le Guyader FS, Le Saux J-C, Ambert-Balay K, Krol J, Serais O, Par-naudeau S, Giraudon H, Delmas G, Pommepuy M, Pothier P, Atmar RL. 2008. Aichi virus, norovirus, astrovirus, enterovirus and rotavirus involved in clinical cases from a French oyster-related gastroenteritis outbreak. *J Clin Microbiol* 46:4011–4017. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.01044-08>.
 63. Dore B, Keaveney S, Flannery J, Rajko-Nenow P. 2010. Management of health risks associated with oysters harvested from a norovirus contaminated area, Ireland, February-March 2010. *Euro Surveill* 15:pii/19567.

ERRATUM

Erratum for Drouaz et al., Tulane Virus as a Potential Surrogate To Mimic Norovirus Behavior in Oysters

Najoua Drouaz,^a Julien Schaeffer,^a Tibor Farkas,^b Jacques Le Pendu,^c Françoise S. Le Guyader^a

IFREMER, Laboratoire de Microbiologie, LSEM-SG2M, Nantes, France^a; Laboratory of Specialized Clinical Studies, Division of Infectious Diseases, Cincinnati Children's Hospital Medical Center, Cincinnati, Ohio, USA^b; INSERM, U892, CNRS, UMR6299, Université de Nantes, Nantes, France^c

Volume 81, no. 15, p. 5249–5256, 2015. Page 5252, Table 2: All plus-minus signs (\pm) should be replaced with multiplication signs (\times).

Citation Drouaz N, Schaeffer J, Farkas T, Le Pendu J, Le Guyader FS. 2015. Erratum for Drouaz et al., Tulane virus as a potential surrogate to mimic norovirus behavior in oysters. *Appl Environ Microbiol* 81:7348. doi:10.1128/AEM.02614-15.

Copyright © 2015, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.
doi:10.1128/AEM.02614-15

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

A

- Abad FX, P. R., Gajardo R and Bosch A, (1997). "Viruses in mussels: Public health implications and depuration." *J Food Prot* **60**(6): 677 - 81.
- Abrantes, J., D. Posada, P. Guillon, P. J. Esteves and J. Le Pendu (2009). "Widespread gene conversion of alpha-2-fucosyltransferase genes in mammals." *J Mol Evol* **69**(1): 22-31.
- Adler, J. L. and R. Zickl (1969). "Winter vomiting disease." *J Infect Dis* **119**(6): 668-73.
- Aladaileh, S., S. V. Nair, D. Birch and D. A. Raftos (2007). "Sydney rock oyster (*Saccostrea glomerata*) hemocytes: morphology and function." *J Invertebr Pathol* **96**(1): 48-63.
- Alfano-Sobsey, E., D. Sweat, A. Hall, F. Breedlove, R. Rodriguez, S. Greene, *et al.* (2012). "Norovirus outbreak associated with undercooked oysters and secondary household transmission." *Epidemiol Infect* **140**(2): 276-82.
- Allen, D. J., N. L. Adams, F. Aladin, J. P. Harris and D. W. Brown (2014). "Emergence of the GII-4 Norovirus Sydney2012 strain in England, winter 2012-2013." *PLoS One* **9**(2): e88978.
- Allen, D. J., R. Noad, D. Samuel, J. J. Gray, P. Roy and M. Iturriza-Gomara (2009). "Characterisation of a GII-4 norovirus variant-specific surface-exposed site involved in antibody binding." *Virology* **6**: 150.
- Ambert-Balay, K., F. Bon, F. Le Guyader, P. Pothier and E. Kohli (2005). "Characterization of new recombinant noroviruses." *J Clin Microbiol* **43**(10): 5179-86.
- Ambert-Balay, K. and P. Pothier (2013). "Evaluation of 4 immunochromatographic tests for rapid detection of norovirus in faecal samples." *J Clin Virol* **56**(3): 194-8.
- Aminev, A. G., S. P. Amineva and A. C. Palmenberg (2003). "Encephalomyocarditis virus (EMCV) proteins 2A and 3BCD localize to nuclei and inhibit cellular mRNA transcription but not rRNA transcription." *Virus Res* **95**(1-2): 59-73.
- Ang, L. H. (1998). "An outbreak of viral gastroenteritis associated with eating raw oysters." *Commun Dis Public Health* **1**(1): 38-40.
- Aoki, Y., K. Suto A Fau - Mizuta, T. Mizuta K Fau - Ahiko, K. Ahiko T Fau - Osaka, Y. Osaka K Fau - Matsuzaki and Y. Matsuzaki "Duration of norovirus excretion and the longitudinal course of viral load in norovirus-infected elderly patients." (1532-2939 (Electronic)).
- Appleton, H. and M. S. Pereira (1977). "A possible virus aetiology in outbreaks of food-poisoning from cockles." *Lancet* **1**(8015): 780-1.
- Atmar, R. L., D. I. Bernstein, C. D. Harro, M. S. Al-Ibrahim, W. H. Chen, J. Ferreira, *et al.* (2011). "Norovirus vaccine against experimental human Norwalk Virus illness." *N Engl J Med* **365**(23): 2178-87.
- Atmar, R. L., T. G. Metcalf, F. H. Neill and M. K. Estes (1993). "Detection of enteric viruses in oysters by using the polymerase chain reaction." *Appl Environ Microbiol* **59**(2): 631-5.
- Atmar, R. L., F. H. Neill, J. L. Romalde, F. Le Guyader, C. M. Woodley, T. G. Metcalf, *et al.* (1995). "Detection of Norwalk virus and hepatitis A virus in shellfish tissues with the PCR." *Appl Environ Microbiol* **61**(8): 3014-8.
- Atmar, R. L., A. R. Opekun, M. A. Gilger, M. K. Estes, S. E. Crawford, F. H. Neill, *et al.* (2008). "Norwalk virus shedding after experimental human infection." *Emerg Infect Dis* **14**(10): 1553-7.
- Ausar, S. F., T. R. Foubert, M. H. Hudson, T. S. Vedvick and C. R. Middaugh (2006). "Conformational stability and disassembly of Norwalk virus-like particles. Effect of pH and temperature." *J Biol Chem* **281**(28): 19478-88.

B

- Baert, L., C. E. Wobus, E. Van Coillie, L. B. Thackray, J. Debevere and M. Uyttendaele (2008). "Detection of murine norovirus 1 by using plaque assay, transfection assay, and real-time reverse transcription-PCR before and after heat exposure." Appl Environ Microbiol **74**(2): 543-6.
- Bailey, D., I. Karakasiliotis, S. Vashist, L. M. Chung, J. Rees, N. McFadden, *et al.* (2010). "Functional analysis of RNA structures present at the 3' extremity of the murine norovirus genome: the variable polypyrimidine tract plays a role in viral virulence." J Virol **84**(6): 2859-70.
- Bailey, D., L. B. Thackray and I. G. Goodfellow (2008). "A single amino acid substitution in the murine norovirus capsid protein is sufficient for attenuation in vivo." J Virol **82**(15): 7725-8.
- Bailey, M. S., C. J. Boos, G. Vautier, A. D. Green, H. Appleton, C. I. Gallimore, *et al.* (2005). "Gastroenteritis outbreak in British troops, Iraq." Emerg Infect Dis **11**(10): 1625-8.
- Ball J.M., Graham D.Y., Opekun A.R., Gilger M.A., Guerrero R.A. and E. M.K. (1999). "Recombinant Norwalk virus-like particles given orally to volunteers: phase 1 study." Gastroenterology **117**: 40-8.
- Balny, C. and P. Masson (1993). "EFFECTS OF HIGH-PRESSURE ON PROTEINS." Food Reviews International **9**(4): 611-28.
- Baric, R. S., B. Yount, L. Lindesmith, P. R. Harrington, S. R. Greene, F. C. Tseng, *et al.* (2002). "Expression and self-assembly of norwalk virus capsid protein from venezuelan equine encephalitis virus replicons." J Virol **76**(6): 3023-30.
- Battifora, H. (1986). "The multitumor (sausage) tissue block: novel method for immunohistochemical antibody testing." Lab Invest **55**(2): 244-8.
- Bedford, A. J., G. Williams and A. R. Bellamy (1978). "Virus accumulation by the rock oyster *Crassostrea glomerata*." Appl Environ Microbiol **35**(6): 1012-8.
- Belliot, G., A. Lavaux, D. Souihel, D. Agnello and P. Pothier (2008a). "Use of murine norovirus as a surrogate to evaluate resistance of human norovirus to disinfectants." Appl Environ Microbiol **74**(10): 3315-8.
- Belliot, G., S. V. Sosnovtsev, K. O. Chang, V. Babu, U. Uche, J. J. Arnold, *et al.* (2005). "Norovirus proteinase-polymerase and polymerase are both active forms of RNA-dependent RNA polymerase." J Virol **79**(4): 2393-403.
- Belliot, G., S. V. Sosnovtsev, K. O. Chang, P. McPhie and K. Y. Green (2008b). "Nucleotidylation of the VPg protein of a human norovirus by its proteinase-polymerase precursor protein." Virology **374**(1): 33-49.
- Belliot, G., S. V. Sosnovtsev, T. Mitra, C. Hammer, M. Garfield and K. Y. Green (2003). "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**(20): 10957-74.
- Berg, D. E., M. A. Kohn, T. A. Farley and L. M. McFarland (2000). "Multi-state outbreaks of acute gastroenteritis traced to fecal-contaminated oysters harvested in Louisiana." J Infect Dis **181 Suppl 2**: S381-6.
- Beuret C., B. A., Schlupe J. (2003). "Virus-contaminated oysters: a three-month monitoring of oysters imported to Switzerland." Appl. Environ. Microbiol. **69**: 2292-7.
- Bidawid, S., N. Malik, O. Adegbunrin, S. A. Sattar and J. M. Farber (2003). "A feline kidney cell line-based plaque assay for feline calicivirus, a surrogate for Norwalk virus." J Virol Methods **107**(2): 163-7.

- Blazevic, V., S. Lappalainen, K. Nurminen, L. Huhti and T. Vesikari (2011). "Norovirus VLPs and rotavirus VP6 protein as combined vaccine for childhood gastroenteritis." Vaccine **29**(45): 8126-33.
- Blumenfeld, O. O. and S. K. Patnaik (2004). "Allelic genes of blood group antigens: a source of human mutations and cSNPs documented in the Blood Group Antigen Gene Mutation Database." Hum Mutat **23**(1): 8-16.
- Bok, K., E. J. Abente, M. Realpe-Quintero, T. Mitra, S. V. Sosnovtsev, A. Z. Kapikian, *et al.* (2009). "Evolutionary dynamics of GII.4 noroviruses over a 34-year period." J Virol **83**(22): 11890-901.
- Bok, K., V. J. Cavanaugh, D. O. Matson, L. Gonzalez-Molleda, K. O. Chang, C. Zintz, *et al.* (2008). "Inhibition of norovirus replication by morpholino oligomers targeting the 5'-end of the genome." Virology **380**(2): 328-37.
- Bok, K. and K. Y. Green (2012). "Norovirus gastroenteritis in immunocompromised patients." N Engl J Med **367**(22): 2126-32.
- Bok, K., G. I. Parra, T. Mitra, E. Abente, C. K. Shaver, D. Boon, *et al.* (2011). "Chimpanzees as an animal model for human norovirus infection and vaccine development." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(1): 325-30.
- Bon F., F. a. P., Dauvergne M., Tenenbaum D., Planson H., Petion A.M., Pothier P., Kohli E. (1999). "Prevalence of group A rotavirus, human calicivirus, astrovirus and adenovirus type 40 and 41 infections among children with acute gastroenteritis in Dijon, France." J. Clin. Microbiol. **37**(9): 3055-8.
- Boon, D., J. E. Mahar, E. J. Abente, C. D. Kirkwood, R. H. Purcell, A. Z. Kapikian, *et al.* (2011). "Comparative evolution of GII.3 and GII.4 norovirus over a 31-year period." J Virol **85**(17): 8656-66.
- Borchardt, M. A., K. R. Bradbury, E. C. Alexander, Jr., R. J. Kolberg, S. C. Alexander, J. R. Archer, *et al.* (2011). "Norovirus outbreak caused by a new septic system in a dolomite aquifer." Ground Water **49**(1): 85-97.
- Borchardt, M. A., N. L. Haas and R. J. Hunt (2004). "Vulnerability of drinking-water wells in La Crosse, Wisconsin, to enteric-virus contamination from surface water contributions." Appl Environ Microbiol **70**(10): 5937-46.
- Bougrier, S., P. Geairon, J. M. Deslous-Paoli, C. Bacher and G. Jonquière (1995). "Allometric relationships and effects of temperature on clearance and oxygen consumption rates of *Crassostrea gigas* (Thunberg)." Aquaculture **134**(1-2): 143-54.
- Boxman, I. L. A., Tilburg, J.J.H.C., Te Loeke N.A.J.M., Vennema, H., Jonker, K, de Boer, E., Koopmans, M. (2006). "Detection of noroviruses in shellfish in the Netherlands." J. Food Microbiology **108**(391-396).
- Bozkurt, H., S. Leiser, P. M. Davidson and D. H. D'Souza (2014). "Thermal inactivation kinetic modeling of human norovirus surrogates in blue mussel (*Mytilus edulis*) homogenate." Int J Food Microbiol **172**: 130-6.
- Brown, K. E., S. M. Anderson and N. S. Young (1993). "Erythrocyte P antigen: cellular receptor for B19 parvovirus." Science **262**(5130): 114-7.
- Bu, W., A. Mamedova, M. Tan, M. Xia, X. Jiang and R. S. Hegde (2008). "Structural basis for the receptor binding specificity of Norwalk virus." J Virol **82**(11): 5340-7.
- Buesa J., C. B., Lopez-Andujar P., R. Abu-Mallouh, J. Rodriguez Diaz, Garcia-Diaz A., J. Prat, S. Guix, T. Llovet, G. Prats, A. Bosch. (2002). "Molecular epidemiology of caliciviruses causing outbreaks and sporadic cases of acute gastroenteritis in Spain." J. Clin. Microbiol. **40**: 2854-9.

- Bull, R. A., J. S. Eden, W. D. Rawlinson and P. A. White (2010). "Rapid evolution of pandemic noroviruses of the GII.4 lineage." *PLoS Pathog* **6**(3): e1000831.
- Bull, R. A., G. S. Hansman, L. E. Clancy, M. M. Tanaka, W. D. Rawlinson and P. A. White (2005). "Norovirus recombination in ORF1/ORF2 overlap." *Emerg Infect Dis* **11**(7): 1079-85.
- Bull, R. A., M. M. Tanaka and P. A. White (2007). "Norovirus recombination." *J Gen Virol* **88**(Pt 12): 3347-59.
- Bull, R. A., E. T. Tu, C. J. McIver, W. D. Rawlinson and P. A. White (2006). "Emergence of a new norovirus genotype II.4 variant associated with global outbreaks of gastroenteritis." *J Clin Microbiol* **44**(2): 327-33.
- Burkhardt, W., 3rd and K. R. Calci (2000). "Selective accumulation may account for shellfish-associated viral illness." *Appl Environ Microbiol* **66**(4): 1375-8.
- Burness, A. T. and I. U. Pardoe (1983). "A sialoglycopeptide from human erythrocytes with receptor-like properties for encephalomyocarditis and influenza viruses." *J Gen Virol* **64**(Pt 5): 1137-48.
- Butot, S., T. Putallaz, R. Amoroso and G. Sanchez (2009). "Inactivation of enteric viruses in minimally processed berries and herbs." *Appl Environ Microbiol* **75**(12): 4155-61.
- Butt A.A., A. K. E., Sanders C.V. (2004). "Infections related to the ingestion of seafood. Part I: viral and bacterial infections." *The lancet Inf. Dis.* **4**: 201-12.

C

- Caballero S., A. F. X., Loisy F., Le Guyader F.S., Cohen J., Pinto R.M., Bosch A. (2004). "Rotavirus virus-like particles as surrogates in environmental persistence and inactivation studies." *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 3904-9.
- Cailleau-Thomas, A., P. Coullin, J. J. Candelier, L. Balanzino, B. Mennesson, R. Oriol, *et al.* (2000). "FUT4 and FUT9 genes are expressed early in human embryogenesis." *Glycobiology* **10**(8): 789-802.
- Campos, C. J., J. Avant, J. Lowther, D. Till and D. N. Lees (2013). "Levels of Norovirus and E. coli in Untreated, Biologically Treated and UV-Disinfected Sewage Effluent Discharged to a Shellfish Water." *Journal of Water Resource and Protection* **Vol.5**: 978-82
- Campos, C. J. and D. N. Lees (2014). "Environmental transmission of human noroviruses in shellfish waters." *Appl Environ Microbiol* **80**(12): 3552-61.
- Cannon, J. L., L. C. Lindesmith, E. F. Donaldson, L. Saxe, R. S. Baric and J. Vinje (2009). "Herd immunity to GII.4 noroviruses is supported by outbreak patient sera." *J Virol* **83**(11): 5363-74.
- Cannon, J. L., E. Papafragkou, G. W. Park, J. Osborne, L. A. Jaykus and J. Vinje (2006). "Surrogates for the study of norovirus stability and inactivation in the environment: aA comparison of murine norovirus and feline calicivirus." *J Food Prot* **69**(11): 2761-5.
- Cao, S., Z. Lou, M. Tan, Y. Chen, Y. Liu, Z. Zhang, *et al.* (2007). "Structural basis for the recognition of blood group trisaccharides by norovirus." *J Virol* **81**(11): 5949-57.
- Carlsson, B., E. Kindberg, J. Buesa, G. E. Rydell, M. F. Lidon, R. Montava, *et al.* (2009). "The G428A nonsense mutation in FUT2 provides strong but not absolute protection against symptomatic GII.4 Norovirus infection." *PLoS One* **4**(5): e5593.
- Chakravarty, S., A. M. Hutson, M. K. Estes and B. V. Prasad (2005). "Evolutionary trace residues in noroviruses: importance in receptor binding, antigenicity, virion assembly, and strain diversity." *J Virol* **79**(1): 554-68.

- Chalmers, J. W. and J. H. McMillan (1995). "An outbreak of viral gastroenteritis associated with adequately prepared oysters." Epidemiol Infect **115**(1): 163-7.
- Chang, K. O. and D. W. George (2007). "Interferons and ribavirin effectively inhibit Norwalk virus replication in replicon-bearing cells." J Virol **81**(22): 12111-8.
- Chang, K. O., S. V. Sosnovtsev, G. Belliot, A. D. King and K. Y. Green (2006). "Stable expression of a Norwalk virus RNA replicon in a human hepatoma cell line." Virology **353**(2): 463-73.
- Cheetham, S., M. Souza, T. Meulia, S. Grimes, M. G. Han and L. J. Saif (2006). "Pathogenesis of a genogroup II human norovirus in gnotobiotic pigs." J Virol **80**(21): 10372-81.
- Cehade, H., E. Girardin, V. Delich, M. A. Pascual, J. P. Venetz and F. Cachat (2012). "Acute norovirus-induced agranulocytosis in a pediatric kidney transplant recipient." Transpl Infect Dis **14**(4): E27-9.
- Chen, R., J. D. Neill, M. K. Estes and B. V. Prasad (2006). "X-ray structure of a native calicivirus: structural insights into antigenic diversity and host specificity." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(21): 8048-53.
- Chen, R., J. D. Neill, J. S. Noel, A. M. Hutson, R. I. Glass, M. K. Estes, *et al.* (2004). "Inter- and intragenus structural variations in caliciviruses and their functional implications." J Virol **78**(12): 6469-79.
- Chen, Y., M. Tan, M. Xia, N. Hao, X. C. Zhang, P. Huang, *et al.* (2011). "Crystallography of a Lewis-Binding Norovirus, Elucidation of Strain-Specificity to the Polymorphic Human Histo-Blood Group Antigens." PLoS Pathog **7**(7).
- Chironna, M., C. Germinario, D. De Medici, A. Fiore, S. Di Pasquale, M. Quarto, *et al.* (2002). "Detection of hepatitis A virus in mussels from different sources marketed in Puglia region (South Italy)." Int J Food Microbiol **75**(1-2): 11-8.
- Choi, J. M., A. M. Hutson, M. K. Estes and B. V. Prasad (2008). "Atomic resolution structural characterization of recognition of histo-blood group antigens by Norwalk virus." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(27): 9175-80.
- Christensen B.F., Lees D., Henshilwood K., Bjergskov T. and G. J. (1998). "Human enteric viruses in oysters causing a large outbreak of human food borne infection in 1996/97." J. Shellf. Res. **17**(5): 1633-5.
- Chung, H., L. A. Jaykus and M. D. Sobsey (1996). "Detection of human enteric viruses in oysters by in vivo and in vitro amplification of nucleic acids." Appl Environ Microbiol **62**(10): 3772-8.
- Clarke, I. N. and P. R. Lambden (2000). "Organization and expression of calicivirus genes." J Infect Dis **181 Suppl 2**: S309-16.
- Clausen, H. and S. Hakomori (1989). "ABH and related histo-blood group antigens; immunochemical differences in carrier isotypes and their distribution." Vox Sang **56**(1): 1-20.
- Cole, D., S. C. Long and M. D. Sobsey (2003). "Evaluation of F+ RNA and DNA coliphages as source-specific indicators of fecal contamination in surface waters." Appl Environ Microbiol **69**(11): 6507-14.
- Costafreda, M. I., A. Bosch and R. M. Pinto (2006). "Development, evaluation, and standardization of a real-time TaqMan reverse transcription-PCR assay for quantification of hepatitis A virus in clinical and shellfish samples." Appl Environ Microbiol **72**(6): 3846-55.

- Costantini, V., L. Grenz, A. Fritzingler, D. Lewis, C. Biggs, A. Hale, *et al.* (2010). "Diagnostic accuracy and analytical sensitivity of IDEIA Norovirus assay for routine screening of human norovirus." *J Clin Microbiol* **48**(8): 2770-8.
- Croci, L., D. De Medici, S. Di Pasquale and L. Toti (2005). "Resistance of hepatitis A virus in mussels subjected to different domestic cookings." *Int J Food Microbiol* **105**(2): 139-44.
- Croci, L., M. N. Losio, E. Suffredini, E. Pavoni, S. Di Pasquale, F. Fallacara, *et al.* (2007). "Assessment of human enteric viruses in shellfish from the northern Adriatic sea." *Int J Food Microbiol* **114**(2): 252-7.
- Croci L., De Medici D., Scalfaro C., Fiore A., Divizia M., Donia D., *et al.* (2000). "Determination of enteroviruses, hepatitis A virus, bacteriophages and *Escherichia coli* in adriatic sea mussels." *J. Appl. Microbiol.* **88**: 293-8.
- Cromeans, T., G. W. Park, V. Costantini, D. Lee, Q. Wang, T. Farkas, *et al.* (2014). "Comprehensive Comparison of Cultivable Norovirus Surrogates in Response to Different Inactivation and Disinfection Treatments." *Appl Environ Microbiol.*
- D**
- da Silva, A. K., O. V. Kavanagh, M. K. Estes and M. Elimelech (2011). "Adsorption and aggregation properties of norovirus GI and GII virus-like particles demonstrate differing responses to solution chemistry." *Environ Sci Technol* **45**(2): 520-6.
- da Silva, A. K., J. C. Le Saux, S. Parnaudeau, M. Pommepuy, M. Elimelech and F. S. Le Guyader (2007). "Evaluation of removal of noroviruses during wastewater treatment, using real-time reverse transcription-PCR: different behaviors of genogroups I and II." *Appl Environ Microbiol* **73**(24): 7891-7.
- Dancho, B. A., H. Chen and D. H. Kingsley (2012). "Discrimination between infectious and non-infectious human norovirus using porcine gastric mucin." *Int J Food Microbiol* **155**(3): 222-6.
- Daughenbaugh, K. F., C. S. Fraser, J. W. Hershey and M. E. Hardy (2003). "The genome-linked protein VPg of the Norwalk virus binds eIF3, suggesting its role in translation initiation complex recruitment." *EMBO J* **22**(11): 2852-9.
- De Roda Husman, A. M., P. Bijkerk, W. Lodder, H. Van Den Berg, W. Pribil, A. Cabaj, *et al.* (2004). "Calicivirus inactivation by nonionizing (253.7-nanometer-wavelength [UV]) and ionizing (gamma) radiation." *Appl Environ Microbiol* **70**(9): 5089-93.
- de Roda Husman, A. M., F. Lodder-Verschoor, H. H. van den Berg, F. S. Le Guyader, H. van Pelt, W. H. van der Poel, *et al.* (2007). "Rapid virus detection procedure for molecular tracing of shellfish associated with disease outbreaks." *J Food Prot* **70**(4): 967-74.
- de Rougemont, A., N. Ruvoen-Clouet, B. Simon, M. Estienney, C. Elie-Caille, S. Aho, *et al.* (2011). "Qualitative and quantitative analysis of the binding of GII.4 norovirus variants onto human blood group antigens." *J Virol* **85**(9): 4057-70.
- Debbink, K., L. C. Lindesmith and R. S. Baric (2014). "The state of norovirus vaccines." *Clin Infect Dis* **58**(12): 1746-52.
- Debbink, K., L. C. Lindesmith, E. F. Donaldson and R. S. Baric (2012). "Norovirus immunity and the great escape." *PLoS Pathog* **8**(10): e1002921.
- Debbink, K., L. C. Lindesmith, E. F. Donaldson, V. Costantini, M. Beltramello, D. Corti, *et al.* (2013). "Emergence of new pandemic GII.4 Sydney norovirus strain correlates with escape from herd immunity." *J Infect Dis* **208**(11): 1877-87.
- DePaola, A., J. L. Jones, J. Woods, W. Burkhardt, 3rd, K. R. Calci, J. A. Krantz, *et al.* (2010). "Bacterial and viral pathogens in live oysters: 2007 United States market survey." *Appl Environ Microbiol* **76**(9): 2754-68.

- Desai, R., C. D. Hembree, A. Handel, J. E. Matthews, B. W. Dickey, S. McDonald, *et al.* (2012). "Severe outcomes are associated with genogroup 2 genotype 4 norovirus outbreaks: a systematic literature review." Clin Infect Dis **55**(2): 189-93.
- Dethlefs, S., N. Escriou, M. Brahic, S. van der Werf and E. L. Larsson-Sciard (1997). "Theiler's virus and Mengo virus induce cross-reactive cytotoxic T lymphocytes restricted to the same immunodominant VP2 epitope in C57BL/6 mice." J Virol **71**(7): 5361-5.
- Dick, G. W., A. M. Best and *et al.* (1948). "Mengo encephalomyelitis; a hitherto unknown virus affecting man." Lancet **2**(6521): 286-9.
- DiGirolamo, R., J. Liston and J. R. Matches (1970). "Survival of virus in chilled, frozen, and processed oysters." Appl Microbiol **20**(1): 58-63.
- Dingle, K. E., P. R. Lambden, E. O. Caul and I. N. Clarke (1995). "Human enteric Caliciviridae: the complete genome sequence and expression of virus-like particles from a genetic group II small round structured virus." J Gen Virol **76** (Pt 9): 2349-55.
- Dolin, R., N. R. Blacklow, H. DuPont, R. F. Buscho, R. G. Wyatt, J. A. Kasel, *et al.* (1972). "Biological properties of Norwalk agent of acute infectious nonbacterial gastroenteritis." Proc Soc Exp Biol Med **140**(2): 578-83.
- Donaldson, E. F., L. C. Lindesmith, A. D. Lobue and R. S. Baric (2008). "Norovirus pathogenesis: mechanisms of persistence and immune evasion in human populations." Immunol Rev **225**: 190-211.
- Dore, B., S. Keaveney, J. Flannery and P. Rajko-Nenow (2010). "Management of health risks associated with oysters harvested from a norovirus contaminated area, Ireland, February-March 2010." Euro Surveill **15**(19): pii/19567.
- Dore, W. J., K. Henshilwood and D. N. Lees (2000). "Evaluation of F-specific RNA bacteriophage as a candidate human enteric virus indicator for bivalve molluscan shellfish." Appl Environ Microbiol **66**(4): 1280-5.
- Doré, W. J., K. Henshilwood and D. N. Lees (1998). "The development of management strategies for control of virological quality in oysters." Water Science and Technology **38**(12): 29-35.
- Dore, W. J. and D. N. Lees (1995). "Behavior of Escherichia coli and male-specific bacteriophage in environmentally contaminated bivalve molluscs before and after depuration." Appl Environ Microbiol **61**(8): 2830-4.
- Dore, W. J., M. Mackie and D. N. Lees (2003). "Levels of male-specific RNA bacteriophage and Escherichia coli in molluscan bivalve shellfish from commercial harvesting areas." Lett Appl Microbiol **36**(2): 92-6.
- Doultree J.C., Druce J.D., Birch C.J., Bowden D.S. and M. J.A. (1999). "Inactivation of feline calicivirus, a norwalk virus surrogate." J. Hosp. Inf. **41**: 51-7.
- Dowell, S. F., C. Groves, K. B. Kirkland, H. G. Cicirello, T. Ando, Q. Jin, *et al.* (1995). "A multistate outbreak of oyster-associated gastroenteritis: implications for interstate tracing of contaminated shellfish." J Infect Dis **171**(6): 1497-503.
- Drouaz, N., J. Schaeffer, T. Farkas, J. Le Pendu and F. S. Le Guyader (2015). "Tulane Virus as a Potential Surrogate To Mimic Norovirus Behavior in Oysters." Appl Environ Microbiol **81**(15): 5249-56.
- Duizer, E., P. Bijkerk, B. Rockx, A. De Groot, F. Twisk and M. Koopmans (2004). "Inactivation of caliciviruses." Appl Environ Microbiol **70**(8): 4538-43.
- Duizer E., S. K. J., Neill F.H., Atmar R.L., Koopmans M.P.G., Estes M.K. (2004). "Laboratory efforts to cultivate noroviruses." J. Gen. Virol. **85**: 79-87.

Duke, G. M., M. A. Hoffman and A. C. Palmenberg (1992). "Sequence and structural elements that contribute to efficient encephalomyocarditis virus RNA translation." *J Virol* **66**(3): 1602-9.

Duke, G. M., J. E. Osorio and A. C. Palmenberg (1990). "Attenuation of Mengo virus through genetic engineering of the 5' noncoding poly(C) tract." *Nature* **343**(6257): 474-6.

E

Eden, J. S., R. A. Bull, E. Tu, C. J. McIver, M. J. Lyon, J. A. Marshall, *et al.* (2010). "Norovirus GII.4 variant 2006b caused epidemics of acute gastroenteritis in Australia during 2007 and 2008." *J Clin Virol* **49**(4): 265-71.

Eden, J. S., J. Hewitt, K. L. Lim, M. F. Boni, J. Merif, G. Greening, *et al.* (2014). "The emergence and evolution of the novel epidemic norovirus GII.4 variant Sydney 2012." *Virology* **450-451**: 106-13.

Eden, J. S., M. M. Tanaka, M. F. Boni, W. D. Rawlinson and P. A. White (2013). "Recombination within the pandemic norovirus GII.4 lineage." *J Virol* **87**(11): 6270-82.

EFSA (2012). "Scientific Opinion on Norovirus (NoV) in oysters: methods, limits and control options." *EFSA Journal* **10**(1): 39.

El-Kamary, S. S., M. F. Pasetti, P. M. Mendelman, S. E. Frey, D. I. Bernstein, J. J. Treanor, *et al.* (2010). "Adjuvanted intranasal Norwalk virus-like particle vaccine elicits antibodies and antibody-secreting cells that express homing receptors for mucosal and peripheral lymphoid tissues." *J Infect Dis* **202**(11): 1649-58.

Estes, M. K., J. M. Ball, R. A. Guerrero, A. R. Opekun, M. A. Gilger, S. S. Pacheco, *et al.* (2000). "Norwalk virus vaccines: challenges and progress." *J Infect Dis* **181 Suppl 2**: S367-73.

Estes, M. K., B. V. Prasad and R. L. Atmar (2006). "Noroviruses everywhere: has something changed?" *Curr Opin Infect Dis* **19**(5): 467-74.

F

Farkas, J. (1989). "Microbiological safety of irradiated foods." *Int J Food Microbiol* **9**(1): 1-15.

Farkas, T. (2014). "RHESUS ENTERIC CALICIVIRUS SURROGATE MODEL FOR HUMAN NOROVIRUS GASTROENTERITIS." *J Gen Virol*.

Farkas, T., R. W. Cross, E. Hargitt, 3rd, N. W. Lerche, A. L. Morrow and K. Sestak (2010a). "Genetic diversity and histo-blood group antigen interactions of rhesus enteric caliciviruses." *J Virol* **84**(17): 8617-25.

Farkas, T., R. W. Cross, E. Hargitt, N. W. Lerche, A. L. Morrow and K. Sestak (2010b). "Genetic Diversity and Histo-Blood Group Antigen Interactions of Rhesus Enteric Caliciviruses." *J Virol* **84**(17): 8617-25.

Farkas, T., J. Dufour, X. Jiang and K. Sestak (2010c). "Detection of norovirus-, sapovirus- and rhesus enteric calicivirus-specific antibodies in captive juvenile macaques." *J Gen Virol* **91**(Pt 3): 734-8.

Farkas, T., C. W. Lun and B. Fey (2014). "Relationship between genotypes and serotypes of genogroup 1 reoviruses: a model for human norovirus antigenic diversity." *J Gen Virol* **95**(Pt 7): 1469-78.

Farkas, T., K. Sestak, C. Wei and X. Jiang (2008). "Characterization of a rhesus monkey calicivirus representing a new genus of Caliciviridae." *J Virol* **82**(11): 5408-16.

Feng, K., E. Divers, Y. Ma and J. Li (2011). "Inactivation of a human norovirus surrogate, human norovirus virus-like particles, and vesicular stomatitis virus by gamma irradiation." *Appl Environ Microbiol* **77**(10): 3507-17.

- Fernandez-Vega, V., S. V. Sosnovtsev, G. Belliot, A. D. King, T. Mitra, A. Gorbalenya, *et al.* (2004). "Norwalk virus N-terminal nonstructural protein is associated with disassembly of the Golgi complex in transfected cells." J Virol **78**(9): 4827-37.
- Fino, V. R. and K. E. Kniel (2008). "UV light inactivation of hepatitis A virus, Aichi virus, and feline calicivirus on strawberries, green onions, and lettuce." J Food Prot **71**(5): 908-13.
- Flannery, J., S. Keaveney, P. Rajko-Nenow, V. O'Flaherty and W. Dore (2012). "Concentration of norovirus during wastewater treatment and its impact on oyster contamination." Appl Environ Microbiol **78**(9): 3400-6.
- Flannery, J., P. Rajko-Nenow, J. B. Winterbourn, S. K. Malham and D. L. Jones (2014). "Effectiveness of cooking to reduce norovirus and infectious F-specific RNA bacteriophage concentrations in *Mytilus edulis*." J Appl Microbiol **117**(2): 564-71.
- Formiga-Cruz, M., G. Tofino-Quesada, S. Bofill-Mas, D. N. Lees, K. Henshilwood, A. K. Allard, *et al.* (2002). "Distribution of human virus contamination in shellfish from different growing areas in Greece, Spain, Sweden, and the United Kingdom." Appl Environ Microbiol **68**(12): 5990-8.
- Formiga-Cruz M., A. A. K., Conden Hansson A.C., Henshilwood K., Hernroth B.E., Jofre J., Lees D.N., *et al.* (2003). "Evaluation of potential indicators of viral contamination in shellfish and their applicability to divers geographical areas." Appl. Environ. Microbiol. **69**: 1556-63.
- Francy, D. S., E. A. Stelzer, R. N. Bushon, A. M. Brady, A. G. Williston, K. R. Riddell, *et al.* (2012). "Comparative effectiveness of membrane bioreactors, conventional secondary treatment, and chlorine and UV disinfection to remove microorganisms from municipal wastewaters." Water Res **46**(13): 4164-78.
- Frenck, R., D. I. Bernstein, M. Xia, P. Huang, W. Zhong, S. Parker, *et al.* (2012). "Predicting susceptibility to norovirus GII.4 by use of a challenge model involving humans." J Infect Dis **206**(9): 1386-93.
- Fukuda, S., Y. Sasaki and M. Seno (2008). "Rapid and sensitive detection of norovirus genomes in oysters by a two-step isothermal amplification assay system combining nucleic acid sequence-based amplification and reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification assays." Appl Environ Microbiol **74**(12): 3912-4.
- Furuya, D., K. Kuribayashi, Y. Hosono, N. Tsuji, M. Furuya, K. Miyazaki, *et al.* (2011). "Age, viral copy number, and immunosuppressive therapy affect the duration of norovirus RNA excretion in inpatients diagnosed with norovirus infection." Jpn J Infect Dis **64**(2): 104-8.
- Futch, J. C., D. W. Griffin, K. Banks and E. K. Lipp (2011). "Evaluation of sewage source and fate on southeast Florida coastal reefs." Mar Pollut Bull **62**(11): 2308-16.

G

- Gallimore C.I., C. D., du Plessis N., Gray J.J. (2004). "Asymptomatic and symptomatic excretion of Noroviruses during a Hospital outbreak of gastroenteritis." J. Clin. microbiol. **42**: 2271-4.
- Gallimore, C. I., J. S. Cheesbrough, K. Lamden, C. Bingham and J. J. Gray (2005). "Multiple norovirus genotypes characterised from an oyster-associated outbreak of gastroenteritis." Int J Food Microbiol **103**(3): 323-30.
- Gehrke, C., J. Steinmann and P. Goroncy-Bermes (2004). "Inactivation of feline calicivirus, a surrogate of norovirus (formerly Norwalk-like viruses), by different types of alcohol in vitro and in vivo." J Hosp Infect **56**(1): 49-55.

- Gehrke C., S. J., Goroncy-Bernes P. (2004). "Inactivation of feline calicivirus, as surrogate of norovirus (formerly Norwalk-like viruses), by different types of alcohol in vitro and in vivo." *J. Hosp. Inf.* **56**: 49-55.
- Geissler, K., K. Schneider, G. Platzer, B. Truyen, O. R. Kaaden and U. Truyen (1997). "Genetic and antigenic heterogeneity among feline calicivirus isolates from distinct disease manifestations." *Virus Res* **48**(2): 193-206.
- Gentry, J., J. Vinje, D. Guadagnoli and E. K. Lipp (2009). "Norovirus distribution within an estuarine environment." *Appl Environ Microbiol* **75**(17): 5474-80.
- Giammanco, G. M., S. De Grazia, V. Terio, G. Lanave, C. Catella, F. Bonura, *et al.* (2014). "Analysis of early strains of the norovirus pandemic variant GII.4 Sydney 2012 identifies mutations in adaptive sites of the capsid protein." *Virology* **450-451**: 355-8.
- Glass P.J, White L.J., Ball J.M.; Leparc-Goffart I., Hardy M. and E. M.K. (2000). "Norwalk virus open reading frame 3 encodes a minor structural protein." *J. Virol.* **74**: 6581-91.
- Glass, P. J., L. J. White, J. M. Ball, I. Leparc-Goffart, M. E. Hardy and M. K. Estes (2000). "Norwalk virus open reading frame 3 encodes a minor structural protein." *J Virol* **74**(14): 6581-91.
- Gosling, E. (2007). How Bivalves Feed. *Bivalve Molluscs*, Blackwell Publishing Ltd: 87-130.
- Graham, D. Y., X. Jiang, T. Tanaka, A. R. Opekun, H. P. Madore and M. K. Estes (1994). "Norwalk virus infection of volunteers: new insights based on improved assays." *J Infect Dis* **170**(1): 34-43.
- Green J., H. K., Gallimore C.I., Brown D.W.G., Lees D.N. (1998). "A nested reverse transcriptase PCR assay for detection of small round structured viruses in environmentally contaminated molluscan shellfish." *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 858-63.
- Green, K. Y., A. Z. Kapikian, J. Valdesuso, S. Sosnovtsev, J. J. Treanor and J. F. Lew (1997). "Expression and self-assembly of recombinant capsid protein from the antigenically distinct Hawaii human calicivirus." *J Clin Microbiol* **35**(7): 1909-14.
- Greening, G. and J. Hewitt (2008). "Norovirus detection in shellfish using a rapid, sensitive virus recovery and real-time RT-PCR detection protocol." *Food Anal Methods*(1): 109-18.
- Grizel, H. (2003). Atlas d'histologie et de cytologie des mollusques bivalves marins / An atlas of histology and cytology of marine bivalve molluscs. Plouzané, France, Ifremer: 200.
- Grizel, H., M. Auffret, L. Barillé, N. Besnard-Cochennec, F. Blanc, E. Boucaud-Camou, *et al.* (2003). *An Atlas of Histology and Cytology of Marine Bivalve Molluscs*.
- Grodzki, M., J. Schaeffer, J. C. Piquet, J. C. Le Saux, J. Cheve, J. Ollivier, *et al.* (2014). "Bioaccumulation efficiency, tissue distribution, and environmental occurrence of hepatitis E virus in bivalve shellfish from France." *Appl Environ Microbiol* **80**(14): 4269-76.
- Grohmann, G. S., A. M. Murphy, P. J. Christopher, E. Auty and H. B. Greenberg (1981). "Norwalk virus gastroenteritis in volunteers consuming depurated oysters." *Aust J Exp Biol Med Sci* **59**(Pt 2): 219-28.
- Guix, S., M. Asanaka, K. Katayama, S. E. Crawford, F. H. Neill, R. L. Atmar, *et al.* (2007). "Norwalk virus RNA is infectious in mammalian cells." *J Virol* **81**(22): 12238-48.
- Gulati, B. R., P. B. Allwood, C. W. Hedberg and S. M. Goyal (2001). "Efficacy of commonly used disinfectants for the inactivation of calicivirus on strawberry, lettuce, and a food-contact surface." *J Food Prot* **64**(9): 1430-4.
- Guo, M., J. Hayes, K. O. Cho, A. V. Parwani, L. M. Lucas and L. J. Saif (2001). "Comparative pathogenesis of tissue culture-adapted and wild-type Cowden porcine enteric calicivirus

(PEC) in gnotobiotic pigs and induction of diarrhea by intravenous inoculation of wild-type PEC." *J Virol* **75**(19): 9239-51.

Gustavsson, L., L. M. Andersson, M. Lindh and J. Westin (2011). "Excess mortality following community-onset norovirus enteritis in the elderly." *J Hosp Infect* **79**(1): 27-31.

Gutierrez-Escolano A.L., Brito Z.U., Angel R.M. and J. X. (2000). "Interaction of cellular proteins with the 5' end of Norwalk virus genomic RNA." *J. Virol.* **74**: 8558-62.

H

Hall, A. J., A. T. Curns, L. C. McDonald, U. D. Parashar and B. A. Lopman (2012). "The roles of *Clostridium difficile* and norovirus among gastroenteritis-associated deaths in the United States, 1999-2007." *Clin Infect Dis* **55**(2): 216-23.

Hammoumi, S., Guy, M., Eloit, M., and Bakkali-Kassimi, L. (2007). "Encephalomyocarditis virus [Le virus de l'encéphalomyocardite]." *Virologie* **11**(3): 217-29.

Handley, S., L. B. Thackray, G. Zhao, R. Presti, A. Miller, L. Droit, *et al.* (2012). "Pathogenic simian immunodeficiency virus infection is associated with expansion of the enteric virome." *Cell* **151**(2): 253-66.

Hansman, G. S., C. Biertumpfel, I. Georgiev, J. S. McLellan, L. Chen, T. Zhou, *et al.* (2011). "Crystal structures of GII.10 and GII.12 norovirus protruding domains in complex with histo-blood group antigens reveal details for a potential site of vulnerability." *J Virol* **85**(13): 6687-701.

Hansman, G. S., T. Oka, R. Okamoto, T. Nishida, S. Toda, M. Noda, *et al.* (2007). "Human sapovirus in clams, Japan." *Emerg Infect Dis* **13**(4): 620-2.

Hardy, M. E. (2005). "Norovirus protein structure and function." *FEMS Microbiol Lett* **253**(1): 1-8.

Harrington P.R., L. L., Yount B., Moe C.L., Baric R.S. (2002). "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**: 12335-43.

Hasing, M. E., B. E. Lee, J. K. Preiksaitis, R. Tellier, L. Honish, A. Senthilselvan, *et al.* (2013). "Emergence of a new norovirus GII.4 variant and changes in the historical biennial pattern of norovirus outbreak activity in Alberta, Canada, from 2008 to 2013." *J Clin Microbiol* **51**(7): 2204-11.

Hata, A., H. Katayama, K. Kojima, S. Sano, I. Kasuga, M. Kitajima, *et al.* (2014). "Effects of rainfall events on the occurrence and detection efficiency of viruses in river water impacted by combined sewer overflows." *Sci Total Environ* **468-469**: 757-63.

Heller D., G. o. N., Raynham E., Kirkland T., Zadick P.M., Stanwell-smith R. (1986). "An outbreak of gastrointestinal illness associated with consumption of raw depurated oysters." *Br. Med. J.* **292**: 1726-7.

Herbert, T. P., I. Brierley and T. D. Brown (1997). "Identification of a protein linked to the genomic and subgenomic mRNAs of feline calicivirus and its role in translation." *J Gen Virol* **78** (Pt 5): 1033-40.

Hernandez-Morga, J., J. Leon-Felix, F. Peraza-Garay, B. G. Gil-Salas and C. Chaidez (2009). "Detection and characterization of hepatitis A virus and Norovirus in estuarine water samples using ultrafiltration--RT-PCR integrated methods." *J Appl Microbiol* **106**(5): 1579-90.

Hernroth, B. and A. Allard (2007). "The persistence of infectious adenovirus (type 35) in mussels (*Mytilus edulis*) and oysters (*Ostrea edulis*)." *Int J Food Microbiol* **113**(3): 296-302.

Hernroth, B. E., A. C. Conden-Hansson, A. S. Rehnstam-Holm, R. Girones and A. K. Allard (2002). "Environmental Factors Influencing Human Viral Pathogens and Their Potential

- Indicator Organisms in the Blue Mussel, *Mytilus edulis*: the First Scandinavian Report." *Appl Environ Microbiol* **68**(9): 4523-33.
- Hewitt, J., M. Rivera-Aban and G. E. Greening (2009). "Evaluation of murine norovirus as a surrogate for human norovirus and hepatitis A virus in heat inactivation studies." *J Appl Microbiol* **107**(1): 65-71.
- Hewitt J., G. G. E. (2004). "Survival and persistence of norovirus, hepatitis A virus, and feline calicivirus in marinated mussels." *J. Food Prot.* **67**: 1743-50.
- Hijnen, W. A. M., E. F. Beerendonk and G. J. Medema (2006). "Inactivation credit of UV radiation for viruses, bacteria and protozoan (oo)cysts in water: A review." *Water Res* **40**(1): 3-22.
- Hirneisen, K. A., E. P. Black, J. L. Cascarino, V. R. Fino, D. G. Hoover and K. E. Kniel (2010). "Viral Inactivation in Foods: A Review of Traditional and Novel Food-Processing Technologies." *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **9**(1): 3-20.
- Hirneisen, K. A. and K. E. Kniel (2013). "Comparing human norovirus surrogates: murine norovirus and Tulane virus." *J Food Prot* **76**(1): 139-43.
- Hirneisen, K. A., S. M. Markland and K. E. Kniel (2011). "Ozone inactivation of norovirus surrogates on fresh produce." *J Food Prot* **74**(5): 836-9.
- His, E. and C. Cantin (1995). "Biologie et physiologie des coquillages."
- Hoelzer, K., W. Fanaselle, R. Pouillot, J. M. Van Doren and S. Dennis (2013). "Virus inactivation on hard surfaces or in suspension by chemical disinfectants: systematic review and meta-analysis of norovirus surrogates." *J Food Prot* **76**(6): 1006-16.
- Hoffmann, S., M. B. Batz and J. G. Morris, Jr. (2012). "Annual cost of illness and quality-adjusted life year losses in the United States due to 14 foodborne pathogens." *J Food Prot* **75**(7): 1292-302.
- Hsu, C. C., L. K. Riley and R. S. Livingston (2007). "Molecular characterization of three novel murine noroviruses." *Virus Genes* **34**(2): 147-55.
- Hsu, C. C., L. K. Riley, H. M. Wills and R. S. Livingston (2006). "Persistent infection with and serologic cross-reactivity of three novel murine noroviruses." *Comp Med* **56**(4): 247-51.
- Hsu, C. C., C. E. Wobus, E. K. Steffen, L. K. Riley and R. S. Livingston (2005). "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**(10): 1145-51.
- Huang, P., T. Farkas, S. Marionneau, W. Zhong, N. Ruvoen-Clouet, A. L. Morrow, *et al.* (2003). "Noroviruses bind to human ABO, Lewis, and secretor histo-blood group antigens: identification of 4 distinct strain-specific patterns." *J Infect Dis* **188**(1): 19-31.
- Huang, P., T. Farkas, W. Zhong, M. Tan, S. Thornton, A. L. Morrow, *et al.* (2005). "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**(11): 6714-22.
- Hunter, P. R. (2003). "Climate change and waterborne and vector-borne disease." *J Appl Microbiol* **94 Suppl**: 37S-46S.
- Hutson A.M., A. R. L., Graham D.Y., Estes M.K. (2002). "Norwalk virus infection and disease is associated with ABO histo-blood group type." *J. Infect. Dis.* **185**: 1335-7.
- Hutson, A. M., F. Airaud, J. LePendou, M. K. Estes and R. L. Atmar (2005). "Norwalk virus infection associates with secretor status genotyped from sera." *J Med Virol* **77**(1): 116-20.

Hutson, A. M., R. L. Atmar, D. Y. Graham and M. K. Estes (2002). "Norwalk virus infection and disease is associated with ABO histo-blood group type." *J Infect Dis* **185**(9): 1335-7.

I

ICTV (2012). *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses : Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, Elsevier Academic Press.

Isakbaeva, E. T., M. A. Widdowson, R. S. Beard, S. N. Bulens, J. Mullins, S. S. Monroe, *et al.* (2005). "Norovirus transmission on cruise ship." *Emerg Infect Dis* **11**(1): 154-8.

Iwai, M., S. Hasegawa, M. Obara, K. Nakamura, E. Horimoto, T. Takizawa, *et al.* (2009). "Continuous presence of noroviruses and sapoviruses in raw sewage reflects infections among inhabitants of Toyama, Japan (2006 to 2008)." *Appl Environ Microbiol* **75**(5): 1264-70.

J

Jean, J., R. Morales-Rayas, M. N. Anoman and S. Lamhoujeb (2011). "Inactivation of hepatitis A virus and norovirus surrogate in suspension and on food-contact surfaces using pulsed UV light (pulsed light inactivation of food-borne viruses)." *Food Microbiol* **28**(3): 568-72.

Jiang, X., M. Wang, D. Y. Graham and M. K. Estes (1992). "Expression, self-assembly, and antigenicity of the Norwalk virus capsid protein." *J Virol* **66**(11): 6527-32.

Jiang, X., M. Wang, K. Wang and M. K. Estes (1993). "Sequence and genomic organization of Norwalk virus." *Virology* **195**(1): 51-61.

Jiang X., E. C., Zhong W.M., Cuello H., Matson D.O. (1999). "Characterization of a novel human calicivirus that may be a naturally occurring recombinant." *Arch. virol.* **144**: 2377-87.

Jin, Y. M., I. U. Pardoe, A. T. Burness and T. I. Michalak (1994). "Identification and characterization of the cell surface 70-kilodalton sialoglycoprotein(s) as a candidate receptor for encephalomyocarditis virus on human nucleated cells." *J Virol* **68**(11): 7308-19.

Jofre, J. and A. R. Blanch (2010). "Feasibility of methods based on nucleic acid amplification techniques to fulfil the requirements for microbiological analysis of water quality." *J Appl Microbiol* **109**(6): 1853-67.

Johnson, P. C., J. Hoy, J. J. Mathewson, C. D. Ericsson and H. L. DuPont (1990a). "Occurrence of Norwalk virus infections among adults in Mexico." *J Infect Dis* **162**(2): 389-93.

Johnson, P. C., J. J. Mathewson, H. L. DuPont and H. B. Greenberg (1990b). "Multiple-challenge study of host susceptibility to Norwalk gastroenteritis in US adults." *J Infect Dis* **161**(1): 18-21.

Jones, M. K., M. Watanabe, S. Zhu, C. L. Graves, L. R. Keyes, K. R. Grau, *et al.* (2014). "Enteric bacteria promote human and mouse norovirus infection of B cells." *Science* **346**(6210): 755-9.

Josephson, E. S. "AN HISTORICAL REVIEW OF FOOD IRRADIATION1."

Jothikumar, N., J. A. Lowther, K. Henshilwood, D. N. Lees, V. R. Hill and J. Vinje (2005). "Rapid and sensitive detection of noroviruses by using TaqMan-based one-step reverse transcription-PCR assays and application to naturally contaminated shellfish samples." *Appl Environ Microbiol* **71**(4): 1870-5.

K

Kageyama T., K. S., Shinohara M., Uchida K., Fukushi S., Hoshino F.B., Takeda N., Katayama K. (2003). "Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR." *J. Clin. Microbiol.* **41**: 154-7.

- Kageyama T., S. M., Uchida K., Fukushi S., Hoshino F.B., Kojima S., Takai R., Oka T., Takeda N., Katayama K. (2004). "Coexistence of multiple genotypes, including newly identified genotypes, in outbreaks of gastroenteritis due to Norovirus in Japan." J. Clin. microbiol. **42**: 2988-95.
- Kampf, G., D. Grotheer and J. Steinmann (2005). "Efficacy of three ethanol-based hand rubs against feline calicivirus, a surrogate virus for norovirus." J Hosp Infect **60**(2): 144-9.
- Kapikian, A. Z., R. G. Wyatt, R. Dolin, T. S. Thornhill, A. R. Kalica and R. M. Chanock (1972). "Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis." J Virol **10**(5): 1075-81.
- Kaplan, J. E., G. W. Gary, R. C. Baron, N. Singh, L. B. Schonberger, R. Feldman, *et al.* (1982). "Epidemiology of Norwalk gastroenteritis and the role of Norwalk virus in outbreaks of acute nonbacterial gastroenteritis." Ann Intern Med **96**(6 Pt 1): 756-61.
- Karst, S. M., C. E. Wobus, M. Lay, J. Davidson and H. W. t. Virgin (2003). "STAT1-dependent innate immunity to a Norwalk-like virus." Science **299**(5612): 1575-8.
- Katayama, H., E. Haramoto, K. Oguma, H. Yamashita, A. Tajima, H. Nakajima, *et al.* (2008). "One-year monthly quantitative survey of noroviruses, enteroviruses, and adenoviruses in wastewater collected from six plants in Japan." Water Res **42**(6-7): 1441-8.
- Katayama H., S.-H. H., Kojima S. *et al.* (2002). "Phylogenetic analysis of the complete genome of 18 Norwalk-like viruses." Virology **299**: 225-39.
- Kelly, P. M., J. D. Shanley and J. Sears (1983). "Replication of encephalomyocarditis virus in various mammalian cell types." J Med Virol **11**(3): 257-64.
- Kelly, R. J., S. Rouquier, D. Giorgi, G. G. Lennon and J. B. Lowe (1995). "Sequence and expression of a candidate for the human Secretor blood group alpha(1,2)fucosyltransferase gene (FUT2). Homozygosity for an enzyme-inactivating nonsense mutation commonly correlates with the non-secretor phenotype." J Biol Chem **270**(9): 4640-9.
- Keswick, B. H., T. K. Satterwhite, P. C. Johnson, H. L. DuPont, S. L. Secor, J. A. Bitsura, *et al.* (1985). "Inactivation of Norwalk virus in drinking water by chlorine." Appl Environ Microbiol **50**(2): 261-4.
- Khan, R. R., A. D. Lawson, L. L. Minnich, K. Martin, A. Nasir, M. K. Emmett, *et al.* (2009). "Gastrointestinal norovirus infection associated with exacerbation of inflammatory bowel disease." J Pediatr Gastroenterol Nutr **48**(3): 328-33.
- Khare, R., M. J. Espy, E. Cebelinski, D. Boxrud, L. M. Sloan, S. A. Cunningham, *et al.* (2014). "Comparative evaluation of two commercial multiplex panels for detection of gastrointestinal pathogens by use of clinical stool specimens." J Clin Microbiol **52**(10): 3667-73.
- Kim, H. S., J. Hyun, H. S. Kim, J. S. Kim, W. Song and K. M. Lee (2013). "Emergence of GII.4 Sydney norovirus in South Korea during the winter of 2012-2013." J Microbiol Biotechnol **23**(11): 1641-3.
- Kindberg, E., B. Akerlind, C. Johnsen, J. D. Knudsen, O. Heltberg, G. Larson, *et al.* (2007). "Host genetic resistance to symptomatic norovirus (GGII.4) infections in Denmark." J Clin Microbiol **45**(8): 2720-2.
- Kingsley D.H. and R. G.P. (2001). "Rapid and efficient extraction method for reverse transcription-PCR detection of hepatitis A and Norwalk-like viruses in shellfish." Appl Environ Microbiol **67**(9): 4152-7.
- Kingsley D.H., R. G. P. (2003). "Persistence of hepatitis A virus in oysters." J. Food Prot. **66**: 331-4.

- Kingsley, D. H., D. R. Holliman, K. R. Calci, H. Chen and G. J. Flick (2007). "Inactivation of a norovirus by high-pressure processing." Appl Environ Microbiol **73**(2): 581-5.
- Kingsley, D. H., D. G. Hoover, E. Papafragkou and G. P. Richards (2002a). "Inactivation of hepatitis A virus and a calicivirus by high hydrostatic pressure." J Food Prot **65**(10): 1605-9.
- Kingsley, D. H., G. K. Meade and G. P. Richards (2002b). "Detection of both hepatitis A virus and Norwalk-like virus in imported clams associated with food-borne illness." Appl Environ Microbiol **68**(8): 3914-8.
- Kingsley, D. H. and G. P. Richards (2003). "Persistence of hepatitis A virus in oysters." J Food Prot **66**(2): 331-4.
- Kirby, A. E., J. Shi J Fau - Montes, M. Montes J Fau - Lichtenstein, C. L. Lichtenstein M Fau - Moe and C. L. Moe "Disease course and viral shedding in experimental Norwalk virus and Snow Mountain virus infection." (1096-9071 (Electronic)).
- Kittigul, L., K. Pombubpa, T. Rattanatham, P. Diraphat, F. Utrarachkij, S. Pungchitton, *et al.* (2008). "Development of a method for concentrating and detecting rotavirus in oysters." Int J Food Microbiol **122**(1-2): 204-10.
- Kniel, K. E. (2014). "The makings of a good human norovirus surrogate." Curr Opin Virol **4**: 85-90.
- Knight, A., D. Li, M. Uyttendaele and L. A. Jaykus (2013). "A critical review of methods for detecting human noroviruses and predicting their infectivity." Crit Rev Microbiol **39**(3): 295-309.
- Kobasa, D., M. Mulvey, J. S. Lee and D. G. Scraba (1995). "Characterization of Mengo Virus Neutralization Epitopes II. Infection of Mice with an Attenuated Virus." Virology **214**(1): 118-27.
- Koda, Y., M. Soejima and H. Kimura (2001). "The polymorphisms of fucosyltransferases." Leg Med (Tokyo) **3**(1): 2-14.
- Kohn, M. A., T. A. Farley, T. Ando, M. Curtis, S. A. Wilson, Q. Jin, *et al.* (1995). "An outbreak of Norwalk virus gastroenteritis associated with eating raw oysters. Implications for maintaining safe oyster beds." JAMA **273**(6): 466-71.
- Kononen, J., L. Bubendorf, A. Kallioniemi, M. Barlund, P. Schraml, S. Leighton, *et al.* (1998). "Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens." Nat Med **4**(7): 844-7.
- Koopmans, M., J. Harris, L. Verhoef, E. Depoortere, J. Takkinen and D. Coulombier (2006). "European investigation into recent norovirus outbreaks on cruise ships: update." Euro Surveill **11**(7): E060706 5.
- Koopmans M., Von Bosdorff C-H, Vinje J., de Medici D. and M. S. (2002). "Foodborne viruses." FEMS Microbiology Reviews **26**: 187-205.
- Koppisetty, C. A., W. Nasir, F. Strino, G. E. Rydell, G. Larson and P. G. Nyholm (2010). "Computational studies on the interaction of ABO-active saccharides with the norovirus VA387 capsid protein can explain experimental binding data." J Comput Aided Mol Des **24**(5): 423-31.
- Kowalski, W. J., W. P. Bahnfleth, D. L. Witham, B. F. Severin and T. S. Whittam "Mathematical Modeling of Ultraviolet Germicidal Irradiation for Air Disinfection."
- Krishnaswamy, S. and M. G. Rossmann (1990). "Structural refinement and analysis of Mengo virus." J Mol Biol **211**(4): 803-44.
- Kroneman, A., E. Vega, H. Vennema, J. Vinje, P. A. White, G. Hansman, *et al.* (2013). "Proposal for a unified norovirus nomenclature and genotyping." Arch Virol **158**(10): 2059-68.

- Kroneman, A., H. Vennema, K. Deforche, H. v d Avoort, S. Penaranda, M. S. Oberste, *et al.* (2011). "An automated genotyping tool for enteroviruses and noroviruses." J Clin Virol **51**(2): 121-5.
- Kroneman, A., L. Verhoef, J. Harris, H. Vennema, E. Duizer, Y. van Duynhoven, *et al.* (2008). "Analysis of integrated virological and epidemiological reports of norovirus outbreaks collected within the Foodborne Viruses in Europe network from 1 July 2001 to 30 June 2006." J Clin Microbiol **46**(9): 2959-65.
- Kuyumcu-Martinez, N. M., M. E. Van Eden, P. Younan and R. E. Lloyd (2004). "Cleavage of poly(A)-binding protein by poliovirus 3C protease inhibits host cell translation: a novel mechanism for host translation shutoff." Mol Cell Biol **24**(4): 1779-90.
- L**
- L'Homme, Y., R. Sansregret, E. Plante-Fortier, A. M. Lamontagne, M. Ouardani, G. Lacroix, *et al.* (2009). "Genomic characterization of swine caliciviruses representing a new genus of Caliciviridae." Virus Genes **39**(1): 66-75.
- Lambden, P. R., E. O. Caul, C. R. Ashley and I. N. Clarke (1993). "Sequence and genome organization of a human small round-structured (Norwalk-like) virus." Science **259**(5094): 516-9.
- Langlet, J., L. Kaas and G. Greening (2015). "Binding-Based RT-qPCR Assay to Assess Binding Patterns of Noroviruses to Shellfish." Food Environ Virol.
- Larsson, M. M., G. E. Rydell, A. Grahn, J. Rodriguez-Diaz, B. Akerlind, A. M. Hutson, *et al.* (2006). "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**(10): 1422-7.
- LaRue, R., S. Myers, L. Brewer, D. P. Shaw, C. Brown, B. S. Seal, *et al.* (2003). "A wild-type porcine encephalomyocarditis virus containing a short poly(C) tract is pathogenic to mice, pigs, and cynomolgus macaques." J Virol **77**(17): 9136-46.
- Le Guyader, F., L. Haugarreau, L. Miossec, E. Dubois and M. Pommepuy (2000). "Three-year study to assess human enteric viruses in shellfish." Appl Environ Microbiol **66**(8): 3241-8.
- Le Guyader, F., F. Loisy, R. L. Atmar, A. M. Hutson, M. K. Estes, N. Ruvoen-Clouet, *et al.* (2006a). "Norwalk virus-specific binding to oyster digestive tissues." Emerg Infect Dis **12**(6): 931-6.
- Le Guyader, F., L. Miossec, L. Haugarreau, E. Dubois, H. Kopecka and M. Pommepuy (1998). "RT-PCR evaluation of viral contamination in five shellfish beds over a 21-month period." Water Science and Technology **38**(12): 45-50.
- Le Guyader, F. S., R. L. Atmar and J. Le Pendu (2012). "Transmission of viruses through shellfish: when specific ligands come into play." Curr Opin Virol **2**(1): 103-10.
- Le Guyader, F. S., F. Bon, D. DeMedici, S. Parnaudeau, A. Bertone, S. Crudeli, *et al.* (2006b). "Detection of multiple noroviruses associated with an international gastroenteritis outbreak linked to oyster consumption." J Clin Microbiol **44**(11): 3878-82.
- Le Guyader, F. S., J. Krol, K. Ambert-Balay, N. Ruvoen-Clouet, B. Desaubliaux, S. Parnaudeau, *et al.* (2010). "Comprehensive analysis of a norovirus-associated gastroenteritis outbreak, from the environment to the consumer." J Clin Microbiol **48**(3): 915-20.
- Le Guyader, F. S., J. C. Le Saux, K. Ambert-Balay, J. Krol, O. Serais, S. Parnaudeau, *et al.* (2008). "Aichi virus, norovirus, astrovirus, enterovirus, and rotavirus involved in clinical cases from a French oyster-related gastroenteritis outbreak." J Clin Microbiol **46**(12): 4011-7.

- Le Guyader, F. S., F. H. Neill, E. Dubois, F. Bon, F. Loisy, E. Kohli, *et al.* (2003). "A semiquantitative approach to estimate Norwalk-like virus contamination of oysters implicated in an outbreak." Int J Food Microbiol **87**(1-2): 107-12.
- Le Guyader, F. S., S. Parnaudeau, J. Schaeffer, A. Bosch, F. Loisy, M. Pommepuy, *et al.* (2009). "Detection and quantification of noroviruses in shellfish." Appl Environ Microbiol **75**(3): 618-24.
- Le Pendu, J., J. P. Cartron, R. U. Lemieux and R. Oriol (1985). "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**(4): 749-60.
- Le Pendu, J., K. Nystrom and N. Ruvoen-Clouet (2014). "Host-pathogen co-evolution and glycan interactions." Curr Opin Virol **7**: 88-94.
- Le Pendu, J., N. Ruvoen-Clouet, E. Kindberg and L. Svensson (2006). "Mendelian resistance to human norovirus infections." Semin Immunol **18**(6): 375-86.
- Lee T., Yam W.C., Tam T.Y., H. B.S.W., Ng M.H. and B. M.J. (1999). "Occurrence of hepatitis A virus in green-lipped mussels (*perna viridis*)." Wat. Res. **33**(3): 885-9.
- Lencioni, K. C., A. Seamons, P. M. Treuting, L. Maggio-Price and T. Brabb (2008). "Murine norovirus: an intercurrent variable in a mouse model of bacteria-induced inflammatory bowel disease." Comp Med **58**(6): 522-33.
- Leshem, E., M. Wikswa, L. Barclay, E. Brandt, W. Storm, E. Salehi, *et al.* (2013). "Effects and clinical significance of GII.4 Sydney norovirus, United States, 2012-2013." Emerg Infect Dis **19**(8): 1231-8.
- Li, J. W., Z. T. Xin, X. W. Wang, J. L. Zheng and F. H. Chao (2004). "Mechanisms of inactivation of hepatitis A virus in water by chlorine dioxide." Water Res **38**(6): 1514-9.
- Li, X., M. Ye, H. Neetoo, S. Golovan and H. Chen (2013). "Pressure inactivation of Tulane virus, a candidate surrogate for human norovirus and its potential application in food industry." Int J Food Microbiol **162**(1): 37-42.
- Lim, K. L., J. S. Eden, L. L. Oon and P. A. White (2013). "Molecular epidemiology of norovirus in Singapore, 2004-2011." J Med Virol **85**(10): 1842-51.
- Lindesmith, L., C. Moe, J. Lependu, J. A. Frelinger, J. Treanor and R. S. Baric (2005). "Cellular and humoral immunity following Snow Mountain virus challenge." J Virol **79**(5): 2900-9.
- Lindesmith L., M. C., Marionneau S., Ruvoens N., Jiang X., Lindblad L., Stewart P., le Pendu J., Baris R. (2003). "Human susceptibility and resistance to norwalk virus infection." Nat Med **9**: 548-53.
- Lindesmith, L. C., M. Beltramello, E. F. Donaldson, D. Corti, J. Swanstrom, K. Debbink, *et al.* (2012). "Immunogenetic mechanisms driving norovirus GII.4 antigenic variation." PLoS Pathog **8**(5): e1002705.
- Lindesmith, L. C., E. Donaldson, J. Leon, C. L. Moe, J. A. Frelinger, R. E. Johnston, *et al.* (2010). "Heterotypic humoral and cellular immune responses following Norwalk virus infection." J Virol **84**(4): 1800-15.
- Lindesmith, L. C., E. F. Donaldson and R. S. Baric (2011). "Norovirus GII.4 strain antigenic variation." J Virol **85**(1): 231-42.
- Lindesmith, L. C., E. F. Donaldson, A. D. Lobue, J. L. Cannon, D. P. Zheng, J. Vinje, *et al.* (2008). "Mechanisms of GII.4 norovirus persistence in human populations." PLoS Med **5**(2): e31.
- Liu, B., I. N. Clarke and P. R. Lambden (1996). "Polyprotein processing in Southampton virus: identification of 3C-like protease cleavage sites by in vitro mutagenesis." J Virol **70**(4): 2605-10.

- Liu, G., Z. Ni, T. Yun, B. Yu, L. Chen, W. Zhao, *et al.* (2008a). "A DNA-launched reverse genetics system for rabbit hemorrhagic disease virus reveals that the VP2 protein is not essential for virus infectivity." *J Gen Virol* **89**(Pt 12): 3080-5.
- Liu, G. Q., Z. Ni, T. Yun, B. Yu, J. M. Zhu, J. G. Hua, *et al.* (2008b). "Rabbit hemorrhagic disease virus poly(A) tail is not essential for the infectivity of the virus and can be restored in vivo." *Arch Virol* **153**(5): 939-44.
- LoBue, A. D., L. Lindesmith, B. Yount, P. R. Harrington, J. M. Thompson, R. E. Johnston, *et al.* (2006). "Multivalent norovirus vaccines induce strong mucosal and systemic blocking antibodies against multiple strains." *Vaccine* **24**(24): 5220-34.
- Lodder-Verschoor, F., A. M. de Roda Husman, H. H. van den Berg, A. Stein, H. M. van Pelt-Heerschap and W. H. van der Poel (2005). "Year-round screening of noncommercial and commercial oysters for the presence of human pathogenic viruses." *J Food Prot* **68**(9): 1853-9.
- Loisy, F., R. L. Atmar, J. Cohen, A. Bosch and F. S. Le Guyader (2004). "Rotavirus VLP2/6: a new tool for tracking rotavirus in the marine environment." *Res Microbiol* **155**(7): 575-8.
- Loisy, F., R. L. Atmar, J. C. Le Saux, J. Cohen, M. P. Caprais, M. Pommepuy, *et al.* (2005). "Use of rotavirus virus-like particles as surrogates to evaluate virus persistence in shellfish." *Appl Environ Microbiol* **71**(10): 6049-53.
- Lopman B.A., V. H., Kohli E., *et al.* (2004). "Increase in viral gastroenteritis outbreaks in Europe and epidemic spread of new norovirus variant." *Lancet* **363**: 682-8.
- Lopman, B. A., N. Andrews, J. Sarangi, I. B. Vipond, D. W. Brown and M. H. Reacher (2005). "Institutional risk factors for outbreaks of nosocomial gastroenteritis: survival analysis of a cohort of hospital units in South-west England, 2002-2003." *J Hosp Infect* **60**(2): 135-43.
- Love, D. C., G. L. Lovelace and M. D. Sobsey (2010). "Removal of Escherichia coli, Enterococcus fecalis, coliphage MS2, poliovirus, and hepatitis A virus from oysters (*Crassostrea virginica*) and hard shell clams (*Mercinaria mercinaria*) by depuration." *Int J Food Microbiol* **143**(3): 211-7.
- Lowther, J. A., K. Henshilwood and D. N. Lees (2008). "Determination of norovirus contamination in oysters from two commercial harvesting areas over an extended period, using semiquantitative real-time reverse transcription PCR." *J Food Prot* **71**(7): 1427-33.
- Luo, M., G. Vriend, G. Kamer, I. Minor, E. Arnold, M. G. Rossmann, *et al.* (1987). "The atomic structure of Mengo virus at 3.0 Å resolution." *Science* **235**(4785): 182-91.
- M**
- Maalouf, H., J. Schaeffer, S. Parnaudeau, J. Le Pendu, R. L. Atmar, S. E. Crawford, *et al.* (2011). "Strain-dependent norovirus bioaccumulation in oysters." *Appl Environ Microbiol* **77**(10): 3189-96.
- Maalouf, H., M. Zakhour, J. Le Pendu, J. C. Le Saux, R. L. Atmar and F. S. Le Guyader (2010). "Distribution in tissue and seasonal variation of norovirus genogroup I and II ligands in oysters." *Appl Environ Microbiol* **76**(16): 5621-30.
- Magulski, T., D. Paulmann, B. Bischoff, B. Becker, E. Steinmann, J. Steinmann, *et al.* (2009). "Inactivation of murine norovirus by chemical biocides on stainless steel." *BMC Infect Dis* **9**: 107.
- Mahar, J. E. and C. D. Kirkwood (2011). "Characterization of norovirus strains in Australian children from 2006 to 2008: prevalence of recombinant strains." *J Med Virol* **83**(12): 2213-9.

- Makino, A., M. Shimojima, T. Miyazawa, K. Kato, Y. Tohya and H. Akashi (2006). "Junctional Adhesion Molecule 1 Is a Functional Receptor for Feline Calicivirus." *J Virol* **80**(9): 4482-90.
- Malik, Y. S., S. Maherchandani and S. M. Goyal (2006). "Comparative efficacy of ethanol and isopropanol against feline calicivirus, a norovirus surrogate." *Am J Infect Control* **34**(1): 31-5.
- Mann, L. M., K. Anderson, M. Luo and C. W. Bond (1992). "Molecular and structural basis of hemagglutination in mengovirus." *Virology* **190**(1): 337-45.
- Marionneau, S., N. Ruvoën, B. Le Moullac-Vaidye, M. Clement, A. Cailleau-Thomas, G. Ruiz-Palacois, *et al.* (2002). "Norwalk virus binds to histo-blood group antigens present on gastroduodenal epithelial cells of secretor individuals." *Gastroenterology* **122**(7): 1967-77.
- Martella, V., M. Campolo, E. Lorusso, P. Cavicchio, M. Camero, A. L. Bellacicco, *et al.* (2007). "Norovirus in captive lion cub (*Panthera leo*)." *Emerg Infect Dis* **13**(7): 1071-3.
- Martella, V., E. Lorusso, N. Decaro, G. Elia, A. Radogna, M. D'Abramo, *et al.* (2008). "Detection and molecular characterization of a canine norovirus." *Emerg Infect Dis* **14**(8): 1306-8.
- Martin, L. R., G. M. Duke, J. E. Osorio, D. J. Hall and A. C. Palmenberg (1996). "Mutational analysis of the mengovirus poly(C) tract and surrounding heteropolymeric sequences." *J Virol* **70**(3): 2027-31.
- Martin, L. R. and A. C. Palmenberg (1996). "Tandem mengovirus 5' pseudoknots are linked to viral RNA synthesis, not poly(C)-mediated virulence." *J Virol* **70**(11): 8182-6.
- Mattner, F., D. Sohr, A. Heim, P. Gastmeier, H. Vennema and M. Koopmans (2006). "Risk groups for clinical complications of norovirus infections: an outbreak investigation." *Clin Microbiol Infect* **12**(1): 69-74.
- McCartney, S. A., L. B. Thackray, L. Gitlin, S. Gilfillan, H. W. Virgin and M. Colonna (2008). "MDA-5 recognition of a murine norovirus." *PLoS Pathog* **4**(7): e1000108.
- McFadden, N., D. Bailey, G. Carrara, A. Benson, Y. Chaudhry, A. Shortland, *et al.* (2011). "Norovirus regulation of the innate immune response and apoptosis occurs via the product of the alternative open reading frame 4." *PLoS Pathog* **7**(12): e1002413.
- McIntosh, M. T., S. C. Behan, F. M. Mohamed, Z. Lu, K. E. Moran, T. G. Burrage, *et al.* (2007). "A pandemic strain of calicivirus threatens rabbit industries in the Americas." *Virol J* **4**: 96.
- McLeod, C., B. Hay, C. Grant, G. Greening and D. Day (2009a). "Inactivation and elimination of human enteric viruses by Pacific oysters." *J Appl Microbiol* **107**(6): 1809-18.
- McLeod, C., B. Hay, C. Grant, G. Greening and D. Day (2009b). "Localization of norovirus and poliovirus in Pacific oysters." *J Appl Microbiol* **106**(4): 1220-30.
- Meyers, G. (2003). "Translation of the minor capsid protein of a calicivirus is initiated by a novel termination-dependent reinitiation mechanism." *J Biol Chem* **278**(36): 34051-60.
- Meyers, G. (2007). "Characterization of the sequence element directing translation reinitiation in RNA of the calicivirus rabbit hemorrhagic disease virus." *J Virol* **81**(18): 9623-32.
- Milbrath, M. O., I. H. Spicknall, J. L. Zelner, C. L. Moe and J. N. Eisenberg (2013). "Heterogeneity in norovirus shedding duration affects community risk." *Epidemiol Infect* **141**(8): 1572-84.
- Millard J., Appleton H. and P. J.V. (1987). "Studies on heat inactivation of hepatitis A virus with special reference to shellfish." *Epidem. Infect.* **98**: 397-414.

- Milne, S. A., S. Gallacher, P. Cash, D. N. Lees, K. Henshilwood and A. J. Porter (2007). "A sensitive and reliable reverse transcriptase PCR-enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of human pathogenic viruses in bivalve molluscs." J Food Prot **70**(6): 1475-82.
- Miura, T., S. Parnaudeau, M. Grodzki, S. Okabe, R. L. Atmar and F. S. Le Guyader (2013). "Environmental detection of genogroup I, II, and IV noroviruses by using a generic real-time reverse transcription-PCR assay." Appl Environ Microbiol **79**(21): 6585-92.
- Mollicone, R., A. Cailleau and R. Oriol (1995). "Molecular genetics of H, Se, Lewis and other fucosyltransferase genes." Transfus Clin Biol **2**(4): 235-42.
- Morales, M., J. Barcena, M. A. Ramirez, J. A. Boga, F. Parra and J. M. Torres (2004). "Synthesis in vitro of rabbit hemorrhagic disease virus subgenomic RNA by internal initiation on (-)sense genomic RNA: mapping of a subgenomic promoter." J Biol Chem **279**(17): 17013-8.
- Moreau, P., K. Moreau, A. Segarra, D. Tourbiez, M. A. Travers, D. C. Rubinsztein, *et al.* (2015). "Autophagy plays an important role in protecting Pacific oysters from OsHV-1 and *Vibrio aestuarianus* infections." Autophagy **11**(3): 516-26.
- Morse D.L., Guzeich J.J. and H. J.P. (1986). "Widespread outbreaks of clam and oyster associated gastroenteritis. Role of Norwalk virus." N. Eng. J. Med. **314**(11): 678-81.
- Mounts, A. W., T. Ando, M. Koopmans, J. S. Bresee, J. Noel and R. I. Glass (2000). "Cold weather seasonality of gastroenteritis associated with Norwalk-like viruses." J Infect Dis **181 Suppl 2**: S284-7.
- Mullendore J., Sobsey M.D. and S. Y.S.C. (2001). "Improved method for the recovery of hepatitis A virus from oysters." J. Virol. Meth. **94**: 25-35.
- Mumphrey, S. M., H. Changotra, T. N. Moore, E. R. Heimann-Nichols, C. E. Wobus, M. J. Reilly, *et al.* (2007). "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**(7): 3251-63.
- Muniain-Mujika, I., M. Calvo, F. Lucena and R. Girones (2003). "Comparative analysis of viral pathogens and potential indicators in shellfish." Int J Food Microbiol **83**(1): 75-85.
- Muniain-Mujika I., C. M., Lucena F., Girones R. (2003). "Comparative analysis of viral pathogens and potential indicators in shellfish." Int. J. Food Microbiol. **83**: 75-85.
- Myrmel M., B. E. M. M., Rimstad E., Grinde B. (2004). "Detection of enteric viruses in shellfish from the Norwegian coast." Appl. Environ. Microbiol. **70**: 2678-84.
- N**
- Nappier, S. P., T. K. Graczyk and K. J. Schwab (2008). "Bioaccumulation, retention, and depuration of enteric viruses by *Crassostrea virginica* and *Crassostrea ariakensis* oysters." Appl Environ Microbiol **74**(22): 6825-31.
- Navidad, J. F., D. J. Griswold, M. S. Gradus and S. Bhattacharyya (2013). "Evaluation of Luminex xTAG gastrointestinal pathogen analyte-specific reagents for high-throughput, simultaneous detection of bacteria, viruses, and parasites of clinical and public health importance." J Clin Microbiol **51**(9): 3018-24.
- Neill, J. D., R. F. Meyer and B. S. Seal (1995). "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**(7): 4484-8.
- Nenonen, N. P., C. Hannoun, P. Horal, B. Hernroth and T. Bergstrom (2008). "Tracing of norovirus outbreak strains in mussels collected near sewage effluents." Appl Environ Microbiol **74**(8): 2544-9.

- Nenonen, N. P., C. Hannoun, M. B. Olsson and T. Bergstrom (2009). "Molecular analysis of an oyster-related norovirus outbreak." J Clin Virol **45**(2): 105-8.
- Ng, T. L., P. P. Chan, T. H. Phua, J. P. Loh, R. Yip, C. Wong, *et al.* (2005). "Oyster-associated outbreaks of Norovirus gastroenteritis in Singapore." J Infect **51**(5): 413-8.
- Nilsson M., H. K.-O., Thorhagen M., Larson G., Johansen K., Ekspong A., Svensson L. (2003). "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**: 13117-24.
- Nishida, T., H. Kimura, M. Saitoh, M. Shinohara, M. Kato, S. Fukuda, *et al.* (2003). "Detection, quantitation, and phylogenetic analysis of noroviruses in Japanese oysters." Appl Environ Microbiol **69**(10): 5782-6.
- Nishida, T., O. Nishio, M. Kato, T. Chuma, H. Kato, H. Iwata, *et al.* (2007). "Genotyping and quantitation of noroviruses in oysters from two distinct sea areas in Japan." Microbiol Immunol **51**(2): 177-84.
- Nishida T., K. H., Saitoh M., Shinohara M., Kato M. *et al.* (2003). "Detection, quantitation, and phylogenetic analysis of noroviruses in Japanese oysters." Appl. Environ. Microbiol. **69**: 5782-6.
- Nordgren, J., E. Kindberg, P. E. Lindgren, A. Matussek and L. Svensson (2010). "Norovirus gastroenteritis outbreak with a secretor-independent susceptibility pattern, Sweden." Emerg Infect Dis **16**(1): 81-7.
- Nordgren, J., A. Matussek, A. Mattsson, L. Svensson and P. E. Lindgren (2009). "Prevalence of norovirus and factors influencing virus concentrations during one year in a full-scale wastewater treatment plant." Water Res **43**(4): 1117-25.
- "Norovirus activity--United States, 2006-2007." (2007). MMWR Morb Mortal Wkly Rep **56**(33): 842-6.
- Nuanualsuwan, S., T. Mariam, S. Himathongkham and D. O. Cliver (2002). "Ultraviolet inactivation of feline calicivirus, human enteric viruses and coliphages." Photochem Photobiol **76**(4): 406-10.
- Nuanualsuwan S., C. D. O. (2003). "Capsid functions of inactivated human picornaviruses and feline calicivirus." Appl. Environ. Microbiol. **69**: 350-7.
- O**
- O'Brien, R. T. and J. Newman (1979). "Structural and compositional changes associated with chlorine inactivation of polioviruses." Appl Environ Microbiol **38**(6): 1034-9.
- Oliver, S. L., E. Asobayire, A. M. Dastjerdi and J. C. Bridger (2006). "Genomic characterization of the unclassified bovine enteric virus Newbury agent-1 (Newbury1) endorses a new genus in the family Caliciviridae." Virology **350**(1): 240-50.
- Oliver, S. L., A. M. Dastjerdi, S. Wong, L. El-Attar, C. Gallimore, D. W. Brown, *et al.* (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**(4): 2789-98.
- Olofsson, S. and T. Bergstrom (2005). "Glycoconjugate glycans as viral receptors." Ann Med **37**(3): 154-72.
- Osorio, J. E., G. B. Hubbard, K. F. Soike, M. Girard, S. van der Werf, J. C. Moulin, *et al.* (1996a). "Protection of non-murine mammals against encephalomyocarditis virus using a genetically engineered Mengo virus." Vaccine **14**(2): 155-61.
- Osorio, J. E., L. R. Martin and A. C. Palmenberg (1996b). "The immunogenic and pathogenic potential of short poly(C) tract Mengo viruses." Virology **223**(2): 344-50.

P

- Palmenberg, A. C., E. M. Kirby, M. R. Janda, N. L. Drake, G. M. Duke, K. F. Potratz, *et al.* (1984). "The nucleotide and deduced amino acid sequences of the encephalomyocarditis viral polyprotein coding region." Nucleic Acids Res **12**(6): 2969-85.
- Pang X.L., j. J., Vesikari T. (1999). "Human calicivirus associated with sporadic gastroenteritis in Finish children less than two years of age followed prospectively during a rotavirus vaccine trial." Pediatric Infectious Disease journal **18**: 420-6.
- Park, G. W., L. Barclay, D. Macinga, D. Charbonneau, C. A. Pettigrew and J. Vinje (2010). "Comparative efficacy of seven hand sanitizers against murine norovirus, feline calicivirus, and GII.4 norovirus." J Food Prot **73**(12): 2232-8.
- Park, G. W., K. G. Linden and M. D. Sobsey (2011). "Inactivation of murine norovirus, feline calicivirus and echovirus 12 as surrogates for human norovirus (NoV) and coliphage (F+) MS2 by ultraviolet light (254 nm) and the effect of cell association on UV inactivation." Lett Appl Microbiol **52**(2): 162-7.
- Parra, G. I., K. Bok, R. Taylor, J. R. Haynes, S. V. Sosnovtsev, C. Richardson, *et al.* (2012). "Immunogenicity and specificity of norovirus Consensus GII.4 virus-like particles in monovalent and bivalent vaccine formulations." Vaccine **30**(24): 3580-6.
- Parrino, T. A., D. S. Schreiber, J. S. Trier, A. Z. Kapikian and N. R. Blacklow (1977). "Clinical immunity in acute gastroenteritis caused by Norwalk agent." N Engl J Med **297**(2): 86-9.
- Parwani, A. V., W. T. Flynn, K. L. Gadfield and L. J. Saif (1991). "Serial propagation of porcine enteric calicivirus in a continuous cell line. Effect of medium supplementation with intestinal contents or enzymes." Arch Virol **120**(1-2): 115-22.
- Passerat, J., N. K. Ouattara, J. M. Mouchel, V. Rocher and P. Servais (2011). "Impact of an intense combined sewer overflow event on the microbiological water quality of the Seine River." Water Res **45**(2): 893-903.
- Patel, M. M., A. J. Hall, J. Vinje and U. D. Parashar (2009). "Noroviruses: a comprehensive review." J Clin Virol **44**(1): 1-8.
- Patel, M. M., M. A. Widdowson, R. I. Glass, K. Akazawa, J. Vinje and U. D. Parashar (2008). "Systematic literature review of role of noroviruses in sporadic gastroenteritis." Emerg Infect Dis **14**(8): 1224-31.
- Patnaik, S. K., W. Helmberg and O. O. Blumenfeld (2012). "BGMUT: NCBI dbRBC database of allelic variations of genes encoding antigens of blood group systems." Nucleic Acids Res **40**(Database issue): D1023-9.
- Patterson, M. F. (1993). "Food irradiation and food safety." Reviews in Medical Microbiology **4**(3).
- Patterson, M. F. (2005). "Microbiology of pressure-treated foods." J Appl Microbiol **98**(6): 1400-9.
- Payne, D. C., J. Vinje, P. G. Szilagyi, K. M. Edwards, M. A. Staat, G. A. Weinberg, *et al.* (2013). "Norovirus and medically attended gastroenteritis in U.S. children." N Engl J Med **368**(12): 1121-30.
- Perrett, K. and G. Kudesia (1995). "Gastroenteritis associated with oysters." Commun Dis Rep CDR Rev **5**(10): R153-4.
- Pfister, T. and E. Wimmer (2001). "Polypeptide p41 of a Norwalk-like virus is a nucleic acid-independent nucleoside triphosphatase." J Virol **75**(4): 1611-9.
- Phan, T. G., T. Kuroiwa, K. Kaneshi, Y. Ueda, S. Nakaya, S. Nishimura, *et al.* (2006a). "Changing distribution of norovirus genotypes and genetic analysis of recombinant GIIb among infants and children with diarrhea in Japan." J Med Virol **78**(7): 971-8.

- Phan, T. G., F. Yagyu, V. Kozlov, A. Kozlov, S. Okitsu, W. E. Muller, *et al.* (2006b). "Viral gastroenteritis and genetic characterization of recombinant norovirus circulating in Eastern Russia." Clin Lab **52**(5-6): 247-53.
- Phillips, G., C. C. Tam, S. Conti, L. C. Rodrigues, D. Brown, M. Iturriza-Gomara, *et al.* (2010). "Community incidence of norovirus-associated infectious intestinal disease in England: improved estimates using viral load for norovirus diagnosis." Am J Epidemiol **171**(9): 1014-22.
- Pina S., Puig M., Lucena F., Jofre J. and G. R. (1998). "Viral pollution in the environment and in shellfish: human adenovirus detection by PCR as an index of human viruses." Appl Environ Microbiol. **64**(9): 3376-82.
- Pinto, R. M., M. I. Costafreda and A. Bosch (2009). "Risk assessment in shellfish-borne outbreaks of hepatitis A." Appl Environ Microbiol **75**(23): 7350-5.
- Pletneva, M. A., S. V. Sosnovtsev and K. Y. Green (2001). "The genome of hawaii virus and its relationship with other members of the caliciviridae." Virus Genes **23**(1): 5-16.
- Pompey M., C. M. P., Le Saux J.C., Le Mennec C., Parnaudeau S., Madec Y., Brest G., Le Guyader F.. (2003). "Evaluation of viral shellfish depuration in a semi-professional size tank.": 485-99.
- Pontes, L., Y. Cordeiro, V. Giongo, M. Villas-Boas, A. Barreto, J. R. Araujo, *et al.* (2001). "Pressure-induced formation of inactive triple-shelled rotavirus particles is associated with changes in the spike protein Vp4." J Mol Biol **307**(5): 1171-9.
- Powell, K. L., R. G. Taylor, A. A. Cronin, M. H. Barrett, S. Pedley, J. Sellwood, *et al.* (2003). "Microbial contamination of two urban sandstone aquifers in the UK." Water Res **37**(2): 339-52.
- Power, U. and J. K. Collins (1990). "Elimination of coliphages and Escherichia coli from mussels during depuration under varying conditions of temperature, salinity and food availability." J Food Prot **53**(Article): 208-12.
- Power, U. F. and J. K. Collins (1989). "Differential depuration of poliovirus, Escherichia coli, and a coliphage by the common mussel, Mytilus edulis." Appl Environ Microbiol **55**(6): 1386-90.
- Prasad, B. V., S. Crawford, J. A. Lawton, J. Pesavento, M. Hardy and M. K. Estes (2001). "Structural studies on gastroenteritis viruses." Novartis Found Symp **238**: 26-37; discussion -46.
- Prasad, B. V., M. E. Hardy, T. Dokland, J. Bella, M. G. Rossmann and M. K. Estes (1999). "X-ray crystallographic structure of the Norwalk virus capsid." Science **286**(5438): 287-90.
- Prasad, B. V., R. Rothnagel, X. Jiang and M. K. Estes (1994). "Three-dimensional structure of baculovirus-expressed Norwalk virus capsids." J Virol **68**(8): 5117-25.
- Prato, R., P. L. Lopalco, M. Chironna, G. Barbuti, C. Germinario and M. Quarto (2004). "Norovirus gastroenteritis general outbreak associated with raw shellfish consumption in south Italy." BMC Infect Dis **4**: 37.
- Praveen, C., B. A. Dancho, D. H. Kingsley, K. R. Calci, G. K. Meade, K. D. Mena, *et al.* (2013). "Susceptibility of murine norovirus and hepatitis A virus to electron beam irradiation in oysters and quantifying the reduction in potential infection risks." Appl Environ Microbiol **79**(12): 3796-801.
- Puustinen, L., V. Blazevic, L. Huhti, E. D. Szakal, A. Halkosalo, M. Salminen, *et al.* (2012). "Norovirus genotypes in endemic acute gastroenteritis of infants and children in Finland between 1994 and 2007." Epidemiol Infect **140**(2): 268-75.

R

- Rajan, V. P., R. D. Larsen, S. Ajmera, L. K. Ernst and J. B. Lowe (1989). "A cloned human DNA restriction fragment determines expression of a GDP-L-fucose: beta-D-galactoside 2-alpha-L-fucosyltransferase in transfected cells. Evidence for isolation and transfer of the human H blood group locus." J Biol Chem **264**(19): 11158-67.
- Ramirez, K., R. Wahid, C. Richardson, R. F. Bargatze, S. S. El-Kamary, M. B. Sztein, *et al.* (2012). "Intranasal vaccination with an adjuvanted Norwalk virus-like particle vaccine elicits antigen-specific B memory responses in human adult volunteers." Clin Immunol **144**(2): 98-108.
- Ravn, V. and E. Dabelsteen (2000). "Tissue distribution of histo-blood group antigens." APMIS **108**(1): 1-28.
- Redman J.A., G. S. B., Olson T.M. (1997). "Filtration of recombinant Norwalk virus particles and bacteriophage MS2 in quartz sand: importance of electrostatic interactions." Environmental Science and Technology **31**: 3378-83.
- Redman J.A., G. S. B., Olson T.M., Estes M.K. (2001). "Pathogen filtration, heterogeneity, and the potable reuse of wastewater." Environ. Sci. Technol. **35**: 1798-805.
- Reeck, A., O. Kavanagh, M. K. Estes, A. R. Opekun, M. A. Gilger, D. Y. Graham, *et al.* (2010). "Serological correlate of protection against norovirus-induced gastroenteritis." J Infect Dis **202**(8): 1212-8.
- Reuter, G., H. Vennema, M. Koopmans and G. Szucs (2006). "Epidemic spread of recombinant noroviruses with four capsid types in Hungary." J Clin Virol **35**(1): 84-8.
- Richards G.P. (1985). "Outbreaks of shellfish-associated enteric virus illness in the United States : requisite for development of viral guidelines." J. Food Prot. **48**: 815-23.
- Richards G.P. (1988). "Microbial purification of shellfish : a review of depuration and relaying." J. food Protect. **51**: 218-51.
- Richards, G. P. (2012). "Critical review of norovirus surrogates in food safety research: rationale for considering volunteer studies." Food Environ Virol **4**(1): 6-13.
- Rigotto, C., M. Victoria, V. Moresco, C. K. Kolesnikovas, A. A. Correa, D. S. Souza, *et al.* (2010). "Assessment of adenovirus, hepatitis A virus and rotavirus presence in environmental samples in Florianopolis, South Brazil." J Appl Microbiol **109**(6): 1979-87.
- Rockx, B., R. S. Baric, I. de Grijjs, E. Duizer and M. P. Koopmans (2005a). "Characterization of the homo- and heterotypic immune responses after natural norovirus infection." J Med Virol **77**(3): 439-46.
- Rockx B., d. W. M., Vennema H., Vonje J., de Bruin E., Van Duynhoven Y., Koopmans M. (2002). "Natural history of human calicivirus infection : a prospective cohort study." Clinical Infectious Diseases **35**: 246-53.
- Rockx, B. H., W. M. Bogers, J. L. Heeney, G. van Amerongen and M. P. Koopmans (2005b). "Experimental norovirus infections in non-human primates." J Med Virol **75**(2): 313-20.
- Roddie, C., J. P. Paul, R. Benjamin, C. I. Gallimore, J. Xerry, J. J. Gray, *et al.* (2009). "Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation and norovirus gastroenteritis: a previously unrecognized cause of morbidity." Clin Infect Dis **49**(7): 1061-8.
- Rodriguez, R. A., P. M. Gundy, G. K. Rijal and C. P. Gerba (2012). "The impact of combined sewage overflows on the viral contamination of receiving waters." Food Environ Virol **4**(1): 34-40.
- Rolfe, K. J., S. Parmar, D. Mururi, T. G. Wreghitt, H. Jalal, H. Zhang, *et al.* (2007). "An internally controlled, one-step, real-time RT-PCR assay for norovirus detection and genotyping." J Clin Virol **39**(4): 318-21.

- Romalde, J. L., M. K. Estes, G. Szucs, R. L. Atmar, C. M. Woodley and T. G. Metcalf (1994). "In situ detection of hepatitis A virus in cell cultures and shellfish tissues." Appl Environ Microbiol **60**(6): 1921-6.
- Rose, J. B., P. R. Epstein, E. K. Lipp, B. H. Sherman, S. M. Bernard and J. A. Patz (2001). "Climate variability and change in the United States: potential impacts on water- and foodborne diseases caused by microbiologic agents." Environmental Health Perspectives **109**(Suppl 2): 211-21.
- Rouquier, S., D. Giorgi, A. Bergmann, B. Brandriff and G. Lennon (1994). "The fucosyltransferase locus FUT1 maps distal to apolipoprotein loci E and C2 on human chromosome 19." Cytogenet Cell Genet **66**(1): 70-1.
- Ruvoen-Clouet, N., G. Belliot and J. Le Pendu (2013). "Noroviruses and histo-blood groups: the impact of common host genetic polymorphisms on virus transmission and evolution." Rev Med Virol **23**(6): 355-66.
- Ruvoen-Clouet, N., J. P. Ganiere, G. Andre-Fontaine, D. Blanchard and J. Le Pendu (2000). "Binding of rabbit hemorrhagic disease virus to antigens of the ABH histo-blood group family." J Virol **74**(24): 11950-4.
- Ruvoen-Clouet, N. L. P., J. (2004). "Fixation des norovirus sur des glycanes : conséquences biologiques et perspectives prophylactiques." Virologie **8**(6).
- Ruvoen, N. and J. Le Pendu (2013). "Sensibilité génétique aux infections à norovirus." Pathologie Biologie **61**(1): 28-35.
- Rydell, G. E., J. Nilsson, J. Rodriguez-Diaz, N. Ruvoen-Clouet, L. Svensson, J. Le Pendu, *et al.* (2009). "Human noroviruses recognize sialyl Lewis x neoglycoprotein." Glycobiology **19**(3): 309-20.
- Rzezutka, A. and N. Cook (2004). "Survival of human enteric viruses in the environment and food." FEMS Microbiol Rev **28**(4): 441-53.
- S**
- Sattar, S. A., M. Ali and J. A. Tetro (2011). "In vivo comparison of two human norovirus surrogates for testing ethanol-based handrubs: the mouse chasing the cat!" PLoS One **6**(2): e17340.
- Scallan, E., R. M. Hoekstra, F. J. Angulo, R. V. Tauxe, M. A. Widdowson, S. L. Roy, *et al.* (2011). "Foodborne illness acquired in the United States--major pathogens." Emerg Infect Dis **17**(1): 7-15.
- Schultz, A. C., P. Saadbye, J. Hoorfar and B. Norrung (2007). "Comparison of methods for detection of norovirus in oysters." Int J Food Microbiol **114**(3): 352-6.
- Schwab K.J., Neill F.H., Le Guyader F., Estes M.K. and A. R.L. (2001). "Development of a reverse transcription-PCR -DNA enzyme immunoassay for detection of Norwalk-like viruses and hepatitis A virus in stool and shellfish." Appl. Environ. Microbiol. **67**(2): 742-9.
- Schwab K.J., N. F. H., Estes M.K., Metcalf T.G., Atmar R.L. (1998). "Distribution of Norwalk virus within shellfish following bioaccumulation and subsequent depuration by detection using RT-PCR." J Food Prot **61**: 1674-80.
- Schwab, K. J., F. H. Neill, M. K. Estes, T. G. Metcalf and R. L. Atmar (1998). "Distribution of Norwalk virus within shellfish following bioaccumulation and subsequent depuration by detection using RT-PCR." J Food Prot **61**(12): 1674-80.
- Scipioni, A., A. Mauroy, J. Vinje and E. Thiry (2008). "Animal noroviruses." Vet J **178**(1): 32-45.

- Scott, T. M., J. B. Rose, T. M. Jenkins, S. R. Farrah and J. Lukasik (2002). "Microbial source tracking: current methodology and future directions." *Appl Environ Microbiol* **68**(12): 5796-803.
- Seah, E. L., I. C. Gunsekere, J. A. Marshall and P. J. Wright (1999). "Variation in ORF3 of genogroup 2 Norwalk-like viruses." *Arch Virol* **144**(5): 1007-14.
- Seah, E. L., J. A. Marshall and P. J. Wright (2003). "Trans activity of the norovirus Camberwell proteinase and cleavage of the N-terminal protein encoded by ORF1." *J Virol* **77**(12): 7150-5.
- Seitz, S. R., J. S. Leon, K. J. Schwab, G. M. Lyon, M. Dowd, M. McDaniels, *et al.* (2011). "Norovirus infectivity in humans and persistence in water." *Appl Environ Microbiol* **77**(19): 6884-8.
- Serracca, L., M. Verani, R. Battistini, I. Rossini, A. Carducci and C. Ercolini (2010). "Evaluation of Adenovirus and E. coli as indicators for human enteric viruses presence in mussels produced in La Spezia Gulf (Italy)." *Lett Appl Microbiol* **50**(5): 462-7.
- Sestak, K., S. Feely, B. Fey, J. Dufour, E. Hargitt, X. Alvarez, *et al.* (2012). "Experimental inoculation of juvenile rhesus macaques with primate enteric caliciviruses." *PLoS One* **7**(5): e37973.
- Shanker, S., J. M. Choi, B. Sankaran, R. L. Atmar, M. K. Estes and B. V. Prasad (2011). "Structural analysis of histo-blood group antigen binding specificity in a norovirus GII.4 epidemic variant: implications for epochal evolution." *J Virol* **85**(17): 8635-45.
- Shieh, Y., S. S. Monroe, R. L. Fankhauser, G. W. Langlois, W. Burkhardt, 3rd and R. S. Baric (2000). "Detection of norwalk-like virus in shellfish implicated in illness." *J Infect Dis* **181 Suppl 2**: S360-6.
- Shieh Y.S.C., Calci K.R. and B. R.S. (1999). "A method to detect low levels of enteric viruses in contaminated oysters." *Appl Environ Microbiol* **65**(11): 4709-14.
- Shin G-A., S. M. D. (2003). "Reduction of Norwalk virus, poliovirus 1 and bacteriophage MS2 by ozone disinfection of water." *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 3975-8.
- Shirato, H., S. Ogawa, H. Ito, T. Sato, A. Kameyama, H. Narimatsu, *et al.* (2008). "Noroviruses distinguish between type 1 and type 2 histo-blood group antigens for binding." *J Virol* **82**(21): 10756-67.
- Siebenga, J. J., P. Lemey, S. L. Kosakovsky Pond, A. Rambaut, H. Vennema and M. Koopmans (2010). "Phylogenetic reconstruction reveals norovirus GII.4 epidemic expansions and their molecular determinants." *PLoS Pathog* **6**(5): e1000884.
- Siebenga, J. J., H. Vennema, B. Renckens, E. de Bruin, B. van der Veer, R. J. Siezen, *et al.* (2007). "Epochal evolution of GGII.4 norovirus capsid proteins from 1995 to 2006." *J Virol* **81**(18): 9932-41.
- Siebenga, J. J., H. Vennema, D. P. Zheng, J. Vinje, B. E. Lee, X. L. Pang, *et al.* (2009). "Norovirus illness is a global problem: emergence and spread of norovirus GII.4 variants, 2001-2007." *J Infect Dis* **200**(5): 802-12.
- Silva, J. L., P. Luan, M. Glaser, E. W. Voss and G. Weber (1992). "Effects of hydrostatic pressure on a membrane-enveloped virus: high immunogenicity of the pressure-inactivated virus." *J Virol* **66**(4): 2111-7.
- Simmonds, P., I. Karakasiliotis, D. Bailey, Y. Chaudhry, D. J. Evans and I. G. Goodfellow (2008). "Bioinformatic and functional analysis of RNA secondary structure elements among different genera of human and animal caliciviruses." *Nucleic Acids Res* **36**(8): 2530-46.

- Simmons, G., C. Garbutt, J. Hewitt and G. Greening (2007). "A New Zealand outbreak of norovirus gastroenteritis linked to the consumption of imported raw Korean oysters." N Z Med J **120**(1264): U2773.
- Simmons, K., M. Gambhir, J. Leon and B. Lopman (2013). "Duration of immunity to norovirus gastroenteritis." Emerg Infect Dis **19**(8): 1260-7.
- Slomka M.J. and A. H. (1998). "Feline calicivirus as a model system for heat inactivation studies of small round structured viruses in shellfish." Epidemiol Infect **121**: 401407.
- Slomka, M. J. and H. Appleton (1998). "Feline calicivirus as a model system for heat inactivation studies of small round structured viruses in shellfish." Epidemiol Infect **121**(2): 401-7.
- Smiley J.R., H. A. E., Traven M., Tsunemitsu H., Saif L.J. (2003). "Reverse transcription-PCR assays for detection of bovine enteric caliciviruses (BEC) and analysis of the genetic relationship among BEC and human caliciviruses." J. Clin. microbiol. **41**: 3089-99.
- Smiley, J. R., K. O. Chang, J. Hayes, J. Vinje and L. J. Saif (2002). "Characterization of an enteropathogenic bovine calicivirus representing a potentially new calicivirus genus." J Virol **76**(20): 10089-98.
- Smirnov, Y. A., M. P. Rodrigues-Molto and M. T. Famadas (1983). "Protein-RNA interaction in encephalomyocarditis virus as revealed by UV light-induced covalent linkages." J Virol **45**(3): 1048-55.
- Smits, S. L., M. Rahman, C. M. Schapendonk, M. van Leeuwen, A. S. Faruque, B. L. Haagmans, *et al.* (2012). "Calicivirus from Novel Recovirus Genogroup in Human Diarrhea, Bangladesh." Emerg Infect Dis **18**(7): 1192-5.
- Sosnovtsev, S. and K. Y. Green (1995). "RNA transcripts derived from a cloned full-length copy of the feline calicivirus genome do not require VpG for infectivity." Virology **210**(2): 383-90.
- Sosnovtsev, S. V., G. Belliot, K. O. Chang, O. Onwudiwe and K. Y. Green (2005). "Feline calicivirus VP2 is essential for the production of infectious virions." J Virol **79**(7): 4012-24.
- Sosnovtsev, S. V. and K. Y. Green (2000). "Identification and genomic mapping of the ORF3 and VPg proteins in feline calicivirus virions." Virology **277**(1): 193-203.
- Souza, M., M. S. Azevedo, K. Jung, S. Cheetham and L. J. Saif (2008). "Pathogenesis and immune responses in gnotobiotic calves after infection with the genogroup II.4-HS66 strain of human norovirus." J Virol **82**(4): 1777-86.
- Souza, M., S. M. Cheetham, M. S. Azevedo, V. Costantini and L. J. Saif (2007). "Cytokine and antibody responses in gnotobiotic pigs after infection with human norovirus genogroup II.4 (HS66 strain)." J Virol **81**(17): 9183-92.
- Sow, H., M. Desbiens, R. Morales-Rayas, S. E. Ngazoa and J. Jean (2011). "Heat inactivation of hepatitis A virus and a norovirus surrogate in soft-shell clams (*Mya arenaria*)." Foodborne Pathog Dis **8**(3): 387-93.
- Steinmann, J. (2004). "Surrogate viruses for testing virucidal efficacy of chemical disinfectants." J Hosp Infect **56 Suppl 2**: S49-54.
- Straub, T. M., K. Honer zu Bentrup, P. Orosz-Coghlan, A. Dohnalkova, B. K. Mayer, R. A. Bartholomew, *et al.* (2007). "In vitro cell culture infectivity assay for human noroviruses." Emerg Infect Dis **13**(3): 396-403.
- Sugieda M., Nakajima K. and N. S. (1996). "Outbreaks of Norwalk like virus associated gastroenteritis traced to shellfish : coexistence of two genotypes in one specimen." Epidemiol. infect. **116**: 339-46.

Sukhrie, F. H., P. Teunis, H. Vennema, C. Copra, M. F. Thijs Beersma, J. Bogerman, *et al.* (2012). "Nosocomial transmission of norovirus is mainly caused by symptomatic cases." Clin Infect Dis **54**(7): 931-7.

Sunen, E., N. Casas, B. Moreno and C. Zigorraga (2004). "Comparison of two methods for the detection of hepatitis A virus in clam samples (*Tapes* spp.) by reverse transcription-nested PCR." Int J Food Microbiol **91**(2): 147-54.

T

Tacket, C. O., H. S. Mason, G. Losonsky, M. K. Estes, M. M. Levine and C. J. Arntzen (2000). "Human immune responses to a novel norwalk virus vaccine delivered in transgenic potatoes." J Infect Dis **182**(1): 302-5.

Tacket, C. O., M. B. Sztein, G. A. Losonsky, S. S. Wasserman and M. K. Estes (2003). "Humoral, mucosal, and cellular immune responses to oral Norwalk virus-like particles in volunteers." Clin Immunol **108**(3): 241-7.

Tan, M., P. Huang, J. Meller, W. Zhong, T. Farkas and X. Jiang (2003). "Mutations within the P2 domain of norovirus capsid affect binding to human histo-blood group antigens: evidence for a binding pocket." J Virol **77**(23): 12562-71.

Tan, M. and X. Jiang (2010). "Norovirus Gastroenteritis, Carbohydrate Receptors, and Animal Models." PLoS Pathog **6**(8).

Tan, M. and X. Jiang (2011). "Norovirus-host interaction: multi-selections by human histo-blood group antigens." Trends Microbiol **19**(8): 382-8.

Tan, M., M. Jin, H. Xie, Z. Duan, X. Jiang and Z. Fang (2008a). "Outbreak studies of a GII-3 and a GII-4 norovirus revealed an association between HBGA phenotypes and viral infection." J Med Virol **80**(7): 1296-301.

Tan, M., M. Xia, S. Cao, P. Huang, T. Farkas, J. Meller, *et al.* (2008b). "Elucidation of strain-specific interaction of a GII-4 norovirus with HBGA receptors by site-directed mutagenesis study." Virology **379**(2): 324-34.

Tan, M., M. Xia, Y. Chen, W. Bu, R. S. Hegde, J. Meller, *et al.* (2009). "Conservation of carbohydrate binding interfaces: evidence of human HBGA selection in norovirus evolution." PLoS One **4**(4): e5058.

Tan M., H. R. S., X. Jiang. (2004). "The P domain of norovirus capsid protein forms dimer and binds to histo-blood group antigen receptors." J. Virol. **78**: 6233-42.

Tartera, C. and J. Jofre (1987). "Bacteriophages active against *Bacteroides fragilis* in sewage-polluted waters." Appl Environ Microbiol **53**(7): 1632-7.

Tartera, C., F. Lucena and J. Jofre (1989). "Human origin of *Bacteroides fragilis* bacteriophages present in the environment." Appl Environ Microbiol **55**(10): 2696-701.

Taube, S., A. O. Kolawole, M. Hohne, J. E. Wilkinson, S. A. Handley, J. W. Perry, *et al.* (2013). "A mouse model for human norovirus." MBio **4**(4).

Taube, S., A. Kurth and E. Schreier (2005). "Generation of recombinant norovirus-like particles (VLP) in the human endothelial kidney cell line 293T." Arch Virol **150**(7): 1425-31.

Teunis, P. F., C. L. Moe, P. Liu, S. E. Miller, L. Lindesmith, R. S. Baric, *et al.* (2008). "Norwalk virus: how infectious is it?" J Med Virol **80**(8): 1468-76.

Thiel H.J. and K. M. (1999). "Caliciviruses : an overview." Veterinary Microbiology **69**: 55-62.

Thurston-Enriquez J.A., H. C. N., Jacangelo J., Riley K., Gerba C.P. (2003). "Inactivation of feline calicivirus and adenovirus type 40 by UV radiation." Appl. Environ. Microbiol. **69**: 577-82.

- Tian, P., A. H. Bates, H. M. Jensen and R. E. Mandrell (2006). "Norovirus binds to blood group A-like antigens in oyster gastrointestinal cells." Lett Appl Microbiol **43**(6): 645-51.
- Tian, P., A. L. Engelbrektsen, X. Jiang, W. Zhong and R. E. Mandrell (2007). "Norovirus recognizes histo-blood group antigens on gastrointestinal cells of clams, mussels, and oysters: a possible mechanism of bioaccumulation." J Food Prot **70**(9): 2140-7.
- Tian, P., A. L. Engelbrektsen and R. E. Mandrell (2008). "Seasonal tracking of histo-blood group antigen expression and norovirus binding in oyster gastrointestinal cells." J Food Prot **71**(8): 1696-700.
- Tian, P., D. Yang, C. Quigley, M. Chou and X. Jiang (2013). "Inactivation of the Tulane virus, a novel surrogate for the human norovirus." J Food Prot **76**(4): 712-8.
- Tree, J. A., M. R. Adams and D. N. Lees (2005). "Disinfection of feline calicivirus (a surrogate for Norovirus) in wastewaters." J Appl Microbiol **98**(1): 155-62.
- Tu, E. T., R. A. Bull, G. E. Greening, J. Hewitt, M. J. Lyon, J. A. Marshall, *et al.* (2008). "Epidemics of gastroenteritis during 2006 were associated with the spread of norovirus GII.4 variants 2006a and 2006b." Clin Infect Dis **46**(3): 413-20.
- Tung, G. (2011). Efficacy of Commonly Used Disinfectants for Inactivation of Human Noroviruses and Its Surrogates., North Carolina State University; Raleigh, NC, USA:.
- Tunkijjanukij, S., H. Giaever, C. C. Chin and J. A. Olafsen (1998). "Sialic acid in hemolymph and affinity purified lectins from two marine bivalves." Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol **119**(4): 705-13.
- U**
- U47-600-2, N. (2015). Méthodes d'analyse en santé animale - PCR (réaction de polymérisation en chaîne) - Partie 2 : exigences et recommandations pour le développement et la validation de la PCR en santé animale. AFNOR.
- Ueki, Y., D. Sano, T. Watanabe, K. Akiyama and T. Omura (2005). "Norovirus pathway in water environment estimated by genetic analysis of strains from patients of gastroenteritis, sewage, treated wastewater, river water and oysters." Water Res **39**(18): 4271-80.
- Ueki, Y., M. Shoji, A. Suto, T. Tanabe, Y. Okimura, Y. Kikuchi, *et al.* (2007). "Persistence of caliciviruses in artificially contaminated oysters during depuration." Appl Environ Microbiol **73**(17): 5698-701.
- Umesha, K. R., N. C. Bhavani, M. N. Venugopal, I. Karunasagar, G. Krohne and I. Karunasagar (2008). "Prevalence of human pathogenic enteric viruses in bivalve molluscan shellfish and cultured shrimp in south west coast of India." Int J Food Microbiol **122**(3): 279-86.
- "Updated norovirus outbreak management and disease prevention guidelines." (2011). MMWR Recomm Rep **60**(RR-3): 1-18.
- V**
- van Beek, J., K. Ambert-Balay, N. Botteldoorn, J. S. Eden, J. Fonager, J. Hewitt, *et al.* (2013). "Indications for worldwide increased norovirus activity associated with emergence of a new variant of genotype II.4, late 2012." Euro Surveill **18**(1): 8-9.
- Van der Poel W., v. d. H. R., Verschoor F., Gelderblom H., Vinje J., Koopmans M.P.G. (2003). "Epidemiology of Norwalk-like virus infections in cattle in the Netherlands." Vet. Microbiol. **92**: 297-309.
- Van Der Poel W.H.M., V. J., Van der heide R., Herrera M.I.,Vivo A.,Koopmans M.P.G. (2000). "Norwalk-like calicivirus genes in farm animals." Emerg. Infect. Dis. **6**: 36-41.
- Vashist, S., D. Bailey, A. Putics and I. Goodfellow (2009). "Model systems for the study of human norovirus Biology." Future Virol **4**(4): 353-67.

- Vega, E., L. Barclay, N. Gregoricus, S. H. Shirley, D. Lee and J. Vinje (2014). "Genotypic and epidemiologic trends of norovirus outbreaks in the United States, 2009 to 2013." J Clin Microbiol **52**(1): 147-55.
- Vega, E., L. Barclay, N. Gregoricus, K. Williams, D. Lee and J. Vinje (2011). "Novel surveillance network for norovirus gastroenteritis outbreaks, United States." Emerg Infect Dis **17**(8): 1389-95.
- Vennema H., D. B. E., Koopmans M. (2002). "Rational optimization of generic primers used for Norwalk-like virus detection by reverse transcriptase polymerase chain reaction." J. Clin. Virology **25**: 233-5.
- Vilarino, M. L., F. S. Le Guyader, D. Polo, J. Schaeffer, J. Krol and J. L. Romalde (2009). "Assessment of human enteric viruses in cultured and wild bivalve molluscs." Int Microbiol **12**(3): 145-51.
- Vinje, J. "The Role of Molecular Diagnostics of Viral. Agents Causing Gastroenteritis: the importance of noroviruses. ."
- Vinje, J. (2015). "Advances in laboratory methods for detection and typing of norovirus." J Clin Microbiol **53**(2): 373-81.
- W**
- Wall, R., N. Dymond, A. Bell, C. Thornley, H. Buik, D. Cumming, *et al.* (2011). "Two New Zealand outbreaks of norovirus gastroenteritis linked to commercially farmed oysters." N Z Med J **124**(1347): 63-71.
- Wang, D., Q. Wu, L. Yao, M. Wei, X. Kou and J. Zhang (2008). "New target tissue for food-borne virus detection in oysters." Lett Appl Microbiol **47**(5): 405-9.
- Wang, Q.-H., V. Costantini and L. J. Saif (2007a). "Porcine enteric caliciviruses: Genetic and antigenic relatedness to human caliciviruses, diagnosis and epidemiology." Vaccine **25**(30): 5453-66.
- Wang, Q. H., V. Costantini and L. J. Saif (2007b). "Porcine enteric caliciviruses: genetic and antigenic relatedness to human caliciviruses, diagnosis and epidemiology." Vaccine **25**(30): 5453-66.
- Wang, Q. H., M. G. Han, S. Cheetham, M. Souza, J. A. Funk and L. J. Saif (2005). "Porcine noroviruses related to human noroviruses." Emerg Infect Dis **11**(12): 1874-81.
- Wang, Q. H., M. Souza, J. A. Funk, W. Zhang and L. J. Saif (2006). "Prevalence of noroviruses and sapoviruses in swine of various ages determined by reverse transcription-PCR and microwell hybridization assays." J Clin Microbiol **44**(6): 2057-62.
- Weaver, B. and S. Rosenthal (2010). "Viral risk mitigation for Mammalian cell culture media." PDA J Pharm Sci Technol **64**(5): 436-9.
- Webby, R. J., K. S. Carville, M. D. Kirk, G. Greening, R. M. Ratcliff, S. K. Crerar, *et al.* (2007). "Internationally distributed frozen oyster meat causing multiple outbreaks of norovirus infection in Australia." Clin Infect Dis **44**(8): 1026-31.
- Wellmann, K. F., D. Amsterdam and B. W. Volk (1975). "EMC virus and cultured human fetal pancreatic cells. Ultrastructural observations." Arch Pathol **99**(8): 424-9.
- West, P. A., P. C. Wood and M. Jacob (1985). "Control of food poisoning risks associated with shellfish." J R Soc Health **105**(1): 15-21.
- White, L. J., J. M. Ball, M. E. Hardy, T. N. Tanaka, N. Kitamoto and M. K. Estes (1996). "Attachment and entry of recombinant Norwalk virus capsids to cultured human and animal cell lines." J Virol **70**(10): 6589-97.

- White P.A., H. G. S., Li A., Dable J., Isaacs M., Ferson M., McIver C.J., Rawlison W.D. (2002). "Norwalk-like virus 95/96-US strain is a major cause of gastroenteritis outbreaks in Australia." *J. Med. Virol.* **68**: 113-8.
- White, P. A. (2014). "Evolution of norovirus." *Clin Microbiol Infect* **20**(8): 741-5.
- Widdowson M-A., C. E. H., Hadley L. et al. (2004). "Outbreak of gastroenteritis on cruise ships and on land: identification of a predominant circulating strain of norovirus-United States, 2002." *J. Infect. Dis.* **190**: 27-36.
- Widdowson, M. A., E. H. Cramer, L. Hadley, J. S. Bresee, R. S. Beard, S. N. Bulens, *et al.* (2004). "Outbreaks of acute gastroenteritis on cruise ships and on land: identification of a predominant circulating strain of norovirus--United States, 2002." *J Infect Dis* **190**(1): 27-36.
- Willcocks, M. M., M. J. Carter and L. O. Roberts (2004). "Cleavage of eukaryotic initiation factor eIF4G and inhibition of host-cell protein synthesis during feline calicivirus infection." *J Gen Virol* **85**(Pt 5): 1125-30.
- Wirblich, C., H. J. Thiel and G. Meyers (1996). "Genetic map of the calicivirus rabbit hemorrhagic disease virus as deduced from in vitro translation studies." *J Virol* **70**(11): 7974-83.
- Wobus, C. E., S. M. Karst, L. B. Thackray, K. O. Chang, S. V. Sosnovtsev, G. Belliot, *et al.* (2004). "Replication of Norovirus in cell culture reveals a tropism for dendritic cells and macrophages." *PLoS Biol* **2**(12): e432.
- Wolf, S., W. Williamson, J. Hewitt, S. Lin, M. Rivera-Aban, A. Ball, *et al.* (2009). "Molecular detection of norovirus in sheep and pigs in New Zealand farms." *Vet Microbiol* **133**(1-2): 184-9.
- X**
- Xi, J. N., D. Y. Graham, K. N. Wang and M. K. Estes (1990). "Norwalk virus genome cloning and characterization." *Science* **250**(4987): 1580-3.
- Y**
- Ye, M., X. Li, D. H. Kingsley, X. Jiang and H. Chen (2014). "Inactivation of human norovirus in contaminated oysters and clams by high hydrostatic pressure." *Appl Environ Microbiol* **80**(7): 2248-53.
- Yen, C., M. E. Wikswo, B. A. Lopman, J. Vinje, U. D. Parashar and A. J. Hall (2011). "Impact of an emergent norovirus variant in 2009 on norovirus outbreak activity in the United States." *Clin Infect Dis* **53**(6): 568-71.
- Yu, G., D. Zhang, F. Guo, M. Tan, X. Jiang and W. Jiang (2013). "Cryo-EM structure of a novel calicivirus, Tulane virus." *PLoS One* **8**(3): e59817.
- Z**
- Zakhour, M., H. Maalouf, I. Di Bartolo, L. Haugarreau, F. S. Le Guyader, N. Ruvoen-Clouet, *et al.* (2010). "Bovine norovirus: carbohydrate ligand, environmental contamination, and potential cross-species transmission via oysters." *Appl Environ Microbiol* **76**(19): 6404-11.
- Zakhour, M., N. Ruvoen-Clouet, A. Charpilienne, B. Langpap, D. Poncet, T. Peters, *et al.* (2009). "The alphaGal 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.
- Zee, Y. C. and A. J. Hackett (1967). "The influence of cations on the thermal inactivation of vesicular exanthema of swine virus." *Arch Gesamte Virusforsch* **20**(4): 473-6.

- Zhang, D., P. Huang, L. Zou, T. L. Lowary, M. Tan and X. Jiang (2014). "Tulane virus recognizes the A-type 3 and B histo-blood group antigens." J Virol.
- Zhang, D., P. Huang, L. Zou, T. L. Lowary, M. Tan and X. Jiang (2015). "Tulane virus recognizes the A type 3 and B histo-blood group antigens." J Virol **89**(2): 1419-27.
- Zheng, D.-P., T. Ando, R. L. Fankhauser, R. S. Beard, R. I. Glass and S. S. Monroe (2006). "Norovirus classification and proposed strain nomenclature." Virology **346**(2): 312-23.
- Zheng, D. P., M. A. Widdowson, R. I. Glass and J. Vinje (2010). "Molecular epidemiology of genogroup II-genotype 4 noroviruses in the United States between 1994 and 2006." J Clin Microbiol **48**(1): 168-77.

ANNEXES

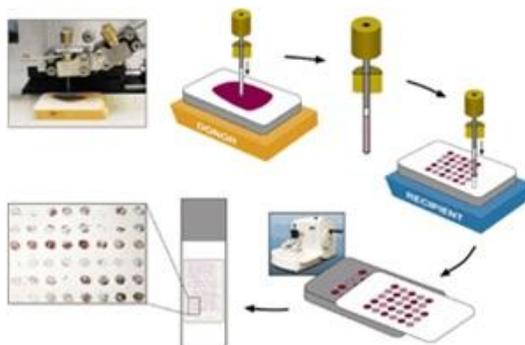
Annexe 1

Tests immunohistochimiques, Tissue Microarray «TMA»

La technique TMA a été décrite pour la première fois en 1986 par H. Battifora et coll., dans «The multitumor tissue block» (Battifora 1986) où jusqu'à 100 tissus différents ont été traités ensemble dans un seul bloc de paraffine. En 1998 J. Kononen et coll., (Kononen *et al.* 1998) ont élaboré la technique actuelle, qui utilise une nouvelle approche d'échantillonnage visant à produire des tissus de forme et taille régulière plus précisément alignés. Dans cette technique, une aiguille creuse est utilisée pour prélever des carottes de tissus aussi petit que 0,6 mm de diamètre à partir des régions d'intérêt dans les tissus inclus dans la paraffine. Ces carottes de tissu sont ensuite insérées dans un bloc de paraffine selon un schéma pré-établi, des sections de ce bloc sont découpées à l'aide d'un microtome, montée sur une lame de microscope, puis analysés par une méthode d'analyse histologique standard.

Cette technique présente plusieurs avantages dont :

- Uniformité expérimentale car les échantillons de tissus sont traités de façon égale au cours des immuno-marquages, les sources de variation sont majoritairement éliminées facilitant ainsi les études comparatives.
- Economie des réactifs et de temps.
- Conservation des blocs originaux car les tissus sont mieux conservés que si les blocs devaient être sectionnés en série.



<http://medicine.yale.edu/pathology/research/tissueservices/tissuemicroarrayfacility/what.aspx>

Figure : Construction des lames de TMA.

1. Fixation des tissus

Des lames incluant des huîtres creuses *Crassostrea gigas*, des huîtres plates *Ostrea edulis*, des moules *Mytilus edulis* et palourdes *Ruditapes decussatus* ont été préparées. Immédiatement après ouverture, les coquillages ont été coupés dans le sens de la longueur et fixés dans du formaldéhyde 10 % pendant 24 h.

2. Inclusion

Les tissus fixés ont été placés dans des caissettes. Après 3 rinçages de 10 min en tampon PBS, les tissus ont été incubés 10 min dans des bains successifs d'éthanol de 20, 30, 50, 70, 80, 90 et 95°C puis dans 2 bains d'éthanol absolu pendant 30 min à température ambiante. Après 3 bains de 30 min en tampon LMR (substituant non toxique de toluène), les caissettes ont été incubées pendant une heure dans un bain de paraffine fondu à 56°C sous vide. Les caissettes ont été ensuite incubées à 56°C dans un nouveau bain de paraffine fondu pendant 48 h. Les tissus ont été inclus dans des blocs de paraffine, séchés à température ambiante puis conservés à +4°C.

3. Coupes de tissus

Pour chaque espèce de coquillage trois tissus ont été prélevés : TD, Br et Mt. Pour chaque tissu trois carottes de 0,6 mm ont été sélectionnées, permettant l'échantillonnage de zones différentes et donc plus susceptibles d'être représentative du tissu. Des coupes (5 µm) du block de paraffine destinataire ont été réalisées à l'aide d'un microtome. Les coupes ont été montées sur lames dans une goutte de paraffine puis séchées à 37°C.

4. Immunohistochimie

Les lames ont été déparaffinées dans un bain de LMR pendant 10 min puis dans un second bain pendant 2 min à température ambiante. Elles ont été ensuite réhydratées par des bains successifs de 2 min à température ambiante en éthanol absolu, 90 %, 70 %, 50 %. Après un rinçage de 5 min en PBS, la peroxydase endogène a été bloquée par incubation des lames 20 min en PBS, 0,3 % d'eau oxygénée à température ambiante. Les lames ont été ensuite rincées puis des puits ont été tracés autour des coupes de tissu (à l'aide d'un crayon type Dakopen). Les sites non spécifiques ont été bloqués par dépôt dans les puits de 200 µl de PBS additionné de sérum de chèvre à 5 % et une incubation

pendant 30 min à température ambiante. Les VLPs NV(GI.1) à une concentration de 2 µg/ml dilué dans 200 µl de tampon PBS-BSA 1 % ont été mises en contact pendant une nuit à +4°C en chambre humide. Après 3 lavages de 5 min en PBS, le premier Ac, dilué au 1/1 000^{ème} dans 200 µl de PBS-BSA 1 % a été déposé dans les puits et les lames incubées pendant une heure à température ambiante. Après 3 lavages, le second Ac, une IgG de chèvre anti-lapin marquée à la peroxydase diluée au 1/2 000^{ème} dans 200 µl de PBS-BSA 1 % a été déposé dans les puits. Après une heure d'incubation à température ambiante, l'excédent d'anticorps a été éliminé par 3 lavages. La révélation a été réalisée par addition de 200 µl de substrat 3-amino-9,6 éthylcarbazole AEC (Vector Biosys) et incubation des lames à l'obscurité jusqu'à l'obtention d'une coloration rouge-rosé (10 à 20 min). Après 3 lavages, une contre-coloration a été réalisée à l'hématoxyline de Mayer pendant 10 sec. Après rinçage des lames à l'eau distillée et montage en milieu aqueux Aquatex, celles-ci ont été observées au microscope. Le niveau de marquage est noté quantitativement de 0(-) ,1(+), 2(++), 3(+++) selon l'intensité de la coloration. Une coupe témoin (-) incubée sans VLPs a été incluse dans le test et traité dans les mêmes conditions que la lame test.

Annexe 2

Principales méthodes utilisées pour la détection de virus dans les coquillages.

Coquillage	Poids analysé	Elution Des virus	Concentration des virus	masse utilisé pour l'extraction d'acide nucléique	Extraction ARN	% De l'échantillon utilisé pour la RT-PCR	Références
Huitres	25 g	Glycine	PEG	0,5 g	QIAamp (Qiagen)	3	(Shieh Y.S.C. <i>et al.</i> 1999)
	50 g	Eau	PEG	0,5 g	Ebullition	nc	(Chung <i>et al.</i> 1996)
	18 g	Glycine	Ultracentrifugation	1 g	GuSCN	10	(Muniain-Mujika I. 2003)
	50 g	Sonication	PEG	nc	GuSCN	nc	(Green J. 1998)
	25 g	Glycine	PEG			10	(Kingsley D.H. and G.P. 2001)
	1,5 g TD	Chloroforme-butanol, cat-floc	PEG	1,5 g	Prot.K,CTAB	20	(Atmar <i>et al.</i> 1995)
	1,5 g TD	Gycine-threonine	PEG	0.12g	GuSCN+ QIAamp	16	(Beuret C. 2003)
	1,5 g TD	chloroform-butanol, cat-floc	PEG	1,5 g	Prot. K, CTAB	20	(Schwab K.J. <i>et al.</i> 2001)
	1,5 g TD	PBS pH7.4 chloroform-butanol, cat-floc	Ultracentrifugation	1 g	QIAamp	25	(Nishida T. 2003)
	1,5 g TD	Billes Zirconia	nc	0,09g	RNEasy (Qiagen)	6	(Lodder-Verschoor <i>et al.</i> 2005)
	TD d'une huitre	Billes Stainless-steels	nc	nc	Silice et guanidium	17	(Ueki <i>et al.</i> 2005)
	2 g TD	Proteinase K	nc	0,01g	GuSCN	4*	(Jothikumar <i>et al.</i> 2005)
	10 g TD	TRIzol (Gibco)	nc	0,08g	GuSCN	8	(Boxman 2006)
	1,5 g TD	Billes Zirconia	nc	nc	RNeasy	5	(Schultz <i>et al.</i> 2007)
	nc	Glycine, pH 10	Ultracentrifugation	nc	Methode silice	10	(Hernroth and Allard 2007)
TD de 3 huitres	PBS	PEG	1g	QIAamp	5	(Fukuda <i>et al.</i> 2008)	

	5 g TD	Buffer pH 8 + Proteinase K	nc	0,05g	Silice et guanidium	10	(Greening and Hewitt 2008)
	25 g de chaire	Adsorption élution alcaline	Double PEG	5 g de chaire	RNeasy	3	(Kittigul <i>et al.</i> 2008)
	TD de 6 huitres	Tampon pH 8+ Proteinase K	-	nc	Silice et guanidium	11	(Lowther <i>et al.</i> 2008)
	1,5 g TD	Glycine pH 9	PEG	1,5 g	Nuclisens (BioMerieux)	20	(Le Guyader <i>et al.</i> 2009)
	5 g TD	haché finement + Proteinase K	-	0,15 g	RNeasy	4	(Gentry <i>et al.</i> 2009)
	25 g de chaire	Adsorption élution	Double PEG	25g de chaire	RNeasy	6	(DePaola <i>et al.</i> 2010)
	2 g TD	Bouillon de phosphate Tryptose et chloroforme-butanol	PEG	nc	Silice et guanidium	nc	(Rigotto <i>et al.</i> 2010)
Moules	20 g	Glycine, cat-floc	Antigène capture	0,04 g	QIAamp	21	(Lee T. <i>et al.</i> 1999)
	50 g	Glycine	PEG	nc	Guanidium,CsCl	100	(Crocì L. <i>et al.</i> 2000)
	100 g	Glycine	Ultracentrifugation	1 g	GuSCN	5	(Pina S. <i>et al.</i> 1998)
	10 g	Glycine	PEG	0,8 g	RNeasy	50	(Chironna <i>et al.</i> 2002)
	25 g	Threonine	PEG	Nc	GuSCN	2,5	(Mullendore J. <i>et al.</i> 2001)
	25 g TD	Glycine	Ultracentrifugation	1,5 g	TRIzol (Gibco) + Boom	6	(Myrmel M. 2004)
	2 g TD	Glycine	Ultracentrifugation	0,1 g	GuSCN	10	(Hernroth <i>et al.</i> 2002)
	75 g total	Glycine pH 9,2	PEG	8,3 g	guanidium	100	(Crocì <i>et al.</i> 2007)
	1,5 g TD	Glycine pH 9,5	PEG	1,5 g	Nuclisens	5	(Vilarino <i>et al.</i> 2009)
	25 g TD	Glycine pH 9,2	PEG	0,75 g	Nucleospin RNA (Macherey-Nagel)	4	(Serracca <i>et al.</i> 2010)
Palourdes	25 g	Glycine, chlorof.	Ultracentrifugation	1,25 g	Nucleospin RNA	10	(Sunen <i>et al.</i> 2004)
	1,5 g TD	chloroforme- butanol, cat-floc	PEG	0,07 g	RNeasy	6	(Costafreda <i>et al.</i> 2006)
	1 g TD	PBS	Ultracentrifugation	nc	QIAamp	1,5	(Hansman <i>et al.</i> 2007)

Norovirus et coquillages : Approches pour l'évaluation de la persistance et du pouvoir infectieux.

Résumé

Cette thèse s'articule essentiellement autour de l'évaluation du potentiel des Recovirus comme substitut viral des norovirus humains afin d'étudier leurs distribution et persistance dans les coquillages. Les norovirus humains sont la principale cause d'épidémie et de cas sporadiques de gastro-entérite aiguë dans le monde entier et sont une cause majeure de maladies d'origine alimentaire. La contamination des coquillages par les norovirus humains constitue un problème sanitaire et économique important. L'utilisation combinée de diagnostic moléculaire et de virus de substitution est une approche qui devrait contribuer à améliorer la compréhension du comportement des norovirus humains dans les coquillages, en particulier leur persistance. Le point majeur concerne la comparaison du comportement du virus Norwalk (prototype du génogroupe I) et deux virus cultivables, le virus Tulane (prototype du genre *Recovirus*) et le Mengovirus. Après bioaccumulation, la distribution tissulaire était assez similaire entre le virus Norwalk et le virus Tulane, la majorité des particules virales ont été détectées dans les tissus digestifs, tandis que le Mengovirus a été détecté dans les tissus digestifs mais également dans les branchies et le manteau. La persistance de ces trois virus après huit jours était comparable, mais des nettes différences ont été observées sur des périodes plus longues. Les virus Norwalk et Tulane ont affiché des demi-vies assez similaires, contrairement au Mengovirus qui a été éliminé plus rapidement. Ces résultats confortent l'hypothèse que le virus Tulane constitue un substitut adéquat pour étudier le comportement des norovirus humains dans les huîtres et a confirmé la persistance prolongée du virus Norwalk dans les tissus d'huîtres. En effet, la concentration dans les tissus digestifs a diminué seulement de 50% sur une période de huit jours. Cette approche innovante de l'analyse de la contamination virale des coquillages ouvre de nouvelles perspectives en particulier les études d'infectiosité car le virus Tulane est multipliable en culture cellulaire et peut aider à identifier les particules infectieuses.

Mots clés : Norovirus; Coquillages; Huîtres; Substitut; Virus Tulane; Persistance.

Norovirus and shellfish: Approaches for assessing persistence and infectivity.

Abstract

This thesis aimed to evaluate the potential of Recovirus to be used as a surrogate for human norovirus to evaluate their behavior in shellfish, including persistence. Human norovirus is the leading cause of epidemic and sporadic cases of acute gastroenteritis worldwide and the major cause of food borne disease. Norovirus contamination in oyster is an important health issue and economic problem. The combined use of molecular detection and surrogate viruses can provide tools that should help to improve understanding of human norovirus behavior in shellfish. The major issue is the comparison of the behavior of Norwalk virus (prototype genogroup I norovirus) and two cultivable virus, the Tulane virus (*Recovirus* prototype) and Mengovirus. After bioaccumulation, tissue distributions were quite similar for Norwalk virus and Tulane virus, with the majority of viral particles detected in digestive tissues while Mengovirus was detected in large amounts in gills and mantle as well as in digestive tissues. The level of persistence of all three viruses over eight days were comparable, but clear differences were observed over longer periods, with Norwalk and Tulane virus displaying rather similar half-lives, unlike Mengovirus that cleared more rapidly. These results strongly indicate that Tulane virus may be an adequate surrogate to study norovirus behavior in oysters and confirmed the prolonged persistence of Norwalk virus in oyster tissues, as concentration in the oyster digestive tissues only decreased by 50% over an eight day period. This innovative concept to evaluate shellfish viral contamination may lead to opening new perspectives in particular the infectivity studies as Tulane virus may be multiplied in cell culture and may help to identify infectious particles.

Keywords: Norovirus; Shellfish; Oyster; Surrogate; Tulane virus; Persistence.