



# UNIVERSITÉ DE BOURGOGNE ET DE CARTHAGE

École Doctorale Environnements- Santé ES <sup>Dijon</sup>  
École Doctorale Sciences, Vie et Matière <sup>Carthage</sup>

## THÈSE

pour obtenir le grade de

**Docteur d'Université**

Discipline : Sciences de la vie <sup>France</sup>  
Discipline : Sciences biologiques <sup>Tunisie</sup>  
Spécialité : Virologie

Par

**Siwar AYOUNI**

soutenue publiquement le 22 décembre 2015  
à l'UFR de médecine de Dijon

**Analyse moléculaire des virus entériques circulant en Tunisie – Mise en évidence des relations entre les antigènes de groupes sanguins et le pouvoir infectieux des rotavirus et des norovirus**

Directeur : **Professeur Pierre POTHIER**

### Membres du Jury

<b>M. Ousmane TRAORE</b>	Professeur des Universités, Université d'Auvergne	<b>Président</b>
<b>Mme Hélène BRIAND</b>	Docteur d'état, BioMérieux, Marcy l'Étoile	<b>Rapporteur</b>
<b>M. Amine SLIM</b>	Professeur des Universités, Université de Tunis El Manar	<b>Rapporteur</b>
<b>M. Pierre POTHIER</b>	Professeur des Universités, Université de Bourgogne	<b>Directeur de thèse</b>
<b>M. Mahjoub AOUNI</b>	Professeur des Universités, Université de Monastir	<b>Co-directeur de thèse</b>
<b>M. Gaël BELLIOU</b>	Docteur, CNR des virus entériques, Dijon	<b>Co-encadrant</b>

## Remerciements

Je tiens à remercier dans un premier temps, les membres de mon jury de thèse qui m'ont fait l'honneur d'évaluer mon manuscrit. Je remercie donc Monsieur le Professeur Amine Slim et Madame le Docteur Hélène Briand d'avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse et Monsieur le Professeur Ousmane TRAORE en tant que président de Jury. Mes remerciements chaleureux à tous les membres de Jury, qui malgré leurs lourdes responsabilités ils m'ont fait l'honneur d'accepter de participer à ce jury.

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de thèse, Monsieur le Professeur Pierre Pothier, de m'avoir accueillie au sein de son équipe et de m'avoir fourni les moyens nécessaires au bon déroulement du présent travail, de la confiance qu'il m'a accordée tout au long du projet, de son encadrement tout en me laissant évoluer librement dans mes recherches, de sa patience et de son aide pour la correction de ce rapport.

Je remercie sincèrement Monsieur le Professeur Mahjoub Aouni, qui m'a accueillie dans son laboratoire et m'a co-encadré au cours de mes travaux et qui m'a aidée patiemment. Merci pour son dynamisme, sa franchise, ses compétences, pour le temps et la patience que vous m'avez accordée tout au long de ces années et surtout votre soutien continu malgré la distance géographique.

Je tiens tout particulièrement à adresser mes remerciements chaleureux à Monsieur le Docteur Gaël Belliot, responsable scientifique de ce travail et membre du jury. Gaël, merci pour votre encadrement exceptionnel, votre disponibilité, vos précieux conseils, vos encouragements et votre soutien quasi quotidien pendant toutes ces années. Merci d'avoir cru en mes capacités.

Je remercie aussi sincèrement Monsieur le Professeur Néji Gueddich pour sa contribution et sa confiance en tant que Chef de service de Pédiatrie et membre de comité d'éthique de CHU de Monastir en Tunisie.

Egalement je remercie le Pédiatre Dr Sabeur Hammami qui m'a aidée lors de la collection de mes échantillons cliniques. Merci pour sa disponibilité et son enthousiasme.

Mes remerciements vont également au Docteur Alexis De Rougemont qui a gentiment accepté de m'aider et m'encourager quand tout semblait impossible. Mille Merci Alexis de tout mon cœur.

Mes remerciements vont aussi à l'équipe du laboratoire de Virologie du Dijon, je suis reconnaissante pour leur gentillesse et leur aide surtout Philippe. C'est à toutes les personnes de l'équipe du Centre National de Référence des virus entériques à Dijon que je m'adresse pour leur dire combien j'ai été sensible à leur disponibilité, leur compétence, leur soutien, leur aide. J'ai eu plaisir à travailler avec vous. Merci beaucoup Katia, Jérôme, Lucie, Maxime et Céline. Vous êtes tous géniaux. C'était un énorme plaisir de travailler avec vous.

Je remercie chaleureusement mon cher ami et voisin de paillasse Davide, pour sa disponibilité, sa gentillesse sans limite et surtout ses précieux conseils. Tu t'étais toujours là pour moi. Un grand Merci.

Et je garde le meilleur à la fin, je tiens à remercier chaleureusement ma chère amie et sœur Marie Estienney pour sa gentillesse, sa douceur, ses conseils, son aide et pour sa contribution à la correction de mon manuscrit de thèse. Malgré son emploi du temps surchargé, elle n'a pas hésité à m'apporter son aide lors des problèmes rencontrés tout au long de ces années. T'es mon ange gardien au laboratoire.

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

**À Maman, Papa, mes sœurs Hajer, Manel, Nessrine, Sabrine  
et Sarra, et à ma Grand-Mère Lalla**

*« Bien entourée, le chemin paraît moins long.*

*C'est difficile mais c'est beau »*

*Sœur Louise Bonta*

**À la mémoire de mon cher oncle « Dr Henchiri Amor »**

## Résumé

Les rotavirus et les norovirus sont les principaux agents étiologiques des gastro-entérites en Tunisie. Pendant l'hiver 2011-2012, nous avons collecté les selles et les salives de 114 enfants âgés de moins de 6 ans, souffrant de gastro-entérites et admis à l'Hôpital Fattouma Bourguiba de Monastir. L'analyse des salives a montré que la cohorte se répartissait entre 79% de sécréteur et 21% de non-sécréteur (absence d'antigène dans les salives). Parmi les sécréteurs, les individus du groupe O étaient les plus représentés (42%) suivis des groupes A (30%), B (21%) et AB (7%) alors que 96% des patients étaient positifs pour l'antigène Lewis. Pour 98 patients, l'analyse génétique du sang a montré que le gène *FUT2* se répartissait entre 77.6% de sécréteur (Se+/Se+ et Se+/se-) et 22.4% de non-sécréteurs (se-/se-, N=22).

L'analyse des fèces a montré que les rotavirus et les norovirus étaient responsables respectivement de 22% et 31% des cas, les infections mixtes représentant 6% des cas. Parmi les norovirus, le génotype GII.3 était prédominant (69% de tous les NoV) tandis que le génotype G9P[8] était le plus fréquemment détecté de tous les rotavirus (37,5%).

Les rotavirus ont été détectés chez les individus sécréteurs (N=28) mais aussi chez 4 patients non-sécréteurs (3 souches G9P[8] et une souche G3P[8]). Nous n'avons pas observé de distribution particulière des rotavirus en fonction des antigènes A, B et H parmi les enfants sécréteurs. En revanche, nous avons constaté que l'infection à rotavirus ne s'était produite que chez les individus positifs pour l'antigène Lewis ( $P=0.017$ ). La présence de génotype P[8] chez des non-sécréteurs est inédite, elle a été confirmée par le séquençage du segment correspondant à VP8\* de ces rotavirus.

La majorité des infections à norovirus a été détectée chez les patients sécréteurs et cela sans distribution particulière en fonction des antigènes A, B, H et Lewis. Cinq GII.3, un GII.1 et un norovirus de génotype GII.7 ont été détectés chez les non-sécréteurs, Lewis-positifs. La production de particules de synthèse (VLP) de norovirus GII.3 en baculovirus à partir des selles d'un des patients non-sécréteurs nous a permis de tester les échantillons salivaires de toute la cohorte. L'absence d'attachement de ces VLP sur les salives des non-sécréteurs montre que la présence ou l'absence des antigènes de groupe ne reflète pas nécessairement le pouvoir infectieux des norovirus chez les jeunes enfants. Les résultats obtenus sur les rotavirus et les norovirus suggèrent qu'ils existent des voies alternatives aux antigènes de groupe sanguin pour l'attachement des rotavirus et des norovirus dans l'intestin.

**Mots clés :** rotavirus, norovirus, gastro-entérites, enfants, antigène de groupe sanguin, VLP

## Abstract

Rotavirus and norovirus are the main aetiological agents of gastroenteritis in Tunisia. Stool specimens and saliva were collected from children younger than 6 years of age, admitted to the Fattouma Bourguiba Hospital (Monastir, Tunisia) for gastroenteritis during the winter 2011-12. Saliva analysis showed that 79% and 21% patients had secretor and non-secretor phenotypes, respectively. Group O blood type was predominant (42%) followed by groups A (30%), B (21%) and AB (7%), whilst 96% of the patients were positive for Lewis antigen. For 98 patients, blood samples were available and were used for FUT2 genotyping. 77.6% of the cohort were secretor (Se+/Se+ and Se+/se-) and 22.4% were non-secretor (se-/se-).

Rotavirus and norovirus were found alone in 22% and 31% of the stool specimens, respectively. Mixed rotavirus-norovirus infections accounted for 6% of the cases. GII.3 noroviruses were predominant among the noroviruses whilst the G9P[8] genotype was predominant for the rotaviruses.

Rotaviruses were detected in secretor (N=28) as well as in non-secretor individuals (three G9P[8] strains and one G3P[8]). No significant association was found between ABO antigens or the secretor status and RV infection. Inversely, we observed that RV infection always occurred in Lewis-positive patients (P=0.017). The presence of the P[8] genotype was confirmed by sequencing part of the VP8\* coding region.

There was no significant association between norovirus infection and ABO antigens and the FUT2 genotype. Five GII.3, one GII.1 and one GII.7 noroviruses were found in Lewis-positive non-secretor patients. Virus-like particles from a GII.3 norovirus infecting a non-secretor patient from the cohort were expressed in baculovirus and used for binding assay with the 114 saliva samples of the study group. VLP binding with non-secretor saliva was negative and suggested that saliva binding assay might not reflect norovirus infectivity. Overall, our data suggested that rotavirus and norovirus infection might involve non-HBGA binding pathways as well as the canonical HBGA ligands.

**Keywords:** rotavirus, norovirus, gastroenteritis, children, HBGA, VLP

## Avant-propos

Les gastro-entérites aiguës entraînent une morbidité importante chez les personnes de tous âges et sont associées à une mortalité conséquente dans les pays en voie de développement. On estime que les gastroentérites sont à l'origine de 1,8 million de décès chaque année chez les enfants de moins de 5 ans, ce qui en fait la deuxième cause majeure de mortalité infantile après les affections respiratoires (Bryce et al. 2005; M. M. Patel et al. 2008). Dans les pays en voie de développement, la mauvaise prise en charge des gastroentérites peut aggraver celles-ci. Dans les pays industrialisés, les gastroentérites sont aussi fréquentes ; mieux prises en charge, elles constituent un problème économique important (Steiner et al. 2006).

Ainsi juste aux Etats-Unis il y a environ 200 millions de cas de gastro-entérite chaque année, entraînant plus de 1 million de visites chez le médecin, 152.000 malades aux urgences, plus de 470.000 hospitalisations et 5000 décès (Gastañaduy et al. 2013; Scallan et al. 2001). Au Canada, on recense environ 8 millions de cas chaque année. En Australie, les 17,2 millions de cas annuels, conduisent à plus de 41 000 hospitalisations et 217 décès (Scallan et al. 2001; Wheeler et al. 1999). Des observations ont été effectuées en Europe (Van Cauteren et al. 2012; Kuusi et al. 2003; Wheeler et al. 1999; De Wit et al. 2001; De Wit et al. 2001).

Si les gastro-entérites peuvent être parfois d'origine médicamenteuse, elles sont le plus souvent d'origines infectieuses. Il existe de nombreux agents infectieux entraînant des gastro-entérites. Ils peuvent être d'origine bactérienne (*Campylobacter spp*, *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli* (*E. coli*), *Salmonella spp*, *Shigella spp*), parasitaire (*Giardia Lambia*, *Cryptosporidium parvum* et *Toxoplasma gondii*) et virale. Les virus sont la cause la plus fréquente de gastro-entérites d'origine infectieuse. Les principaux virus impliqués sont les rotavirus, surtout chez les jeunes enfants, et les norovirus se retrouvant dans toutes les tranches d'âge (Bull et al. 2006; Hall et al. 2012; Mead et al. 1999; Scallan et al. 2011; Thomas et al. 2013).

## ***Table des matières***

<b>Rotavirus</b> .....	<b>2</b>
1. Structure et classification des rotavirus.....	<b>2</b>
1.1. Les protéines structurales.....	<b>2</b>
1.2. Les protéines non-structurales.....	<b>3</b>
2. Réplication des rotavirus.....	<b>7</b>
3. Physiopathologie des infections à rotavirus.....	<b>9</b>
3.1. Infection extra-intestinale.....	<b>10</b>
4. Réponse immunitaire à l'infection par les rotavirus.....	<b>11</b>
4.1. Immunité à médiation humorale.....	<b>11</b>
4.2. Immunité à médiation cellulaire.....	<b>12</b>
5. Détection et typage des Rotavirus.....	<b>12</b>
5.1. Détection.....	<b>12</b>
5.2. Typage des rotavirus.....	<b>13</b>
6. Epidémiologie.....	<b>14</b>
6.1. Transmission.....	<b>15</b>
6.2. Prévalence des génotypes de rotavirus du groupe A.....	<b>15</b>
7. Vaccination contre les rotavirus.....	<b>16</b>
7.1. Efficacité du vaccin anti-rotavirus.....	<b>17</b>
7.2. Invagination intestinale et infection à rotavirus.....	<b>18</b>
<b>Les norovirus</b> .....	<b>19</b>
1 Découverte du Virus de Norwalk.....	<b>19</b>
2 Organisation génomique.....	<b>19</b>
2.1. L'ORF 1.....	<b>20</b>
2.2. L'ORF 2 et la protéine VP1.....	<b>21</b>
2.3. L'ORF3 et la protéine VP2.....	<b>23</b>
3. Classification des norovirus.....	<b>24</b>
3.1. Classification des norovirus dans l'ORF2.....	<b>25</b>
3.2. Classification des norovirus dans la polymérase.....	<b>25</b>
3.3. Evolution et classification des norovirus GI.4.....	<b>26</b>
4. Tentative de mise en culture des norovirus humains.....	<b>27</b>
4.1. Le norovirus murin.....	<b>29</b>
4.2. Facteurs microbiens et culture des norovirus humains.....	<b>29</b>
5. Pathogenèse des norovirus.....	<b>30</b>
6. Immunité.....	<b>31</b>
7. Propriétés physico-chimique des norovirus et résistance à l'environnement.....	<b>31</b>
7.1. Moyen de destruction des norovirus.....	<b>32</b>
8. Méthode de détection des norovirus.....	<b>33</b>
9. Modes de transmission des norovirus.....	<b>34</b>

9.1.	Excrétion du norovirus .....	35
10.	Les manifestations cliniques.....	36
10.1.	Symptômes inhabituels.....	37
10.2.	Les infections chroniques .....	37
10.3.	Les infections asymptomatiques.....	38
11.	Epidémiologie .....	38
11.1.	Les gastro-entérites à norovirus d'origine alimentaire .....	39
11.2.	Epidémiologie moléculaire.....	40
12.	Traitement et vaccin .....	42
	<b>Les antigènes tissulaires de groupe sanguin .....</b>	<b>44</b>
1.	Généralités sur les antigènes tissulaires de groupe sanguin .....	44
2.	Biosynthèse des HBGA.....	45
3.	Expression des gènes FUT2 et 3 .....	46
4.	Norovirus et antigènes tissulaires de groupe sanguin.....	47
4.1.	Etude sur les volontaires et susceptibilité génétique aux norovirus .....	48
4.2.	Profil d'attachement des norovirus aux antigènes de groupe sanguin.....	50
4.3.	Etude de la liaison entre le norovirus et les HBGA.....	52
4.4.	Facteurs influençant l'attachement des norovirus aux HBGA .....	53
5.	Facteurs intervenant dans l'attachement des rotavirus .....	54
5.1.	Rôle des acides sialiques et des glycosaminoglycanes dans l'attachement des rotavirus.....	54
5.2.	Rôle des intégrines dans l'attachement des rotavirus .....	55
5.3.	Rôle des radeaux lipidiques.....	56
6.	HBGA et rotavirus.....	57
6.1.	Rotavirus et HBGA d'un point de vue épidémiologique .....	58
7.	Les différentes étapes de l'attachement du rotavirus.....	58
	Objectifs des travaux de la thèse.....	60
	<b>Matériels et Méthodes.....</b>	<b>62</b>
1.	Conception de l'étude .....	62
2.	Préparation des échantillons de selles .....	62
2.1.	Extraction de l'ARN viral à partir des échantillons fécaux.....	62
3.	Détection des rotavirus .....	63
3.1.	ELISA.....	63
3.2.	Détection moléculaire des rotavirus de groupe A .....	63
3.3.	Typage des rotavirus de groupe A.....	65
4.	Détection des norovirus .....	68
4.1.	Typage des norovirus humains.....	69
5.	Production des VLP dérivée du norovirus GII.3 souche SW4 .....	71
5.1	Amplification de l'ORF2.....	71
5.2.	Clonage de l'ORF2 de la souche SW4 .....	73

6.	Production et purification des VLP .....	77
6.1.	Principe.....	77
6.2.	Entretien des cellules d'insectes.....	78
6.3.	Co-transfection des cellules Sf9 avec le génome du baculovirus et le plasmide navette .....	79
6.4.	Plages de lyse et criblage des clones recombinants.....	80
6.5.	Production des protéines VP1 recombinantes .....	81
6.6.	Caractérisation des VLP .....	83
7.	Analyses des antigènes tissulaires des groupes sanguins .....	85
7.1.	Typage des salives.....	85
7.2.	Génotypage du gène FUT2.....	86
7.3.	Interaction des VLP avec les salives .....	86
8.	Analyses statistiques.....	87
	<b>Résultats de la surveillance épidémiologique .....</b>	<b>90</b>
1.	Echantillonnage .....	90
2.	Détection et typage des rotavirus.....	91
3.	Détection et typage des norovirus .....	92
9.	Typage des salives.....	92
9.1.	Phénotypage des salives .....	92
9.1.	Génotypage du gène <i>FUT2</i> .....	95
	<b>Relation entre les HBGA et les rotavirus .....</b>	<b>95</b>
1.	Présence des rotavirus chez des enfants non sécréteurs .....	98
	Conclusions et discussion des travaux sur les rotavirus .....	99
	<b>Relation entre les HBGA et les norovirus .....</b>	<b>102</b>
1.	Production et caractérisation des particules de synthèse du norovirus GII.3 souche SW4 .....	103
2.	Attachement des VLP GII.3 de la souche SW4.....	105
3.	Analyse des co-infections rotavirus-norovirus .....	106
	Conclusions et discussion des travaux sur les norovirus .....	107
	<b>Conclusion et perspectives .....</b>	<b>114</b>
	<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>118</b>
	<b>Annexes .....</b>	<b>152</b>

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1</b> : Protéines structurales (VP) et non-structurales (NSP) du rotavirus.....	<b>6</b>
<b>Tableau 2</b> : Caractéristiques des vaccins Rotarix® et RotaTeq.....	<b>17</b>
<b>Tableau 3</b> : Amorces et sonde utilisées pour l'amplification du gène codant la protéine de capsid VP2.....	<b>64</b>
<b>Tableau 4</b> : Mélange réactionnel pour l'amplification du gène codant la protéine de capsid VP2.....	<b>64</b>
<b>Tableau 5</b> : Cycles pour l'amplification du gène codant VP2 par RT-PCR temps réel.....	<b>65</b>
<b>Tableau 6</b> : Amorces utilisées pour les typages G (VP7) et P (VP4) des rotavirus.....	<b>66</b>
<b>Tableau 7</b> : Amorces utilisées pour l'amplification du gène codant VP8.....	<b>67</b>
<b>Tableau 8</b> : Mélange réactionnel pour l'amplification du gène codant VP8.....	<b>67</b>
<b>Tableau 9</b> : Cycles pour l'amplification du gène codant VP8.....	<b>67</b>
<b>Tableau 10</b> : Amorces et sondes utilisées pour l'amplification des norovirus GI et GII.....	<b>68</b>
<b>Tableau 11</b> : Mélange réactionnel pour l'amplification des norovirus GI.....	<b>69</b>
<b>Tableau 12</b> : Mélange réactionnel pour l'amplification des norovirus GII.....	<b>69</b>
<b>Tableau 13</b> : Cycles d'amplification de la RT-PCR temps réel des norovirus GI et GII.....	<b>69</b>
<b>Tableau 14</b> : Mélange réactionnel pour l'amplification de la polymérase.....	<b>70</b>
<b>Tableau 15</b> : Mélange réactionnel pour l'amplification de la capsid.....	<b>70</b>
<b>Tableau 16</b> : Liste des amorces pour le séquençage et le clonage de la souche SW4/GII.3.....	<b>72</b>
<b>Tableau 17</b> : Milieu réactionnel pour l'amplification de l'ORF2 entière.....	<b>72</b>
<b>Tableau 18</b> : Cycles d'amplification pour l'amplification de l'ORF2 entière.....	<b>73</b>
<b>Tableau 19</b> : Milieu réactionnel pour le screening des clones par PCR en point final.....	<b>74</b>
<b>Tableau 20</b> : Cycle PCR pour l'amplification de l'ORF2 entière.....	<b>75</b>
<b>Tableau 21</b> : Echantillonnage au cours de l'étude.....	<b>91</b>
<b>Tableau 22</b> : Répartition des antigènes des groupes sanguins après typage des salives.....	<b>93</b>

<b>Tableau 23</b> : Distribution des allèles FUT2 en fonction des groupes sanguins.....	<b>95</b>
<b>Tableau 24</b> : Distribution des génotypes de rotavirus en fonction des phénotypes HBGA et des génotypes sécréteur et non-sécréteur.....	<b>97</b>
<b>Tableau 25</b> : Distribution des norovirus en fonction des HBGA.....	<b>102</b>
<b>Tableau 26</b> : Distribution des norovirus en fonction des génotypes sécréteurs et non sécréteurs.....	<b>102</b>
<b>Tableau 27</b> : Répartition des rotavirus et des norovirus en fonction des HBGA.....	<b>106</b>

## Liste des figures

<b>Figure 1</b> : Représentation schématique d'un virion de rotavirus.....	<b>3</b>
<b>Figure 2</b> : Génome et structure du rotavirus.....	<b>5</b>
<b>Figure 3</b> : Phases du cycle de réplication du rotavirus.....	<b>9</b>
<b>Figure 4</b> : Organisation génomique des norovirus.....	<b>20</b>
<b>Figure 5</b> : Distribution phylogénétique des norovirus.....	<b>27</b>
<b>Figure 6</b> : Susceptibilité de la population aux infections à norovirus.....	<b>49</b>
<b>Figure 7</b> : Interactions des norovirus avec les HBGA.....	<b>51</b>
<b>Figure 8</b> : résultats des phénotypages des échantillons salivaires pour les antigènes A, B, H et Lewis.....	<b>94</b>
<b>Figure 9</b> : Modèle proposé pour l'attachement et l'internalisation du rotavirus dans la cellule hôte.....	<b>101</b>
<b>Figure 10</b> : Electrophorèse des protéines des VLP de l'étude.....	<b>104</b>
<b>Figure 11</b> : Attachement des VLP de la souche SW4 sur des salives référencées.....	<b>104</b>
<b>Figure 12</b> : Attachement des VLP de la souche SW GII.3 sur les salives de l'étude.....	<b>105</b>
<b>Figure 13</b> : Marquage immunohistochimique du duodenum par les VLP GII.3 de la souche SW.....	<b>109</b>
<b>Figure 14</b> : Attachement des VLP GII.4 variant Osaka de la souche Cairo 4 sur les salives de l'étude.....	<b>110</b>
<b>Figure 15</b> : Photographie en MEB d'une bordure en brosse de cellules Caco-2.....	<b>115</b>

## Liste des annexes

**Annexe 1 :** Avis du comité d'Éthique et de Recherche du CHU Fattouma Bourguiba à Monsatir, en Tunisie.

**Annexe 2: Rotavirus P[8] Infections in Persons with Secretor and Nonsecretor Phenotypes, Tunisia.** Siwar Ayouni, Khira Sdiri-Loulizi, Alexis de Rougemont, Marie Estienney, Katia Ambert- Balay, Serge Aho, Sabeur Hamami, Mahjoub Aouni, Mohamed Neji-Guediche, Pierre Pothier, Gaël Belliot. *Emerging Infectious Diseases*. 2015 Nov;21(11):2055-8.

**Annexe 3: Relationship between GII.3 Norovirus infections and blood group antigens in young children in Tunisia.** Ayouni Siwar, Estienney Marie, Sdiri-Loulizi Khira, Ambert-Balay Katia, de Rougemont Alexis, Aho Serge, Hammami Saber, Mahjoub Aouni, Guediche Mohamed Neji, Pothier Pierre, Belliot Gaël. *Clinical Microbiology and Infection*. 2015 Sep; 21(9):874.e1-8.

# **INTRODUCTION**

# Rotavirus

## 1. Structure et classification des rotavirus

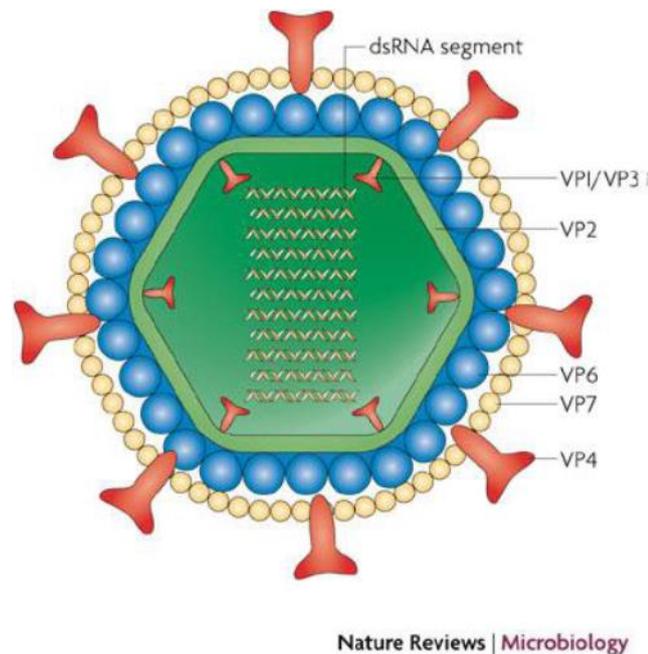
Les rotavirus font partie de la famille des *Reoviridae* (**Figure 1**). Les rotavirus sont donc des virus non-enveloppés dont le diamètre de la particule virale est de 70 nm et 100 nm si on rajoute les spicules. Le génome est constitué de 11 segments d'ARN double brin qui code 8 protéines structurales (VP1, VP2, VP3, VP4, VP6 et VP7) et 6 protéines non structurales (NSP1 à 6). Chaque segment code une protéine structurale sauf le segment 11 codant les protéines NSP5 et 6.

### 1.1. Les protéines structurales

Les protéines structurales forment la nucléocapside et certaines d'entre elles ont des fonctions enzymatiques. La structure du virion est complexe, celle-ci est formée d'une triple couche protéique (le core du virion, la couche intermédiaire et la couche externe). Les protéines VP1, VP2 et VP3 forment le core du virion. La protéine VP1 est une polymérase virale. La protéine VP2 est une protéine support qui est essentielle dans le fonctionnement de VP1. La protéine VP3 a une fonction guanylate (coiffe des ARN). Les protéines VP1, 2 et 3 s'organisent en trimère. La protéine VP6 est le composant unique de la couche intermédiaire, elle s'organise sous forme trimérique. C'est la protéine la plus abondante dans le virion. Elle définit les antigènes de groupe, A à H. Les protéines VP4 et VP7 sont les constituants de la couche externe, elles s'organisent également entre elles en trimère. La protéine VP7, porteuse de l'antigène de type G, induit la production d'anticorps neutralisants. C'est une glycoprotéine qui est stabilisée par les ions  $Ca^{2+}$ .

La protéine VP4 (88 kDa) induit également la production d'anticorps neutralisants. Elle est porteuse de l'antigène de type P. Cette protéine est directement impliquée dans l'attachement du rotavirus à la surface des entérocytes. Organisées en trimère, les protéines VP4 forment des spicules à la surface du virion. Pour certains rotavirus, la protéine VP4 a une fonction d'hémagglutination qui est sensible à la neuraminidase éliminant les motifs sialylés. Lors des phases d'attachement et d'internalisation du virus, la protéine VP4 est clivée en deux sous-produits, VP5\* (55 kDa) et VP8\* (28 kDa). L'attachement du rotavirus à la cellule ne

nécessite pas le clivage de la protéine VP4. La reconnaissance des ligands cellulaires se fait par le biais du domaine VP8\* de VP4, mais l'attachement du rotavirus à la cellule ne nécessite pas le clivage de la protéine VP4. En revanche, les étapes initiales de l'internalisation du virion requièrent le clivage de celle-ci et la médiation par la protéine VP5\* qui serait ensuite impliquée dans la fusion des membranes endosomales.



**Figure 1.** Représentation schématique d'un virion de rotavirus d'après Juana Angel et al. 2007 (Nature).

## 1.2. Les protéines non-structurales

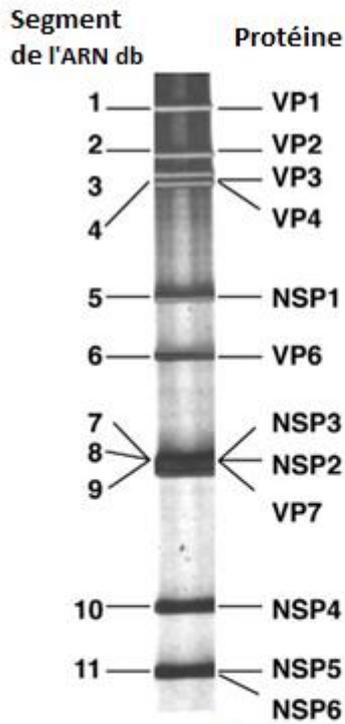
Les six protéines non structurales, NSP1-6 (**Figure 2**), codées par le rotavirus, sont exprimées dans les cellules hôtes lors de sa réplication. A l'exception de NSP4, les autres protéines non-structurales ont la propriété d'interagir avec les acides nucléiques (**Tableau 1**). La protéine NSP1 induit la dégradation de l'IRF3 (Interferon Regulatory Factor 3) et par conséquent bloque la production d'IFN (interféron) de type I et l'activation des gènes antiviraux induits par cette même voie.

La protéine NSP2 est un enzyme multifonctionnel qui intervient dans la réplication et la transcription du rotavirus. Cette protéine se fixe à l'ARN double brin et a une activité NTPase (Taraporewala et al. 1999). Dans la cellule infectée, la protéine NSP2 avec NSP5 forment des viroplasmes (Hu et al. 2012; Poncet et al. 1997). *In vitro* la protéine NSP2 seule ou en

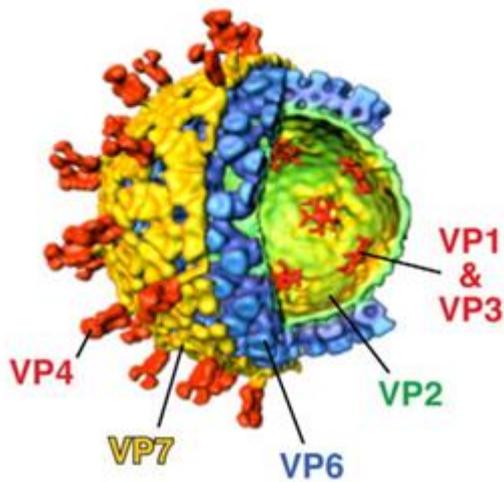
présence de dimère de NSP5 peut s'auto-assembler en octamère qui est l'unité de base des viroplasmés. Ces viroplasmés interagissent avec les lipides des organelles cellulaires et les protéines structurales du rotavirus, en particulier VP1-3, pour former les complexes de traduction-réplication dans lesquels sont assemblées les particules virales et synthétisés les ARN viraux. La protéine NSP5 est glycosylée (Gonzalez et Burrone 1991) et autophosphorylée, car elle possède les propriétés d'une kinase, lui donnant une masse de 28 à 35 kDa selon le niveau de phosphorylation (Afrikanova et al. 1996; Blackhall et al. 1997). Cette protéine interagit directement avec la protéine VP2 dans le viroplasmé (Berois et al. 2003). Il a été proposé qu'elle joue un rôle modulateur de la protéine NSP2.

La protéine NSP3 intervient lors de la traduction des protéines virales en jouant un rôle analogue à la protéine cellulaire PABP (Poly A Binding Protein). La protéine NSP3 permet ainsi de ponter les extrémités 5' et 3' des ARN messagers viraux qui à la différence des ARN messagers de la cellule ne sont pas polyadénylés en 3'. Jouant un rôle actif dans la traduction, la protéine NSP3 interagit avec eIF4 (eukaryotic-initiation factor 4). Cette protéine joue également un rôle dans le « shut off » de la machinerie cellulaire et en particulier de la traduction des ARN messagers cellulaires.

La protéine NSP4 est une entérotoxine virale qui induit la diarrhée chez la souris et la perte d'électrolytes par la libération d'ions chlorure par les cellules épithéliales de l'intestin. La protéine NSP4 est également impliquée dans l'assemblage des particules virales. Jouant le rôle d'une porine pour les ions  $Ca^{2+}$ , la protéine NSP4 a un rôle actif dans l'assemblage des particules de rotavirus. La protéine se retrouve principalement dans le cytoplasme, le réticulum endoplasmique et en faible quantité dans l'appareil de Golgi. La protéine NSP6 est quant à elle codée par le même segment que NSP5. Cette protéine de 12 kDa est la moins étudiée. Certains rotavirus humain ne possèdent pas de protéine NSP6, suggérant que NSP6 est probablement accessoire.

**A**

*Figure 2* Génome et structure du rotavirus. A). Electrophorétype des 11 segments d'ARN double brin du génome des rotavirus. La numérotation des segments est indiquée sur la gauche. Sur la droite sont légendées les protéines codées par chaque segment. B). Reconstruction d'un virion d'un rotavirus à partir des analyses effectuée en cryo-microscopie. Chaque protéine structurale est indiquée par une couleur différente (adapté de Greenberg et Estes 2009).

**B**

*Tableau 1 : Protéines structurales (VP) et non-structurales (NSP) du rotavirus Tableau adapté de la thèse de A. Kamel 2009*

Nom	Segment	Poids moléculaire (kDA)	Taille (bp)	Propriétés
VP1	1	125	3302	ARN polymérase virale, complexe avec VP3
VP2	2	102	2690	Interagit avec VP1 et VP3, rôle structural dans la transcription, la réplication et l'assemblage des protéines.
VP3	3	98	2591	Guanyltransférase, méthyltransférase, complexe avec VP1
VP4 (VP5*+VP8*)	4	86,5	2362	Protéine de spicule dimérisée, oligomérisée avec VP7 et NSP5, liée à la virulence, induit des anticorps neutralisants, clivée en VP5* et VP8* (protéine d'hémagglutination), impliquée dans l'attachement du virus aux cellules, induit la perméabilisation membranaire après trypsination, présente dans la membrane plasmique et associée aux microtubules
VP6	6	44,8	1356	Protéine majoritaire, antigénique, n'induit pas d'anticorps neutralisants, interaction absolue avec VP2 pour la transcription, possède les canaux pour sortie des ARNm
VP7	9	37,3	1062	Antigénique, induit des anticorps neutralisants, induit la perméabilisation membranaire après clivage, glycosylée, insérée dans la membrane du réticulum plasmique, intégrité structurale calcium dépendante.
NSP1	5	58,6	1611	Fonction inconnue. Motif en doigt de zinc N-terminal, fixe le zinc, lie les ARNm viraux
NSP2	8	36,7	1059	Fixe les ARN double brins viraux, multimérisé, intervient dans la réplication, impliquée dans la formation des viroplasmés, activité NTPase
NSP3	7	34,6	1104	Fixe les ARNm viraux sur la séquence consensus 3', dimérise, non viroplasmique, interagit avec le facteur de transcription eIFG4 et la protéine RoXaN
NSP4	10	28	751	Fonction multiple. Glycoprotéine, ancrée dans la membrane du réticulum endoplasmique, récepteur intracellulaire des particules immatures, tétramérise, déstabilise la membrane plasmique, entérotoxine virale
NSP5	11	21,7	667	Formation des viroplasmés, interagit avec NSP2, O-glycosylée, auto-phosphorylée
NSP6	11	12		Viroplasme, interagit avec NSP5

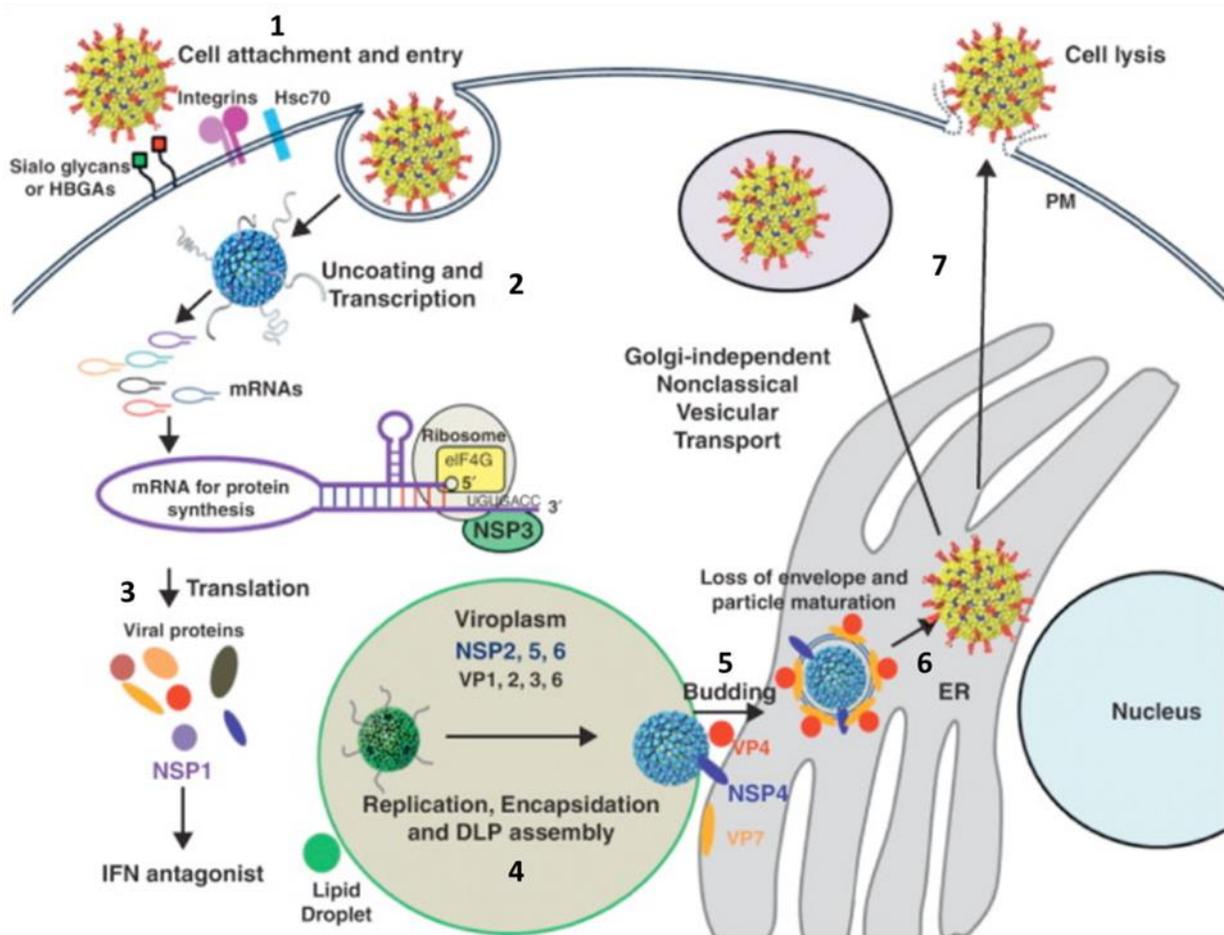
## 2. Réplication des rotavirus

L'adaptation à la culture cellulaire de nombreux rotavirus a permis une étude détaillée de leur réplication (Knipe et Howley 2013.; Trask et al. 2012) (**Figure 3**). Un grand nombre d'études sur la réplication des rotavirus a été ainsi effectué sur la lignée cellulaire MA104 avec la souche de rotavirus simienne (RRV). Dans les cellules MA104, la réplication du rotavirus *in vitro* est maximale entre 10 et 12 heures post-infection (hpi), lorsque les cellules sont infectées à une MOI élevée (MOI : Multiplicity of infection) (Knipe et Howley 2013). La réplication des rotavirus cependant diffère en fonction de la lignée cellulaire. Par exemple pour les cellules Caco-2, la réplication est plus lente et est maximale qu'entre 20 et 24 hpi (Knipe et Howley 2013).

La réplication rotavirus a lieu dans les viroplasmes, ces derniers se situant dans le cytoplasme à proximité du noyau et du réticulum endoplasmique (Knipe et Howley 2013). Les flux de calcium entre les compartiments cellulaires jouent un rôle prépondérant durant le cycle viral, en particulier lors des étapes de décapsidation et dans la morphogénèse des particules de rotavirus (Bugarcic et Taylor 2006). L'appareil de Golgi, lieu de la glycosylation cellulaire n'est pas directement impliqué dans la réplication du rotavirus.

L'attachement du virus se fait par le biais de la protéine VP4. Le rotavirus présente un tropisme entérique. *In vivo*, le récepteur n'a pas été clairement identifié. Cependant les travaux effectués *in vitro* sur plusieurs lignées cellulaires sensibles au rotavirus suggèrent que l'acide sialique (Haselhorst et al. 2009), les intégrines (Seo et al. 2008) et les antigènes de groupe sanguin (Hu et al. 2012; Nordgren et al. 2014) sont des ligands du rotavirus intervenant lors de la phase d'attachement. L'accroche du rotavirus aux entérocytes induit un changement conformationnel de la protéine VP4 qui est clivée en VP5\* et VP8\*. L'exposition dans l'intestin des particules virales permettrait aux protéases de cliver la protéine VP4 en VP5\* et VP8\*. Le domaine correspondant à VP8\* permet la reconnaissance des ligands. Après l'étape d'attachement, la pénétration du virus peut se faire par endocytose, médiée par la protéine VP5\*, ou par pénétration directe de la particule dans la cellule (Kaljot et al. 1988; Wolf et al. 2011). L'endocytose est dépendante de flux de calcium (Ruiz et al. 1997). Enfin, selon la souche de rotavirus, les voies d'endocytose sont différentes (Gutiérrez et al. 2010).

La diminution des concentrations en ions  $\text{Ca}^{2+}$  dans l'endosome entraîne une décapsidation partielle du rotavirus avec la perte de la couche externe constituée de VP7, VP5\* et VP8\*. La disparition des membranes endosomales entraînent la libération des particules virales double couche (Core : VP1-3 et couche intermédiaire VP6) dans le cytoplasme (Desselberger 2014). La transcription et la traduction du génome virale ont ensuite lieu dans le cytoplasme de la cellule. La synthèse des nouveaux ARN viraux résulte de l'activité des protéines structurales VP1 et VP3 à l'intérieur des complexes de réplication que sont les viroplasmes. Produits en grande quantité, les ARN de polarité positive nouvellement synthétisés servent de messagers au début du cycle infectieux alors qu'à la fin du cycle de réplication, ils restent dans le core où ils servent de matrice pour la synthèse des brins complémentaires et ainsi former de nouveaux génomes viraux double brins (Desselberger 2014). L'assemblage des particules virales se fait au niveau des viroplasmes. Soulignons que les connaissances que nous avons sur les étapes de la réplication et les mécanismes qui régissent la production de nouveaux virions sont très parcellaires. La protéine NSP4 joue un rôle clé dans la maturation des particules virales (Silvestri et al. 2005). Localisée au niveau du réticulum endoplasmique, elle interagit avec la protéine VP6 constituant les DLP (VP1-3+VP6+ARNds) qui sont enveloppées de façon transitoire (Estes et Greenberg 2013; Taylor et al. 1996). Cette enveloppe disparaît dans le réticulum endoplasmique sans que le mécanisme en soit élucidé, il coïncide avec le greffage aux DLP des trimères de protéine VP4. A l'intérieur du réticulum endoplasmique, la maturation des capsides s'achève par l'addition des protéines VP7. Le virus est libéré dans la lumière intestinale après la lyse des entérocytes ou par le biais de vésicules générées par l'appareil de Golgi.



**Figure 3.** Etapes du cycle de répllication du rotavirus (d'après Li et al. 2012). 1. Attachement et entrée du virus ; 2. Décapsidation et transcription des ARN viraux ; 3. Traduction des ARNm ; 4. Réplication du génome viral et assemblage des DLPs ; 5. Translocation des DLPs dans le réticulum endoplasmique ; 6. Acquisition de la capsid externe ; 7. Relargage des particules virales matures (TLPs).

### 3. Physiopathologie des infections à rotavirus

La gravité et la localisation de l'infection par le rotavirus varient selon les espèces animales et surtout l'âge. L'infection est presque exclusivement limitée à l'intestin grêle. Le rotavirus infecte les entérocytes matures se situant dans les parties supérieures des villosités du petit intestin (Lundgren et Svensson 2001). Au niveau cellulaire, l'infection est caractérisée par une vacuolisation du cytoplasme et l'atrophie des villosités.

Il y a eu peu d'études histopathologiques de la muqueuse duodénale des nourrissons infectés par le rotavirus (Davidson et Barnes 1979; [No authors listed] 1975). Les rares biopsies qui ont été étudiées ont permis de constater le raccourcissement et l'atrophie des villosités dans un épithélium infiltré par des lymphocytes. L'étude post-mortem de section d'intestin d'enfants infectés par le rotavirus a permis d'observer des changements dégénératifs de l'épithélium avec une infiltration de la *lamina propria* par des cellules inflammatoires. Il a été également observé une hyperplasie des plaques de Peyer lors de l'infection (Lynch et al. 2003). Ces changements structuraux se situent au niveau de l'intestin grêle. Au niveau cellulaire, le réticulum endoplasmique paraît distendu avec des mitochondries de plus grande taille. Ces changements structuraux sont toujours accompagnés par la disparition des microvillosités du pôle apical des entérocytes (Davidson et Barnes 1979; [No authors Listed] 1975).

L'origine de la diarrhée est multifactorielle. La composante osmotique est due à une mauvaise adsorption des fluides suite à la destruction des entérocytes au sommet des villosités et une malabsorption du glucose. Il y a également une composante sécrétoire due à l'action de la protéine NSP4, du système nerveux entérique et de molécules telles que la sérotonine (Ball et al. 1996; Hagbom et al. 2011, 2012; Kordasti et al. 2004; Kordasti et al. 2006; Lundgren et al. 2000).

Les infections à rotavirus se caractérisent également par des vomissements. Il a été récemment démontré que l'infection entraîne le relargage de sérotonine par les cellules entérochromaffines. Celle-ci est impliquée dans l'activation des zones du cerveau impliquées dans les nausées et dans les vomissements (Hagbom et al. 2011).

### **3.1. Infection extra-intestinale**

La virémie à rotavirus est fréquente mais les manifestations cliniques extra-intestinales sont rares. Lors de l'infection, ARN et antigène viraux (VP6) sont fréquemment détectés dans le sang des patients (Blutt et al. 2003; Chiappini et al. 2005; Fischer et al. 2005; Moon et al. 2012; Nakagomi et Nakagomi 2005; Ray et al. 2006). En revanche à l'exception d'un cas (Sarah E Blatt et al. 2007), l'isolement et la culture de particules infectieuses de RV à partir de sérum humain a échoué et cela peut-être en raison de la présence de facteurs d'inhibition dans le sérum et du faible nombre de particules infectieuses virales (Beisner et al. 1998; Smith et al. 1979). Dans certaines conditions, l'infection à rotavirus peut atteindre le foie, les poumons, les reins, la

rate, le cœur et les ganglions lymphatiques mésentériques (Kawashima et al. 2012; Ramig 2007) où des ARN viraux ont été détectés dans plusieurs de ces organes (Li et wang 2003; Lynch et al. 2003; Morrison et al. 2001; Nakano et al. 2011), par exemple dans le liquide céphalorachidien . Les complications associées sont de plusieurs sortes : encéphalite, méningite, syndrome de Kawasaki, mort subite du nourrisson, abcès hépatique, exanthème, convulsions et pancréatite (Blutt et Conner 2007). Récemment, il a été observé que chez les enfants immunocompétents l'infection à rotavirus était fréquemment associée à des taux sériques élevés de transaminases hépatiques suggérant une atteinte du foie (Akelma et al. 2013). D'autres observations ont également associés l'infection à rotavirus à des troubles respiratoires tels que la toux, les pharyngites, les otites et la pneumonie à l'infection à rotavirus sans qu'ils puissent être reliés virologiquement au rotavirus. En fait il s'agirait plus d'infections hivernales concomitantes

## **4. Réponse immunitaire à l'infection par les rotavirus**

### **4.1. Immunité à médiation humorale**

Les protéines VP4 et VP7 composant la couche externe des particules de rotavirus induisent des anticorps neutralisants (Ruggeri et Greenberg 1991). Cependant, certains anticorps orientés contre la protéine VP6 (Aladin et al. 2012; Burns et al. 1996), et l'entérotoxine NSP4 (Desselberger et Huppertz 2011; Hou et al. 2008) peuvent également conférer une protection efficace contre les rotavirus.

Les premières études sur l'infection par les rotavirus d'enfants sains suggèrent que les taux d'anticorps sériques spécifiques des rotavirus, en particulier celui de l'immunoglobuline A (IgA), sont corrélés avec la protection contre le virus. La présence d'anticorps sérique reflète l'immunité mucoale qui joue un rôle crucial dans la protection. Cette protection se caractérise par des niveaux élevés d'IgA dans les selles (Coulson et al. 1992; Matson et al. 1993). D'un point de vue expérimental, il a été démontré chez le modèle murin que les IgA sécrétoires étaient protectrices (Giammarioli et al. 1996; Ruggeri et al. 1998). La neutralisation des rotavirus par les IgA sécrétoires pourrait également se produire dans la cellule lors de la transcytose des immunoglobulines vers la lumière intestinale (Corthésy et al. 2006; Ruggeri et al. 1998). Les sérologies très positives chez les personnes présentant un déficit en IgA d'origine génétique (Blutt et al. 2012; Istrate et al. 2008; Nordgren et al. 2014) attestent que les IgG dirigées contre la

protéine VP6 peuvent également jouer un rôle protecteur, même si les IgA jouent un rôle majeur dans la protection.

## **4.2. Immunité à médiation cellulaire**

La contribution de la réponse immunitaire à médiation cellulaire est démontrée pour la résolution de l'infection (Franco et al. 2006) mais elle est relativement peu connue pour la protection contre l'infection. Des éléments sont en faveur d'une participation de ce type d'immunité car la protection contre l'infection à rotavirus n'est pas entièrement corrélée avec la concentration d'anticorps neutralisants dirigés contre VP4 et VP7. Par ailleurs le transfert passif de cellules T CD8 spécifiques du rotavirus induit une protection (Offit 1994).

## **5. Détection et typage des Rotavirus**

### **5.1. Détection**

La détection d'une infection à rotavirus est importante pour le contrôle des épidémies et la prévention des infections nosocomiales (Feeney et al. 2011). La microscopie électronique (EM) a permis la découverte du virus en 1973 et a été utilisée par la suite pour la détection des rotavirus. Cependant, cette méthode manque de sensibilité, elle nécessite un personnel formé à la technique et le coût de l'équipement est très élevé (Jothikumar et al. 2009; Pang et al. 2004).

La ME a été remplacé pour le diagnostic des rotavirus par des trousse de détection rapide basées sur des dosages immuno-enzymatiques, d'abord par agglutination au latex puis plus tard par immunochromatographie, technique plus simple et plus rapide. L'intérêt de ces tests est la rapidité d'exécution, le faible coût et le peu de formation que nécessite la mise en œuvre des tests. La sensibilité de ces techniques est plus faible que celle des techniques de biologie moléculaire (Gómara et al. 2001; Jothikumar et al. 2009; Nordgren et al. 2010), mais elle est cependant suffisante pour le diagnostic des infections symptomatiques. L'amélioration et la simplification des techniques de PCR en temps réel a permis leur utilisation dans un grand nombre de laboratoire. Ces techniques moléculaires sont très utiles pour la détection des porteurs asymptomatiques qui sont clés dans la diffusion du virus dans la population. La plupart des

systèmes PCR ciblent les segments correspondant à NSP3, VP6 et VP7 (Feeney et al. 2011; Jothikumar et al. 2009; Nordgren et al. 2010; Pang et al. 2004).

Les autres méthodes comme la culture du virus ou l'électrophorèse des segments génomiques sont plus adaptés à la recherche. Seules certaines souches sont adaptées à la culture cellulaire et la migration des ARN viraux en gel polyacrylamide nécessite une charge virale élevée. Cette dernière technique est maintenant remplacée par les méthodes de biologie moléculaire, beaucoup plus pertinentes pour la caractérisation et la différenciation des souches virales.

## **5.2. Typage des rotavirus**

Le typage des rotavirus est déterminé par les caractéristiques antigéniques des protéines VP4 et VP7 capables d'induire des anticorps neutralisants. Ainsi les rotavirus auront une classification binaire avec la détermination du type G (VP7) et du type P (VP4). Par manque de réactifs immunologiques, la détermination des sérotypes G et P est remplacé par le classement phylogénétiques des séquences codant les protéines VP4 et VP7. A ce jour, 27 génotypes G et 37 génotypes P ont été décrits. Il y a une parfaite correspondance entre génotype et sérotype G. Ce n'est pas le cas pour les génotypes et sérotypes P qui nécessitent alors une double nomenclature. Le génotype P[8] correspond par exemple au sérotype P1A. En pratique, le génotypage des rotavirus a complètement supplanté le sérotypage. Le génotypage est couramment effectué à l'aide de PCR nichée (Gouvea et al. 1990). Depuis les travaux de Gouvea et al., il y a eu une amélioration des amorces et de la technique qui rendent le typage des rotavirus à la fois fiable et aisé. Cependant, le recours au séquençage et l'analyse phylogénique des segments codant VP4 et VP7 reste quelques fois nécessaire. Très récemment, pour les besoins d'études épidémiologiques et phylogénétiques approfondies, il a été proposé d'élargir ce procédé de génotypage aux 11 segments composant le génome viral (Kim et al. 2012; Martel-Paradis et al. 2013; Monini et al. 2014; Okitsu et al. 2013). Pour la nomenclature, les segments sont codés de la façon suivante : I-R-C-M-A-N-T-E-H en plus des types G et P. Ces lettres suivies d'un chiffre lors du typage correspondent respectivement aux segments codant les protéines VP1-VP2-VP3-VP6-NSP1-NSP2-NSP3-NSP4-NSP5.

## 6. Epidémiologie

Les épidémies de rotavirus ont lieu durant les mois hivernaux dans les zones tempérées. Dans les zones tropicales, les infections à rotavirus s'échelonnent sur toute l'année, mais avec une élévation du nombre de cas pendant la saison sèche correspondant aux mois les plus froids.

Le rotavirus est l'agent étiologique principal des gastro-entérites sévères chez les enfants de moins de 5 ans dans le monde entier. On estime qu'il y a chaque année près de 25 millions de consultations chez le médecin, et 2 millions d'hospitalisations suite à une infection par le rotavirus (Fritzell 2001; Fischer et al. 2004). Avant l'âge de 5 ans, on considère que la grande majorité des enfants aura été infectée au moins une fois par le rotavirus. La morbidité et surtout la mortalité associées à l'infection ne sera pas la même entre les pays développés et ceux en voie de développement.

Dans les pays développés comme les Etats-Unis, avant que la vaccination soit proposée, le rotavirus était responsable de 30 à 50% des gastro-entérites chez les enfants de moins de 5 ans et de 30 à 50% des cas les plus graves nécessitant une intervention médicale (Estes et al. 2013). Les infections à rotavirus ainsi représentaient 3 millions de cas, 500.000 consultations médicales, 70 à 80.000 hospitalisations et 20 à 40 décès par an. En Europe, les chiffres étaient de même grandeur avec toutefois un nombre supérieur d'hospitalisations (N=90.000) et plus de 200 décès par an sur le continent. En France, les infections à rotavirus sont responsables chaque année de 18.000 hospitalisations et de 6 à 12 décès (Melliez et al. 2005). Avant l'introduction de la vaccination contre le rotavirus, on a estimé aux Etats-Unis que chaque année les infections à rotavirus coutaient à la société 1,4 milliard de dollar dont 400 millions de frais médicaux (Estes et Greenberg 2013). Dans les pays développés, l'introduction du vaccin contre le rotavirus a permis de réduire considérablement la mortalité et surtout la morbidité associées au rotavirus comme l'atteste l'étude multi-centrique à grande échelle menée par les CDC entre 2000 et 2014 aux Etats-Unis (Aliabadi et al. 2015).

Dans les pays en voie de développement, morbidité et mortalité associées aux infections à rotavirus, sont importantes. Il y a environ 100 millions de cas de gastro-entérites par an chez les enfants de moins de 5 ans et dans un cas sur 5, l'infection entraîne la consultation d'un médecin. A cause de différents facteurs comme l'absence d'hygiène ou la malnutrition, la mortalité due au rotavirus est bien supérieure. On estime en effet que le rotavirus est responsable de 500.000 décès

par an en particulier dans les pays de l'Asie du Sud-Est et de l'Afrique sub-saharienne (Estes et Greenberg 2013)

## **6.1. Transmission**

Le virus se transmet par voie oro-fécale de personne à personne ou par l'intermédiaire d'objets contaminés (Murphy et al. 2001). La charge virale élevée et la durée de l'excrétion virale dans les selles sont les facteurs favorisant la transmission du rotavirus (Chen et Hibbs 1998). Les particules virales, au demeurant très infectieuses, sont excrétées en grande quantité dans les matières fécales dès 2 jours après l'infection. L'excrétion se prolonge en moyenne jusqu'à 10 jours après l'apparition des symptômes (Richardson et al. 1998). Les rotavirus infectent un grand nombre de mammifères et d'oiseaux le risque de co-infection existe. Il est ainsi possible de co-infecter expérimentalement des souris simultanément avec un rotavirus d'origines simienne et bovine et de produire des rotavirus recombinants dont les capacités de réplication sont supérieures à celles des souches originales (données personnel A. Kapikian). Dans la nature, l'analyse phylogénétique des différents segments génomiques d'un rotavirus montre que ceux-ci peuvent provenir de différentes espèces. Ainsi l'analyse phylogénétiques des souches bovines G8P[7] et G6P[7] décrites récemment en Corée a démontré que les segments de génomes avaient des origines bovines mais aussi humaines et porcines (Park et al. 2011). Cependant, une transmission zoonotique du rotavirus est rarement efficace car celui-ci se réplique peu dans son nouvel hôte pour lequel il n'est pas encore adapté. Cette restriction d'espèce relative explique pourquoi la transmission directe des rotavirus animaux à l'homme est rare (Greenberg et Estes 2009).

## **6.2. Prévalence des génotypes de rotavirus du groupe A**

Les rotavirus sont classés selon leur génotype plutôt que leur sérotype, plus difficiles à déterminer. Le génotype des rotavirus est déterminé par les gènes codant la protéine VP4 (génotype P) et VP7 (génotype G). Cette nomenclature binaire, G et P, offre en théorie une grande diversité des génotypes des rotavirus. En pratique, cette diversité génotypique est plus limitée. C'est ainsi que 90% des infections à rotavirus chez l'homme sont causés par cinq

sérotypes appartenant tous au groupe A. Il s'agit des génotypes G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8] et G9P[8]. Le type G1P[8] représente à lui seul plus de 60% des cas. Il y a moins de variation dans la distribution des souches de génotype P que pour les souches de génotype G et c'est ainsi que le génotype P[8] est prédominant et induit 80% des infections mondiales. De plus, des fluctuations géographiques et temporelles importantes ont été observées dans la distribution des différentes souches. Par exemple le type G1P[8] est prévalent à 70% en Amérique du Nord, en Europe et en Océanie alors qu'il représente seulement 30% des souches en Afrique (Honma et al. 2007; Santos et Hoshino 2005). Le génotype P[8] est quant à lui prévalent à 50% en Afrique, 70% en Asie et à 90% dans les pays occidentaux. Dans les pays européens, il existe chaque année des fluctuations entre les génotypes prédominants, l'émergence et la prédominance de génotypes inhabituels est rare (Cilla et al. 2010; Lennon et al. 2008; de Rougemont et al. 2010). Des associations G/P inhabituelles ont été caractérisées et sont bien souvent le produit de réassortiments entre souches humaine et animale ; le sérotype G5 est par exemple issu d'une souche porcine (Parez 2007; Santos et Hoshino 2005). En Inde, au Brésil et en Afrique, les souches de rotavirus G9P[6], G5 et G8 sont plus fréquentes que dans d'autres parties du monde (Santos et Hoshino 2005). Il faut souligner que la plus grande variabilité des rotavirus est observée en Afrique, où les souches circulant avec une combinaison G-P inhabituelles, probablement issues d'une transmission zoonotique, sont les plus fréquentes (Todd et al. 2010).

Après l'introduction de la vaccination contre le rotavirus, la question de la prévalence des anciens génotypes et l'émergence de nouveaux génotypes s'est posée. Dans leur étude bibliographique, Leshem et al. ont analysé rétrospectivement 63 publications sur la prévalence des rotavirus après vaccination. L'analyse globale de ces travaux a montré que l'implémentation du vaccin n'entraînait pas l'émergence d'un génotype quelconque et que la distribution génotypique des rotavirus restait identique avec toujours la même alternance des génotypes circulants d'une année à l'autre (Leshem et al. 2014).

## **7. Vaccination contre les rotavirus**

La mortalité en Afrique et en Asie, la morbidité et les coûts économiques associés à l'infection par les rotavirus dans les pays développés ont motivé la conception de plusieurs vaccins visant à réduire les risques sanitaires que posent les rotavirus. Actuellement, deux vaccins

sont disponibles sur le marché, RotaTeq et Rotarix (**Tableau 2**). Le vaccin RotaTeq contient 5 rotavirus réassortis atténués développés à partir d'une souche bovine dans laquelle on a remplacé le gène codant la protéine VP7 ou VP4 par un gène de rotavirus humain codant un des génotypes suivants : G1, G2, G3, G4 et P[8] (ou sérotype P1A). Il est administré en 3 doses par voie orale. Le vaccin Rotarix est formulé à partir d'une souche atténuée de rotavirus humain. Deux 2 doses suffisent pour la vaccination. Elles sont également administrées par voie orale (Franco et al. 1994).

**Tableau 2** Caractéristiques des vaccins Rotarix® et RotaTeq (Adapté de Lopman et al. 2012)

	RotaTeq ® (RV1)	Rotarix ® (RV5)
fabricant	Merck	GlaxoSmith Kline Biologicals
conception	Live, le pentavalent oral	Humain vivant atténué
Composition antigénique	G1, G2, G3, G4, P1A : souches ressortant provenant d'une souche bovine WC3 (type G6P7 [5])	G1P1A provenant de la souche humaine 89-12
Nombre de doses	3	2
Calendrier de vaccination	La première dose doit être administrée entre 6 et 12 semaines d'âge et la dernière dose de 6 mois d'âge, avec au moins 4 semaines entre les deux doses)	La première dose doit être administrée entre 6 et 12 semaines d'âge et la dernière dose de 6 mois d'âge, avec au moins 4 semaines entre les deux doses)

### 7.1. Efficacité du vaccin anti-rotavirus

Dans les pays disposant d'un programme de vaccination contre le rotavirus, l'introduction du vaccin a été suivie d'une nette diminution du nombre d'hospitalisations et de consultations médicales (Ruiz-Palacios et al. 2006; Vesikari et al. 2006). Les bénéfices apportés en santé

publique par ce type de vaccin a motivé l'OMS à donner un avis favorable globale pour la vaccination contre le rotavirus, en particulier en Afrique et en Asie (Organizations et al. 2013).

Cependant, si dans les pays développés, la protection peut atteindre plus de 96%, dans certains pays pauvres, l'efficacité des vaccins RV est nettement inférieure (Madhi et al. 2010) ; par exemple au Malawi, la vaccination avec Rotarix ne confère que 50% de protection. Dans ces populations, la réponse immunitaire au vaccin caractérisée par des IgA spécifique est inférieure à celle obtenue dans les populations des pays industrialisés (Patel et al. 2009). Plusieurs facteurs pourraient expliquer ces différences dans l'efficacité des vaccins (Serazin et al. 2010) : la malnutrition, la co-infection avec d'autres organismes pathogènes qui interfèreraient avec la réponse immunitaire induite par la vaccination et les entéropathies environnementales dues aux problèmes d'insalubrité.

En Tunisie, malgré les études antérieures qui démontrent l'intérêt de vacciner les enfants de moins de 5 ans en Tunisie, ces vaccins (Rotarix et Rotateq) ne sont pas encore entrés dans le programme national de vaccination (Soltani MS et al. 2015, Soltani et al. 2012a, Soltani et al. 2012b).

## **7.2. Invagination intestinale et infection à rotavirus**

Les études de surveillance pharmacologique après la mise sur le marché des vaccins anti-rotavirus ont montré un risque d'apparition d'invagination intestinale aiguë. Le premier vaccin licencié, RotaShield<sup>®</sup>, a été rapidement retiré du marché américain. L'élévation de la fréquence des invaginations intestinales était en partie liée à une administration trop tardive de la première dose vaccinale, entre 4 et 6 mois, période où le risque naturel d'invagination est déjà élevé (Centers for Disease Control and Prevention 1999; Murphy et al. 2001). Avec les vaccins de deuxième génération, Rotarix et Rotateq, le risque est minime à condition que la première dose soit administrée avant 12 semaines. Dans ces conditions, le sur-risque est évalué à 2 pour 100.000 vaccinations en Europe.

# Les norovirus

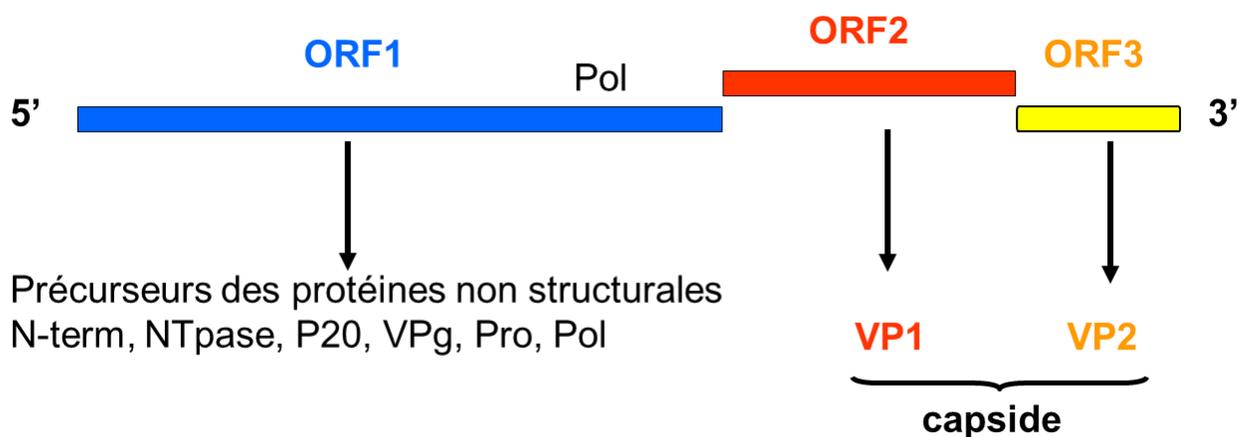
## 1 Découverte du Virus de Norwalk

Du à son aspect saisonnier et hivernal, les gastro-entérites à norovirus étaient communément appelées « Winter vomiting diseases » avant la découverte du virus. Zahorsky en 1929 décrit cette maladie comme des épisodes soudains de vomissement et de diarrhée. Les symptômes associés disparaissaient généralement au bout de quelques jours sans aucun traitement (Zahorsky 1929). Des études plus récentes ont exclu les bactéries comme agents étiologiques car la maladie pouvait être transmise grâce à des selles filtrées (Kapikian 2000). D'autres travaux ont démontré que les toxines qui auraient pu être libérées par certaines bactéries étaient absentes lors de ces cas de gastro-entérites. Les échecs répétés de mise en culture et l'absence du rotavirus, nouvellement découvert, suggérait un nouvel agent étiologique. C'est grâce à la microscopie électronique que le premier norovirus a été observé dans des selles d'enfants suite à une épidémie de gastroentérite survenue en 1968 dans une école primaire de la ville de Norwalk dans l'Ohio (Adler & Zickl 1969; Kapikian et al. 1972). L'analyse des sérums précoces et tardifs en immunoelectromicroscopie a permis de démontrer qu'un petit virus était effectivement l'agent étiologique de l'épidémie. Après les premières observations, d'autres virus du même type ont été découverts, appelés agent de Norwalk puis petits virus ronds structurés (« Small Round Structured Virus » ou SRSV) ou virus de type Norwalk, l'appellation définitive de norovirus a été enfin adoptée en 2002 par le Comité international de taxonomie des virus (ICTVdB 2004). Le clonage du génome du virus de Norwalk en 1990 a permis de le caractériser comme un calicivirus (X Jiang et al. 1990).

## 2 Organisation génomique

Les norovirus sont des virus non-enveloppés. Ils sont constitués d'une capsidie de 35 à 40 nm de diamètre. Le génome viral est constitué d'un ARN de 7500 bases de long, de polarité positive. Celui-ci est polyadénylé à l'extrémité 3' et est relié de façon covalente à son extrémité 5' à la protéine VPg (Glass et al. 2009; Green 2007; Hardy 2005; Koo et al. 2010; Morillo et Timenetsky 2011). Le génome comprend trois cadres de lecture ouverts ou ORF (Open Reading Frame) que sont l'ORF 1, l'ORF 2 et l'ORF 3. Les ORF 1 et 2 se chevauchent par 17 à 20

nucléotides selon le génogroupe, provoquant un décalage de +1 nt du cadre de lecture 2. Les ORF 2 et 3 se chevauchent seulement par une base provoquant un décalage de -1 nt de l'ORF 3 par rapport à l'ORF 2 (Dingle et al. 1995; Jiang et al. 1993; Lambden et al. 1995; Matsui et al. 1991). Lors du cycle viral, la protéine de capsid codée par l'ORF 2 est produite en grande quantité dans la cellule par le biais d'ARN subgénomique comprenant les ORF 2 et 3. Les ARN génomiques et sous-génomiques contiennent des séquences identiques d'environ 30 nucléotides à leurs terminaisons 5 (Dingle et al. 1995; Lambden et al. 1995; Seah et al. 1999; Someya et al. 2000). Les cadres de lecture sont bordés par des régions non codantes très courtes aux extrémités 5' (4 nt) et 3' (46 nt) (*Figure 4*).



*Figure 4. Organisation génomique des norovirus. Les cadres de lecture (ORF1, 2 et 3) sont indiqués au-dessus du schéma. Les protéines codées par les ORF sont indiquées par des flèches.*

## 2.1. L'ORF 1

L'absence de système de culture sur cellules des norovirus humains a rendu difficile l'étude fonctionnelle des protéines non structurales des norovirus humains (Karst et al. 2003; Wobus et al. 2006). Cependant, les outils de biologie moléculaire (réplicons et génétique inverse) d'une part et l'étude de virus proches (calicivirus félin (Kreutz et al. 1994) et surtout norovirus murin (Herod et al. 2014)) ont largement contribué à l'étude des fonctions des protéines non structurales des norovirus humains (Asanaka et al. 2005; Chang et al. 2006, Chang et al. 2008; Wobus et al. 2004; Yunus et al. 2010).

La polyprotéine non structurale de 200 kDa codée par l'ORF 1 comprend 1700 à 1790 acides aminés (aa) selon le génogroupe. Lors du cycle viral, le précurseur protéique est clivé en *cis* et en *trans* par la protéinase virale NS6 pour libérer plusieurs sous-produits possédant chacun une ou plusieurs fonctions. Ces protéines non-structurales ont pour la plupart des fonctions enzymatiques nécessaires à la réplication du virus (Gaël Belliot et al. 2003; Clarke et Lambden 1997; Liu et al. 1996; Lochridge and Hardy 2003). A partir de l'extrémité NH<sub>2</sub>, la protéine NS1/2 interagirait avec le réticulum endoplasmique et en particulier avec l'appareil de Golgi sans que l'on connaisse précisément sa fonction. La protéine NS3 de 40 kDa possède une fonction NTPase. La protéine NS4 est l'équivalent de la protéine 3A que l'on retrouve chez les picornavirus. La protéine NS5 ou VPg (viral protein genome-linked) est de loin la plus étudiée. Cette protéine possède plusieurs fonctions. Elle intervient notamment comme agent recruteur des facteurs de traduction présents dans la cellule. Elle serait également à l'origine de la réplication du génome viral en servant d'amorce à la polymérase du virus. La protéine NS6 ou 3C<sub>pro</sub> est une protéinase virale. Celle-ci agit en *cis* et en *trans*. Lors du cycle viral, elle permet le clivage du polypeptide par l'ORF1. Elle intervient également dans le clivage de certains facteurs cellulaires comme le clivage de la PABP (Poly A Binding Protein) permettant ainsi le détournement de la machinerie cellulaire au profit du virus. La dernière protéine codée par l'ORF1 est la protéine NS7 ou 3D<sub>pol</sub>. C'est une polymérase ARN à matrice ARN (RdRp : RNA dependent RNA polymerase), elle fait partie de la même famille des RdRp que 3D<sub>pol</sub> des picornavirus et NS7 du virus de l'hépatite C. En présence de plusieurs facteurs et dans certaines conditions la polymérase opère la nucléotidylation de la protéine VPg (**figure 4**) (Green et al. 2002; Hardy 2005; Jiang et al. 1993; Lochridge et Hardy 2003; Min et al. 2012; Rohayem et al. 2006).

## **2.2. L'ORF 2 et la protéine VP1**

Les ORF2 et 3 sont traduites en protéine à partir d'un ARN subgénomique d'environ 2,3 kb de longueur (Asanaka et al. 2005; Jiang et al. 1993) . L'ORF 2 code la protéine majeure de la capsid, VP1. Composée de 530 à 560 aa, son poids moléculaire varie entre 56-62 kDa selon les génotypes (Dingle et al. 1995; Greenberg et al. 1981; Jiang et al. 1993; Lochridge et Hardy 2003; Madore et al. 1986). Les résultats de clivage de la VP1 par la trypsine est une protéine soluble

antigénique de ~ 30-32 kDa (Greenberg et al. 1981; Hardy et al. 1995). Chaque capsid est composée de 180 protomères VP1 qui s'organisent en 90 dimères où les protéines VP1 sont tête-bêche (Greenberg et al. 1981; Jiang et al. 1995; kapikian et al. 1973; Madore et al. 1986; Prasad et al. 1999).

L'analyse cristallographique de la capsid des norovirus révèle que la protéine VP1 est constituée de 3 domaines, N, S et P, ce dernier se divisant en sous-domaines P1 et P2 (Figure. 1,B) (Prasad et al. 1999). Le domaine N représente la face interne de la capsid, il est en contact avec le génome viral. L'architecture et le maintien de la structure de la capsid repose sur le domaine S des 180 protomères qui interagissent ensembles. La séquence en acides aminés des domaines N et S est très conservée pour chaque génogroupe de norovirus humain. A l'inverse, pour le domaine P qui forme une protubérance à la surface de la capsid, les séquences codantes sont très hétérogènes d'un génotype à l'autre. Le domaine P compose la face externe de la protéine VP1. Au niveau atomique, le domaine P est relié au domaine S par une charnière flexible (Prasad et al. 1999). On distingue les domaines P1, celui-ci est voisin du domaine S et le domaine P2. Le domaine P2 forme la zone la plus exposée de la capsid et sa séquence est très variable d'un point de vue génétique. C'est le domaine P2 qui est reconnu par les facteurs d'attachement que sont les antigènes de groupe sanguin (Cao et al. 2007; Y. Chen et al. 2011; Hansman et al. 2011; Ming Tan et al. 2008).

### *2.2.1. Production de particules de synthèse à partir de VP1*

En l'absence d'un système de culture efficace des norovirus humains, le clonage et l'expression de la protéine de capsid VP1 du virus de Norwalk (NV, GI.1) dans le système baculovirus, a permis la production des pseudo-particules virales recombinantes en grande quantité (Virus Like Particles ou VLP) (Jiang et al. 1992a). Les VLP ont fourni un matériel de choix pour l'immunisation et la fabrication d'anticorps spécifiques des norovirus mais aussi dans d'autres domaines comme l'étude des facteurs d'attachement des norovirus et plus récemment l'étude des norovirus dans l'environnement. Les VLP apparaissent également être des outils prometteurs dans l'éventualité d'un vaccin contre les norovirus humains (Bernstein et al. 2015; Malm et al. 2015). Dans le système baculovirus, le gène codant la protéine VP1 en association ou non à l'ORF 3 est inséré dans le génome d'un baculovirus à la place du gène codant la

polyhédrique dont l'expression est commandée par un promoteur transcriptionnel fort. Une fois que l'ADN du baculovirus est circularisé après transfection des cellules d'insecte, celui-ci devient infectieux et permet la production de baculovirus recombinant exprimant en grande quantité la protéine VP1 à la place de la polyhédrique, absente. En grande quantité dans la cellule, les protomères de VP1 des norovirus ont alors la capacité de s'auto-assembler en pseudo-particules (Baric et al. 2002; Jiang et al. 1992; Jiang et al. 1995; Nicollier-Jamot et al. 2003; Scotti et Rybicki 2013; Souza et al. 2013; Zhang et al. 2006; Dingle et al. 1995). Ces VLP sont similaires sur le plan structural et antigénique aux particules virales natives (Jiang et al. 1992; Parra et al. 2012; Tan et Jiang 2012). Ne contenant pas d'ARN viral infectieux, les VLP ne se répliquent pas et sont donc d'une totale innocuité pour l'homme. Généralement excrétées dans le milieu de culture du système baculovirus, les VLP peuvent être concentrées par ultracentrifugation à partir de lysat cellulaire. Leur purification s'effectue ensuite sur gradient de saccharose ou de chlorure de césium. Les capsides de nombreux génotypes de norovirus ont été ainsi produites : Chiba virus et Seto virus (Kitamoto et al. 2002), virus de Lordsdale (Dingle et al. 1995), Snow Mountain virus (Jiang et al. 1995a; Lochridge et Hardy 2003), virus Hawaï (K Y Green 1997), virus Mexico (Jiang et al. 1995b), virus Toronto (Leite et al. 1996) et virus Grimsby (Hale et al. 1999; Nicollier-Jamot et al. 2003).

D'autres systèmes de production de la protéine VP1 ont été adaptés à la levure (Xia et al. 2007). Les VLP de norovirus ont été également produites à partir d'un système d'expression du virus de l'encéphalite équine, permettant ainsi une production dans des cellules de mammifères (Baric et al. 2002). Le domaine P de la VP1 peut être aussi produit dans *Escherichia coli*, permettant la production de particules d'un nouveau type (Tan et Jiang 2012). Ces particules sont constituées de 24 monomères (12 dimères) correspondant au domaine P (Tan et Jiang 2012).

### **2.3. L'ORF3 et la protéine VP2**

L'ORF3 code pour la protéine VP2 faisant 22 à 31 kDa de masse moléculaire. La protéine VP2 est minoritaire dans la capside et sa fonction est inconnue (Bertolotti-Ciarlet et al. 2003; Glass et al. 2000; Jiang et al. 1993; Lochridge et Hardy 2003). La protéine VP2 est très basique et pourtant son association avec des acides nucléiques n'a pour l'instant pas été clairement établie. Présente à un ou deux exemplaires dans la capside, la VP2 est censée jouer un rôle dans

l'assemblage viral (Glass et al. 2000; Vongpunsawad et al. 2013). Il a été ainsi démontré que la VP2 n'est pas requise pour l'assemblage de la capsid. Sa présence dans les particules natives reste en suspens. La production en très grande quantité de particules de FCV (féline calicivirus) ou de norovirus murin n'a pas permis de détecter sur gel d'acrylamide la présence de VP2 dans la capsid alors que la présence de la protéine VPg (1 exemplaire par particule) a été démontrée sans équivoque. A l'inverse, d'autres auteurs ont observé que la présence de VP2 conférait une stabilité accrue aux particules de synthèse par rapport à celles composées exclusivement de la protéine VP1 (Bertolotti-Ciarlet et al. 2002, Bertolotti-Ciarlet et al. 2003). L'expression de VP1 dans des cellules d'insecte ou de mammifère serait également accrue en présence de VP2 (Bertolotti-Ciarlet et al. 2003; Vongpunsawad et al. 2013). Une étude récente a permis de déterminer que VP2 s'associe avec le domaine S de VP1 sur la surface intérieure de la particule virale par le biais d'une isoleucine en position 52 (génogroupe I) et 48 (génogroupe II) de la protéine VP1 (Vongpunsawad et al. 2013). Les auteurs ont alors émis l'hypothèse que la protéine VP2, très basique et hydrophobe, devait intervenir dans l'encapsidation de l'ARN viral. Ce rôle de VP2 n'a pour l'instant pas été démontré. Toutefois des expériences de trans-complémentation effectuées avec le FCV ont révélé que la protéine VP2 était essentielle à la réplication du FCV et à la production de particules virales infectieuses (Sosnovtsev et al. 2005).

### **3. Classification des norovirus**

Les premières tentatives de classification des norovirus se sont basées sur l'aspect morphologique des particules virales en microscopie électronique. Plus tard, l'utilisation de sérum de patient a permis de faire une première classification précise des norovirus à partir de leurs propriétés immunologiques. Ces techniques ont permis de déterminer rapidement qu'il y avait deux groupes de norovirus. La démocratisation et l'amélioration constante des techniques de biologie moléculaire ont permis d'établir une classification précise des *Caliciviridae* et parmi ceux-ci des norovirus. Les *Caliciviridae* regroupent 4 genres: les lagovirus, les vesivirus, les sapovirus et les norovirus, présentant tous une organisation génomique différente. Des genres supplémentaires ont été récemment proposés comme les recovirus (virus Tulane) et les valovirus (St-Valérien-like calicivirus), et un certain nombre d'autres calicivirus non classés que l'on retrouve chez les oiseaux (bavovirus et nacovirus) (Clarke et al. 2012).

### **3.1. Classification des norovirus dans l'ORF2**

La classification la plus précise des norovirus est cependant basée sur l'analyse phylogénétique de la séquence correspondant à l'ORF2. On distingue ainsi chez les norovirus 5 génogroupes, GI à GV (Glass et al. 2009; Koo et al. 2010; Morillo et Timenetsky 2011; Patel et al. 2009). Les génogroupes, GI, GII, et GIV, ont été détectés chez l'homme où ils provoquent des gastro-entérites (E Mathijs et al. 2010) . Les norovirus GII ont été également détectés chez le porc. Les norovirus GIV ont également été détectés chez le lion et le chien (Martella et al. 2007, Martella et al. 2008; Shen et al. 2012; Sugieda et Nakajima 2002). Les génogroupes III et V infectent respectivement moutons et souris (R. a Bull et al. 2011; Mauroy et al. 2012; Tse et al. 2012; S. Wolf et al. 2009). Le tropisme du norovirus murin est différent des autres puisqu'il a un tropisme pour les cellules du système immunitaire ; les lymphocytes B. En 2010, un sixième génogroupe provisoire (GVI) a été détecté chez le chien (João Rodrigo Mesquita et al. 2010). Le degré d'homologie en acides aminés entre génogroupes varie entre 40% et 60% (Zheng et al. 2006). Dans chaque génogroupe, on distingue des génotypes. La variabilité entre chaque génotype est en moyenne de 20% (Khamrin et al. 2007). En 2014, on distinguait 9 génotypes pour le génogroupe I, numérotés GI.1 à GI.9, 22 pour GII (GII.1 à GII.22) et au moins 2 pour GIV (GIV.1 et GIV.2) (Maunula et von Bonsdorff 2014; Vega et al. 2014). Ce nombre augmente avec la découverte de nouvelle souche.

### **3.2. Classification des norovirus dans la polymérase**

Les premières tentatives de classification phylogénique des norovirus ont été faites sur la région la plus conservée de l'ORF1 correspondant à la séquence codant la polymérase NS7 (Ando et al. 1995). Cette classification a été remise à jour et est maintenant utilisée pour distinguer les recombinants entre l'ORF1 et l'ORF2 (Katayama et al. 2002; Zheng et al. 2006). Les génotypes dans la polymérase se définissent le plus souvent par la lettre P suivi du génotype (Kroneman et al. 2013). Dans le cas d'un recombinant entre un norovirus GII.21 dans la polymérase et GII.3 dans la capsid la dénomination du virus sera par exemple GII.P21/GII.3. Il y a également plusieurs génotypes définis dans la polymérase qui n'ont pu être associé à un

génotype dans la capsid. Ce sont les génotypes orphelins GII.a, GII.c, GII.e et GII.r (Kroneman et al. 2013).

### **3.3. Evolution et classification des norovirus GII.4**

Les analyses épidémiologiques menées sur tous les continents ont démontré que les épidémies de gastro-entérites étaient dues principalement au norovirus de génotype GII.4 (Gaël Belliot et al. 2010; Jian-guang Fu et al. 2014; Hasing et al. 2013; Sdiri-Loulizi et al. 2009). Ce génotype a fait l'objet d'analyse génétique approfondie depuis la pandémie de 1995-96 (Noel et al. 1999). Depuis 2000, l'ORF2 des norovirus GII.4 est en constante évolution. Cette hétérogénéité grandissante au sein du génotype GII.4 est unique. Elle a permis de classer les différents norovirus en sous-types ou variants. Avant 2000, on distingue les variants Bristol et US95-96. Ce dernier a circulé dans le monde entier pendant une dizaine d'année jusqu'en 2000 jusqu'à l'apparition du variant Farmington (B. Lopman et al. 2004). L'émergence de celui-ci a conduit à la disparition des variants de type US95-96. Les variants Farmington et ceux qui suivent ont tous la particularité d'avoir un acide aminé en plus situé dans la région hypervariable P2 de la capsid. L'apparition de ce résidu surnuméraire a coïncidé avec l'apparition de nouveaux variants par cycle de 2 à 4 ans. L'amélioration continue des réseaux de surveillance a mis en évidence que l'émergence d'un nouveau variant coïncidait toujours avec la disparition du précédent. Depuis l'émergence du variant US95-96, il a été observé plusieurs variants à l'échelle mondiale : Farmington Hills/2002, Hunter/2004, Yerseke/2006a, Den Haag/2006b, New Orleans/2009 et plus récemment Sydney/2012. D'autres variants ont eu une distribution géographique plus restreinte comme Henry/2001, Japan/2001, Sakai/2003, Osaka/2007 et Apeldoorn/2008 (Eden et al. 2013). Les mécanismes régissant l'émergence de nouveaux variants restent inconnus. Il semble cependant que la pression immunitaire chez l'individu et l'immunité de la population soient des forces de sélection génétique importante dans l'apparition des variants de norovirus GII.4. L'exposition répétée des individus à un variant prédominant rendrait la population de moins en moins naïve sur le plan immunitaire et conduirait à l'élimination de ce variant et son remplacement par un nouveau variant qui échappe au système immunitaire (Debbink et al. 2012; Donaldson et al. 2010; J Fu et al. 2015; Lindesmith et al. 2012, Lindesmith et al. 2013) (*Figure 5*).



proposés. Ceux-ci ont permis entre autre la production de VLP dans des plantes (Z. Huang et al. 2009; Mason et al. 1996) ou dans des cellules immortalisées à l'aide de virus recombinants (Baric et al. 2002). Des systèmes de réplicon du génome entier des norovirus ou l'ORF2 a été remplacée par un gène de résistance à un antibiotique ont été proposés dans des hépatocytes immortalisés (Chang et al. 2006). Ils ont mis en évidence le rôle inhibiteur de l'interféron sur le replicon. (Chang and George 2007). Il y a eu également des tentatives de réplication du génome et de production de particules virales. C'est ainsi que la transfection des cellules humaines de la lignée HEK293T par des ARN génomiques de norovirus humain en présence de la souche MVA du virus exprimant la polymérase ARN du bactériophage T7 a donné des ARN viraux se répliquant dans les cellules transfectées. Ce système a également permis l'obtention d'ARN subgénomique et de particules virales de norovirus humain ayant intégré l'ARN génomique. Malgré ces résultats prometteurs, il s'est avéré que les particules virales ainsi produites n'étaient pas infectieuses (Asanaka et al. 2005). D'autre part des expériences de transfection de génomes viraux extraits de selle de patient sur des cellules hépatiques Huh7 a démontré que la réplication du génome viral se produisait dans les cellules (Guix et al. 2007). En revanche, ce système ne permettait la production de virions. La même équipe a ensuite proposé un système de génétique inverse ou le génome d'un norovirus GII.3 a été cloné dans un plasmide en aval du promoteur transcriptionnel du facteur d'élongation EF1- $\alpha$  (Katayama et al. 2014). La transfection de ce plasmide navette dans des cellules HEK293T a produit des particules virales complètes possédant un ARN viral. Ces particules filles n'étaient pas infectieuses. En revanche, à partir de ces particules filles, les auteurs ont réussi à réextraire l'ARN viral qu'ils ont transfecté de nouveau dans des cellules. Les auteurs ont observé que ces ARN viraux étaient capables de se répliquer démontrant donc que les ARN viraux produits de novo étaient fonctionnels.

Les études menées jusqu'à maintenant ont démontré qu'il était possible d'établir des systèmes où la production de novo d'ARN génomique et de particules contenant le génome viral était possible grâce à l'utilisation de lignées cellulaires immortalisées. En revanche, les différents auteurs n'ont jamais réussi à effectuer un passage en utilisant les particules virales nouvellement produites. Tous ces travaux ont mis en lumière les nombreux obstacles à la culture des norovirus. Il faut non seulement l'expression d'un récepteur à la surface des cellules mais aussi l'expression

de plusieurs facteurs cellulaires pour que la réplication se produise dans les cellules et enfin une absence ou une réduction de la réponse à l'interféron.

#### **4.1. Le norovirus murin**

Le rôle de l'interféron dans la réplication des norovirus a été montré pour la première fois avec le norovirus murin (Murine Norovirus ou MNV) (Karst 2003). Dans ces travaux, l'observation de souris sentinelles génétiquement modifiées STAT1  $-/-$  déficientes pour la réponse interféron a mis en évidence le premier norovirus murin dont le tropisme est immunitaire. Ce virus, peu pathogène chez les souris sauvages, s'est avéré mortel dans 100% des cas chez les souris STAT1  $-/-$ . Les auteurs ont également démontré qu'il était transmissible d'une souris à l'autre en utilisant des broyats de cerveau de souris infectées. Par la suite les mêmes auteurs se sont attachés à mettre en culture le MNV. Les premiers travaux conclurent que l'absence d'interféron favorisait la réplication efficace du MNV. Des essais de mise en culture du MNV à partir de broyat de tissu ont été effectués sur plusieurs lignées cellulaires déficientes pour la réponse à interféron (Wobus et al. 2004). Ces essais ont été très concluants sur la lignée cellulaire RAW264.7, dérivée de macrophage et déficiente pour la réponse interféron. Ce type cellulaire a permis plusieurs passages du virus sans diminution du titre viral, celui-ci s'établissant à environ  $10^7$  ufp/ml à 48 hpi. L'adaptation du MNV à la culture cellulaire s'est accompagnée par une atténuation du virus chez les souris STAT1  $-/-$  où il n'est plus mortel. L'analyse du génome a démontré que l'atténuation du virus s'accompagnait de deux mutations spécifiques localisées dans NS1 et dans VP1 (Bailey et al. 2008).

#### **4.2. Facteurs microbiens et culture des norovirus humains**

Après la mise en culture des norovirus murins sur des lignées lymphocytaires, des travaux ont été logiquement entrepris sur la culture des norovirus humains sur des cellules dérivées du système immunitaire. Lay et al. ont ainsi entrepris sans succès de cultiver des norovirus purifiés à partir d'échantillons cliniques sur des macrophages et des cellules dendritiques (Lay et al. 2010). Cependant, des travaux publiés en 2015 ont démontré que la réplication des norovirus humains dans les lymphocytes était possible si l'inoculum contenait une suspension de selle non filtrée

(Jones et al. 2014). De ces premières observations, les auteurs ont conclu que des bactéries jouaient un rôle dans l'attachement et peut être la réplication des norovirus dans les lymphocytes. Parmi ces facteurs microbiens, les auteurs ont démontré qu'*Enterobacter cloacae* qui exprime à sa surface l'antigène de groupe sanguin H favorisait l'attachement et la réplication des norovirus humains dans les lymphocytes en présence de cellules HT-29 implantées en co-culture. Ces travaux, prometteurs, n'ont pas pour l'instant donné suite à d'autres études. Ils mettent en évidence le rôle de la flore intestinale dans la réplication des norovirus humains comme cela a été démontré pour le poliovirus et les réovirus (Kuss et al. 2011). Ils démontrent également que les norovirus humains sont capables de se répliquer dans les cellules du système immunitaire. La question est alors posée sur le rôle des entérocytes lors de l'infection.

## 5. Pathogenèse des norovirus

La cellule cible pour le norovirus humain n'a pas été identifiée de manière précise, mais plusieurs travaux suggèrent que les norovirus se répliqueraient dans les entérocytes du tractus intestinal supérieur. Jusqu'à présent, il n'a pas été possible de visualiser des particules virales de norovirus dans des biopsies lors d'études effectuées chez des volontaires. Cependant une étude sur des coupes de tissus de la jonction gastroduodénale a montré une liaison de VLP de virus Norwalk prédominante principalement sur les entérocytes au niveau des villosités et plus faible au niveau des cryptes (Severine Marionneau et al. 2002).

Il avait été précédemment observé, les biopsies de jéjunum de volontaires infectés avec le virus de Norwalk (GI.1) ou le virus d'Hawaï (GII.1) présentent des lésions histologiques (Agus et al. 1973; Schreiber et al. 1973, Schreiber et al. 1974). Il a été également observé une invasion de l'épithélium intestinal par des lymphocytes et une vacuolisation importante du cytoplasme des entérocytes. Dans une étude plus récente, des lymphocytes CD8 ont été identifiés dans l'épithélium intestinal (Troeger et al. 2008). Ces cellules T étaient impliquées dans les altérations morphologiques des villosités.

## **6. Immunité**

L'immunité contre les norovirus est mal comprise pour l'instant. Le rôle de l'immunité à médiation cellulaire reste inconnu et les connaissances sur l'immunité à médiation humorale sont parcellaires. Les premières expériences menées sur des volontaires ont montré qu'il n'y avait pas d'immunité à long terme. Un même patient pouvait contracter la maladie à plusieurs mois d'intervalle alors que d'autres ne tombaient jamais malades (Johnson et al. 1990; Matsui and Greenberg 2000; Parrino et al. 1977). L'élévation des anticorps sériques spécifiques des norovirus ne constitue ni ne reflète la protection contre l'infection (Belliot et al. 2001). En dehors des facteurs génétiques influençant les infections à norovirus (cf activité du gène FUT2), des études plus récentes sur les volontaires ont permis de démontrer qu'un certain nombre d'individus sont protégés contre l'infection grâce à une élévation rapide des IgA spécifiques des norovirus au niveau de la muqueuse intestinale (L. Lindesmith et al. 2003). En outre, les premières expériences menées sur des volontaires ayant ingéré des norovirus GI.1 ou GII.1 ont démontré qu'il n'y avait pas d'immunité intergénéogroupe (pour les norovirus) (Wyatt et al. 1974). Des expériences plus récentes ont démontré que des volontaires infectés par le virus de Norwalk (GI.1) produisait des anticorps neutralisants efficaces contre plusieurs génotypes (GI.1 à GI.4) de norovirus de génogroupe identique (Donaldson et al. 2008). Ces résultats prometteurs sont toutefois à pondérer car l'activation de cellules lymphocytaires mis en contact avec des VLP varie d'un individu à l'autre et dépend du type de VLP utilisé.

## **7. Propriétés physico-chimique des norovirus et résistance à l'environnement**

Les norovirus sont stables dans l'environnement où leur pouvoir infectieux reste intact. Cette caractéristique est partagée par tous les virus entériques non-enveloppés. Avec une densité qui varie entre 1.33 et 1.41 g/ml dans le chlorure de césium (kapikian et al. 1973), les particules de norovirus humain peuvent résister au pH acide pendant environ 3 h à température ambiante. Du fait qu'il ne possède pas d'enveloppe, ils résistent aux solvants organiques comme l'éther à basse température (Dolin et al. 1972). Les particules de norovirus résistent également au traitement thermique sachant que le maintien de l'intégrité du virion est fonction de la matrice. Dans les

eaux souterraines, les norovirus peuvent rester infectieux pendant au moins 60 jours et sont détectables pendant plus de 3 ans (Lamhoujeb et al. 2009). Le norovirus est capable de persister plusieurs semaines sur des surfaces solides à des températures variant de 4 à 37°C (Baert et al. 2008). Récemment, il a été démontré que l'humidité absolue jouait un rôle dans la persistance des norovirus dans l'environnement. Des expériences utilisant le MNV ont démontré que celui-ci pouvait rester infectieux pendant plusieurs mois à 25°C si l'humidité relative était maintenue à 10% (Colas de la Noue et al. 2014).

### **7.1. Moyen de destruction des norovirus**

Les norovirus sont résistants aux détergents les plus utilisés comme les produits à base d'ammonium quaternaires et les savons (Nowak et al. 2011). Une fois immobilisées sur une surface, les particules de norovirus deviennent encore plus résistantes aux virucides. L'utilisation par exemple d'éthanol à 70% ou de chlore à 200 ppm devient alors moins efficace sur les norovirus (Girard et al. 2010; Liu et al. 2010; Nowak et al. 2011). Les solutions hydro-alcooliques sont plus ou moins efficaces sur les norovirus, un minimum de 70% d'alcool est requis pour que le produit soit réellement virucide (Belliot et al. 2008; Liu et al. 2010). La résistance des norovirus comme tous les autres virus est fonction de la matrice alimentaire. Généralement, les particules virales ne sont que partiellement détruites aux températures utilisées lors de la pasteurisation. Une température supérieure ou égale à 80°C est nécessaire pour la destruction efficace du virus (Topping et al. 2009). En outre, les norovirus ne sont pas affectés par des décongélations répétées ou par une congélation de longue durée (G. P. Richards et al. 2012). Les traitements physiques comme la lumière pulsée sont très efficaces sur des substituts des norovirus humains comme le MNV dès lors que les particules virales sont en suspension dans un liquide transparent (Jean et al. 2011; Vimont et al. 2015). D'autres moyens de traitement comme les très hautes pressions semblent être efficaces sur les différents substituts des norovirus (Cromeans et al. 2014) mais l'efficacité est aussi fonction d'autres paramètres comme la température et le pH (Lou et al. 2015).

## 8. Méthode de détection des norovirus

Avant l'avènement de la biologie moléculaire, la microscopie électronique (ME) était la seule méthode disponible pour la détection des calicivirus (Dolin et al. 1982; Grohmann et al. 1980; Kapikian et al. 1972; Lewis et al. 1988; Thornhill et al. 1977). Les particules virales étaient généralement concentrées à partir de suspension de selle et observées directement en ME ou préalablement incubées avec des sérums pré ou post convalescents pour effectuer une immunoelectromicroscopie. Les préparations étaient ensuite observées sur des grilles de microscopie chargées positivement. L'observation se faisait en coloration négative, l'acide phosphotungstique ou l'acétate d'uranyl servant de contrastant. La ME est peu sensible mais ne requiert pas de réactifs spécifiques pour établir un diagnostic. Cette technique nécessite cependant du personnel technique formé et des installations lourdes et coûteuses (Amar et al. 2007; Grohmann et al. 1980; Kjeldsberg et al. 1989; Venjé et Koopmans 1996).

Au début des années 80, divers dosages immunologiques, le plus souvent sous forme d'ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), ont été développés pour la détection des norovirus dans les selles (Gary et al. 1985; Greenberg HB, Wyatt et al. 1978; Herrmann et al. 1985; Jiang et al. 1995; Jiang et al. 1995). Il existe actuellement plusieurs kits commerciaux de détection des antigènes de norovirus dans les selles sous format ELISA ou de test rapide par immuno-chromatographie sur membrane (Ambert-Balay et Pothier 2013; De Bruin et al. 2006; Gray et al. 2007; Greenberg et al. 1978; Iturriza-Gómara et al. 2008; Jiang et al. 1995; Jiang et al. 1995; Khamrin et al. 2009; Thongprachum et al. 2012). Ces tests sont faciles d'utilisation et relativement peu coûteux mais leurs sensibilité et spécificité sont médiocres à cause en partie de l'absence d'antigène de groupe pour les norovirus et de la grande hétérogénéité génotypique dans la capsid (Atmar et al. 2008). Les techniques immunologiques sont donc intéressantes pour un pré-screening d'échantillons. Elles permettent le plus souvent la détection efficace des norovirus de génotype GII.4, celle des autres génotypes restant problématique (Ambert-Balay et Pothier 2013). Malgré la facilité d'usage des tests rapides basés sur l'immunochromatographie, les résultats obtenus grâce à ceux-ci doivent être confirmés en biologie moléculaire.

Les techniques de détection moléculaire du génome sont actuellement les plus efficaces et les plus utilisés dans tous les laboratoires. La détection des norovirus consiste à amplifier le génome ARN par amplification génique (PCR) après une phase de rétro-transcription (RT) de l'ARN viral

en ADN complémentaire. La RT-PCR est actuellement la méthode de référence pour le diagnostic des norovirus humains dans les échantillons cliniques, alimentaires ou environnementaux (Koopmans et al. 2002; Mattison 2011; Riera-Montes et al. 2011) . Actuellement, les RT-PCR en temps réel ou qRT-PCR sont les plus utilisées car sensibles et rapides, elles permettent aussi d'évaluer la quantité de génomes par échantillon. De nombreuses trousse de détection sont maintenant disponibles sur le marché. Elles permettent généralement l'amplification d'un fragment court situé dans le domaine codant la protéine NS7. Ces trousse contiennent également des contrôles internes permettant de vérifier la présence d'inhibiteurs de PCR. Ces contrôles sont maintenant obligatoires pour la validation des résultats à l'hôpital. Les techniques de RT-PCR en point final ont été initialement les plus utilisées pour le diagnostic des norovirus. Elles sont peu à peu remplacées par les techniques de qRT-PCR, plus sensibles et plus faciles d'utilisation. En revanche la RT-PCR en point final reste la technique standard dès qu'il s'agit de typage du norovirus car l'obtention de produits de PCR permet ensuite leur séquençage en vue du génotypage des norovirus humains. Dans la littérature de nombreux jeux d'amorce ont été publiés pour l'amplification des norovirus aussi bien dans l'ORF1 (le plus souvent dans le domaine codant NS7) que dans l'ORF2 (le plus souvent dans le domaine N de la protéine VP1) (Kojima et al. 2002; Nenonen et al. 2009).

## **9. Modes de transmission des norovirus**

Les norovirus sont principalement transmis par la voie féco-orale. Les fèces sont la source principale de norovirus où des milliards de particules infectieuses peuvent être présentes. Les norovirus sont très infectieux et quelques particules (18 à 1000) suffisent théoriquement pour provoquer la maladie (Teunis et al. 2008). Le pouvoir infectieux des norovirus ne diminue pas avec le passage successif du virus entre les individus (Dolin et al. 1971; Teunis et al. 2008).

La transmission du virus peut également se faire par le biais de vomissure (Said et al. 2008) ou directement de personne à personne (Chapman et al. 2011; Solano et al. 2014). Dans les établissements de type EHPAD, la majorité des infections à norovirus est attribuable à ce mode de transmission (Greig et Lee 2009; Iturriza-Gómara et Lopman 2014). La promiscuité entre personnes fragilisées favorise les épidémies à norovirus (Kambhampati et al. 2015; Trivedi et al. 2012). La propagation du norovirus est également facilitée par l'augmentation de la durée de

l'excrétion des particules infectieuses dans les selles. Ainsi la transmission du virus par une personne asymptomatique est également possible (Patterson et al. 1993).

La contamination par le norovirus peut également se produire par le biais de souillures ou de projections. Dans ce cas l'eau est un vecteur important de la transmission des norovirus (Atmar et Estes 2006). Des épidémies associées à la contamination par le norovirus de l'eau potable ont été documentées (Arvelo et al. 2012; Di Bartolo et al. 2011; Breitenmoser et al. 2011). Le virus se transmet aussi par contact avec des matières contaminées et des particules sous forme d'aérosol (Evans et al. 2002; Hall et al. 2013; Li et al. 2013; Mäde et al. 2013; Mesquita et Nascimento 2009; Räsänen et al. 2010; Werber et al. 2009; Widdowson et al. 2005). C'est un problème important dans les toxi-infections alimentaires où les norovirus en sont la principale cause (Van Cauteren et al. 2012; Hall et al. 2005; Kuusi et al. 2003; Lopman et al. 2004; Wheeler et al. 1999; De Wit et al. 2001). Dans la restauration, le personnel infecté de façon asymptomatique ou souffrant d'une gastro-entérite peut accidentellement contaminer les aliments lors de leur préparation ou de leur vente (McIntyre et al. 2012). Les épidémies d'origine alimentaire ont été associées à la consommation de framboises, d'huîtres, de salades, de sandwiches ou de produits de boulangerie (Bresee et al. 2002; Coudray-Meunier et al. 2015; Daniels et al. 2000; Richards 2000; Montazeri et al. 2015; Müller et al. 2015; Perrin et al. 2015). Une étude tunisienne a montré une similitude entre les souches de norovirus détectées dans les eaux usées et les coquillages et celles retrouvées dans les selles des patients. Ces similitudes suggéraient qu'il existe une relation entre la contamination des eaux et les diarrhées infantiles (Sdiri-Loulizi et al. 2008).

### **9.1. Excrétion du norovirus**

Dans les selles, les génomes de norovirus peuvent être présents en grande nombre. Les expériences effectuées sur des volontaires à partir du virus de Norwalk a permis d'évaluer la charge virale de  $5 \times 10^8$  à  $1,6 \times 10^{12}$  copies du génome par gramme de selles (Atmar et al. 2008). Des concentrations comparables de norovirus GII.4 ont été documentés dans les fèces des personnes symptomatiques (Lai et al. 2013; Lee et al. 2007). Dans ces travaux, les concentrations élevées de norovirus étaient fréquemment associées à des patients plus âgés et à des épisodes

diarrhéiques prolongés. Le pic d'excrétion du virus correspond généralement à l'apparition de la maladie sachant que les norovirus sont détectables dans les selles un peu avant l'apparition des symptômes (Atmar et al. 2008).

On a estimé que l'excrétion du norovirus pouvait se prolonger jusqu'à 3 semaines chez les personnes en bonne santé et pouvait durer de 47 à 80 jours chez les excréteurs de longue durée que sont les immunodéprimés et les enfants lors de leur première année (Atmar et al. 2008; Rockx et al. 2002) sachant que des excréctions continues de norovirus ont été également observées sur des périodes de plus de 2 ans (Ronchetti et al. 2014; Westhoff et al. 2009).

## **10. Les manifestations cliniques**

La gastro-entérite à norovirus est une maladie bénigne dans la grande majorité des cas. Celle-ci ne nécessite pas de prise en charge médicale particulière. Après la période d'incubation, habituellement comprise entre 24 et 48 heures, les symptômes persistent généralement entre 12 et 72 h selon les individus (Estes et al. 2006). Les principales manifestations cliniques des infections à norovirus sont la diarrhée dans 59 à 87% des cas et les vomissements pour 39 à 74% des patients (Karsten et al. 2009; Rockx et al. 2002). Les épisodes diarrhéiques sont relativement plus fréquents chez les enfants de moins de 1 an (95% de ces enfants contre 82% chez ceux de > 1 an). Au-delà d'un an, les vomissements sont plus fréquents (82% des cas contre 59 % chez les enfants de <1 an) (Rockx et al. 2002). Les autres symptômes observés lors de l'infection sont les douleurs abdominales, la nausée, la fièvre et la fatigue (Atmar et al. 2008; D. Y. Graham et al. 1994; Karsten et al. 2009; Rockx et al. 2002). Des études sur des volontaires ont montré que les symptômes étaient variables selon les individus (Glass et al. 2009; Mattner et al. 2006). De tous les symptômes, la diarrhée persiste le plus longtemps, avec une durée moyenne de 4 jours. Cependant, chez certaines personnes les épisodes diarrhéiques peuvent persister au-delà d'une semaine (Goller et al. 2004). Les diarrhées répétées peuvent entraîner des problèmes importants de déshydratation qui sont à surveiller chez les jeunes enfants et surtout chez les personnes âgées où les gastro-entérites à norovirus induisent une surmortalité (van Asten et al. 2011; Harris et al. 2008).

## **10.1. Symptômes inhabituels**

Des symptômes autres que ceux décrits pour les gastro-entérites ont été également associés à une infection par les norovirus. Une entérocolite nécrosante a été par exemple documentée chez un nouveau-né admis dans une unité de soins intensifs (Turcios-Ruiz et al. 2008). Dans une étude menée parmi les soldats britanniques en Afghanistan, 4 soldats se sont plaint de maux de tête, de raideur de la nuque, de sensibilité accrue à la lumière et de confusion (Brown et al. 2002). Pour l'un des patients, une coagulation intravasculaire disséminée a été observée. Dans une autre étude, un norovirus a été détecté par RT-PCR en temps réel dans les selles et le liquide céphalorachidien d'une fillette de 23 mois qui suite à l'infection, présentait des troubles cognitifs importants, signes d'une encéphalopathie peut être associée au norovirus (Ito et al.. 2006).

## **10.2. Les infections chroniques**

L'infection chronique à norovirus est fréquente chez les patients immunodéprimés (Gallimore et al. 2004; Kaufman et al. 2005; Siebenga et al. 2008; Westhoff et al. 2009) et plus généralement chez les individus souffrant d'hypogammaglobulinémie (Woodward et al. 2015). Si le déficit immunitaire est sévère comme par exemple chez les transplantés, la persistance du norovirus est fréquente et les particules virales peuvent être détectées dans les selles à des concentrations très élevées et cela pendant plusieurs années (Carlsson et al. 2009; Ludwig et al. 2008). Ces infections chroniques sont un problème important dans les unités oncologiques (Sheahan et al. 2015). Les complications qu'entraînent l'infection peuvent être mortelles chez le transplanté ou le patient suivant une chimiothérapie (Roddie et al. 2009; Schwartz et al. 2011)

Dans une de ces études chez un greffé du cœur, les auteurs ont observé après les premiers jours de la maladie que tous les symptômes caractérisant les gastro-entérites avaient disparu à l'exception de la diarrhée (Nilsson et al.2003). Dans ce cas, la réduction des doses de médicament anti-rejet (azathioprine et cyclosporine) a été sans effet et l'administration de colostrum ou l'injection d'immunoglobulines n'ont pas permis de diminuer les effets de la gastro-entérite et l'excrétion du virus dans les selles.

### **10.3. Les infections asymptomatiques**

Le pourcentage des infections asymptomatiques aux norovirus varie autour de 5 à 10% selon les études (Currier et al. 2015; Qi et al. 2015). En Angleterre, le suivi de 2205 personnes a montré que 12% des individus, pour la plupart ayant moins de 5 ans, sont infectés par le norovirus de façon asymptomatique (Phillips et al. 2010). Des études sur des volontaires ont montré que certaines personnes peuvent être infectées de manière asymptomatique par le norovirus (Hutson et al. 2004). Ces personnes excrètent des particules virales dans les selles et développent généralement des anticorps contre les norovirus sans présenter les symptômes de la maladie (Gallimore et al. 2004; Ozawa et al. 2007). Dans ce cas, le norovirus peut être excrété plusieurs jours chez les porteurs sains (Atmar et al. 2008; Murata et al. 2007; Rockx et al. 2002).

## **11. Epidémiologie**

Les norovirus sont la cause la plus fréquente de gastro-entérites à toutes les âges (Bull et al. 2006; Hall et al. 2012; Mead et al. 1999; Patel et al. 2008; Scallan et al. 2011; Thomas et al. 2013). Les infections à norovirus sont parmi les causes les plus importantes de gastroentérites et apparaissent souvent sous forme d'épidémies touchant un grand nombre de personnes. Les estimations sur la fréquence des épidémies varient grandement entre les pays selon l'efficacité des systèmes de surveillance mis en place et selon les méthodes de détection utilisées. Les infections à norovirus sont parmi les causes les plus importantes de gastroentérites et se présentent souvent sous forme d'épidémies. Les estimations sur la fréquence des épidémies varient grandement entre les pays selon l'efficacité des systèmes de surveillance mis en place et les méthodes de détection utilisées.—Les gastro-entérites causées par les norovirus ont une distribution saisonnière dans les pays tempérés et dans leur grande majorité se produisent en hiver (Gastañaduy et al. 2013; Kroneman et al.. 2008; Matthews et al. 2012).

Aux Etats-Unis, on estime que plus de 90% des épidémies de gastro-entérites aiguës d'origine virale sont dues aux norovirus. L'analyse de ces épidémies montre que les très jeunes enfants, les personnes âgées et les immunodéprimés sont plus sujets aux infections. On estime que les norovirus sont responsables en moyenne de 11% (3-31% selon les études) des cas de gastro-

entérite dont la sévérité nécessite une prise en charge médicale et de 12% des gastro-entérites de gravité moyenne (5-36% selon les études) (M. M. Patel et al. 2008). A l'hôpital, les norovirus sont responsables d'infections nosocomiales (Spackova et al. 2010). De façon plus générale, les infections à norovirus constituent un problème important dans les institutions médicalisées comme les établissements hospitaliers pour personnes âgées dépendantes (EHPAD) ou les services de soins de longue durée (Kirk et al. 2010; Tam et al. 2012; Widdowson et al. 2011). Dans la plupart des cas, les gastro-entérites à norovirus ne nécessitent pas de traitement ou de surveillance médicale particulière. Cependant les infections à norovirus peuvent être fatales chez les personnes vulnérables comme les personnes âgées. On estime que les gastro-entérites à norovirus sont les causes les plus fréquentes de décès liées aux gastro-entérites en milieu hospitalier (Hall et al. 2013; Kirk et al. 2010; Widdowson et al. 2011).

### **11.1. Les gastro-entérites à norovirus d'origine alimentaire**

Dans l'épidémiologie des norovirus, nous pouvons distinguer les cas d'origine alimentaire. En effet, de par sa résistance dans l'environnement et son pouvoir infectieux important, le norovirus humain est de loin le virus qui prédomine dès qu'il s'agit de risques infectieux dans l'alimentation (Scallan et al. 2011). La contamination des aliments se fait par le biais d'eau souillée ou bien par la manipulation des aliments par une personne porteuse du norovirus (Bouwknegt et al. 2015; El-Senousy et al. 2013). Selon une enquête des CDC (Centers for Disease Control and Prevention), 96% des épidémies de gastroentérites aiguës d'origine non bactérienne répertoriées entre janvier 1997 et juin 1998 auraient été causées par les norovirus (Fankhauser et al. 1998; Greene et al. 2003; Xue et al. 2014). Parmi les épidémies dont le mode de transmission a été identifié, 47% seraient d'origine alimentaire. Ces chiffres varient et des études plus récentes menées en Europe et aux Etats-Unis évaluent l'impact des norovirus entre 10 et 26% (Hall et al. 2013; Kroneman et al. 2008). Dans les premières estimations de Mead et al., il avait été estimé que rien qu'aux Etats-Unis, les norovirus étaient responsables annuellement de plus de 9 millions des cas de gastro-entérites d'origine alimentaire entraînant 20.000 hospitalisations et 124 décès (Mead et al. 1999). Ces chiffres ont été affinés par la suite. Le nombre d'hospitalisations et de décès est généralement plus élevé aux Etats-Unis, avec 15 à 20% des cas, qu'en Europe ou en Australie où moins de 2% des cas épidémiques aboutissent à une

hospitalisation ou un décès (Belliot et al. 2014) Ces épidémies d'origine alimentaire ont évidemment un coût qui est évalué à 2 milliards de dollar par an aux Etats-Unis (Hoffmann, Batz, and Morris, Jr. 2012).

## **11.2. Epidémiologie moléculaire**

L'épidémiologie des norovirus varie selon le génogroupe et le génotype. Il existe trois génogroupes de norovirus qui infectent l'homme, GI, GII et GIV qui provoquent tous des gastro-entérites. Les norovirus GIV ont été rarement incriminés dans des épidémies en raison peut être des difficultés techniques rencontrées lors de leur détection (Bon et al. 2005; Eden et al. 2012; Han et al. 2014; Matthews et al. 2012). Des études sérologiques récentes ont cependant démontré que jusqu'à 45% de la population avaient des anticorps contre les norovirus GIV.1 suggérant donc que ce type de virus était assez commun (Di Martino et al. 2014).

Les norovirus GII sont les plus fréquemment rencontrés. Le réseau FBVE a répertorié toutes les données sur les épidémies à norovirus en Europe sur une période de 5 ans (Kroneman et al. 2008). L'analyse de ces données montre que les norovirus de génotype GII.4 ont été à l'origine de la majorité des épidémies de personne à personne, alors qu'un nombre relativement élevé d'épidémies d'origine alimentaire étaient causées par des souches autres que GII.4. C'est ainsi que les norovirus GII.4 sont à l'origine de 60 à 80% des épidémies de gastro-entérites causées par les norovirus au cours de ces 10 dernières années en Europe, en Amérique du Nord et en Asie (Chen et Chiu 2012; Kroneman et al. 2008; Liu et al. 2010; Mathijs et al. 2011; Nayak et al. 2009; Siebenga et al. 2009). Les norovirus GII.4 sont généralement incriminés dans des contaminations de personne à personne. Cependant, 10% de la totalité des épidémies d'origine alimentaire sont également attribuables au génotype GII.4 (Verhoef et al. 2015). L'accumulation de données au sujet des séquences des norovirus GII.4 a permis de mettre en évidence des variants à l'intérieur du génotype GII.4. Ces variants ont des distributions géographiques différentes. Les variants US95/96, Farmington Hills/2002, Hunter/2004 et Den Haag/2006b ont eu une distribution globale (Noel et al. 1999; Siebenga et al. 2009). D'autres variants ont eu une circulation plus restreinte. C'est le cas de Sakai/2003, d'Osaka/2007 ou de Yerseke/2006a (Kamel et al. 2009; Siebenga et al. 2009). Pour une même année, plusieurs variants peuvent circuler en même temps. En revanche, il y a toujours un variant qui est très prédominant par rapport aux autres. C'est ainsi

qu'au début de 2010, le variant archi-prédominant Den Haag 2006b a disparu de la circulation au profit d'un nouveau variant, Nouvelle-Orléans/2009 aux Etats-Unis (Vega et al. 2011) et en Europe (van Beek et al. 2013; Mathijs et al. 2011; Rajko-Nenow et al. 2013) . Ce remplacement d'un variant par un autre se produit par cycle de 2 à 4 ans et caractérise l'épidémiologie des norovirus GII.4 (Green 2007). Les mécanismes régissant le remplacement d'un variant par un autre restent inconnues. L'immunité collective de la population et de chaque individu pourraient expliquer ces changements (Cannon et al. 2009; Debbink et al. 2012, 2013; Donaldson et al. 2010; L. C. Lindesmith et al. 2008, 2012, 2013) . L'activité de la polymérase des norovirus pourrait expliquer pourquoi certains variant GII.4 sont prédominants (Bull et al. 2010). L'affinité des différents variants de GII.4 vis-à-vis de leurs ligands sur la cellule hôte apporte également des explications sur le succès de certains variants GII.4 (de Rougemont et al. 2011).

Au cours des dernières années, le génotype GII.4 n'a pas toujours été systématiquement prédominant comme l'atteste une surveillance épidémiologique menée en Tunisie, entre 2007 et 2010, où les norovirus GII.3 ont été détectés en plus grand nombre chez les enfants de moins de 5 ans (Hassine-Zaafraane et al. 2013). Plus généralement, on retrouve dans les épidémies pédiatriques un plus grand nombre de génotypes que chez les adultes (Ferreira et al. 2012; Lindell et al. 2005; Sdiri-Loulizi et al. 2009). D'autres norovirus GII tels que GII.1 à 8, GII.12, et GII.14 ont été détectés de façon sporadique dans des épidémies ou dans des foyers isolés (Bull et al. 2006; Green et al. 2002; Greening et al. 2012; Lysén et al. 2009; Ozawa et al. 2007; Tu et al. 2008; Vainio et Myrmeel 2006; Vega et al. 2014). Très récemment des études ont signalé l'émergence de norovirus GII.17 en Chine (Fu et al. 2015), en Europe (de Graaf et al. 2015) aux Etats-Unis (Parra et Green 2015) et en Afrique (Ayukekbong et al. 2014).

Grâce aux séquences recueillies par le réseau FBVE (Foodborne Viruses European network) pour le génotypage des souches de norovirus circulant en Europe, il a été démontré qu'il est possible d'utiliser les informations sur les génotypes pour déterminer les modes de transmission (Verhoef et al. 2010). Les algorithmes développés par le FBVE sont disponibles sur internet. Ils permettent d'évaluer la probabilité qu'une épidémie soit d'origine alimentaire (Verhoef et al. 2009; Verhoef et al. 2011). L'analyse des données les plus récentes révèlent que 27% des épidémies d'origine alimentaire sont dues à un génotype unique autre que GII.4 et que dans 37%

des cas, les épidémies sont dues à des infections mixtes ou le génotype GII.4 est incriminé ( Verhoef et al. 2015).

Les norovirus GI sont généralement associés à des épidémies d'origine alimentaire ou environnementale (Agus et al. 1973; Matthews et al. 2012; Schreiber D. S., Blacklow N. R. 1973; Troeger et al. 2009; Vega et al. 2014). Ainsi, on relie souvent les épidémies d'origine hydrique aux génotypes GI (Matthews et al. 2012). L'hypothèse a été avancée que les génotypes GI de norovirus seraient plus résistants aux facteurs environnementaux que les norovirus GII (Nordgren et al. 2009). Leur survie prolongée dans l'environnement et dans l'eau en particulier favoriserait alors leur transmission à l'origine des gastro-entérites d'origine hydrique. Les norovirus GI sont ainsi souvent incriminés dans les épidémies qui suivent la consommation de coquillages crus (Le Guyader et al. 2012; Matthews et al. 2012).

## **12. Traitement et vaccin**

Les gastroentérites à norovirus sont généralement sans complication et évoluent spontanément vers la guérison chez les personnes en bonne santé (Desai et al. 2012; Rockx et al. 2002). Un traitement symptomatique des douleurs abdominales et de la déshydratation lors de diarrhées ou de vomissements sévères peut être mis en place dans certains cas. Dans les cas les plus graves, il existe deux stratégies possibles pour le traitement des infections à norovirus, les antiviraux et la vaccination. Chez les immunodéprimés, les très jeunes enfants et les personnes âgées, l'infection à norovirus peut entraîner des complications importantes. L'infection peut alors nécessiter une hospitalisation (Bok et Green 2012; Elliott 2007; Trivedi et al. 2012). Les agents antiviraux pour traiter les infections à norovirus sont en phase de développement (Chang 2009; Costantini et al. 2012; Dou et al. 2012; Rocha-Pereira et al. 2013; Tan et Jiang 2008). Il a été démontré que le Nitazoxanide, un médicament anti-protozoaires, réduit la durée de l'infection chez les patients immunodéprimés. Ces résultats prometteurs devraient faire l'objet d'études à grande échelle car l'utilisation de ce médicament dans le traitement de l'infection à norovirus reste au stade expérimentale (Rossignol et El-Gohary 2006; Siddiq et al. 2011).

Aujourd'hui, il n'existe pas de vaccins commerciaux contre les norovirus. Les premiers projets de vaccin sont toujours au stade expérimental. Ces vaccins prototypes sont élaborés à partir de VLP utilisées comme matériel antigénique (94 – 96). L'utilisation de VLP de GII.4 pour

l'immunisation de sujets sains permet ainsi la production d'anticorps sériques aux propriétés neutralisantes en se basant sur les résultats obtenus in vitro (Atmar et al 2015; Lindesmith et al. 2015; Malm et al. 2014). Dans les prochains vaccins, il a été proposé d'inclure au norovirus GII.4 prédominant, des VLP de GI avec pour objectif l'obtention d'une meilleure réponse immunitaire permettant une protection élargie contre plusieurs génotypes de norovirus (Malm et al. 2015). La formulation du vaccin et son administration ont été également étudiées. Ces vaccins ont tous en commun l'utilisation de protéine recombinante sous forme de VLP, de particule P ou de VLP chimère. L'administration proposée est intranasale ou intramusculaire (Debbink et al. 2014). Des formulations en poudre qui permettent une administration orale des VLP ont été également proposées (Velasquez et al. 2011). L'efficacité des différents vaccins prototypes a été pour l'instant contrôlée à partir de test in vitro sans que l'on connaisse vraiment leur efficacité chez les individus à l'exception d'une étude. Dans ces travaux, l'administration intra-nasale de VLP GI.1 a provoqué la production d'IgA spécifiques au niveau des muqueuses intestinales pour 70% des récipiendaires. Le suivi des vaccinés et du groupe placebo a montré que la vaccination diminuait par deux le risque de gastro-entérite quand après coup ceux-ci était expérimentalement infecté par le norovirus qui a servi à l'immunisation (Atmar et al. 2011). Il a été également documenté que l'administration d'immunoglobulines à des immunodéprimés donnent des résultats très variables (Chagla et al. 2013; Florescu et al. 2011; Nilsson et al. 2003). Les travaux effectués chez le chimpanzé montrent toutefois qu'un traitement prophylactique par des anticorps monoclonaux neutralisants pourrait être efficace contre les infections à norovirus (Chen et al. 2013; Dai et al. 2013).

## **Les antigènes tissulaires de groupe sanguin**

Pendant plusieurs années, les travaux sur l'épidémiologie des norovirus et des rotavirus, comme la plupart des autres virus entériques, se sont le plus souvent limités à évaluer la prévalence de ces virus et de déterminer quels étaient les génotypes circulant dans la population. La découverte du rôle des HBGA dans l'attachement des norovirus et récemment des rotavirus ont ouvert de nouvelles perspectives de recherche sur la pathologie et l'épidémiologie de ces virus mais aussi sur les facteurs génétiques contribuant à la persistance et à la propagation de ces importants pathogènes dans la population.

### **1. Généralités sur les antigènes tissulaires de groupe sanguin**

Les antigènes tissulaires de groupes sanguins ou HBGA en Anglais (Human Blood Group Antigens) doivent leur nom à leur présence sur les érythrocytes chez l'homme. Ils ont été décrits pour la première fois par Landsteiner. On regroupe sous le terme HBGA les antigènes de groupe sanguin définissant entre autre les systèmes ABO et Lewis. Les HBGA sont une association de sucres simples. Chaque combinaison de ces sucres définit un antigène de groupe sanguin particulier. Les motifs HBGA se retrouvent intégrés dans des structures plus importantes telles que les protéoglycanes que sont les mucines dans la salive. Les HBGA se situent généralement à l'extrémité de ces structures glycaniques. Les HBGA se transmettent d'une génération à l'autre de façon héréditaire et ils sont le fruit de l'activité de plusieurs gènes.

La présence des HBGA est commune aux hommes et aux grands singes (chimpanzé, gorille). Les deux groupes ont la particularité de posséder ces antigènes à la surface des globules rouges dans le sang. Certains HBGA ou précurseurs de ceux-ci sont également présents dans plusieurs espèces animales.

En plus des érythrocytes, les HBGA sont présents à la surface de plusieurs tissus. On les retrouve à la surface des muqueuses intestinales, respiratoires et vaginales sur les tissus épithéliaux et glandulaires. On les retrouve également dans certaines sécrétions comme la salive.

## 2. Biosynthèse des HBGA

Les HBGA sont constitués de plusieurs oses. L'enchaînement et la disposition des motifs osidiques entre eux forment une structure tridimensionnelle complexe qu'est l'HBGA. A partir d'un précurseur glucidique, l'association de chaque ose est le fruit de l'action d'une glycosyltransférase. Il y a 6 types de précurseurs (Oriol 1990). De différentes natures en termes de motifs glucidiques, ces précurseurs se retrouvent préférentiellement sur les glycoprotéines et les glycolipides neutres. C'est le cas des précurseurs de type 1 ( $\beta\text{Gal}1/3\beta\text{GlcNAc-R}$ ) et 2 ( $\beta\text{Gal}1/4\beta\text{GlcNAc-R}$ ). Le précurseur de type 3 correspond au « Core 1 » qui est un motif glucidique ( $\beta\text{Gal}1/3\alpha\text{GalNAc-R}$ ) relié en O à un acide aminé de type sérine ou thréonine. On retrouve par exemple ce type de précurseur dans les mucines. Les autres types de précurseurs des HBGA se retrouvent sur des glycolipides comme les globosides et gangliosides pour le précurseur de type 4 ( $\beta\text{Gal}1/3\beta\text{GalNAc-R}$ ), les gangliosides neutres de type lactoceramide pour le précurseur de type 5 ( $\beta\text{Gal}1/3\beta\text{Gal-R}$ ) qui est absent chez l'homme. Le type 6 ( $\beta\text{Gal}1/4\beta\text{Glc-R}$ ) se retrouve essentiellement dans l'urine et le lait. Dans le paragraphe qui suit nous développerons les mécanismes de synthèse des HBGA concernant en particulier les précurseurs de type 1 et 2 et l'action des fucosyl-transférases codées par les gènes *FUT2* et *3* car ils concernent les HBGA que l'on retrouve entre autre à la surface des muqueuses et des cellules intestinales et dans la salive.

Ces précurseurs sont les substrats de l'alpha1-2 fucosyl transférase ( $\alpha 2\text{FT}$ ) qui va ajouter un groupement fucose pour donner l'antigène H de type 1 à 4 selon le type de précurseur. Cet enzyme est le produit du gène *FUT1* pour les érythrocytes ou du gène *FUT2* pour les tissus épithéliaux. L'antigène H sert ensuite de substrat aux enzymes A ou B qui vont ajouter en  $\alpha 1/3$  un N-acetylgalactosamine ou un galactose qui caractérise respectivement les antigènes A et B. Ces enzymes sont codés par des gènes du locus ABO dont le polymorphisme est important.

A partir des précurseurs de type 1 et 2, un groupe fucose peut être greffé en  $\alpha 1/4$  (précurseur 1) ou  $\alpha 1/3$  (précurseur 2) pour donner respectivement les antigènes Lewis a ( $\text{Le}^a$ ) et x ( $\text{Le}^x$ ). L'addition de fucose peut également se produire à partir de l'antigène H et caractérise alors les antigènes Lewis b ( $\text{Le}^b$ ) (H type 1) et Lewis y ( $\text{Le}^y$ ) (H type 2). De la même façon, un groupement fucose peut être également greffé sur l'antigène A ou l'antigène B pour donner  $\text{ALe}^b/\text{Le}^y$  et  $\text{BLe}^b/\text{Le}^y$  selon le type de précurseur. L'addition de l'antigène Lewis est le fruit des

fucosyl-transférases de type 3 et de type 5, produits respectifs des gènes *FUT3* et *FUT5*. Ces enzymes peuvent utiliser comme substrats les précurseurs de type 1 et 2. L'affinité de ces enzymes diffère selon le type de précurseur. L'enzyme *FUT3* a par exemple une affinité supérieure pour le précurseur de type 1. Il existe d'autres fucosyl-transférases codés par les gènes *FUT4*, 6, 7, 8 et 9, actifs sur les lymphocytes (*FUT7*), durant l'embryogénèse (*FUT6* et 9) ou dans les processus tumoraux (*FUT4* et 8).

Sur ces structures antigéniques déjà complexes peuvent se greffer des acides sialiques grâce à l'action de sialyl-transférases qui catalysent l'addition d'un acide sialique sur un  $\beta$ -galactose en  $\alpha 1/3$ . Il existe à ce jour 6 types de sialyl-transférases (I à VI) dont l'affinité diffère selon le type de précurseur.

### 3. Expression des gènes *FUT2* et 3

Les fucosyl-transférases de types 2 et 3 sont actives dans les cellules épithéliales et de leur activité résulte la synthèse des HBGA. On retrouve ainsi les antigènes tissulaires de groupes sanguins A, B et H à la surface des cellules intestinales grâce à l'activité du gène *FUT2*. Ce gène est également actif dans les glandes salivaires et permet l'excrétion dans la salive des HBGA fixés aux mucines. La présence d'antigène de groupe sanguin de type ABO dans la salive reflète donc l'activité du gène *FUT2* dans les sécrétions salivaires mais aussi à la surface des cellules intestinales. La présence des antigènes A, B et H dans la salive caractérise le phénotype sécréteur (Se ou se+) du gène *FUT2*. Ce gène est actif pour 80% de la population caucasienne. Pour les 20% restant, le gène *FUT2* est inactivé par l'introduction d'un codon stop dans le cadre de lecture du gène codant la fucosyl-transférase de type 2. Cette mutation, homozygote récessive, donne le phénotype non sécréteur (se ou se-). Dans 95% des cas, la mutation ponctuelle est de type G428A. Pour les autres cas, on retrouve la mutation A385T. En l'absence d'enzyme *FUT2* actif, les antigènes A, B et H sont absents tout comme les antigènes Lewis b et y dont la synthèse par les enzymes *FUT3* et 5 dépend de la présence des antigènes du système ABO. En revanche, les antigènes Le<sup>a</sup> et Le<sup>x</sup> peuvent être greffés sur les précurseurs de type 1 et 2 par l'enzyme *FUT3*, indépendamment de l'activité du gène *FUT2*. Chez les non sécréteurs, il y a ainsi une surexpression de Le<sup>a</sup> alors que Le<sup>b</sup> est absent, le phénotype est alors Le<sup>a</sup>+Le<sup>b</sup>-. Chez les individus sécréteurs, Le<sup>a</sup> est absent et Le<sup>b</sup> est surexprimé, le phénotype est par conséquent Le<sup>a</sup>-Le<sup>b</sup>+. Dans

certains cas, il y a aussi bien expression des deux types d'antigènes ( $Le^a+Le^b+$ ), on parle de sécréteur partiel. Il correspondrait à la mutation d'une isoleucine en phénylalanine à la position 129 de la fucosyl-transférase qui réduirait l'activité de l'enzyme sans la supprimer (Henry et al. 1996). Pour 5 à 10% de la population caucasienne, l'antigène Lewis est absent à cause de mutation du gène *FUT3*. L'inactivation du gène *FUT3* est de nature homozygote et récessive. Elle implique plusieurs mutations ponctuelles (G13A, T59G, T202C, C314T, G508A, G667A, G808A et T1067A) d'après l'inventaire effectué par Soejima et al. (Soejima et al. 2009). Les mutations T202C et C314T sont les plus rencontrées dans la population caucasienne. G508A se retrouve exclusivement en Asie. G13A, G484A, G667A et G808A sont spécifiques des populations africaines subsahariennes. Il existe donc une partie de la population, correspondant à moins de 5% de la population totale, où les gènes *FUT2* et *FUT3* sont inactivés se traduisant par l'absence de l'intestin des antigènes des systèmes ABO et Lewis.

Chez les nouveaux nés, la présence des HBGA a été peu documentée. Toutefois, il semble qu'à la naissance l'expression des antigènes Lewis et ABO soit établie dans le tractus digestif.

#### **4. Norovirus et antigènes tissulaires de groupe sanguin**

Il existe plusieurs virus possédant des propriétés d'hémagglutination des globules rouges. Ces virus sont généralement enveloppés et le plus connu est le virus influenza qui interagit par le biais de l'hémagglutinine se trouvant sur son enveloppe lipidique. Dans les premiers travaux sur le RHDV (rabbit haemorrhagic disease virus) du genre lagovirus chez les *Caliciviridae*, il a été démontré grâce à l'utilisation de particules virales extraites de foie de lapin, que le RHDV avait la capacité d'agglutiner les érythrocytes humains (N Ruvoën-Clouet et al. 2000). Ces résultats ont été par la suite confirmés grâce à l'utilisation d'antigènes synthétiques de groupe A et H de type 2. L'interaction spécifique d'un calicivirus avec les HBGA constituait une nouveauté. L'étape suivant était donc de déterminer si d'autres calicivirus, et en particulier les norovirus, étaient capables d'interagir avec les HBGA et quelle en était la signification biologique.

Les travaux effectués par Marionneau et al. ont été déterminants pour démontrer le rôle que jouaient les HBGA comme facteurs d'attachement des norovirus (Severine Marionneau et al. 2002). La première série consistait en des expériences d'attachement des VLP provenant du virus de Norwalk (GI.1) sur des coupes de duodénum. Des marquages ont été observés au niveau des

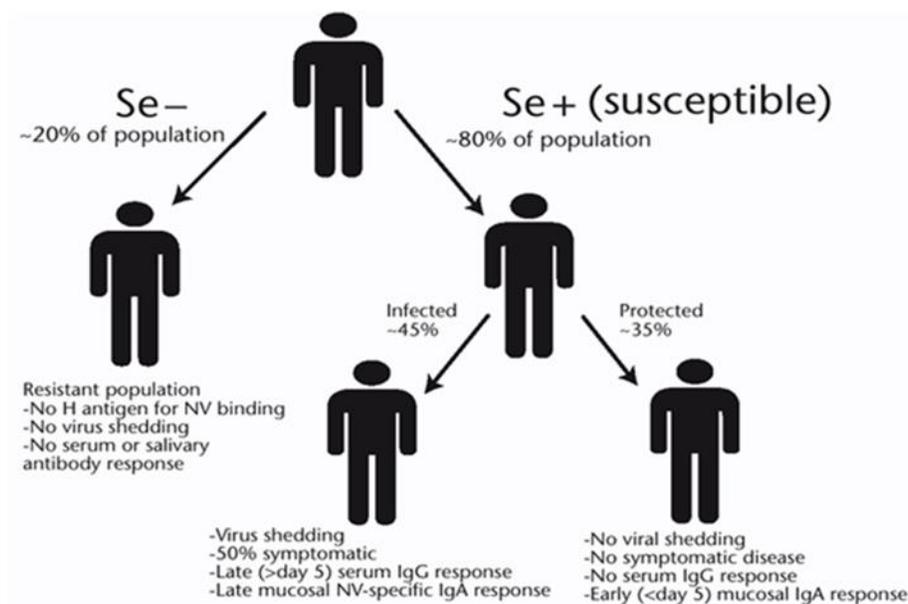
microvillosités. Ces marquages spécifiques étaient sensibles à l'action du périodate de sodium, prouvant ainsi l'implication de sucre dans l'attachement des VLP. Ils étaient également sensibles à l'action de la fucosidase démontrant le rôle des groupements fucose dans la reconnaissance des VLP par le villum. Ces marquages histologiques ont été également conduits sur des tissus d'individus non sécréteurs où aucun attachement de VLP n'a été observé. Dans la deuxième série d'expérience, les auteurs ont démontré que l'attache des VLP GI.1 à des salives provenant d'individus sécréteurs était spécifique. Dans les mêmes conditions, les salives de non-sécréteurs ne permettaient pas l'attache des VLP. Dans des expériences de compétition par addition de sucre de synthèse, les auteurs ont ensuite prouvé que l'attachement des VLP à la salive impliquait spécifiquement l'antigène H de type 1 ou 3. Ces premiers résultats positifs obtenus seulement chez les sécréteurs suggéraient que la fucosyl-transférase de type 2 était impliquée dans la reconnaissance des VLP. Pour démontrer l'implication de l'enzyme, les auteurs ont mené des expériences d'attachement des VLP sur des cellules CHO préalablement transfectées par le gène *FUT2*. En mesurant la fluorescence correspondant au VLP et à l'antigène H, fruit de l'activité du gène *FUT2*, par cytométrie de flux, les auteurs ont démontré que l'antigène H était effectivement responsable de la reconnaissance spécifique des VLP. Pour les cellules témoins non transfectées, aucun attachement n'a été observé.

L'observation en microscopie confocale des cellules CHO transfectées révélait que l'attachement des VLP à la surface des cellules était suivi par l'internalisation des pseudo-particules virales.

#### **4.1. Etude sur les volontaires et susceptibilité génétique aux norovirus**

D'autres travaux importants ont suivi et en particulier une étude effectuée sur les volontaires (Lindesmith et al. 2003). Dans cette étude de grande ampleur, les auteurs ont infecté expérimentalement 77 volontaires avec le virus de Norwalk. Pour chaque individu, la salive et les sérums précoces et tardifs à 1, 5, 8, 14 et 21 jours après l'inoculation ont été prélevés. Ces prélèvements biologiques en plus des selles ont permis de déterminer les groupes sanguins, le génotype sécréteur et d'effectuer une étude sérologique chez ces personnes. Les 77 volontaires se départageaient en 55 sécréteurs et 22 non sécréteurs. Chez les non-sécréteurs, le virus était absent des selles et aucune élévation sérique des anticorps spécifiques des virus de Norwalk a été

détectée. Parmi les sécréteurs, seuls 60% de la cohorte avaient des virus présents dans les selles. Les résultats sur les non-sécréteurs confirmaient les travaux de Marionneau et al. selon lesquels le génotype non-sécréteur pour le gène *FUT2* conférait une résistance à l'infection aux norovirus ( $P=0.01$ ). Parmi les sécréteurs, les auteurs ont observé que quel que soit le titre de l'inoculum, une fraction des sécréteurs était résistante à l'infection. La détection d'IgA salivaires spécifiques des norovirus a permis de démontrer que ce groupe de sécréteurs, réfractaires à l'infection, était protégé du norovirus en produisant rapidement des IgA spécifiques au niveau des muqueuses (« fast responder »). Un modèle a pu donc être établi à partir de ces résultats expérimentaux (**Figure 6**) (Lindesmith et al. 2003) où 45% de la population peut être infecté par le norovirus, les 55 autres pourcents étant protégés par l'absence de HBGA à la surface des cellules intestinales (non-sécréteur) ou par une réponse rapide à l'infection par la production d'IgA (« fast responder »).



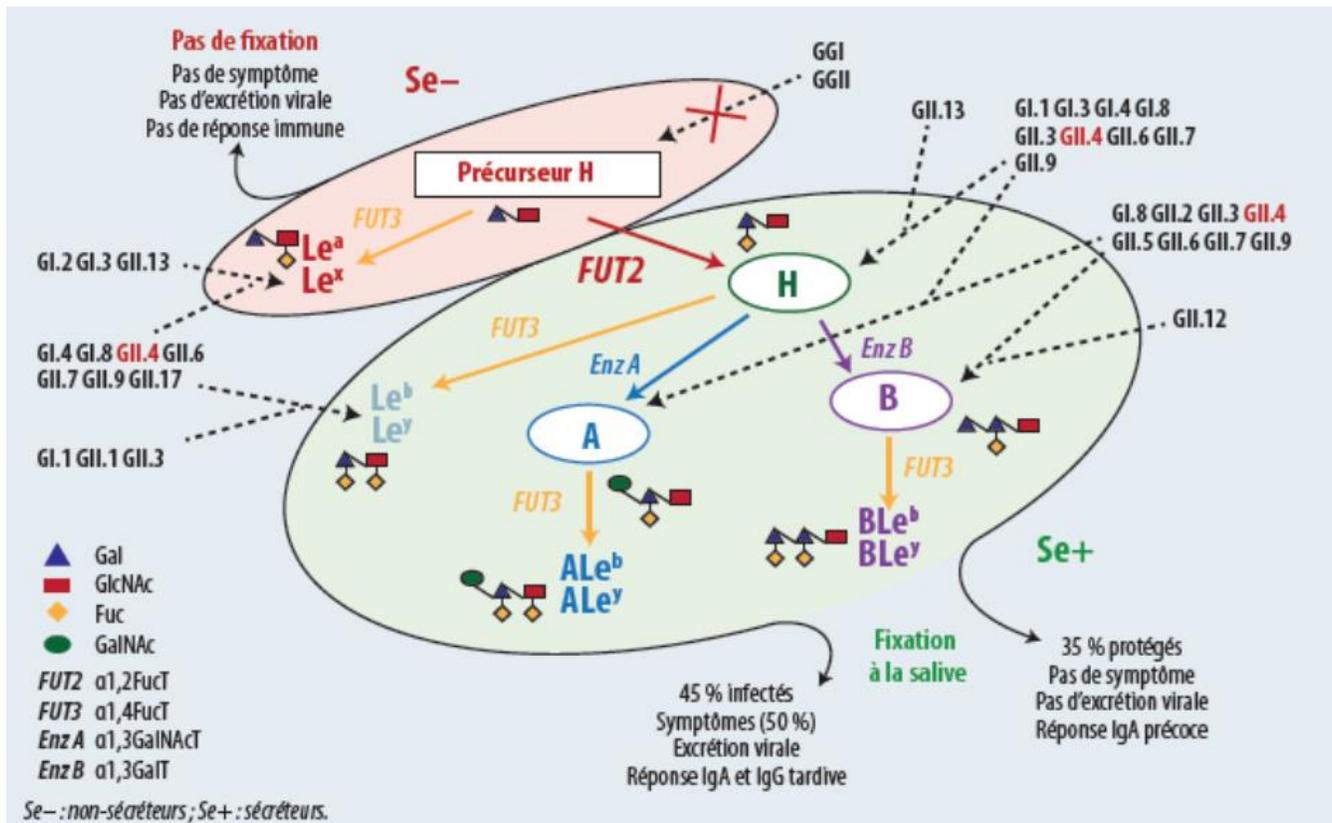
**Figure 6.** Susceptibilité de la population aux infections à norovirus d'après l'étude de Lindesmith et al. sur des volontaires (Lindesmith et al. 2003). Se- : non-sécréteur. Se+ : sécréteur.

Depuis ces travaux, il est admis que l'infection par les norovirus était surtout associée au phénotype sécréteur. D'autres études épidémiologiques récentes ont confirmé ces conclusions. En particulier, le génotype GII.4 prédominant depuis plusieurs années n'infecterait que les sécréteurs (Currier et al. 2015; Lopman et al. 2015; Van Trang et al. 2014). Il y a cependant quelques

exceptions. Lors d'une étude ultérieure, il avait été démontré qu'un variant 2004/Hunter des norovirus GII.4 avait infecté un individu non-sécréteur  $Le^a+Le^b-$  (Carlsson et al. 2009). L'étude a également montré que si de nombreux individus non-sécréteurs étaient infectés, l'infection était généralement asymptomatique. En dehors de GII.4, l'infection des non-sécréteurs par un norovirus d'un autre génotype a été observée à de nombreuses reprises (Bucardo et al. 2010; Lopman et al. 2015; Nordgren et al. 2010, 2013). En revanche, les auteurs n'ont pas pu établir de lien entre la présence des antigènes Lewis et l'infection comme l'atteste la présence de norovirus dont des norovirus GII.4 et GII.7 chez des patients  $Le^a-Le^b-$  (défectif pour *FUT2* et *FUT3*) (Nordgren et al. 2013). Ces dernières observations sont inédites car elles mettent en évidence des mécanismes d'attachement indépendants des HBGA.

#### **4.2. Profil d'attachement des norovirus aux antigènes de groupe sanguin**

Lors de l'étude effectuée sur les volontaires (Lindesmith et al. 2003), les auteurs ont déterminé le profil d'accroche du virus de Norwalk grâce à des VLP. Ils ont ainsi démontré à partir de test sur salives phénotypées que ce génotype s'accrochait préférentiellement sur l'antigène H et un peu sur l'antigène A alors que la reconnaissance de l'antigène B était faible ou nulle. Le profil d'attachement des norovirus en fonction de leur génotype et du type d'antigène de groupe sanguin a fait par la suite l'objet de plusieurs études (Lindesmith et al. 2013; Nasir et al. 2012; Nordgren et al. 2013). Il ressort de ces travaux que le profil d'accroche des norovirus est fonction du génotype et des HBGA. On distingue 7 profils d'accroche des norovirus reconnaissant exclusivement les sécréteurs ou les non sécréteurs, un antigène de groupe sanguin du système ABO ou du système Lewis et enfin un groupe ou les norovirus n'ont pas la capacité d'interagir avec aucune des salives (génotype GII.1) (Huang et al. 2003, 2005) (*Figure 7*).



**Figure 7.** Interactions des norovirus avec les HBGAs, en relation avec les phénotypes sécréteur (Se+) et non-sécréteur (Se-) (adaptée de la thèse d'Alexis De Rougemont)

Les interactions entre les virus et les HBGAs sont indiqués par des flèches discontinues. Les motifs glucidiques constituant chaque HbGA sont représentés symboliquement. Les enzymes permettant la synthèse des HBGAs sont indiqués en bleu. Reprenant les données de Lindesmith et al. (2003), les « fast IgA responder » et les personnes infectées parmi les sécréteurs sont indiqués sur le schéma.

Les travaux effectués au laboratoire montrent que le profil d'attachement des norovirus GII.4 varie en fonction du variant (de Rougemont et al. 2011). L'utilisation de VLP représentatives des différents sous-groupes prouve que les GII.4 ont la capacité de reconnaître les antigènes A, B et H parmi les sécréteurs. Pour les variants Osaka/2007 et Den Haag/2006b, le profil d'accroche inclut également les non-sécréteurs positifs pour l'antigène Lewis. Dans le dernier volet de cette étude, la mesure de l'affinité en résonance plasmonique de flux des VLP à des antigènes synthétiques a permis de démontrer que l'affinité était supérieure pour les souches qui ont émergé à partir de 2000 et en particulier pour le variant Den Haag/2006b. L'affinité accrue de certains pour les HBGAs peut en partie expliquer la prédominance de certains d'entre eux comme le

variant Den Haag/2006b d'un point de vue épidémiologique. Ces travaux expérimentaux ont donc permis de prédire la possibilité d'une infection des non-sécréteurs par les GII.4. Ils confirmaient une étude antérieure qui décrivait le cas d'un GII.4 retrouvé chez un individu non sécréteur (Carlsson et al. 2009). Toutefois, . Les études épidémiologiques récentes montrent que les norovirus GII.4 ne semblent infecter que la population des sécréteurs (Currier et al. 2015; Van Trang et al. 2014). A la lumière de ces résultats, ils semblent que la prédiction de l'infection par des tests salivaires ne soit pas infaillible.

### **4.3. Etude de la liaison entre le norovirus et les HBGA**

L'interaction des norovirus avec les HBGA se fait par le biais du domaine P2. Les études cristallographiques qui ont été effectuées à l'aide de VLP ou de particules P dérivées de norovirus ont permis de démontrer que plusieurs acides aminés interagissaient directement avec la particule virale. La nature de cette interaction varie selon le génogroupe de norovirus et l'antigène (Choi et al. 2008). L'analyse structurale en cristallographie du virus de Norwalk (GI.1) révèle que chaque protéine VP1 possède un site d'interaction aux HBGA, ce site étant situé sur le domaine P2. Pour les norovirus GII, l'interaction aux HBGA fait intervenir un dimère de VP1. Chaque capsid possède 90 dimères où les protéines VP1 sont organisées tête-bêche. Dans ces dimères, le site d'interaction aux HBGA est situé sur le domaine P2, à l'interface des deux protéines VP1. Le site d'attachement implique toujours plusieurs acides aminés sur la capsid. Ces résidus diffèrent selon les génogroupes mais sont conservés pour la plupart entre les génotypes (Tan et al. 2009). Pour le génogroupe I, 6 acides aminés (Asp327, His329, Trp375, Ser377, Pro378, Ser380) formant une poche hydrophobe interviennent dans l'interaction avec l'antigène A sous forme de trisaccharide alors que la reconnaissance de l'antigène H de type 1 sous forme de pentasaccharide met en jeu 7 acides aminés (Asp327, His329, Gln342, Asp344, Trp375, Ser377, Pro378) et de manière indirecte 3 autres (Ser338, Ala440 et Tyr431) (Bu et al. 2008; Choi et al. 2008). L'analyse cristallographique du variant Farmington des norovirus GII.4 (à partir du domaine P produit en système bactérien) en présence des antigènes A et B sous forme de trisaccharides révèle la présence d'une poche hydrophobe composée également de 7 acides aminés (Ser343, Thr344, Arg345, Asp374, Ser441, Gly442 et Tyr443) (Cao et al. 2007). Ces acides aminés sont conservés au sein du génotype GII.4 (Cao et al. 2007; Lindesmith et al. 2008; Tan et al. 2009).

Pour les norovirus GII.4, la délétion de l'un de ces acides aminés entraîne la suppression de l'attachement des VLP aux HBGA (de Rougemont et al. 2011). La modification d'un acide aminé modifie également le profil d'attachement des norovirus aux HBGA. De Rougemont et al. ont démontré que le remplacement de la tyrosine en position 443 par une phenyl-alanine qui supprime un groupement hydroxyl sur le noyau aromatique influe sur le profil d'attachement des norovirus. Le contexte moléculaire des acides aminés constituant le site de réception joue également un rôle dans l'attachement des norovirus (de Rougemont et al. 2011; Tan et al. 2009). Ainsi la suppression ou la modification de Thr395, marqueur épidémiologique des norovirus GII.4 post 2000, induit une forte diminution de l'affinité des norovirus pour les antigènes A et B. Le remplacement de ce résidu thréonine entraîne alors la suppression d'une boucle à cheval entre les domaines P1 et P2 (L. C. Lindesmith et al. 2008).

#### **4.4. Facteurs influençant l'attachement des norovirus aux HBGA**

Les études sur le sujet sont rares mais donnent un éclairage nouveau sur la relation entre le norovirus et son hôte. Dans la première étude (Ruvoën-Clouet et al. 2014), l'analyse des biopsies d'estomac et de la salive de 109 individus a démontré qu'il y avait généralement une bonne concordance entre la présence d'HBGA et l'attachement de VLP de GI.1 et GII.4. En revanche, pour 10 individus non sécréteur sur un tout de 27, les résultats ne correspondaient pas. Les observations histologiques ont confirmé l'attachement des VLP GII.4 sur les coupes provenant d'individus non-sécréteurs négatifs pour la présence d'HBGA dans la salive. Les auteurs ont associé ces résultats à la forte prévalence des infections (plus de 90% de la population), pour la plupart chronique, à *Helicobacter pylori* dont certaines adhésines interagissent avec les HBGA. Dans la suite de leurs travaux, les auteurs ont démontré que cette expression anormale des HBGA et de l'antigène H en particulier pouvait être corrélée avec l'infection par *H. pylori* exprimant la protéine CagA (cytotoxin-associated gene A). Cette protéine très immunogénique est un facteur de virulence dont les mécanismes d'action restent inconnus. Dans l'étude Ruvoen-Clouet et al. ont conclu que le facteur CagA induirait ainsi l'expression des HBGA dans le tractus digestif grâce à l'activation du gène *FUT1*.

Dans la deuxième étude, Jones et al. ont étudié la réplication du MNV et des norovirus humains dans les lymphocytes (Jones et al. 2014) . Dans cette étude, les auteurs ont démontré que

les norovirus murins et humains avaient la capacité d'adhérer et de se répliquer dans les lymphocytes dans certaines conditions. L'implantation en co-culture de lymphocytes humains en présence de cellules HT-29 dérivées d'un adénocarcinome a permis la réplication des norovirus humains et de façon plus surprenante du MNV lors de l'addition d'un extrait de fèces non filtré. Les expériences menées avec des filtrats de selle se sont soldées par des échecs. Ces résultats démontraient qu'une substance présente dans les selles permettait l'adhésion puis la réplication des norovirus. Dans l'expérience suivante, les auteurs ont montré qu'*Enterobacter cloacae* exprimant l'antigène H à sa surface jouaient le rôle de facilitateur dans l'entrée des norovirus dans les lymphocytes. Ces travaux ouvrent de nouveaux domaines de recherche s'agissant du rôle du microbiome digestif dans la biologie des norovirus. Ces travaux démontrent également que plusieurs facteurs et molécules interviennent dans l'attachement des norovirus. Les rotavirus fournissent un autre exemple de ces mécanismes d'adhésion du virus à sa cellule.

## **5. Facteurs intervenant dans l'attachement des rotavirus**

Quoique parcellaires, les connaissances que nous avons sur les mécanismes d'attachement sont plus importantes pour les rotavirus que pour les norovirus. Dans la plupart des études sur l'attachement des rotavirus, des souches virales adaptées à la culture cellulaire et d'origines animales ou humaines ont été étudiées. L'entrée des rotavirus dans la cellule fait intervenir plusieurs facteurs protéiques ou glycolipidiques.

### **5.1. Rôle des acides sialiques et des glycosaminoglycanes dans l'attachement des rotavirus**

Plusieurs rotavirus ont la capacité d'agglutiner les érythrocytes. Cette capacité d'agglutination est sensible à l'action de la neuraminidase et par conséquent suggère l'implication de l'acide sialique dans la reconnaissance de certains rotavirus par la cellule hôte. La capacité d'agglutiner grâce à l'interaction avec les acides sialiques est associée à VP8\*, sous-produit de VP4 (Fiore, Greenberg, and Mackow 1991; Kalica, Flores, and Greenberg 1983), Après traitement à la neuraminidase des cellules telles que les MA104, on distingue deux groupes de rotavirus. Les rotavirus sensibles (« NA-sensitive ») sont ceux qui ne se répliquent pas après traitement des

cellules hôtes à la neuraminidase. Les résistants (« NA-resistant ») se répliquent sur des cellules traitées par la neuraminidase. La plupart des rotavirus humains rentrent dans la catégorie des résistants (Ciarlet and Estes 1999). A l'aune des récents travaux effectués sur l'interaction des rotavirus avec les HBGA au niveau structural, le site d'interaction de VP8\* acides sialiques serait plus confiné pour les rotavirus résistants et n'autoriserait que l'attache aux HBGA (Hu, et al. 2012). Cette hypothèse va à l'encontre d'autres résultats expérimentaux. Il a été ainsi démontré que des souches supposées résistantes comme la souche humaine G1P[8] interagissait avec l'acide sialique interne du ganglioside GM1 et que cette étape était obligatoire pour l'infection de la cellule par le rotavirus (Haselhorst et al. 2009).

## **5.2. Rôle des intégrines dans l'attachement des rotavirus**

Les intégrines sont des récepteurs transmembranaires ubiquitaires. Elles sont constituées de deux sous-unités,  $\alpha$  et  $\beta$ . De par leurs séquences en acide aminé, on distingue 18 sous-unités  $\alpha$  et 8 sous-unités  $\beta$ . Les intégrines sont par conséquent le produit de plusieurs combinaisons, il en existe plus de 20, et chacune de celle-ci détermine la spécificité de l'intégrine vis-à-vis du ligand et la nature de celui-ci. Ces molécules sont utilisées par de nombreux virus enveloppés et non-enveloppés pour leur attachement à la cellule hôte (López et Arias 2004). Les protéines VP4 et VP7 du rotavirus arborent des sites de reconnaissance des intégrines. L'incubation de cellules MA104 ou Caco-2 avec des anticorps anti-intégrine ou des peptides dérivés de VP4 (motifs DGE situé dans VP5) ou VP7 (motifs GDV et LPR) comportant les sites de reconnaissance de ces molécules a permis de bloquer par compétition de façon spécifique l'infection des cellules par le rotavirus (simien ou humain), démontrant ainsi pour la première fois l'implication des intégrines dans l'attachement du rotavirus à la cellule (Coulson, Londrigan, and Lee 1997). Dans la même étude, les auteurs ont démontré que les intégrines reconnues par VP4 et VP7 étaient de différents types. Dans cette étude princeps, les auteurs ont mis en évidence l'utilisation par le rotavirus des intégrines  $\alpha 2\beta 1$ ,  $\alpha x\beta 2$  et  $\alpha 4\beta 1$  comme facteur d'attachement. Dans une autre étude, il a été mis en évidence le rôle de l'intégrine  $\alpha v\beta 3$  (C. Guerrero et al. 2000), en utilisant les mêmes approches expérimentales. Plus récemment, il a été également démontré que  $\alpha 1\beta 1$  et  $\alpha 2\beta 1$  jouaient le rôle de récepteur de NSP4, toxine entérique du rotavirus murin (Seo et al. 2008). A l'exception des intégrines  $\alpha 2\beta 1$  et  $\alpha 4\beta 1$  qui interviennent lors de l'accroche du virus à la cellule (Hewish et al.

2000), les autres types d'intégrine interviendraient surtout lors des étapes qui suivent l'attachement du rotavirus à la membrane cellulaire, jouant le rôle de co-récepteurs. D'autres protéines et en particulier la protéine hsc70 (Heat Shock Cognate Protein 70) interviennent également comme co-récepteur des rotavirus. Pour hsc70, il a été ainsi prouvé, grâce à des anticorps spécifiques, que celle-ci n'intervenait pas lors de l'attachement du virus par le biais de VP4 et VP7, mais lors de sa prise en charge dans la phase d'internalisation par la cellule (Guerrero et al. 2002). Au niveau moléculaire, la phase d'attachement est semble-t-il plus complexe qu'il n'y paraît. Ainsi, la sous-unité  $\alpha$  de  $\alpha 2\beta 1$  reconnaît VP4 lors de l'attachement du virus alors que les intégrines  $\alpha x\beta 2$  et  $\alpha v\beta 3$  interagissent avec VP7 lors de l'internalisation du virus (Graham et al. 2003; Londrigan et al. 2003). Le domaine  $\alpha 2I$  de la sous-unité  $\alpha$  correspondant au site d'adhérence dépendants des ions métalliques (motif MIDAS : metal ion-dependent adhesion site) est directement impliqué dans l'accroche des rotavirus (Londrigan et al. 2003). L'analyse de chimères dérivées de  $\alpha 2\beta 1$  révèle que plusieurs acides aminés de la sous-unité  $\beta$  participent indirectement à l'interaction avec le site MIDAS. La mutagenèse de un ou plusieurs de ces acides aminés abolit complètement l'interaction des rotavirus avec l'intégrine (Fleming et al. 2011).

### **5.3. Rôle des radeaux lipidiques**

Les radeaux lipidiques sont une structure ou un état biochimique de la membrane cellulaire qui se caractérise par un enrichissement entre autre en cholestérol, en gangliosides comme le GM1 et en récepteur cellulaires comme les intégrines ou la protéine hsc70. Ils constituent la porte d'entrée de nombreux virus à la cellule. Les radeaux lipidiques joueraient également un rôle dans l'internalisation du rotavirus comme suggère la déplétion en cholestérol de la membrane cellulaire de la lignée MA104 (Guerrero et al. 2000). D'autres expériences ont montré que les particules de rotavirus co-ségréguaient avec la fraction résistante aux détergents anioniques, ou DRM (Detergent Resistant Membrane), lors de la purification de celles-ci par centrifugation en gradient de sucrose à partir de cellules MA104 infectées par le rotavirus simien (Cuadras et Greenberg 2003). L'infection par le rotavirus ne modifie pas la composition générale des DRM où l'on retrouve associée la protéine VP4 plusieurs quelques heures après l'inoculation suivie par

les autres protéines. Cette étude et une autre antérieure ont suggéré que l'excrétion du virus se faisait également par le biais des radeaux lipidiques (Jourdan et al. 1997; Sapin et al. 2002).

## **6. HBGA et rotavirus**

Les HBGA font partie des nombreux facteurs d'attachement des rotavirus dont le rôle n'a été découvert que tardivement. Dans les études initiales, les auteurs ont cherché sans succès une association entre les HBGA et l'infection par le rotavirus en se basant sur le typage des érythrocytes (Ahmed et al. 2009; Yazgan et al. 2013). La relation qu'il existe entre les sphingolipides et les rotavirus a été établie depuis plusieurs années. En revanche ce n'est que très récemment que la démonstration des interactions entre les rotavirus et les HBGA a été faite. Dans cette interaction, les HBGA tout comme les sphingolipides interagissent de manière spécifique avec la protéine VP8 des rotavirus, sous-produit du clivage de VP4 en VP5 et VP8. Dans un des premiers papiers sur le sujet, les auteurs ont fait l'hypothèse que les HBGA pouvaient intervenir comme facteurs d'attachement alternatifs chez les Rotavirus résistants aux neuraminidases (Huang et al. 2012). Ils ont ainsi démontré à l'aide de protéine VP8 recombinante et de TLP (Triple Layer Particle) que les RV de génotype P[4] et P[8] pouvaient reconnaître les antigènes Le<sup>b</sup> et H de type 1. Dans cette étude et d'autres, il a été également démontré que le profil d'attachement aux HBGA était fonction du génotype (Ramani et al. 2013). Il a été également démontré que les rotavirus P[11], fréquemment détectés chez les très jeunes enfants, ne reconnaissaient pas les HBGA mais seulement leurs précurseurs (Liu et al. 2013).

La même année, l'étude structurale d'un rotavirus P[14] interagissant avec l'antigène A a été publiée (Hu et al. 2012). De la même manière que pour les norovirus, les auteurs ont démontré que le RV s'associait spécifiquement aux cellules HT-29 qui exprime l'antigène A à leur surface. Cet attachement était inhibé par la neutralisation de l'antigène A par des anticorps spécifiques. Ils ont également démontré qu'une fois transfectées par les gènes codant la fucosyl transférase de type 2 et l'enzyme A, les cellules CHO acquéraient la capacité d'attachement au rotavirus. L'étude cristallographique a prouvé que les sites d'accroche des rotavirus aux HBGA étaient identiques à ceux retrouvés pour les acides sialiques.

L'analyse phylogénétique de la séquence codant VP8 permet de distinguer 5 sous-groupes phylogéniques, P[I] à [V]. Les groupes I, III, IV et V correspondent aux rotavirus animaux, les

groupes II et III aux rotavirus humains. Les génotypes humains P[4], P[6] et P[8] de VP8 appartiennent au groupe II alors que des rotavirus humains plus rares de génotypes P[9], P[14] et P[25] font partie du groupe P[III]. Selon ces groupes phylogénétiques, l'attache aux HBGA est différente. Les expériences d'hémagglutination et les tests d'attachement à des sucres synthétiques ou des particules virales infectieuses de rotavirus ont ainsi permis de démontrer qu'il y a deux profils d'attachement aux antigènes de groupe A spécifiques des génogroupes P[II] et P[III] de VP8 (Liu et al. 2012).

### **6.1. Rotavirus et HBGA d'un point de vue épidémiologique**

Les travaux expérimentaux ont permis de démontrer que l'interaction entre les HBGA et les rotavirus par le biais de VP8 étaient spécifiques. Autres études ont eu alors comme objectif de déterminer les liens entre HBGA et rotavirus. Toutes les études ont clairement démontré que les génotypes les plus communs de rotavirus, en l'occurrence le génotype P[8], se retrouvait exclusivement chez les patients sécréteurs (Imbert-Marcille et al. 2014; Van Trang et al. 2014). L'étude rétrospective menée sur des enfants burkinabés et nicaraguayens où la distribution des HBGA est différente de celle de la population caucasienne a confirmé les conclusions sur l'absence d'infection par les rotavirus P[8] chez les non-sécréteurs. Ces mêmes travaux ont montré en revanche que les rotavirus P[6] se retrouvaient chez les sécréteurs comme les non-sécréteurs qu'ils soient positifs ou pas pour l'antigène Lewis alors que la présence de l'antigène Lewis semble être un prérequis à l'infection par les rotavirus P[8] (Nordgren et al. 2014).

## **7. Les différentes étapes de l'attachement du rotavirus**

Les données obtenues ces dernières années donnent un éclairage nouveau sur la complexité des mécanismes régissant l'attachement des rotavirus à l'hôte (Estes et Greenberg 2013; López et Arias 2004). Elles font apparaître que l'attachement des rotavirus implique différentes étapes et que la protéine VP4 et ses produits de clivage VP5\* et VP8\* ont un rôle pivot dans l'attachement. La reconnaissance par le virus des HBGA se situant au sommet de glycocalix atteignant 100 nm de haut pourrait constituer la première étape de l'attachement des rotavirus (Le Pendu et al.) . Il y a également une reconnaissance par le virus des structures glucidiques que sont

les acides sialiques portés entre autre par les gangliosides. La relation qu'il y a entre les HBGA et les acides sialiques reste à éclaircir pour l'instant. Le virus pourrait être ensuite pris en charge par l'intégrine  $\alpha 2\beta 1$ , le récepteur des rotavirus, puis par la protéine hsc70 et d'autres intégrines ( $\alpha v\beta 3$ ,  $\alpha x\beta 2$ ,  $\alpha 2\beta 1$ ) qui joueraient le rôle de co-récepteurs. Le complexe migrerait ensuite vers les radeaux-lipidiques où les particules virales seraient internalisées, la voie d'endocytose variant selon la souche de rotavirus (Gutiérrez et al. 2010).

## **Objectifs des travaux de la thèse**

L'objectif principal de nos travaux a été de déterminer les liens éventuels entre la présence des HBGA et les infections à rotavirus et norovirus. L'objectif pour les norovirus a été ensuite de caractériser plus en détails une souche de norovirus GII.3 infectant les non-sécréteurs de l'étude.

Notre étude a porté sur des jeunes enfants souffrant de gastroentérites aiguës admis à l'hôpital Fattouma Bourguiba à Monastir en Tunisie. En parallèle des prélèvements de selles et après accord de la commission d'éthique de l'hôpital, nous avons effectué le phénotypage des HBGA dans des échantillons de salive. Nous avons déterminé les génotypes, sécréteur ou non-sécréteur, du gène FUT2 à partir de prélèvements sanguins.

Les travaux présentés dans le mémoire s'articule en 2 volets traitant des rotavirus puis des norovirus. En premier lieu, nous aborderons la méthodologie utilisée lors de l'étude. Nous présenterons ensuite les résultats obtenus. Nous clorons la thèse par la discussion de nos travaux et les perspectives qui en découlent.

## **MATERIELS ET METHODES**

# Matériels et Méthodes

## 1. Conception de l'étude

Pour l'étude, nous avons prélevés 114 échantillons de selles sur des enfants de moins de six ans (âge compris entre 5 jours et 6 ans). Ces enfants ont consulté à l'hôpital des enfants de Monastir et à des dispensaires appartenant à la région de Monastir, pour des signes de gastro-entérite suspectées d'origine virale entre janvier 2011 et août 2012. Nous avons également prélevés des échantillons de sang pour 98 patients sur les 114. L'étude a été approuvée par le comité d'éthique de l'hôpital public Fattouma Bourguiba à Monastir (Tunisie) (décision du comité du 9 mai 2013), et le consentement éclairé a été obtenu des parents des 114 enfants. Les échantillons de sang et de salive ont été prélevés en présence des parents.

Le dépistage des virus et la caractérisation ont été effectués au Centre National de Référence des Virus Entériques à Dijon, France.

## 2. Préparation des échantillons de selles

Pour chacun des échantillons, un petit volume de selle (de la taille d'une lentille) a été resuspendu dans 800 µl de tampon PBS (phosphate buffer saline) à pH 7,4. Les resuspensions ont été ensuite centrifugées pendant 30 minutes à 3000 rpm puis à 10000 rpm pendant 15 minutes pour clarifier la suspension. Les préparations ont été ensuite utilisées pour la détection des antigènes de rotavirus par ELISA et pour l'extraction des acides nucléiques pour la détection et le typage des rotavirus et des norovirus.

### 2.1. Extraction de l'ARN viral à partir des échantillons fécaux

L'extraction des acides nucléiques a été effectuée avec un extracteur automatique de type Easy MAG<sup>TM</sup> NucliSENS<sup>®</sup> (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France), suivant les instructions du fabricant, dont le protocole opératoire est basé sur les méthodes d'extractions des acides nucléiques par le thiocyanate de guanidine (Chomczynski et Sacchi, 1987) et de purification sur

silice (Boom *et coll.*, 1990). Les acides nucléiques ont été élués dans un volume final de 110  $\mu$ l puis stockés à -70°C avant utilisation.

### **3. Détection des rotavirus**

#### **3.1. ELISA**

Chaque suspension de selle a été préparée dans une solution saline tamponnée avec 0.02% de thimérosal avant la procédure. La détection des antigènes de rotavirus a été effectuée par le dépistage de la protéine VP6 grâce à la trousse de détection Premier™ Rotaclone® Rotavirus Test Kit (Meridian, Paris, France) en suivant le protocole fourni par le fabricant. A la fin du protocole, le mélange chromogénique (peroxyde d'urée et 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine: TMB) a été incubé pendant 10 min à température ambiante. Le développement de la réaction a été stoppé par l'ajout d'acide sulfurique 1N. L'absorbance a été mesurée à 450 nm en utilisant 600 nm comme longueur d'onde de référence. Tout échantillon avec une absorbance supérieure à 0.150 a été considéré comme positif.

#### **3.2. Détection moléculaire des rotavirus de groupe A**

Pour la détection des génomes des rotavirus, les ARN (5  $\mu$ l d'ARN + 4  $\mu$ l d'eau) ont été préalablement chauffés à 97°C pendant 5 min pour éliminer les structures secondaires, puis plongés immédiatement dans la glace pendant 2 min. Neuf microlitres d'ARN dénaturés ont été amplifiés par RT-PCR temps réel en utilisant les amorces listées dans le *Tableau 3*. Les informations concernant le mélange réactionnel et les cycles d'amplification sont indiquées dans les *Tableaux 4 et 5*.

*Tableau 3. Amorces et sonde utilisées pour l'amplification du gène codant la protéine de capsid VP2, d'après Gutiérrez-Aguirre I. et al 2008.*

<b>Amorces</b>	<b>Séquences</b>	<b>Polarité</b>	<b>Position</b>
VP2-F1	5'-TCTGCAGACAGTTGAACCTATTAA-3'	sens	
VP2-F2	5'-CAGACACGGTTGAACCCATTAA-3'	sens	
VP2-F3	5'-TCGGCTGATACAGTAGAACCTATAAAATG-3'	sens	
VP2-F4	5'-TGTCAGCTGATACAGTAGAACCTATAAAATG-3'	sens	
VP2-F5	5'-TCAGCTGACACAGTAGAACCTATAAAATG-3'	sens	
VP2-R1	5'-GTTGGCGTTTACAGTTCGTTTCAT-3'	Anti-sens	
VP2-R2	5'-GTTGGCGTCTACAATTCGTTTCAT-3'	Anti-sens	
<b>Sondes</b>	<b>Séquences</b>	<b>Polarité</b>	
VP2-P	6FAM-5'-ATGCGCATRTRTCAAHGCAA-3'	sens	

*Tableau 4. Mélange réactionnel pour l'amplification du gène codant la protéine de capsid VP2*

<b>Réactifs</b>	<b>Volumes</b>
TaqMan® fast Virus 1-Step Master Mix (4X)	5 µl
VP2-F1 (100 µM)	0.18 µl
VP2-F2 (100 µM)	0.18 µl
VP2-F3 (100 µM)	0.18 µl
VP2-F4 (100 µM)	0.18 µl
VP2-F5 (100 µM)	0.18 µl
VP2-R1 (40 µM)	0.45 µl
VP2-R2 (40 µM)	0.45 µl
VP2-P (10 µM)	0.5 µl
H <sub>2</sub> O	3.7 µl
ARN dénaturés	9 µl
<b>Volume total</b>	<b>20 µl</b>

**Tableau 5.** Cycles pour l'amplification du gène codant VP2 par RT-PCR temps réel

Étapes	Dénaturation	RT	Activation <sup>a</sup>	Amplification
Paramètres	97°C, 5 min	50°C, 5 min	95°C, 20 sec	95°C, 30 sec 60°C, 3 sec
Cycles	1	1	1	40

<sup>a</sup> Etape correspondant à l'activation de la polymérase

### 3.3. Typage des rotavirus de groupe A

Les échantillons de rotavirus positifs par ELISA ont été confirmés et génotypés par RT-PCR. Avant la phase d'amplification, les ARN ont été préalablement chauffés à 97°C pendant 5 min puis refroidis 2 min dans la glace. Le génotypage de VP4 et VP7 a été effectué en plusieurs étapes en fonction des résultats positifs obtenus par RT-PCR avec plusieurs jeux d'amorces (**Tableau 6**). Les échantillons d'ARN ont servi en premier à une RT-PCR multiplexe de typage utilisant séparément les groupes d'amorces G (pool G) et P (pool P). Les produits de PCR ont été analysés par électrophorèse en gel d'agarose où la taille de chaque produit de PCR est fonction du génotype. Lors de l'analyse, des souches de référence préalablement typées (P[4], P[8], G1-4 et G9) ont servi de standards.

En cas de résultats négatifs pour le typage de VP4 et/ou VP7, les échantillons ont été ensuite amplifiés avec les amorces VP4F/VP4R (génotype P), les amorces VP7F/VP7R (génotype G) et VP6F/VP6R (protéine VP6). Les produits d'amplification ont été alors purifiés sur gel puis séquencés. L'analyse des séquences avec des séquences standard disponibles sur GenBank a permis le génotypage des rotavirus. Pour quelques échantillons, ces amplifications se sont avérées négatives. Dans ce cas les produits de PCR obtenus avec VP4F/VP4R et VP7F/VP7R ont été réamplifiés en PCR nichée avec respectivement les jeux d'amorces Con2/Con3 (VP4) et beg9/end9 (VP7). Les produits d'amplification ont été alors purifiés sur gel puis séquencés pour génotypage. Le génotypage des rotavirus pour P ou G a été rendu « non typables » quand les PCR nichées utilisant Con2/Con3 ou beg9/end9 ont été négatives.

**Tableau 6.** Amorces utilisées pour les typages G (VP7) et P (VP4) des rotavirus de groupe A (Gouvea V et al. 1990, Gentsch JR et al. 1992, Iturriza-Gomara M et al. 2000, Iturriza-Gomara M et al. 2001, Iturriza-Gomara M et al. 2002, Iturriza-Gomara M et al. 2004, Simmonds MK et al. 2008)

Amorces		Séquences	Polarité	Position des amorces	Longueur	
VP6-F		5'-GACGGVGCRACTACATGGT-3'	sens	747-765	19	
VP6-R		5'-GTCCAATTCATNCCTGGTGG-3'	Anti-sens	1107-1126	20	
VP7-F		5'-ATGTATGGTATTGAATATACCAC-3'	sens	49-71	23	
Pool G	VP7-R		5'-AACTTGCCACCATTTTTTCC-3'	Anti-sens	914-933	20
	aBT1	G1	5'-CAAGTACTCAAATCAATGATGG-3'	sens	314-335	22
	aCT2	G2	5'-CAATGATATTAACACATTTTCTGTG-3'	sens	411-435	25
	G3	G3	5'-ACGAACTCAACACGAGAGG-3'	sens	250-269	19
	aDT4	G4	5'-CGTTTCTGGTGAGGAGTTG-3'	sens	480-498	19
	aAT8	G8	5'-GTCACACCATTTGTAAATTCG-3'	sens	178-198	21
	G9	G9	5'-CTTGATGTGACTAYAAATAC-3'	sens	757-776	20
	G10	G10	5'-ATGTCAGACTACARATACTGG-3'	sens	666-686	21
Pool P	2T-1	P[4]	5'-CTATTGTTAGAGGTTAGAGTC-3'	Anti-sens	474-494	21
	3T-1	P[6]	5'-TGTTGATTAGTTGGATTCAA-3'	Anti-sens	259-278	20
	1T-1D	P[8]	5'-TCTACTGGRTRACNTGC-3'	Anti-sens	339-356	18
	4T-1	P[9]	5'-TGAGACATGCAATTGGAC-3'	Anti-sens	385-402	18
	5T-1	P[10]	5'-ATCATAGTTAGTAGTCGG-3'	Anti-sens	575-594	18
	P[11]	P[11]	5'-GTAAACATCCAGAATGTG-3'	Anti-sens	306-323	18
	VP4-F		5'-TATGCTCCAGTNAATTGG-3'	sens	132-149	18
	VP4-R		5'-ATTGCATTTCTTTCCATAATG-3'	Anti-sens	775-795	21
Beg9		5'-GGCTTTAAAAGAGAGAATTTCCGCTGG-3'	sens	1-28	28	
End9		5'-GGTCACATCATACAATTCTAATCTAAG-3'	Anti-sens	1036-1062	27	
Con3		5'-TGGCTTCGCCATTTTATAGACA-3'	sens	11-32	22	
Con2		5'-ATTTCCGACCATTTATAACC-3'	Anti-sens	868-887	20	

Pour quelques rotavirus retrouvés chez les patients non-sécréteurs et génotypés P[8] à l'aide de la PCR multiplexe, le génotypage a été confirmé par séquençage des produits de PCR obtenus à l'aide d'amorces spécifiques du génotype P[8] (**Tableau 7**). Le mélange réactionnel de la RT-PCR et les cycles d'amplification sont décrits dans les **Tableaux 8** et **9**. Après amplification les produits de PCR ont été purifiés sur gel d'agarose puis séquencés avant leur analyse sur GenBank.

**Tableau 7. Amorces utilisées pour l'amplification du gène codant VP8**

Amorces	Séquences	Polarité	Tm (°C)
SWR-F2	5'-CTCAAAATGTAAGTAAATCCAGGTCCATTTGCTC3'	sens	67.2
SWR-F3	5'-CTACTACATTCACACCACCTACTG-3'	sens	61.0
SWR-R1	5'-GACCGTTGTTAATATATTCATTACACTTAGACTCTTG -3'	anti-sens	65.0

**Tableau 8. Mélange réactionnel pour l'amplification du gène codant VP8**

Réactifs	Volumes
<b>RT-PCR</b>	
H <sub>2</sub> O	qsp 50 µl
Tampon 10X	5 µl
MgSO <sub>4</sub> (25 mM)	3 µl
dNTPs (2 mM chacun) (10 mM)	5 µl
SWR-F2 : amorce sens ou <i>forward</i> (10 µM)	1.5 µl
SWR-F3 : amorce sens ou <i>forward</i> (10 µM)	1.5 µl
SWR-R1 : amorce anti-sens ou <i>reverse</i> (10 µM)	1.5 µl
KOD Hot Start DNA Polymerase (1U/µl)	1 µl
ADN	6 µl
<b>Volume total</b>	<b>50 µl</b>

**Tableau 9. Cycles pour l'amplification du gène codant VP8**

Étapes	Activation de la polymérase	Amplification			Élongation
		Dénaturation	Hybridation	Élongation	
Paramètres	95°C, 2 min	95°C, 20 s	55°C, 10 s	70°C, 3 s	70°C, 2 min
Cycles	1	40			1

## 4. Détection des norovirus

Pour les norovirus, les échantillons ont d'abord été analysés par RT-PCR en temps réel en utilisant la technologie TaqMan<sup>®</sup>. Cinq microlitres d'ARN ont été utilisés pour chaque essai pour la détection des norovirus GI puis des norovirus GII. Pour les norovirus GI, une paire d'amorces JJV1NF / JJV1R et les sondes JJV1P et RING-1b ont été utilisées. Pour les norovirus GII, les amorces QNIF2d COG2R ont été combinées avec la sonde QNIF2. Les séquences des amorces et des sondes sont indiquées dans le **Tableau 10**. Les mélanges réactionnels pour la détection des norovirus GI et GII et les cycles sont indiqués respectivement dans les **Tableaux 11, 12 et 13**. Les réactions de PCR et la mesure de l'amplification ont été réalisées sur un système ABI 7500 Prism de la société Life Technologies. Les échantillons donnant des valeurs de Ct au-dessus de 40 ont été considérés comme négatifs.

**Tableau 10.** Amorces et sondes utilisées pour l'amplification des norovirus GI et GII (Jothikumar N. et al. 2005 ; Lyman W.H. et al. 2009 ; Skrabber S. et al 2009 ; Kageyama T. et al 2003 et Loisy F. et al. 2005).

	Amorces et sondes	Séquences	Polarité	Position
<b>GI</b>	JJV1NF	5'-CCATGTTCCGTTGGATGC-3'	sens	5283-5300 <sup>a</sup>
	JJV1R	5'-TCCTTAGACGCCATCATCAT-3'	Anti-sens	5377-5358 <sup>a</sup>
	JJV1P	FAM-5'-TGTGGACAGGAGATCGCAATCTC-3'- TAMRA <sup>c</sup>	sens	5319-5341 <sup>a</sup>
	RING-1b	FAM-5'-AGATCGCGGTCTCCTGTCCA-3'-TAMRA <sup>c</sup>	Anti-sens	5321-5340 <sup>a</sup>
<b>GII</b>	QNIF2d	5'-ATGTTTCAGRTGGATGAGRTTCTCWGA-3'	sens	5012-5037 <sup>b</sup>
	Cog2R	5'-TCGACGCCATCTTCATTACACA-3'	Anti-sens	5080-5100 <sup>b</sup>
	QNIFS	FAM-5'-AGCACGTGGGAGGGCGATCG-3'-TAMRA <sup>c</sup>	sens	5042-5061 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Positions données pour le génome de la souche Norwalk/68 (numéro d'accension GenBank M87661).

<sup>b</sup> Positions données pour le génome de la souche Camberwell (numéro d'accension GenBank AF145896).

<sup>c</sup> Les sondes ont été marquées avec les fluorophores 6-carboxy fluorescéine (FAM) à l'extrémité 5' et 6-carboxy-tétraméthylrhodamine (TAMRA) à l'extrémité 3' de la sonde.

**Tableau 11. Mélange réactionnel pour l'amplification des norovirus GI**

Réactifs	Volumes
H <sub>2</sub> O	qsp 25 µl
Master Mix (2X)	12.375 µl
JJV1NF (10 µM)	2.5 µl
JJV1R (10 µM)	2.5 µl
RING-1b (10 µM)	0.25 µl
JJV1P (10 µM)	0.25 µl
RNAsine (5 U/µl)	0.625 µl
ARN	5 µl
<b>Volume total</b>	<b>25 µl</b>

**Tableau 12. Mélange réactionnel pour l'amplification des norovirus GII**

Réactifs	Volumes
H <sub>2</sub> O	qsp 25 µl
Master Mix (2X)	12.375 µl
QNIF2d (20 µM)	0.5 µl
Cog2R (20 µM)	0.5 µl
QNIFS (7.5 µM)	0.5 µl
RNAsine (5 U/µl)	0.625 µl
ARN	5 µl
<b>Volume total</b>	<b>25 µl</b>

**Tableau 13. Cycles d'amplification de la RT-PCR temps réel des norovirus GI et GII**

Étapes	RT	Activation <sup>a</sup>	Amplification
<b>GI ou GII</b>	48°C, 30 min	95°C, 10min	95°C, 15 sec 60°C, 60 sec
<b>Cycles</b>	1	1	45

<sup>a</sup> Etape correspondant à l'activation de la polymérase

#### 4.1. Typage des norovirus humains

Les échantillons positifs par RT-PCR en temps réel ont été ensuite génotypés par séquençage des produits de PCR obtenus à partir de la polymérase et la capsid. Avant la phase

d'amplification de la polymérase, les ARN ont été préalablement dénaturés à 94°C pendant 2 min puis refroidis durant au moins 3 min dans la glace (la dénaturation).

Trois microlitres d'ARN ont été amplifiés par RT-PCR en point final en utilisant les amorces décrites par Kojima et al pour la capsid et les amorces décrites par Vinje et al. pour la polymérase (Kojima et al. 2002; Vinje et Koopmans 1996). Les cycles d'amplification utilisés ont été ceux documentés par ces auteurs. Les mélanges réactionnels sont décrits dans les *Tableaux 14 et 15*.

*Tableau 14. Mélange réactionnel pour l'amplification de la polymérase (Vinje and Koopmans 1996).*

Réactifs	Volumes
H <sub>2</sub> O	Qsp 50 µℓ
JV12 et JV13 (50 µM)	0.8 µℓ de chaque
ARN	3 µℓ
Tampon 5X	10 µℓ
dNTP (10 mM)	2 µℓ
RNAsine (5 U/µℓ)	1µℓ
Enzymes	1 µℓ
<b>Volume total</b>	<b>50 µℓ</b>

*Tableau 15. Mélange réactionnel pour l'amplification de la capsid (Kojima et al. 2002)<sup>1</sup>*

Réactifs	Volumes
H <sub>2</sub> O	qsp 50 µℓ
Tampon 5X	10 µℓ
Solution Q 5X	10 µℓ
dNTP (10 mM)	2 µℓ
G1SKF ou G2SKF (20 µM)	1.5 µℓ
G1SKR ou G2SKR (20 µM)	1.5 µℓ
RNAsine (5U/µℓ)	1µℓ
Enzymes	1 µℓ
ARN	3 µℓ
<b>Volume total</b>	<b>50 µℓ</b>

Les produits de PCR ont été ensuite purifiés avec le kit d'extraction QIAquick Gel de la société Qiagen (Hilden, Allemagne) puis séquencés pour les besoins du typage à l'aide du kit de séquençage ABI Prism Big dye<sup>®</sup> Terminator cycle sequencing ready reaction v1.1 (Life Technologies, France) suivant les recommandations du fabricant pour les cycles d'amplification (**Tableaux 14 et 15**). Les séquences ont été obtenues sur un séquenceur automatique de type ABI PRISM<sup>®</sup> 3100 de chez Life Technologies en utilisant les jeux d'amorces JV12/13 (polymérase) et GSKF/R (capside).

Le géotypage des norovirus a été effectué grâce à l'alignement avec des séquences avec des séquences de référence tirées de GenBank à l'aide du programme CodonCode Aligner version 5.02 (CodonCode Corp, Dedham, MA, USA) et MEGA6.06 (K. Tamura et al. 2013).

## **5. Production des VLP dérivée du norovirus GII.3 souche SW4**

### **5.1 Amplification de l'ORF2**

Parmi les norovirus GII.3 détectés chez les patients non-sécréteurs, un norovirus GII.3 a été sélectionné (souche SW4) pour l'expression de la protéine VP1 en baculovirus. Cette souche de norovirus, dénommée SW, a été isolée chez un enfant de 2 mois et 10 jours souffrant de gastro-entérite dans l'hiver 2011-2012 (Monastir, Tunisie).

L'ORF2 faisant 1623 bases de long, le kit TITAN<sup>®</sup> proposée par Roche Moléculaire (Manheim, Allemagne) a été utilisé pour l'amplification du fragment, les phases de rétro-transcription et d'amplification se faisant dans le même tube à partir de 5 µl d'ARN. Le milieu réactionnel et les cycles de la PCR sont indiqués dans les tableaux ci-dessous (**Tableaux 16, 17 et 18**). Les produits de PCR ont été purifiés après une électrophorèse en gel TAE-1% d'agarose SeaKem GTG à l'aide du kit « Qiaquick gel extraction kit » proposé par Qiagen. Le fragment purifié a été élué dans 70 µl de tampon d'éluion (10mM Tris à pH 8.4) avant une étape d'extraction au phénol-chloroforme des acides nucléiques puis une précipitation à l'éthanol. La précipitation se faisant grâce à de l'acétate de sodium 3M pH 5.2, l'ADN extrait a été en premier lieu centrifugé à 12500 rpm (soient environ 10000g) puis lavé par une solution d'éthanol à 70% pour éliminer les sels. Après rinçage, le fragment d'ADN correspondant à VP1 a été séché puis resuspendu dans 12 µl d'eau distillée. Pour la quantification, 2 µl d'ADN purifiés ont été

analysés par électrophorèse sur gel à 1% d'agarose dans du TAE en présence de bromure d'éthidium (BET), « low » et « High DNA mass ladder » ont été utilisés comme étalon pour quantifier l'ADN pour le clonage de l'insert.

**Tableau 16.** Liste des amorces pour le séquençage et le clonage de la souche SW4/GII.3

Amorces	Séquences	Polarité	Position des amorces <sup>a</sup>	ORF amplifié
FW1 <sup>b</sup>	5'-ATGAAGATGGCGTCAATGACG-3'	sens	5085-5106	fin ORF1
FW2	5'-GCGCAGCACAGATCACAATGTG-3'	sens	5485-5506	ORF2
RT1	5'-TGTTGCGAACGTCAGGCATTG-3'	Anti-sens	5554-5574	ORF2
FW3	5'-CACCTCTTAGGGCAAATAATTCTG-3'	sens	5635-5658	ORF2
RT2	5'-AACCTAGAATTGGACATTTTCAG-3'	Anti-sens	5788-5809	ORF2
RT3	5'-CCATTTAGATTATCCAATTGT-3'	Anti-sens	6029-6049	ORF2
FW5	5'-GCACAACCTAGGGCACATGAAGC-3'	sens	6148-6169	ORF2
RT4	5'-GTCAACCCCAATGCCAACTGGGGTGAA-3'	Anti-sens	6293-6293	ORF2
RT5 <sup>b</sup>	5'-TTATTGAATCCTTCTACGCC-3'	Anti-sens	6712-6731	début ORF3

<sup>a</sup> Positions données pour le génome de la souche isolée GII.3 CBNU1(GU980585)

<sup>b</sup> Amorces utilisées pour le clonage de l'ORF2

**Tableau 17.** Milieu réactionnel pour l'amplification de l'ORF2 entière

Réactifs	Volumes
<b>Mélange 1:</b>	<b>25 µl</b>
H <sub>2</sub> O	qsp 25 µl
dNTP (10 mM)	4 µl
DTT (100 mM)	2.5 µl
Amorce sens ou <i>forward</i> : FW1 (10µM)	2 µl
Amorce anti-sens ou <i>reverse</i> : RT5 (10µM)	2 µl
RNAsine (5 U/µl)	1µl
ARN dénaturé	5 µl
<b>Mélange 2:</b>	<b>25 µl</b>
H <sub>2</sub> O	qsp 25 µl
Tampon 5X	10 µl
Enzymes	1µl
<b>Volume total</b>	<b>50 µl</b>

*Tableau 18. Cycles d'amplification pour l'amplification de l'ORF2 entière*

Étapes	RT	Dénaturation Initiale	Amplification		Élongation
Paramètres	42°C, 30 min	50°C, 30 min	94°C, 30 sec 40°C, 30sec 68°C, 2 min 40 sec	94°C, 30 sec 55°C, 30 sec 68°C, 2 min 40 sec + (5 sec/cycle)	68°C, 10 min
Cycles	1	1	10	30	1

## 5.2. Clonage de l'ORF2 de la souche SW4

### 5.2.1. Sous clonage dans le vecteur pGEM<sup>®</sup>-T Easy

Le clonage a été effectué en deux étapes. L'insert correspondant à l'ORF2 de la souche SW4 de norovirus a été en premier lieu cloné dans le vecteur pGEM<sup>®</sup>-T Easy (Promega, Charbonnières-les-Bains, France) puis séquencé. Dans un deuxième, l'insert a été sous-cloné dans le vecteur de transfert pVL1392 pour la production de baculovirus recombinant.

Le clonage dans le vecteur pGEM a été effectué selon le protocole du fabricant. Dans un volume final de 10 µl, 50 ng de vecteur de transfert pGEM ont été incubés toute la nuit à 4°C avec 80 ng d'ADN d'ORF2 en présence de T4 ligase. D'un point de vue enzymologique, la ligation étant peu efficace, 3 réactions ont été effectuées en faisant varier la quantité d'insert par rapport au plasmide soient 3, 4 ou 6 molécules d'insert (1600 pb) pour 1 molécule de plasmide (3000 pb) c'est-à-dire 80 ng, 100 ng et 160 ng d'insert pour 50 ng de plasmide dans chaque réaction.

A partir de chaque produit de ligation, 3 µl d'ADN ont été utilisés pour la transformation de 50 µl de bactéries JM109 (Promega la France, Charbonnières-les-Bains, France) livrées chimiquement compétentes. Le mélange ADN-bactéries a été ensuite mis dans la glace pendant 30 min avant un choc thermique d'exactly 45 s à 42°C des bactéries remises ensuite dans la glace pendant 5 min. Les bactéries ont été enfin reprises dans 500 µl de milieu SOC (Life technologies) stérile puis incubées à 37°C pendant une 1h30 à 130 rpm.

Après transformation, les bactéries ont étéensemencées sur milieu gélosé (milieu Luria-Bertani (milieu LB avec 1.5% d'agarose) contenant 0,1 mg/ ml d'ampicilline, 100 mM d'IPTG et 50 mg/ml de X-Gal (50 mg/ ml)). Les ensemencements ont été incubés toute la nuit à 37°C

### 5.2.2. Recherche des clones positifs par PCR conventionnelle

Grâce au test blanc/bleu, la recherche des clones positifs a été effectuée sur les colonies blanches [ce test se base sur les propriétés d'une enzyme appelée  $\beta$ -galactosidase, issue de l'opéron lactose. La  $\beta$ -galactosidase est une enzyme codée par le gène LacZ et est constituée de deux sous-unités : *alpha* et *omega*. En présence d'Isopropyl  $\beta$ -D-1-ThioGalactopyranoside (**IPTG** = **inducteur**) et de 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside (**X-Gal** = **substrat**), les colonies **transformées non recombinées** (plasmide sans insert) sont **bleues**. Les colonies **transformées recombinées** (plasmide avec insert) sont **blanches** car le gène LacZ-alpha est inactivé par l'insertion du fragment d'intérêt dans le plasmide. Il n'y a donc pas de synthèse du peptide alpha et donc absence de  $\beta$ -galactosidase fonctionnelle. Le X-Gal n'est pas hydrolysé, les colonies sont blanches]. Chaque colonie a été resuspendue dans 50  $\mu$ l de milieu LB puis incubée à 37°C sous agitation pendant 45 min. Deux microlitres de cette suspension bactérienne ont été ensuite utilisés pour une amplification par PCR utilisant les amorces FW2/RT2 (**Tableau 16**). Le mélange réactionnel et les cycles sont indiqués dans les **Tableau 19 et 20**. A noter que le faible nombre de cycles a permis de visualiser uniquement les plasmides possédant l'insert sans avoir de bruit de fond dû à l'ADN résiduel provenant de la ligation.

**Tableau 19.** Milieu réactionnel pour le screening des clones par PCR en point final

<b>Réactifs</b>	<b>Volumes</b>
H <sub>2</sub> O	16,7 $\mu$ l
dNTP (10 mM)	0,2 $\mu$ l
<b>FW2</b> (10 $\mu$ M)	1 $\mu$ l
<b>RT2</b> (10 $\mu$ M)	1 $\mu$ l
Taq polymérase	0,1 $\mu$ l
Tampon 10X	2,5 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub> (50 $\mu$ M)	2,5 $\mu$ l
Bactéries en suspension	2 $\mu$ l
<b>Volume final</b>	<b>25 <math>\mu</math>l</b>

*Tableau 20. Cycle PCR pour l'amplification de l'ORF2 entière*

Étapes	Dénaturation	Amplification	Élongation
Paramètres	94°C, 2 min	94°C, 30 sec 40°C, 30 sec 72°C, 30 sec	72°C, 5 min
Cycles	1	25	1

### 5.2.3. Caractérisation des clones positifs par PCR

Cinq colonies ont été sélectionnées parmi celles positives par PCR pour faire une pré-culture dans 5 ml de milieu LB supplémentés avec de l'ampicilline. Après une nuit d'incubation à 37°C sous agitation, 500 µl de la culture ont servi à un stockage glycérol (1:1 vol :vol) à -80°C. Le reste de la culture a servi l'extraction du plasmide selon le principe de la lyse alcaline (Birnboim et Doly, 1979) grâce à l'utilisation du « miniprep kit » de la société Qiagen. L'ADN plasmidique a été purifié sur colonne (fournie avec le kit) et élué des colonnes avec 50 µl de tampon EB. Cinq microlitres d'éluat ont été utilisés pour la digestion avec 5 unités de l'enzyme de restriction EcoRI dans un volume final de 15 µl. Après 1.5h d'incubation à 37°C, les produits de digestion ont été contrôlés par électrophorèse sur un gel d'agarose à 1% dans du TAE pour vérifier la présence de l'insert et sa taille. La taille de l'insert a été vérifiée grâce à un contrôle positif (ORF2 de norovirus GII.4 cloné dans pGEM) et à un marqueur de masse moléculaire (Mark X de chez Roche Diagnostic (Mannheim, Allemagne)).

Un clone positif sur gel a été ensuite sélectionné puis séquencé à l'aide des amorces FW1 à FW5 et RT1 à RT5 spécifiques des norovirus GII.3 (**Tableau 16**). La réaction de séquençage a été réalisée comme décrite précédemment. Les séquences nucléotidiques ont été éditées à l'aide du programme CodonCode Aligner® version 5.02 (CodonCode Corp, Dedham, MA, USA). Le séquençage de l'ORF2 de la souche SW4 a permis de vérifier l'absence d'éventuels codons stop dans la séquence codante et l'absence des sites de restrictions BglII et NotI nécessaires au clonage dans pVL1392.

#### 5.2.4. Sous clonage de l'ORF2 dans le vecteur pVL1392

A partir de l'ADN de la miniprep, un microlitre du plasmide pGEM recombinant correspondant à l'ORF2 de la souche SW4, a été utilisé pour la réamplification de l'ORF2 utilisant l'amorce FW1/BglII 5'- GAAGATCTATGAAGATGGCGTCGAATGACGC-3', qui contient un site BglII à l'extrémité 5' (souligné en gras), et l'amorce RT5, le site NotII (5'-GC▼GGCCGC-3') utilisé pour le sous-clonage étant déjà présent à l'extrémité 3' du plasmide pGEM. La réamplification a été effectuée avec le kit « Expand High Fidelity PCR System » de la société Roche en suivant les recommandations du fabricant pour le mélange réactionnel et les cycles d'amplification. Cette réamplification a permis d'introduire un site BglII à l'extrémité 5' de l'insert.

Après amplification, l'insert a été purifié sur gel puis cloné dans pGEM-T easy. Après transformation des bactéries JM109, la présence de l'insert a été vérifiée par PCR en utilisant la paire d'amorces FW2/RT2 de GII.3 puis par digestion enzymatique avec les enzymes de restriction BglII et NotI. L'analyse sur gel des produits de digestion a permis de purifier les inserts correspondant à l'ORF2 en vue du sous-clonage dans le vecteur de transfert pVL1392 (BD Bioscience, Le Pont de Claix, France).

Le plasmide pVL1392 fait 9639 pb de long. Il possède un site de clonage multiple (MCS) et en amont de celui-ci le promoteur transcriptionnel fort du gène codant la polyhédrine. Nous avons sous-cloné l'insert correspondant à l'ORF2 par le biais du site BglII car celui-ci est le plus proche du promoteur de la polyhédrine dans le plasmide pVL1392 et de NotI pour l'extrémité 3'.

Pour les besoins du clonage, 5 µg de plasmide pVL1392 ont été digérés par 50 unités des enzymes BglII et NotI dans un volume final de 100 µl, à 37°C pendant toute la nuit. Le produit de digestion a été ensuite traité au phénol-chloroforme pour éliminer les protéines puis précipité à l'éthanol absolu. Après centrifugation, le culot d'ADN plasmidique a été rincé à l'éthanol à 70% puis séché. La préparation de plasmide digéré et purifié a été ensuite resuspendue dans 20 µl d'eau bi-distillée et la quantité a été estimée sur gel d'électrophorèse comme décrit auparavant. Pour le clonage, le mode opératoire a été identique à celui décrit pour pGEM (1 molécule de plasmide pour 3 d'insert) sachant que 100 ng de pVL ont été utilisés pour chaque ligation. Le

Rapid DNA Ligation Kit de Roche a été choisi pour la réaction, celle-ci se faisant dans un volume final de 20 µl pendant 45 min à température ambiante et ensuite à 4°C, toute la nuit. Le détail du mélange réactionnel est indiqué dans le tableau ci-dessous.

La détection des clones positifs a été effectuée en deux étapes comme pour les constructions faites dans pGEM c'est-à-dire par PCR et carte de restriction. Un clone positif a été ensuite sélectionné pour le séquençage de l'ORF2 et la transfection des cellules sf9 pour l'élaboration d'un baculovirus recombinant.

## **6. Production et purification des VLP**

### **6.1. Principe**

Le système baculovirus permet la production *in vitro* de protéines recombinantes en cellules d'insectes. Grâce à ce système d'expression eucaryote, la production de protéines recombinantes en quantité importante avec une structure tertiaire correcte est possible. Le système d'expression en baculovirus constitue ainsi un outil de choix pour l'expression de pseudo-particules virales en particulier pour les norovirus (Jiang *et coll.*, 1992). En l'absence de système de culture pour les norovirus humains, la production de particules de synthèse constitue toujours une des rares alternatives pour l'étude de ces virus.

Au contraire des systèmes d'expression de protéine bactériens, l'infection par un baculovirus recombinant d'une cellule d'insecte permet non seulement l'expression en grande quantité des protéines VP1 des norovirus mais aussi leur auto-assemblage dans le cytoplasme cellulaire et enfin leur excrétion dans le milieu de culture, facilitant ainsi leur purification par des techniques classiques d'ultracentrifugation.

La réplication du baculovirus met en jeu plusieurs centaines de gènes viraux distribués sur un ADN génomique double brin pouvant atteindre 200 kb. L'activation de ces gènes est fonction du temps ; celui-ci se divise en phases précoce, tardive et très tardive. Certains de ces gènes ont un intérêt majeur en biotechnologies. C'est le cas en particulier du gène de la polyhédrine qui est surexprimé grâce à un promoteur transcriptionnel fort. Dans nos travaux, nous avons élaboré un baculovirus dans lequel le gène accessoire codant la polyhédrine a été remplacé par l'ORF2 du

norovirus, ce dernier se trouvant par conséquent directement sous l'influence du promoteur transcriptionnel fort du gène de la polyhédrine.

Pour la fabrication du baculovirus recombinant, l'ADN génomique linéarisé du baculovirus, par conséquent non infectieux, et dépourvu du gène de la polyhédrine est co-transfecté dans des cellules sf9 en compagnie du plasmide pVL1392. Dans nos travaux, ce vecteur plasmidique possède l'ORF2 codant la protéine VP1 du norovirus SW4. Le gène d'intérêt est bordé par de longue séquence correspondant au voisinage immédiat en 5' et 3' du gène de la polyhédrine. Dans la cellule, des doubles « crossing over » se produisent entre le génome viral et le plasmide navette. Ces doubles recombinaisons entraînent la circularisation du génome viral qui devient alors fonctionnel avec l'intégration du gène correspondant à l'ORF2 à la place du gène de la polyhédrine. De la double recombinaison, il en résulte que le plasmide se linéarise et est rapidement dégradé par dans le cytoplasme de la cellule.

L'ADN viral circularisé est alors opérationnel. Il est directement transcrit et traduit par la machinerie cellulaire. Les protéines virales nouvellement produites contribuent à l'installation de la machinerie virale qui aboutit à la production de baculovirus recombinants. Sans polyhédrine, les baculovirus recombinants sont relargués dans le surnageant alors que la protéine recombinante VP1, qui est un produit de la réplication virale, est excrétée en grande quantité dans le milieu de culture.

## **6.2. Entretien des cellules d'insectes**

L'entretien du stock de baculovirus comme son titrage par la méthode des plages a été effectué dans des cellules sf9 par des techniques de virologie classique. Dans nos travaux, les cellules Hi-5 ont été utilisées pour la production de la protéine recombinante VP1 car cette lignée cellulaire a un rendement bien supérieur pour la production de VLP que les cellules sf9. De plus l'entretien des cellules et la production des VLP s'effectuent avec un milieu sans SVF.

Les cellules d'insectes *Sf9* ont été achetées chez Pharmingen-BD Biosciences. Elles ont été maintenues en culture à 27°C dans du milieu TNMFH<sup>®</sup> (BD Biosciences Pharmingen) contenant du SVF. Pour chaque passage, les cellules ont été décrochées à l'aide d'un grattoir puis comptées à l'aide d'une cellule de Mallassez. Cinq à 10 millions de cellules ont été implantées dans chaque

flasque de 175 cm<sup>2</sup>. Les cellules ont été ensuite incubées à 27°C pour atteindre la confluence entre 3 et 5 jours pour chaque flasque faisant 175 cm<sup>2</sup>.

Le protocole opératoire pour les cellules Hi-5 a été identique à celui utilisé pour les cellules Sf9 si ce n'est que 2 à 3 millions de cellules ont suffi lors de l'implantation des flasques de 175 cm<sup>2</sup>. Les cellules *Hi5* ont été obtenues auprès de la société Life Technologies. Leur arrivée à confluence est revanche plus rapide que pour les cellules Sf9, 3 jours à 27°C sont nécessaires. Le milieu d'entretien des cellules Hi-5 utilisé pour nos travaux a été le milieu ExpressFive™ (Life Technologies). Sans SVF, la purification des VLP a donc été facilitée à partir de cette lignée cellulaire, car l'albumine en grande quantité dans les milieux supplémentés en SVF, était ici absente.

### **6.3. Co-transfection des cellules Sf9 avec le génome du baculovirus et le plasmide navette**

Le génome du baculovirus linéarisé et dépourvu du gène codant la polyhédrine provient de la société BD Biosciences. Pour les besoins de la co-transfection, 10<sup>6</sup> cellules de la lignée Sf9 ont été implantés dans 2 ml de milieu TNMFH dans une plaque 6 puits (Greiner Bio-one, Courtaboeuf, France). Pour permettre l'attachement des cellules, la plaque de culture a été incubée à 27°C pendant 2 heures. La co-transfection nécessite des cellules *Sf9* à 70% de confluence, puis la cotransfection de l'ADN de l'ORF2 cloné dans le vecteur pVL1392 de souche SW se fait selon les indications du fournisseur (Pharmingen). Une fois les cellules fixées au support, le milieu a été remplacé par 500 µl de tampon A fourni avec le kit de transfection. Il a été également mélangé dans un tube stérile 3 µl d'ADN linéarisé du baculovirus modifié avec 3 µg de pVL-ORF2 dans un volume final de 6 µl. ADN viral et plasmidique ont été incubés pendant 10 min à température ambiante avant l'ajout de 500 µl de tampon B (25 mM de HEPES, pH 7,1, 125 mM de CaCl<sub>2</sub>, 140 mM NaCl). Pour favoriser la précipitation du CaCl<sub>2</sub> favorisant ainsi la transfection de l'ADN dans les cellules, l'ADN dilué dans le tampon B a été ajouté goutte à goutte suivant les recommandations du fabricant. A la fin de l'opération, le milieu devient laiteux, trahissant la précipitation du CaCl<sub>2</sub> à la surface des cellules. Les cellules sont ensuite incubées pendant 4 h à 27°C. Le milieu de transfection est ensuite remplacé par 2 ml de TNMFH. Les cellules ont été alors incubées pendant 6 jours à 27°C. L'effet cytopathogène associé à la

réplication du baculovirus reste ténu. Il se traduit le plus souvent par le fait que les cellules infectées doublent de volume. A la fin des 6 jours d'incubation, nous avons sélectionné les baculovirus recombinants par la méthode des plages de lyse.

#### **6.4. Plages de lyse et criblage des clones recombinants**

La technique des plages de lyse a permis de faire un clonage des baculovirus recombinants et de sélectionner les clones qui présentaient le rendement le plus élevé pour la production des VLP. Au bout de 6 jours d'incubation le produit de transfection a été recueilli puis dilué de 10 en 10 jusqu'à la dilution  $10^{-8}$ , dans du milieu TMNFH. Un millilitre de chaque dilution ont servi à l'incubation de cellules Sf9 qui ont été implantées extemporanément à la concentration de  $10^6$  de cellules par puit. Les cellules ont été ensuite incubées pendant au moins 1 h à 27°C. L'inoculum a été ensuite remplacé par 2 ml/puit de TMNFH préchauffé à 42°C et contenant 0.5% d'agarose de qualité SeaPlaque (Lonza, Levallois, France). Une fois le milieu gélosé solidifié, les plaques ont été entreposées à 27°C dans une atmosphère et à l'abri de la lumière. Au cinquième jour d'incubation, un milieu d'une solution de rouge neutre à 10 mg/ml contenant 0.5% d'agarose SeaPlaque a été rajouté à chaque puit. Après solidification de la gélose, les plaques ont été entreposées à 27°C, à l'abri de lumière jusqu'au 6<sup>ème</sup> jour. Le rouge neutre permet de visualiser les cellules vivantes sans inactiver le baculovirus, les plages de lyse apparaissant comme des cercles blancs d'environ 1 mm pour le baculovirus. Vingt plages de lyse du baculovirus recombinant ORF2-SW4 ont été recueillies à l'aide d'une pipette pasteur stérile dans les puits correspondant aux dilutions les plus fortes. Elles ont été ensuite resuspendues dans 1 ml de TMNFH. Pour faciliter l'élution du virus, les suspensions ont été agitées vigoureusement avant d'être entreposées toute la nuit à 4°C. Le lendemain, chaque clone a été réamplifié. Un, dix et cent microlitres de chaque clone ont été inoculés dans 3 puits contenant chacun  $10^6$  cellules Sf9 et 2 ml de TMNFH. Après 6 jours d'incubation à 27°C, le surnageant de chaque puit a été testé en ELISA à l'aide du Kit de détection norovirus Ridascreen® (RBiopharm, Lyon, France) afin de détecter les clones de baculovirus possédant l'insert et exprimant le mieux la protéine VP1.

## 6.5. Production des protéines VP1 recombinantes

### 6.5.1. Titrage du baculovirus

Le titrage du baculovirus recombinant a été effectué par la méthode des plages de lyse comme expliqué dans la section précédente. Des dilutions en cascade de l'inoculum par un facteur 10 ont été effectuées jusqu'à la dilution  $10^{-8}$ . Un millilitre de chaque dilution a servi l'inoculation de un million de cellules, implantées dans chaque puit. L'inoculum a été incubé pendant 1 h à 27°C avant d'être remplacé par du milieu TMNFH contenant 0.5% d'agarose SeaPlaque en fusion. Les plaques de titrage ont été incubées pendant 5 jours à 27°C puis colorées au rouge neutre, le 6<sup>ème</sup> jour. Le titre du baculovirus a été déterminé grâce à la méthode de Spearman-Kärber après numérations des plages aux dilutions permettant de distinguer les plages de lyse isolées les unes des autres selon la formule qui suite

### 6.5.2. Préparation du stock de baculovirus

La dilution la plus importante correspondant au clone exprimant le mieux la protéine VP1 de la souche SW4 du norovirus GII.3 a été réamplifié sur cellule Sf9 afin de produire suffisamment d'inoculum pour la production des VLP sur les cellules Hi-5. Une flasque de 75 cm<sup>2</sup> a été chacune implantée avec une suspension de 10 millions de cellule dans 10 ml de milieu. Les cellules ont été ensuite laissée à température ambiante pendant 2 h avant de remplacer le milieu par 10 ml de TMNFH. Les données du laboratoire sur d'autres baculovirus recombinant ont montré que le titre viral n'excédait jamais  $10^8$  ufp/ml. Par conséquent, 100 µl de baculovirus recombinant issus de la première amplification ont été rajoutés dans la flasque. Les 100 µl d'inoculum correspondaient environ à  $10^5$  ufp pour 10 millions de cellules soit une multiplicité d'infection (MOI) de 0.01. D'après la littérature technique sur les vecteurs baculovirus, une MOI largement inférieur à 1 réduit considérablement le risque d'apparition de particules recombinantes dont le gène d'intérêt a été délété. Après inoculation, la flasque a été placée à 27°C pendant 6 jours. Cette première réamplification a servi ensuite comme matériel de départ pour une deuxième amplification cette fois-ci de 10 flasques de 175 cm<sup>2</sup> pour produire 200 ml d'inoculum sur cellules Sf9 dont le titre par la méthode des plages a été estimé à  $10^{7.4}$  ufp/ml.

L'inoculum ainsi produit a ensuite servi à l'inoculation des cellules Hi-5 avec une MOI de 6 suivant les recommandations de Pharmingen pour l'expression en grande quantité de protéine recombinante. Vingt flasques de 175 cm<sup>2</sup> ont été implantées chacune avec 20 millions de cellules Hi-5 resuspendues dans 10 ml de milieu ExpressFive. Pour permettre aux cellules de s'attacher à leur support, nous avons laissé reposer les flasques pendant au moins 1.5 h sous la hotte. Le milieu de culture a été ensuite remplacé pour chaque flasque par un inoculum composé de 5 ml de milieu ExpressFive et 5 ml de baculovirus SW4 produit sur cellule Sf9. Les cellules ont été ensuite incubées pendant 2 h à 27°C avant le remplacement de l'inoculum par 20 ml de milieu ExpressFive pour la production des VP pendant 6 jours à 27°C.

### 6.5.3. *Concentration et purification des particules virales de synthèse*

Le principe de la concentration et la purification des VLP de la souche SW4 ont été décrits dans des protocoles utilisés précédemment par le laboratoire (Belliot et al. 2001; de Rougemont et al. 2011) Au sixième jour, les cellules Hi-5 ont été entièrement lysées et le lysat cellulaire contenant le baculovirus et les VLP ont été collectés à partir des 20 flasques. Afin d'éliminer les membranes cellulaires, la première étape a consisté à centrifuger les lysats à 6.000 x g à 4°C pendant 30 min à l'aide d'un rotor SL-250T (Sorvall). Les surnageants ont été ensuite centrifugés à 14.000 x g à 4°C pendant 30 min avec un rotor SL-50T (Sorvall) pour sédimenter les débris cellulaires de petites tailles et les particules de baculovirus recombinant. Après ces deux centrifugations à basse vitesse, l'étape suivante a été de concentrer les VLP par ultracentrifugations.

Le surnageant a été ainsi centrifugé à 30.000 rpm avec un rotor SW32 Ti (Beckman) (soient environ 150.000 x g) pendant 2 heures à 4°C sur un coussin de 2 ml de saccharose à 30% préparé dans du tampon TNC (50 mM Tris-HCl à pH 7,4, 0,15 M NaCl, 10 mM CaCl<sub>2</sub>). Les culots contenant les VLP sont apparus translucides. Ces derniers ont été ensuite repris dans 200 à 500 µl de tampon TNC contenant de la leupeptine à 0,5 µg/ml (leupeptine trifluoro-acétate, Sigma-Aldrich) et placés toute la nuit à 4°C.

Les VLP resuspendues ont été ensuite purifiées sur un gradient discontinu de saccharose dont les concentrations variaient entre 10% (haut du tube) et 60% (fond du tube). Chaque solution de saccharose a été préparée dans du tampon TNC. Après le montage du gradient, les suspensions de

VLP ont été déposées au-dessus de la fraction à 10% de saccharose. Les tubes ont été ensuite centrifugés 30000 rpm, soient 154000 x g, dans un rotor SW41Ti (Beckman) pendant 4 h à 4°C. A la fin de la centrifugation, une bande opalescente correspondant à la fraction 40% de saccharose a été récupérée à l'aide d'une pipette. Des travaux précédents menés au laboratoire ont permis de démontrer que cette bande correspondait au VLP purifiées. Pour éliminer le saccharose des VLP, la fraction récupérée a été immédiatement centrifugée à 30000 rpm pendant 2 h sur un coussin de sucrose. Les tubes ont été vidés après centrifugation et le culot translucide correspondant aux VLP purifiés a été resuspendu toute la nuit à 4°C dans 1 à 3 ml de tampon TNC contenant 0.5 µg/ml de leupeptine.

Pour chaque suspension de VLP purifiées, la quantité a été estimée grâce au kit de dosage des protéines BC Assay Kit Uptima par colorimétrie à l'aide d'une courbe étalon établie à partir de dilution d'une préparation d'albumine standardisée fournie avec le kit. Le seuil de précipitation des VLP a été établi au laboratoire pour plusieurs VLP de norovirus ; celui-ci se situe à 1 mg/ml. Les VLP de la souche SW4 étant très concentrées après la purification, celles-ci ont donc été diluées à 1 mg/ml. Pour le stockage, les suspensions de VLP ont été divisées en aliquots de 10 à 50 µl puis congelées instantanément dans de l'azote liquide avant d'être entreposées à -40°C.

## **6.6. Caractérisation des VLP**

### *6.6.1. Electrophorèse en conditions dénaturante : SDS-PAGE*

Le degré de pureté des VLP et leur niveau de dégradation ont été contrôlés sur gel d'acrylamide. Jusqu'à 4 µg de VLP purifiés ont été analysés par électrophorèse en tampon MOPS (Life Technologies) sur un gel en gradient de polyacrylamide de 4 à 12% Bis-Tris de type NuPage (Life Technologies). Une fois rincé à l'eau 3 fois 10 min pour éliminer le SDS, les protéines ont été révélées par coloration au bleu de Coomassie. Dans les mêmes conditions d'électrophorèse, les protéines du gel ont été également transférées par western-blot sur une membrane de nitrocellulose pour confirmer l'origine des protéines produites par le baculovirus recombinant SW4. Suite au transfert, la membrane a été lavée une fois à l'eau distillée puis

saturée dans du PBS contenant 4% de lait en poudre écrémé pendant une nuit à température ambiante. Après trois lavages au PBS Tween<sub>20</sub> 0.05% (PBS-T), la membrane de nitrocellulose a été incubée pendant une heure à température ambiante avec un anticorps monoclonal séquentiel (8C12) dilué au 1/10 dans du PBS et 1% de lait en poudre. L'anticorps monoclonal 8C12 a été produit au laboratoire, celui-ci reconnaît un épitope linéaire commun aux norovirus GI, GII et GV. Après 3 lavages de 5 min avec du PBS-T, la membrane a été incubée avec un anti-IgG de souris couplé à la phosphatase alcaline (PA) (Sigma) dilué au 1/2000<sup>e</sup> dans du PBS 1% de lait pendant une heure à température ambiante. Après 3 autres lavages au PBS-T et un lavage à l'eau distillée, L'activité de la phosphatase alcaline a été révélée en incubant la membrane pendant 20 s dans une solution de NBT-BCIP (nitro blue tetrazolium-5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate) dilué dans l'eau (Roche). La réaction chromogénique a été finalement stoppée en trempant la membrane dans une solution d'EDTA à 250mM.

#### 6.6.2. *Marquage d'une coupe de duodénum*

Ces travaux ont été effectués dans le laboratoire d'anatomo-pathologie du CHU de Dijon par Georges TARRIS (interne) sous la supervision de M. Le Professeur Laurent MARTIN (Chef de Service). La coupe d'un duodénum sain provenant d'un individu sécréteur a été préparée au laboratoire dans un bloc de paraffine. Pour le marquage, la coupe a été déparaffinée par des bains successifs de toluène puis un bain final dans de l'éthanol absolu. L'activité peroxydase endogène a été bloquée en incubant la coupe pendant 20 min sans 0.3% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> diluée dans du méthanol. Pour éliminer le solvant, la coupe a été ensuite plongée dans 3 bains successifs de PBS. Les sites a-spécifiques ont été bloqués grâce à une incubation de la coupe dans 1% d'albumine bovine diluée dans du PBS pendant 40 min à température ambiante. Trois cents microlitres d'une préparation de VLP SW4 à 5 µg/ml ont été ensuite incubé sur la coupe, sous atmosphère humide, pendant toute la nuit à 4°C. Le lendemain, la lame a été rincée dans 3 bains de PBS de 1 minute chacun avant l'incubation d'un anticorps polyclonal anti GII.3 dilué au 1/1000<sup>ème</sup> et généreusement fourni par Marc BOSSUS de la Société bioMérieux. Le sérum a été ensuite incubé pendant 1 h à température ambiante puis lavé 3 x 1 min dans un bain de PBS. L'anticorps anti lapin, marqué à la peroxydase, a été dilué au 1/5000<sup>ème</sup> dans du PBS puis incubé pendant 45 min à température ambiante. Après 3 lavages au PBS, l'activité peroxydase a été révélé par ajout

de 3,3'-Diaminobenzidine pendant 1 min. Après rinçage, la contre-coloration de la coupe a été effectuée dans une solution d'Hémalun de Meyer avant montage et collage de la lame.

## **7. Analyses des antigènes tissulaires des groupes sanguins**

Les échantillons de salive ont été bouillis pendant 10 minutes et centrifugés pendant 2 minutes à 3.000 rpm, les surnageants ont été transférés dans des tubes microfuge puis centrifugés pendant 10 minutes à 10000 rpm. Les surnageants de salives ont été divisés en aliquots puis stockés à -20 °C.

### **7.1. Typage des salives**

Les échantillons de salives ont été premièrement typés en ELISA pour déterminer la présence des antigènes de groupe sanguin A, B, H et Lewis comme décrit précédemment (Marionneau *et coll.*, 2005). Les salives ont été ensuite diluées au 1/1000<sup>ème</sup> dans 100 mmol/l de tampon carbonate-bicarbonate à pH 9,6, puis incubées toute la nuit à 37°C dans des plaques 96 puits Maxysorp (Nunc, Thermo Scientific, Saint-Herblain, France).

Le jour suivant, les plaques ont été lavées 3 fois avec du tampon PBS-T puis saturées avec du PBS-lait écrémé à 4% pendant 2 h à 37°C afin de bloquer les sites non spécifiques. Après 3 lavages au PBS-T, les plaques ont été incubées avec 100 µl d'anticorps primaires spécifiques des HBGA pendant 1 h à 37°C. Les anticorps monoclonaux anti-A et anti-B (Diagast, Loos, France) ont été dilués au 1/ 5000<sup>e</sup>. L'anticorps monoclonal anti-H (Thermo fisher, France) et les surnageants d'hybridomes (don du Docteur BARA) anti-Lewis a et anti-Lewis b ont été dilués au 1/1000<sup>e</sup>. Après incubation des anticorps primaires, les échantillons ont été incubés 30 min à 37°C avec 100 µl/puit d'un anticorps secondaire anti-IgG conjugué à la peroxydase (Vector PI-2000) pour détecter les antigènes A, B, Le a et Le b. Pour la détection de l'anticorps primaire spécifique de l'antigène H, les plaques ont été incubées 45 min à 37°C avec 100 µl d'un anticorps secondaire de chèvre anti-IgM conjugué à la peroxydase (Southern Biotech Réf. : 1020-05). Pour la révélation de l'activité peroxydase après lavage au PBS-T, 100 µl de substrat TMB (3,3', 5,5'-tétraméthyl-benzidine de (KPL/Eurobio, Courtaboeuf, France), ont été ajoutés dans chaque puits et incubé exactement pendant 10 min à température ambiante à l'obscurité. La réaction chromogénique a été stoppée par l'addition 50 µl/puit d'acide chlorhydrique (HCl) 2N.

L'absorbance de chaque réaction a été mesurée à la longueur d'onde de 450 nm (filtre à 620 nm) sur un spectrophotomètre BioRad. Les valeurs en dessous de 0.15 ont été considérées comme négatives.

## **7.2. Génotypage du gène FUT2**

Pour le génotypage du gène FUT2, l'ADN génomique a été extrait à partir d'un échantillon de 50 µl de sang total grâce au kit d'extraction d'ADN « QIAamp® ADN » (Qiagen, Hilden, Allemagne), selon les recommandations du fabricant. L'ADN a été remis en suspension avec du tampon TE pH 8 avant de le précipiter avec 2,5 volumes d'éthanol absolu et 0,1 volume d'acétate de sodium 3M pH 5,2. L'ADN a été ensuite centrifugé pendant 15 min à 12500 g à température ambiante. Le culot d'ADN obtenu a été lavé avec 1 volume d'éthanol à 70%, puis séché et remis en suspension avec 12 µl de tampon TE pH 8 avant congélation. Les génotypes sécréteur et non sécréteur ont été déterminés par séquençage d'une région du gène FUT2 englobant les mutations A385T et G428A générant des codons stop dans le cadre de lecture utilisant les amorces et les conditions d'amplification décrites précédemment (Imbert-Marcille et al. 2014). Pour les besoins de la PCR, 2 µl d'ADN non dilués ont été utilisés. Le fragment amplifié de 391 pb a été purifié sur gel comme décrit dans le chapitre précédent. L'insert purifié a été ensuite resuspendu dans de l'eau. Pour le séquençage, 10 ng d'ADN ont été utilisés pour chaque réaction de séquençage. Les séquences obtenues ont été alignées puis corrigées à l'aide du programme « Codon aligner ». La présence éventuelle des mutations sur le gène a été déterminée manuellement en comparant les chromatogrammes obtenus à l'aide des amorces sens et anti-sens.

## **7.3. Interaction des VLP avec les salives**

La technique utilisée dans nos travaux pour l'étude de l'attachement des VLP de norovirus sur les salives a été mise au point par l'équipe de Jacques Le Pendu (Marionneau et al. 2002). L'analyse de l'attachement des VLP s'effectue sous un format ELISA. Les plaques utilisées, la préparation des échantillons salivaires et les phases de lavage par du PBS-T sont identiques au protocole utilisé pour le phénotypage des échantillons pour les HBGA. Pour les besoins de l'expérience, les échantillons salivaires ont été dilués au 1/1000<sup>ème</sup> (norovirus GII.4

servant de contrôle positif) et au 1/100<sup>ème</sup> (norovirus GII.3 souche SW4) avant d'être incubées sur les plaques ELISA. Cinq cents nanogrammes de VLP GII-3 ou GII-4 purifiées ont été incubés dans chaque puit et incubés pendant 2 heures à 37°C. Après lavage, 100 µ de sérum polyclonal de lapin anti-GII.3 ou 100 µl d'un anticorps monoclonal spécifique des norovirus GII.4 (clone 5B9 disponible au laboratoire) ont été dilués au 1/2000<sup>e</sup> dans du PBS contenant 4% de lait écrémé. Les anticorps ont été ainsi incubés pendant 1 heure à 37°C. Pour la détection des anticorps primaires, les anticorps secondaires (anti lapin ou anti souris) marqués à la peroxydase ont été dilués au 1/5000<sup>ème</sup> dans du PBS-4% lait écrémé puis incubés à 37°C pendant 30 min. L'activité peroxydase des anticorps secondaires après lavage au PBS-T a été révélée en incubant les plaques avec 100 µl de TMB par puit. Pour l'attachement des VLP GII.3 et GII.4, les révélations ont duré respectivement 20 min et 15 min à température ambiante. Dans chaque puit, la réaction a été stoppée en ajoutant 50 µl d'HCl 2N. La mesure de l'absorbance a été effectuée à 450 nm. Pour la lecture des plaques, le seuil de positivité a été fixé arbitrairement au-dessus d'une DO de 0,1.

L'étude des jeunes enfants souffrant de gastro-entérites, admis à l'hôpital Fattouma Bourguiba à Monastir en Tunisie nous a permis d'effectuer une étude sur les rotavirus et les norovirus. Après accord préalable de la Commission d'éthique de l'hôpital, nous avons été en mesure d'effectuer le phénotypage pour les HBGA des salives des jeunes malades et le génotypage par séquençage du gène *FUT2* à partir de prélèvements sanguins.

L'objectif principal de nos travaux a été de déterminer les liens éventuels entre la présence des HBGA et les infections à rotavirus ou norovirus. Les travaux présentés dans le mémoire de thèse s'articulent en 2 volets traitant des rotavirus puis des norovirus. En premier lieu, nous aborderons la méthodologie, nous présenterons ensuite les résultats obtenus. Nous terminerons la thèse par un chapitre consistant discutant de nos travaux et les perspectives qui en découlent.

## **8. Analyses statistiques**

Toutes les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du programme STATA version 12 (StatCorp LP, College Station, Etats-Unis). Pour déterminer s'il y avait une distribution spécifique des cas de norovirus et de rotavirus en classe d'âge, une analyse univariée a été effectuée en utilisant un test du Chi-2 de Pearson pour vérifier l'échantillonnage et un également

test exact de Fischer. Nous avons également effectué une analyse de variance multivariée de la distribution des rotavirus, des norovirus et des norovirus GII.3 en fonction des antigènes A, B, H et Lewis. La taille de l'échantillon étant réduite, nous avons opté pour des modèles de régression logistique exacte. Seules les variables dont  $p < 0,2$  en analyse univariée ont été incluses dans le modèle de régression multivariée. Un seuil de  $p < 0,05$  a été considéré comme significatif.

# **RESULTATS**

# Résultats de la surveillance épidémiologique

## 1. Echantillonnage

L'échantillonnage a été effectué au sein du service de Pédiatrie de l'hôpital Fattouma Bourguiba de Monastir entre janvier 2011 et août 2012. L'étude a inclus 114 enfants entre 1 mois et 6 ans et présentant tous un ou plusieurs symptômes caractérisant les gastro-entérites. Pour chacun des enfants, selles et salives ont été collectées durant la phase aigüe de la maladie. Pour 98 de ceux-ci, un prélèvement sanguin a été effectué. Les prélèvements salivaires et sanguins ont nécessité au préalable l'autorisation par le comité d'éthique de l'hôpital (voir pièce jointe). Rotavirus et norovirus ont été recherchés dans les selles. Les salives ont servi à déterminer le groupe sanguin et les prélèvements sanguins au génotypage des individus par séquençage d'une région du gène *FUT2*.

Sur les 114 échantillons, 101 ont été collectés entre juillet 2011 et mars 2012 (**Tableau 21**). Les 13 restants ont été collectés en janvier 2011 (N=5), mars 2011 (N=5), mai 2011 (N=1), juillet (N=1) et août 2012 (N=1). A l'exception d'un enfant de 6 ans, les enfants admis à l'hôpital avaient tous moins de 2 ans dont 80% d'entre eux avaient moins d'un an. L'âge moyen des enfants était de 9.55 mois et l'âge médian était de 7.3 mois. En moyenne, 6 épisodes diarrhéiques ont été observés pour chaque enfant se traduisant par des selles plus ou moins liquides. Les symptômes les plus fréquents après la diarrhée étaient la fièvre pour 79 individus, les vomissements pour 36 patients avec en moyenne 4 épisodes par jour et enfin une déshydratation de gravité moyenne pour 20 d'entre eux.

**Tableau 21:** échantillonnage au cours de l'étude

Date de prélèvement	Nombre d'échantillons	Date de l'échantillonnage	Nombre d'échantillons
Janvier 2011	5	Novembre 2011	14
Mars 2011	5	Décembre 2011	17
Mai 2011	1	Janvier 2012	15
Juillet 2011	8	Février 2012	13
Août 2011	2	Mars 2012	1
Septembre 2011	4	Juillet 2012	1
Octobre 2011	27	Août 2012	1
Total	114		

## 2. Détection et typage des rotavirus

Dans un premier temps les selles ont été testées en ELISA. La présence du virus a été ensuite confirmée par RT-PCR. Le rotavirus a été décelée dans les selles de 32 enfants soient 28% des échantillons. Soixante-quinze pourcents de ces 32 cas ont été détectés durant les mois d'hiver entre septembre 2011 et mars 2012. L'âge médian des enfants infectés par le rotavirus était de 9 mois et 80% d'entre eux avaient moins de 14 mois. L'individu le plus jeune avait 1.2 mois et le plus âgé avait 39 mois (âge moyen : 10.6 mois).

L'étape suivante a été de déterminer les génotypes G (VP7) et P (VP4) des 32 souches de rotavirus. Ce génotypage a été établi par PCR. Parmi les génotypes P, seuls les génotypes P[8] (N=30) et P[4] (N=2) ont été détectés. Les génotypes G1, G3 et G9 ont été respectivement détectés dans 40, 25 et 21% des cas. Les génotypes G2 et G4, plus rares, ont été seulement caractérisés pour 2 cas chacun. Pour un isolat appartenant au génotype P[8], le génotype G n'a pas pu être défini. Tous les génotypes G1, G3, G4 et G9 ont été associés au génotype P[8] alors que le génotype G2 a été associé à P[4]. Les souches de rotavirus G9P[8] ont été majoritaires (N=12) suivies des souches G3P[8] (N=8) et G1P[8] (N=7).

### 3. Détection et typage des norovirus

Les norovirus ont été détectés dans les selles par des techniques de RT-PCR en point final. Les amorces utilisées étaient spécifiques de la polymérase dans l'ORF1 et de l'extrémité de l'ORF2 correspondant au domaine S de VP1. Les norovirus ont été détectés dans les selles de 42 des enfants, essentiellement en hiver. Les enfants infectés par le norovirus avaient moins de 10 mois pour 80% d'entre eux. L'âge médian des enfants infectés était de 7.2 mois, le plus jeune et le plus vieux ayant respectivement 2.3 mois et 6 ans (âge moyen : 9.4 mois).

Pour le génotypage, les produits de PCR obtenus à partir de la polymérase et une partie conservée de l'ORF2 ont été séquencés. L'interrogation de la banque de données GenBank a permis de déterminer quels étaient les génotypes des norovirus détectés lors de l'étude. Soixante-neuf pourcents (N=29) des norovirus détectés étaient de génotype GII.3 dans la capsid et de génotype GII.P21 dans la polymérase. Des norovirus GII.1 ont été également détectés et représentaient 14.3% des norovirus totaux. Ces norovirus étaient tous de génotypes GII.g dans la polymérase. Le norovirus GII.7 a été détecté dans les selles de deux enfants, ils étaient également de génotype GII.P21 dans l'ORF1. Le génotype GII.4, souvent prédominant à l'heure actuelle, n'a été détecté que chez 5 individus. Ils se partagent entre les variants 2010 (N=2) et 2012 (N=3). Aucun norovirus appartenant au génogroupe I n'a été détecté parmi les 114 enfants.

### 9. Typage des salives

#### 9.1. Phénotypage des salives

Cent quatorze échantillons salivaires étaient à notre disposition. Bouillies puis dilués au 1000<sup>ème</sup>, ils ont été utilisés pour la détection des HBGA dans la salive (**Tableau 22 et figure 8**). Les antigènes A et B ont été recherchés en premier dans tous les échantillons de salive. Vingt-sept individus ont été très positifs pour l'antigène A et négatif pour l'antigène B. Cette différence était significative sur le plan statistique ( $p=0.0001$ ) et a permis de conclure que ces 27 enfants étaient du groupe A. Pour 19 enfants, l'antigène B était présent dans la salive alors que l'antigène A était absent ( $p=0.0001$ ), définissant ainsi des enfants appartenant au groupe B. Enfin 6 enfants appartenaient au groupe AB puisque leurs échantillons salivaires étaient aussi bien positifs pour

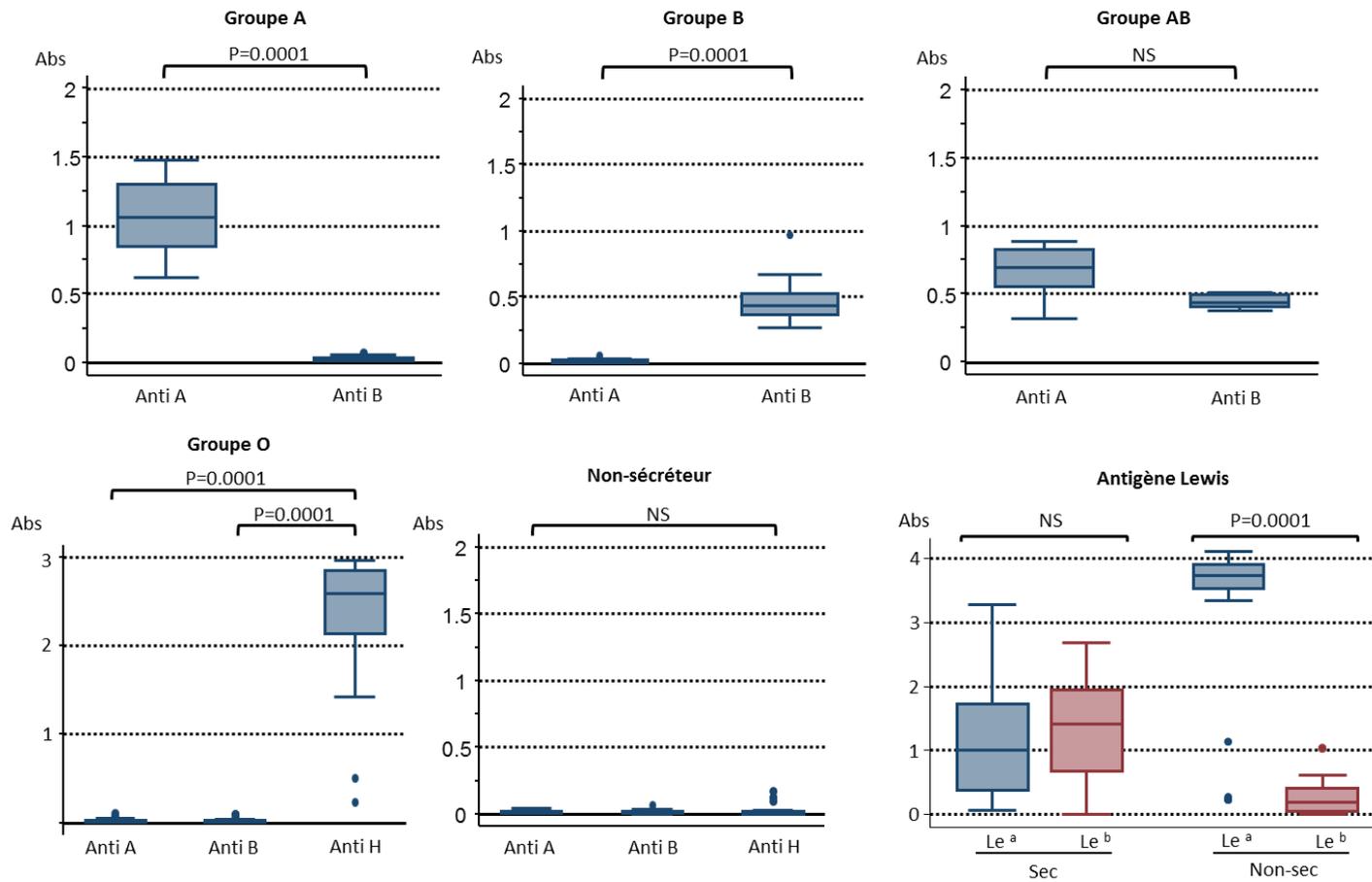
l'antigène A que pour l'antigène B. Il y avait donc 62 enfants qui étaient ni A, ni B. Ils pouvaient donc être du groupe O (présence de l'antigène H) ou non sécréteurs (absence des antigènes A, B et H de la salive). L'antigène H a donc été recherché dans la salive de ces 62 patients. Pour 38 d'entre eux, l'antigène H était effectivement présent alors que les antigènes A et B étaient absents ( $p=0.0001$ ). Ces résultats ont permis de conclure que ces 38 enfants étaient de groupe O. Pour les 24 restants, les antigènes du système ABO étaient absents et suggéraient que ces individus étaient des non-sécréteurs. La recherche des antigènes  $Le^a$  et  $Le^b$  a confirmé cela car pour ces 24 individus, nous avons détecté la présence de  $Le^a$  alors que l'antigène  $Le^b$  était absent ( $p=0.0001$ ). Ces résultats sont cohérents avec ceux que l'on retrouve dans la littérature car ils montrent que les non-sécréteurs sont du phénotype  $Le^a+Le^b-$  alors que les sécréteurs sont  $Le^a-Le^b+$ . Parmi les individus sécréteurs, l'antigène Lewis était absent pour 5 individus (1 groupe O, 1 groupe A et 3 du groupe B soient 4.4% du groupe).

**Tableau 22:** Répartition des antigènes des groupes sanguins après typage des salives.

	O		A		B		AB <sup>2</sup>		Non sec	
	Lewis <sup>3</sup> +	-	+	-	+	-	+	-	+	-
Phénotype <sup>1</sup> (N=114)	37	1	26	1	16	3	6		24	

<sup>1</sup> un échantillon salivaire a été collecté pour chaque patient (N=114)

<sup>2</sup> pour ces patients, les antigènes A et B ont été détectés dans la salive



**Figure 8:** Diagramme en boîte des résultats des phénotypes des échantillons salivaires pour les antigènes A, B, H et Lewis. Les groupes sanguins des individus considérés sont indiqués au-dessus de chaque diagramme. Les anticorps utilisés pour le typage sont indiqués en dessous de chaque graphique. Les différences significatives lors du typage sont indiquées par les probabilités. NS : non significatif.

## 9.1. Génotypage du gène *FUT2*

Pour 98 enfants, nous avons eu à disposition un prélèvement sanguin (**Tableau 23**). Celui-ci a été utilisé pour déterminer le génotype du gène *FUT2* par séquençage d'une portion du gène comportant les sites de mutation G428A qui est fréquemment retrouvée dans les populations caucasiennes et A385T qui est plus rarement détectée. Ces deux mutations ponctuelles introduisent un codon stop dans la séquence codant le fucosyl transférase, rendant alors l'enzyme inactive. Le phénotypage des salives a suggéré que 96 enfants appartenaient au groupe des sécréteurs alors que les 24 restants étaient des non-sécréteurs car les antigènes ABO étaient absents et leur profil phénotypique était Le<sup>a</sup>+Le<sup>b</sup>-. Le génotypage du gène *FUT2* a été possible pour 22 des 24 supposés non-sécréteurs et 76 des 96 sécréteurs. Le typage par séquençage a permis de confirmer que les 22 phénotypes non-sécréteurs étaient effectivement de génotype non-sécréteur (se-/se-). Ces enfants présentaient tous la mutation homozygote récessive G428A. Pour les 76 autres patients, nous avons confirmé qu'ils étaient effectivement de génotype sécréteur homozygote (N=23, Se+/Se+) ou hétérozygote (N=53, Se+/se-). Bien que l'échantillonnage fut trop petit pour être représentatif, la distribution allélique du gène *FUT2* dans notre étude s'approchait d'une distribution mendélienne (22% de se-/se-, 54% de Se+/se- et 24% de Se+/Se+)

**Tableau 23 : distribution des allèles *FUT2* en fonction des groupes sanguins**

	Lewis	O		A		B		AB <sup>4</sup>		Non sec	
		+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
Genotype <sup>1</sup>	Se+/Se+ <sup>2</sup>	6	1	8		6		2			
(N=98)	Se+/se- <sup>2</sup>	25		13	1	8	3	3			
	se-/se- <sup>2</sup>										22

<sup>1</sup> Parmi les 114 individus, un échantillon sanguin a été prélevé pour 98 d'entre eux

<sup>2</sup> Se+/Se+ : homozygote sécréteur ; Se+/se- : hétérozygote sécréteur ; se-/se- : homozygote non-sécréteur

## Relation entre les HBGA et les rotavirus

Les rotavirus ont été détectés chez les sécréteurs comme les non-sécréteurs (**Tableau 24**). La plupart des rotavirus ont été retrouvés chez des individus des groupes O (N=12) et A (N=10).

Quelques rotavirus ont été détectés chez des enfants des groupes B et AB. Enfin 4 patients non-sécréteurs ont été aussi infectés par un rotavirus. L'analyse statistique de ces résultats tend à démontrer qu'il n'y a pas de corrélation entre l'infection à rotavirus et le génotype *FUT2* ou l'appartenance à un groupe spécifique du système ABO. Malgré le très faible nombre d'individus négatifs pour l'antigène Lewis, l'analyse statistique des résultats a montré qu'il y avait cependant une association entre la présence de l'antigène Lewis et l'infection à rotavirus ( $p=0.017$ ). Le lien statistique que nous avons obtenu est ténu et nécessitera des études à plus grande échelle pour confirmer cette observation.

L'analyse des génotypes de rotavirus en fonction des HBGA n'a montré aucune association particulière entre les génotypes G et P et les antigènes sanguins. Les rotavirus majoritaires de type G9P[8] ont été détectés pour tous les groupes sanguins. Les rotavirus G3P[8] ont été également retrouvés chez des enfants des groupes A, B et O. Pour le génotype *FUT2*, il n'y avait, là non plus, pas d'association particulière sur le plan statistique entre les génotypes de rotavirus et le statut sécréteur. Les rotavirus ont été détectés chez 16 individus Se+/se- et 8 chez des homozygotes sécréteurs.

**Tableau 24:** Distribution des géotypes de rotavirus en fonction des phénotypes HBGA et des géotypes sécréteur et non-sécréteur.

Lewis	Sec <sup>1</sup>									
	O		A		B		AB		Non sec	
	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
G9P[8] <sup>†</sup>	<b>4</b>		<b>1</b>		<b>2</b>		<b>2</b>		<b>3</b>	
<i>Se/Se</i>			<i>1</i>		<i>1</i>		<i>1</i>			
<i>Se/se</i>	<i>4</i>				<i>1</i>		<i>1</i>			
<i>se/se</i>									<i>3</i>	
G3P[8] <sup>†</sup>	<b>1</b>		<b>4</b>		<b>2</b>				<b>1</b>	
<i>Se/Se</i>			<i>2</i>		<i>1</i>					
<i>Se/se</i>	<i>1</i>		<i>1</i>		<i>1</i>					
<i>se/se</i>									<i>1</i>	
G1P[8] <sup>†</sup>	<b>4</b>		<b>3</b>							
<i>Se/Se</i>										
<i>Se/se</i>	<i>4</i>		<i>2</i>							
G4P[8] <sup>†</sup>	<b>1</b>		<b>1</b>							
<i>Se/se</i>			<i>1</i>							
G2P[4] <sup>†</sup>	<b>2</b>									
<i>Se/Se</i>	<i>1</i>									
P[8] <sup>†</sup>			<b>1</b>							
<i>Se/Se</i>			<i>1</i>							
Total	<b>12</b>		<b>10</b>		<b>4</b>		<b>2</b>		<b>4</b>	
<i>Se/Se</i>	<i>1</i>		<i>4</i>		<i>2</i>		<i>1</i>			
<i>Se/se</i>	<i>9</i>		<i>4</i>		<i>2</i>		<i>1</i>			
<i>se/se</i>									<i>4</i>	

## 1. Présence des rotavirus chez des enfants non sécréteurs

L'infection par des rotavirus a été détectée chez 4 enfants non sécréteurs. Trois d'entre eux ont été infectés par un rotavirus G9P[8] et le quatrième par un rotavirus G3P[8]. Dans un premier temps, nous avons confirmé pour 3 des patients, la présence d'un rotavirus par RT-PCR en temps réel en utilisant des amorces et une sonde spécifiques du segment codant VP6 grâce à la technologie taqman. Sur les 4 patients non-sécréteurs, il nous restait des selles pour deux patients. Ces échantillons nous ont permis de réextraire l'ARN viral et d'effectuer sa réamplification. Les produits de PCR obtenus ont été ensuite séquencés (numéro GenBank KP862856 et KP862857). L'analyse génétique après séquençage du segment VP8 a permis de confirmer le génotype P[8] de ces souches de rotavirus. Nous avons donc la démonstration que des rotavirus de génotype P[8], largement prédominants dans la population, pouvaient infecter des individus non-sécréteurs.

Des travaux récents sur l'association entre les HBGA et les infections à rotavirus ont démontré que certains génotypes de rotavirus pouvaient effectivement infecter des individus non-sécréteurs (Imbert-Marcille BM et al., J Infect Dis. 2014 Apr 15;209(8):1227-30.) (Van Trang et al., J Clin Microbiol. 2014 May;52(5):1366-74.) (Nordgren et al., Clin Infect Dis. 2014 Dec 1;59(11):1567-73). L'étude menée au Burkina Faso a démontré le rôle des rotavirus P[6] chez les non-sécréteurs. En revanche dans toutes ces études, il a été constaté que les rotavirus de génotype P[8], très prédominants, n'infectaient que les individus sécréteurs.

- **Prédominance des rotavirus de génotype P[8].**
- **Absence de distribution spécifique des rotavirus en fonction des antigènes A, B et H.**
- **Corrélation de l'infection par les rotavirus avec la présence de l'antigène Lewis ( $p=0.017$ ).**
- **Les rotavirus de génotype P[8] peuvent infecter des individus non-sécréteurs → implication de facteurs d'attachement différents des HBGA.**

## Conclusions et discussion des travaux sur les rotavirus

Plusieurs études ont récemment montré l'implication des HBGA dans l'attachement des rotavirus aux entérocytes. Lors de nos travaux, nous avons effectué une surveillance épidémiologique des rotavirus chez des jeunes enfants souffrant de gastro-entérites combinée à l'analyse de leurs groupes sanguins à partir d'échantillons salivaires et sanguins, notre objectif étant de déterminer s'il y avait une relation quelconque entre les HBGA et les infections à rotavirus. Parmi les 114 selles analysées au cours de l'étude, le génotype P[8] a été largement majoritaire (93.7% des cas). La distribution génotypique des rotavirus de l'étude était classique avec la présence des génotypes que l'on retrouve le plus fréquemment dans les surveillances épidémiologiques effectuées par exemple en Tunisie et en Europe (Mouna et al. 2013; de Rougemont et al. 2011; Tam et al. 2012). En revanche le faible nombre d'échantillons positifs ne nous a pas permis de détecter des souches émergentes comme les rotavirus de génotype G12 ou des rotavirus d'origine animal comme les génotypes P[6] (Mouna et al. 2013).

Récemment, deux publications ont documenté l'implication des HBGA dans la fixation des rotavirus sur les entérocytes (Hu et al. 2012; Huang et al. 2012). Ces premiers travaux étant effectués *in vitro*, plusieurs équipes dont la nôtre ont alors étudiés l'association qu'il pourrait y avoir entre les HBGA et les rotavirus grâce à l'analyse d'échantillons cliniques. Ces études ont toutes eu le même objectif d'étudier la répartition des rotavirus en fonction des HBGA et des génotypes sécréteurs et non-sécréteurs. Nous n'avons pas observé de distribution particulière des génotypes de rotavirus et de leurs génotypes en fonction des antigènes ABO. Il en est de même pour les individus de génotypes sécréteurs ou non-sécréteurs puisque nous avons détecté les rotavirus aussi bien chez les sécréteurs (N=24) que chez les non-sécréteurs (N =4). La présence des rotavirus a été confirmée par RT-PCR en temps réel sur VP6, par le séquençage du segment VP8 et enfin la caractérisation du génotype sécréteur ou non-sécréteur par le séquençage du gène *FUT2*. Une étude multicentrique publiée récemment par le Centers for Disease Control corrobore nos résultats (Payne et al. 2015). Dans cette étude les selles et les salives de 1564 enfants de moins de 5 ans souffrant de gastro-entérites ont été analysées. Les rotavirus ont été recherchés dans les selles et le génotype *FUT2* des patients a été déterminé à partir des échantillons salivaires. Sur les 1564 individus, un rotavirus a été détecté pour 189 patients et 188 d'entre eux étaient sécréteurs. Un individu non-sécréteur a cependant été infecté par un rotavirus de génotype G3P[8], confirmant ainsi nos résultats au sujet des

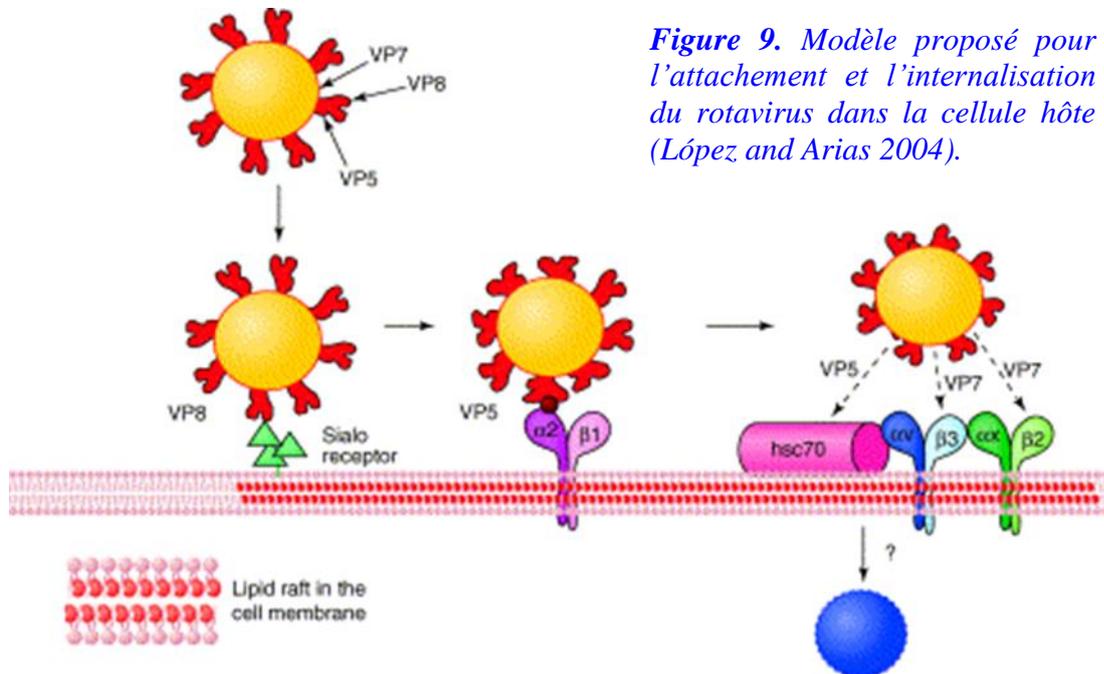
infections à P[8] chez les non-sécréteurs. En revanche, l'observation de rotavirus de génotype P[8] dans nos travaux est en contradiction avec l'étude effectuée au CHU de Nantes par Ruvoen-Clouet et al. où les rotavirus P[8] n'ont jamais été détectés chez les individus non-sécréteurs (Ruvoen-Clouet et al. 2014). C'est également la conclusion des travaux menés en Afrique, en Amérique du Sud et en Asie où il a été observé un lien entre le phénotype sécréteur et l'infection par des rotavirus de génotype P[8] (Nordgren et al. 2014; Van Trang et al. 2014).

Si nous n'avons pas détecté de distribution particulière des rotavirus en fonction des antigènes ABO, nous avons en revanche observé que les infections à rotavirus ne se produisaient que chez les individus positifs pour l'antigène Lewis. Notons que selon l'origine ethnique de la population, la distribution des antigènes ABO et des génotypes pour les gènes *FUT2* et *FUT3* diffèrent. Au Burkina Faso par exemple, il y a une proportion élevée de personnes négatives pour l'antigène Lewis car l'expression du gène *FUT3* est déficiente (Nordgren et al. 2014). Les auteurs ont démontré qu'il y avait une corrélation entre la présence de l'antigène Lewis et l'infection à rotavirus P[8]. Cela corrobore nos résultats où nous avons observé la même corrélation entre l'infection à rotavirus P[8] et la présence de l'antigène Lewis, sachant que dans l'étude burkinabé, le rotavirus P[6] a été en revanche détecté chez les patients négatifs pour l'antigène Lewis. Par conséquent, la distribution des génotype P de rotavirus semble liée à celle des groupes sanguins.

Le petit nombre d'échantillons positifs pour le rotavirus ne nous a pas permis de confirmer statistiquement nos observations. Des surveillances à plus grande échelle devront être effectuées à l'avenir. La majorité des études a pour l'instant pris en compte que le génotype *FUT2* à l'exception de l'étude de Nordgren J et al. (Nordgren et al. 2014) et nos travaux. Elles devront à l'avenir combiner l'analyse des rotavirus à la détection des HBGA dans la salive associée au génotypage du gène *FUT2*. L'analyse d'un grand nombre d'échantillons positifs fournira de nouvelles informations sur la répartition des génotypes P en fonction des HBGA. Dans la plupart des études dont la notre, le génotypage de *FUT2* a été effectué à partir d'ADN extrait d'échantillons sanguins ou salivaires. Dans l'étude rétrospective de Ruvoen-Clouet et al., la détection des rotavirus et le typage de *FUT2* ont été effectués à partir des selles (Imbert-Marcille et al. 2014). Cette stratégie de recherche est une alternative valable car elle permet de s'affranchir des prélèvements sanguins et salivaires qui peuvent être difficile à collecter sur le terrain.

En conclusion il apparaît donc que la population des sécréteurs est plus exposée aux infections à rotavirus. Plusieurs études ont ainsi montré que le génotype prédominant P[8] infectait principalement les sécréteurs. Nos travaux ont cependant démontré que les infections des non-sécréteurs par le génotype P[8] sont également possibles. Les facteurs favorisant l'infection des non-sécréteurs sont pour l'instant inconnus. Si le rôle des HBGA dans l'attachement des rotavirus est à présent clairement démontré, ceux-ci s'ajoutent à une longue liste de facteurs cellulaires intervenant dans la reconnaissance du virus.

Dans la modélisation proposée par Arias et Lopez (**Figure 9**), les rotavirus sont pris en charge par des glycosphingolipides puis par l'intégrine  $\alpha_2\beta_1$  avant d'être reconnu par hsc70 et les intégrines  $\alpha_v\beta_3$  et  $\alpha_x\beta_2$ . Dans ce modèle, le rôle des HBGA reste à définir.



Nous pouvons aussi concevoir que les HBGA constituent une des voies de fixation des rotavirus à la cellule et qu'il en existe d'autres. L'infection de non sécréteurs par le rotavirus, comme l'atteste notre étude, suggère que l'attachement des rotavirus puisse mettre en jeu également des mécanismes indépendants des HBGA comme les facteurs microbiens. L'utilisation croissante des technologies de séquençage à haut débit a permis de souligner le rôle de la flore microbienne intestinale dans le cycle infectieux des norovirus où des bactéries exprimant les HBGA pourraient favoriser l'infection. Ces questions sur le rôle de la flore microbienne peuvent également se poser pour les rotavirus. Il s'avère donc que les mécanismes infectieux observés pour les rotavirus sont encore plus complexes.

## Relation entre les HBGA et les norovirus

Les norovirus ont été détectés chez les sécréteurs (N=35) et les non-sécréteurs (N=7). Parmi les sécréteurs, les norovirus ont été détectés le plus souvent chez les individus du groupe O (N=21), suivi du groupe A (N=7) et du groupe B (N=6). Parmi les individus du groupe B, 2 individus négatifs pour l'antigène Lewis ont été infectés par un norovirus de génotype GII.3 ou GII.4. Des norovirus GII.3 (N=5), GII.1 (N=1) et GII.7 (N=1) ont été retrouvés chez les enfants non-sécréteurs (**Tableau 25**)

**Tableau 25 : Distribution des norovirus en fonction des HBGA**

Lewis	O		A		B		AB		Non sec <sup>a</sup>	
	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
GII.3	15		6		1	1	1		5	
GII.4	3				1	1				
GII.1	3		1		1				1	
GII.7					1				1	
Total	21		7		4	2	1		7	

Sur le plan statistique, nous n'avons pas trouvé de distribution particulière des norovirus selon le groupe sanguin ou le génotype *FUT2* (**Tableau 26**). Cela est également vrai pour les norovirus GII.3 qui ont été prédominants lors de l'étude. Le faible nombre de norovirus détectés lors de l'étude n'a pas permis de détecter une distribution particulière selon le génotype du gène *FUT2*. Toutefois, nous avons constaté que les infections à norovirus touchaient plus souvent les individus Se+/se- ( $p=0.057$ ). Ces observations corroborent des travaux plus anciens démontrant qu'il y aurait une prédisposition accrue des individus hétérozygotes aux infections à norovirus (Marionneau et al. 2005).

**Tableau 26: distribution des norovirus en fonction des génotypes sécréteurs et non sécréteurs**

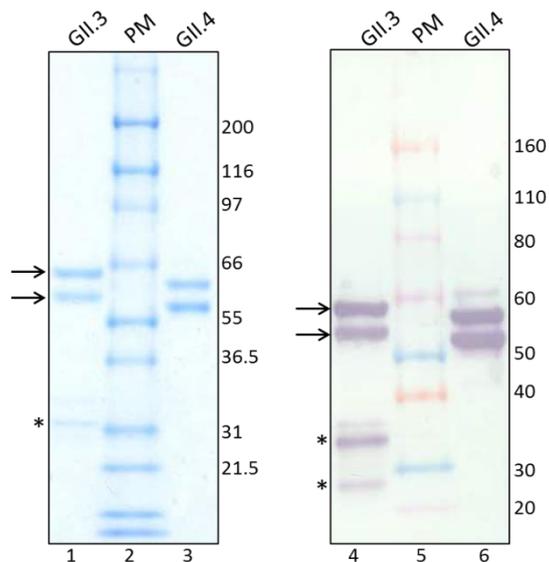
	Sécréteur <sup>1</sup>		Non-sécréteur <sup>1</sup>
	Se+/Se+ <sup>2</sup>	Se+/Se- <sup>2</sup>	Se-/Se- <sup>2</sup>
GII.3	5	18	5
GII.4	2	2	
GII.7	1		1
GII.1			1

<sup>1</sup> une portion du gène *FUT2* a été séquencée pour le dépistage des mutations A385T and G428A (Imbert-Marcille et al. 2014).

<sup>2</sup> Se+/Se+ : homozygote sécréteur ; Se+/se- : hétérozygote sécréteur ; se-/se- : homozygote non-sécréteur

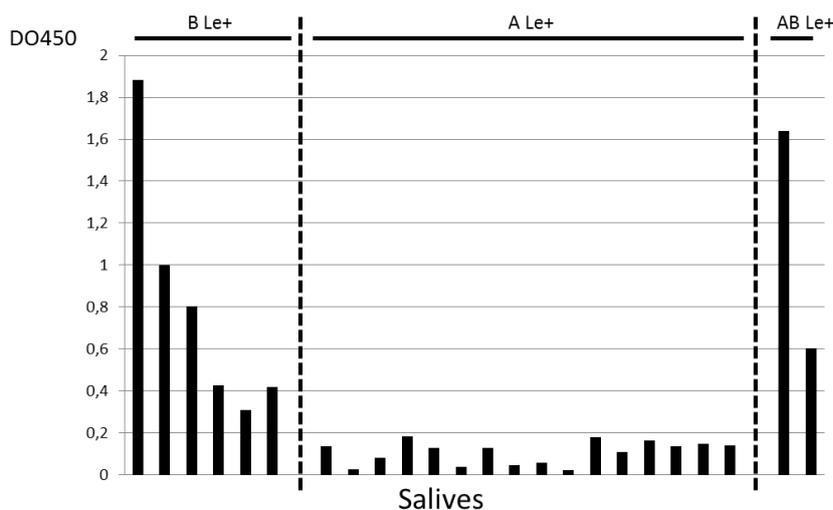
## **1. Production et caractérisation des particules de synthèse du norovirus GII.3 souche SW4**

Lors de l'étude nous avons détecté des norovirus GII.3 chez des patients non-sécréteurs. L'objectif a été de déterminer les capacités d'attachement d'un norovirus GII.3 isolé chez un patient que nous savions non-sécréteur. Nous avons d'abord cloné la portion du génome correspondant à l'ORF2 dans un vecteur pGEM puis nous avons déterminé la séquence nucléotidique de ce norovirus que nous avons dénommée souche SW4. La séquence de l'ORF2 a été enregistrée dans GenBank sous le numéro KM056394. La séquence nucléotidique de la souche SW4 est à 98% identique à la souche pédiatrique 693/425 (KC464328) isolée en Australie (Mahar et al. 2013). L'insert correspondant à l'ORF2 a été ensuite sous-cloné dans le vecteur de transfert PVL1392, ce vecteur navette a servi ensuite à la production de baculovirus recombinant après sa co-transfection avec le génome linéarisé d'un baculovirus où le gène codant la polyhédrine était manquant. Plusieurs baculovirus recombinants ont été isolés par plage de lyse, amplifiés puis testés individuellement en ELISA pour sélectionner sommairement le recombinant produisant le plus de VLP dont la détection a été effectuée grâce à un sérum polyclonal anti GII.3 disponible au laboratoire. Nous avons sélectionné un clone de baculovirus permettant la production de plus de 3 mg de VLP GII.3 SW purifiées à partir de 20 millions de cellules Hi-5. Les VLP purifiées après électrophorèse avaient une pureté de 90%. Les particules de synthèse sont constituées d'une protéine VP1 complète et d'une version tronquée comme il a été observé pour les norovirus GII.4. L'origine des protéines produites a été confirmée par westernblot à l'aide du sérum polyclonal anti-GII.3 (*Figure 10*)



**Figure 10.** Electrophorèse des protéines des VLP de l'étude. Coloration au bleu de Coomassie d'un gel acrylamide (lignes 1-3) et westernblot (lignes 4-6) des VLP purifiées de la souche SW4 (GII.3) (lignes 1 et 4) et de la souche Cairo4 (GII.4) (lignes 3 et 6). Les protéines correspondant à VP1 (forme complète et tronquée) sont indiquées par des flèches. Les produits de dégradation sont indiqués par des étoiles. Les masses du marqueur moléculaire (PM) sont indiqués sur la droite.

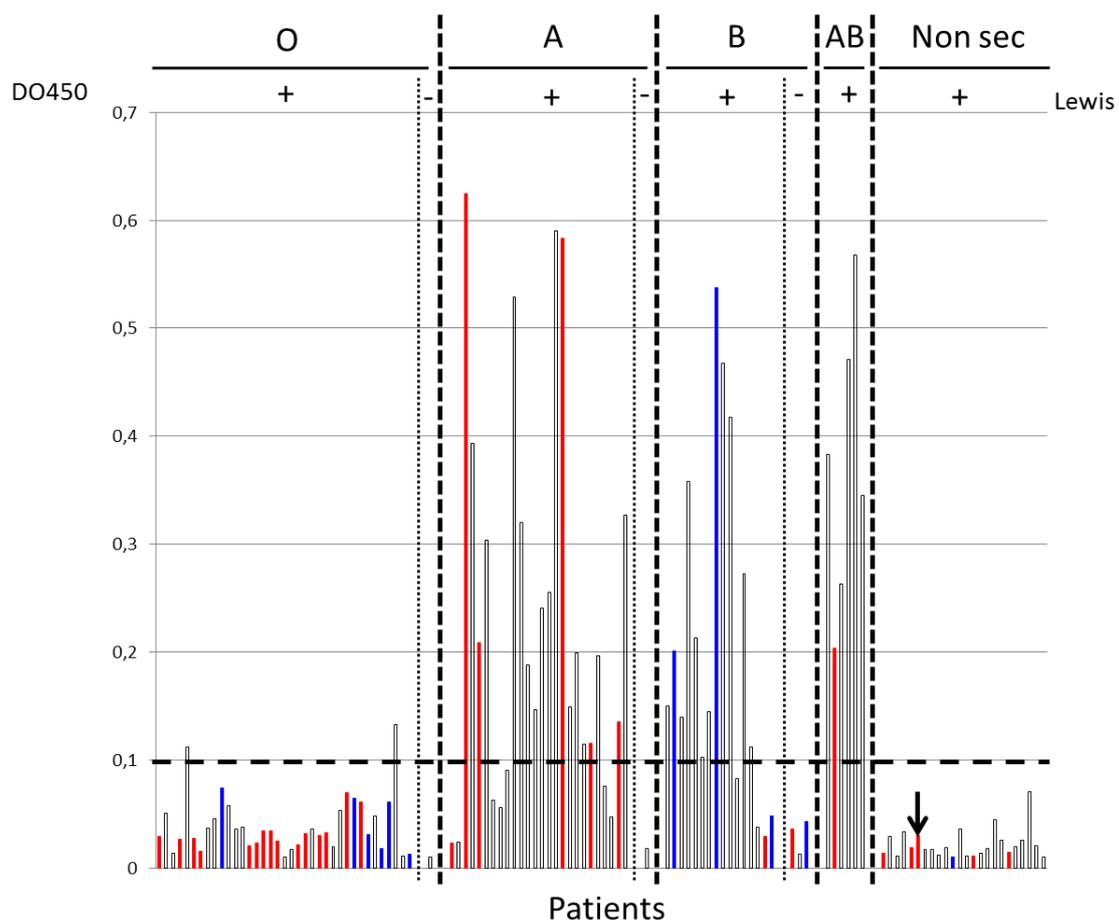
Nous avons ensuite établi le profil d'attachement de ces VLP en utilisant des salives caractérisées dans le laboratoire de Jacques LE PENDU (INSERM U892). Nous avons obtenu les signaux d'attachement optimaux en utilisant des salives diluées au 1/100<sup>ème</sup> (**Figure 11**). Nous avons observé que les VLP GII.3 SW reconnaissent l'antigène B présent chez les individus des groupes B et AB avec toutefois un attachement résiduel sur l'antigène A. La suppression de l'attachement des VLP aux extraits de salive après traitement de ceux-ci par 100 mM de périodate de sodium (NaIO<sub>4</sub>) démontrant que que l'attachement se faisait effectivement par le biais des sucres.



**Figure 11:** attachement des VLP GII.3 de la souche SW4 sur des salives préalablement typées. Chaque barre correspond à un échantillon. Les salives ont été classées par phénotype. Celui-ci est indiqué au-dessus du graphe.

## 2. Attachement des VLP GII.3 de la souche SW4

Après détermination de la dilution optimale des échantillons salivaires, chaque salive des 114 patients a été bouillie puis diluée au 1/100<sup>ème</sup> pour les besoins du test d'accroche des VLP en ELISA. Les essais d'attachement des VLP ont été effectués en duplicata. Nous avons ainsi observé que les VLP produites avaient la capacité de s'attacher aux salives des patients des groupes A, B et AB (**Figure 12**). Le seuil de détection étant fixé arbitrairement à 0,1, seuls deux individus du groupe O ont attaché faiblement les VLP. Concernant les individus des groupes A, B et AB, l'attachement des VLP était variable en amplitude mais n'excédait pas une absorbance de 0,6. Chez les non sécréteurs et en particulier chez l'individu à partir duquel les VLP ont été produites, nous n'avons observé aucun attachement des VLP SW4. Nous avons donc conclu que les HBGA présents ou absents de la salive ne reflétaient pas nécessairement les capacités d'interaction des norovirus avec la cellule, en particulier pour une population pédiatrique. Nos résultats suggèrent l'existence d'autres types de récepteurs autres que les HBGA.



*Figure 12 : attachement des VLP de la souche SW GII.3 sur les salives de l'étude. Chaque barre correspond à un patient. Les barres rouges correspondent aux patients infectés par un norovirus GII.3. Les barres bleues correspondent aux patients infectés par un génotype de norovirus autre que GII.3. La souche SW a été isolée chez un patient non-sécréteur indiqué par une flèche. Le seuil de détection a été arbitrairement fixé à 0.1 (trait hachuré). Le phénotype HBGA des salives et la présence d'antigène Lewis sont indiqués au-dessus du graphe.*

### 3. Analyse des co-infections rotavirus-norovirus

L'analyse des infections à rotavirus et norovirus en fonction des HBGA à partir de l'échantillonnage a été traitée de manière indépendante dans les deux publications tirées des travaux de cette thèse sans que nous documentions les co-infections. Lors de l'étude, les norovirus (N=42) ont été prédominants par rapport aux rotavirus (N=32). Nous avons détecté 7 cas de co-infections, tous concernaient un norovirus GII.3 qui était associé à un rotavirus G1P[8] (N=4 et N=1 pour respectivement les groupes O et A), G9P[8] (N=1, groupe O) ou G2P[4] (N=1, groupe O). Quant à la distribution des norovirus et des rotavirus vis-à-vis des HBGA, il n'y avait pas de différence marquante d'un point de vue statistique (*Tableau 27*).

*Tableau 27. Répartition des rotavirus et des norovirus en fonction des HBGA*

Phenotype (N=114)	O		A		B		AB		Non sec *	
	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
Lewis	37	1	26	1	16	3	6	-	24	-
Rotavirus	12		10		4		2		4	
Norovirus	21		7		4	2	1		7	

- **Prédominance des norovirus GII.3.**
- **Absence de distribution spécifique des norovirus en fonction des HBGA.**
- **Détection des norovirus chez les sécréteurs et les non-sécréteurs.**
- **Existence de voies alternatives à la voie HBGA pour l'attachement des norovirus chez les non-sécréteurs comme le suggère l'absence d'attachement des VLP dérivées d'un norovirus GII.3 d'un patient non-sécréteur sur sa propre salive et les autres échantillons salivaires des non-sécréteurs.**

## Conclusions et discussion des travaux sur les norovirus

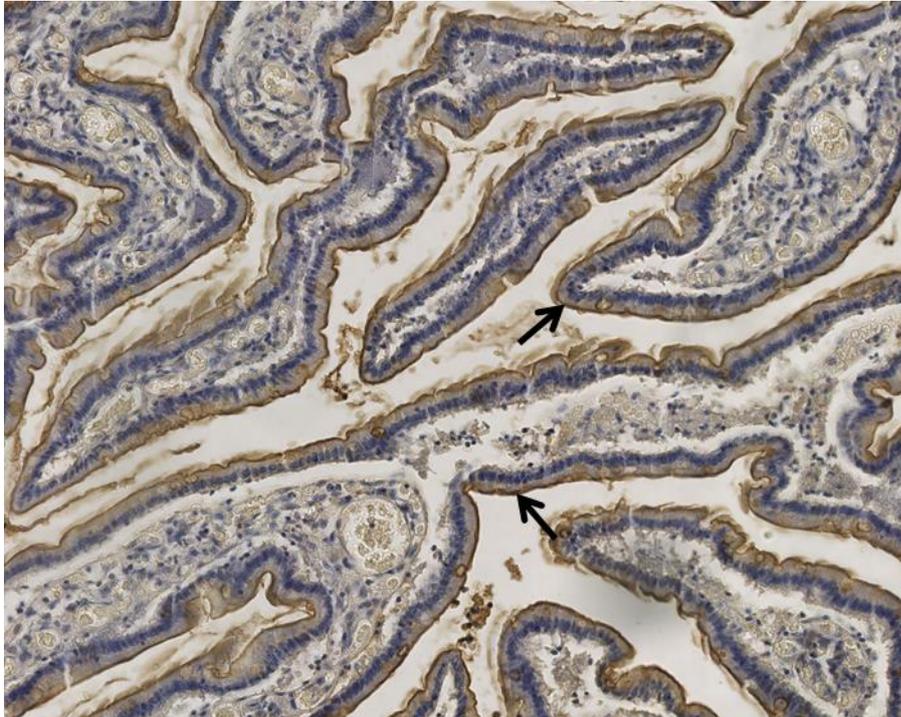
Dans nos travaux nous avons démontré que la présence ou l'absence d'antigène de groupe sanguin ne reflétait pas nécessairement les risques éventuels d'infection par le norovirus. Nous avons eu l'opportunité d'isoler et de caractériser un norovirus GII.3 à partir de selle d'un patient non sécréteur dont nous avons déterminé le phénotype salivaire pour les antigènes A, B, H et Lewis. L'absence des antigènes du système ABO et la présence de Lewis a suggéré que cet enfant était non-sécréteur ce qui a été confirmé par séquençage d'une portion du gène *FUT2*. Dans les selles de cet enfant, nous avons détecté un norovirus de génotype GII.3 dont nous avons cloné le gène codant la capsid pour l'exprimer dans le système baculovirus et synthétiser des VLP, notre objectif étant d'utiliser celles-ci pour déterminer les propriétés d'attachement.

Notre premier objectif a été de détecter puis de caractériser les norovirus afin de déterminer leur distribution en fonction du profil HBGA des patients. Nous n'avons pas observé de distribution particulière des norovirus en fonction des HBGA et des phénotypes sécréteur et non-sécréteur. Habituellement prédominants, nous n'avons détecté que 4 norovirus GII.4 et chez des personnes du groupe sécréteurs. De la même façon, dans deux études récentes, il a été constaté que les norovirus GII.4 infectaient uniquement les individus sécréteurs (Currier et al. 2015; Lopman et al. 2015). Au contraire, les travaux de Carlsson et al. rapportent une exception où ils ont détecté chez un individu non-sécréteur  $Le^{a+}Le^{b-}$ , un variant 2004 du norovirus GII.4 lors d'une épidémie touchant des personnes qui étaient toutes, mise à part ce cas, de phénotype sécréteur (Carlsson et al. 2009). C'est le seul exemple d'un norovirus GII.4 infectant un individu non-sécréteur positif pour Lewis. Cette observation va toutefois dans le sens de nos travaux sur l'affinité des différents variants GII.4 pour les antigènes de groupe sanguin (de Rougemont et al. 2011) où nous avons démontré que les VLP des variants 2007/Osaka et 2006b/Den Haag s'attachaient aux salives des sécréteurs et des non-sécréteurs. Ces données obtenues *in vitro* suggéraient que certains norovirus GII.4 pouvaient potentiellement infecter une part plus importante de la population comprenant des individus sécréteurs et des non-sécréteurs. Toutefois, la capacité d'attachement des VLP de norovirus aux salives ne reflète pas nécessairement le risque réel d'infection par le norovirus GII.4. Cela pourrait expliquer les discordances avec les données obtenues chez les patients.

Le génotype prédominant de notre étude a été le norovirus de génotype GII.3, celui-ci représente à lui seul 69% des norovirus détectés. D'autres travaux ont fait état de la prédominance de ce génotype chez les jeunes enfants (Van Trang et al. 2014). Par ailleurs, nous avons détecté des norovirus GII.3 chez 5 non sécréteurs en plus des sécréteurs. Les résultats de la littérature concernant le lien entre l'infection par le norovirus GII.3 et le statut sécréteur ou non-sécréteur de l'individu sont contradictoires. Liu et al. ont constaté une forte corrélation entre la présence des GII.3 et le phénotype sécréteur (P. Liu et al. 2014) alors que dans une autre étude menée sur 262 enfants, Van Trang et al. ont observé des norovirus GII.3 chez des non-sécréteurs (Van Trang et al. 2014) . Nos résultats indiquent clairement qu'il y a une possibilité d'infection des non-sécréteurs par les norovirus GII.3.

Le deuxième objectif a été ensuite de déterminer le profil d'attachement aux HBGA de VLP dérivées d'un norovirus GII.3 isolé chez un patient non-sécréteur de l'étude. Nous avons en premier lieu évalué les capacités d'attachement de cette VLP aux salives collectées lors de l'étude, en particulier celle des non-sécréteurs. Lorsque nous avons testé ces VLP GII.3 provenant de ce patient non-sécréteur avec sa propre salive, nous n'avons pas observé d'attachement. Il en était de même pour les salives des autres non-sécréteurs. En revanche, nous avons observé un attachement avec les salives de plusieurs patients sécréteurs des groupes A et B alors qu'aucun attachement n'a été observé pour les individus du groupe O où pourtant la majorité des autres norovirus GII.3 a été détectée. Il semblait donc que dans certains cas il n'y ait pas de corrélations entre les HBGA dans la salive et l'infection par le norovirus. Cela était particulièrement vrai pour les non sécréteurs où la présence de l'antigène Lewis ne permettait pas l'attachement des VLP. Dans la littérature, Carlsson et al. ont documenté une épidémie de gastro-entérites dans une maison de retraite où sécréteurs et non-sécréteur ont été infectés par un variant 2004 du norovirus GII.4. La stratégie utilisée dans ces travaux était similaire à la nôtre si ce n'est que des particules virales natives de norovirus GII.4, purifiées à partir des selles des malades, ont été utilisées pour les essais d'attachement (Carlsson et al. 2009) .Dans ces travaux, il a été ainsi démontré que le norovirus GII.4 épidémique interagissait avec les salives des patients sécréteurs et trois salives de non sécréteurs, un individu  $Le^{a+}Le^{b-}$  et deux patients  $Le^a-Le^{b-}$ . Les auteurs ont alors conclu que l'attachement des norovirus était probablement possible sans HBGA et en particulier sans antigène Lewis. Nos résultats vont dans ce sens mais à la différence des travaux exposés dans l'étude de Carlsson, nous avons utilisé des VLP au lieu de particules natives purifiées à partir des selles des malades. L'utilisation de particules natives aurait été idéale pour notre étude. Cependant, les faibles quantités d'échantillons ont imposé l'utilisation de VLP. Il se posait

alors la question de l'intégrité structurale de nos capsides de synthèse. Pour contrôler celle-ci, des VLP SW4 de GII.3 ont été utilisées lors de marquages immuno-histochimiques de coupe de duodénum (**Figure 13**).

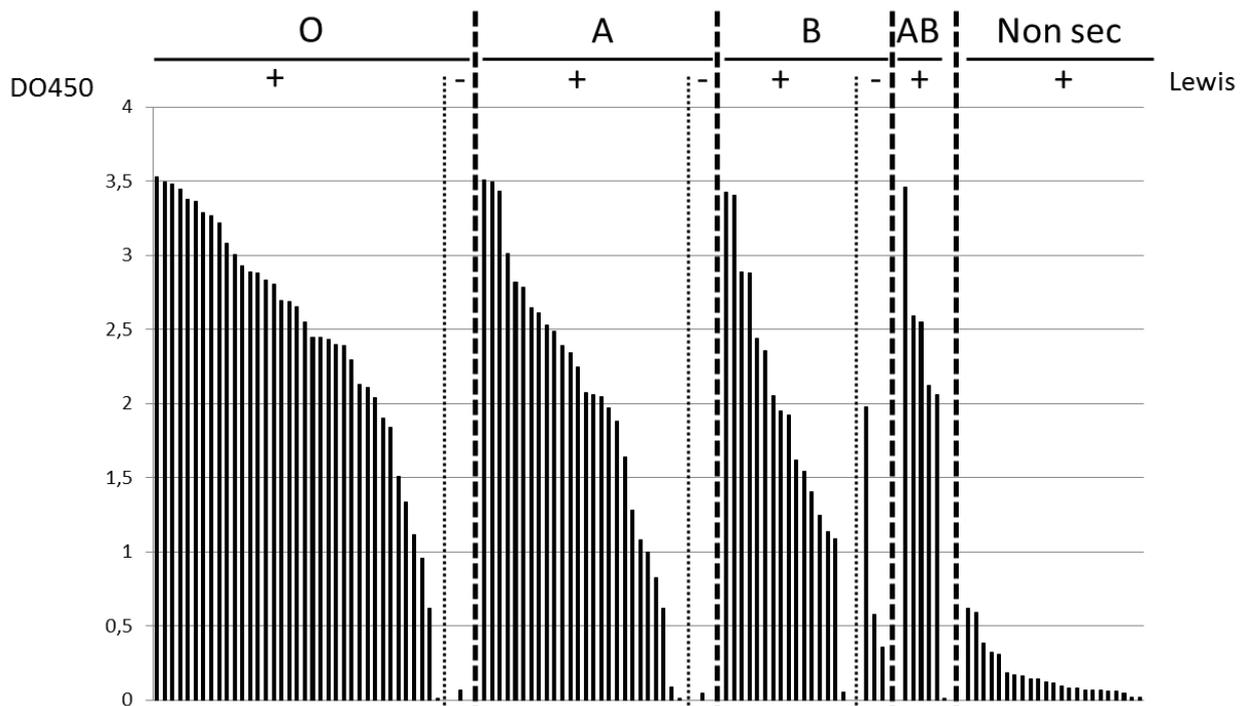


*Figure 13. Marquage immunohistochimique du duodénum par les VLP GII.3 de la souche SW. Le marquage spécifique de la bordure en brosse des cellules épithéliales est indiqué par des flèches.*

Ces marquages ont prouvé qu'il y avait un attachement spécifique des VLP SW4 sur la bordure en brosse des cellules épithéliales, confirmant l'intégrité structurale de ces VLP. D'autre part, les VLP SW4 de l'étude ont été testées sur des salives préalablement étalonnées (INSERM U892, Nantes) où nous avons observé leur attachement aux salives des groupes B et AB (**Figure 11**) Ces résultats ont également apporté des arguments en faveur de l'intégrité des VLP en l'absence d'observation en microscopie électronique.

Depuis le papier princeps de Marionneau et al. les tests d'attachement des VLP aux salives ont été très utilisés pour la caractérisation des différents génotypes de norovirus humains (Severine Marionneau et al. 2002). Il a été démontré que la détection des HBGA dans la salive est un indicateur de la présence de ces antigènes à la surface des entérocytes (S Marionneau et al. 2001). Or, nous n'avons observé aucun attachement des VLP SW4 sur les

salives des individus non-sécréteurs de l'étude. La question était donc de savoir si les HBGA et en particulier les antigènes Lewis étaient présents dans les salives des très jeunes enfants. Dans la littérature, les quelques publications sur l'expression des HBGA chez les jeunes enfants montrent qu'il n'y a pas de retard de l'expression des HBGA sous le contrôle du gène *FUT2* (Arcilla et al. 1973). A la naissance, les méconiums sont extrêmement riches en glycolipides de toute sorte et en particulier en HBGA (Karlsson et Larson 1981). Les nouveau-nés expriment ainsi les antigènes Lewis a, b et x. Dans les deux premières années de la vie, la proportion de ces antigènes varie selon le génotype du gène *FUT2* pour se stabiliser ensuite (Larson et al. 1987). Afin de démontrer la présence d'HBGA dans la salive de sujets non sécréteurs et leur capacité à fixer les norovirus nous avons mené deux séries d'expérience. Nous avons premièrement prouvé la présence de l'antigène Le<sup>a</sup> dans les échantillons salivaires des non-sécréteurs, quel que soit leur âge. Pour l'enfant non-sécréteur dont la souche SW4 est issue, les absorbances obtenues pour l'antigène Lewis ont été supérieures à 3. Dans la deuxième série de test, nous avons mesuré l'attachement de toutes les salives de l'étude sur les VLP GII.4 de Cairo 4 (variant Osaka) (*Figure 14*).



*Figure 14: Attachement des VLP GII.4 variant Osaka de la souche Cairo 4 sur les salives de l'étude. Les groupes sanguins sont indiqués au-dessus du graphique. Chaque barre du graphe correspond à un échantillon salivaire.*

Les valeurs élevées que nous avons obtenues lors des tests d'attachement, incluant les salives des non-sécréteurs, ont prouvé que les HBGA étaient effectivement excrétés dans les salives.

Pour confirmer le rôle des HBGA, nous avons traité avec du périodate de sodium quelques extraits salivaires provenant de sécréteurs et de non-sécréteurs. L'absence d'attachement sur les salives constatée pour les GII.4 (salive des sécréteurs et des non-sécréteurs) et la souche GII.3 SW (salives des sécréteurs) ont confirmé le rôle de la fraction glycane dans l'attachement des VLP.

En conclusion, le rôle des HBGA dans l'attachement des norovirus est accepté par la communauté scientifique depuis plusieurs années. Les études épidémiologiques prenant en compte les HBGA et les phénotypes sécréteurs/non-sécréteurs comme celles que nous présentons sont de plus en plus nombreuses. Cependant à la différence des autres études publiées récemment, nos travaux sur les norovirus indiquent que les propriétés d'attachement à la salive ne reflètent pas nécessairement la reconnaissance des norovirus à la surface des cellules intestinales et cela en particulier chez les non sécréteurs. Pour la première fois, nous avons produit des VLP dérivées d'un norovirus qui avait infecté un non-sécréteur. Les VLP SW de GII.3 ont permis non seulement de mettre en évidence le rôle des HBGA mais très probablement celui d'autres molécules. Les exemples de virus dont la fixation à la cellule hôte met en jeu plusieurs facteurs sont nombreux. Les plus connus sont évidemment le virus de l'immunodéficience humaine et le virus de l'hépatite C. Pour ce dernier, des glycoaminoglycane puis plusieurs protéines permettent la reconnaissance de la particule virale et sa prise en charge jusqu'à son internalisation dans les hépatocytes (Popescu et al. 2014). De la même façon, nous pouvons faire l'hypothèse qu'il existe d'autres molécules qui ne sont pas des HBGA et qui permettent l'infection par les norovirus, constituant ainsi une voie alternative à l'attachement des norovirus. Ces facteurs d'attachement pourraient être des glycolipides ou des glycoprotéines. Dans la littérature, les articles traitant des facteurs autres que les HBGA sont très rares pour les norovirus. Des expériences d'attachement de VLP sur des extraits cellulaires de cellule Caco-2 ont toutefois permis la détection d'une protéine de 105 kDa sans qu'on ait pu l'identifier précisément (M. Tamura et al. 2000).

Très récemment, des études ont montré que des facteurs microbiens intervenaient également dans l'infection par les norovirus. Dans une première étude, Ruvoen-Clouet et al. ont observé que les infections à norovirus pouvait toucher une partie des non-sécréteurs (Imbert-Marcille et al. 2014). Dans ces travaux, les tests d'attachement des VLP sur salive ont été négatifs. Les expériences d'immuno-histochimie effectuées à partir de biopsie de non-sécréteurs ont pourtant prouvé que la fixation du norovirus était possible et que de façon surprenante les HBGA étaient exprimés à la surface des cellules intestinales. L'étude

effectuée dans la population portugaise a permis de démontrer que *H. pylori* était présent dans 90% de la population. Les auteurs ont montré que certaines souches de *H. pylori* exprimant le facteur de virulence CagA permettaient l'expression des HBGA chez les non-sécréteurs par la réactivation du gène *FUT1* dans les cellules intestinales. La présence de *H. pylori*, bien qu'improbable, chez de jeunes enfants restent à vérifier mais ce type de mécanisme peut expliquer la reconnaissance des norovirus chez des non-sécréteurs. Une autre étude, celle-ci effectuée *in vitro*, a permis de démontrer le rôle possible d'*E. cloacae*, exprimant l'antigène H à sa surface, dans l'infection par les norovirus (Jones et al. 2014). Les auteurs ont ainsi démontré que la réplication des norovirus peut se produire dans des cellules lymphocytaires grâce à des bactéries en culture ou provenant de selles non-filtrées, mettant ainsi en lumière le rôle probable de la flore bactérienne dans l'infection à norovirus. Le rôle du microbiote dans l'infection a déjà été démontré pour d'autres virus comme le poliovirus (Kuss et al. 2011). Il se peut également que le microbiote joue un rôle dans les infections à norovirus chez les enfants.

# CONCLUSION

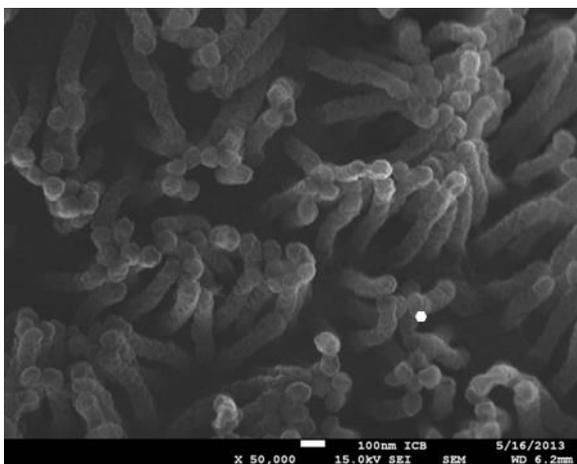
## Conclusion et perspectives

Les norovirus et les rotavirus sont la cause du plus grand nombre de gastro-entérites dans la population. Ils ont en commun l'utilisation des HBGA comme ligands lors de l'attachement à la cellule hôte. Les HBGA sont pour l'instant les seuls facteurs d'attachement que l'on connaisse pour les norovirus. L'utilisation *in vitro* de liposomes ou GUVs (giant unilamellar vesicles) a permis de démontrer que les VLP de norovirus, une fois attachées au glycolipides, provoquaient l'invagination de la membrane lipidique et l'internalisation des particules (Rydell et al. 2013). Cela tendrait à démontrer que les HBGA sont les seuls récepteurs des norovirus et qu'aucun autre ligand n'est nécessaire. Cependant la modélisation des mécanismes d'attachement à la cellule hôte n'est pas nécessairement prédictive. D'autres molécules pourraient également être impliquées comme ligands. Inversement pour les rotavirus, l'adaptation de certaines souches à la culture cellulaire a permis de démontrer l'implication des gangliosides, de la protéine hsc70 et de plusieurs intégrines. Là encore les travaux effectués *in vitro* ne permettent pas d'affirmer leur rôle *in vivo*. La découverte du rôle des HBGA pour les rotavirus a été plus tardive et a suscité un regain d'intérêt dans l'étude des mécanismes d'interaction du virus avec son hôte. Pour les deux virus, la question est de savoir si les modèles cellulaires reflètent effectivement la réalité.

Lors de la découverte du rôle des HBGA, la séparation entre sécréteur et non-sécréteur était bien acceptée et on considérait que les HBGA salivaires reflétaient le statut HBGA à la surface des cellules intestinales. L'exemple des *H. pylori* et du norovirus chez des non-sécréteurs démontrent que les mécanismes mis en jeu pourraient être plus complexes. Nos résultats montrent que les HBGA ne sont pas des ligands exclusifs des rotavirus et des norovirus et que d'autres voies d'attachement doivent probablement exister.

S'il y a plusieurs types de molécules participant à la reconnaissance des rotavirus et des norovirus par les entérocytes, les relations et les mécanismes régissant la prise en charge des virus par les différents ligands sont inconnus. Récemment, Le Pendu et al. soulignait que les motifs HBGA sont généralement au sommet de grandes structures glucidiques pouvant mesurer plus de 100 à 400 nm de long (Le Pendu et al. 2014). Ces glycolipides et glycoprotéines forment ainsi un épais tapis glucidique, le glycocalyx qui recouvre les microvillosités à la surface du pôle apicale. Norovirus ou rotavirus s'accrocheraient donc en premier sur le glycocalyx par le biais des HBGA, une centaine de nanomètres au-dessus de la bicouche lipidique. Or les intégrines ou les gangliosides tels que les GM1 sont des petites

structures. La partie glucidique des GM1 ne fait par exemple que quelques nanomètres de hauteur. Les mécanismes par lequel les particules virales pourraient descendre sur la bicouche lipidique jusqu'à ces molécules restent inconnus. Des techniques de plus en plus utilisées tels que la microscopie atomique de force (HS-AFM) pourrait fournir les premières observations en temps réel des particules virales s'arrimant à la surface des cellules. L'implication des radeaux lipidiques dans l'attachement des rotavirus et du norovirus murin a été démontrée et laisse supposer que ces structures lipidiques sont également impliquées dans l'attachement et l'internalisation des norovirus humains. En revanche l'agencement des radeaux lipidiques sur la cellule et le positionnement des particules n'a fait l'objet d'aucune étude. La microscopie confocale et la microscopie électronique à balayage sont de plus en plus performantes et constituent des outils puissants pour faire ce genre d'observation. Au laboratoire, les observations effectuées en microscopie à balayage de la surface de cellule Caco-2 différenciée donnent une idée de l'échelle des particules virales par rapport aux microvillosités dont la longueur dépasse 500 nm d'après les mesures effectuées en microscopie atomique de force (**Figure 15**), données personnelles fournies par Eric LESNIEWSKA et Ece AYBEKE). Les futurs travaux devront permettre de co-localiser de façon précise les particules et les différents ligands participant à l'attache des rotavirus et des norovirus.



*Figure 15 : Photographie en microscopie électronique en balayage du détail d'une bordure en brosse de cellules Caco-2 différenciées depuis 4 semaines. L'échelle est donnée en bas de la photographie. Le point inséré sur l'image permet de donner à l'échelle la taille d'une particule virale de 45 nm de diamètre (Crédit photo : Frédéric HERBST, Gaël BELLLOT).*

Le séquençage à haut débit a également progressé et a permis de déterminer de façon précise la composition de la flore microbienne intestinale. Celle-ci est différente d'un individu à l'autre. Elle varie également en fonction des pathologies et du comportement alimentaire. Les résultats obtenus pour NoV montrent que certaines bactéries ont un rôle actif dans l'attachement des norovirus (Ruvoën-Clouet et al. 2014) il en est sûrement de même pour les rotavirus. Il est également envisageable qu'une maladie cœliaque ou un cancer de l'intestin

pourrait modifier d'une part la flore intestinale mais également l'expression des HBGA (les mécanismes de glycosylations sont très perturbés lors de la tumorigénèse) et par conséquent la sensibilité au rotavirus et au norovirus.

Enfin d'un point de vue épidémiologique, les futures études devront prendre en compte les HBGA et les génotypes sécréteurs et non-sécréteurs. Les tests salivaires de phénotypage des HBGA donneront une première indication sur la susceptibilité des malades. Selon le génotype de norovirus ou de rotavirus, elle permettra de déterminer si éventuellement une partie de la population est plus à risque et doit être vaccinée comme par exemple les individus sécréteurs. Il faudra cependant prendre en compte nos résultats et d'autres qui suggèrent l'existence de voie alternative d'entrée des virus dans la cellule lors de l'infection non seulement pour les rotavirus mais aussi pour les norovirus.

## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

## Références bibliographiques

### A

---

- Adler J. L., Zickl R. 1969. "Table 2. Food-Specific Attack Rates." *J Infect Dis* 119: 668–73.
- Afrikanova, I., M. C. Miozzo, S. Giambiagi, and O. Burrone. 1996. "Phosphorylation Generates Different Forms of Rotavirus NSP5." *Journal of General Virology* 77(9): 2059–65.
- Agus S. G., Dolin R., Wyatt R. G., Tousimis A. J., Northrup R. S. 1973. "Acute Infectious Nonbacterial Gastroenteritis: Intestinal Histopathology. Histologic and Enzymatic Alterations during Illness Produced by the Norwalk Agent in Man." *Ann Intern Med* 79: 18–25.
- Ahmed T, Lundgren A, Arifuzzaman M, Qadri F, Teneberg S, Svennerholm AM.. 2009. "Children with the Le(a+b-) Blood Group Have Increased Susceptibility to Diarrhea Caused by Enterotoxigenic Escherichia Coli Expressing Colonization Factor I Group Fimbriae." *Infection and Immunity* 77(5): 2059–64.
- Akelma AZ, Kutukoglu I, Koksall T, Cizmeci MN, Kanburoglu MK, Catal F, Namuslu M Mete E, Bozkaya D. 2013. "Serum Transaminase Elevation in Children with Rotavirus Gastroenteritis: Seven Years' Experience." *Scand J Infect Dis* 45: 362–67.
- Aladin F et al. 2012. "In Vitro Neutralisation of Rotavirus Infection by Two Broadly Specific Recombinant Monovalent Llama-Derived Antibody Fragments." *PloS one* 7(3): e32949.
- Aliabadi N, Jacqueline, Amber KH, Umesh DP. 2015. "Sustained Decrease in Laboratory Detection of Rotavirus after Implementation of Routine Vaccination — United States , 2000 – 2014." *Morbidity and Mortality Weekly Report* 64(13): 337–42.
- Amar CF, East CL, Gray J, Ituririza-Gomara M, Maclure EA, Mclauchlin J. 2007. "Detection by PCR of Eight Groups of Enteric Pathogens in 4,627 Faecal Samples: Re-Examination of the English Case-Control Infectious Intestinal Disease Study (1993-1996)." *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 26: 311–23.
- Ambert-Balay, Katia, Pierre Pothier. 2013. "Evaluation of 4 Immunochromatographic Tests for Rapid Detection of Norovirus in Faecal Samples." *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology* 56(3): 194–98.
- Ando, T. et al. 1995. "Detection and Differentiation of Antigenically Distinct Small Round- Structured Viruses (Norwalk-like Viruses) by Reverse Transcription-PCR and Southern Hybridization." *Journal of Clinical Microbiology* 33(1): 64–71.
- Arcilla MB, Sturgeon P. 1973. "Perinatal Expression of the Lewis and Secretor Blood Group Systems." *Biol Neonate*. 22(5): 407–20.
- Arvelo, W et al. 2012. "Norovirus Outbreak of Probable Waterborne Transmission with High Attack Rate in a Guatemalan Resort." *Journal of Clinical Virology* 55(1): 8–11.
- Asanaka, Miyuki et al. 2005. "Replication and Packaging of Norwalk Virus RNA in Cultured Mammalian Cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(29): 10327–32.

- van Asten, L et al. 2011. "Unspecified Gastroenteritis Illness and Deaths in the Elderly Associated with Norovirus Epidemics." *Epidemiology (Cambridge, Mass.)* 22(3): 336–43.
- Atmar RL, Bernstein DI, Lyon GM, Treanor JJ, Al-Ibrahim MS, Graham DY, Vinjé J, Jiang X, Gregoricus N, Frenck RW, Moe CL, Chen WH, Ferreira J, Barrett J, Opekun AR, Estes MK, Borkowski A, Baehner F, Goodwin R, Edmonds A, Mendelman PM. 2015. "Serological Correlates of Protection against a GII.4 Norovirus." *Clin Vaccine Immunol* 22(8): 923–29.
- Atmar, RL, and Mary K Estes. 2006. "The Epidemiologic and Clinical Importance of Norovirus Infection." *Gastroenterology clinics of North America* 35(2): 275–90, viii.
- Atmar, RL. et al. 2008. "Norwalk Virus Shedding after Experimental Human Infection." *Emerging Infectious Diseases* 14(10): 1553–57.
- Atmar RL, Bernstein DI, Harro CD, Al-Ibrahim MS, Chen WH, Ferreira J, Estes MK, Graham DY, Opekun AR, Richardson C, Mendelman PM.. 2011. "Norovirus Vaccine against Experimental Human Norwalk Virus Illness." *New England Journal of Medicine* 365(23): 2178–87.
- Ayukekbong JA et al. 2014. "Pattern of Circulation of Norovirus GII Strains during Natural Infection." *Journal of clinical microbiology* 52(12): 4253–59.

## B

---

- Baert L et al. 2008. "Survival and Transfer of Murine Norovirus 1, a Surrogate for Human Noroviruses, during the Production Process of Deep-Frozen Onions and Spinach." *Journal of food protection* 71(8): 1590–97.
- 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." *Journal of virology* 82(15): 7725–28.
- Ball, J M et al. 1996. "Age-Dependent Diarrhea Induced by a Rotaviral Nonstructural Glycoprotein." *Science (New York, N.Y.)* 272(5258): 101–4.
- Baric, R S et al. 2002. "Expression and Self-Assembly of Norwalk Virus Capsid Protein from Venezuelan Equine Encephalitis Virus Replicons." *J Virol* 76(6): 3023–30.
- Di Bartolo, Ilaria et al. 2011. "Molecular Characterization of Noroviruses and Rotaviruses Involved in a Large Outbreak of Gastroenteritis in Northern Italy." *Applied and Environmental Microbiology* 77(15): 5545–48.
- van Beek, J. et al. 2013. "Indications for Worldwide Increased Norovirus Activity Associated with Emergence of a New Variant of Genotype II.4, Late 2012." *Euro surveillance : bulletin européen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin* 18: 8–9.
- Beisner, B, D Kool, A Marich, and I H Holmes. 1998. "Characterisation of G Serotype Dependent Non-Antibody Inhibitors of Rotavirus in Normal Mouse Serum." *Arch.Virol.* 143(7): 1277–94.
- Ben Hadj Fredj M et al. 2013. "Sequence and Phylogenetic Analyses of Human Rotavirus Strains: Comparison of VP7 and VP8\* Antigenic Epitopes between Tunisian and Vaccine Strains before National Rotavirus Vaccine Introduction." *Infection, Genetics and Evolution* 18: 132–44.

- Belliot, G, B a Lopman, K Ambert-Balay, and P Pothier. 2014. "The Burden of Norovirus Gastroenteritis: An Important Foodborne and Healthcare-Related Infection." *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 20(8): 724–30.
- Belliot, G. et al. 2001. "Characterization of Capsid Genes, Expressed in the Baculovirus System, of Three New Genetically Distinct Strains of 'Norwalk-like Viruses.'" *Journal of Clinical Microbiology* 39(12): 4288–95.
- Belliot, Gaël et al. 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." *Journal of virology* 77(20): 10957–74.
- Belliot G, Lavaux A, Souihel D, Agnello D, Pothier P. 2008. "Use of Murine Norovirus as a Surrogate to Evaluate Resistance of Human Norovirus to Disinfectants." *Applied and Environmental Microbiology* 74(10): 3315–18.
- Belliot, GKamel, a. H.Estienney, M.Ambert-Balay, K.Pothier, P.. 2010. "Evidence of Emergence of New GGII.4 Norovirus Variants from Gastroenteritis Outbreak Survey in France during the 2007-to-2008 and 2008-to-2009 Winter Seasons." *Journal of Clinical Microbiology* 48(3): 994–98.
- Bernstein, David I et al. 2015. "Norovirus Vaccine against Experimental Human GII.4 Virus Illness: A Challenge Study in Healthy Adults." *The Journal of infectious diseases* 211(6): 870–78. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25210140>.
- Berois, Mabel et al. 2003. "Rotavirus Nonstructural Protein NSP5 Interacts with Major Core Protein VP2." *Journal of virology* 77(3): 1757–63.
- Bertolotti-Ciarlet, Andrea et al. 2002. "Structural Requirements for the Assembly of Norwalk Virus-like Particles." *Journal of Virology* 76(8): 4044–55.
- Bertolotti-Ciarlet, Andrea, Sue E Crawford, Anne M Hutson, and Mary K Estes. 2003. "The 3' End of Norwalk Virus mRNA Contains Determinants That Regulate the Expression and Stability of the Viral Capsid Protein VP1: A Novel Function for the VP2 Protein." *Journal of virology* 77(21): 11603–15.
- Blackhall, J, a Fuentes, K Hansen, and G Magnusson. 1997. "Serine Protein Kinase Activity Associated with Rotavirus Phosphoprotein NSP5." *Journal of virology* 71(1): 138–44.
- Blutt, S E et al. 2012. "IgA Is Important for Clearance and Critical for Protection from Rotavirus Infection." *Mucosal immunology* 5(6): 712–19.
- Blutt, Sarah E et al. 2007. "Rotavirus Antigenemia in Children Is Associated with Viremia." *PLoS medicine* 4(4): e121.
- Blutt, Sarah E. et al. 2003. "Rotavirus Antigenaemia and Viraemia: A Common Event?" *Lancet* 362(9394): 1445–49.
- Blutt SE, Conner ME. 2007. "Rotavirus: To the Gut and Beyond!" *Curr Opin Gastroenterol* 23: 39–43.
- Bok K, Green KY. 2012. "Norovirus Gastroenteritis in Immunocompromised Patients." *N Engl J Med*

367: 2126–32.

- Bon, F. et al. 2005. “Molecular Epidemiology of Caliciviruses Detected in Sporadic and Outbreak Cases of Gastroenteritis in France from December 1998 to February 2004.” *Journal of Clinical Microbiology* 43(9): 4659–64.
- Bouwknegt, Martijn et al. 2015. “Quantitative Farm-to-Fork Risk Assessment Model for Norovirus and Hepatitis A Virus in European Leafy Green Vegetable and Berry Fruit Supply Chains.” *International Journal of Food Microbiology* 198: 50–58.
- Breitenmoser, A. et al. 2011. “Outbreak of Acute Gastroenteritis due to a Washwater-Contaminated Water Supply, Switzerland, 2008.” *Journal of water and health* 9(3): 569–76.
- Bresee, Joseph S, Marc-Alain Widdowson, Stephan S Monroe, and Roger I Glass. 2002. “Foodborne Viral Gastroenteritis: Challenges and Opportunities.” *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 35(6): 748–53.
- Brown D., Gray J., MacDonald P., Green A., Morgan D., Christopher G., Glass R., Turcois R. 2002. “Outbreak of Acute Gastroenteritis Associated with Norwalk-like Viruses among British Military Personnel--Afghanistan, May 2002.” *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 51: 477–79.
- de Bruin, Erwin, Erwin Duizer, Harry Vennema, and Marion P G Koopmans. 2006. “Diagnosis of Norovirus Outbreaks by Commercial ELISA or RT-PCR.” *Journal of Virological Methods* 137(2): 259–64.
- Bryce J, Boschi-Pinto C, Shibuya K, Black RE; WHO Child Health Epidemiology Reference Group.. 2005. “WHO Estimates of the Causes of Death in Children.” *Lancet* 365(9465): 1147–52..
- Bu, W et al. 2008. “Structural Basis for the Receptor Binding Specificity of Norwalk Virus.” *Journal of virology* 82(11): 5340–47.
- Bucardo, Filemon et al. 2010. “Asymptomatic Norovirus Infections in Nicaraguan Children and Its Association with Viral Properties and Histo-Blood Group Antigens.” *The Pediatric infectious disease journal* 29(10): 934–39.
- Bugaric A, Taylor JA. 2006. “Rotavirus Nonstructural Glycoprotein NSP4 Is Secreted from the Apical Surfaces of Polarized Epithelial Cells.” *Journal of virology* 80(24): 12343–49.
- Bull RA et al. 2006. “Emergence of a New Norovirus Genotype II.4 Variant Associated with Global Outbreaks of Gastroenteritis.” *Journal of clinical microbiology* 44(2): 327–33.
- Bull RA et al. 2011. “Comparison of the Replication Properties of Murine and Human Calicivirus RNA-Dependent RNA Polymerases.” *Virus genes* 42(1): 16–27.
- Bull RA, John SE, Rawlinson WD, and White PA. 2010. “Rapid Evolution of Pandemic Noroviruses of the GII.4 Lineage.” *PLoS Pathogens* 6(3): 1–10.
- Burns JW, Siadat-Pajouh M, Krishnaney AA, Greenberg HB. 1996. “Protective Effect of Rotavirus VP6-Specific IgA Monoclonal Antibodies That Lack Neutralizing Activity.” *Science (New York, N.Y.)* 272(1984): 104–7.

# C

---

- Cannon, Jennifer L et al. 2009. "Herd Immunity to GII.4 Noroviruses Is Supported by Outbreak Patient Sera." *Journal of virology* 83(11): 5363–74.
- Cao S et al. 2007. "Structural Basis for the Recognition of Blood Group Trisaccharides by Norovirus." *Journal of virology* 81(11): 5949–57.
- Carlsson B, Kindberg E, Buesa J, Rydell GE, Lidón MF, Montava R, Abu Mallouh R, Grahn A, Rodríguez-Díaz J, Bellido J, Arnedo A, Larson G, Svensson L. 2009. "The G428A Nonsense Mutation in FUT2 Provides Strong but Not Absolute Protection against Symptomatic GII.4 Norovirus Infection." *PLoS One* 4(5): e5593.
- Carlsson, B et al. 2009. "Quasispecies Dynamics and Molecular Evolution of Human Norovirus Capsid P Region during Chronic Infection." *Journal of General Virology* 90(2): 432–41.
- Van CD et al. 2012. "Burden of Acute Gastroenteritis and Healthcare-Seeking Behaviour in France: A Population-Based Study." *Epidemiology and infection* 140(4): 697–705.
- Centers for Disease Control and Prevention. 1999. 48 MMWR. Morbidity and mortality weekly report *Intussusception among Recipients of Rotavirus Vaccine--United States, 1998-1999*.
- Chagla, Zain et al. 2013. "Chronic Norovirus Infection in a Transplant Patient Successfully Treated with Enterally Administered Immune Globulin." *Journal of clinical virology: the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology* 58(1): 306–8. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23850414>.
- Chang, Kyeong-Ok et al. 2006. "Stable Expression of a Norwalk Virus RNA Replicon in a Human Hepatoma Cell Line." *Virology* 353(2): 463–73.
- Chang KO, George DW, Patton JB, Green KY, Sosnovtsev SV.. 2008. "Leader of the Capsid Protein in Feline Calicivirus Promotes Replication of Norwalk Virus in Cell Culture." *Journal of virology* 82(19): 9306–17.
- Chang, KO.. 2009. "Role of Cholesterol Pathways in Norovirus Replication." *Journal of virology* 83(17): 8587–95.
- Chang, Kyeong-Ok, and David W George. 2007. "Interferons and Ribavirin Effectively Inhibit Norwalk Virus Replication in Replicon-Bearing Cells." *Journal of virology* 81(22): 12111–18.
- Chapman, A S et al. 2011. "Norovirus Outbreak Associated with Person-to-Person Transmission, U.S. Air Force Academy, July 2011." *MSMR* 18(11): 2–5.
- Chen, RT and B Hibbs. 1998. "Vaccine Safety: Current and Future Challenges." *Pediatric annals* 27(7): 445–55.
- Chen, SY and Cheng-Hsun Chiu. 2012. "Worldwide Molecular Epidemiology of Norovirus Infection." *Paediatrics and international child health* 32(3): 128–31. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22824658>.
- Chen, Y et al. 2011. "Crystallography of a Lewis-Binding Norovirus, Elucidation of Strain-Specificity to the Polymorphic Human Histo-Blood Group Antigens." *PLoS pathogens* 7(7): e1002152.

- Chen, Z et al. 2013. "Development of Norwalk Virus-Specific Monoclonal Antibodies with Therapeutic Potential for the Treatment of Norwalk Virus Gastroenteritis." *Journal of virology* 87(17): 9547–57.
- Chiappini E et al. 2005. "Viraemia Is a Common Finding in Immunocompetent Children with Rotavirus Infection." *Journal of medical virology* 76(2): 265–67.
- Choi, Jae-Mun, Anne M Hutson, Mary K Estes, and B V Venkataram Prasad. 2008. "Atomic Resolution Structural Characterization of Recognition of Histo-Blood Group Antigens by Norwalk Virus." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(27): 9175–80.
- Ciarlet M, Mary K. Estes. 1999. "Human and Most Animal Rotavirus Strains Do Not Require the Presence of Sialic Acid on the Cell Surface for Efficient Infectivity." *Journal of General Virology* 80(4): 943–48.
- Cilla, G et al. 2010. "Rotavirus Genotypes in Children in the Basque Country (northern Spain) over a 13-Year Period (July 1996-June 2009)." *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology* 29(8): 955–60.
- Clarke, Ian N., and Paul R. Lambden. 1997. "The Molecular Biology of Caliciviruses." *Journal of General Virology* 78(1997): 291–301.
- Clarke IN, Estes MK et al. 2012. "Caliciviridae." In *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, ed. Lefkowitz EJ, King AMQ, Adams MJ, Carstens EB. San Diego: Elsevier, 977–86.
- Colas de la Noue A et al. 2014. "Absolute Humidity Influences the Seasonal Persistence and Infectivity of Human Norovirus." *Applied and environmental microbiology* 80(23): 7196–7205.
- Corthésy B et al. 2006. "Rotavirus Anti-VP6 Secretory Immunoglobulin A Contributes to Protection via Intracellular Neutralization but Not via Immune Exclusion." *Journal of virology* 80(21): 10692–99.
- Costantini VP. et al. 2012. "Antiviral Activity of Nucleoside Analogues against Norovirus." *Antiviral Therapy* 17: 981–91.
- Coudray-Meunier C, Fraisse A1, Martin-Latil S, Guillier L, Delannoy S, Fach P, Perelle S. 2015. "A Comparative Study of Digital RT-PCR and RT-qPCR for Quantification of Hepatitis A Virus and Norovirus in Lettuce and Water Samples." *Int J Food Microbiol* 201: 17–26.
- Coulson, B S et al. 1992. "Role of Coproantibody in Clinical Protection of Children during Reinfection with Rotavirus." *Journal of clinical microbiology* 30(7): 1678–84.
- Coulson, BS, Londrigan SL, Lee DJ. 1997. "Rotavirus Contains Integrin Ligand Sequences and a Disintegrin-like Domain That Are Implicated in Virus Entry into Cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94(10): 5389–94.
- Cromeans, Theresa et al. 2014. "Comprehensive Comparison of Cultivable Norovirus Surrogates in Response to Different Inactivation and Disinfection Treatments." *Applied and environmental microbiology* 80(July): 5743–51. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25015883>.
- Cuadras MA, Greenberg HB. 2003. "Rotavirus Infectious Particles Use Lipid Rafts during Replication

for Transport to the Cell Surface in Vitro and in Vivo.” *Virology* 313: 308–21.

Currier RL. et al. 2015. “Innate Susceptibility to Norovirus Infections Influenced by FUT2 Genotype in a United States Pediatric Population.” *Clinical Infectious Diseases* 2: 1–8.

## D

---

Dai, YC et al. 2013. “A Dual Chicken IgY against Rotavirus and Norovirus.” *Antiviral research* 97(3): 293–300.

Daniels, NA et al. 2000. “A Foodborne Outbreak of Gastroenteritis Associated with Norwalk-like Viruses: First Molecular Traceback to Deli Sandwiches Contaminated during Preparation.” *The Journal of infectious diseases* 181(4): 1467–70.

Davidson, G P, G L Barnes. 1979. “Structural and Functional Abnormalities of the Small Intestine in Infants and Young Children with Rotavirus Enteritis.” *Acta paediatrica Scandinavica* 68(2): 181–86.

Debbink K et al. 2013. “Emergence of New Pandemic GII.4 Sydney Norovirus Strain Correlates with Escape from Herd Immunity.” *The Journal of infectious diseases* 208(11): 1877–87.

Debbink K, Lindesmith LC, Donaldson EF Baric RS. 2012. “Norovirus Immunity and the Great Escape.” *PLoS pathogens* 8(10): e1002921.

Debbink K, Lindesmith LC, Baric RS. 2014. “The State of Norovirus Vaccines.” *Clinical Infectious Diseases* 58(12): 1746–52.

Desai R et al. 2012. “Severe Outcomes Are Associated with Genogroup 2 Genotype 4 Norovirus Outbreaks: A Systematic Literature Review.” *Clinical Infectious Diseases* 55(2): 189–93.

Desselberger U 2014. “Rotaviruses.” *Virus research* 190: 75–96.

Desselberger U, Huppertz HI. 2011. “Immune Responses to Rotavirus Infection and Vaccination and Associated Correlates of Protection. The Journal of Infectious Diseases.” *The Journal of infectious diseases* 203(188-195).

De Wit, MAS et al. 2001. “Gastroenteritis in Sentinel General Practices, the Netherlands.” *Emerging Infectious Diseases* 7(1): 82–91.

De Wit, MA S et al. 2001. “Sensor, a Population-Based Cohort Study on Gastroenteritis in the Netherlands: Incidence and Etiology.” *American Journal of Epidemiology* 154(7): 666–74.

Dingle, KE, Paul R Lambden, Owen E Caul, and Ian 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.” *Journal of General Virology* 76: 2349–55.

Dingle, K E Lambden PR, Caul EO, Clarke IN. 1995. “Human Enteric Caliciviridae: The Complete Genome Sequence and Expression of Virus-like Particles from a Genetic Group II Small Round Structured Virus.” *Journal of General Virology* 76: 2349–55.

Dolin, R et al. 1982. “Detection by Immune Electron Microscopy of the Snow Mountain Agent of Acute Viral Gastroenteritis.” *The Journal of infectious diseases* 146(2): 184–89.

- Dolin R, Blacklow NR, DuPont H, Buscho RF, Wyatt RG, Kasel JA, Hornick R, Chanock RM. 1972. "Biological Properties of Norwalk Agent of Acute Infectious Nonbacterial Gastroenteritis." *Proc Soc Exp Biol Med* 140(2): 578–83.
- Dolin R, Blacklow NR, Dupont H, Format S, Buscho RF, Kasel JA, Chames RP, Hornick R, ChanoCk RM. 1971. "Transmission of Acute Infectious Nonbacterial to Volunteers by Oral Administration of Stool Filtrates." *J Infect Dis* 123(307-312).
- Donaldson, EF, Lindesmith LC, Anna D Lobue, Ralph S Baric. 2010. "Viral Shape-Shifting: Norovirus Evasion of the Human Immune System." *Nature reviews. Microbiology* 8(3): 231–41.
- Donaldson, Eric F., Lisa C. Lindesmith, Anna D. Lobue, and Ralph S. Baric. 2008. "Norovirus Pathogenesis: Mechanisms of Persistence and Immune Evasion in Human Populations." *Immunological Reviews* 225(1): 190–211.
- Dou, Dengfeng et al. 2012. "Potent Norovirus Inhibitors Based on the Acyclic Sulfamide Scaffold." *Bioorganic & medicinal chemistry* 20(6): 2111–18.

## E

---

- EdeN JS et al. 2013. "Recombination within the Pandemic Norovirus GII.4 Lineage." *Journal of virology* 87(11): 6270–82.
- Eden JS, Kun LL, Peter AW. 2012. "Complete Genome of the Human Norovirus GIV.1 Strain Lake Macquarie Virus." *Journal of virology* 86(18): 10251–52.
- Elliott, EJ. 2007. "Acute Gastroenteritis in Children." *BMJ* 334(7583): 35–40. <http://www.bmj.com/content/334/7583/35.pdf+html> \n <http://www.bmj.com/content/334/7583/35> \n <http://w>
- El-Senousy WM, M. Costafreda I, PintóRM, Bosch A. 2013. "Method Validation for Norovirus Detection in Naturally Contaminated Irrigation Water and Fresh Produce." *International Journal of Food Microbiology* 167(1): 74–79.
- Estes, MK, Prasad BV, Atmar RL. 2006. "Noroviruses Everywhere: Has Something Changed?" *Current opinion in infectious diseases* 19(5): 467–74.
- Estes MK, Greenberg HB. 2013. "Rotaviruses." In *Fields in Virology*, , 1347–1401.
- Evans, MR et al. 2002. "An Outbreak of Viral Gastroenteritis Following Environmental Contamination at a Concert Hall." *Epidemiology and infection* 129(2): 355–60.

## F

---

- Fankhauser, R L et al. 1998. "Molecular Epidemiology of 'Norwalk-like Viruses' in Outbreaks of Gastroenteritis in the United States." *J. Infect. Dis.* 178(6): 1571–78.
- Feeney S A et al. 2011. "Development and Clinical Validation of Multiplex TaqMan® Assays for Rapid Diagnosis of Viral Gastroenteritis." *Journal of medical virology* 83(9): 1650–56.
- Ferreira, M et al. 2012. "Assessment of Gastroenteric Viruses Frequency in a Children's Day Care

- Center in Rio De Janeiro, Brazil: A Fifteen Year Study (1994-2008).” *PLoS ONE* 7(3): e33754.
- Fiore, L, Greenberg HB, Mackow ER. 1991. “The VP8 Fragment of VP4 Is the Rhesus Rotavirus Hemagglutinin.” *Virology* 181(2): 553–63.
- Fischer T K et al. 2005. “Rotavirus Antigenemia in Patients with Acute Gastroenteritis.” *Journal of Infectious Diseases* 192(5): 913–19.
- Fischer TK, Bresee JS, Glass RI. 2004. “Rotavirus Vaccines and the Prevention of Hospital-Acquired Diarrhea in Children.” *Vaccine* 22 Suppl 1: S49–54.
- Fleming, FE.,Graham KL, Takada Y, Coulson BS. 2011. “Determinants of the Specificity of Rotavirus Interactions with the  $\alpha 2\beta 1$  Integrin.” *Journal of Biological Chemistry* 286(8): 6165–74.
- Florescu DF. et al. 2011. “Is There a Role for Oral Human Immunoglobulin in the Treatment for Norovirus Enteritis in Immunocompromised Patients?” *Pediatric Transplantation* 15(7): 718–21.
- Franco MA, Angel J, Greenberg HB. 2006. “Immunity and Correlates of Protection for Rotavirus Vaccines.” *Vaccine* 24: 2718–31.
- Franco MA., Lefevre P, Willems P, Tosser G, Lintermanns P, Cohen J. 1994. “Identification of Cytotoxic T Cell Epitopes on the VP3 and VP6 Rotavirus Proteins.” *The Journal of general virology* 75(Pt 3): 589–96.
- Fritzell B. 2001. “Detection of Adverse Events: What Are the Current Sensitivity Limits during Clinical Development? Vaccine.” *Vaccine* 20 suppl(1): S47–48.
- Fu J et al. 2015. “Emergence of a New GII . 17 Norovirus Variant in Patients with Acute Gastroenteritis in Jiangsu , China , September 2014 to March 2015.” (September 2014): 1–7.
- Fu JG et al. 2014. “Emergence of Two Novel Norovirus Genotype II.4 Variants Associated with Viral Gastroenteritis in China.” *Journal of medical virology* 86(7): 1226–34.

## G

---

- Gallimore C I., Lewis D., Taylor C., Cant A., Gennery A., Gray J. J. 2004. “Chronic Excretion of a Norovirus in a Child with Cartilage Hair Hypoplasia (CHH).” *J Clin Virol* 30: 196–204.
- Gallimore CI., Cubitt D, Du Plessis N, Gray JJ. 2004. “Asymptomatic and Symptomatic Excretion of Noroviruses during a Hospital Outbreak of Gastroenteritis.” *Journal of Clinical Microbiology* 42(5): 2271–74.
- Gary GW.,Kaplan JE, Stine SE , Anderson LJ. 1985. “Detection of Norwalk Virus Antibodies and Antigen with a Biotin-Avidin Immunoassay.” *Journal of Clinical Microbiology* 22(2): 274–78.
- Gastañaduy PA et al. 2013. “Burden of Norovirus Gastroenteritis in the Ambulatory Setting - Gentsch JR1, Glass RI, Woods P, Gouvea V, Gorziglia M, Flores J, Das BK, Bhan MK United States, 2001-2009.” *Journal of Infectious Diseases* 207(7): 1058–65.
- Gentsch JR, Glass RI, Woods P, Gouvea V, Gorziglia M, Flores J, Das BK, Bhan MK. 1992. «Identification of group A rotavirus gene 4 types by polymerase chain reaction”. *J Clin Microbiol* 30(6):1365-73.

- Giammarioli, AM et al. 1996. "Production and Characterization of Murine IgA Monoclonal Antibodies to the Surface Antigens of Rhesus Rotavirus." *Virology* 225(1): 97–110.
- Girard, M, Ngazoa S, Mattison K, Jean J. 2010. "Attachment of Noroviruses to Stainless Steel and Their Inactivation, Using Household Disinfectants." *Journal of food protection* 73(2): 400–404.
- Glass, P J et al. 2000. "Norwalk Virus Open Reading Frame 3 Encodes a Minor Structural Protein." *Journal of virology* 74(14): 6581–91.
- Glass RI, Parashar UD, Estes MK. 2009. "Norovirus Gastroenteritis." *N. Engl. J. Med* 361: 1776–85.
- Goller, J. L. et al. 2004. "Long-Term Features of Norovirus Gastroenteritis in the Elderly." *Journal of Hospital Infection* 58(4): 286–91.
- Gómará, MI, Cubitt D, Desselberger U, Gray J. 2001. "Amino Acid Substitution within the VP7 Protein of G2 Rotavirus Strains Associated with Failure to Serotype." *Journal of clinical microbiology* 39(10): 3796–98.
- Gonzalez SA, Burrone OR. 1991. "Rotavirus NS26 Is Modified by Addition of Single O-Linked Residues of N-Acetylglucosamine." *Virology* 182: 8–16.
- Gouvea, V et al. 1990. "Polymerase Chain Reaction Amplification and Typing of Rotavirus Nucleic Acid from Stool Specimens." *J Clin Microbiol* 28(2): 276–82.
- de Graaf M, van Beek JVH, Podkolzin AT, Hewitt J, Bucardo F, Templeton K, Mans J, Nordgren J, Reuter G, Lynch M, Rasmussen LD, Iritani N, Chan MC, Martella V, Ambert-Balay K, Vinjé J, White PA, Koopmans MP. 2015. "Emergence of a Novel GII.17 Norovirus – End of the GII.4 Era?" *Euro Surveill* 20(26): pii: 21178.
- Graham DY et al. 1994. "Norwalk Virus Infection of Volunteers: New Insights Based on Improved Assays." *The Journal of infectious diseases* 170(1): 34–43. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8014518>.
- Graham KL et al. 2003. "Integrin-Using Rotaviruses Bind alpha2beta1 Integrin alpha2 I Domain via VP4 DGE Sequence and Recognize alphaXbeta2 and alphaVbeta3 by Using VP7 during Cell Entry." *Journal of virology* 77(18): 9969–78.
- Gray J J. et al. 2007. "European Multicenter Evaluation of Commercial Enzyme Immunoassays for Detecting Norovirus Antigen in Fecal Samples." *Clinical and Vaccine Immunology* 14(10): 1349–55.
- Green KY. 2007. "Caliciviridae: The Noroviruses." In *Fields' Virology*, ed. Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia., 949–949 – 979.
- Green, K Y. 1997. "The Role of Human Caliciviruses in Epidemic Gastroenteritis." *Arch Virol Suppl* 13: 153–65.
- Green K Y , Mory, AF, ogg M H, Weisberg A, Belliot G, Wagner M, Mitra T, Ehrenfeld E, Cameron C E, Sosnovtsev S V. 2002. "Isolation of Enzymatically Active Replication Complexes from Feline Calicivirus-Infected Cells." *J.Virol.* 76(17): 8582–95.
- Green, KY et al. 2002. "A Predominant Role for Norwalk-like Viruses as Agents of Epidemic Gastroenteritis in Maryland Nursing Homes for the Elderly." *The Journal of infectious diseases* 185(2): 133–46.

- Greenberg, H B et al. 1981. "Proteins of Norwalk Virus." *Journal of virology* 37(3): 994–99.
- Greenberg, Harry B., and Mary K. Estes. 2009. "Rotaviruses: From Pathogenesis to Vaccination." *Gastroenterology* 136(6): 1939–51.
- Greenberg HB, Wyatt RG, Valdesuso J, Kalica AR, London WT, Chanock RM, Kapikian AZ. 1978. "Solid-Phase Microtiter Radioimmunoassay for Detection of the Norwalk Strain of Acute Nonbacterial, Epidemic Gastroenteritis Virus and Its Antibodies." *J Med Virol* 2: 97–108.
- Greene, SR et al. 2003. "Evaluation of the NucliSens® Basic Kit Assay for Detection of Norwalk Virus RNA in Stool Specimens." *Journal of Virological Methods* 108(1): 123–31.
- Greening GE, Hewitt J, Rivera-Aban M, Croucher D. 2012. "Molecular Epidemiology of Norovirus Gastroenteritis Outbreaks in New Zealand from 2002-2009." *Journal of medical virology* 84(9): 1449–58.
- Greig JD1, Lee MB. 2009. "Enteric Outbreaks in Long-Term Care Facilities and Recommendations for Prevention: A Review." *Epidemiol Infect.* 137(2): 145–55.
- Grohmann, GS, Greenberg HB, Welch BM, AM Murphy. 1980. "Oyster-Associated Gastroenteritis in Australia: The Detection of Norwalk Virus and Its Antibody by Immune Electron Microscopy and Radioimmunoassay." *J Med Virol* 6(1): 11–19.
- Guerrero C et al. 2000. "Integrin alpha(v)beta(3) Mediates Rotavirus Cell Entry." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(26): 14644–49.
- Guerrero CA et al. 2002. "Heat Shock Cognate Protein 70 Is Involved in Rotavirus Cell Entry." *Journal of virology* 76(8): 4096–4102.
- Guix S et al. 2007. "Norwalk Virus RNA Is Infectious in Mammalian Cells." *Journal of virology* 81(22): 12238–48.
- Gutiérrez M et al. 2010. "Different Rotavirus Strains Enter MA104 Cells through Different Endocytic Pathways: The Role of Clathrin-Mediated Endocytosis." *Journal of virology* 84(18): 9161–69.

## H

---

- Hagbom M et al. 2011. "Rotavirus Stimulates Release of Serotonin (5-HT) from Human Enterochromaffin Cells and Activates Brain Structures Involved in Nausea and Vomiting." *PLoS Pathogens* 7(7): 1–10.
- Hagbom M, Sharma S, Lundgren O, Svensson L. 2012. "Towards a Human Rotavirus Disease Model." *Current Opinion in Virology* 2(4): 408–18.
- Hale AD et al. 1999. "Expression and Self-Assembly of Grimsby Virus: Antigenic Distinction from Norwalk and Mexico Viruses." *Clinical and diagnostic laboratory immunology* 6(1): 142–45.
- Hall AJ, Curns AT, McDonald LC, Parashar UD, Lopman BA, Lopman BA. 2012. "The Role of Clostridium Difficile and Norovirus among Gastroenteritis-Associated Deaths in the United States, 1999-2007." *Clin Infect Dis* 55: 216–23.
- Hall AJ et al. 2013. "Acute Gastroenteritis Surveillance through the National Outbreak Reporting System, United States." *Emerging infectious diseases* 19(8): 1305–9.

- Hall G et al. 2005. "Estimating Foodborne Gastroenteritis, Australia." *Emerging Infectious Diseases* 11(8): 1257–64.
- Han TH et al. 2014. "Detection of Norovirus Genogroup IV, Klassevirus, and Pepper Mild Mottle Virus in Sewage Samples in South Korea." *Archives of Virology* 159(3): 457–63.
- Hansman GS 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." *Journal of virology* 85(13): 6687–6701.
- Hardy, ME, White LJ, Ball, J M, Estes MK. 1995. "Specific Proteolytic Cleavage of Recombinant Norwalk Virus Capsid Protein." *Journal of virology* 69(3): 1693–98.
- Hardy ME. 2005. "Norovirus Protein Structure and Function." *FEMS Microbiology Letters* 253: 1–8.
- Harris JP et al. 2008. "Deaths from Norovirus among the Elderly, England and Wales." *Emerging Infectious Diseases* 14(10): 1546–52.
- Haselhorst T et al. 2009. "Sialic Acid Dependence in Rotavirus Host Cell Invasion." *Nature chemical biology* 5(2): 91–93.
- Hasing ME. 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." *Journal of clinical microbiology* 51(7): 2204–11.
- Hassine-Zaafraane M et al. 2013. "Prevalence and Genetic Diversity of Norovirus Infection in Tunisian Children (2007-2010)." *J Med Virol* 85(6): 1100–1110.
- Henry S et al. 1996. "Molecular Basis for Erythrocyte Le(a+b+) and Salivary ABH Partial-Secretor Phenotypes: Expression of a FUT2 Secretor Allele with an A→T Mutation at Nucleotide 385 Correlates with reduced  $\alpha(1,2)$  Fucosyltransferase Activity." *Glycoconjugate Journal* 13(6): 985–93.
- Herod MR et al. 2014. "Expression of the Murine Norovirus (MNV) ORF1 Polyprotein Is Sufficient to Induce Apoptosis in a Virus-Free Cell Model." *PLoS ONE* 9(3): e90679.
- Herrmann JE, Nowak NA, Blacklow NR. 1985. "Detection of Norwalk Virus in Stools by Enzyme Immunoassay." *J Med Virol* 17: 127–33.
- Hewish, M J, Takada Y, Coulson BS. 2000. "Integrins  $\alpha 2\beta 1$  and  $\alpha 4\beta 1$  Can Mediate SA11 Rotavirus Attachment and Entry into Cells." *Journal of virology* 74(1): 228–36.
- Hoffmann S, Batz MB, GJ JR Morris. 2012. "Annual Cost of Illness and Quality-Adjusted Life Year Losses in the United States Due to 14 Foodborne Pathogens." *Journal of Food Protection* 75(7): 1292–1302.
- Honma S, Chizhikov V, Santos N, Tatsumi M, Timenetsky Mdo C, Linhares AC, Mascarenhas JD, Ushijima H, Armah GE, Gentsch JR, Hoshino Y. 2007. "Development and Validation of DNA Microarray for Genotyping Group A Rotavirus VP4 (P[4], P[6], P[8], P[9], and P[14]) and VP7 (G1 to G6, G8 to G10, and G12) Genes." *J Clin Microbiol.* 45(8): 2641–48.
- Hou Z et al. 2008. "Anti-NSP4 Antibody Can Block Rotavirus-Induced Diarrhea in Mice." *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 46: 376–85.

- Hu L, Sue E, Crawford, et al. 2012. "Cell Attachment Protein VP8\* of a Human Rotavirus Specifically Interacts with A-Type Histo-Blood Group Antigen." *Nature* 485(7397): 256–59.
- Hu L et al. 2012. "Crystallographic Analysis of Rotavirus NSP2-RNA Complex Reveals Specific Recognition of 5' GG Sequence for RTPase Activity." *Journal of virology* 86(19): 10547–57.
- Huang P et al. 2003. "Noroviruses Bind to Human ABO, Lewis, and Secretor Histo-Blood Group Antigens: Identification of 4 Distinct Strain-Specific Patterns." *The Journal of infectious diseases* 188(1): 19–31.
- Huang P, Farkas T, Zhong W, Tan M, Thornton S, Morrow AL, Jiang X. 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." *Journal of virology* 79(11): 6714–22.
- Huang P, Xia M, Tan M, Zhong W, Wei C, Wang L, Morrow A, Jiang X. 2012. "Spike Protein VP8\* of Human Rotavirus Recognizes Histo-Blood Group Antigens in a Type-Specific Manner." *Journal of virology* 86(9): 4833–43.
- Huang Z et al. 2009. "A DNA Replicon System for Rapid High-Level Production of Virus-like Particles in Plants." *Biotechnology and Bioengineering* 103(4): 706–14.
- Hutson AM, Atmar RL, Estes MK. 2004. "Norovirus Disease: Changing Epidemiology and Host Susceptibility Factors." *Trends in Microbiology* 12(6): 279–87.

## I

---

- ICTVdB. 2004. "00.012.0.03. Norovirus. In ICTVdB — The Universal Virus Database, Ed. C Büchen- Osmond." *New York: ICTVdB Management, Columbia University.*
- Imbert-Marcille, BM et al. 2014. "A FUT2 Gene Common Polymorphism Determines Resistance to Rotavirus a of the P[8] Genotype." *Journal of Infectious Diseases* 209(8): 1227–30.
- Istrate, C., J. Hinkula, L. Hammarstrom, and L. Svensson. 2008. "Individuals with Selective IgA Deficiency Resolve Rotavirus Disease and Develop Higher Antibody Titers (IgG, IgG1) than IgA Competent Individuals." *Journal of medical virology* 80: 531–35.
- Ito S., Takeshita S., Nezu A., Aihara Y., Usuku S., Noguchi Y., Yokota S. 2006. "Norovirus-Associated Encephalopathy." *Pediatr Infect Dis J* 25: :651–52.
- Iturriza-Gómara M, Lopman B. 2014. "Norovirus in Healthcare Settings." *Curr Opin Infect Dis.* 27(5): 437–43.
- Iturriza-Gómara, M et al. 2008. "Evaluation of the Loopamp (loop-Mediated Isothermal Amplification) Kit for Detecting Norovirus RNA in Faecal Samples." *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology* 42(4): 389–93.
- Iturriza-Gómara M, Kang G, Gray J. 2004. "Rotavirus genotyping: keeping up with an evolving population of human rotaviruses". *J Clin Virol* 31(4):259-65.
- Iturriza Gómara M, Wong C, Blome S, Desselberger U, Gray J. 2002. «Molecular characterization of

VP6 genes of human rotavirus isolates: correlation of genogroups with subgroups and evidence of independent segregation". *J Virol* 76(13):6596-601.

Iturriza-Gómara M, Green J, Brown DW, Desselberger U, Gray JJ. 2000. " Diversity within the VP4 gene of rotavirus P[8] strains: implications for reverse transcription-PCR genotyping". *J Clin Microbiol* 38(2):898-901.

## J

---

Jean J, Morales-Rayas R, Anoman MN, Lamhoujeb S. 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 et al. 1995. "Expression, Self-Assembly, and Antigenicity of a Snow Mountain Agent-like Calicivirus Capsid Protein." *J Clin Microbiol* 33: 1452–55.

Jiang, X, Graham DY, Wang KN, Estes MK. 1990. "Norwalk Virus Genome Cloning and Characterization." *Science (New York, N.Y.)* 250(4987): 1580–83.

Jiang, X, Wang J, Estes MK. 1995. "Characterization of SRSVs Using RT-PCR and a New Antigen ELISA." *Archives of virology* 140(2): 363–74.

Jiang, X, Wang M, Graham DY, Estes MK. 1992. "Expression, Self-Assembly, and Antigenicity of the Norwalk Virus Capsid Protein." *Journal of virology* 66(11): 6527–32.

Jiang, X, Wang M, Wang K, Estes MK. 1993. "Sequence and Genomic Organization of Norwalk Virus." *Virology* 195(1): 51–61.

Jiang, Xi et al. 1995. "Development of an ELISA to Detect MX Virus , a Human Calicivirus in the Snow Mountain Agent Genogroup." 76(Pt 11): 2739–47.

Johnson, P C, Mathewson JJ, DuPont HL, Greenberg HB. 1990. "Multiple-Challenge Study of Host Susceptibility to Norwalk Gastroenteritis in US Adults." *The Journal of infectious diseases* 161(1): 18–21.

Jones M.K. et al. 2014. "Enteric Bacteria Promote Human and Mouse Norovirus Infection of B Cells." *Science* 346(6210): 755–59.

Jothikumar N, Lowther JA, Henshilwood K, Lees DN, Hill VR, Vinjé J. 2005. "Rapid and sensitive detection of noroviruses by using TaqMan-Based One-Step reverse transcription-PCR assays and application to naturally contaminated Shellfish samples". *Applied and Environmental Microbiology* 1870-1875.

Jothikumar N., G. Kang, V. R. Hill. 2009. "Broadly Reactive TaqMan® Assay for Real-Time RT-PCR Detection of Rotavirus in Clinical and Environmental Samples." *Journal of Virological Methods* 155(2): 126–31.

Jourdan, N et al. 1997. "Rotavirus Is Released from the Apical Surface of Cultured Human Intestinal Cells through Nonconventional Vesicular Transport That Bypasses the Golgi Apparatus." *Journal of virology* 71(11): 8268–78.

# K

---

- Kageyama T, Kojima S, Shinohara M, Uchida K, Fukushi S, Hoshino FB, 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(4):1548-57.
- Kalica, Anthony R., Jorge Flores, Harry B. Greenberg. 1983. "Identification of the Rotaviral Gene That Codes for Hemagglutination and Protease-Enhanced Plaque Formation." *Virology* 125(1): 194–205.
- Kaljot, K T, Shaw RD, Rubin DH, Greenberg HB. 1988. "Infectious Rotavirus Enters Cells by Direct Cell Membrane Penetration, Not by Endocytosis." *Journal of virology* 62(4): 1136–44.
- Kambhampati, A., Koopmans M, Lopman BA. 2015. "Burden of Norovirus in Healthcare Facilities and Strategies for Outbreak Control." *Journal of Hospital Infection* 89(4): 296–301.
- Kamel AH. et al. 2009. "Predominance and Circulation of Enteric Viruses in the Region of Greater Cairo, Egypt." *Journal of Clinical Microbiology* 47(4): 1037–45.
- Kapikian AZ et al. 1972. "Visualization by Immune Electron Microscopy of a 27-Nm Particle Associated with Acute Infectious Nonbacterial Gastroenteritis." *Journal of virology* 10(5): 1075–81.
- Kapikian A.Z. 2000. "The Discovery of the 27-Nm Norwalk Virus: An Historic Perspective." *The Journal of infectious diseases* 181 Suppl: S295–302.
- kapikian AZ, Gerin JL, Wyatt RG, Thornhill TS, Chanock RM. 1973. "Density in Cesium Chloride of the 27 Nm '8FIIa' Particle Associated with Acute Infectious Nonbacterial Gastroenteritis: Determination by Ultra-Centrifugation and Immune Electron Microscopy." *Poc Soc Exp Biol Med* 142: 874–77.
- Karlsson, KA, Larson G. 1981. "Molecular Characterization of Cell Surface Antigens of Fetal Tissue. Detailed Analysis of Glycosphingolipids of Meconium of a Human O Le(a--B+) Secretor." *The Journal of biological chemistry* 256(7): 3512–24. .
- Karst S.M. 2003. "STAT1-Dependent Innate Immunity to a Norwalk-Like Virus." *Science* 299(5612): 1575–78..
- Karsten C. et al. 2009. "Incidence and Risk Factors for Community-Acquired Acute Gastroenteritis in North-West Germany in 2004." *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 28(8): 935–43.
- Katayama K et al. 2002. "Phylogenetic Analysis of the Complete Genome of 18 Norwalk-like Viruses." *Virology* 299: 225–39.
- Katayama K et al. 2014. "Plasmid-Based Human Norovirus Reverse Genetics System Produces Reporter-Tagged Progeny Virus Containing Infectious Genomic RNA." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111(38): E4043–52.
- Kaufman SS et al. 2005. "Characteristics of Human Calicivirus Enteritis in Intestinal Transplant Recipients." *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* 40(3): 328–33.

- Kawashima, Hisashi et al. 2012. "Transaminase in Rotavirus Gastroenteritis." *Pediatrics International* 54(1): 86–88.
- Khamrin, P et al. 2007. "Genetic Diversity of Noroviruses and Sapoviruses in Children Hospitalized with Acute Gastroenteritis in Chiang Mai, Thailand." *Journal of medical virology* 79(12): 1921–26.
- Khamrin P1 et al. 2009. "Immunochromatography Test for Rapid Detection of Norovirus in Fecal Specimens." *Journal of Virological Methods* 157(2): 219–22.
- Kim HH et al.. 2012. "Full-Length Genomic Analysis of Porcine G9P[23] and G9P[7] Rotavirus Strains Isolated from Pigs with Diarrhea in South Korea." *Infect Genet Evol* 12(7): 1427–35.
- Kirk, MD et al. 2010. "Surveillance for Outbreaks of Gastroenteritis in Long-Term Care Facilities, Australia, 2002-2008." *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 51(8): 907–14.
- Kitamoto N et al. 2002. "Cross-Reactivity among Several Recombinant Calicivirus Virus-like Particles (VLPs) with Monoclonal Antibodies Obtained from Mice Immunized Orally with One Type of VLP." *Journal of Clinical Microbiology* 40(7): 2459–65.
- Kjeldsberg E, Anestad G, Greenberg H, Orstavik I, Pedersen R, Slettebo E. 1989. "Norwalk Virus in Norway: An Outbreak of Gastroenteritis Studied by Electron Microscopy and Radioimmunoassay." *Scand J Infect Dis* 21: 521–26.
- Knipe DM, Howley PM. 2013. "Fields Virology." In ed. Lippincott Williams & Wilkins. , 1347 – 1401.
- Kojima S et al. 2002. "Genogroup-Specific PCR Primers for Detection of Norwalk-like Viruses." *Journal of Virological Methods* 100(1-2): 107–14.
- Koo Hoonmo L, Ajami N, Atmar RL, DuPont HL. 2010. "Noroviruses: The Leading Cause of Gastroenteritis Worldwide." *Discovery medicine* 10(50): 61–70.
- Koopmans M et al. 2002. "Foodborne Viruses." *FEMS Microbiology Reviews* 26(2): 187–205.
- Kordasti, S Sjövall H, Lundgren O, Svensson L. 2004. "Serotonin and Vasoactive Intestinal Peptide Antagonists Attenuate Rotavirus Diarrhoea." *Gut* 53: 952–57.
- Kordasti S et al. 2006. "Rotavirus Infection Is Not Associated with Small Intestinal Fluid Secretion in the Adult Mouse." *Journal of virology* 80(22): 11355–61.
- Kreutz, LC, Seal BS, Mengeling WL. 1994. "Early Interaction of Feline Calicivirus with Cells in Culture." *Arch.Virol.* 136(1-2): 19–34. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8002786>.
- Kroneman A 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.
- Kroneman A, Verhoef L, Harris J, Vennema H, Duizer E, van Duynhoven Y, Gray J, Iturriza M. Falkenhorst G. et al. Bottiger B. 2008. "Analysis of Integrated Virological and Epidemiological Reports of Norovirus Outbreaks Collected within the Foodborne Viruses in Europe Network from 1-7- 2001 to 30-6-2006." *J Clin Microbiol.*

- Kroneman A et al. 2013. "Proposal for a Unified Norovirus Nomenclature and Genotyping." *Archives of Virology* 158(10): 2059–68.
- Kuss SK et al. 2011. "Intestinal Microbiota Promote Enteric Virus Replication and Systemic Pathogenesis." *Science (New York, N.Y.)* 334(6053): 249–52.
- Kuusi, M, Aavitsland P, Gondrosen B, Kapperud G. 2003. "Incidence of Gastroenteritis in Norway--a Population-Based Survey." *Epidemiology and infection* 131(1): 591–97.

## L

---

- Lai, CC et al. 2013. "A Norovirus Outbreak in a Nursing Home: Norovirus Shedding Time Associated with Age." *Journal of Clinical Virology* 56(2): 96–101.
- Lambden PR, Liu B, Clarke IN. 1995. "A Conserved Sequence Motif at the 5' Terminus of the Southampton Virus Genome Is Characteristic of the Caliciviridae." *Virus Genes* 10: 149–52.
- Lamhoujeb S., Fliss I, Ngazoa SE, Jean J. 2009. "Molecular Study of the Persistence of Infectious Human Norovirus on Food-Contact Surfaces." *Food and Environmental Virology* 1(2): 51–56.
- Larson, G et al. 1987. "Fecal Excretion of Intestinal Glycosphingolipids by Newborns and Young Children." *FEBS letters* 214(1): 41–44.
- Lay MK1, Atmar RL, Guix S, Bharadwaj U, He H, Neill FH, Sastry KJ, Yao Q, Estes MK. 2010. "Norwalk Virus Does Not Replicate in Human Macrophages or Dendritic Cells Derived from the Peripheral Blood of Susceptible Humans." 406(1): 1–11.
- Lee, Nelson et al. 2007. "Fecal Viral Concentration and Diarrhea in Norovirus Gastroenteritis." *Emerging Infectious Diseases* 13(9): 1399–1401.
- Leite J P et al. 1996. "Characterization of Toronto Virus Capsid Protein Expressed in Baculovirus." *Archives of Virology* 141(5): 865–75.
- Le Guyader FS, Robert LA, Le Pendu J. 2012. "Transmission of Viruses through Shellfish: When Specific Ligands Come into Play." *Current opinion in virology* 2(1): 103–10.
- Lennon G, Reidy N, Cryan B, Fanning S, O'Shea H. 2008. "Changing Profile of Rotavirus in Ireland: Predominance of P[8] and Emergence of P[6] and P[9] in Mixed Infections." *J Med Virol* 80: 524–30.
- Leshem E et al. 2014. "Distribution of Rotavirus Strains and Strain-Specific Effectiveness of the Rotavirus Vaccine after Its Introduction: A Systematic Review and Meta-Analysis." *The Lancet Infectious Diseases* 14: 847–56.
- Leung WK, Chan PK, Lee NL, Sung JJ. 2010. "Development of an in Vitro Cell Culture Model for Human Noroviruses and Its Clinical Application." *Hong Kong Med* 16: 18–21.
- Lewis D.C., Lightfoot NF, Pether JVS. 1988. "Solid-Phase Immune Electron Microscopy with Human Immunoglobulin M for Serotyping of Norwalk-like Viruses." *Journal of Clinical Microbiology* 26(5): 938–42.
- Li JK, Liang JJ, Liao CL, Lin YL. 2012. "Autophagy Is Involved in the Early Step of Japanese Encephalitis Virus Infection." *Microbes and infection / Institut Pasteur* 14(2): 159–68.

- Lyman WH, Walsh JF, Kotch JB, Weber DJ, Gunn E, Vinjé J. 2009. "Prospective study of etiologic agents of acute gastroenteritis outbreaks in child care centers". *J Pediatr* 154(2):253-7.
- Li N, Wang ZY. 2003. "Viremia and Extraintestinal Infections in Infants with Rotavirus Diarrhea." *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao* 23(7): 643–48.
- Li Y et al. 2013. "An Outbreak of Norovirus Gastroenteritis Associated with a Secondary Water Supply System in a Factory in South China." *BMC Public Health* 13: 283.
- Lindell AT, Grillner L, Svensson L, Wirgart BZ.. 2005. "Molecular Epidemiology of Norovirus Infections in Stockholm, Sweden, during the Years 2000 to 2003: Association of the GGIIb Genetic Cluster with Infection in Children." *Journal of Clinical Microbiology* 43(3): 1086–92.
- Lindesmith L. et al. 2003. "Human Susceptibility and Resistance to Norwalk Virus Infection." *Nat Med* 9(5): 548–53.
- Lindesmith, LC et al. 2008. "Mechanisms of GII . 4 Norovirus Persistence in Human Populations." *PLoS Medicine* 5(2).
- Lindesmith LC, Beltramello M, Donaldson EF, Corti D, Swanstrom J, Debbink K, Lanzavecchia A, Baric RS.. 2012. "Immunogenetic Mechanisms Driving Norovirus GII.4 Antigenic Variation." *PLoS pathogens* 8(5): e1002705.
- Lindesmith LC, Costantini V, Swanstrom J, Debbink K, Donaldson EF, Vinjé J, Baric RS. 2013. "Emergence of a Norovirus GII.4 Strain Correlates with Changes in Evolving Blockade Epitopes." *Journal of virology* 87(5): 2803–13.
- Lindesmith LC et al. 2015. "Broad Blockade Antibody Responses in Human Volunteers after Immunization with a Multivalent Norovirus VLP Candidate Vaccine: Immunological Analyses from a Phase I Clinical Trial." *PLOS Medicine* 12(3): e1001807.
- Liu B, Clarke IN, Lambden PR. 1996. "Polyprotein Processing in Southampton Virus: Identification of 3C-like Protease Cleavage Sites by in Vitro Mutagenesis." *Journal of virology* 70(4): 2605–10.
- Liu LJ, Liu W, Liu YX, Xiao HJ, Jia N, Liu G, Tong YG, Cao WC. 2010. "Identification of Norovirus as the Top Enteric Viruses Detected in Adult Cases with Acute Gastroenteritis." *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 82(4): 717–22.
- Liu, Pengbo et al. 2010. "Effectiveness of Liquid Soap and Hand Sanitizer against Norwalk Virus on Contaminated Hands." *Applied and environmental microbiology* 76(2): 394–99.
- Liu P, Yuen Y, Hsiao HM, Jaykus LA, Moe C. 2013. "Laboratory Evidence of Norwalk Virus Contamination on the Hands of Infected Individuals." *Applied and Environmental Microbiology* 79(24): 7875–81.
- Liu P, Wang X, Lee JC, Teunis P, Hu S, Paradise HT, Moe C. 2014. "Genetic Susceptibility to Norovirus GII.3 and GII.4 Infections in Chinese Pediatric Diarrheal Disease." *The Pediatric infectious disease journal* 33(11): e305–9.
- Liu P, Jaykus LA, Wong E, Moe C.. 2012. "Persistence of Norwalk Virus, Male-Specific Coliphage, and Escherichia Coli on Stainless Steel Coupons and in Phosphate-Buffered Saline." *Journal of food protection* 75(12): 2151–57.

- Lochridge VP, Hardy ME. 2003. "Snow Mountain Virus Genome Sequence and Virus-like Particle Assembly." *Virus genes* 26(1): 71–82.
- Londrigan SL et al. 2003. "Monkey Rotavirus Binding to alpha2beta1 Integrin Requires the alpha2 I Domain and Is Facilitated by the Homologous beta1 Subunit." *Journal of virology* 77(17): 9486–9501.
- López S, Arias CF. 2004. "Multistep Entry of Rotavirus into Cells: A Versaillesque Dance." *Trends in Microbiology* 12(6): 271–78.
- Lopman BA, Cooper PJ et al. 2015. "Norovirus Infection and Disease in an Ecuadorian Birth Cohort: Association of Certain Norovirus Genotypes With Host FUT2 Secretor Status." *J Infect Dis* 211(11): 1813–21.
- Lopman BA, Trivedi T, Vicuña Y, Costantini V, Collins N, Gregoricus N, Parashar U, Sandoval C, Broncano N, Vaca M, Chico ME, Vinjé J, Cooper PJ. 2015. "Norovirus Infection and Disease in an Ecuadorian Birth Cohort: Association of Certain Norovirus Genotypes With Host FUT2 Secretor Status." *J Infect Dis*. 211(11): 1813–21.
- Lopman B et al. 2004. "Increase in Viral Gastroenteritis Outbreaks in Europe and Epidemic Spread of New Norovirus Variant." *Lancet* 363(9410): 682–88.
- Lopman BA et al. 2004. "Epidemiology and Cost of Nosocomial Gastroenteritis, Avon, England, 2002–2003." *Emerging infectious diseases* 10(10): 1827–34.
- Lopman BA et al. 2012. "Understanding Reduced Rotavirus Vaccine Efficacy in Low Socio-Economic Settings." *PloS one* 7(8): e41720.
- Loisy F, Atma RL, Guillon P, Le cann P, Pommepuy M, Le Guyader FS. 2005. "Real-time RT-PCR For norovirus screenin in shelfish". *Journal of Virological Methods* 1-7.
- Lou F, Neetoo H, Chen H, Li J. 2015. "High Hydrostatic Pressure Processing: A Promising Nonthermal Technology to Inactivate Viruses in High-Risk Foods." *Annual Review of Food Science and Technology* 6(1): 389–409.
- Ludwig A et al. 2008. "Quantitative Detection of Norovirus Excretion in Pediatric Patients with Cancer and Prolonged Gastroenteritis and Shedding of Norovirus." *J Med Virol* 80(8): 1461–67.
- Lundgren O et al. 2000. "Role of the Enteric Nervous System in the Fluid and Electrolyte Secretion of Rotavirus Diarrhea." *Science* 287(5452): 491–95.
- Lundgren O, Svensson L. 2001. "Pathogenesis of Rotavirus Diarrhea." *Microbes and Infection* 3(13): 1145–56.
- Lyman WH, Wlsh JF, Kotch JB, Weber DJ, Gunn E, Vinjé J. 2009. "Prospective study of etiologic agents of acute gastroenteritis outbreaks in chil care centers". *The journal of Pediatrics* 154:253-7.
- Lynch M et al. 2003. "The Pathology of Rotavirus-Associated Deaths, Using New Molecular Diagnostics." *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 37(October): 1327–33.
- Lysén M et al. 2009. "Genetic Diversity among Food-Borne and Waterborne Norovirus Strains Causing Outbreaks in Sweden." *Journal of Clinical Microbiology* 47(8): 2411–18.

# M

---

- Mäde D et al. 2013. "Detection and Typing of Norovirus from Frozen Strawberries Involved in a Large-Scale Gastroenteritis Outbreak in Germany." *Food and Environmental Virology* 5: 162–68.
- Madhi SA. et al. 2010. "Effect of Human Rotavirus Vaccine on Severe Diarrhea in African Infants." *N Engl J Med* 362(4): 289–98.
- Madore HP, Treanor JJ, Dolin R. 1986. "Characterization of the Snow Mountain Agent of Viral Gastroenteritis." *Journal of virology* 58(2): 487–92.
- Mahar JE, Bok K, Green KY, Kirkwood CD.. 2013. "The Importance of Intergenic Recombination in Norovirus GII.3 Evolution." *Journal of virology* 87(7): 3687–98.
- Malm M et al. 2015. "Genotype Considerations for Virus-like Particle Based Bivalent Norovirus Vaccine Composition." *Clinical and Vaccine Immunology* 22(6): 656–63.
- Malm M, Uusi-Kerttula H, Vesikari T, Blazevic v. 2014. "High Serum Levels of Norovirus Genotype-Specific Blocking Antibodies Correlate With Protection From Infection in Children." *The Journal of infectious diseases*: 1–8.
- Marionneau S et al. 2001. "ABH and Lewis Histo-Blood Group Antigens, a Model for the Meaning of Oligosaccharide Diversity in the Face of a Changing World." *Biochimie* 83(7): 565–73.
- Marionnea, S et al. 2002. "Norwalk Virus Binds to Histo-Blood Group Antigens Present on Gastrointestinal Epithelial Cells of Secretor Individuals." *Gastroenterology* 122(7): 1967–77.
- Marionneau S et al. 2005. "Influence of the Combined ABO, FUT2, and FUT3 Polymorphism on Susceptibility to Norwalk Virus Attachment." *The Journal of infectious diseases* 192(6): 1071–77.
- Martella V et al. 2007. "Norovirus in Captive Lion Cub ( Panthera Leo )." *Emerging Infectious Diseases* 13(7): 1071–73.
- Martella V, Lorusso E et al.. 2008. "Detection and Molecular Characterization of a Canine Norovirus." *Emerging Infectious Diseases* 14(8): 1306–8.
- Martel-Paradis O et al. 2013. "Full-Length Genome Analysis of G2, G9 and G11 Porcine Group A Rotaviruses." *Veterinary Microbiology* 162: 94–102.
- Di Martino B et al. 2014. "Seroprevalence of Norovirus Genogroup IV Antibodies among Humans, Italy, 2010–2011." *Emerging Infectious Diseases* 20(11): 1828–32.
- Mason HS et al. 1996. "Expression of Norwalk Virus Capsid Protein in Transgenic Tobacco and Potato and Its Oral Immunogenicity in Mice." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93(11): 5335–40.
- Mathijs E et al. 2010. "Experimental Evidence of Recombination in Murine Noroviruses." *J Gen Virol* 91(Pt 11): 2723–33.
- Mathijs E et al. 2011. "Novel Norovirus Recombinants and of GII.4 Sub-Lineages Associated with Outbreaks between 2006 and 2010 in Belgium." *Virology journal* 8(1): 310.

- Matson DO et al. 1993. "Fecal Antibody Responses to Symptomatic and Asymptomatic Rotavirus Infections." *The Journal of infectious diseases* 167: 577–83.
- Matsui S M, Greenberg HB. 2000. "Immunity to Calicivirus Infection." *The Journal of infectious diseases* 181 Suppl : S331–35.
- Matsui SM et al. 1991. "The Isolation and Characterization of a Norwalk Virus-Specific cDNA." *Journal of Clinical Investigation* 87(4): 1456–61.
- Matthews JE et al. 2012. "The Epidemiology of Published Norovirus Outbreaks: A Review of Risk Factors Associated with Attack Rate and Genogroup." *Epidemiology and Infection* 140(07): 1161–72.
- Mattison K. 2011. "Norovirus as a Foodborne Disease Hazard." *Advances in food and nutrition research* 62: 1–39.
- Mattner F et al. 2006. "Risk Groups for Clinical Complications of Norovirus Infections: An Outbreak Investigation." *Clinical Microbiology and Infection* 12(1): 69–74.
- Maunula L von Bonsdorff CH. 2014. "Emerging and Re-Emerging Enteric Viruses Causing Multinational Foodborne Disease Outbreaks." *Future Virology* 9(3): 301–12.
- Mauroy A. et al. 2012. "Complete Genome Sequence of a Novel Bovine Norovirus: Evidence for Slow Genetic Evolution in Genogroup III Genotype 2 Noroviruses." *Journal of Virology* 86(22): 12449–50.
- McIntyre L et al. 2012. "Multiple Clusters of Norovirus among Shellfish Consumers Linked to Symptomatic Oyster Harvesters." *Journal of food protection* 75(9): 1715–20.
- Mead PS. et al. 1999. "Food-Related Illness and Death in the United States." *Emerging Infectious Diseases* 5(5): 607–25.
- Melliez H et al. 2005. "[Morbidity and Cost of Rotavirus Infections in France]." *Médecine et maladies infectieuses* 35(10): 492–99.
- Mesquita JR, Nascimento MS. 2009. "A Foodborne Outbreak of Norovirus Gastroenteritis Associated with a Christmas Dinner in Porto, Portugal, December 2008." *Euro Surveill* 14(41): 19355.
- Mesquita JR, Barclay L, MSJ Nascimento, Vinjé J. 2010. "Mahar JE1, Bok K, Green KY, Kirkwood CD, Min BS, Han KR, Lee JI, Yang JM. 2012. "cDNA Cloning of Korean Human Norovirus and Nucleotidylation of VPg by Norovirus RNA-Dependent RNA Polymerase." *Journal of Microbiology* 50(4): 625–30.
- Monini, Marina et al. 2014. "Full-Length Genomic Analysis of Porcine Rotavirus Strains Isolated from Pigs with Diarrhea in Northern Italy." *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* 25: 4–13.
- Montazeri N, Maite M, Liu D, Cormier J, Landry M, Shackelford J, Lampila LE, Achberger EC, Janes ME. 2015. "Surveillance of Enteric Viruses and Microbial Indicators in the Eastern Oysters (*Crassostrea Virginica*) and Harvest Waters along Louisiana Gulf Coast." *J Food Sci* 80(5): M1075–82.
- Moon S et al. 2012. "Antigenemia, RNAemia, and Innate Immunity in Children with Acute Rotavirus Diarrhea." *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 64(3): 382–91.

- Morillo SG, Timenetsky Mdo C. 2011. "Norovirus: An Overview." *Revista da Associação Médica Brasileira (1992)* 57(4): 453–58.
- Morrison C, Gilson T, Nuovo GJ. 2001. "Histologic Distribution of Fatal Rotaviral Infection: An Immunohistochemical and Reverse Transcriptase in Situ Polymerase Chain Reaction Analysis." *Human pathology* 32(2): 216–21.
- Müller L, Schultz AC et al. 2015. "Separate Norovirus Outbreaks Linked to One Source of Imported Frozen Raspberries by Molecular Analysis, Denmark, 2010-2011." *Epidemiol Infect* 143(11): 2299–2307.
- Murata T, Katsushima N, Mizuta K, Muraki Y, Hongo S, Matsuzaki Y. 2007. "Prolonged Norovirus Shedding in Infant  $\leq$ 6 Months of Age with Gastroenteritis." *pediatr Infect Dis* 26: 46–49.

## N

---

- Nakagomi, T, Nakagomi O. 2005. "Rotavirus Antigenemia in Children with Encephalopathy Accompanied by Rotavirus Gastroenteritis." *Archives of virology* 150(9): 1927–31.
- Nakano I et al. 2011. "Sudden Death from Systemic Rotavirus Infection and Detection of Nonstructural Rotavirus Proteins." *Journal of clinical microbiology* 49(12): 4382–85.
- Nasir W et al. 2012. "Lewis Histo-Blood Group  $\alpha$ 1,3/ $\alpha$ 1,4 Fucose Residues May Both Mediate Binding to GII.4 Noroviruses." *Glycobiology* 22(9): 1163–72.
- Nayak MK, Chatterjee D, Nataraju SM, Pativada M, Mitra U, Chatterjee MK, Saha TK, Sarkar U, Krishnan T. 2009. "A New Variant of Norovirus GII.4/2007 and Inter-Genotype Recombinant Strains of NVGII Causing Acute Watery Diarrhoea among Children in Kolkata, India." *J Clin Virol* 45(3): 223–29.
- Nenonen, NP., Hannoun C, Olsson MB, Bergström T. 2009. "Molecular Analysis of an Oyster-Related Norovirus Outbreak." *Journal of Clinical Virology* 45(2): 105–8.
- Nicollier-Jamot B, Pico V, Pothier P, Kohli V. 2003. "Molecular Cloning, Expression, Self-Assembly, Antigenicity, and Seroepidemiology of a Genogroup II Norovirus Isolated in France." *Journal of Clinical Microbiology* 41(8): 3901–4.
- Nilsson M., Hedlund 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.
- No authors listed. 1975. "Infantile Enteritis Viruses: Morphogenesis and Morphology." *J Virol* 16(4): 937 – 43.
- Noel J S et al. 1999. "Identification of a Distinct Common Strain of 'Norwalk-like Viruses' Having a Global Distribution." *The Journal of infectious diseases* 179(6): 1334–44.
- Nordgren J, Bucardo F, Svensson L, Lindgren PE. 2010. "Novel Light-upon-Extension Real-Time PCR Assay for Simultaneous Detection, Quantification, and Genogrouping of Group A Rotavirus." *J Clin Microbiol* 48(5): 1859–65.

- Nordgren, Johan et al. 2009. "Prevalence of Norovirus and Factors Influencing Virus Concentrations during One Year in a Full-Scale Wastewater Treatment Plant." *Water Research* 43(4): 1117–25.
- Nordgren J, Kindberg E, Lindgren PE, Matussek A, Svensson L. 2010. "Norovirus Gastroenteritis Outbreak with a Secretor-Independent Susceptibility Pattern, Sweden." *Emerging infectious diseases* 16(1): 81–87.
- Nordgren J, Nitiema LW, Ouermi D, Simpore J, Svensson L. 2013. "Host Genetic Factors Affect Susceptibility to Norovirus Infections in Burkina Faso." *PloS one* 8(7): e69557.
- Nordgren J, Sharma S et al. 2014. "Both Lewis and Secretor Status Mediate Susceptibility to Rotavirus Infections in a Rotavirus Genotype-Dependent Manner." *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 59(11): 1567–73.
- Nowak, P. et al. 2011. "Measurement of the Virolysis of Human GII.4 Norovirus in Response to Disinfectants and Sanitisers." *Journal of Virological Methods* 174(1-2): 7–11.

## O

---

- Offit, P A. 1994. "Rotaviruses: Immunological Determinants of Protection against Infection and Disease." *Advances in virus research* 44: 161–202.
- Okitsu S, Khamrin P, Thongprachum A, Kongkaew A, Maneekarn N, Mizuguchi M, Hayakawa S, Ushijima H. 2013. "Whole-Genomic Analysis of G3P[23], G9P[23] and G3P[13] Rotavirus Strains Isolated from Piglets with Diarrhea in Thailand, 2006-2008." *Infect Genet Evol* 18: 74–86.
- Organizations, World Health et al. 2013. "Rotavirus Vaccines WHO Position Paper: January 2013 - Recommendations." *Vaccine* 31(52): 6170–71.
- Oriol, R. 1990. "Genetic Control of the Fucosylation of ABH Precursor Chains. Evidence for New Epistatic Interactions in Different Cells and Tissues." *Journal of immunogenetics* 17(4-5): 235–45.
- Ozawa, Kazuhiro, Tomoichiro Oka, Naokazu Takeda, and Grant S Hansman. 2007. "Norovirus Infections in Symptomatic and Asymptomatic Food Handlers in Japan." *Journal of clinical microbiology* 45(12): 3996–4005.

## P

---

- Pang, Xiaoli L. et al. 2004. "Increased Detection of Rotavirus Using a Real Time Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) Assay in Stool Specimens from Children with Diarrhea." *Journal of Medical Virology* 72(October 2003): 496–501.
- Papafragkou, Efstathia et al. 2013. "Challenges of Culturing Human Norovirus in Three-Dimensional Organoid Intestinal Cell Culture Models." *PloS one* 8(6): e63485.
- Parez, N. 2007. "Rotavirus Gastroenteritis: Why to Back up the Development of New Vaccines?" *Camp Immunol Microbial Infect* 31(2-3): 253–69.

- Park, Sang Ik et al. 2011. "Reassortment among Bovine, Porcine and Human Rotavirus Strains Results in G8P[7] and G6P[7] Strains Isolated from Cattle in South Korea." *Veterinary Microbiology* 152(1-2): 55–66.
- Parra, Gabriel I. et al. 2012. "Immunogenicity and Specificity of Norovirus Consensus GII.4 Virus-like Particles in Monovalent and Bivalent Vaccine Formulations." *Vaccine* 30: 3580–86.
- Parra GI, Green KY. 2015. "Genome of Emerging Norovirus GII.17, United States, 2014." *Emerg Infect Dis* 21(8): 1477–79.
- Parrino T. A., Schreiber D. S., Trier J. S., Kapikian A. Z., Blacklow N. R. 1977. "Clinical Immunity in Acute Gastroenteritis Caused by Norwalk Agent." *N Engl J Med* 297: 86–89.
- Patel, Manish et al. 2009. "Oral Rotavirus Vaccines: How Well Will They Work Where They Are Needed Most?" *The Journal of infectious diseases* 200 Suppl : S39–48.
- Patel, Manish M. et al. 2008. "Systematic Literature Review of Role of Noroviruses in Sporadic Gastroenteritis." *Emerging Infectious Diseases* 14(8): 1224–31.
- Patel, Manish M., Aron J. Hall, Jan Vinjé, and Umesh D. Parashar. 2009. "Noroviruses: A Comprehensive Review." *Journal of Clinical Virology* 44(1): 1–8.
- Patterson, T, P Hutchings, and S Palmer. 1993. "Outbreak of SRSV Gastroenteritis at an International Conference Traced to Food Handled by a Post-Symptomatic Caterer." *Epidemiology and infection* 111(1): 157–62.
- Payne DC, Currier RL et al.. 2015. "Epidemiologic Association Between FUT2 Secretor Status and Severe Rotavirus Gastroenteritis in Children in the United States." *JAMA Pediatr* 21: 1–6.
- Le Pendu, Jacques, Kristina Nyström, and Nathalie Ruvoën-Clouet. 2014. "Host-Pathogen Co-Evolution and Glycan Interactions." *Current opinion in virology* 7: 88–94.
- Perrin A, Loutreul J, Boudaud N, Bertrand I, Gantzer C. 2015. "Rapid, Simple and Efficient Method for Detection of Viral Genomes on Raspberries." *J Virol Methods* 224: 956101.
- Phillips, G, C C Tam, L C Rodrigues, and B Lopman. 2010. "Prevalence and Characteristics of Asymptomatic Norovirus Infection in the Community in England." *Epidemiology and infection* 138(10): 1454–58.
- Poncet D, Lindenbaum P, L'Haridon R, Cohen J. 1997. "In Vivo and in Vitro Phosphorylation of Rotavirus NSP5 Correlates with Its Localization in Viroplasm." *J Virol* 71(1): 34–41.
- Popescu, Costin-Ioan et al. 2014. "Hepatitis C Virus Life Cycle and Lipid Metabolism." *Biology* 3(4): 892–921.
- Prasad, B V et al. 1999. "X-Ray Crystallographic Structure of the Norwalk Virus Capsid." *Science* 286(October): 287–90.

## Q

- Qi R, Ye C, Chen C, Yao P, Hu F, Lin Q. 2015. "Norovirus Prevention and the Prevalence of Asymptomatic Norovirus Infection in Kindergartens and Primary Schools in Changzhou, China: Status of the Knowledge, Attitudes, Behaviors, and Requirements Requirements." *Am J Infect*

## R

---

- Rajko-Nenow P et al. 2013. “Norovirus Genotypes Present in Oysters and in Effluent from a Wastewater Treatment Plant during the Seasonal Peak of Infections in Ireland in 2010.” *Applied and Environmental Microbiology* 79(8): 2578–87.
- Ramani S, Cortes-Penfield NW, Hu L, Crawford SE, Czako R, Smith DF, Kang G, Ramig RF, Le Pendu J, Prasad BV, Estes MK. 2013. “The VP8\* Domain of Neonatal Rotavirus Strain G10P[11] Binds to Type II Precursor Glycans.” *J virol* 87(3): 7255–64.
- Ramig, RF. 2007. “Systemic Rotavirus Infection.” *Expert review of anti-infective therapy* 5(4): 591–612.
- Räsänen S et al. 2010. “Mixed Viral Infections Causing Acute Gastroenteritis in Children in a Waterborne Outbreak.” *Epidemiology and infection* 138(9): 1227–34.
- Ra P et al. 2006. “Quantitative Evaluation of Rotaviral Antigenemia in Children with Acute Rotaviral Diarrhea.” *The Journal of infectious diseases* 194(5): 588–93.
- Richards GP et al. 2012. “Resilience of Norovirus GII.4 to Freezing and Thawing: Implications for Virus Infectivity.” *Food and Environmental Virology* 4(4): 192–97.
- Richards GP. 2000. “Enteric Virus Contamination of Foods through Industrial Practices: A Primer on Intervention Strategies.” *J Ind Microbiol Biotechnol* 27(2): 117–25.
- Richardson S et al. 1998. “Extended Excretion of Rotavirus after Severe Diarrhoea in Young Children.” *Lancet* 351(9119): 1844–48.
- Riera-Montes M et al. 2011. “Waterborne Norovirus Outbreak in a Municipal Drinking-Water Supply in Sweden.” *Epidemiology and Infection* 139(12): 1928–35.
- Rocha-Pereira J et al. 2013. “The Viral Polymerase Inhibitor 2’-C-Methylcytidine Inhibits Norwalk Virus Replication and Protects against Norovirus-Induced Diarrhea and Mortality in a Mouse Model.” *Journal of virology* 87(21): 11798–805.
- Rockx B et al. 2002. “Natural History of Human Calicivirus Infection: A Prospective Cohort Study.” *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 35(3): 246–53.
- Roddie C et al. 2009. “Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation and Norovirus Gastroenteritis: A Previously Unrecognized Cause of Morbidity.” *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 49(7): 1061–68.
- Rohayem J et al. 2006. “Protein-Primed and de Novo Initiation of RNA Synthesis by Norovirus 3Dpol.” *J Virol* 80(14): 7060–69.
- Ronchetti AM et al. 2014. “Norovirus-Related Chronic Diarrhea in a Patient Treated with Alemtuzumab for Chronic Lymphocytic Leukemia.” *BMC infectious diseases* 14: 239.
- Rossignol JF and Y M El-Gohary. 2006. “Nitazoxanide in the Treatment of Viral Gastroenteritis: A Randomized Double-Blind Placebo-Controlled Clinical Trial.” *Alimentary pharmacology &*

*therapeutics* 24(10): 1423–30.

- de Rougemont A et al. 2011. “Qualitative and Quantitative Analysis of the Binding of GII.4 Norovirus Variants onto Human Blood Group Antigens.” *Journal of virology* 85(9): 4057–70.
- de Rougemont A, Kaplon J et al. 2010. “Molecular and Clinical Characterization of Rotavirus From Diarrheal Infants Admitted to Pediatric Emergency Units in France.” *Pediatr Infect Dis J*.
- Ruggeri FM et al. 1998. “Antirovirus Immunoglobulin A Neutralizes Virus in Vitro after Transcytosis through Epithelial Cells and Protects Infant Mice from Diarrhea.” *Journal of virology* 72(4): 2708–14. h
- Ruggeri FM, Greenberg HB. 1991. “Antibodies to the Trypsin Cleavage Peptide VP8 Neutralize Rotavirus by Inhibiting Binding of Virions to Target Cells in Culture.” *Journal of virology* 65(5): 2211–19.
- Ruiz MC et al. 1997. “Cell Lines Susceptible to Infection Are Permeabilized by Cleaved and Solubilized Outer Layer Proteins of Rotavirus.” *Journal of General Virology* 78: 2883–93.
- Ruiz-Palacios, Guillermo M. et al. 2006. “Safety and Efficacy of an Attenuated Vaccine against Severe Rotavirus Gastroenteritis.” *The New England Journal of Medicine* 354(1): 11–22.
- Ruvoën-Clouet N et al. 2000. “Binding of Rabbit Hemorrhagic Disease Virus to Antigens of the ABH Histo-Blood Group Family.” *Journal of virology* 74(24): 11950–54.
- Ruvoën-Clouet N et al. 2014. “Increase in Genogroup II.4 Norovirus Host Spectrum by CagA-Positive Helicobacter Pylori Infection.” *The Journal of infectious diseases*: 1–9.
- Rydell G.E. et al. 2013. “Human GII.4 Norovirus VLP Induces Membrane Invaginations on Giant Unilamellar Vesicles Containing Secretor Gene Dependent  $\alpha$ 1,2-Fucosylated Glycosphingolipids.” *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* 1828(8): 1840–45.

## S

---

- Said MA, Perl TM, Sears CL. 2008. “Healthcare Epidemiology: Gastrointestinal Flu: Norovirus in Health Care and Long-Term Care Facilities.” *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 47(9): 1202–8.
- Santos N et Hoshino, Y. 2005. “Global Distribution of Rotavirus Serotypes/genotypes and Its Implication for the Development and Implementation of an Effective Rotavirus Vaccine.” *Rev Med Virol* 15(1): 29–56.
- Sapin C et al. 2002. “Rafts Promote Assembly and Atypical Targeting of a Nonenveloped Virus, Rotavirus, in Caco-2 Cells.” *Journal of virology* 76(9): 4591–4602.
- Scallan E et al. 2001. “Foodborne Illness Acquired in the United States-Unspecified Agents.” *Emerging Infectious Diseases* 17(1): 16–22.
- Scallan E? Griffin PM, Angulo FJ, Tauxe RV, Hoekstra RM.. 2011. “Foodborne Illness Acquired in the United States-Major Pathogens.” *Emerging Infectious Diseases* 17(1): 7–15.
- Schreiber DS, Blacklow N R, Trier J.S. 1973. “The Mucosal Lesion of the Proximal Small Intestine in Acute Infectious Nonbacterial Gastroenteritis.” *N Engl J Med* 288: 1318–23.

- Schreiber DS, Blacklow NR, Trier JS. 1974. "The Small Intestinal Lesion Induced by Hawaii Agent Acute Infectious Nonbacterial Gastroenteritis." *J Infect Dis* 129: 705–8.
- Schwartz S et al. 2011. "Norovirus Gastroenteritis Causes Severe and Lethal Complications after Chemotherapy and Hematopoietic Stem Cell Transplantation." *Blood* 117(22): 5850–56.
- Scotti N, Rybicki EP. 2013. "Virus-like Particles Produced in Plants as Potential Vaccines." *Expert review of vaccines* 12(2): 211–24.
- Sdiri-Loulizi K et al. 2008. "Acute Infantile Gastroenteritis Associated with Human Enteric Viruses in Tunisia." *Journal of Clinical Microbiology* 46(4): 1349–55.
- Sdiri-Loulizi K, Ambert-Balay K, Gharbi-Khelifi H, Sakly N, Hassine M, Chouchane S, Guediche MN, Pothier P, Aouni M. 2009. "Molecular Epidemiology of Norovirus Gastroenteritis Investigated Using Samples Collected from Children in Tunisia during a Four-Year Period: Detection of the Norovirus Variant GGII.4 Hunter as Early as January 2003." *Journal of Clinical Microbiology* 47(2): 421–29.
- Seah, EL, Marshal JAI, Wright PJ. 1999. "Open Reading Frame 1 of the Norwalk-like Virus Camberwell: Completion of Sequence and Expression in Mammalian Cells." *J.Virol.* 73: 10531–35.
- Seo NS et al. 2008. "Integrins alpha1beta1 and alpha2beta1 Are Receptors for the Rotavirus Enterotoxin." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(26): 8811–18.
- Serazin AC, Shackelton LA, Wilson C, Bhan MK. 2010. "Improving the Performance of Enteric Vaccines in the Developing World." *Nature immunology* 11(9): 769–73.
- Sheahan A, Copeland G, Richardson L, McKay S, Chou A4, Babady NE, Tang YW, Boulad F, Eagan J, Sepkowitz K, Kamboj M. 2015. "Control of Norovirus Outbreak on a Pediatric Oncology Unit." *Am J Infect Control* 43(10): 1066–69.
- Shen Q et al. 2012. "Complete Genome Sequence of a New-Genotype Porcine Norovirus Isolated from Piglets with Diarrhea." *Journal of virology* 86(12): 7015–16.
- Siddiq DM, Koo HL, Adachi JA, Viola GM. 2011. "Norovirus Gastroenteritis Successfully Treated with Nitazoxanide." *Journal of Infection* 63(5): 394–97.
- Siebenga JJ et al. 2009. "Norovirus Illness Is a Global Problem: Emergence and Spread of Norovirus GII.4 Variants, 2001-2007." *The Journal of infectious diseases* 200(5): 802–12.
- Siebenga JJ, Beersma MF, Vennema H, van Biezen P, Hartwig NJ, Koopmans M. 2008. "High For, Prevalence of Prolonged Norovirus Shedding and Illness among Hospitalized Patients: A Model for In Vivo Molecular Evolution." *J Infect Dis* 198: 994–1001.
- Silvestri LS, Tortorici MA, Vasquez-Del Carpio R, Patton JT. 2005. "Rotavirus Glycoprotein NSP4 Is a Modulator of Viral Transcription in the Infected Cell." *J Virol* 79(24): 15165–74.
- Skraber S, Gantzer C, Helmi K, Hoffmann L, Cauchie HM. "Simultaneous concentration of enteric viruses and protozoan parasites: a protocol based on tangential flow filtration and adapted to large volumes of surface and drinking waters". *Food Environ Virol* 1:66-76.
- Smith EM, Estes MK, Graham DY, Gerba CP. 1979. "A Plaque Assay for the Simian Rotavirus

- SA11.” *Journal of General Virology* 43(3): 513–19.
- Simmonds MK et al. 2008. "New oligonucleotide primers for P-typing of rotavirus strains: Strategies for typing previously untypeable strains". *J Clin Virol* 42(4):368-73.
- Soejima M, Munkhtulga L, Iwamoto S, Koda Y.. 2009. "Genetic Variation of FUT3 in Ghanaians, Caucasians, and Mongolians." *Transfusion* 49(5): 959–66.
- Solano R et al. 2014. "Person-to-Person Transmission of Norovirus Resulting in an Outbreak of Acute Gastroenteritis at a Summer Camp." *European journal of gastroenterology & hepatology* 26(10): 1160–66.
- Soltani M et al. 2012a. " Gastroentérites aiguës communautaires à rotavirus en Tunisie : épidémiologie et facteurs de risque". *Revue d'épidémiologie et de santé publique* 60 (2): S123.
- Soltani M et al. 2012b. "Epidémiologie des gastroentérites à rotavirus chez les enfants âgés de mois de cinq ans en Tunisie - Résultats de la surveillance sentinelle hospitalière 2009 à 2011". *Revue d'épidémiologie et de santé publique* 60: 473–480.
- Soltani MS et al. 2015. "Epidemiology and medical cost of hospitalization due to rotavirus gastroenteritis among children under 5 years of age in the central-east of Tunisia". *Eastern Mediterranean Health Journal* 21(8):584-90.
- Someya Y, Takeda N, Miyamura T. 2000. "Complete Nucleotide Sequence of the Chiba Virus Genome and Functional Expression of the 3C-like Protease in Escherichia Coli." *Virology* 278(2): 490–500.
- Sosnovtsev SV et al. 2005. "Feline Calicivirus VP2 Is Essential for the Production of Infectious Virions." *Journal of virology* 79(7): 4012–24.
- Souza AC et al. 2013. "Expression and Assembly of Norwalk Virus-like Particles in Plants Using a Viral RNA Silencing Suppressor Gene." *Applied microbiology and biotechnology* 97(20): 9021–27.
- Spackova M et al. 2010. "High Level of Gastrointestinal Nosocomial Infections in the German Surveillance System, 2002-2008." *Infection control and hospital epidemiology: the official journal of the Society of Hospital Epidemiologists of America* 31(12): 1273–78.
- Steiner TS, Samie A, Guerrant RL. 2006. "Infectious Diarrhea: New Pathogens and New Challenges in Developed and Developing Areas." *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 43(4): 408–10.
- Straub TM et al. 2011. "Human Norovirus Infection of Caco-2 Cells Grown as a Three-Dimensional Tissue Structure." *Journal of water and health* 9(2): 225–40.
- Sugieda M, Nakajima S.. 2002. "Viruses Detected in the Caecum Contents of Healthy Pigs Representing a New Genetic Cluster in Genogroup II of the Genus 'Norwalk-like Viruses.'" *Virus Research* 87(2): 165–72.

## T

- 
- Takanashi S et al. 2014. "Failure of Propagation of Human Norovirus in Intestinal Epithelial Cells

- with Microvilli Grown in Three-Dimensional Cultures.” *Archives of virology* 159(2): 257–66.
- Tam CC et al. 2012. “Changes in Causes of Acute Gastroenteritis in the United Kingdom over 15 Years: Microbiologic Findings from 2 Prospective, Population-Based Studies of Infectious Intestinal Disease.” *Clinical Infectious Diseases* 54(9): 1275–86.
- Tamura K et al. 2013. “MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0.” *Molecular Biology and Evolution* 30(12): 2725–29.
- Tamura M et al. 2000. “Interaction of Recombinant Norwalk Virus Particles with the 105-Kilodalton Cellular Binding Protein, a Candidate Receptor Molecule for Virus Attachment.” *J. Virol.* 74: 11589–97.
- Tan M et al. 2009. “Conservation of Carbohydrate Binding Interfaces: Evidence of Human HBGA Selection in Norovirus Evolution.” *PLoS ONE* 4(4): e5058.
- Tan M, Jiang X. 2008. “Norovirus Gastroenteritis, Increased Understanding and Future Antiviral Options.” *Curr Opin Investig Drugs* 9(2): 146–51.
- Tan M et al. 2008. “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, Jiang Xi. 2012. “Norovirus P Particle: A Subviral Nanoparticle for Vaccine Development against Norovirus, Rotavirus and Influenza Virus.” *Nanomedicine* 7(6): 889–97.
- Taraporewala Z, Chen D, Patton JT.. 1999. “Multimers Formed by the Rotavirus Nonstructural Protein NSP2 Bind to RNA and Have Nucleoside Triphosphatase Activity.” *Journal of virology* 73(12): 9934–43.
- Taylor JA., O’Brien JA, Yeager M. 1996. “The Cytoplasmic Tail of NSP4, the Endoplasmic Reticulum-Localized Non-Structural Glycoprotein of Rotavirus, Contains Distinct Virus Binding and Coiled Coil Domains.” *The EMBO journal* 15(17): 4469–76.
- Teunis PFM et al. 2008. “Norwalk Virus : How Infectious Is It ?” *Journal of Infectious Diseases The* 1476(April): 1468–76.
- Thomas MK et al. 2013. “Estimates of the Burden of Foodborne Illness in Canada for 30 Specified Pathogens and Unspecified Agents, circa 2006.” *Foodborne pathogens and disease* 10(7): 639–48.
- Thongprachum A et al. 2012. “Evaluation and Comparison of the Efficiency of Immunochromatography Methods for Norovirus Detection.” *Clinical laboratory* 58(5-6): 489–93.
- Thornhill T S et al. 1977. “Detection by Immune Electron Microscopy of 26- to 27-Nm Viruslike Particles Associated with Two Family Outbreaks of Gastroenteritis.” *The Journal of infectious diseases* 135(1): 20–27.
- Todd S et al. 2010. “Rotavirus Strain Types Circulating in Africa: Review of Studies Published during 1997-2006.” *The Journal of infectious diseases* 202 Suppl(Suppl 1): S34–42.
- Topping JR Schnerr H et al. 2009. “Temperature Inactivation of Feline Calicivirus Vaccine Strain FCV F-9 in Comparison with Human Noroviruses Using an RNA Exposure Assay and Reverse Transcribed Quantative Real-Time Polymerase Chain Reaction-A Novel Method for Predicting

- Virus Infectivity.” *J Virol Methods* 156: 89–95.
- Van Trang N et al. 2014. “Association between Norovirus and Rotavirus Infection and Histo-Blood Group Antigen Types in Vietnamese Children.” *Journal of clinical microbiology* 52(5): 1366–74.
- Trask SD, McDonald SM, Patton JT.. 2012. “Structural Insights into the Coupling of Virion Assembly and Rotavirus Replication.” *Nature Reviews Microbiology* 10(3): 165–77.
- Trivedi TK et al. 2012. “Hospitalizations and Mortality Associated with Norovirus Outbreaks in Nursing Homes, 2009-2010.” *JAMA* 308(16): 1668–75.
- Troeger H., Loddenkemper C, Schneider T, Schreier E, Epple H J, Zeitz M, Fromm M, Schulzke JD. 2009. “Structural And Functional Changes Of The Duodenum In Human Norovirus Infection.” *Gut*.
- Murphy TV, Gargiullo PM, Massoudi MS, Nelson DB, Jumaan AO, Okoro CA, Zanardi LR, Setia S, Fair E, LeBaron CW, Wharton M, Livengood JR; Rotavirus Intussusception Investigation Team.. 2001. “Intussusception among Infants given an Oral Rotavirus Vaccine.” *New England journal of medicine* 344(8): 564–72.
- Tse H. et al. 2012. “Complete Genome Sequences of Novel Rat Noroviruses in Hong Kong.” *Journal of Virology* 86(22): 12435–36.
- Tu ET-V et al. 2008. “Epidemics of Gastroenteritis during 2006 Were Associated with the Spread of Norovirus GII.4 Variants 2006a and 2006b.” *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 46(3): 413–20.
- Turcios-Ruiz RM et al. 2008. “Outbreak of Necrotizing Enterocolitis Caused by Norovirus in a Neonatal Intensive Care Unit.” *Journal of Pediatrics* 153(3): 339–44.

## V

---

- Vainio K and Mette Myrmel. 2006. “Molecular Epidemiology of Norovirus Outbreaks in Norway during 2000 to 2005 and Comparison of Four Norovirus Real-Time Reverse Transcriptase PCR Assays.” *Journal of Clinical Microbiology* 44(10): 3695–3702.
- Vega E et al. 2011. “Novel Surveillance Network for Norovirus Gastroenteritis Outbreaks, United States.” *Emerging Infectious Diseases* 17(8): 1389–95.
- Vega E Barclay L Gregoricus N, Shirley SH, Lee D, Vinjé J. 2014. “Genotypic and Epidemiologic Trends of Norovirus Outbreaks in the United States, 2009 to 2013.” *Journal of clinical microbiology* 52(1): 147–55.
- Velasquez LS. et al. 2011. “Intranasal Delivery of Norwalk Virus-like Particles Formulated in an in Situ Gelling, Dry Powder Vaccine.” *Vaccine* 29(32): 5221–31.
- Venjé J, Koopmans MPG. 1996. “Molecular Detection and Epidemiology of Small Round-Structured Viruses in Outbreaks of Gastroenteritis in the Netherlands.” *J Infect Dis* 174: 610–15.
- Verhoef L et al. 2010. “Use of Norovirus Genotype Profiles to Differentiate Origins of Foodborne Outbreaks.” *Emerging Infectious Diseases* 16(4): 617–24.

- Verhoef L, Kouyos RD, Vennema H, Kroneman A, Siebenga J, van Pelt W, Koopmans M; Foodborne Viruses in Europe Network.. 2011. "An Integrated Approach to Identifying International Foodborne Norovirus Outbreaks." *Emerging Infectious Diseases* 17(3): 412–18.
- Verhoef L, Hewitt J, Barclay L, Ahmed SM, Lake R, Hall AJ, Lopman B, Kroneman A, Vennema H, Vinjé J, Koopmans M. 2015. "Norovirus Genotype Profiles Associated with Foodborne Transmission, 1999-2012." *Emerging infectious diseases* 21(4): 592–99.
- Verhoef LP, Kroneman A, van Duynhoven Y, Boshuizen H, van Pelt W, Koopmans M; Foodborne Viruses in Europe Network.. 2009. "Selection Tool for Foodborne Norovirus Outbreaks." *Emerging Infectious Diseases* 15(1): 31–38.
- Vesikari T et al. 2006. "Safety and Efficacy of a Pentavalent Human-Bovine (WC3) Reassortant Rotavirus Vaccine." *The New England journal of medicine* 354(1): 23–33.
- Vimont A, Fliss I, Jean J. 2015. "Efficacy and Mechanisms of Murine Norovirus Inhibition by Pulsed-Light Technology." *Appl Environ Microbiol* 81(8): 2950–57.
- Vinjé JI, Koopmans MP. 1996. "Molecular Detection and Epidemiology of Small Round-Structured Viruses in Outbreaks of Gastroenteritis in the Netherlands." *Journal of Infectious Diseases* 174(3): 610–15.
- Vongpunsawad S, Prasad BVV, Estes MK. 2013. "Norwalk Virus Minor Capsid Protein VP2 Associates within the VP1 Shell Domain." *Journal of virology* 87(9): 4818–25.

## W

- 
- Werber D et al. 2009. "Massive Outbreak of Viral Gastroenteritis Associated with Consumption of Municipal Drinking Water in a European Capital City." *Epidemiology and infection* 137(12): 1713–20.
- Westhoff TH et al. 2009. "Chronic Norovirus Infection in Renal Transplant Recipients." *Nephrol Dial Transplant* 24(3): 1051–53.
- Westhoff Timm H et al. 2009. "Chronic Norovirus Infection in Renal Transplant Recipients." *Nephrology, dialysis, transplantation: official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 24(3): 1051–53.
- Wheeler JG et al. 1999. "Study of Infectious Intestinal Disease in England: Rates in the Community, Presenting to General Practice, and Reported to National Surveillance. The Infectious Intestinal Disease Study Executive." *BMJ (Clinical research ed.)* 318(7190): 1046–50.
- Widdowson MA, Silka A et al. 2005. "Norovirus and Foodborne Disease, United States, 1991-2000." *Emerging infectious diseases* 11(1): 95–102.
- Widdowson MA, Bulens SN et al. 2011. "Enhanced Surveillance of Norovirus Outbreaks of Gastroenteritis in Georgia." *Public health reports (Washington, D.C. : 1974)* 126(2): 251–58.
- Wobus CE et al. 2004. "Replication of Norovirus in Cell Culture Reveals a Tropism for Dendritic Cells and Macrophages." *PLoS Biology* 2(12): e432.
- Wobus CE, Thackray LB, Virgin HW. 2006. "Murine Norovirus: A Model System to Study

Norovirus Biology and Pathogenesis.” *Journal of virology* 80(11): 5104–12.

Wolf M, Phuoc T Vo, Harry B Greenberg. 2011. “Rhesus Rotavirus Entry into a Polarized Epithelium Is Endocytosis Dependent and Involves Sequential VP4 Conformational Changes.” *Journal of virology* 85(6): 2492–2503.

Wolf Sandro et al. 2009. “Molecular Detection of Norovirus in Sheep and Pigs in New Zealand Farms.” *Veterinary Microbiology* 133(1-2): 184–89.

Woodward JM et al. 2015. “The Role Of Chronic Norovirus Infection In The Enteropathy Associated With Common Variable Immunodeficiency.” *The American Journal of Gastroenterology* 110(2): 320–27.

Wyatt RG et al. 1974. “Comparison of Three Agents of Acute Infectious Nonbacterial Gastroenteritis by Cross- Challenge in Volunteers Comparison of Three Agents of Acute Infectious Nonbacterial Gastroenteritis by Cross-Challenge in Volunteers.” *The Journal of infectious diseases* 129(6): 709–14.

## X

---

Xia M, Farkas T, Jiang X. 2007. “Norovirus Capsid Protein Expressed in Yeast Forms Virus-like Particles and Stimulates Systemic and Mucosal Immunity in Mice Following an Oral Administration of Raw Yeast Extracts.” *Journal of medical virology* 79(1): 74–83.

Xue C, Fu Y, Zhu W, Fei Y, Zhu L, Zhang H, Pan L, Xu H, Wang Y, Wang W, Sun Q1.2014. “An Outbreak of Acute Norovirus Gastroenteritis in a Boarding School in Shanghai: A Retrospective Cohort Study.” *BMC public health* 14: 1092.

## Y

---

Yazgan H, Keleş E, Gebeşçe A, Demirdöven M, Yazgan Z. 2013. “Blood Groups and Rotavirus Gastroenteritis.” *Pediatr Infect Dis J* 32(6): 705–6.

Yunus MA, Chung LM, Chaudhry Y, Bailey D, Goodfellow I. 2010. “Development of an Optimized RNA-Based Murine Norovirus Reverse Genetics System.” *Journal of Virological Methods* 169(1): 112–18.

## Z

---

Zahorsky J. 1929. “Hyperemesis Hiemis or the Winter Vomiting Disease.” *Arch Pediatr* 46: 391–95.

Zhang X, Buehner NA, Hutson AM, Estes MK, Mason HS. 2006. “Tomato Is a Highly Effective Vehicle for Expression and Oral Immunization with Norwalk Virus Capsid Protein.” *Plant Biotechnology Journal* 4(4): 419–32.

Zheng DP, Ando T, Fankhauser RL, Beard RS, Glass RI, Monroe SS. 2006. “Norovirus Classification and Proposed Strain Nomenclature.” *Virology* 346(2): 312–23.



# **ANNEXES**

## **Annexes**

## **Annexe 1**

Le comité a été saisi : 09-05-2013

Par le Docteur : **Dr. Khira SDIRI LOULIZI**

D'un avis éthique sur un projet de recherche intitulé « relation entre l'infection à Rotavirus et Norovirus et les antigènes sanguins ». **Dr. Khira SDIRI LOULIZI – Pr. Mohamed Neji GUEDICHE**

Le Comité a examiné les documents suivants relatifs à ce projet :  
- Protocole de l'étude

Ont participé à la délibération :

<b>Nom</b> : ABROUG	<b>Prénom</b> : Fekri	<b>Fonction</b> : Président du comité
<b>Nom</b> : TABKA	<b>Prénom</b> : Raoudha	<b>Fonction</b> : Chef de Service
<b>Nom</b> : MAHJOUR	<b>Prénom</b> : Sylvia	<b>Fonction</b> : Chef de service
<b>Nom</b> : REGAIEG	<b>Prénom</b> : Mohamed	<b>Fonction</b> : Défense du consommateur

**L'investigateur pressenti pour la réalisation de cet essai n'a pas pris part aux délibérations.**

**Ce Comité agit conformément aux Bonnes Pratiques Cliniques et aux Recommandations ICH.**

Le comité a adopté la décision suivante :

**Avis favorable**

Date de l'avis : 28-05-2013

Signature du Président du Comité d'Ethique



## **Annexe 2**

---

# Rotavirus P[8] Infections in Persons with Secretor and Nonsecretor Phenotypes, Tunisia

Siwar Ayouni, Khira Sdiri-Loulizi,  
Alexis de Rougemont, Marie Estienney,  
Katia Ambert-Balay, Serge Aho, Sabeur Hamami,  
Mahjoub Aouni, Mohamed Neji-Guediche,  
Pierre Pothier, Gaël Belliot

To determine whether rotavirus infections are linked to secretor status, we studied samples from children in Tunisia with gastroenteritis. We phenotyped saliva for human blood group antigens and tested feces for rotavirus. Rotavirus was detected in 32/114 patients. Secretor genotyping showed that P[8] rotavirus infected secretors and nonsecretors, and infection correlated with presence of Lewis antigen.

Each year, millions of persons worldwide suffer from acute gastroenteritis. Group A rotavirus is the leading cause of acute gastroenteritis in children <5 years of age. The disease causes ≈453,000 deaths annually, mostly in developing countries (1); however, the number of cases has declined in industrialized countries where vaccines have been recommended (2).

Recent findings showed that human blood group antigens (HBGAs) might be involved in rotavirus attachment to intestinal cells (3,4,5,6). Expression of the HBGAs (A, B, H, and Lewis antigens) in saliva and on the surface of intestinal cells is driven by the *FUT2* (A, B, and H antigens [secretor]) and *FUT3* (Lewis antigens) genes, which express type 2 and type 3 fucosyltransferases, respectively. Approximately 20% of the white population is homozygous for a recessive point mutation of the *FUT2* gene, which leads to the absence of A, B, and H antigen expression, also called the nonsecretor phenotype. There is also a Lewis-negative phenotype resulting from various mutations of the *FUT3* gene (7).

The entry of rotavirus into cells involves several factors. Human and porcine rotaviruses could specifically interact with H antigen type 1, Lewis b antigen, or Lewis a antigen through their viral protein (VP) 8 and VP5 during the attachment phase (3,4,8). Of note, the HBGA

binding profile is P genotype-dependent (4), and rotavirus infection correlates with the secretor and partial secretor phenotype (i.e., with active *FUT2* gene status) (5,6,9). However, in some studies, no association has been observed between HBGAs from blood cells (10), including Lewis antigens (11), and rotavirus infection. A recent epidemiologic survey of children in the region of Monastir, Tunisia, gave us the opportunity to determine whether rotavirus infections in children could be linked to secretor status and HBGAs.

## The Study

During November 2011–February 2012, feces and saliva samples were collected from 114 children <6 years of age who were seen for acute gastroenteritis at the Fattouma Bourguiba children's hospital (Monastir). For 98 of these patients, blood samples were also collected at symptom onset for *FUT2* genotyping by sequencing for the A385T and G428A nonsense mutations from total blood DNA (9). The study was approved by the Ethics Committee of the Fattouma Bourguiba University Hospital in Monastir, and informed consent was obtained from the parents of the 114 study participants.

The feces were first screened for the presence of group A rotavirus antigen by using the Premier Rotaclone detection kit (Meridian Bioscience, Inc., Paris, France). The remainder of the suspension was used for the extraction of nucleic acids by using a Nuclisens easyMAG system (bioMérieux, Marcy l'Étoile, France) according to the manufacturer's instructions. RNA was eluted in a final volume of 110 mL and used for the molecular detection and typing of rotavirus. Norovirus PCR detection is described elsewhere (12).

Samples positive for rotavirus by ELISA were further confirmed and genotyped by PCR as described previously (online Technical Appendix Table, <http://wwwnc.cdc.gov/EID/article/21/11/14-1901-Techapp1.pdf>). Of the 114 patients, 32 had confirmed rotavirus infections by ELISA and PCR. Of the 32 confirmed cases, 24 (75%) occurred during the cold season, and 26 (80%) occurred in children <14 months of age; the mean age for infected persons was 8.1 months. We used ELISAs to screen the saliva of rotavirus-positive patients for A and B antigens (anti-A and anti-B mouse IgG from DIAGAST, Loos, France), H antigen (anti-H specific IgM from Thermo Fisher Scientific, Villebon sur Yvette, France), and Lewis antigens (anti-Lewis a [clone 7LE] and anti-Lewis b [clone 2–25LE] hybridoma

---

Author affiliations: National Reference Center for Enteric Viruses, Dijon, France (S. Ayouni, A. de Rougemont, M. Estienney, K. Ambert-Balay, P. Pothier, G. Belliot); Monastir University, Monastir, Tunisia (S. Ayouni, K. Sdiri-Loulizi, M. Aouni); Public Hospital of Dijon, Dijon (S. Aho); Hospital Fattouma Bourguiba, Monastir (S. Hamami, M. Neji-Guediche)

DOI: <http://dx.doi.org/10.3201/eid2111.141901>

**Table 1.** Distribution of rotavirus and norovirus cases among 114 children <6 years of age by ABO blood group, Lewis phenotype status, and nonsecretor status, Tunisia, November 2011–February 2012\*

Phenotype	No. rotavirus-positive patients	No. norovirus-positive patients
ABO and Lewis antigen distribution in patients, N = 90		
O		
Le+, n = 37	12	21
Le-, n = 1	0	0
A		
Le+, n = 26	10	7
Le-, n = 1	0	0
B		
Le+, n = 16	4	4
Le-, n = 3	0	2
AB		
Le+, n = 6	2	1
Le-, n = 0	0	0
Nonsecretor group, Lewis antigen status, N = 24		
Positive, n = 24	4	7
Negative, n = 0	0	0
<b>Total</b>	<b>32</b>	<b>42</b>

\*All children had gastroenteritis. Paired saliva and feces specimens were collected from each patient (N = 114) and screened for the presence of ABO and Lewis antigens (saliva) and rotavirus and norovirus (feces). Le+, positive for Lewis antigen; Le-, negative for Lewis antigen.

supernatants; gift from Jacques Bara, INSERM U673). Among the secretor phenotype–positive rotavirus patients, no blood group antigen nor P or G genotypes (in feces specimens) were significantly overrepresented. For comparison, we assessed the distribution of ABO blood groups and Lewis antigens among patients with norovirus and rotavirus; no statistical difference was found (Table 1). Rotavirus infection was observed only in Lewis antigen–positive patients ( $p = 0.017$ , exact logistic regression); however, the prevalence of the Lewis antigen–negative phenotype in the population was low.

Among the 32 rotavirus isolates, 30 were genotype P[8] and 2 were genotype P[4] (Table 2). G9, G3, and G1 were the most common genotypes and were detected in 13 (40%), 8 (25%), and 7 (21%) of the cases, respectively. The G genotype could not be determined for 1 P[8] genotype isolate. Genotypes G1, G3, G4, and G9 were all associated with the P[8] genotype, and genotype G2 was associated with the P[4] genotype. Rotavirus G9P[8] strains were predominant ( $n = 12$ ), followed by G3P[8] ( $n = 8$ ) and G1P[8] ( $n = 7$ ) strains.

For 3 G9P[8] and 1 G3P[8] rotavirus-positive patients, saliva samples were negative for Lewis b antigen

**Table 2.** Distribution of ABO blood groups and Lewis antigens among 32 children <6 years of age infected with various rotavirus strains in Monastir, Tunisia, November 2011–February 2012\*

Isolated rotavirus strain, patient <i>FUT2</i> genotype	No. patients by ABO blood group and Lewis antigen status†								No. nonsecretor patients	
	O		A		B		AB		Le+	Le-
	Le+	Le-	Le+	Le-	Le+	Le-	Le+	Le-	Le+	Le-
G9P[8]	4	0	1	0	2	0	2	0	3	0
Se/Se	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0
Se/se	4	0	0	0	1	0	1	0	0	0
se/se	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0
G3P[8]	1	0	4	0	2	0	0	0	1	0
Se/Se	0	0	2	0	1	0	0	0	0	0
Se/se	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0
se/se	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
G1P[8]	4	0	3	0	0	0	0	0	0	0
Se/Se	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Se/se	4	0	2	0	0	0	0	0	0	0
G4P[8]	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Se/se	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
G2P[4]	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Se/Se	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
P[8]	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Se/Se	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
<b>Total</b>	<b>12</b>	<b>0</b>	<b>10</b>	<b>0</b>	<b>4</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>4</b>	<b>0</b>
Se/Se	1	0	4	0	2	0	1	0	0	0
Se/se	9	0	4	0	2	0	1	0	0	0
se/se	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0

\*Le+, positive for Lewis antigen; Le-, negative for Lewis antigen; Se/Se, homozygous secretor; Se/se, heterozygous secretor; se/se, nonsecretor.

†Human blood group antigen distribution was determined by using a typing assay with saliva samples

(mean absorbance at 450 nm was 0.25) and positive for the presence of Lewis a antigen (mean absorbance at 450 nm was 3.67), suggesting that the patients were Lewis-positive and nonsecretors. A total of 98 blood samples were genotyped by sequencing of the *FUT2* gene. Homozygous secretor, heterozygous secretor, and nonsecretor genotypes represented 23.47%, 54.08%, and 22.45% of the cohort, respectively. All nonsecretors (n = 22) harbored the G428A mutation. The A385T mutation was absent. Blood samples were available for 28 of the 32 rotavirus-positive patients. Of these 28 patients, 24 were homozygous and heterozygous secretors and 4 were nonsecretors. Because rotaviruses were P- and G-typed by PCR using VP4- and VP7-specific primers, we further confirmed the presence of rotavirus in samples from nonsecretor patients. For 3 of the samples, we used a TaqMan-based quantitative reverse transcription PCR with VP2-specific primers to detect rotavirus (13), and for 2 rotavirus isolates (GenBank accession nos. KP862856 and KP862857) for which feces samples were still available, we confirmed the P[8] genotype by sequencing.

### Conclusions

Our findings show that rotaviruses can infect secretor and nonsecretor Lewis antigen-positive persons, which suggests that rotavirus infection is not associated with the secretor phenotype or HBGA type. However, it should be noted that one limitation of our study was the small size of our cohort. A larger number of cases might provide new insights about the affinity of rotavirus toward certain types of HBGAs; a larger study with a more robust statistical analysis might confirm that rotavirus infections only occur in Lewis antigen-positive persons. In addition, we detected genotype P[8] rotavirus infection in both secretor and nonsecretor patients; this finding was not observed in previous studies (5,6,9). P[8] infection of nonsecretors might be associated with preexisting health conditions, and healthy nonsecretors might never be infected by P[8] rotavirus.

We and others (3,4,6) have characterized the secretor and Lewis phenotypes related to infection by rotaviruses. The interaction between rotavirus particles and HBGAs might constitute the first step in the attachment to the cell before internalization of the virus particle, after binding with integrins (4,5). However, other types of ligand, such as non-HBGA ligands and bacteria from intestinal flora, might also play a role during the infection process, as recently shown for noroviruses (14,15).

In conclusion, our data and that of others show that rotavirus infection might be correlated with genetic factors, such as HBGAs. Further studies will be required to determine the exact role of HBGA ligands and other ligands in rotavirus infection.

### Acknowledgments

We thank Jacques Bara for kindly providing us with Lewis-specific monoclonal antibodies; Philippe Daval, Céline Fremy, and the National Reference Center for Enteric Viruses for their technical support; and Philip Bastable for editorial assistance.

This study was supported by the National Reference Center for Enteric Viruses and the Public Hospital of Dijon, France. A fellowship from Campus France was awarded to S.A. (PHC-UTIQUE program).

Ms. Ayouni is currently a PhD student at the National Reference Center for Enteric Viruses (Dijon, France). Her research interests focus on the relation between human blood group antigens and enteric viruses, mainly rotavirus and norovirus.

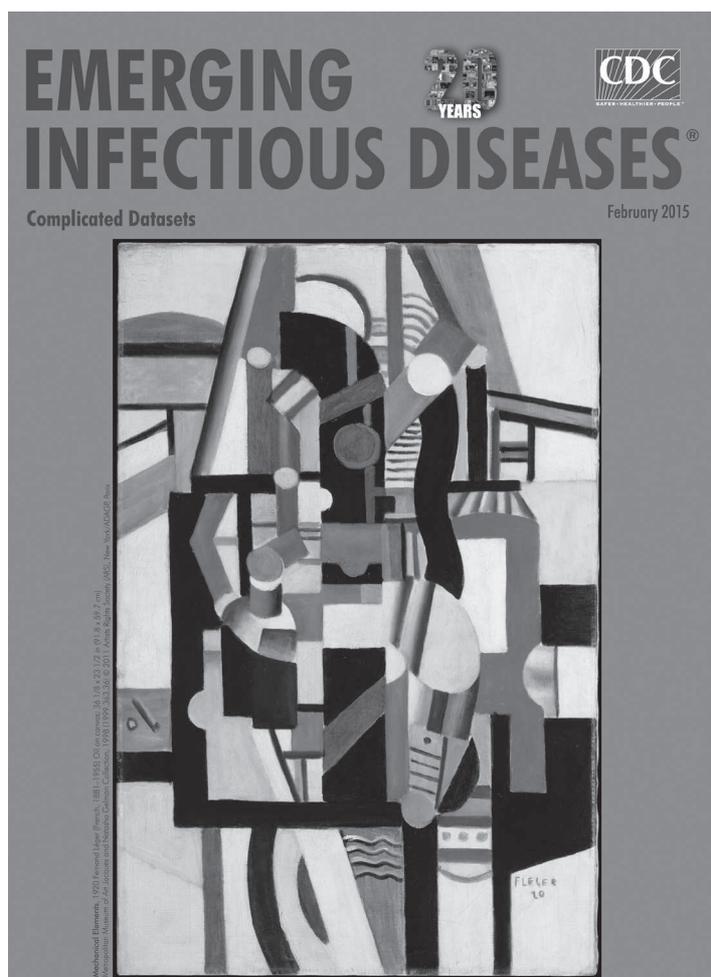
### References

1. Tate JE, Burton AH, Boschi-Pinto C, Steele AD, Duque J, Parashar UD, et al. 2008 estimate of worldwide rotavirus-associated mortality in children younger than 5 years before the introduction of universal rotavirus vaccination programmes: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis*. 2012; 12:136–41. [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(11\)70253-5](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(11)70253-5)
2. Lopman BA, Payne DC, Tate JE, Patel MM, Cortese MM, Parashar UD. Post-licensure experience with rotavirus vaccination in high and middle income countries; 2006 to 2011. *Curr Opin Virol*. 2012;2:434–42. <http://dx.doi.org/10.1016/j.coviro.2012.05.002>
3. Hu L, Crawford SE, Czako R, Cortes-Penfield NW, Smith DF, Le Pendu J, et al. Cell attachment protein VP8\* of a human rotavirus specifically interacts with A-type histo-blood group antigen. *Nature*. 2012;485:256–9. <http://dx.doi.org/10.1038/nature10996>
4. Huang P, Xia M, Tan M, Zhong W, Wei C, Wang L, et al. Spike protein VP8\* of human rotavirus recognizes histo-blood group antigens in a type-specific manner. *J Virol*. 2012;86:4833–43. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.05507-11>
5. Nordgren J, Sharma S, Bucardo F, Nasir W, Gunaydin G, Ouermi D, et al. Both Lewis and secretor status mediate susceptibility to rotavirus infections in a rotavirus genotype-dependent manner. *Clin Infect Dis*. 2014;59:1567–73. <http://dx.doi.org/10.1093/cid/ciu633>
6. Van Trang N, Vu HT, Le NT, Huang P, Jiang X, Anh DD. Association between norovirus and rotavirus infection and histo-blood group antigen types in Vietnamese children. *J Clin Microbiol*. 2014;52:1366–74. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.02927-13>
7. Grahn A, Elmgren A, Aberg L, Svensson L, Jansson PA, Lonnroth P, et al. Determination of Lewis FUT3 gene mutations by PCR using sequence-specific primers enables efficient genotyping of clinical samples. *Hum Mutat*. 2001;18:358–9. <http://dx.doi.org/10.1002/humu.1204>
8. Blanchard H, Yu X, Coulson BS, von Itzstein M. Insight into host cell carbohydrate-recognition by human and porcine rotavirus from crystal structures of the virion spike associated carbohydrate-binding domain (VP8\*). *J Mol Biol*. 2007;367:1215–26. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2007.01.028>
9. Imbert-Marcille BM, Barbe L, Dupe M, Le Moullac-Vaidye B, Besse B, Peltier C, et al. A *FUT2* gene common polymorphism determines resistance to rotavirus A of the P[8] genotype. *J Infect Dis*. 2014;209:1227–30. <http://dx.doi.org/10.1093/infdis/jit655>
10. Yazgan H, Keles E, Gebesce A, Demirdoven M, Yazgan Z. Blood groups and rotavirus gastroenteritis. *Pediatr Infect Dis J*. 2013;32:705–6. <http://dx.doi.org/10.1097/INF.0b013e318288a48f>

11. Ahmed T, Lundgren A, Arifuzzaman M, Qadri F, Teneberg S, Svennerholm AM. Children with the Le(a+b-) blood group have increased susceptibility to diarrhea caused by enterotoxigenic *Escherichia coli* expressing colonization factor I group fimbriae. *Infect Immun*. 2009;77:2059–64. <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.01571-08>
12. Kamel AH, Ali MA, El-Nady HG, de Rougemont A, Pothier P, Belliot G. Predominance and circulation of enteric viruses in the region of greater Cairo, Egypt. *J Clin Microbiol*. 2009;47:1037–45. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.01381-08>
13. Gutiérrez-Aguirre I, Steyer A, Boben J, Gruden K, Poljsak-Prijatelj M, Ravnikar M. Sensitive detection of multiple rotavirus genotypes with a single reverse transcription–real-time quantitative PCR assay. *J Clin Microbiol*. 2008;46:2547–54. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.02428-07>
14. Jones MK, Watanabe M, Zhu S, Graves CL, Keyes LR, Grau KR, et al. Enteric bacteria promote human and mouse norovirus infection of B cells. *Science*. 2014;346:755–9. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1257147>
15. Ruvoën-Clouet N, Magalhaes A, Marcos-Silva L, Breiman A, Figueiredo C, David L, et al. Increase in genogroup II.4 norovirus host spectrum by CagA-positive *Helicobacter pylori* infection. *J Infect Dis*. 2014;210:183–91. <http://dx.doi.org/10.1093/infdis/jiu054>

Address for correspondence: Gaël Belliot, Centre National de Référence des Virus Entériques, Laboratoire de Virologie/Plateau Technique de Biologie/CHU Dijon, 2 rue Angélique Ducoudray, BP37013, 21070 Dijon CEDEX, France; email: [gael.belliot@u-bourgogne.fr](mailto:gael.belliot@u-bourgogne.fr)

## February 2015: Complicated Datasets



### Including:

- Entry Screening for Infectious Diseases in Humans
- Timing of Influenza A(H5N1) in Poultry and Humans and Seasonal Influenza Activity Worldwide, 2004–2013
- Quantifying Reporting Timeliness to Improve Outbreak Control
- Tickborne Relapsing Fever, Bitterroot Valley, Montana, USA
- Evidence for *Elizabethkingia anophelis* Transmission from Mother to Infant, Hong Kong
- pH Level as a Marker for Predicting Death among Patients with *Vibrio vulnificus* Infection, South Korea, 2000–2011

<http://wwwnc.cdc.gov/eid/content/21/2/contents.htm>

Provided for non-commercial research and education use.  
Not for reproduction, distribution or commercial use.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/authorsrights>

## **Annexe 3**

# Relationship between GII.3 norovirus infections and blood group antigens in young children in Tunisia

S. Ayouni<sup>1,2</sup>, M. Estienney<sup>1</sup>, K. Sdiri-Loulizi<sup>2</sup>, K. Ambert-Balay<sup>1</sup>, A. de Rougemont<sup>1</sup>, S. Aho<sup>3</sup>, S. Hammami<sup>4</sup>, M. Aouni<sup>2</sup>, M. N. Guédiche<sup>4</sup>, P. Pothier<sup>1</sup> and G. Belliot<sup>1</sup>

1) National Reference Centre for Enteric Viruses, Public Hospital of Dijon, France, 2) Laboratory of Infectious Diseases and Biological Agents, Faculty of Pharmacy, Monastir, Tunisia, 3) Epidemiology and Infection Control Unit, Public Hospital of Dijon, Dijon, France and 4) Paediatric Department, University Hospital Fattouma Bourguiba, Monastir, Tunisia

## Abstract

Noroviruses (NoVs) constitute a major cause of gastroenteritis in Tunisia. One hundred and fourteen matched saliva and stool samples were collected from children ( $n = 114$ ) suffering from acute gastroenteritis at the hospital of Monastir during the winter season 2011–2012. For 98 of 114 children, blood samples were collected for secretor genotyping. NoVs were associated with 36.8% ( $n = 42/114$ ) of the gastroenteritis cases. The GII.3 genotype was the most common (69% of all NoVs). For patients who were phenotyped ( $n = 114$ ) for human blood group antigens (HBGAs), the secretor and non-secretor phenotypes represented 79% and 21%, respectively. Of the NoV infections, 83% were detected in all ABO groups. Five GII.3 isolates, one GII.1 isolate and one GII.7 isolate were detected in Lewis-positive non-secretors, confirmed by genotyping of the *FUT2* gene. Even though our data showed that GII.3 NoVs could infect non-secretors, no binding was observed with saliva and GII.3 baculovirus-expressed virus-like particles from the same symptomatic non-secretor individual. This suggests that other factors might also participate in NoV attachment in children and newborns.

Clinical Microbiology and Infection © 2015 European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** Children, gastroenteritis, HBGA, infection, norovirus, receptor

**Original Submission:** 12 January 2015; **Revised Submission:** 29 April 2015; **Accepted:** 11 May 2015

Editor: L. Kaiser

**Article published online:** 21 May 2015

**Corresponding author:** G. Belliot, Centre National de Référence des Virus Entériques, Laboratoire de Virologie/Plateau Technique de Biologie/CHU Dijon, 2 rue Angélique Ducoudray, BP37013, 21070 Dijon cedex, France  
**E-mail:** [gael.belliot@u-bourgogne.fr](mailto:gael.belliot@u-bourgogne.fr)

## Introduction

Each year, millions of people suffer from acute gastroenteritis (AGE) worldwide. Rotavirus and norovirus (NoV) are the main causative agents of gastroenteritis in all age groups. Group A rotavirus is the leading cause and human NoVs are the second leading cause of AGE in children aged <5 years. NoVs belong to one of the four genera constituting the *Caliciviridae* family, and

are divided into six genogroups, but only genogroup (G)I, GII and GIV infect humans. There are eight and 17 genotypes within GI and GII, respectively, according to VP1 coding sequence analysis [1]. Among NoVs, GII genotype 4 (GII.4) is globally the most predominant, and can be classified into subtypes or variants [2], which follow on one after the other as a global epidemic strain every 2 or 3 years [3].

The human blood group antigens (HBGAs) are involved in NoV attachment to intestinal cells [4]. Expression of the HBGA (A, B, H and Lewis antigens) in saliva and on the surface of intestinal cells is driven by the *FUT2* (A, B and H antigens) and *FUT3* (Lewis antigens) genes, which encode type 2 and type 3 fucosyltransferases, respectively [5]. Lewis antigen expression is also partly dependent on the ABO phenotype, as the *FUT3* enzyme elongates H type 1 antigen, which is controlled by the active *FUT2* enzyme. Approximately 20% of the Caucasian

population are homozygous for a recessive point mutation of the *FUT2* gene, which leads to the absence of A, B and H antigen expression, also called the non-secretor phenotype. There is also a Lewis-negative phenotype due to various mutations of the *FUT3* gene, as reviewed previously [6], but the percentage of genotype and allele mutations varies considerably with ethnicity [7,8].

Genetic differences may thus play a role in susceptibility to NoV infection in humans, as non-secretor individuals are not susceptible or are less susceptible than secretors to infection [9]. Indeed, HBGA ligands participate in NoV attachment at the surface of intestinal cells via amino acid residues that directly interact with the sugar moiety [4,10,11]. NoV infection mainly occurs in secretor individuals, among whom blood group O individuals are more likely to be infected by any NoV genotype [9,12–15]. NoV infection, mainly with GII.3 and GII.4, has also been reported in non-secretors, although the number of infected individuals was lower [12,13,16,17]. Nonetheless, susceptibility to NoV infection seems to be much more complex. Recent data have shown that adult non-secretor individuals infected with *CagA Helicobacter pylori* might become more susceptible because of abnormal expression of fucosylated motifs at the surface of intestinal cells, while it is absent from saliva [18]. Additionally, it has been shown that enteric bacteria from unfiltered stools, such as H antigen-expressing *Enterobacter cloacae*, promote *in vitro* infection of B-cells by human NoV [19].

A recent epidemiological survey of children in the Monastir region (Tunisia) allowed us to determine whether NoV paediatric infections were linked to secretor status and HBGAs. The observations regarding NoVs were further supported by the analysis of saliva from patients and the use of baculovirus-expressed synthetic particles from a strain that was isolated during the study in a non-secretor patient.

## Materials and methods

### Study design

One hundred and fourteen individual stool and saliva samples were collected from children aged <6 years who consulted for AGE at the Children's Hospital of Monastir (Tunisia) from January 2011 to August 2012. At the onset of the disease, blood samples were also collected from 98 of these 114 patients. The study was approved by the Ethics Committee of the Fattouma Bourguiba Public Hospital at Monastir (Tunisia) (committee decision of 9 May 2013), and informed consent was obtained from the parents of the 114 children. Blood and saliva samples were taken in the presence of the parents.

### NoV detection and typing

Viruses were screened for and characterized at the National Reference Centre for Enteric Viruses in Dijon, France. For each patient, 800 µL of a 10% stool suspension was prepared in phosphate-buffered saline (PBS) before extraction of nucleic acids with a Nuclisens Easy MAG system (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France), according to the manufacturer's instructions. RNA was eluted in a final volume of 110 µL.

Clinical specimens were first screened by real-time RT-PCR with Taqman technology. Five microlitres of RNA was used for the real-time RT-PCR assay, which was performed with an ABI Prism 7500 sequence detection system (Life Technologies, Saint Aubin, France), according to the manufacturer's instructions. For GI NoVs, the JJVIN/JJVIR primer pair and JJVIP and RING-1b probes were used [20]. For GII NoVs, the QNIF2d and COG2R primers were combined with the QNIF2 probe as described previously [21]. Samples giving Ct values of >40 were considered to be negative. The samples that were positive by real-time RT-PCR were then genotyped for the polymerase region with the JVI2/JVI3 primer pair for the polymerase [22]. For the capsid region, the GISKF/GISKR and G2SKF/G2SKR primer pairs were used for the amplification of GI and GII NoVs, respectively [23]. Following sequencing of the PCR products, the NoV genotypes were determined by alignments with reference sequences from GenBank by the use of MEGA5 software [24].

### Cloning of the GII.3 isolate, and production and purification of baculovirus-expressed virus-like particles (VLPs)

A GII.3 NoV isolate (SW4 strain) from a non-secretor Lewis-positive individual from the study was further characterized and cloned into a baculovirus system to produce VLPs for the saliva binding assay. The FW1/RT5 (Table S1) primer pair was used to amplify open reading frame (ORF)2, with the same PCR reagents and amplification conditions as described previously [25]. PCR products were cloned into the pGEM-T easy vector to generate a pGII.3-pGEM construct, which was later sequenced with primers FW1–FW5 and RT1–RT5 (Table S1). pGII.3-pGEM was used as the template to amplify ORF2 with the forward primer 5'-GAAGATCTATGAAGATGGCGTCAATGACGC-3', which contains a *Bgl*II site at the 5' end, (underlined), and RT5 as the reverse primer, which overlaps with ORF2 and ORF3 at the 3' and 5' ends, respectively. Amplified ORF2 with the *Bgl*II site was gel-purified and cloned into pGEM-T easy. One positive clone was digested with *Bgl*II and *Not*I and purified from gel before being cloned into transfer vector pVL1392 (BD Bioscience, Le Pont de Claix, France), which was entirely sequenced to determine the presence of any inadvertent mutations. The recombinant baculovirus was obtained by co-transfection of the pVL vector and the

linearized baculovirus genome into Sf9 cells, according to the manufacturer's recommendations (BD Bioscience). Following transfection, 20 clones were selected after plaque assay by ELISA with an in-house rabbit polyclonal antibody raised against GII.3. The recombinant baculovirus showing the highest optical density by ELISA was selected, and was cloned a second time by plaque assay. Thereafter, the inoculum of the selected recombinant baculovirus was amplified and titrated by infecting Sf9 at a multiplicity of infection of 0.1. The Sf9-produced inoculum was then used to infect Hi-5 cells (Life Technologies) at a multiplicity of infection of 5 with serum-free Express Five medium (Life Technologies). The cells were incubated for 6 days at 27°C prior to concentration and purification of the recombinant VLPs from infected cell lysates, as described previously [26,27].

#### Saliva typing for carbohydrates

Saliva samples were screened for the presence of A, B and O blood group and Lewis antigens. Saliva was boiled for 10 min, and then centrifuged at 3000 g for 2 min and then at 10 000 g for 10 min to pellet debris. The saliva samples were diluted 1000-fold in carbonate/bicarbonate buffer at pH 9.6, and incubated overnight at 37°C on an ELISA plate. On the following day, the plates were washed three times with PBS (pH 7.4) containing 0.05% Tween 20% (PBS-T). Non-specific sites were blocked with 4% skimmed milk–PBS for 2 h at 37°C, and then washed three times with PBS-T. A 4% skimmed milk–PBS solution was also used for the dilution of primary and secondary antibodies in a final volume of 100 µL per well. Anti-A and anti-B mouse IgG antibodies (Diagast, Loos, France) were diluted 5000-fold, and anti-H-specific IgM (Thermo Fisher Scientific, Villebon sur Yvette, France) was diluted 1000-fold. Supernatants from anti-Lewis a (clone 7LE) and anti-Lewis b (clone 2-25LE) hybridoma supernatants were diluted 1000-fold. 7LE and 2-25LE supernatants were kindly provided by J. Bara. The primary antibodies were incubated for 1 h (A, B and O blood group antigens) and 1.5 h (Lewis antigens) at 37°C. After three washes with PBS-T, 5000-fold-diluted peroxidase-conjugated anti-mouse antibodies (Vector/ABCYS, Paris, France) were incubated for 30 min at 37°C for the detection of anti-A-specific, anti-B-specific and Lewis-specific IgG. For the detection of anti-H-specific IgM, a 1000-fold dilution of peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgM antibodies (Southern Biotech/Clinisciences, Nanterre, France) was incubated for 45 min at 37°C. The plates were then washed four times with PBS-T. Peroxidase activity was detected with 100 µL of 3,3',5,5'-tetramethyl benzidine (KPL/Eurobio, Courtaboeuf, France). The reaction was stopped after 10 min of incubation at room temperature with 50 µL of 2 M HCl prior to reading of the absorbance at 450 nm.

#### Genotyping for the FUT2 phenotypes

The *FUT2* genotype was determined in the individuals from whom we had obtained blood samples ( $n = 98$ ). DNA was extracted from a 50-µL sample of whole blood with the QIAamp Blood DNA extraction kit (Qiagen, Les Ulis, France), according to the manufacturer's recommendations. The *FUT2* genotypes were determined by partial sequencing of the *FUT2* gene as described previously [28].

#### Saliva binding assay with VLPs

For GII.3 VLP binding, a preliminary assay showed that only a weak binding signal was obtained with 1000-fold-diluted saliva, and 100-fold-diluted saliva was therefore used for the assay. Five hundred nanograms of purified GII.3 VLPs was used for the assay. Bound VLPs were detected by the use of rabbit polyclonal GII.3-specific serum for 1 h at 37°C. Peroxidase-conjugated anti-rabbit antibodies were incubated for 30 min at 37°C. Peroxidase activity was detected with 3,3',5,5'-tetramethyl benzidine. The reaction was stopped after 20 min of incubation at room temperature with 2 M HCl prior to reading of the absorbance at 450 nm. Values below an optical density of 0.1 were arbitrarily considered to be negative.

#### Statistical analysis

StataCorp statistical software (StataCorp LP, College Station, TX, USA) was used for the statistical analyses. To determine whether NoV infected children at different ages, univariate analysis was performed with the Pearson chi-square test and Fisher's exact test. To determine whether NoV and GII.3 NoV infections were preferentially associated with ABO and Lewis antigens or secretor and non-secretor genotypes, multivariate analysis was conducted. Because of the small sample size, logistic regression models with a robust variance estimator (Huber/White/sandwich) or exact logistic regression models were used [29,30]. Variables with a significance level of  $p < 0.2$  were entered into the multivariate model. The final threshold for significance was set at  $p < 0.05$ .

## Results

#### Epidemiology and clinical features

One hundred and fourteen stool samples collected between January 2011 and July 2012 were screened for the presence of NoV. Eighty per cent of the samples were collected during the cold season from September 2011 to March 2012 (Table S2). Apart from one child aged 6 years, all of the children treated at the paediatric hospital were aged <24 months, and 80% were aged  $\leq 12$  months. On average, there were six diarrhoeal episodes per day at the peak of the disease. After diarrhoea, the

**TABLE 1.** Distribution of norovirus genotypes according to age group

Age (months)	Norovirus genotype			
	GII.1	GII.3	GII.4	GII.7
0–2	0	0	0	0
2–4	1	9	1 <sup>a</sup>	1
4–6	1	4	1 <sup>a</sup>	1
6–8	0	4	1 <sup>b</sup>	0
8–10	2	7	0	0
10–12	0	2	0	0
12–14	0	3	1 <sup>b</sup>	0
14–16	1	0	0	0
16–18	0	0	0	0
18–20	0	0	0	0
20–22	0	0	0	0
22–24	0	0	1 <sup>a</sup>	0
>24	1	0	0	0
Total	6	29	5	2

<sup>a</sup>Variant 2012 GII.4.  
<sup>b</sup>Variant 2010 GII.4.

most common symptoms were fever ( $n = 79$ ), vomiting ( $n = 56$ , mean of 4 episodes/day), and dehydration ( $n = 20$ ). Dehydration was mild ( $n = 8$ ) or moderate ( $n = 12$ ), with an average severity score between 4 and 5. No cases of severe dehydration were reported during the course of the study. NoVs were detected in 42 specimens. Thirty-five of the 42 NoV-positive samples were collected during the cold season (September 2011 to March 2012). Other NoV-positive samples were collected in January 2011 ( $n = 3$ ) and March 2011 ( $n = 3$ ). It is of note that one sample from August 2012 was also positive. The average age of infants infected with NoV was 7.8 months. Eighty per cent of the infections occurred in infants aged <10 months. Forty-two clinical specimens were positive for NoVs (Table 1). GII.3 was predominant, accounting for 69% of NoV cases. GII.3 isolates were detected in children aged between 2 and 14 months. The 29 GII.3 isolates belonged to the GII.2Ipol genotype in the polymerase region. GII.1 was the second most common genotype, accounting for 14.3% of all NoV cases, and was genotyped as GII.g in the polymerase region. Five GII.4 isolates were detected, and belonged to 2010 ( $n = 2$ ) and 2012 variants ( $n = 3$ ). GII.7 isolates were detected in two clinical

specimens, and were genotyped as GII.2Ipol in the polymerase region.

### HBGA phenotype and secretor genotype

One hundred and fourteen saliva samples corresponding to the 114 faecal specimens were phenotyped by ELISA for the presence of ABO HBGAs and Lewis antigens (Table 2). A, B and H blood group antigens were detected in 78.9% of saliva samples ( $n = 90$ ). For 24 samples, the presence of ABH blood group antigens was below the detection threshold. Among the 90 ABO-positive samples, 38 were O, 27 were A, 19 were B, and six were strongly positive for A and B, which characterizes the AB group. The Lewis antigen was detected in 109 individuals. Thirty-seven, 26 and 16 saliva samples were also positive for the Lewis antigen in O, A and B individuals, respectively. The six AB individuals were all positive for the Lewis antigen. For five individuals of the O ( $n = 1$ ), A ( $n = 1$ ) and B ( $n = 3$ ) types, representing 4.4% of the cohort, the Lewis antigen was not detected in the saliva samples. The strong reactivity of these 24 samples against the Lewis a-specific monoclonal antibody rather than against a monoclonal antibody raised against the Lewis b antigen suggested that the 24 individuals had a non-secretor phenotype (Fig. S1). To confirm this hypothesis, the FUT2 secretor phenotype was determined by genotyping the FUT2 gene by sequencing and partial sequencing of the FUT2 gene for 98 patients, including 22 of 24 individuals for whom saliva samples were Lewis a positive and ABO negative. We found that these 22 individuals, representing 22.45% of the study population, had a non-secretor genotype and possessed the mutation G428A. None of the samples showed the A385T mutation. For the other patients with positive saliva test results for either A, B or H antigens, 76 blood samples were available. Genotyping confirmed that they all had a secretor genotype. Among these 76 secretors, 23 (23.47% of the study population) were homozygous ( $Se^+/Se^+$ ) for the FUT2 gene, whereas 53 (54.08% of the study population) were heterozygous ( $Se^+/Se^-$ ). The age distribution for the HBGA phenotype is shown in Fig. S2.

**TABLE 2.** Distribution of ABO blood groups, Lewis antigens and secretor status among the patients from the cohort

	Lewis <sup>b</sup>	O		A		B		AB <sup>a</sup>		Non-secretors	
		+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
Phenotype <sup>c</sup> ( $n = 114$ )		37	1	26	1	16	3	6	0	24	0
Genotype <sup>d</sup> ( $n = 98$ )	$Se^+/Se^+$	6	1	8	0	6	0	2	0	0	0
	$Se^+/Se^-$	25	0	13	1	8	3	3	0	0	0
	$Se^-/Se^-$	0	0	0	0	0	0	0	0	22	0

<sup>a</sup>Individuals were positive for the presence of A and B antigens.

<sup>b</sup>Saliva samples were phenotyped for the presence of Lewis a and b antigens.

<sup>c</sup>Saliva samples were obtained from 114 patients, and phenotyped for the presence of ABO antigens.

<sup>d</sup>Among the 114 individuals, blood samples were collected for a subset of 98 patients. Allele distribution for the FUT2 gene:  $Se^+/Se^+$ , homozygous secretor;  $Se^+/Se^-$  heterozygous secretor;  $Se^-/Se^-$ , homozygous non-secretor.

**TABLE 3.** Distribution of secretor and non-secretor genotypes among norovirus-positive patients

	Secretors <sup>a</sup>		Non-secretors <sup>a</sup>
	Se <sup>+</sup> /Se <sup>+</sup> <sup>b</sup>	Se <sup>+</sup> /Se <sup>-</sup> <sup>b</sup>	Se <sup>-</sup> /Se <sup>-</sup> <sup>b</sup>
GII.3	5	18	5
GII.4	2	2	0
GII.7	1	0	1
GII.1	0	0	1

<sup>a</sup>Secretor and non-secretor genotypes were determined by sequencing for the nonsense mutations A385T and G428A for 35 of 42 norovirus-positive cases [28,40].

<sup>b</sup>Allele distribution for the *FUT2* gene: Se<sup>+</sup>/Se<sup>+</sup>, homozygous secretor; Se<sup>+</sup>/Se<sup>-</sup>, heterozygous secretor; Se<sup>-</sup>/Se<sup>-</sup>, homozygous non-secretor.

### Presence of NoVs and the FUT2 phenotype

To determine the relationship between the secretor status and the presence of NoV, paired faecal samples and blood samples, in addition to saliva samples, were analysed in 35 NoV-infected patients. The NoVs infected homozygous and heterozygous secretor individuals equally. However, for GII.3 NoV, the majority of the infections occurred in heterozygous secretor individuals (18 of the 29 infections; Table 3).

### Distribution of HBGAs in NoV-infected patients

NoVs were detected in secretor and non-secretor patients (Table 4), and all but two of these patients were Lewis positive. The predominant GII.3 isolates were detected in individuals who primarily belonged to group O ( $n = 15$ ), followed by individuals in group A ( $n = 6$ ). GII.3 isolates were also detected in group B and AB patients, and in non-secretors. Other NoV genotypes were detected in group O (GII.1 and GII.4), group A (GII.1), group B (GII.1, GII.4, and GII.7) and non-secretor Lewis-positive patients (GII.1 and GII.7). There was no significant association between NoV polymerase and capsid genotype and HBGA distribution.

### GII.3 SW4 strain binding profile of saliva

GII.3 NoV was detected in five stool samples from Lewis-positive non-secretor patients. To further characterize NoVs that infected non-secretor patients, the GII.3 SW4 strain was selected from a Lewis-positive non-secretor patient for whom

we had characterized stool, saliva and blood samples. The complete nucleic acid sequence of the SW4 ORF2 (Genbank KM056394) showed 98% nucleic acid identity with the GII.3 '693/425' paediatric strain from Australia (Genbank number KC464328) [31]. The VLPs were purified to >90% homogeneity following production and concentration from insect cells. The origin was confirmed with NoV-specific polyclonal serum (Fig. S3).

GII.3 SW4 VLPs were assayed on the 114 saliva samples collected (Fig. 1), and were found to bind to A, B and AB Lewis-positive saliva. The magnitude of the binding varied greatly from person to person. No binding was observed for the Lewis-negative O, A and B saliva ( $n = 5$ ). Residual binding to no binding was observed for O and non-secretor saliva. For the patient who provided samples from which the GII.3 VLPs were produced, no binding was observed with 100-fold-diluted and ten-fold-diluted saliva (data not shown), whereas a strong response for the presence of the Lewis a antigen was obtained with 1000-fold-diluted saliva.

## Discussion

A recent report from Tunisia showed that NoV affected 7.7% and 10.5% of non-hospitalized and hospitalized patients, respectively, between 2007 and 2010 [32]. GII NoVs were predominant over GI NoVs. Among GII NoVs, the GII.3 genotype became predominant during the winter of 2009–2010. Our data confirm that GII.3 NoVs mostly circulate in the paediatric population, as reviewed previously [33]. One hypothesis to explain why GII.3 NoVs were associated with paediatric cases is that the intestinal tract is mostly immature during the first years of life, and might provide a favourable environment for opportunistic infection by GII.3 NoVs.

As in previous reports, we observed that NoV infection mostly occurred in secretor individuals [12,13,34]. We observed that GII.3 and GII.7 isolates also affected Lewis-positive non-secretor individuals, as reported previously [12,17,35], whereas NoV infection has never been reported in Lewis-negative non-secretor individuals. This suggests that the

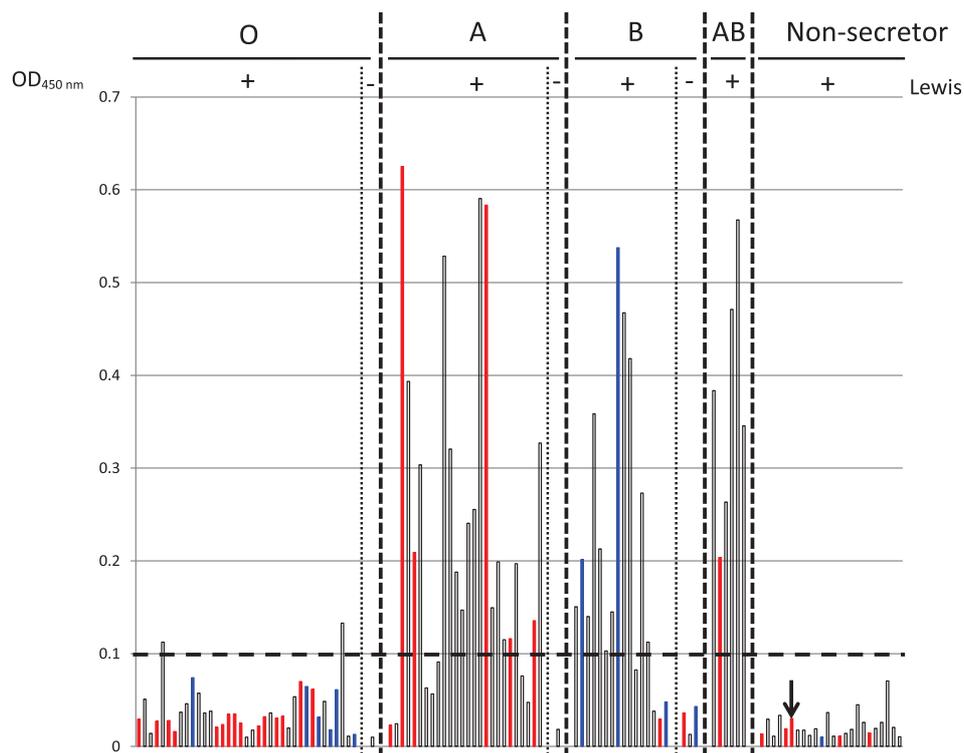
**TABLE 4.** Distribution in saliva of ABO blood groups and Lewis antigens among norovirus-positive cases

Lewis	O		A		B		AB		Non-secretors	
	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
GII.3	15	0	6	0	1	1	1	0	5	0
GII.4	3	0	0	0	1	1	0	0	0	0
GII.1	3	0	1	0	1	0	0	0	1	0
GII.7	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0
Total	21	0	7	0	4	2	1	0	7	0

Lewis antigen might play an essential role in NoV recognition by intestinal cells in non-secretor individuals. Nonetheless, VLPs from GII.3 NoV isolated from a chronically infected patient, and called the Chron I strain, could not bind a panel of non-secretor saliva samples [36]. Our study allowed us to characterize and to clone a GII.3 NoV strain isolated from a symptomatic non-secretor Lewis-positive patient. Our first objective was to determine whether this strain isolated from this non-secretor individual could bind the patient's own saliva and saliva from other non-secretors. As the VLPs did not bind non-secretor saliva, including the saliva of the patient from whom the isolate came, we formulated several hypotheses. We first hypothesized that there was no binding because HBGAs were absent from the saliva sample. This was very unlikely, as we observed strong binding to saliva for GII.4 VLPs (Fig. S4), and a marked signal was observed by ELISA for the presence of Lewis a antigen during phenotyping (Fig. S1). The second hypothesis was that the absence of binding could be due to an artefact. Indeed, it is possible that no binding was observed because the VLPs were not structurally sound. However, as the GII.3 VLPs

did bind with A and B saliva from secretor individuals, we concluded that the GII.3 VLP structure was correct. It is of note that we successfully used SW4 GII.3 VLPs in binding experiments with duodenum tissue from secretor individuals (Fig. S5), again demonstrating that the VLP conformation was correct. Binding for GII.3 VLPs, however, was markedly lower than that for GII.4 VLPs, as described previously [36,37] (Fig. S4). We then hypothesized that the presence of HBGAs in saliva did not reflect the ABO status at the intestinal level. This is very unlikely, because HBGAs are present in the intestine at birth, and persist for the first 2 years of life [38]. Moreover, Lewis, A and H antigen expression is complete in saliva at birth for term infants, whereas it is delayed in red blood cells [39]. Finally, in the event that the Lewis antigen does not participate in the attachment of NoV for non-secretor individuals, we hypothesized that non-HBGA ligands or precursor carbohydrates could constitute an alternative attachment pathway for NoVs during the first months of life.

Our data suggested that the HBGAs present in the saliva from young non-secretor individuals did not reflect the binding



**FIG. 1.** Saliva binding assays for the GII.3 SW strain. The value for each sample is represented by a bar on the graph. Binding values for patients infected with GII.3 and non-GII.3 noroviruses are indicated by red and blue bars, respectively. An arrow indicates the binding value of the patient for whom the GII.3 isolate found in the stool specimens was used for baculovirus-expressed virus-like particle production. The binding experiments were performed in duplicate for each sample, and the mean values are given on the graph (optical density (OD)<sub>450 nm</sub>; ordinate). The Lewis status is indicated at the top of the graph by minus (absence of Lewis antigen) and plus (presence of Lewis antigen) signs. The non-secretor and human blood group antigens are also indicated on the abscissa, and are separated by vertical dashed lines. The thick horizontal dashed line indicates the threshold below which the binding assay was arbitrarily considered to be negative.

capacity of NoV at the surface of intestinal cells. Other types of ligand might play a role during NoV infection. A recent study provided evidence of this, by showing that previous infections with CagA-positive *H. pylori* might interfere with HBGA expression [18]. Infection with *H. pylori* is, however, very unlikely in the first years of life. Nonetheless, immature carbohydrate-like type I chain precursors and non-HBGA ligands might contribute to the increased susceptibility of a large proportion of children to NoV infections. Recent findings have also suggested that certain bacteria (e.g. *E. cloacae*) from the microbiota might participate in NoV infection [19]. These findings support the notion that genetic and microbiological factors are at play during NoV infection. Synergistic and antagonistic effects remain to be determined in future studies.

### Transparency declaration

The authors declare that they have no conflicts of interest.

### Acknowledgments

This study was supported by the National Reference Centre for Enteric Viruses and the Public Hospital of Dijon, France. S. Ayouni was awarded a fellowship from Campus France (PHC-UTIQUE programme). We thank J. Bara for kindly providing us with Lewis-specific monoclonal antibodies. We thank L. Martin and G. Tarris for their technical support with the immunology experiments. We extend our thanks to P. Daval, the National Reference Centre for Enteric Viruses, for technical support, and P. Bastable for editorial assistance.

### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmi.2015.05.015>.

### References

- [1] Zheng DP, Ando T, Fankhauser RL, Beard RS, Glass RI, Monroe SS. Norovirus classification and proposed strain nomenclature. *Virology* 2006;346(2):312–23.
- [2] Eden JS, Hewitt J, Lim KL, Boni MF, Merif J, Greening G, et al. The emergence and evolution of the novel epidemic norovirus GII.4 variant Sydney 2012. *Virology* 2014;450–451:106–13.
- [3] Bull RA, White PA. Mechanisms of GII.4 norovirus evolution. *Trends Microbiol* 2011;19(5):233–40.
- [4] Marionneau S, Ruvoën N, Le Moullac-Vaidye B, Clement M, Cailleau-Thomas A, Ruiz-Palacois G, et al. Norwalk virus binds to histo-blood group antigens present on gastroduodenal epithelial cells of secretor individuals. *Gastroenterology* 2002;122(7):1967–77.
- [5] Marionneau S, Cailleau-Thomas A, Rocher J, Le Moullac-Vaidye B, Ruvoën N, Clement M, et al. ABH and Lewis histo-blood group antigens, a model for the meaning of oligosaccharide diversity in the face of a changing world. *Biochimie* 2001;83(7):565–73.
- [6] Grahn A, Elmgren A, Aberg L, Svensson L, Jansson PA, Lonnroth P, et al. Determination of Lewis FUT3 gene mutations by PCR using sequence-specific primers enables efficient genotyping of clinical samples. *Hum Mutat* 2001;18(4):358–9.
- [7] Soejima M, Munkhtulga L, Iwamoto S, Koda Y. Genetic variation of FUT3 in Ghanaians, Caucasians, and Mongolians. *Transfusion* 2009;49(5):959–66.
- [8] Cakir B, Pankow JS, Salomaa V, Couper D, Morris TL, Brantley KR, et al. Distribution of Lewis (FUT3) genotype and allele: frequencies in a biethnic United States population. *Ann Hematol* 2002;81(10):558–65.
- [9] Lindesmith L, Moe C, Marionneau S, Ruvoën N, Jiang X, Lindblad L, et al. Human susceptibility and resistance to Norwalk virus infection. *Nat Med* 2003;9(5):548–53.
- [10] Cao S, Lou Z, Tan M, Chen Y, Liu Y, Zhang Z, et al. Structural basis for the recognition of blood group trisaccharides by norovirus. *J Virol* 2007;81(11):5949–57.
- [11] Choi JM, Hutson AM, Estes MK, Prasad BV. Atomic resolution structural characterization of recognition of histo-blood group antigens by Norwalk virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105(27):9175–80.
- [12] Nordgren J, Nitiema LW, Ouermi D, Sempore J, Svensson L. Host genetic factors affect susceptibility to norovirus infections in Burkina Faso. *PLoS ONE* 2013;8(7):e69557.
- [13] Jin M, He Y, Li H, Huang P, Zhong W, Yang H, et al. Two gastroenteritis outbreaks caused by GII noroviruses: host susceptibility and HBGA phenotypes. *PLoS ONE* 2013;8(3):e58605.
- [14] Thorven M, Grahn A, Hedlund KO, Johansson H, Wahlfrid C, Larson G, et al. A homozygous nonsense mutation (428G→A) in the human secretor (FUT2) gene provides resistance to symptomatic norovirus (GGII) infections. *J Virol* 2005;79(24):15351–5.
- [15] Kindberg E, Akerlind B, Johnsen C, Knudsen JD, Heltberg O, Larson G, et al. Host genetic resistance to symptomatic norovirus (GGII.4) infections in Denmark. *J Clin Microbiol* 2007;45(8):2720–2.
- [16] Rydell GE, Kindberg E, Larson G, Svensson L. Susceptibility to winter vomiting disease: a sweet matter. *Rev Med Virol* 2011;21(6):370–82.
- [17] Van Trang N, Vu HT, Le NT, Huang P, Jiang X, Anh DD. Association between norovirus and rotavirus infection and histo-blood group antigen types in Vietnamese children. *J Clin Microbiol* 2014;52(5):1366–74.
- [18] Ruvoën-Clouet N, Magalhaes A, Marcos-Silva L, Breiman A, Figueiredo C, David L, et al. Increase in genogroup II.4 norovirus host spectrum by CagA-positive *Helicobacter pylori* infection. *J Infect Dis* 2014;210(2):183–91.
- [19] Jones MK, Watanabe M, Zhu S, Graves CL, Keyes LR, Grau KR, et al. Enteric bacteria promote human and mouse norovirus infection of B cells. *Science* 2014;346(6210):755–9.
- [20] Skraber S, Langlet J, Kremer JR, Mossong J, De Landtsheer S, Even J, et al. Concentration and diversity of noroviruses detected in Luxembourg wastewaters in 2008–2009. *Appl Environ Microbiol* 2011;77(15):5566–8.
- [21] Koo HL, Neill FH, Estes MK, Munoz FM, Cameron A, Dupont HL, et al. Noroviruses: the most common pediatric viral enteric pathogen at a large university hospital after introduction of rotavirus vaccination. *J Pediatr Infect Dis Soc* 2013;2(1):57–60.
- [22] Vinje J, Koopmans MP. Molecular detection and epidemiology of small round-structured viruses in outbreaks of gastroenteritis in the Netherlands. *J Infect Dis* 1996;174(3):610–5.

- [23] Kojima S, Kageyama T, Fukushi S, Hoshino FB, Shinohara M, Uchida K, et al. Genogroup-specific PCR primers for detection of Norwalk-like viruses. *J Virol Methods* 2002;100(1–2):107–14.
- [24] Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 2011;28(10):2731–9.
- [25] Kamel AH, Ali MA, El-Nady HG, de Rougemont A, Pothier P, Belliot G. Predominance and circulation of enteric viruses in the region of Greater Cairo, Egypt. *J Clin Microbiol* 2009;47(4):1037–45.
- [26] Belliot G, Noel JS, Li JF, Seto Y, Humphrey CD, Ando T, et al. Characterization of capsid genes, expressed in the baculovirus system, of three new genetically distinct strains of 'Norwalk-like viruses'. *J Clin Microbiol* 2001;39(12):4288–95.
- [27] de Rougemont A, Ruvoen-Clouet N, Simon B, Estienney M, Elie-Caille C, Aho S, et al. Qualitative and quantitative analysis of the binding of GII.4 norovirus variants onto human blood group antigens. *J Virol* 2011;85(9):4057–70.
- [28] Imbert-Marcille BM, Barbe L, Dupe M, Le Moullac-Vaidye B, Besse B, Peltier C, et al. A FUT2 gene common polymorphism determines resistance to rotavirus A of the P[8] genotype. *J Infect Dis* 2014;209(8):1227–30.
- [29] Mehta CR, Patel NR. Exact logistic regression: theory and examples. *Stat Med* 1995;14(19):2143–60.
- [30] Vach W. Regression models as a tool in medical research. Boca Raton FL: CRC Press, Taylor and Francis Group; 2013.
- [31] Mahar JE, Bok K, Green KY, Kirkwood CD. The importance of intergenic recombination in norovirus GII.3 evolution. *J Virol* 2013;87(7):3687–98.
- [32] Hassine-Zafrane M, Sdiri-Loulizi K, Kaplon J, Salem IB, Pothier P, Aouni M, et al. Prevalence and genetic diversity of norovirus infection in Tunisian children (2007–2010). *J Med Virol* 2013;85(6):1100–10.
- [33] Boon D, Mahar JE, Abente EJ, Kirkwood CD, Purcell RH, Kapikian AZ, et al. Comparative evolution of GII.3 and GII.4 norovirus over a 31-year period. *J Virol* 2011;85(17):8656–66.
- [34] Tan M, Jin M, Xie H, Duan Z, Jiang X, Fang Z. Outbreak studies of a GII-3 and a GII-4 norovirus revealed an association between HBGA phenotypes and viral infection. *J Med Virol* 2008;80(7):1296–301.
- [35] Carlsson B, Kindberg E, Buesa J, Rydell GE, Lidon MF, Montava R, et al. The G428A nonsense mutation in FUT2 provides strong but not absolute protection against symptomatic GII.4 norovirus infection. *PLoS One* 2009;4(5):e5593.
- [36] Rydell GE, Nilsson J, Rodriguez-Diaz J, Ruvoen-Clouet N, Svensson L, Le Pendu J, et al. Human noroviruses recognize sialyl Lewis x neoglycoprotein. *Glycobiology* 2009;19(3):309–20.
- [37] Shirato H, Ogawa S, Ito H, Sato T, Kameyama A, Narimatsu H, et al. Noroviruses distinguish between type 1 and type 2 histo-blood group antigens for binding. *J Virol* 2008;82(21):10756–67.
- [38] Larson G, Watsfeldt P, Falk P, Leffler H, Koprowski H. Fecal excretion of intestinal glycosphingolipids by newborns and young children. *FEBS Lett* 1987;214(1):41–4.
- [39] Arcilla MB, Sturgeon P. Perinatal expression of the Lewis and secretor blood group systems. *Biol Neonate* 1973;22(5):407–20.
- [40] Procter J, Crawford J, Bunce M, Welsh KI. A rapid molecular method (polymerase chain reaction with sequence-specific primers) to genotype for ABO blood group and secretor status and its potential for organ transplants. *Tissue Antigens* 1997;50(5):475–83.

1 **Supplemental material S1: Summary of the designed primers used to sequence the GII.3 NoV.**

2

Primer	Sequence	Polarity	Primer <sup>a</sup>	Amplification
Designation			Location	region
FW1	5'-ATGAAGATGGCGTCGAATGACG-3'	+	5085-5106	3' end ORF1
FW2	5'-GCGCAGCACAGATCACAATGTG-3'	+	5485-5506	ORF2
RT1	5'-TGTTGCGAACGTCAGGCATTG-3'	-	5554-5574	ORF2
FW3	5'-CACCTCTTAGGGCAAATAATTCTG-3'	+	5635-5658	ORF2
RT2	5'-AACCTAGAATTGGACATTCAG-3'	-	5788-5809	ORF2
FW4	5'-TGGGCGCGTCACCCTTGATGGTGAG-3'	+	5873-5897	ORF2
RT3	5'-CCATTTAGATTATCCAATTGT-3'	-	6029-6049	ORF2
FW5	5'-GCACAACCTAGGGCACATGAAGC-3'	+	6148-6169	ORF2
RT4	5'-GTCAACCCCAATGCCAACTGGGGTGAA-3'	-	6293-6293	ORF2
RT5	5'-TTATTGAATCCTTCTACGCC-3'	-	6712-6731	5' end ORF3

3

4 <sup>a</sup> The position of the primers refers to the GII.3 CBNU1 isolate (GU980585)

5

6  
7 **Supplemental material S2:** Number of clinical specimens collected during the study and number of  
8 norovirus-positive samples.

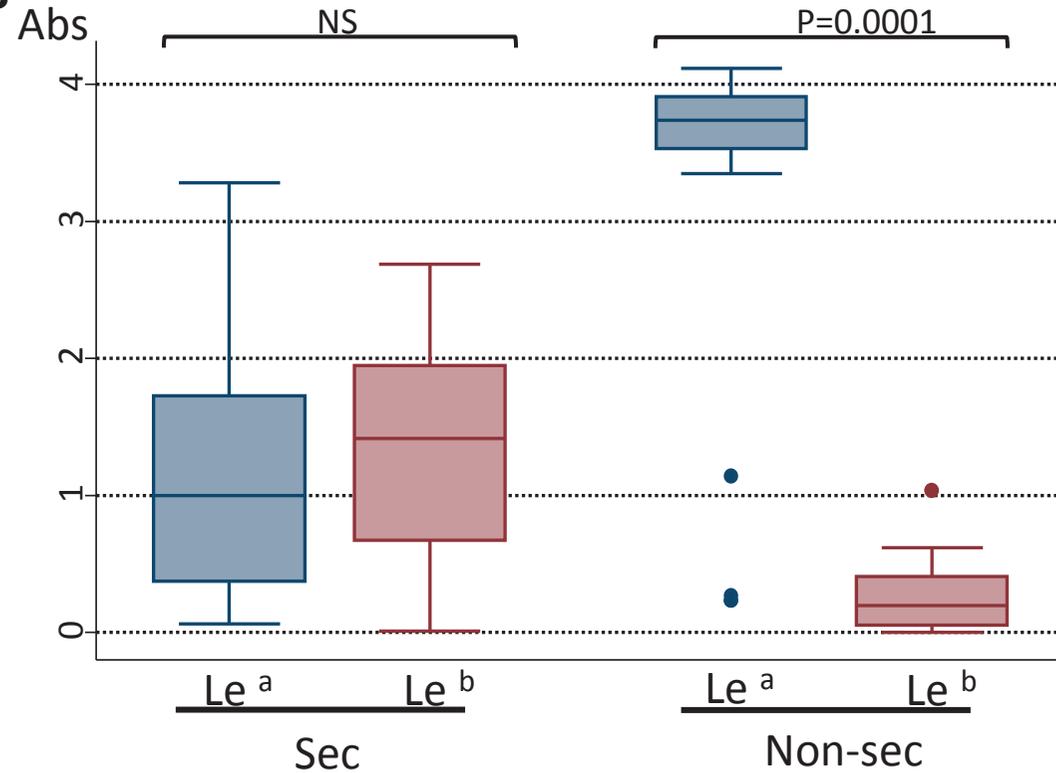
9

Collection date	Number of samples (pos sample for NoV) <sup>a</sup>
January 2011	5 (3)
March 2011	5 (3)
May 2011	1
July 2011	8
August 2011	2
September 2011	4 (1)
October 2011	27 (15)
November 2011	14 (4)
December 2011	17 (10)
January 2012	15 (1)
February 2012	13 (3)
March 2012	1 (1)
July 2012	1
August 2012	1 (1)
Total	114 (42)

10

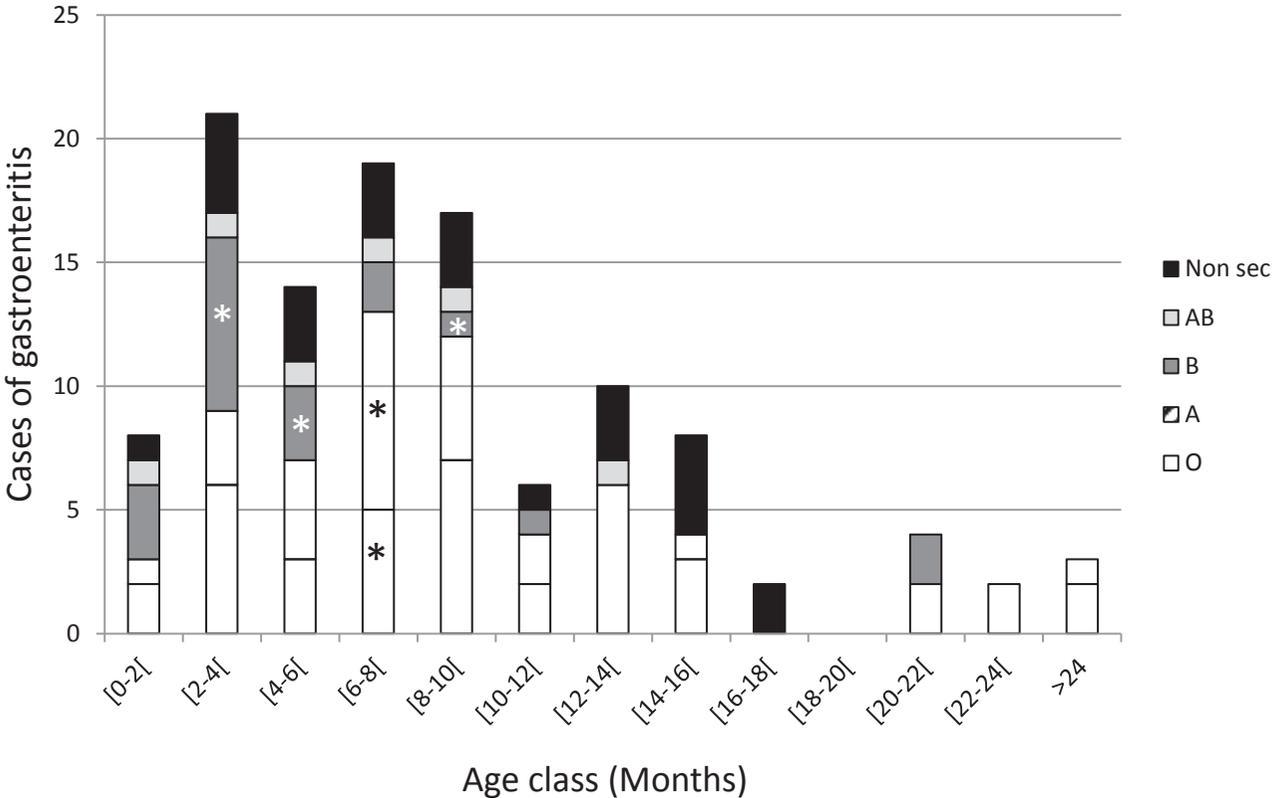
11 <sup>a</sup> Each sample corresponds to one patient

### Supplemental S3



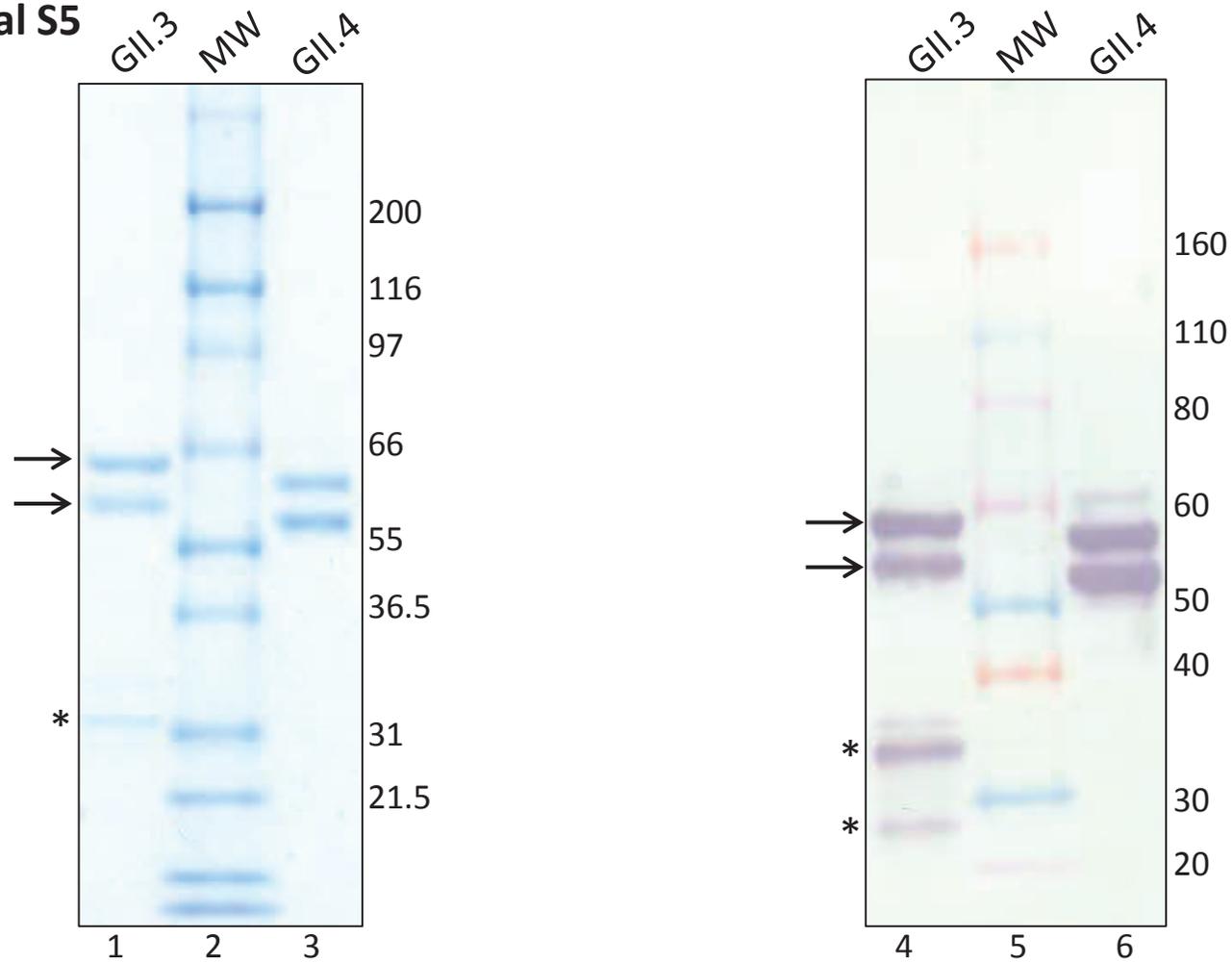
Distribution of the absorbance values for Lewis antigens in secretor (presence of ABO antigens) and non-secretor individuals (absence of ABO antigens). Saliva samples were used for phenotyping the Lewis a and Lewis b antigens using specific monoclonal antibodies. The patients belonged to secretor (Sec) or non-secretor (non-sec) phenotypes, which are indicated below the graphs. The distribution of absorbance (Abs) values for each antigen is represented by a box plot. Boxes correspond to the range between the first and third quartile. The median is indicated by a horizontal line within each box. Statistical analysis was performed with STATA software. The distribution of the absorbance for each antigen was analyzed by Kruskal-Wallis analysis of variance. The dots represent a sample with a value corresponding to 3 box lengths from the lower edge of the box plot. The specificity of each monoclonal antibody used for the detection of the antigens is indicated below the abscissa. Absorbance is indicated on the ordinate.

# Supplemental S4



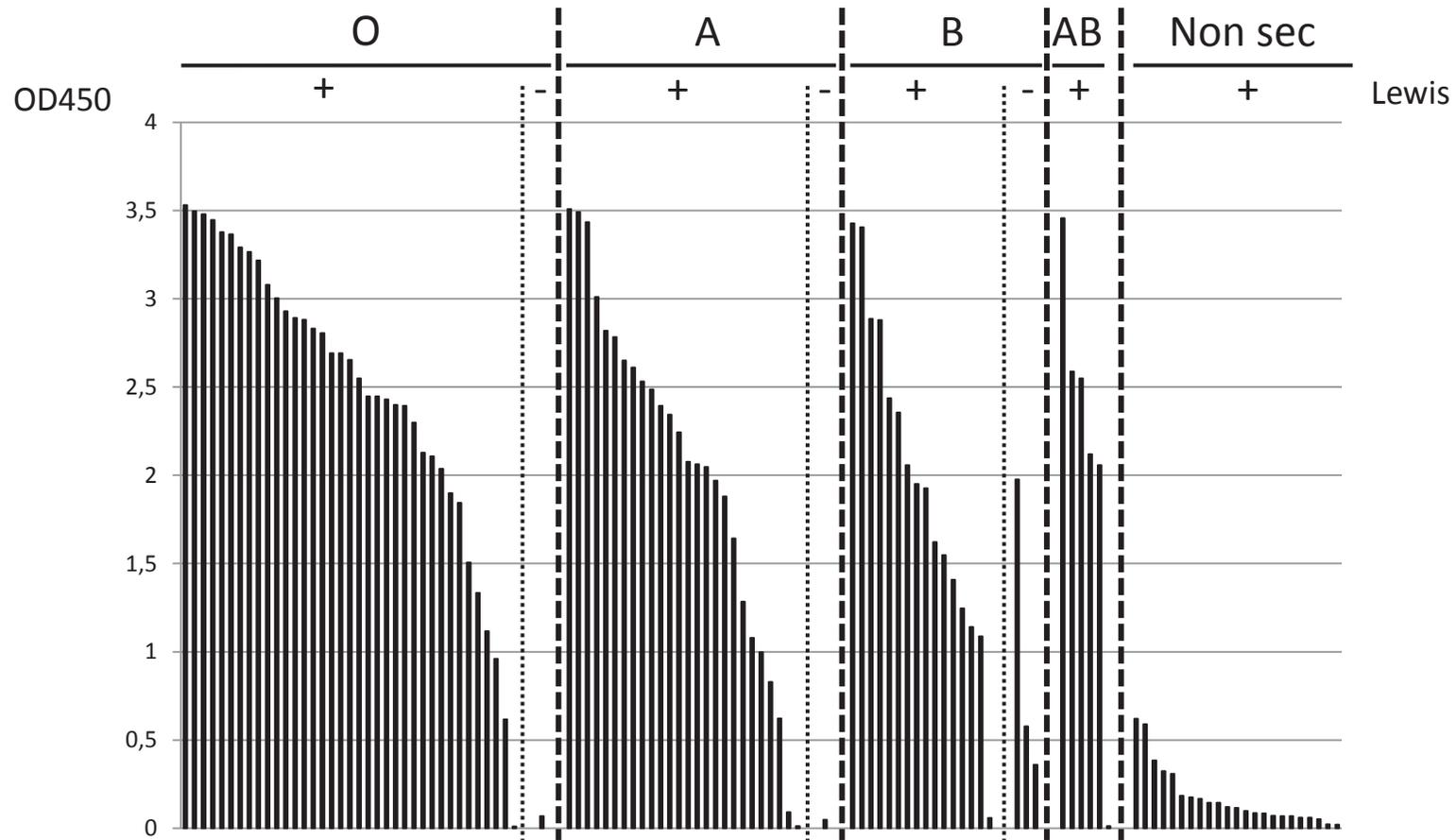
Age distribution for the HBGA phenotype among the 114 individuals from the cohort. HBGA typing was performed on saliva. Specimens from Lewis negative individuals (N=5) are indicated by an asterisk. The HBGA legend is indicated on the right side of the graph. Age class is indicated in months below the graph.

### Supplemental S5



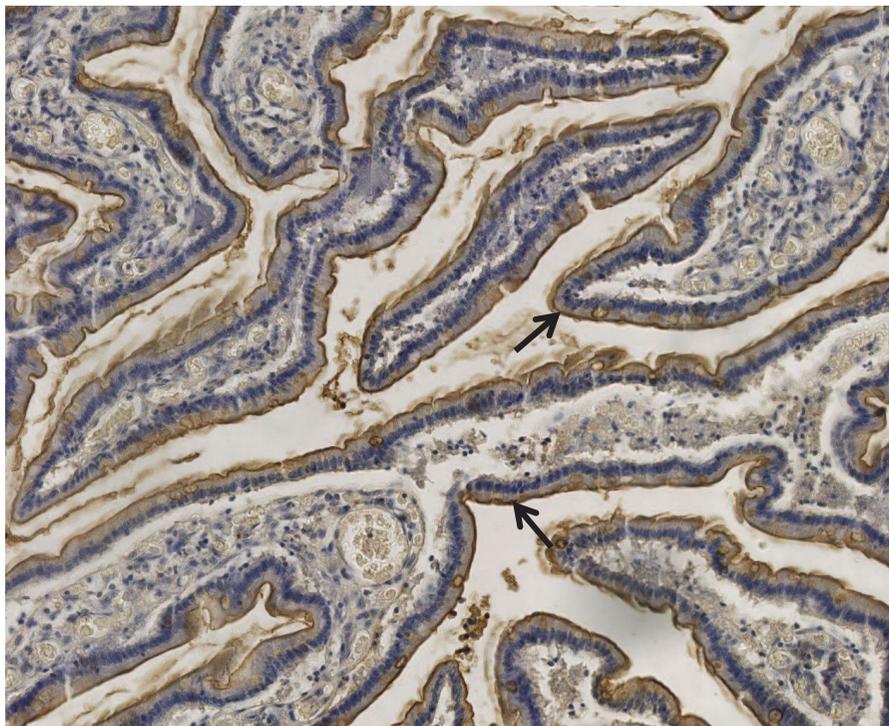
Characterization of the purified VLPs of the GII.3 (SW isolate lanes 1 and 4) and GII.4 Osaka variants (lanes 3 and 6). Two micrograms of VLPs were resolved by SDS-PAGE using NUPAGE gel (Life Technologies). The gel was rinsed with water and stained with Coomassie blue (Lanes 1 to 3). In the second experiment, the gel was rinsed and transferred on to a nitrocellulose membrane for western blot (Lanes 4 to 6) using in-house polyclonal serum. The genotype of the NoV strain is indicated above the gels. Complete and truncated forms of the VP1 protein are indicated by arrows. Degradation products of VP1 are indicated by asterisks. Lanes 2 and 5 contain the protein molecular size markers that are indicated on the right side of the gels.

## Supplemental S6



Saliva binding assays of the GII.4 Osaka variant using saliva samples from the cohort (N=113 since 1 missing for a non-secretor). The binding experiments were performed in duplicate for each sample, and the mean values are given on the graph (OD450; ordinate). The Lewis status is indicated on the abscissa by minus (absence of Lewis antigen) and plus (presence of Lewis antigen) signs. The non-secretor (non sec) and HBGAs are also indicated on the abscissa and are separated by dashed lines.

## Supplemental S7



Six  $\mu\text{m}$ -thick section of FFPE duodenal tissue was incubated with 5  $\mu\text{g}$  of purified VLP (GII.3 SW strain) overnight at 4°C, following dewaxing and rehydration. The section was washed and incubated with an in-house GII.3-specific serum for 1 h at room temperature, and then washed three times with PBS prior to incubating rabbit-specific antibody conjugated to peroxidase. Secondary antibody was incubated for 45 min at 37°C. Finally, after three washes with PBS, the section was incubated with ready-to-use 3,3'-Diaminobenzidine for 1 min at room temperature. Specific labeling of the VLP leads to a brown staining. Immunostaining is located on the apical pole of epithelial cells of the duodenal mucosa (medium magnification) and is indicated by arrows.