
Huîtres et norovirus : une affinité particulière ?

Françoise S. Le Guyader^{1,*}, Haifa Maalouf¹, Jacques Le Pendu²

¹ IFREMER, Laboratoire de Microbiologie- LNR, BP 21105- 44311 Nantes cedex 03,

² INSERM, UMR 892 - CNRS, UMR 6299- Université de Nantes, 44007 Nantes

Corresponding author : Françoise S. Le Guyader, email address : Soizick.Le.Guyader@ifremer.fr

Résumé :

Les coquillages sont identifiés depuis longtemps comme un aliment à risque et, malgré la mise en place d'une norme sanitaire basée sur des critères bactériens, ils restent impliqués dans des épidémies, le plus souvent de gastro-entérites aiguës. Les pathologies induites sont relativement bénignes et dues à la présence de norovirus dans les coquillages consommés. L'analyse des données publiées montre une implication importante des huîtres et une forte proportion de souches de norovirus du génogroupe I, à l'inverse des cas de transmission de personne à personne qui impliquent très majoritairement des souches du génogroupe II. Des études réalisées *in vitro*, *in vivo* et dans l'environnement ont montré que l'huître n'est pas juste un filtre passif, mais qu'elle peut sélectionner certaines souches de norovirus grâce à des ligands de type carbohydate, très proches de ceux qu'utilisent ces virus pour infecter l'homme. Ces observations contribuent à expliquer l'épidémiologie particulière observée lors des épisodes de gastroentérite liés à la consommation d'huîtres.

Mots-clés : huîtres ; norovirus ; ligand ; sélection de souches

Abstract :

Shellfish can be a vector for human pathogens. Despite regulation based on enteric bacteria, shellfish are still implicated in viral outbreaks. Oysters are the most common shellfish associated with outbreaks, and noroviruses, which cause acute gastroenteritis, are the most frequently identified pathogen in these outbreaks. Analysis of shellfish-related outbreak data worldwide shows an unexpected high proportion of genogroup I strains. Recent studies performed *in vitro*, *in vivo* and in the environment indicate that oysters are not just a passive filter, but can selectively accumulate norovirus strains based on virus carbohydrate ligands shared with humans. These observations may help explain the GI/GII bias observed in shellfish-related outbreaks compared to other outbreaks.

Keywords : oysters ; norovirus ; ligand ; strain selection.

1. Introduction

La présence de virus entériques humains dans des coquillages est un problème connu depuis de nombreuses années. L'intérêt gastronomique et culturel porté aux coquillages dans notre pays justifie que l'on essaye de prévenir ces contaminations. Comprendre comment ces virus humains arrivent au contact des coquillages constitue un premier élément important [1]. Le second point clé est d'étudier la bioaccumulation des particules virales par le coquillage et la distribution de ces virus dans les divers tissus du coquillage. La démonstration que la majorité des virus était localisée dans les tissus digestifs comparativement aux autres tissus a permis d'optimiser les méthodes de détection en ciblant ces organes pour l'analyse [2]. Cependant de nombreux questionnements demeurent, en particulier pour les norovirus (NoV), principal agent pathogène rencontré dans les huîtres à l'heure actuelle [3].

2. Les norovirus

Les NoVs appartiennent à la famille des *Caliciviridae*, petits virus ronds non enveloppés de 27 à 35 nm de diamètre, possédant un ARN monocaténaire. Comme de nombreux virus à ARN, les NoVs présentent une importante variabilité génomique et sont répartis en cinq génogroupes (G), de nombreuses souches étant en attente de classement [4]. Les souches humaines appartiennent aux GI, GII et GIV, les souches animales essentiellement aux GIII et GV [5]. Cette classification est basée sur l'ORF2, codant l'unique protéine de capsid VP1 (associée en 90 dimères). Cette protéine VP1 est composée de plusieurs domaines, un domaine N-terminal (AA 1 à 217) à l'intérieur de la capsid, un domaine S intermédiaire (AA 218 à 225) et un domaine P (AA 226 à 530) protubérant exposé à la surface de la capsid. Le domaine P est divisé en deux sous-domaines, le sous-domaine P1, dont la variabilité de séquence est limitée et le sous-domaine P2 (AA 275 à 405). Cette région P2, exposée à la surface de la capsid, présente une très grande variabilité de séquence, avec des conséquences pour l'infection chez l'homme [5, 6].

Ces virus sont responsables de gastroentérites toutes classes d'âge confondues, caractérisées par des vomissements et diarrhées [5]. La prévalence des vomissements associée à une période d'incubation courte (1-2 jours) et une brièveté des signes cliniques (1-3 jours) constituent des éléments épidémiologiques pour identifier une épidémie à norovirus [5]. La dose infectieuse 50% est faible et a été estimée inférieure à 18 virions [7]. Ces dernières années il a été démontré que l'infection était liée à un facteur génétique et que ces virus se fixent sur les antigènes de groupe sanguins tissulaires, sucres complexes présent à la surface de différents types de cellules. Ces antigènes constituent des facteurs d'attachement nécessaires à l'initialisation de l'infection [6, 8]. Si la plupart des souches reconnaissent ces antigènes elles peuvent présenter des spécificités variées, permettant à ces virus, collectivement, de reconnaître la totalité de la diversité génétique humaine définie par ces antigènes [6, 8]. La diversité virale a pour conséquence que toute personne peut être infectée et les norovirus sont responsable de 73 à 95% des gastroentérites aiguës (voir Ruvoën-Clouet *et al.* dans ce même numéro). Les souches du génogroupe II sont majoritaires dans les cas de gastroentérite clairement identifiés et, ces 15 dernières années les données obtenues au niveau mondial montrent que les souches de GII.4 sont impliquées dans 70% des cas cliniques [6, 9, 10].

3. Caractérisation de ligands chez l'huître.

Pour se nourrir, l'huître filtre l'eau de mer et retient les particules au niveau de ses branchies. Ces particules sont ensuite dirigées vers les palpes labiaux puis la bouche avant de pénétrer dans le système digestif (*figure 1*). Pendant longtemps, les huîtres étaient considérées comme des filtres ou des pièges ioniques, accumulant passivement les particules virales, comme toutes autres particules. Cependant, des différences de comportement existent entre virus et bactéries indicatrices de contamination fécale (coliformes fécaux ou *E. coli*) ou avec des phages F+ RNA spécifiques, conduisant, par ailleurs, à les exclure comme indicateur d'un risque viral. Des liaisons mécaniques, chimiques directes, de type Van der Waals, hydrogène ou autres liaisons ioniques ont été suggérées pour expliquer l'accumulation de divers virus (reovirus enterovirus ou phages) [11-14]. De plus, la rapidité de la contamination des huîtres en particulier observée pour les NoVs et la persistance de ces virus dans le coquillage soulèvent des interrogations. Elles suggèrent que l'hypothèse d'une simple accumulation non spécifique comme pour toute autre particule, est probablement simpliste et qu'un mécanisme plus élaboré doit exister. Considérant ces observations nous avons analysé certains mécanismes permettant d'expliquer ces différences. Notre réflexion était également orientée par les découvertes de fixation des NoVs humains aux antigènes tissulaires de groupes sanguins [15-17]. Compte-tenu de l'influence de ces ligands sur l'épidémiologie des NoVs et sur leur évolution moléculaire, nous avons considéré que l'hypothèse de la présence de ligands spécifiques dans les coquillages méritait d'être évaluée.

3.1. Pseudo particules virales (VLP)

L'étude de la fixation des NoVs dans les tissus d'huîtres présente plusieurs défis liés aux qualités intrinsèques des coquillages (physiologie, filtration...), mais également au modèle de virus choisi, les NoVs. En effet, outre leur extrême variabilité génomique, ces virus ne sont pas cultivables. Dans ces conditions, seules les selles de personnes infectées peuvent constituer une source de particules virales, avec les inconvénients associés (taux d'excrétion dans les selles variables, manipulations difficiles, purification et concentration des particules délicates). Ces écueils ayant été rencontrés auparavant par de nombreuses autres équipes, la production de pseudo-particules virales (VLPs) du virus de Norwalk a été réalisée il y a maintenant 20 ans [18]. Ces VLPs, préparées depuis à partir de nombreuses souches, sont devenues l'outil privilégié pour étudier les propriétés structurales et biologiques des NoVs [19, 20].

3.2. Virus de Norwalk (GI.1).

Les premiers essais ont été réalisés avec le virus de Norwalk, prototype du GI. Après immersion pendant 12 à 24 heures dans une eau de mer contenant une suspension de selle d'un volontaire humain infecté par ce virus ou des VLPs de cette même souche, les huîtres ont été fixées dans le formaldéhyde pour permettre des tests d'immuno-histochimie (IMH). L'utilisation d'un anticorps monoclonal montre une fluorescence localisée essentiellement au niveau des tubules digestifs (Figure 2). La présence de particules est détectable dans le lumen des tubules et conduits digestifs ou dans les phagocytes localisés entre les cellules épithéliales ou dans le tissu conjonctif.

Cette localisation observée après bioaccumulation montre que le virus se fixe aux tubules digestifs (TD) et que les particules pénètrent ensuite dans le tissu conjonctif. Des coupes non contaminées ont été préparées et des VLPs mises en contact sur ces coupes. La fixation des VLPs est observée au niveau de l'œsophage, des tubules digestifs mais pas dans les tissus environnants confirmant le phénomène actif observé après bioaccumulation.

S'inspirant des études caractérisant ces ligands chez l'homme, les tissus ont été traités par le périodate de sodium à différentes concentrations ou par des lectines avant application des VLPs [15-17]. Pour d'autres essais, les VLPs ont été préalablement incubées avec des mucines salivaires humaines porteuses d'antigènes de groupes sanguins tissulaires de différents types avant dépôt sur les lames (Tableau 1). Ces essais et l'utilisation d'anticorps humains (anti-A, anti-B, anti-H, anti-Lewis) ont montré que la fixation des VLPs chez l'huître creuse *Crassostrea gigas* passait par des structures de type groupe sanguin tissulaire possédant un résidu N-acetylgalactosamine terminal (antigène A-like) lié en position alpha [21]. Des résultats similaires ont ensuite été obtenus chez une autre espèce d'huître (*Crassostrea virginica*) [22]. La présence à priori surprenante de l'antigène A, dans la fraction polysaccharidique des viscères de l'huître (*Crassostrea gigas*), avait été signalée il y a de nombreuses années sans qu'aucune signification biologique ne puisse lui être attribuée [23]. Pour confirmer l'hypothèse de la reconnaissance spécifique d'un ligand antigène A-like dans le processus de bioaccumulation et de localisation de cette souche Norwalk au niveau des TD, des expériences de bioaccumulation ont été réalisées avec des VLPs mutées de cette même souche, deux mutants ne reconnaissant plus l'antigène A [20]. Comme observé lors des tests utilisant différents glycanes, la substitution, dans le sous-domaine P2 de la protéine VP1 (domaine de reconnaissance de l'antigène A-like) de l'histidine en position 329 (H329) et le tryptophane en position 375 (W375) par l'alanine, induit une perte de reconnaissance du ligand antigène A-like dans les TD de l'huître et réduit l'efficacité de la bioaccumulation. Ces deux VLPs mutantes, H329A et W375A, sont détectées dans le tissu conjonctif après bioaccumulation, mais en quantité bien moindre que les VLPs prototype et N331A (substitution de l'asparagine en position 331) (Figure 3). La similitude de ces observations avec celles réalisées sur les salives ou globules rouges humains confirme que le site de reconnaissance chez l'homme et chez l'huître pour cette souche est identique [20, 24]. La bioaccumulation faible, mais observable des mutants ayant perdu la capacité de reconnaître le ligand peut s'expliquer par des interactions non spécifiques entre virus et tissus d'huîtres, comme suggéré auparavant pour les entérovirus ou réovirus [11-13].

3.3. Souches du GII

Comme indiqué précédemment les NoVs présentent une diversité génétique importante, diversité se reflétant par une différence de reconnaissance des antigènes tissulaires des groupes sanguins, y compris au sein d'un même génogroupe. Pour évaluer si ces différences existent également chez l'huître, des VLPs GII.4, souche majoritaire dans les cas cliniques observés depuis quelques années, ont été mises en contact avec des coupes de tissus d'huître. Comme attendu considérant que les GII.4 ne reconnaissent pas les mêmes glycanes que les souches de GI.1, des différences de fixation ont été observées dans les tissus d'huîtres avec une fixation des VLPs sur le tractus digestif, mais également sur les branchies et sur le manteau, fixation non observée pour les GI.1 (figure 4). Le traitement préalable des tissus par le périodate de sodium, des glycosidases ou par des lectines saturant des sites glycaniques a montré que ces VLPs reconnaissent l'antigène A-like dans les tissus digestifs, et un acide sialique en liaison $\alpha 2,3$, responsable de la fixation dans les branchies ou le manteau, et les tissus digestifs (Tableau 1). Le rôle de l'acide sialique, trouvé majoritairement sous forme libre dans l'hémolymphe, n'est pas clairement élucidé [25].

3.4. Rôle des hémocytes ?

Après bioaccumulation, l'observation microscopique montre l'association des VLPs avec des cellules isolées présentes dans les divers tissus de l'huître qui correspondent à des hémocytes. Ces cellules existent sous diverses formes et certains types d'hémocytes jouent un rôle essentiel dans la défense de l'organisme en phagocytant les particules étrangères, les agents pathogènes ou en les encapsulant en formant des kystes. Ils interviennent également dans la reconnaissance et la dégradation d'agents extérieurs par la sécrétion

intra ou extracellulaire de lectines ou d'enzymes et par la production de radicaux libres [26] [25]. Nos observations ne permettent pas à l'heure actuelle d'expliquer le devenir de ces particules. Un axe de recherche futur sera d'évaluer l'impact des hémocytes sur une éventuelle protection des particules virales, considérant que les NoVs peuvent persister plusieurs semaines dans les huîtres.

3.5. Influence des saisons.

Pour comparer plus aisément les diverses souches et échantillons, un test ELISA permettant de quantifier la fixation des VLPs ou des virus a été développé basé sur la fraction soluble extraite des tissus de coquillages broyés. En prenant en compte les différents contrôles, un ratio de fixation spécifique peut être calculé pour chaque échantillon [24]. Ce test a corroboré les résultats décrits ci-dessus montrant pour les VLPs GI.1 une reconnaissance uniquement des tissus digestifs mais pas des branchies et manteaux, tandis que des VLPs GII.4 ou GII.3 reconnaissent les trois tissus (Tableau 2). Le suivi mensuel pendant 18 mois d'un lot d'huître montre une variation de l'expression du ligand antigène A-like. Ainsi, les ratios obtenus entre les mois de janvier à mai ($R = 10,9 \pm 3,6$) sont significativement différents des ratios observés pendant les mois de juin à décembre, ($R = 4,4 \pm 1,1$) ($p = 4,8 \times 10^{-12}$) (Figure 5). Cet effet n'est pas observé pour la fixation des VLPs GII.4. Les mécanismes responsables de cette variation d'expression du ligand antigène A-like ne sont pas connus, mais ils pourraient être associés à de nombreux facteurs liés à la physiologie du coquillage, aux conditions environnementales, à la concentration en chlorophylle A, au phytoplancton...[27].

4. Impact des ligands sur la contamination des huîtres.

L'huître étant un animal vivant il est important de vérifier si les observations réalisées sur les coupes ou par ELISA ont un lien avec une bioaccumulation active des particules par l'animal. En effet le contact avec le tissu conjonctif ne peut se faire qu'après capture des virus par les branchies puis transfert vers la bouche et ingestion.

4.1. Essais en laboratoire.

Des essais de bioaccumulations ont été réalisés avec trois souches de NoV : GI.1, GII.3 et GII.4 pendant diverses périodes de l'année (octobre, novembre, janvier et mars) afin de mesurer l'impact de ces ligands sur la capacité de l'huître à se contaminer. La souche GI.1 est rapidement bioaccumulée, essentiellement dans les tissus digestifs avec très peu de virus (<1%) détectés dans les autres tissus après une heure, la différence entre tissus s'accroissant après 24 h, confirmant des résultats antérieurs [2]. La concentration obtenue dans les tissus digestifs augmente proportionnellement avec la quantité de virus introduite dans les aquariums. L'observation majeure réside dans le parallèle observé entre l'expression du ligand et l'efficacité de bioaccumulation, argument en faveur d'une implication du ligand dans la capture efficace des particules virales (figure 6).

Deux souches du génogroupe II ont été utilisées, les GII.3 pouvant être plus résistantes que les souches GII.4 en eau de mer, ces deux souches présentant par ailleurs des profils de reconnaissance tissulaire voisins en ELISA et immuno-histologie (tableau 2). Après une heure, les GII.3 sont détectés dans les trois tissus avec un effet dose inoculée dans l'eau de mer quel que soit le tissu. Après 24 heures les concentrations observées dans les branchies et manteau sont 1000 fois plus faibles que les concentrations obtenues dans les tissus digestifs. Ces données suggèrent qu'après une rétention transitoire dans les branchies, vraisemblablement induite par la fixation à l'acide sialique ces particules sont soit détruites, soit transférées vers la bouche avant d'arriver dans les tissus digestifs. Cette élution possible

des branchies suggère que l'affinité des particules pour l'acide sialique est faible, hypothèse intéressante à analyser ultérieurement.

Les huîtres contaminées avec la souche GII.4 ont montré des résultats ressemblant à ceux obtenus avec la souche GII.3 mais avec une efficacité de bioaccumulation inférieure. En effet moins de 0,01% du virus dilué dans l'eau de mer a été retrouvé dans les huîtres. Même à la plus forte dose de virus utilisée, les concentrations détectées dans les tissus digestifs étaient faibles et quasiment identiques pour les quatre expériences réalisées. A l'opposé des observations faites pour la souche GI.1 l'efficacité de bioaccumulation la plus faible a été observée en janvier (Figure 6). Les concentrations après une heure et 24 heures étaient pratiquement identiques à la différence des observations faites pour la souche GII.3. Pour cette souche GII.4 la relation entre dose inoculée et concentration dans les tissus n'a pas été observée, et la distribution tissulaire n'a pas mis en évidence d'organe préférentiel pour la bioaccumulation [28]. Récemment, Wang et coll. étudiant la distribution des NoVs GII.4 dans les différents tissus de l'huître après bioaccumulation, n'ont détecté ces virus que dans les branchies [29]. Une autre souche de GII.4 a montré également une localisation du virus non seulement dans les tissus digestifs mais également dans les branchies et le manteau [30]. La faible quantité de virus retrouvé soulève plusieurs questions. La reconnaissance des résidus sialylés par la souche GII.4 utilisée ici, suggérerait que les particules virales GII.4 liées sur l'acide sialique sont prises en charge par les hémocytes et probablement dégradées. Une autre explication pourrait être une fragilité particulièrement importante des souches de GII.4. Ces souches sont connues pour une transmission importante de personne à personne au détriment des autres modes de transmission [31].

4.2. Huîtres naturellement contaminées.

De nombreux facteurs environnementaux pouvant influencer la physiologie des huîtres et donc leur capacité à se contaminer, une étude sur site en conditions naturelles a été conduite pour valider les observations décrites ci-dessus (conditions artificielles). En France, la production d'huître est réalisée en zone côtière exposant éventuellement les coquillages à une contamination d'origine humaine mais également animale, induite par les animaux en pâture à proximité. L'hypothèse peut alors être émise que la consommation d'huîtres contaminées par des pathogènes animaux pourrait favoriser le potentiel zoonotique des souches de NoV bovins (GIII) chez l'homme. Grâce à des ligands de type carbohydrate partagés avec les humains les huîtres pourraient sélectionner des souches de NoV GI, GII et GIII selon leurs capacités de fixation spécifique. Dans cette étude, la fréquence de contamination et la concentration des génogroupes humains (GI et GII) et bovins (GIII) suivie d'une manière hebdomadaire sur plus d'une année a été réalisée en parallèle à leur quantification dans l'eau environnante. Suivre une contamination virale en milieu environnemental n'est pas une tâche facile car il faut identifier les sources de contamination, considérer les facteurs de dilution, de courants et enfin identifier les points de prélèvements les plus adéquats [32]. Un bassin versant breton présentant un cheptel bovin cent fois plus important que la population humaine en terme de rejet (10^6 équivalent-habitants pour les bovins comparé à 10^4 équivalent-habitants pour les humains) a été sélectionné après vérification de la présence de NoV chez les animaux (18% des bouses détectées positives). Les NoVs GIII ont été détectés dans 14% des échantillons d'eau tandis que les NoVs GI et GII étaient détectés respectivement dans 7 et 24% des échantillons, confirmant l'impact important de la contamination bovine dans les eaux arrivant dans l'aber. Par ailleurs la quantité globale, estimée en nombre de copies d'ARN, détectée dans l'eau pendant la totalité de l'étude pour les NoVs GI était 28 fois plus faible que celle détectée pour les NoVs GII, donnée en adéquation avec l'épidémiologie humaine (forte prédominance des souches GII) (Tableau 3). Considérant les résultats obtenus dans les coquillages, si les NoVs GI ont été détectés moins fréquemment que les NoVs GII, la quantité globale de NoV GI était plus importante. En établissant un ratio de quantité de virus détecté par litre d'eau sur la quantité

de virus détecté par g de tissu digestif d'huître, les NoVs GI sont concentrés beaucoup plus efficacement (ratio de 30) que les NoVs GII (ratio de 1 171) [33]. Ces données confirment les résultats obtenus en aquarium montrant une efficacité bien supérieure de l'huître à capter et accumuler les souches de NoVs GI par rapport à celles du GII. Les vaches en pâture dans les champs autour de l'aber expliquent la quantité de NoV GIII détectée dans les eaux, pratiquement équivalente à celle des NoVs GII. Cependant de façon surprenante un seul échantillon d'huître a été trouvé contaminé par du NoV GIII. Les biais expérimentaux liés à la méthode d'extraction ou à la présence d'inhibiteurs pour les enzymes de la réplication, peuvent être exclus en raison des contrôles insérés aux diverses étapes de l'analyse et de l'efficacité de la méthode pour détecter les NoVs GI et GII. Les amorces et sondes utilisées étant par ailleurs efficaces pour détecter les virus dans les bouses, la quasi absence de détection de NoV GIII dans les coquillages peut être considérée comme un résultat fiable. Par ailleurs, des essais *in vitro* n'ont pas permis d'observer de VLP dans les divers tissus, confirmant cette faible efficacité de bioaccumulation dans l'environnement. Corroborant ces observations, des travaux réalisés en parallèle ont démontré que les NoVs GIII reconnaissent un ligand α Gal, présent dans le tube digestif bovin mais absent des tissus d'huîtres ou humains, ce qui rend ainsi peu probable l'infection de l'homme par les NoVs bovins, d'une part et explique la faible propension de l'huître à concentrer ce génogroupe de NoV, d'autre part [33, 34]. Néanmoins, il convient de rappeler que d'autres mécanismes non spécifiques tels que des liaisons ioniques ou la captation par du mucus peuvent intervenir pour concentrer les virus, n'excluant pas la présence, dans certaines conditions, d'une contamination par ces virus [11].

5. Lien avec les épidémies liées à la consommation d'huître.

Un volet complémentaire de cet ensemble d'études à considérer est le 'retour à l'homme' lors d'épidémies liées à la consommation d'huître. Les huîtres constituent un aliment 'à risque' et les facteurs favorisant leur contamination sont variés [1]. Si les articles publiés sur le sujet précisant les souches impliquées sont encore rares, des points intéressants sont à noter surtout ces dernières années ou les méthodes de détection et de typage utilisées permettent une meilleure comparaison des résultats obtenus entre les diverses équipes. Ainsi les données publiées dans 17 articles ont été comparées en terme de détection et caractérisation de la souche dans les échantillons de selles de consommateurs malades et les coquillages consommés (figure 7). Fréquemment de multiples souches sont impliquées dans les épidémies liées à la consommation d'huître (65% des épidémies), d'où une difficulté pour lier la pathologie à la consommation d'huître, et l'intérêt d'analyser plusieurs échantillons cliniques et de coquillages. Cette contamination multiple associe le plus souvent des souches des deux génogroupes. Les NoVs GI et GII ont été détectés respectivement dans 71% et 88% des selles de consommateurs d'huîtres, et dans 73 et 92% des échantillons d'huîtres [35]. Ces chiffres divergent clairement des chiffres habituellement rapportés dans les autres modes de transmission des NoVs (personne à personne, autres aliments...) [5, 36]. Une analyse récente des épidémies liées à la consommation d'aliments contaminés aux Etats-Unis entre 2001-2008 rapporte une prévalence en NoV GI et GII de 17% et 80% respectivement, 3% impliquant les deux génogroupes [37]. Par ailleurs, comparant les souches impliquées dans les diverses épidémies liées aux huîtres les souches de GI.1 ont été détectées dans 6 épidémies soit aussi fréquemment que les souches GII.4 (figure 7). Ces données extraites de 17 publications de pays divers (Japon, Etats Unis, Canada, Australie, France...) et sur une période d'environ 10 ans, excluent un biais possible dû à une épidémiologie locale ou une production ostréicole particulière. La forte fréquence des souches GI.1 et la faible fréquence des souches GII.4 dans les épidémies liées aux huîtres par rapport aux autres types d'épidémies pourrait être expliquée par la capacité différentielle de bioaccumulation ces deux types de souches telle que décrite plus ci-dessus.

6. Conclusion.

L'ensemble des données disponibles démontre que l'huître peut sélectionner un pathogène humain *via* des ligands partagés avec l'homme reconnus de façon variable selon les souches. Ces ligands facilitent la bioaccumulation (type antigène A-like) où contribuent vraisemblablement à la destruction du virus (type acide sialique). L'approche novatrice que nous avons utilisée, associant des études *in vitro* et *in vivo* à une étude environnementale apporte des données nouvelles pour mieux appréhender la contamination des coquillages.

Pendant longtemps les coquillages ont été considérés comme des filtres concentrant passivement les particules virales. Si ce mécanisme existe pour de nombreux pathogènes, dont probablement certains virus humains, ceci n'est pas le mécanisme principal d'accumulation pour les NoVs et notamment pour les souches GI. Cette sélectivité de bioaccumulation peut expliquer certaines observations épidémiologiques lors d'épidémies liées à la consommation d'huître. Ce nouveau concept de lien entre les NoVs et l'huître devra être étendu à l'analyse d'autres espèces d'huîtres et de coquillages et à celle d'autres virus entériques humains pouvant être présents dans les rejets. L'impact sur l'expression des ligands de divers facteurs comme les conditions d'élevage, les variations climatiques, ou d'autres conditions environnementales sera un point important à analyser dans les années à venir. Ces données pourront nous aider également à développer de nouvelles stratégies de prévention de la contamination ou de purification des coquillages mis sur le marché.

A l'heure où les échanges commerciaux d'aliments augmentent, favorisant la distribution de souches virales et l'émergence de nouvelles épidémies, une meilleure compréhension des liens aliments-virus permettra d'améliorer nos connaissances sur les voies de transmission des virus et de protéger le consommateur.

References

1. Thomas A, Le Saux J-C, Ollivier J, *et al.* Norovirus et huîtres: de la terre à la mer. *Virologie* 2011 ; 15 : 353-60.
2. Atmar RL, Neill FH, Romalde JL, *et al.* Detection of Norwalk virus and Hepatitis A virus in shellfish tissues with the PCR. *Appl Environ Microbiol* 1995 ; 61 : 3014-8.
3. EFSA, Scientific Opinion on Norovirus (NoV) in oysters: methods, limits and control options. *EFSA J* 2012 ; 10 : 1-39.
4. Glass RI, Parashar UD, Estes MK. Norovirus gastroenteritis. *N Engl J Med* 2009 ; 361: 1776-85.
5. Atmar RL. Noroviruses: state of the art. *Food Environ Virol* 2010 ; 2 : 117-26.
6. Tan M, Jiang X. Norovirus–host interaction: multi-selections by human histo-blood group antigens. *Trends Microbiol* 2011 ; 19 : 382-8.
7. Teunis PFM, Moe CL, Liu P, *et al.* Norwalk virus: how infectious is it? *J Med Virol* 2008 ; 80 : 1468-76.
8. Le Pendu J, Ruvoen-Clouet N, Kindberg E, Svensson L. Mendelian resistance to human norovirus infections. *Sem Immunol* 2006 ; 18 : 375-86.
9. Vega E, Barclay L, Gregoricus N, *et al.* Novel surveillance network for norovirus gastroenteritis outbreaks, United States. *Emerg Infect Dis* 2011 ; 17 : 1389-94.
10. Zakikhany K, Allen DJ, Brown D, Iturriza-Gomara M. Molecular evolution of GII.4 norovirus strains. *Plos One* 2012 ; 7 : e41625.
11. Burkhardt W, Calci KR. Selective accumulation may account for shellfish-associated viral illness. *Appl Environ Microbiol* 2000 ; 66 : 1375-8.

12. Bedford AJ, Williams G, Bellamy AR. Virus accumulation by the rock oyster *crassostrea glomerata*. *Appl Environ Microbiol* 1978 ; 35 : 1012-8.
13. Di Girolamo R, Liston J, Matches J. Ionic binding, the mechanism of viral uptake by shellfish mucus. *Appl Environ Microbiol* 1977 ; 33 : 19-25.
14. Metcalf TG. Viruses in shellfish growing waters. *Environ Internat* 1982 ; 7 : 21-7.
15. Hutson AM, Atmar RL, Graham DY, Estes MK. Norwalk virus infection and disease is associated with ABO histo-blood group type. *J Infect Dis* 2002 ; 185 : 1335-7.
16. Marionneau S, Ruvoen N, Le Moullac-Vaidye B, *et al.* Norwalk virus binds to histo blood group antigens present on gastroduodenal epithelial cells of secretor individuals. *Gastroenterology* 2002 ; 122 : 1967-77.
17. Ruvoen-Clouet N, Le Pendu J. Fixation des norovirus sur des glycanes : conséquences biologiques et perspectives prophylactiques. *Virologie*, 2004 ; 8 : 425-34.
18. Jiang X, Wang M, Graham DY, Estes MK. Expression, self assembly and antigenicity of the Norwalk virus capsid protein. *J Virol* 1992 ; 66 : 6527-32.
19. Cuellar JL, Meinhoefel F, Hoehne M, Donath E. Size and mechanical stability of norovirus capsids depend on pH: a nanoindentation study. *J Gen Virol* 2010 ; 91 : 2449-56.
20. Choi J-M, Huston AM, Estes MK, Prasad BVV. Atomic resolution structural characterization of recognition of histo-blood group antigens by Norwalk virus. *Proc Natl Acad Sci* 2008 ; 105 : 9175-80.
21. Le Guyader FS, Loisy F, Atmar RL, *et al.* Norwalk virus specific binding to oyster digestive tissues. *Emerg Infect Dis* 2006 ; 12 : 931-6.
22. Tian P, Bates AH, Jensen HM, Mandrell RE. Norovirus binds to blood group A-like antigens in oyster gastrointestinal cells. *Let Appl Microbiol* 2006 ; 43 : 645-51.
23. Ogamo A, Ogashiwa T, Nagasawa K. Purification and properties of blood group A-active glycoprotein from oyster viscera. *Biochem Biophys Acta* 1976 ; 451 : 426-35.
24. Maalouf H, Zakhour M, Le Pendu J, *et al.* Norovirus genogroup I and II ligands in oysters: tissue distribution and seasonal variations. *Appl Environ Microbiol* 2010 ; 76 : 5621-30.
25. Tunkijjanuki S, Giaever H, Chin CCQ, Olafsen JA. Sialic acid in hemolymph and affinity purified lectins from two marine bivalves. *Comp Biochem Physiol* 1998 ; 119 : 705-13.
26. Aladaileh S, Nair SV, Birch D, Raftos DA. Sydney rock oyster (*Saccostrea glomerata*) hemocytes: morphology and function. *J Invert Pathol* 2007 ; 96 : 48-63.
27. Grangere K, Menesguen A, Lefebvre S, *et al.* Modelling the influence of environmental factors on the physiological status of the Pacific oysters *Crassostrea gigas* in an estuarine embayment; the Baie des Veys (France). *J Sea Res* 2009 ; 62 : 147-58.
28. Maalouf H, Schaeffer J, Parnaudeau S, *et al.* Strain-dependent norovirus bioaccumulation in oysters. *Appl Environ Microbiol* 2011 ; 77 : 3189-96.
29. Wang D, Wu Q, Kou X, Yao L, Zhang J. Distribution of norovirus in oyster tissues. *J Appl Microbiol* 2008 ; 105 : 1966-72.
30. McLeod C, Hay B, Grant C, *et al.* Localization of norovirus and poliovirus in Pacific oysters. *J Appl Microbiol* 2009 ; 106 : 1220-30.
31. Lopman B, Gastanaduy P, Park GW, *et al.* Environmental transmission of norovirus gastroenteritis. *Cur Op Virol* 2012 ; 2 : 96-102.
32. Pompey M, Hervio-Heath D, Caprais M-P, *et al.* Fecal contamination in coastal areas: an engineering approach. *in: Belkin S & Colwell RR (Eds) Oceans and health, pathogens in the marine environment*, New York, NY, Springer. 2005 : 331-359.
33. Zakhour M, Maalouf H, diBartolo I, *et al.* Bovine norovirus ligand, environmental contamination and potential cross-species transmission via oyster. *Appl Environ Microbiol* 2010 ; 76 : 6404-11.

34. Zakhour M, Ruvoen-Clouet N, Charpilienne A, *et al.* The gal epitope of the histo-blood group antigen family is a ligand for bovine norovirus newbury 2 expected to prevent cross-species transmission. *Plos Path* 2009 ; 5 : e1000504.
35. Le Guyader FS, Atmar RL, Le Pendu J. Transmission of viruses through shellfish: when specific ligands come into play. *Cur Op Virol* 2012 ; 2 : 103-10.
36. Phillips G, Tam CC, Rodrigues LC, Lopman B. Risk factor for symptomatic and asymptomatic norovirus infection in the community. *Epidemiol Infect* 2011 ; 139 : 1676-86.
37. Hall AJ, Eisenbart VC, Etingue AL, *et al.* Epidemiology of foodborne norovirus outbreaks, United States, 2001-2008. *Emerg Infect Dis* 2012 ; 18 : 1566-73.

Tables

Tableau 1 : Caractérisation des ligands dans les différents tissus de l'huître.

| Traitement | Cible | GI.1 | | | GII.4 | | |
|-----------------------------|-----------------|------|-----------|---------|-------|-----------|---------|
| | | TD | branchies | manteau | TD | branchies | manteau |
| Tissus contrôles | | +++ | - | - | +++ | ++ | ++ |
| Périodate de sodium (10 mM) | Tous glycanes | - | - | - | - | - | - |
| Périodate de sodium (1 mM) | acide sialique | +++ | - | - | + | - | - |
| Lectine HPA | antigène A-like | - | - | - | + | ++ | ++ |
| Lectine MAA | acide sialique | +++ | - | - | ++ | - | - |
| Salive non sécréteur | saturation | +++ | - | - | | | |
| Salive A sécréteur | saturation | - | - | - | | | |
| Salive 0 sécréteur | saturation | - | - | - | | | |
| Salive B sécréteur | saturation | + | - | - | | | |

La fixation des VLPs sur les tissus d'huîtres après différents traitements est montrée en comparaison des tissus contrôles non traités. L'intensité de la fixation des VLPs GI.1 et GII.4 aux tissus est codée en fixation forte (+++), moyenne (++) , faible (+) ou nulle (-), TD/ Tissus digestifs, HPA : *Helix pomatia* agglutinin, MAA : *Maackia amurensis* agglutinin. Pour les test avec les salives les VLP sont incubées avec les salives avant dépôt sur les tissus. Cellules blanches : test non réalisé (Adapté de (24)).

Tableau 2 : Fixation des VLPs aux tissus d'huîtres

| VLPs | Tissus digestifs | Branchies | Manteau |
|-------|------------------|-----------|-----------|
| GI.1 | 7,4 ± 4,2 | 1,7 ± 0,5 | 1,8 ± 0,9 |
| GII.3 | 6,1 ± 1,3 | 3,8 ± 0,1 | 4,3 ± 0,7 |
| GII.4 | 10,8 ± 3,7 | 8,9 ± 4,3 | 9,9 ± 3,4 |

Chaque tissu est analysé par ELISA et un ratio est calculé basé sur la DO (densité optique) obtenue par rapport aux différents contrôles, un seuil de positivité de 2 a été établi (Adapté de (24)).

Tableau 3 : Détection et quantification des NoVs dans des échantillons d'eau et de coquillages.

| NoV | Eaux (70 échantillons) | | Huîtres (47 échantillons) | | ratio eau/coq |
|------|------------------------|----------|---------------------------|----------|---------------|
| | Nb éch. positif | Nb total | Nb éch positif | Nb total | |
| GI | 5 | 11 510 | 2 | 381 | 30 |
| GII | 17 | 325 530 | 10 | 278 | 1 171 |
| GIII | 10 | 142 220 | 1 | 90 | 1 580 |

Un échantillon d'eau est constitué d'un litre d'eau prélevé à un point donné fixé et 8 points de prélèvements ont été suivis sur une période de 18 mois. Un échantillon d'huître est constitué de 12 huîtres prélevées en même temps au même endroit, 2 points ont été suivis.

Nb total : les quantités de virus détectés dans les échantillons positifs ont été additionnés pour les échantillons d'eau et de coquillages, ces totaux ont servi à calculer le rapport montré en dernière colonne (Adapté de (33)).

Figures

Figure 1 : Représentation schématique des différents organes de l'huître, *Crassostrea gigas*.

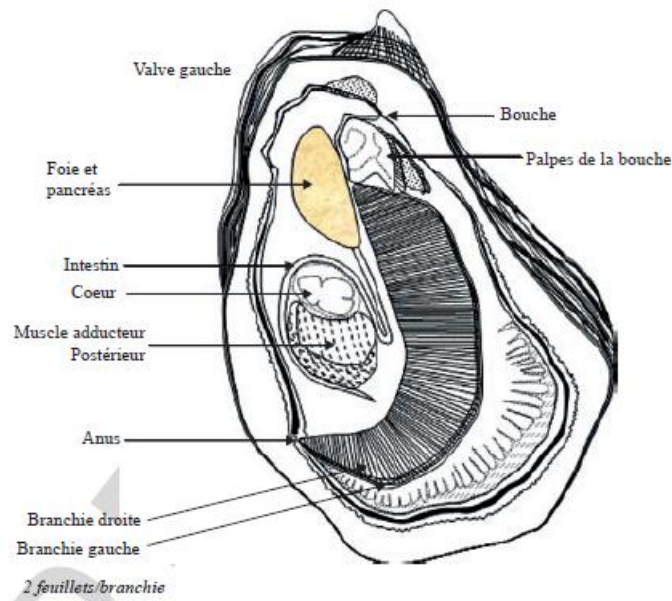


Figure 2 : Localisation de la souche de NoV GI.1 (prototype Norwalk) après bioaccumulation.
Légende : Visualisation des particules virales après révélation par un anticorps spécifique (coloration rouge, flèche) au niveau des tubules digestifs (A) et du tissu conjonctif (B) (21).

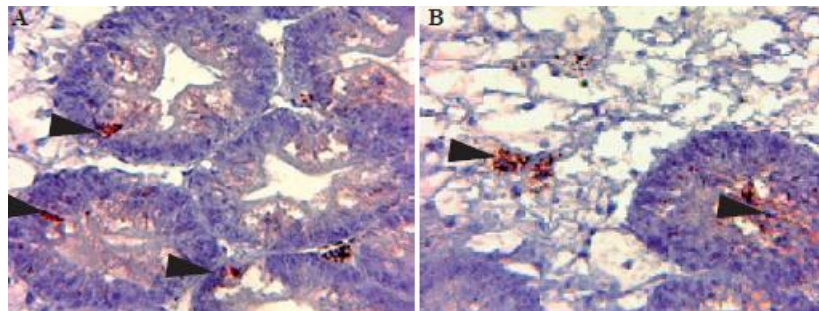


Figure 3 : Bioaccumulation des mutants et comparaison avec souche prototype.

Légende : A : tissu contrôle d'huitres bioaccumulées avec des VLP GI.1 mais révélation sans anticorps primaire (la flèche indique des hémocytes qui ont été coloré par l'hémalun, coloration grisâtre), B : tissu contrôle d'huitres sans VLP mais tissu révélé avec les Ac primaire et secondaire (absence de cellule colorée), C : tissu conjonctif d'huitres bioaccumulées avec le mutant H329 (la flèche indique un hémocyte, légèrement coloré en rouge), D : tissu conjonctif d'huitres bioaccumulées avec la souche GI.1 (coloration rouge intense des hémocytes), E : tissu digestif d'huitres bioaccumulées avec le mutant H329 (légère coloration rouge des hémocyte et des tubules digestifs), F : tissu digestif d'huitres bioaccumulées avec la souche GI.1, (la différence est notable en densité et intensité de la coloration rouge) (24).

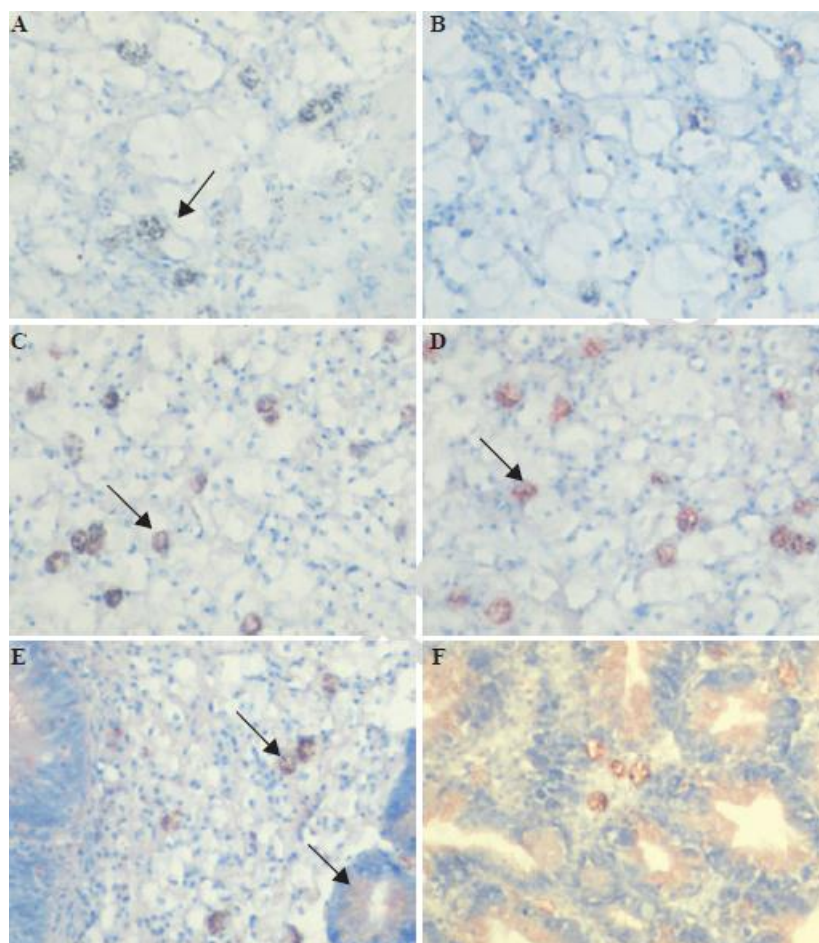


Figure 4 : Fixation des VLP GII.4 aux tissus d'huître.

Légende : Les VLPS GII.4 sont mises en contact sur des coupes de tissus puis révélées par un anticorps spécifique permettant de visualiser leur fixation (les flèches indiquent des exemple de coloration rouge caractéristique de la présence de VLP) sur les palpes labiaux (A), les tubules digestifs (B) et les branchies (C) (adapté de (24)).

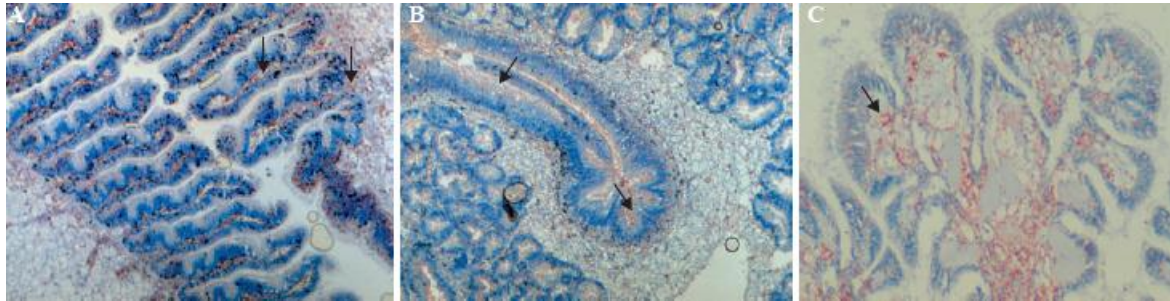


Figure 5 : Variation saisonnière de la fixation des VLP aux tissus digestifs

Légende : La fixation des VLP des souches GI.1 (A) ou GII.4 (B) aux tissus digestifs a été évaluée sur des échantillons collectés mensuellement pendant 1 an et exprimée selon un ratio considérant la réactivité par rapport au bruit de fond (\pm déviation standard), la ligne horizontale pointillée matérialise le seuil de positivité (24).

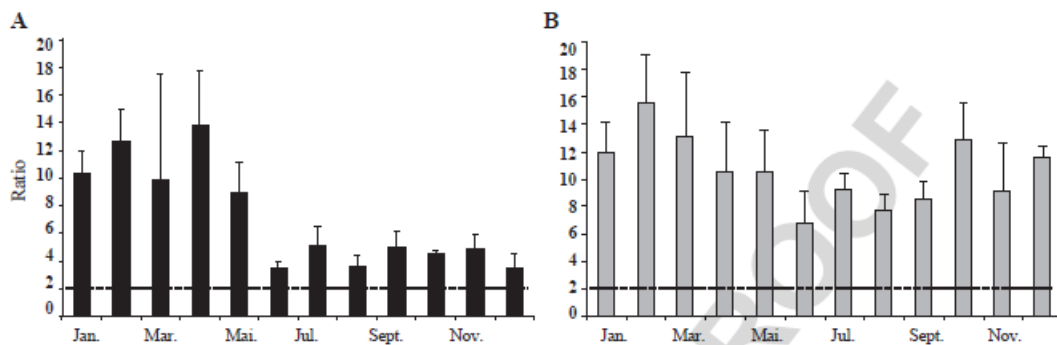


Figure 6 : Bioaccumulation des trois souches de NoV.

Légende : Trois concentration de virus (A 10^6 , B : 10^7 , C : 10^8) ont été diluées dans l'eau avant immersion des huîtres. Les quantités de virus accumulées et exprimées en nombre de copies de génome / g de tissus digestifs après 24 h sont rapportées pour les souches GI.1 (ligne pleine, rond), GII.3 (ligne pointillée, carré) et GII.4 (ligne pointillée, triangle) (28).

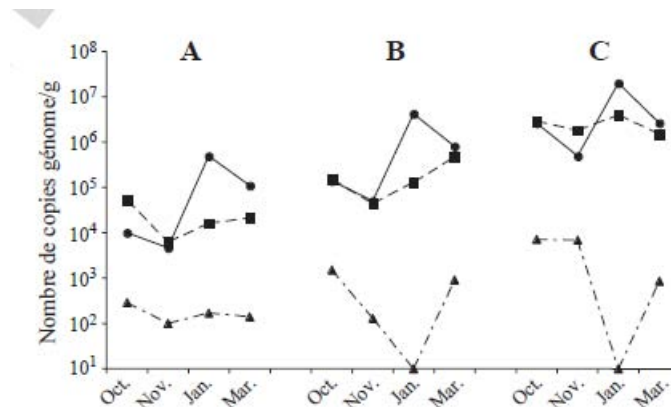


Figure 7 : Répartition des souches caractérisées lors des épidémies liées à la consommation d'huître

Légende : Dans les épidémies liées à la consommation d'huîtres, les souches GI et GII ont été détectées dans respectivement ~70% et ~90% des cas, montrant la fréquence des contaminations multiples. Le panel A montre la répartition des souches GI impliquées et le panel B celle des souches GII. Il est intéressant de noter la dominance des souches GI.1 dans le panel A et *a contrario* la relative implication des souches GII.4 dans le panel B. Lors d'épidémies non liées à la consommation d'huîtres (transmission de personnes à personnes ou par d'autres aliments souillés), les souches GI représentent moins de 20% et les souches GII plus de 80% (70% pour les seules GII.4) des souches incriminées (adapté de 35).

