

MICROBIOLOGIE ET COQUILLAGES : DES ENJEUX ET DES DÉVELOPPEMENTS FUTURS

MICROBIOLOGY AND SHELLFISH : ISSUES AND FUTURE DEVELOPMENTS

Par Soizick F. LE GUYADER⁽¹⁾, Pascal GARRY, Joanna OLLIVIER & Jean-Côme PIQUET
(Communication présentée le 7 Février 2019,
Manuscrit accepté le 5 Mai 2019)

RÉSUMÉ

La salubrité des coquillages est considérée depuis fort longtemps comme un problème de santé publique. La mise en place d'une réglementation basée sur un indicateur bactérien de contamination d'origine fécale a permis de diminuer significativement les épidémies d'origine bactérienne. Cependant, les épidémies de gastroentérites virales dues à la présence de norovirus issus de rejet humains persistent. Des travaux de recherche nous ont permis de mettre en évidence que l'huître n'est pas simplement un filtre passif mais est capable de sélectionner certaines souches virales, *via* la présence de ligands spécifiques, très proches des ligands observés chez l'homme pour ces mêmes virus. Les développements en cours en lien avec l'utilisation des outils de métagénomique, vont nous permettre de mieux appréhender le devenir de certains micro-organismes pathogènes humains après leurs rejets dans l'environnement côtier.

Mots-clés : coquillages, microbiologie sanitaire, huîtres, norovirus.

ABSTRACT

The shellfish safety has long been considered a public health problem. The implementation of a regulation based on a bacterial indicator of faecal contamination has significantly reduced outbreaks of bacterial origin. However, epidemics of viral gastroenteritis due to the presence of noroviruses from human sewage persist. We demonstrated few years ago that oysters are not just a passive filter but are able to select some viral strains, via the presence of specific ligands, very similar to ligands observed in humans for these same virus. Ongoing developments, in conjunction with the application of metagenomic tools, will allow us to better understand the fate of some human pathogens after their release into the coastal environment.

Key words: shellfish, microbiology, oysters, norovirus.

INTRODUCTION

Les mollusques bivalves constituent un aliment unique d'une part par leur habitat sur le littoral et d'autre part par leurs activités physiologiques qui les conduit à filtrer d'importants volumes d'eau. Leur mode de consommation le plus souvent crus, surtout pour les huîtres, fait partie également de ces critères qui placent les coquillages dans les aliments à risque sanitaire, tout comme certains végétaux ou fruits rouges. Leur simplicité de culture

et de collecte sur le littoral à marée basse expliquent leur place dans l'alimentation humaine (Venugopal *et al.* 2018). En effet, les coquillages et particulièrement les huîtres, sont consommés depuis très longtemps par l'homme comme le témoigne des peintures ou autres récits historiques. Leur implication dans la transmission d'agents pathogènes à l'homme a été rapidement reconnue et dès le début du 20^{ème} siècle, la nécessité de les

(1) Ifremer, Laboratoire de Microbiologie, LSEM, BP 21105, 44311 Nantes cedex 03.
Courriel : soizick.le.guyader@ifremer.fr

purifier avant consommation est apparue (Fabre-Doumergue, 1912). Dans certains pays, les coquillages restent une denrée de base. Dans les pays développés leur place dans l'alimentation a évolué et ils sont considérés comme un aliment de fête. Il est néanmoins évident que cette denrée conserve un intérêt relatif à l'apport nutritif, riche en micro-nutriments tels que la vitamine B12 et les minéraux (sélénium, fer, iode et zinc) (Venugopal *et al.* 2018). Les coquillages occupent aujourd'hui une place importante dans l'art culinaire français, et la conchyliculture constitue une activité économique importante en zone littorale (France Agrimer, 2019).

LA RÉGLEMENTATION POUR LA PROTECTION DU CONSOMMATEUR.

L'identification d'épidémies d'origine bactérienne liée à la consommation de coquillage a conduit à la mise en place d'une réglementation juste avant la seconde guerre mondiale (Grastilleur, 2014). Cette réglementation, basée sur un suivi régulier du dénombrement des coliformes fécaux dans les coquillages, permettait de classer administrativement les zones de production de coquillages. La mise en place de l'Union européenne a conduit à l'évolution de certains paramètres, tout en conservant le classement sanitaire des zones de production de coquillages, associé à un suivi régulier de la contamination bactérienne des zones exploitées (règlement CE n° 854/2004, Anonyme 2004b). Le dénombrement d'*Escherichia coli*, germe indicateur de contamination fécale, peut se faire soit en utilisant la méthode basée sur le Nombre le Plus probable (NPP) (ISO 16649-3) soit par impédancemétrie (NF V08-106).

Le dénombrement de ce germe, marqueur indirect de la présence potentielle de micro-organismes pathogènes bactériens (par exemple salmonelles ou virus humains), permet lors du suivi à long terme (au moins trois ans) de classer les zones de production en trois classes (A, B ou C) (**Tableau 1**). Ce classement conditionne le devenir des coquillages produits : commercialisation possible (classe A), purification en eau propre (classe B), reparcage dans une zone de bonne qualité microbiologique ou commercialisation après traitement thermique (zone C) (Grastilleur, 2014). La surveillance des zones de pro-

duction, organisée par les services conjoints de l'Etat (Direction Générale de l'Alimentation) et l'Ifremer (Institut français de recherche pour l'exploitation de la mer), procure par ailleurs une connaissance de l'état sanitaire sur le long terme de la qualité des eaux nationales. Associé à des plans de surveillance sur les coquillages commercialisés, incluant également les coquillages importés, ce dispositif a permis une diminution importante des épidémies d'origine bactérienne. Pour compléter ce dispositif, l'Union Européenne a mis en place un réseau de Laboratoires Nationaux de Référence facilitant l'harmonisation des pratiques (règlement CE 882/2004 qui sera remplacé le 14 décembre 2019 par le règlement CE 665/2017), et la rédaction d'un guide en appui de la réglementation (Alvarez *et al.* 2017). Aux Etats Unis, le classement des zones de production repose sur le suivi des coliformes fécaux dans l'eau (FDA 2013). Cette approche n'est pas directement équivalente à l'approche européenne car la concentration par les coquillages des micro-organismes présents dans l'eau varient selon les espèces et les conditions environnementales. Les comparaisons réalisées indiquent un niveau plus strict du classement A Européen que la catégorie équivalente « approved » des Etats Unis, alors que la catégorie « restricted » serait plus contraignante que la catégorie B Européenne pour certaines espèces de bivalves (Lee *et al.* 2014). Cette absence d'équivalence entre les deux réglementations complique lourdement les échanges commerciaux de coquillages, puisque selon les marchés à l'exportation, des pays producteurs (Brésil, Chine..) sont dans l'obligation d'appliquer les deux types de réglementation.

LES NOROVIRUS

La mise en place et le respect de ces critères microbiologiques ont permis de diminuer de façon significative la mise sur le marché de coquillages contaminés par des bactéries. Cependant, de nombreuses épidémies de gastroentérites virales, suite à la consommation essentiellement d'huître, sont toujours déclarées au niveau mondial. En effet, pendant longtemps la contamination virale n'a pas été considérée. Chaque Etat Membre, voire chaque laboratoire avait sa propre méthode de détection, compliquant les comparaisons de résultat. Suite à la publication d'une méthode pour la détection des norovirus et virus de l'hépatite A (ISO 15216-1 2017), des mesures de gestion sont appliquées depuis quelques années sur le territoire pour limiter le risque de contamination virale. Ainsi, lors de cas avérés dans la population suite à la consommation de coquillage, ou d'évènements exceptionnels (climatiques, rejet accidentel d'eaux usées...), des zones de production peuvent être fermées et les lots de coquillages retirés du marché. Cependant, aucune mesure préventive n'existe et des épidémies persistent. Les signes observés sont ceux d'une gastro-entérite aiguë et sont liés à la présence de norovirus dans les huîtres consommées, consé-

Classe	Seuils microbiologiques	Mesure de gestion avant commercialisation
A	Au moins 80% des résultats \leq 230 E. coli/100 g de CLI et aucun résultat supérieur à 700 E. coli/100 g de CLI	Aucune
B	Au moins 90% des résultats \leq 4 600 E. coli/100 g de CLI et aucun résultat supérieur à 46 000 E. coli/100 g de CLI	Purification ou reparcage
C	Aucun résultat supérieur à 46 000 E. coli/100 g de CLI	Reparcage longue durée ou cuisson

E. coli : *Escherichia coli*, CLI : chair et liquide intervalvaire.

Tableau 1 : Critères microbiologiques de classement des zones conchylicoles. (règlement (CE) n° 854/2004).

quence d'une contamination des eaux côtières par des rejets humains (Maalouf *et al.* 2010; Yu *et al.* 2015). Les norovirus constituent à l'heure actuelle l'agent majeur des gastro-entérites aiguës d'origine virale, toutes classes d'âge confondues. Mis en évidence à l'occasion d'une épidémie de gastro-entérites dans une école de Norwalk (Ohio, USA), ces virus ont été visualisés pour la première fois en microscopie électronique en 1972 et le génome de cette souche a été séquencé 20 ans plus tard. Par la suite, de très nombreuses souches ont été caractérisées, permettant de les classer dans la famille des *Caliciviridae* (Atmar *et al.* 2018). Les norovirus sont des petits virus d'environ 34 nm de diamètre, non enveloppés à symétrie icosaédrique. Leur génome est constitué d'un ARN simple brin de 7 500 bases, organisé en trois cadres de lecture (ORF) et poly-adenylés à l'extrémité 3'. L'ORF 1 code les protéines non structurales, l'ORF2 l'unique protéine de capsid VP1, et l'ORF3 une protéine mineure intervenant dans la stabilité de la capsid. Comme nombre de virus à ARN, les norovirus sont génétiquement très divers. En l'absence de système de multiplication *in vitro*, ils ont été classés par comparaison des séquences codant l'ORF2. A l'heure actuelle, ils se répartissent en sept génogroupes (G), dont trois infectent l'homme (GI, GII et GIV) (**Figure 1**) (De Graaf *et al.* 2016). Depuis plusieurs années, 80 à 90 % des cas cliniques sont liés à une infection par les souches appartenant au GII, et plus précisément à des souches GII.4. Cette infection se traduit, après une courte incubation d'environ 24 heures, par des vomissements, des diarrhées et des douleurs abdominales qui disparaissent le plus souvent spontanément en 24 à 48 heures. Caractéristiques importantes pour ces virus, la sensibilité à l'infection est liée à deux mécanismes. L'immunité acquise protège d'une ré-infection par la même souche et persiste peu (quelques semaines) (Atmar *et al.* 2018). Une seconde caractéristique réside dans une sensibilité génétique liée aux antigènes tissulaires des groupes sanguins expliquant les différences d'expression clinique observées lors d'études chez les volontaires ou lors d'épidémies, certaines personnes infectées pouvant excréter du virus sans présenter de symptômes (Ruvoen *et al.* 2013). Les norovirus utilisent comme ligands les glycanes A, B, H et Lewis de la famille des antigènes de groupes sanguins tissulaires (HBGAs). Cette reconnaissance impacte l'infection et le développement des signes cliniques qui varient selon la souche infectante et la présence ou non de ces glycanes sur les cellules qui est liée

au polymorphisme génétique de ces antigènes chez les individus. Pour une souche donnée, ces ligands sont nécessaires à l'infection et l'apparition de signes cliniques. Chez les personnes sensibles, la dose infectieuse est très basse et serait de quelques particules virales seulement, plaçant ces virus parmi les micro-organismes les plus infectieux. Pour la souche Norwalk, prototype du génogroupe I, moins de 10 particules virales suffisent à déclencher l'apparition des symptômes chez les individus sensibles (Atmar *et al.* 2018). L'épidémiologie montre un caractère saisonnier marqué avec un pic hivernal. Si les signes cliniques disparaissent assez rapidement, l'excrétion virale dans les selles peut persister pendant deux à trois semaines, à des concentrations allant de 10^8 à 10^{10} particules/ g de selle (Atmar *et al.* 2018). Cette longue excrétion virale peut expliquer la transmission élevée de personne à personne et dans le secteur agro-alimentaire, la contamination possible des aliments lors de leur manipulation (De Graaf *et al.* 2016). Les quantités importantes de virus excrétés vont aussi se retrouver dans les eaux usées et ainsi contaminer l'environnement. En effet, si certains traitements appliqués dans les stations d'épuration tels que l'ultrafiltration permettent d'éliminer un grand nombre de particules, d'autres procédés plus anciens ne sont pas aussi efficaces et entraînent le rejet de particules dans l'environnement. Par ailleurs des rejets directs, des assainissements individuels déficients, ou des accidents sur le réseau de canalisation d'eaux usées contribuent à l'apport de virus dans les eaux de surface ou en zone côtière (Maalouf *et al.* 2010).

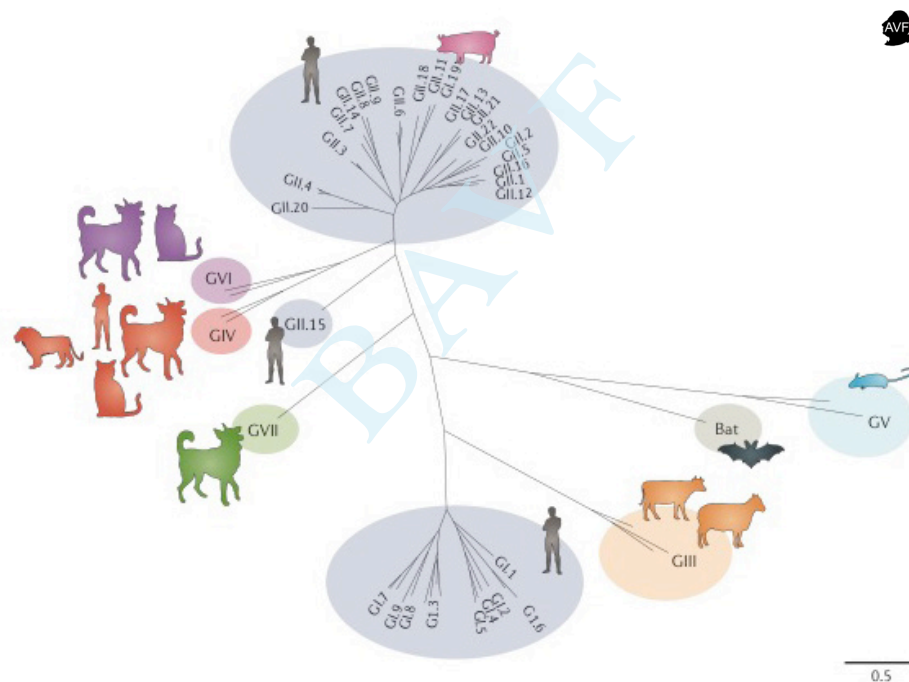


Figure 1 : Classification des norovirus. Les norovirus sont répartis en sept génogroupes basés sur la séquence codant pour la protéine de capsid VP1 (d'après de Graaf *et al.* 2016).

BIOACCUMULATION PAR L'HUÎTRE

De nombreuses études et observations ont montré que la contamination de l'huître par les norovirus est rapide et que, contrairement aux bactéries facilement éliminées par l'immersion en bassin avec une eau propre pendant quelques heures, les norovirus persistent plusieurs jours et même semaines dans les huîtres. De plus, l'analyse des souches détectées chez les consommateurs malades montre une implication relativement fréquente des souches du GI, observation non vérifiée dans les autres types d'épidémies (personnes à personne, ou dans des communautés fermées) (Le Guyader *et al.* 2012, Yu *et al.* 2015). Ces observations nous ont conduits à émettre l'hypothèse que l'huître pouvait sélectionner certaines souches de norovirus. Pour leurs activités physiologiques, les coquillages filtrent de grandes quantités d'eau de mer. Premier organe en contact avec l'eau de mer à l'ouverture des coquilles, le manteau intervient dans la nutrition en participant au premier tri des particules présentes dans l'eau. Les cellules ciliaires et à mucus des branchies attirent, sélectionnent, capturent et conduisent les particules vers les palpes labiaux et la bouche. Les particules sélectionnées pour l'ingestion sont acheminées sous l'action de l'épithélium cilié vers les tissus digestifs, constitués par l'œsophage, l'estomac, la glande digestive. Ensuite les débris sont éliminés via l'intestin, le rectum et l'anus. Des huîtres contaminées avec une eau de mer contaminée par une souche de norovirus connue nous ont permis de mettre en évidence que les norovirus se localisaient essentiellement au niveau des tubules digestifs mais également dans le tissu conjonctif à proximité (**Figure 2**). Poursuivant ces expérimentations avec diverses souches de norovirus reconnaissant des ligands différents chez l'homme, nous avons mis en évi-

dence que ces souches avaient un comportement similaire dans l'huître. Ainsi, une souche du GI, qui reconnaît l'antigène A chez l'homme reconnaît une structure identique dans les tissus digestifs de l'huître. Les mêmes tests répétés avec une souche du GII, reconnaissant l'antigène B (et faiblement le A) chez l'homme, ont montré que cette souche reconnaissait également l'antigène A au niveau des tissus digestifs de l'huître mais également des acides sialiques présent sur les branchies ou encore les palpes labiaux, phénomènes non observés pour les souches du GI (Maalouf *et al.* 2010). La quantification de ces souches dans des expériences réalisées en parallèle a montré une efficacité de concentration de 88% pour la souche de GI contre 4% pour la souche de GII (Maalouf *et al.* 2011). Les premiers essais semblent indiquer que ce phénomène est propre à l'huître creuse *Crassostrea gigas* car cela n'a pas pu être reproduit avec l'huître plate *Ostrea edulis*. Afin de vérifier ces données obtenues par des expériences en laboratoire, une étude environnementale a été menée pendant un an en recherchant la présence de norovirus dans les apports d'eaux douces et les huîtres situées en aval (**Tableau 2**). Cette approche a conforté nos observations préalables avec une efficacité de contamination de l'huître bien supérieure pour les norovirus GI, comparée à celle observée pour les norovirus GII ou GIII (Zakhour *et al.* 2010). Ces diverses approches nous ont permis de démontrer que l'huître n'est pas juste un filtre passif mais peut, par la présence de ligand spécifique reconnaissant certaines souches de norovirus, sélectionner un pathogène humain (Le Guyader *et al.* 2006, Le Guyader *et al.* 2012). Cette observation a, par la suite, été confortée par diverses études (Tian *et al.* 2007, Langlet *et al.* 2015).

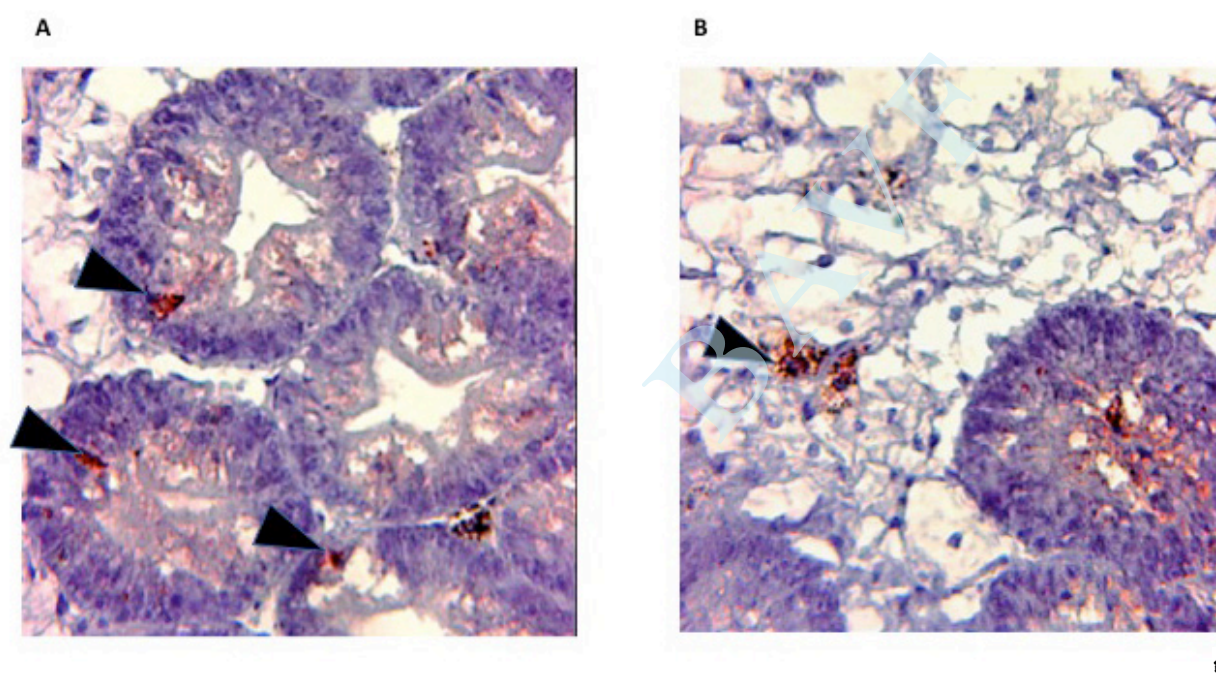


Figure 2 : Détection par immuno-histochimie de norovirus dans des huîtres contaminées par balnéation. La présence de virus (tête de flèche) a été mise en évidence par un anticorps dans les tubules digestifs (A) et dans le tissu conjonctif (B).

Norovirus	Echantillons d'eau (n=70)		Echantillons d'huîtres (n=47)		Ratio eau/coq#
	Nb éch. pos (%)*	Somme**	Nb éch. pos (%)*	Somme**	
GI	5 (7)	11 510	2 (4)	381	30
GII	17 (24)	325 530	10 (21)	278	1 171
GIII	10 (14)	142 220	1 (2)	90	1 580

*: nombre d'échantillons d'eau ou de coquillages détectés positifs pour le génogroupe considéré avec entre parenthèse le % calculé selon le nombre total d'échantillon,

** : somme totale de copies de génome détectés exprimés en copies d'ARN/L ou par g de tissus digestifs d'huître,

: rapport entre le nombre de copies détectés dans l'eau et les coquillages pour chaque génogroupe de norovirus (adaptés de (Zakhour 2010).

Tableau 2 : Détection de norovirus dans des échantillons d'eau et d'huître.

CHANGEMENT CLIMATIQUE ET RÔLE DE L'HUÎTRE : LA MÉTAGÉNOMIQUE.

Par essence la microbiologie constitue un monde en perpétuelle évolution et l'émergence (ou la réémergence) d'agents pathogènes caractérise la thématique. En effet, l'évolution des écosystèmes microbiens se fait *via* la pression de l'environnement comme pour les vibrions, ou *via* leurs hôtes (l'Homme) pour les germes d'origine anthropique. Les prévisions de croissance démographique laissent envisager une forte augmentation de la population humaine en zone littorale, entraînant de ce fait une forte pression anthropique, dans un contexte de changement climatique favorisant les événements climatiques de fortes ampleurs (pluies, température...). La présence de virus ou de bactéries dans des coquillages est rapportée dans de nombreux pays avec une variabilité liée à l'épidémiologie ou aux conditions climatiques. En effet, les pluies intenses responsables de débordements des bassins de rétention des eaux usées ont entraîné des contaminations des zones d'élevage (Grodzki *et al.* 2012). D'autres phénomènes climatiques ou physiques (par exemple tremblement de terre) en provoquant des ruptures de canalisation peuvent avoir un impact négatif sur la qualité des coquillages. Dans le cas de rejets directs, la contamination est massive et multiple et la flore microbienne rejetée va contribuer à une évolution de l'environnement. L'essor des biotechnologies et en particulier

des nouvelles techniques de séquençage (NGS) permet une approche différente. Ainsi la flore microbienne peut être évaluée dans sa totalité, permettant, sur des pas de temps à définir en fonction des questions posées, de comparer les populations et leur équilibre. L'évolution des techniques permet d'avoir une vision globale des agents pathogènes au sein d'un environnement composé d'autres micro-organismes avec lequel il peut interagir. La notion de pathogène évolue et doit être considérée dans sa relation avec son hôte mais également avec divers composants entrant dans son micro-environnement, incluant les communautés bactériennes ou virales (Vonaesch *et al.* 2018).

CONCLUSION

Le devenir d'une bactérie ou d'un virus dépend des conditions physico-chimiques locales, mais également de la microflore environnante et/ou associée. L'acquisition des données permettra d'analyser des variations de la diversité spatiale (environnements ou sites contrastés) et temporelles (pressions anthropiques, changements globaux) en termes d'apport au milieu littoral et de présence dans les coquillages. Ces observations devraient permettre le développement des nouveaux axes de recherche sur le devenir des micro-organismes dans le milieu ou les coquillages.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient les collègues, étudiants et stagiaires ayant contribué à l'obtention de ces données, ainsi qu'aux organismes financeurs (Direction Générale de l'Alimentation, ANR (538, Coquenpath), European Union's Horizon 2020 research and innovation programme (Grant agreement n° 799417).

BIBLIOGRAPHIE

- Alvarez C, Latini M, Piquet J-C, Caricato P, Doré B, Lee R, *et al.* (2017). Microbiological monitoring of bivalve mollusc harvesting areas. Guide to Good Practice: Technical Application. 2017; 6: 1-62.
- Atmar RL, Ramani S, Estes MK. Human noroviruses: recent advances in a 50-year history. *Curr Opin Infect Dis.* 2018; 31:422-432.
- De Graaf M, van Beek J, Koopmans MPG. Human norovirus transmission and evolution in a changing world. *Nat Rev.* 2016; 14:421-433.
- Fabre-Doumergue M. Epuration bactérienne des huîtres par la stabulation en eau de mer artificielle filtrée. *C R Acad Sci* 1912; 393-395.
- Food and Drug Administration. National Shellfish Sanitation Program (NSSP): Guide for the Control of Molluscan Shellfish. 2011. Revision. U. S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Food and Drug Administration. 2013.
- France Agrimer La-filiere-peche-et-aquaculture-en-France-en-2019. 2019. Disponible à: <https://www.franceagrimer.fr/Bibliotheque/INFORMATIONS-ECONOMIQUES/PECHE-ET-AQUACULTURE/CHIFFRES-ET-BILANS/2019/La-filiere-peche-et-aquaculture-en-France-en-2019>. Consulté le 15.11.2019
- Grastilleur C. La surveillance sanitaire officielle des coquillages en France. *Bull Acad Vet France.* 2014; 167: 221-226.
- Grodzki M, Ollivier J, Le Saux J-C, Piquet J-C, Noyer M, Le Guyader FS. Impact of

- Xynthia tempest on viral contamination of shellfish. *Appl Environ Microbiol* 2012; 78: 3508-3511.
- ISO 15216-1. Microbiology of food and animal feed -horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus in food using real-time RT-PCR, Part 1: method for quantification. 2017.
 - Langlet J, Kaas L, Greening G. Binding based RT-qPCR assay to assess binding patterns of norovirus to shellfish. *Food Environ Virol.* 2015;7: 88-95.
 - Le Guyader FS, Loisy F, Atmar RL, Hutson AM, Estes MK, Ruvoen-Clouet N, *et al.* Norwalk virus specific binding to oyster digestive tissues. *Emerg Infect Dis.* 2006;12: 931-936.
 - Le Guyader FS, Atmar RL, Le Pendu J. Transmission of viruses through shellfish: when specific ligands come into play. *Cur Op Virol.* 2012; 2:103-110.
 - Lee R J & Reeses RA. Relating the bivalve shellfish harvesting area classification criteria in the United states and European union programmes. *J Wat Health.* 2014; 12: 280-287.
 - Maalouf H, Pommepuy M, Le Guyader FS. Environmental conditions leading to shellfish contamination and related outbreaks. *Food Environ Virol.* 2010; 2:136-145.
 - Maalouf H, Zakhour M, Le Pendu J, Le Saux J-C, Atmar RL, Le Guyader FS. Norovirus genogroup I and II ligands in oysters: tissue distribution and seasonal variations. *Appl Environ Microbiol.* 2010; 76: 5621-5630.
 - Maalouf H, Schaeffer J, Parnaudeau S, Le Pendu J, Atmar RL, Crawford SE, Le Guyader FS. Strain-dependent norovirus bioaccumulation in oysters. *Appl Environ Microbiol.* 2011; 77: 3189-3196.
 - Ruvoen N & Le Pendu J. Sensibilité génétique aux infections à norovirus. *Patho Biol.* 2013; 61:28-35.
 - Tian P, Engelbrektsen AL, Jiang X, Zhong W, Mandrell RE. Norovirus recognizes histoblood group antigens on gastrointestinal cells of clams, mussels, and oysters: a possible mechanism of bioaccumulation. *J Food Prot.* 2007; 70:2140-2147.
 - Venugopal V & Gopakumar K. Shellfish: nutritive value, health benefits, and consumer safety. *Comp Rev Food Sci Food Saf.* 2018; 16:1219-1242.
 - Vonaesch P, Anderson M, Sansonetti Ph J. Pathogens, microbiome and the host: emergence of the ecological Koch's postulates. *FEMS Microbiol Rev.* 2018; 42:273-292.
 - Yu Y, Cai H, Hu L, Lei R, Pan Y, Yan S, Wang Y. Molecular epidemiology of oyster-related human noroviruses and their global genetic diversity and temporal-geographical distribution from 1983 to 2014. *Appl Environ Microbiol.* 2015; 81:7615-7624.
 - Zakhour M, Maalouf H, diBartolo I, Haugarreau L, Le Guyader FS, Ruvoen-Clouet N, *et al.* Bovine norovirus ligand, environmental contamination and potential cross-species transmission via oyster. *Appl Environ Microbiol.* 2010; 76:6404-6411.