

# THESE DE DOCTORAT

NANTES UNIVERSITE

ECOLE DOCTORALE N° 642

*Ecole doctorale Végétal, Animal, Aliment, Mer, Environnement*

Spécialité : Microbiologie - Immunologie

Par

**Gabriel EULLER-NICOLAS**

**Norovirus, sapovirus et les huîtres : apport du modèle entéroïde intestinal et interactions avec les glycanes**

Thèse présentée et soutenue à Nantes, le 17 Mai 2023

Unité de recherche : Laboratoire Santé, Environnement et Microbiologie, MASAE, IFREMER

## Rapporteurs avant soutenance :

Gaël BELLIOU Ingénieur de recherche, CHU de Dijon

Albert BOSCH Professeur, Université de Barcelone, Espagne

## Composition du Jury :

Président : Berthe-Marie IMBERT Professeure, Nantes Université

Examineurs : Nathalie RUVOËN-CLOUET Professeure, Oniris, Nantes

Mary K. ESTES Directrice de recherche, Baylor College of Medicine, Houston, Etats-Unis

Dir. de thèse : Soizick LE GUYADER Directrice de recherche, Ifremer, Nantes

Co-dir. de thèse : Marion DESDOUITS Chercheuse, Ifremer, Nantes

## Invité(s)

Jacques LE PENDU

Directeur de recherche, Inserm, Nantes

## Remerciements

Je tiens dans un premier temps à remercier les membres du jury Pr. **Nathalie Ruvoën-Clouet**, Pr. **Mary K. Estes** et Pr. **Berthe-Marie Imbert**, ainsi que les rapporteurs Pr. **Albert Bosch** et Mr. **Gaël Belliot** qui ont accepté de participer à l'évaluation et à la discussion de ce travail effectué au cours des trois dernières années.

Je tiens également à remercier ma directrice de thèse **Soizick le Guyader** pour m'avoir prodigué ses conseils et accordé sa confiance dès le stage de Master 2, que j'ai eu la chance d'effectuer dans son laboratoire, le LSEM. Cela m'a permis de voir d'autres horizons que ceux de Paris, ce que j'attendais depuis le début de mon parcours universitaire. J'en suis très reconnaissant et je suis très heureux d'avoir pu prendre ce chemin.

Un immense merci à **Marion Desdouits**, mon encadrante au quotidien depuis mes débuts au laboratoire et qui m'a appris énormément sur tous les domaines que ma thèse a abordé, et plus largement sur le métier de chercheur. Tu es pour moi un modèle scientifique et j'ai toujours été admiratif de tes nombreuses compétences (dont la capacité à pouvoir détecter des incohérences dans les données d'un simple coup d'œil !). Merci de les avoir partagées avec moi pendant ces quatre années et de m'avoir permis de m'améliorer.

Mes remerciements également à **Elodie Fleury** et **Jacques le Pendu**, membres de mon comité de suivi de thèse, pour leurs conseils, leurs nombreuses suggestions et leur suivi bienveillant au cours de ces trois années.

Les membres du laboratoire ne seront pas oubliés : merci à **Cécile** pour son aide depuis le début, **Julien** et nos pauses (e)-cigarette qui permettent de prendre l'air, de parler jeux vidéos, politique et randonnées, **Sylvain**, **Joanna**, **Jessica**, **Gaëlle**, **Candice** et **Tubule**, le duo de choc, **Yann**, **Emilie**, **Pascal**, **Antoine** et **Françoise**, et pour tout le LSEM en général : merci de m'avoir fait me sentir à l'aise au sein du laboratoire et pour toute l'aide que vous m'avez apporté, que ce soit pour des manips, mais aussi pour vos questions, vos attentions et l'ambiance bienveillante que vous apportez. Je n'ai pas de point de comparaison mais je pense honnêtement que j'aurais pu difficilement mieux tomber pour ces 4 années au sein d'un laboratoire de recherche. Mais aussi aux personnes qui travaillent désormais autre part : pensées pour **Sarah**, **Laure** et aussi **Jean-Côme** ! Merci pour votre bonne humeur !

Je souhaite également remercier Ifremer et la région Pays de la Loire pour avoir financé ces travaux, et pour l'octroi de 6 mois de financements supplémentaires en raison de l'impact de la pandémie sur l'avancement général du projet.

Merci aussi à mes amis de (très) longue date, mes frères, pour leur soutien, les discussions et les moments passés ensemble depuis le collège jusqu'à maintenant, même en s'éloignant géographiquement : **Clément**, **Antoine**, **Thibaud**, **Devan**.

Merci aussi à ceux que je vois plus rarement : **Raphaël**, **Morgane**, **Tiffany**, **Marion**, **Julien**, **Gauthier** ... Les retrouvailles sont de très bons moments, qui me permettent de me changer les idées et de voir à quel point vous n'avez pas changé depuis tout ce temps.

N'oublions pas mes anciens colocataires (la liste est longue) : **Holi** qui m'a beaucoup aidé lors mon installation, **Roxane** et ses idées gastronomiques pendant le premier confinement, **Khalil** le texan et son optimisme, **Dinesh** et sa curiosité, **Rui** pour toutes les fois où j'ai croisé son regard dépité envers **Raoul le chien**, et **Juliette** pour sa bonne humeur brestoïse infaillible ! Je

garderais quelques polaroids de vous en souvenir de ces années nantaises. Bonne continuation à **Elodie** et **Oscar**, je vous cède ma place d'Ancien de la Jonelière.

Je remercie également ma mère **Marie** et **Jean-Luc**, pour m'avoir soutenu et accueilli régulièrement dans leur havre de paix finistérien, et pour m'avoir fourni en excellents légumes du potager lors de mes visites ! Merci aussi à mon frère **Niels** et à ma sœur **Marine** pour vos appels réguliers durant les week-ends.

Enfin, quelques lignes aussi pour **Morgane**, ton soutien et nos passages en Bretagne, en Normandie, tous ces petits moments et rêves que nous avons ensemble et qui rendent ma vie plus légère et plus poétique, et ce depuis que je te connais. Cette période de ma vie aurait été bien différente sans toi, merci d'être là.

Ces quelques années m'ont apporté tellement de choses : je ne saurais dire à quel point chacun de vous tous a participé à ce que je suis désormais, merci encore. J'ai du mal à croire le chemin parcouru quand je regarde derrière moi, et même si cela a toujours été un objectif dans un coin de ma tête depuis le départ, il y a maintenant 9 ans, je ne pensais pas pouvoir y arriver un jour.

Et je finirais par une citation de Murakami, car je crois bien que depuis que je l'ai découvert, la frontière est plus mince entre les rêves et la réalité, même pour le cartésien que je suis.

*"Même les rencontres de hasard sont dues à des liens noués dans des vies antérieures... tout est déterminé par le karma. Même pour des choses insignifiantes, le hasard n'existe pas."*

Haruki Murakami, *Kafka sur le rivage*

Je dédie cette thèse à **Oma**, et à **Opa**, paix à son âme.

## **Avant-propos**

Ces travaux de thèse ont été réalisés sous la co-direction des Dr. Soizick le Guyader et Dr. Marion Desdouits au sein du laboratoire Santé, Environnement et Microbiologie (LSEM) de l'unité MASAE, sur le site IFREMER de Nantes. Ces travaux ont bénéficié d'une allocation de recherche de la région Pays de la Loire et de l'IFREMER, et on fait l'objet de publications et de communications orales et par affiches comme listées ci-dessous :

### **Publications**

**Gabriel Euler-Nicolas**, Cécile Le Menec, Julien Schaeffer, Xi-Lei Zeng, Khalil Ettayebi, Robert L. Atmar, Françoise S. Le Guyader, Mary K. Estes and Marion Desdouits. Human sapovirus replication in human intestinal enteroids. *Journal of Virology* 2023

**Gabriel Euler-Nicolas**, Françoise S. Le Guyader and Marion Desdouits. Isolation of live single cells from oyster tissues for flow cytometry. Publication en cours de soumission par *Journal of Experimental Biology*.

### **Communications orales**

**Gabriel Euler-Nicolas**, Yann Guérardel, Jacques le Pendu, Nicolas Jouand, Soizick le Guyader and Marion Desdouits « Characterization of glycans involved in human enteric viruses and oyster interactions » - 7<sup>th</sup> International Society on Food and Environmental Virology Conference (ISFEV2022) à l'Université de Santiago de Compostela (Espagne) le 18 Mai 2022.

**Gabriel Euler-Nicolas**, Cécile Le Menec, Julien Schaeffer, Xi-Lei Zeng, Khalil Ettayebi, Robert L. Atmar, Françoise S. Le Guyader, Mary K. Estes et Marion Desdouits « Réplication de sapovirus humain dans le modèle entéroïde intestinal » - 17<sup>ème</sup> congrès de la Société Française de Microbiologie (SFM) à Montpellier (France) le 5 Octobre 2022.

**Gabriel Euler-Nicolas**, Yann Guérardel, Jacques le Pendu, Nicolas Jouand, Soizick le Guyader and Marion Desdouits « Caractérisation des glycanes impliqués dans les interactions entre cellules d'huîtres et norovirus infectant l'Homme » - Journées de l'Université de Nantes à la Cité des Congrès de Nantes le 3 juin 2022.



## **Communications par affiche**

**Gabriel Euler-Nicolas**, Audrey Auger, Adrien Breiman, Jennifer Jazat, Béatrice Le Moullac-Vaidye, Frédéric Chirat, Marion Desdouits, Jacques Le Pendu, Yann Guerardel, Soizick Le Guyader « Caractérisation des glycanes impliqués dans les interactions entre huître et virus entériques humains. » 16<sup>ème</sup> congrès de la Société Française de Microbiologie (SFM) à Nantes (France) du 22 au 24 Septembre 2021.

**Gabriel Euler-Nicolas**, Audrey Auger, Adrien Breiman, Jennifer Jazat, Béatrice Le Moullac-Vaidye, Frédéric Chirat, Marion Desdouits, Jacques Le Pendu, Yann Guerardel, Soizick Le Guyader. « Caractérisation des glycanes impliqués dans les interactions entre huître et norovirus. » 24<sup>ème</sup> Journées Francophones de Virologie à Strasbourg (France) du 11 au 12 Avril 2022.

**Gabriel Euler-Nicolas**, Cécile Le Mennec, Julien Schaeffer, Xi-Lei Zeng, Khalil Ettayebi, Robert L. Atmar, Françoise S. Le Guyader, Mary K. Estes et Marion Desdouits « Human sapovirus replication in human intestinal enteroids » - Journées de l'Université de Nantes à la Cité des Congrès de Nantes – Colloque Spotlight on Stem Cells le 5 Juin 2023.

## **Autres types de communications**

- Création et mise en place d'un atelier ludique pour la Fête de la Science de Nantes qui s'est déroulée en Octobre 2020, avec l'aide du pôle communication de l'Ifremer (Sophie Pilven) et des collègues du laboratoire. L'atelier consistait à faire participer les visiteurs et à leur faire suivre le trajet d'un norovirus à travers l'environnement jusqu'aux mollusques et l'hôte humain, sous la forme d'un jeu de l'oie afin de mieux comprendre les interactions entre l'Homme, l'environnement et les virus entériques.
- Participation au format « Thésèz-vous » organisé par le pôle communication de l'Ifremer, avec le tournage d'une vidéo réalisée par Ambre Bodenens, disponible sur YouTube ([https://youtu.be/F\\_KSo2Ni344](https://youtu.be/F_KSo2Ni344)) sur la chaîne de l'institut, dans laquelle je présente et vulgarise mon sujet de recherche.

## Abréviations

ARN : Acide RiboNucléique

BR : Branchies

Ct : Cycle Threshold

EFSA : European Food Safety Authority

ELISA : Enzyme Linked Immunosorbent Assay

FCV : Feline CaliciVirus

GCDCA : Glycochenodeoxycholic acid

HBGA : Histo-Blood Group Antigen

HIE : Human Intestinal Enteroid

ICTV : International Commitee on Taxonomy of Viruses

Kb : Kilobase

kDa : Kilo Dalton

MT : Manteau

NoV : Norovirus

NS : Non Structural protein

ORF : Open Reading Frame

RT-qPCR : Reverse Transcription-quantitative Polymerase Chain Reaction

SaV : Sapovirus

TD : Tissu Digestif

TIAC : Toxi-Infection Alimentaire

VLP : Virus Like Particles

VP : Viral Protein

## Table des figures

<b>Figure 1</b> : Arbre phylogénétique des différents genres de la famille des Calicivirus .....	18
<b>Figure 2</b> : Représentation schématique de l'organisation génomique.....	19
<b>Figure 3</b> : Analyse phylogénétique des séquences protéiques de la protéine virale non-structurale NS1/2.....	20
<b>Figure 4</b> : Alignement des séquences de la région C-terminale de la protéine NS2 .....	21
<b>Figure 5</b> : Représentation tridimensionnelle des structures d'homodimères de VP1 .....	25
<b>Figure 6</b> : Représentation tridimensionnelle des capsides .....	26
<b>Figure 7</b> : Schéma résumant les étapes principales du cycle viral des Calicivirus .....	28
<b>Figure 8</b> : Visualisation par microscopie électronique des particules virales de norovirus ....	30
<b>Figure 9</b> : Estimation des impacts qu'ont les infections à norovirus sur la population des Etats-Unis au cours d'une année .....	31
<b>Figure 10</b> : Schéma de la nouvelle classification des norovirus .....	33
<b>Figure 11</b> : Structure de la capside virale du norovirus .....	35
<b>Figure 12</b> : Vues latérales des sous-unités de la protéine majeure de capside VP1 .....	37
<b>Figure 13</b> : Représentation d'un dimère de VP1 .....	38
<b>Figure 14</b> : Représentation schématique des différentes sections du tractus digestif .....	40
<b>Figure 15</b> : Voies de transmission du norovirus.....	44
<b>Figure 16</b> : Proportions de cas de norovirus selon les mois de l'année .....	45
<b>Figure 17</b> : Proportions des différents variants de GII.4 parmi les séquences de l'ORF1 et l'ORF2 de norovirus humain.....	48
<b>Figure 18</b> : Nombre de séquences de l'ORF2 de norovirus humains .....	49
<b>Figure 19</b> : Représentation schématique des voies de biosynthèse des HBGA .....	51
<b>Figure 20</b> : Schéma récapitulatif de l'organisation de l'épithélium intestinal .....	59
<b>Figure 21</b> : Deux modèles d'études de la réplication virale du norovirus.....	61
<b>Figure 22</b> : Visualisation de sapovirus à l'aide de la microscopie électronique à transmission . .....	64
<b>Figure 23</b> : Pourcentage de détection de divers pathogènes dans les selles .....	66
<b>Figure 24</b> : Représentation schématique d'un dimère de VP1 de sapovirus GI.6.....	69
<b>Figure 25</b> : Observation de coupes histologiques de duodénum de porcs infectés par la souche de sapovirus Cowden .....	70
<b>Figure 26</b> : Nombre de prélèvements de selles positives aux sapovirus (avec l'âge des donneurs) en fonction du mois .....	73

<b>Figure 27</b> : Distribution des géotypes de sapovirus identifiés au cours de 38 études de surveillance.....	<b>74</b>
<b>Figure 28</b> : Quantification de la conservation des nucléotides au niveau de la jonction du génome codant pour l'ARNpol et VP1 chez les sapovirus .....	<b>76</b>
<b>Figure 29</b> : Position des changements d'acides aminés de la protéine virale VP1 accumulés par les souches infectant 5 patients de façon chronique.....	<b>77</b>
<b>Figure 30</b> : Distribution des échantillons de selles positifs (gris foncé) et négatifs (gris clair) à la détection en sapovirus en fonction de l'âge des personnes .....	<b>80</b>
<b>Figure 31</b> : Graphe similaire au graphe 30.....	<b>80</b>
<b>Figure 32</b> : Incidence cumulative des infections à sapovirus au sein d'une cohorte de 100 enfants .....	<b>81</b>
<b>Figure 33</b> : Cinétique de réplication d'une souche de sapovirus humaine utilisée pour infecter la lignée NEC8 (à gauche) et la lignée HuTu80 (à droite).....	<b>84</b>
<b>Figure 34</b> : Site d'accumulation d'environ 2 millions de coquilles d'huîtres .....	<b>86</b>
<b>Figure 35</b> : Représentation schématique des différentes étapes du développement .....	<b>88</b>
<b>Figure 36</b> : Représentation schématique de l'anatomie de <i>Crassostrea gigas</i> .....	<b>89</b>
<b>Figure 37</b> : Procédé de stabulation des huîtres en eau de mer filtrée proposé par Fabre-Domergue en 1912 .....	<b>90</b>
<b>Figure 38</b> : Récapitulatif du classement des zones de production selon la qualité microbiologique .....	<b>91</b>
<b>Figure 39</b> : Moyenne arithmétique des concentrations virales quantifiées par qRT-PCR dans 255 échantillons d'eau de mer.....	<b>94</b>
<b>Figure 40</b> : Comparaison de la décroissance virale dans les tissus digestifs de 10 huîtres toutes les 24 heures .....	<b>97</b>
<b>Figure 41</b> : Coupes de tissus d'huîtres ayant bioaccumulé des VLP durant 12 heures.....	<b>98</b>
<b>Figure 42</b> : Ratio moyen de détection par ELISA des différents HBGA dans les tissus de <i>C. gigas</i> .....	<b>101</b>
<b>Figure 43</b> : Suivi mensuel par ELISA de l'affinité des VLP de norovirus (A) GI.1 et (B) GII.4 pour les différents tissus de <i>C. gigas</i> .....	<b>103</b>
<b>Figure 44</b> : Géotypes de norovirus humains détectés dans les huîtres .....	<b>107</b>
<b>Figure 45</b> : Résumé des études portant sur l'interaction entre des VLP de norovirus d'origines animale et humaine avec les tissus des différentes espèces .....	<b>110</b>
<b>Figure 46</b> : Images de bactéries interagissant avec des VLP de norovirus GII.4 Sydney.....	<b>111</b>
<b>Figure 47</b> : Illustration schématique de la différence entre la quantification de génome de norovirus dans l'environnement par rapport à son infectiosité .....	<b>113</b>
<b>Figure 48</b> : Détection de la fluorescence émise par les cellules digestives de <i>C. gigas</i> .....	<b>132</b>

<b>Figure 49</b> : Expression de HBGA par les cellules isolées de trois tissus de <i>C. gigas</i> de janvier 2021 à janvier 2022 .....	<b>133</b>
<b>Figure 50</b> : Pourcentage de cellules isolées des 3 tissus de <i>C.</i> positives après marquage avec l'anticorps #21 ciblant les HBGA de type A.....	<b>135</b>
<b>Figure 51</b> : Pourcentage des cellules isolées de 3 tissus de <i>C. gigas</i> et d'entéroïde intestinal J2 (10 000 évènements) émettant de la fluorescence dans le canal R1 .....	<b>136</b>
<b>Figure 52</b> : Pourcentage de cellules digestives isolées à partir de 4 huîtres positives au marquage VLP GII.4 .....	<b>138</b>
<b>Figure 53</b> : Pourcentage de cellules digestives isolées à partir de 4 huîtres positives au marquage anti-A #21 .....	<b>138</b>
<b>Figure 54</b> : Pourcentage de cellules isolées de trois tissus de <i>C. gigas</i> et <i>O. edulis</i> positives au marquage anti-A.....	<b>139</b>
<b>Figure 55</b> : Pourcentage de cellules isolées de trois tissus de <i>C. gigas</i> et <i>O. edulis</i> positives au marquage avec des VLP GI.1 et GII.4 .....	<b>140</b>
<b>Figure 56</b> : Pourcentage de cellules isolées de trois tissus de <i>C. gigas</i> et <i>O. edulis</i> positives au double-marquage anti-A et VLP .....	<b>141</b>
<b>Figure 57</b> : Représentation des données acquises par BD FACSAria III Cell Sorter lors du tri cellulaire .....	<b>142</b>
<b>Figure 58</b> : Valeurs moyennes de copies de génome de norovirus GI et GII par gramme détectées par qRT-PCR dans les différentes fractions .....	<b>144</b>
<b>Figure 59</b> : Pourcentage du génome viral détecté par RT-qPCR dans chaque fraction du protocole de dissociation du tissu digestif par rapport à la somme des génomes viraux .....	<b>146</b>
<b>Figure 60</b> : A) et B) Quantification relative des antigènes A et Leb natifs ou méthylés dans les N-glycanes de 3 tissus.....	<b>148</b>

## Table des tableaux

<b>Tableau 1</b> : Liste des différentes protéines non-structurales des calicivirus.....	<b>23</b>
<b>Tableau 2</b> : Tableau récapitulatif des différents génogroupes de sapovirus .....	<b>67</b>
<b>Tableau 3</b> : Résumé des affinités entre certaines souches de norovirus et les HBGA.....	<b>104</b>
<b>Tableau 4</b> : Moyenne des valeurs de concentration en acides nucléiques et des ratios d'absorbance mesurés par NanoDrop 2000.....	<b>143</b>

## Table des matières

<b>Remerciements .....</b>	<b>1</b>
<b>Avant-propos .....</b>	<b>3</b>
<b>Abréviations .....</b>	<b>5</b>
<b>Table des figures .....</b>	<b>6</b>
<b>Table des tableaux .....</b>	<b>9</b>
<b>Table des matières .....</b>	<b>10</b>
<b>I. Norovirus et Sapovirus, deux genres des <i>Caliciviridae</i> .....</b>	<b>16</b>
<b>I.1. La famille des <i>Caliciviridae</i> .....</b>	<b>16</b>
I.1.A. Historique et classification.....	16
I.1.B. Caractéristiques moléculaires .....	18
I.1.B.a. Organisation génomique.....	18
I.1.B.b. Protéines non-structurales .....	20
I.1.B.c. Protéines structurales.....	23
I.1.B.d. Particules virales .....	24
I.1.C. Cycle de réplication .....	26
<b>I.2. Le genre <i>Norovirus</i>.....</b>	<b>29</b>
I.2.A. Généralités .....	29
I.2.A.a. Historique.....	29
I.2.A.b. Symptômes .....	30
I.2.A.c. Infections et impact .....	30
I.2.B. Classification.....	32
I.2.C. Caractéristiques moléculaires .....	34
I.2.C.a. Génome, protéines et particule virale .....	34
I.2.C.b. Différences structurales entre les génotypes .....	36
I.2.C.c. Domaine d'interaction avec les HBGA.....	37
I.2.D. Réplication virale.....	38
I.2.D.a. Tropisme des norovirus.....	38
I.2.D.b. Excrétion virale.....	41
I.2.E. Epidémiologie .....	42
I.2.E.a. Voies de transmission.....	42
I.2.E.b. Saisonnalité .....	44
I.2.E.c. Diversité et recombinaison .....	45

I.2.E.d. Epidémiologie moléculaire.....	48
<b>I.2.F. Interactions hôte-virus .....</b>	<b>50</b>
I.2.F.a. Les antigènes tissulaires de groupe sanguin .....	50
I.2.F.b. Affinités entre souches et HBGA .....	52
I.2.F.c. Autres interactions .....	53
<b>I.2.G. Pathogénèse .....</b>	<b>54</b>
I.2.G.a. Physiopathologie de l'infection à norovirus.....	54
I.2.G.b. Immunité.....	55
I.2.G.b. Réponse interféron.....	55
I.2.G.d. Outils thérapeutiques .....	56
<b>I.2.H. Méthodes d'étude.....</b>	<b>57</b>
I.2.H.a. Culture en lignées cellulaires .....	57
I.2.H.b. Le modèle entéroïde humain et les acides biliaires.....	58
I.2.H.c. Autres modèles.....	60
I.2.H.d. Détection génomique .....	61
<b>I.3. Le genre <i>Sapovirus</i> .....</b>	<b>63</b>
<b>I.3.A. Généralités .....</b>	<b>63</b>
I.3.A.a. Historique.....	63
I.3.A.b. Symptômes .....	64
I.3.A.c. Prévalence .....	65
<b>I.3.B. Classification.....</b>	<b>66</b>
<b>I.3.C. Caractéristiques moléculaires .....</b>	<b>68</b>
I.3.C.a. Caractéristiques génomiques .....	68
I.3.C.b. Caractéristiques structurales.....	68
<b>I.2.D. Réplication virale.....</b>	<b>69</b>
I.2.D.a. Tropisme du sapovirus .....	69
I.2.D.b. Excrétion virale.....	70
<b>I.2.E. Epidémiologie .....</b>	<b>71</b>
I.2.E.a. Voies de transmission.....	71
I.2.E.b. Saisonnalité .....	72
I.2.E.c. Epidémiologie moléculaire.....	73
I.2.E.d. Diversité et recombinaison.....	74
<b>I.2.F. Interactions hôte-virus .....</b>	<b>78</b>
I.2.F.a. Récepteurs du sapovirus .....	78
I.2.F.b. Sapovirus et HBGA.....	78
<b>I.2.G. Immunité.....</b>	<b>79</b>
I.2.G.a. Sensibilité selon l'âge .....	79
I.2.G.b. Réinfections et protection .....	80



I.2.H. Modèles d'étude cellulaire .....	82
I.2.H.a. Historique.....	82
I.2.H.b. La souche porcine Cowden .....	82
I.2.H.c. Récents succès.....	83
I.2.H.d. Détection génomique .....	84
<b>II. Huîtres et environnement.....</b>	<b>86</b>
<b>II.1. L'huître, un aliment pour l'Homme.....</b>	<b>86</b>
II.1.A. Historique .....	86
II.1.B. L'ostréiculture moderne.....	87
II.1.C. Anatomie et mécanismes de nutrition .....	87
II.2.D. Les huîtres, source de pathologie chez le consommateur.....	89
II.1.E. Classement des zones de production.....	90
<b>II.2. Circulation des souches de norovirus et sapovirus dans l'environnement.....</b>	<b>92</b>
II.2.A. Dans les eaux usées .....	92
II.2.B. Après traitement .....	92
II.2.C. Dans les eaux littorales .....	93
II.2.D. Phénomènes météorologiques et conséquences .....	94
<b>II.3. Contamination des huîtres .....</b>	<b>95</b>
II.3.A. Par norovirus et sapovirus .....	95
II.3.B. Décontamination des huîtres .....	96
<b>II.4. Bioaccumulation virale.....</b>	<b>98</b>
II.4.A. Premières expérimentations .....	98
II.4.B. Bioaccumulation de VLP.....	98
<b>II.5. Huîtres, glycanes et norovirus .....</b>	<b>99</b>
II.5.A. Présence de glycanes similaires aux HBGA .....	99
II.5.B. Inhibition de l'interaction .....	100
II.5.C. Distribution tissulaire des glycanes .....	100
II.5.D. Variations saisonnières .....	102
II.5.E. Variations inter-espèces .....	103
<b>II.6. Différences d'affinités entre norovirus et HBGA .....</b>	<b>104</b>
II.6.A. Selon les souches.....	104
II.6.B. Dans les huîtres.....	105
II.6.C. Un phénomène de sélection .....	106
II.6.D. Biais et limites .....	107

<b>II.7. Interactions entre souches virales et environnement .....</b>	<b>108</b>
II.7.A. Circulation des souches animales .....	108
II.7.B. Souches animales et HBGA .....	108
II.7.C. Autres interactions .....	110
<b>II.8. Resistance des particules virales.....</b>	<b>111</b>
II.8.A. A la décontamination.....	111
II.8.B. Dans l'environnement.....	112
<b>Objectif des travaux de thèse.....</b>	<b>114</b>
<b>III. Travaux originaux.....</b>	<b>115</b>
<b>III.1. Rôle des glycanes dans les interactions entre huîtres et norovirus</b>	<b>115</b>
<b>III.1.A. Développement d'un protocole pour isoler des cellules viables des</b>	
<b>tissus d'huîtres .....</b>	<b>115</b>
Objectifs de l'étude et résultats principaux.....	115
<b>III.1.B. Interactions entre norovirus et cellules d'huîtres.....</b>	<b>128</b>
Introduction et objectifs .....	128
Matériel et méthodes.....	129
Résultats .....	132
Discussion .....	147
<b>Conclusion de la partie I : .....</b>	<b>151</b>
<b>III.2. Réplication de sapovirus humains dans le modèle entéroïde</b>	
<b>intestinal .....</b>	<b>152</b>
Introduction à l'étude .....	152
Objectifs de l'étude et résultats principaux.....	152
<b>Conclusion de la partie II .....</b>	<b>177</b>
<b>IV. Conclusion générale et perspectives .....</b>	<b>178</b>
<b>Bibliographie .....</b>	<b>183</b>
<b>Communication par affiches .....</b>	<b>223</b>
<b>ANNEXE I.....</b>	<b>225</b>

# Norovirus, sapovirus et les huîtres : apport du modèle entéroïde intestinal et interactions avec les glycanes

## Introduction

Les maladies diarrhéiques sont responsables d'importantes répercussions sanitaires dans l'ensemble des pays touchés, que ce soit sur les personnes ayant un accès limité à l'eau potable, aux infrastructures de santé et à la difficulté de développement de stratégie de prévention et de traitement adéquats ; mais également dans les pays industrialisés où elles provoquent de nombreuses hospitalisations ainsi que des pertes de productivité associées à l'absentéisme entraîné par la pathologie. En 2015, les gastroentérites furent responsables d'environ 500 000 décès chez les enfants de moins de 5 ans (Wang et al., 2016). L'Organisation Mondiale de la Santé estime qu'il y a environ 1,7 milliards cas de diarrhées pédiatriques chaque année. Les régions les plus touchées sont l'Afrique sub-saharienne et l'Asie du Sud, notamment le Tchad, le Niger ou l'Inde. Les norovirus, appartenant à la famille virale des *Caliciviridae*, sont associés à environ 18% des cas de diarrhées pathologiques dans le monde et sont responsables d'une forte mortalité dans les pays où l'accès à l'eau potable est limité avec une population souffrant de malnutrition.

Les hôtes humains sont majoritairement contaminés par voie féco-orale mais également par voie hydrique et via des aliments contaminés, manipulés par des personnes malades ou lors de leur production. Des aliments peuvent également accumuler des particules virales de façon passive comme le font les huîtres. En lien avec l'excrétion virale des personnes infectées, les rejets humains peuvent parfois contaminer le littoral, et donc les lieux de production de ces mollusques.

L'huître creuse *Crassostrea gigas* exprime des glycanes proches de ceux qui définissent le groupe sanguin chez l'Homme, et ces molécules sont les récepteurs d'attachement de certains virus, dont les norovirus, qui peuvent s'y retrouver piégés (Heggelund et al., 2017; Le Guyader et al., 2006). La présence de ces glycanes dans les tissus de l'huître semble également causer un phénomène de sélection de certaines souches virales par rapport à d'autres, grâce à des mécanismes d'interactions entre HBGA (Histo-Blood Group Antigen) et particules virales encore peu connus (Maalouf et al., 2011). Il existe en effet des différences dans les affinités que présentent certaines souches virales avec les différents glycanes, et la nature de ceux exprimés par les différentes espèces d'huîtres pourraient être à l'origine de cette sélection virale.

De nombreux autres virus peuvent également causer une pathologie de type gastroentérite, dont les sapovirus, appartenant, à la même famille virale. Ceux-ci sont détectés de façon croissante dans la population depuis quelques années, mais ont été moins étudiés que les norovirus malgré une sévérité clinique similaire. Ainsi, il est estimé qu'ils sont responsables de 3,4% des cas de gastro-entérites au cours des 20 dernières années, en infectant majoritairement les enfants de moins de 2 ans (Valcarce et al., 2021). Après plusieurs décennies sans modèle de culture cellulaire à disposition, des progrès conséquents ont eu lieu dans les dernières années : une technique de culture des norovirus utilisant des cellules souches intestinales (entéroïdes) au cours de l'année 2016, tandis que certaines souches de sapovirus humains ont démontré leur réplication sur une lignée duodénale en 2020 (Ettayebi et al., 2016; Takagi et al., 2020). Ces modèles ont permis d'approfondir de nombreuses connaissances sur la biologie de ces virus, qui étaient lacunaires sur certains points malgré leur poids épidémiologique important.

L'objectif de cette thèse est donc, à travers le projet GOyAVE (Glycans and Oysters Attachment to enteric Viruses in the coastal Environment), d'identifier précisément la nature et la localisation des HBGA exprimés dans l'huître au niveau cellulaire grâce à une nouvelle technique de dissociation des tissus qui permet d'isoler des cellules vivantes de différents tissus. Les partenaires du projet ont également pour but de caractériser la nature chimique de ces glycanes d'huître grâce à des méthodes structurales. Ces approches multidisciplinaires permettraient de mieux comprendre les différents phénomènes liés à la bioaccumulation et la sélection de souches de norovirus par les huîtres, et d'ouvrir la voie à des stratégies pour lutter contre cette contamination.

Le second objectif consiste à appliquer le modèle entéroïde à la culture *in vitro* des sapovirus humains, car aucun modèle de culture de ces virus n'existait alors au début de ces travaux de thèse.

De plus, les entéroïdes permettent de s'affranchir de certaines limites inhérentes aux lignées cellulaires classiques, et d'étoffer les connaissances sur ce virus. Des données concernant les cofacteurs nécessaires à la réplication, le tropisme ou encore la dépendance aux HBGA ont donc été obtenues.

La première partie de ce manuscrit comprends une revue bibliographique résumant les connaissances sur les genres *Norovirus* et *Sapovirus*, deux membres de la famille des *Caliciviridae*, ainsi que leur présence dans l'environnement et dans l'huître creuse *C. gigas*. La seconde partie présente les résultats obtenus au cours de cette thèse : données préliminaires qui devront être finalisées mais également les articles publiés ou en cours de soumission. Une dernière partie vise à discuter l'intérêt de ces travaux et les perspectives que les résultats obtenus permettent d'envisager par la suite.

# I. *Norovirus et Sapovirus, deux genres des Caliciviridae*

## I.1. La famille des *Caliciviridae*

### I.1.A. Historique et classification

La famille des *Caliciviridae* regroupe 11 genres viraux différents infectant un spectre d'hôte relativement large. Ces virus présentent un génome d'ARN simple brin de polarité positive encapsidé dans une particule virale de petite taille capable de résister de façon importante aux conditions environnementales (Nims and Plavsic, 2013; Smertina et al., 2021). Les virus des genres *Norovirus*, *Nebovirus*, *Sapovirus*, *Lagovirus*, *Vesivirus*, *Recovirus* et *Valovirus* sont capables d'infecter des mammifères en causant une pathologie gastro-intestinale mais peuvent également se répliquer de façon asymptomatique chez leurs hôtes. Lors des infections symptomatiques, on retrouve alors des signes cliniques typiques tels que diarrhées, vomissements, douleurs abdominales, mais d'autres genres comme les *Vesivirus* ou les *Lagovirus* peuvent provoquer des atteintes hépatiques ou respiratoires, voire des défaillances multiviscérales chez leurs hôtes (Martella et al., 2015; Strive et al., 2010). Les *Nacovirus* et *Bavovirus* sont capables d'infecter les oiseaux, en particulier les poules et les dindes, sans démontrer de corrélation claire entre certains symptômes et l'infection (Wolf et al., 2012). Les *Salovirus* infectent des poissons tels que les saumons de l'atlantique (*Salmo salar*) en induisant des signes d'inflammation cardiaques et musculaires (Mikalsen et al. 2014). Les *Minovirus* infectent un poisson d'eau douce (méné à grosse tête, *Pimephales promelas*) en induisant des hémorragies mais les échantillons montraient également une co-infection avec un picornavirus (Mor et al. 2017).

Historiquement, la première pathologie liée à un calicivirus a été identifiée en 1932 aux Etats-Unis : il s'agissait alors d'un vesivirus, l'exanthème vésiculaire du porc, qui forme des lésions au niveau de l'épithélium buccal mais également cutané chez les animaux infectés. L'agent responsable est longtemps resté inconnu et fut purifié et observé en 1968 (Wawrzkievicz et al., 1968). Son aspect morphologique et la pathologie causée furent rapidement mises en lien avec un autre vesivirus : le San Miguel sea lion virus en 1973 (Smith et al., 1973). Le calicivirus félin (FCV) fut isolé et répliqué dans une lignée cellulaire dès 1957, mais fut initialement associé à la famille des *Picornaviridae* (Melnick et al., 1974). L'épidémie de gastro-entérites de 1968 dans une école de la ville de Norwalk aux Etats-Unis permit également d'isoler un agent infectieux : le « Norwalk agent », ou norovirus par la suite (Adler and Zickl, 1969; Dolin et al., 1972).

La famille des *Caliciviridae* incluant ces 3 virus cités précédemment a été créée en 1979 par l'ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses). Les caractéristiques virales des membres de cette famille sont : la présence d'un génome ARN simple brin, une protéine majeure de structure formant une capsidie ayant une forme icosaédrique, et la présence d'une protéine liée en 5' des ARN viraux de type VPg (viral protein genome linked). Leurs capsides, observées en microscopie électronique, présentent des motifs caractéristiques avec des creux et des protrusions, d'où le mot *calix* signifiant « calice » en latin utilisé pour nommer la famille virale (Black et al., 1978; Matthews, 1979). De la même façon, la classification des norovirus humains mis un certain temps à être définie car les méthodes disponibles étaient limitées (Kapikian et al., 1972). L'observation morphologique des particules virales a permis de suggérer des liens phylogénétiques entre plusieurs genres viraux, mais l'avènement des clonages et du séquençage ont permis de définitivement classer ces virus et autres « small round structured viruses », fréquemment associés aux épidémies de gastro-entérites virales, en tant que membres des *Caliciviridae* (Jiang et al., 1990). Le sixième rapport de l'ICTV, publié en 1995, regroupe alors l'ensemble des virus de la famille *Caliciviridae* sous un seul genre *Calicivirus*, malgré des différences déjà observées au niveau des cadres de lecture, des hôtes infectés et antigénique (Cubitt et al., 1995). L'analyse des séquences partielles voire complètes de génomes viraux permirent alors de proposer une nouvelle classification en 1998 avec 4 genres différents (*Vesivirus*, *Lagovirus*, *Norwalkvirus* et *Sapporovirus*) (Green et al., 2000). Ces genres ont depuis subi des modifications au niveau de leurs noms, et le nombre de genres totaux inclus dans la famille virale *Caliciviridae* a augmenté (passant de 4 à 11) en parallèle du développement grandissant des méthodes de détection et de séquençage à travers le monde dans divers organismes, pour déboucher sur la classification représentée par la **figure 1**, qui ne figure pas encore les récents ajouts des *Minovirus* et *Salovirus* identifiés chez des poissons il y a quelques années (Mikalsen et al., 2014; Mor et al., 2017).

Chaque genre viral présente son propre système de classification, permettant de discriminer les souches selon leur génogroupe, puis leur génotype, grâce aux divergences entre les séquences. Cette classification s'appuie sur la séquence codante pour la protéine majeure de capsidie VP1, et sur la séquence de la polymérase virale sur lesquelles nous reviendrons en détail par la suite.

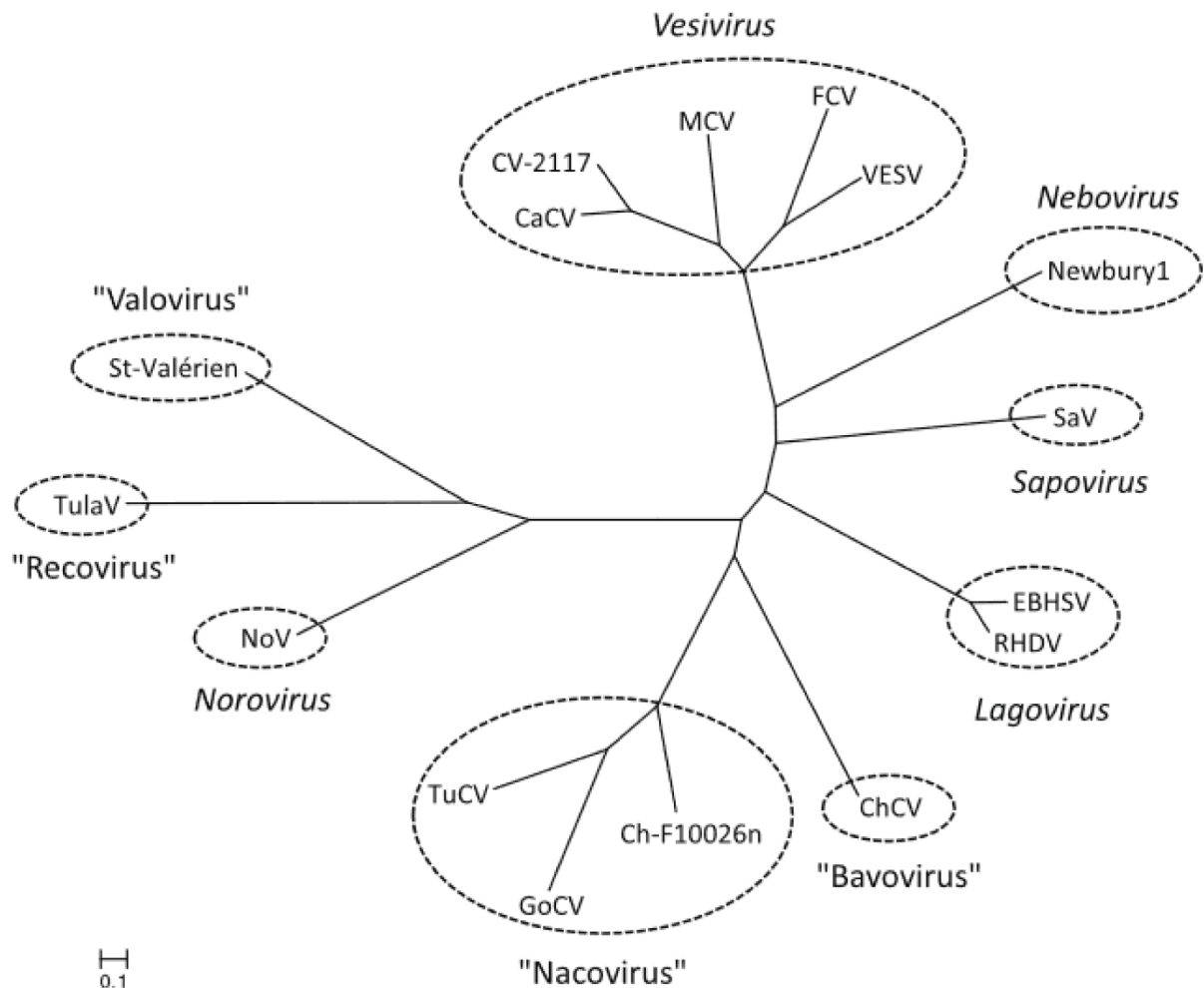


Figure 1 : Arbre phylogénétique des différents genres de la famille des calicivirus basé sur les séquences protéiques complètes de la protéine majeure de capsid VP1. La longueur des branches matérialise la distance génétique entre les souches présentées. Les minovirus et salovirus sont absents de cet arbre en raison de leur récente découverte. Liao et al., 2014

## I.1.B. Caractéristiques moléculaires

### I.1.B.a. Organisation génomique

Les virus appartenant à la famille des *Caliciviridae* présentent une organisation génomique similaire : le génome (**Figure 2**) est un ARN monocaténaire de polarité positive, long de 7,3kb à 8,5kb en moyenne, et présente 2 à 3 cadres de lectures ouverts (open reading frames, ORF) (Karst et al., 2014; Smertina et al., 2019). Le génome est également lié de façon covalente à une protéine désignée par l'acronyme VPg (viral protein genome linked) en 5' et présente une polyadénylation en 3'. De courtes séquences non-traduites (UTR en anglais) sont présentes à ces deux extrémités du génome : elles sont généralement assez courtes en 5' (5 nucléotides pour le norovirus murin) et plus longues en 3' pouvant

atteindre une centaine de nucléotides (Alhatlani et al., 2015; Oka et al., 2018). L'ORF1 code toujours pour une longue polyprotéine qui sera ensuite clivée par la protéase virale, libérant les autres protéines non-structurales nécessaires à la réplication du virus.



Figure 2 : Représentation schématique de l'organisation génomique de virus appartenant à différents genres compris dans la famille des Caliciviridae. Les génomes des virus appartenant aux genres *Norovirus* et *Vesivirus* présentent 3 ORF (sauf pour les norovirus murins qui peuvent en présenter une 4<sup>ème</sup>). Les genres *Lagovirus*, *Nebovirus* et *Sapovirus* présentent 2 ORF. L'ORF1 code pour une polyprotéine virale et présente un motif protéique VPg en 5'. Smertina et al. 2019

Certaines différences sont à noter comme la non-discontinuité de l'ORF1 chez *Sapovirus*, *Lagovirus* et *Nebovirus* entre la région codant pour l'ARN-polymérase virale et la région qui code pour la protéine majeure de capsid VP1, tandis que cette dernière est comprise dans l'ORF2 chez *Norovirus* et *Vesivirus*. De même, le gène de la protéine de capsid mineure VP2 sera alors compris dans l'ORF2 chez les virus du premier groupe évoqué, et dans l'ORF3 pour les seconds. La présence d'une 4<sup>ème</sup> ORF alternative codant pour un facteur de virulence VF1 peut être notée chez les norovirus murins, que l'on ne retrouve pas dans les génomes des autres virus présentés (McFadden et al., 2011).



Le rôle de ces protéines non-structurales est peu connu, partiellement en raison de la découverte encore récente de modèles cellulaires efficaces pour répliquer certains des virus mentionnés. Les informations actuelles ont été obtenues en comparant les motifs de séquence avec d'autres protéines virales dont les fonctions sont connues, ou en transposant les connaissances acquises grâce à certains virus comme le norovirus murins aux autres virus de la famille virale, par homologie de séquence ou de structure lorsque celles-ci apparaissent comme conservées.

### I.1.B.b. Protéines non-structurales

Le précurseur NS1/NS2 présente d'importantes variabilités de séquences entre les différents genres viraux : celui-ci est en effet clivé chez *Sapovirus*, *Vesivirus*, *Lagovirus* et *Nebovirus* (**Figure 3**). Cela libère alors deux protéines : NS1 et NS2, qui pourraient avoir un rôle dans la persistance, le tropisme ou la virulence (Nice et al., 2013; Smertina et al., 2021). Ce précurseur n'est en revanche pas clivé par la protéase virale chez *Norovirus*, mais plutôt par des caspases cellulaires chez la souris (Lee et al., 2019). Des mutations d'un seul aminé dans la protéine NS1 du norovirus murin peuvent conduire à une infection chronique alors que la souche sauvage ne démontre pas cette infection persistante (Nice et al., 2013).

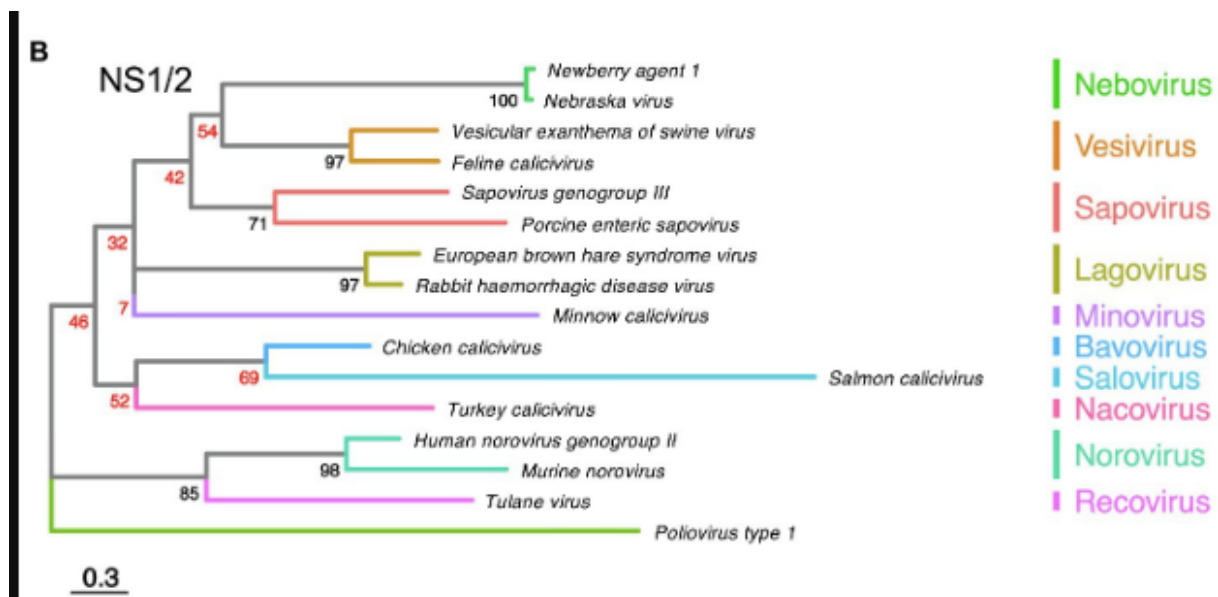


Figure 3 : Analyse phylogénétique des séquences protéiques de la protéine virale non-structurale NS1/2 au sein de différents genres de Calicivirus selon la méthode du maximum de vraisemblance. Les régions codantes pour NS1/2 ont été extraites d'un alignement préalable des ORF1 de virus de chaque genre. L'arbre est représenté à l'échelle, et les longueurs des branches indiquent le nombre

de substitutions par site. Les valeurs d'Ultrafast bootstrap sont indiquées à chaque nœud, en rouge lorsque ces valeurs sont faibles (<70) Smertina et al., 2021.

Le précurseur non-clivé NS1/2 semble interagir avec la protéine VAP-A (Vesicle-associated membrane protein-Associated Protein A), jouant un rôle dans la fusion des vésicules médiées par les protéines SNARE. Cette association a été retrouvée dans le cas des norovirus, grâce à un motif particulier retrouvé également chez les protéines cellulaires liant VAP-A (McCune et al., 2017). Il a donc été suggéré que cette protéine virale joue un rôle dans la formation des complexes de réplication viraux, en sachant que la protéine non-structurale NS5A du virus de l'hépatite C (*Flaviridae*) interagit également avec VAP-A et a été associée à une fonction similaire (Tu et al., 1999).

Une potentielle activité en tant que viroporine a été suggéré, permettant de créer des canaux ioniques transmembranaires en s'oligomérisant. Cette activité est avérée pour la protéine NS1/2 du virus Tulane (genre *Recovirus*), et des alignements des séquences NS2 de calicivirus (**Figure 4**) démontre une conservation de certains motifs à l'origine de cette activité (Strtak et al., 2019).

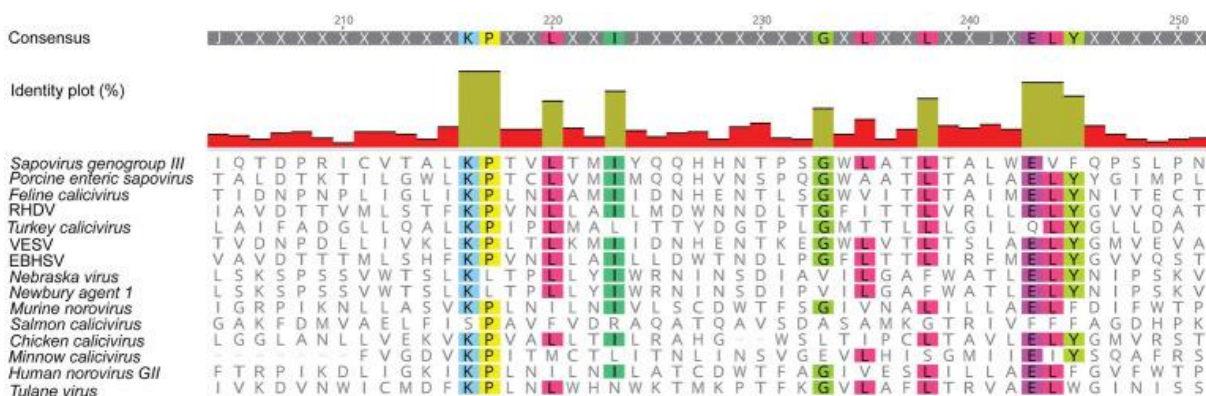


Figure 4 : Alignement des séquences de la région C-terminale du domaine viroporine putatif de la protéine NS2 de différents calicivirus. Les acides aminés en couleur indiquent une certaine conservation de séquence entre les différents genres dans cette portion C-terminale de NS2, dont l'activité viroporine est avérée chez le virus Tulane. Smertina et al. 2021

La protéine NS3 présente un motif typique conservé chez les *Calicivirus* qui traduit son activité NTPase associé à une activité hélicase à ARN, qui a été récemment démontrée chez les norovirus humains (Li et al., 2018). De plus, des interactions avec les microtubules, l'appareil de Golgi et les membranes riches en lipides ont également été démontrées pour la protéine NS3 des norovirus, facilitant certainement la formation de complexes réplicatifs et s'associant même avec l'ARN double brin (intermédiaire réplicatif) dans ces complexes (Cotton et al., 2017).

La protéine NS4 présente peu, voire pas d'homologie avec d'autres séquences protéiques virales, et démontre même une diversité importante au sein de la famille des *Caliciviridae* (Smertina et al., 2021). La protéine NS4 des norovirus humains semble être un facteur déterminant dans la mise en place des complexes de réplication viraux par interactions avec les membranes cellulaires et formation de vésicules, grâce à un motif particulier lui permettant de copier le signal d'export du réticulum endoplasmique (Sharp et al., 2012). La protéine 3A des poliovirus est également impliquée dans la localisation membranaire des complexes de réplication, et ce mécanisme est également retrouvé chez le FCV (Bailey et al., 2010a; Teterina et al., 2011). L'extrapolation de ces fonctions aux protéines NS4 des autres calicivirus reste hypothétique, au vu de la diversité génétique des séquences codantes.

NS5 (Vpg) est une protéine qui se lie de façon covalente aux ARN génomiques et sous-génomiques produits lors de la réplication. Ce phénomène est également retrouvé parmi les virus des familles *Picornaviridae* ou encore les phytovirus *Potyviridae* (Sadowy et al., 2001).

Il a été prouvé que l'absence de cette protéine en liaison avec le génome rendait les virions de FCV non infectieux (Burroughs and Brown, 1978; Herbert et al., 1997). NS5/VPg est en effet nécessaire pour permettre l'interaction du génome avec les polymérases virales, et donc permettre une initiation de la réplication protéine-dépendante. Cette protéine virale interagirait également avec certains facteurs d'initiation de la traduction cellulaire, en particulier les eIF4F et eIF4E pour le FCV, le norovirus murin ou encore le sapovirus porcin (Chaudhry et al., 2006; Hosmillo et al., 2014).

NS6 (3CL pro, pour 3C-like protease) est appelée ainsi en raison de sa similarité avec la protéase 3C des picornavirus. Elle reste parfois associée à la polymérase NS7 sous forme de précurseur fonctionnel, et les formes individuelles de chaque protéine ne sont alors pas identifiables *in vitro* dans le cas des sapovirus (Robel et al., 2008). Une association similaire présentant les deux activités catalytiques de manière fonctionnelle est retrouvée chez *Norovirus* ou *Vesivirus* (Chang et al., 2005; Sosnovtsev et al., 2002). Cette enzyme semble présenter au moins deux sites catalytiques, du moins pour certaines souches (Someya et al., 2002). Elle est également capable de cliver les Poly(A) Binding Protein de l'hôte, qui se fixent à la queue poly-A des ARN messagers en 3' afin de les protéger de la dégradation par les ribonucléases et favoriser la circularisation des ARNm pour permettre leur prise en charge par les ribosomes. Cette protéase virale jouerait donc un rôle dans l'inhibition de la synthèse protéique des cellules infectées (Kuyumcu-Martinez et al., 2004).

La NS7 (RdRp) est l'ARN polymérase ARN-dépendante virale. Celle-ci présente de nombreuses similarités structurales et catalytiques au sein de la famille *Caliciviridae*. Comme les autres enzymes de ce type, elle entraîne des erreurs lors de la réplication en raison de l'absence d'activité correctrice, à la différence des ADN polymérases cellulaires. Ces erreurs permettent l'apparition de mutations qui peuvent impacter positivement ou négativement les futurs variants, et sont un facteur déterminant dans l'évolution des virus de manière générale. Un motif court de 4 acides aminés est conservé au sein de toutes les RdRp des calicivirus et picornavirus, probablement importante pour l'activité enzymatique et la fidélité de cette enzyme (Smertina et al., 2019).

NS	Fonctions
NS1/2	Formation de complexes de réplication, viroporine ?
NS3	Hélicase, NTPase, formations des complexes de réplication
NS4	Formation de complexes de réplication
NS5	Liaison à ARN génomique et sous-génomique, initiation de traduction, réplication, infectiosité
NS6	Protéase
NS7	ARN polymérase ARN dépendante

*Tableau 1 : Liste des différentes protéines non-structurales des calicivirus et leurs fonctions connues. Les fonctions indiquées n'ont pas été démontré expérimentalement pour l'ensemble des genres et font office de suppositions, à la lumière de similitudes des séquences protéiques d'autres familles virales pour lesquelles le rôle a été identifié.*

### **I.1.B.c. Protéines structurales**

Selon les genres viraux, les ORF1 et 2 (*Lagovirus*, *Nebovirus*, *Sapovirus*) ou ORF2 et 3 (*Norovirus*, *Vesivirus*) codent respectivement la protéine majeure de capsid VP1 et la protéine mineure VP2, les deux protéines structurales du virus, qui peuvent être obtenues par clivage de la polyprotéine comme

dans le cas des sapovirus, ou par traduction d'un ARN sous-génomique (Clarke and Lambden, 2000; Hansman et al., 2008; Neill et al., 1991).

L'ORF2 du FCV code pour cette protéine VP1 mais également pour une petite protéine « leader of the capsid » d'une centaine d'acides aminés. Elle joue un rôle dans l'infectiosité et la capacité de réplication des virions (Abente et al., 2013).

VP1 est traduite en une protéine de 58 à 62 kDa comprenant environ 530 à 555 acides aminés. Un nombre fixe de copies de cette protéine s'associent généralement pour former des dimères, et former les capsides virales (Campillay-Véliz et al., 2020; Conley et al., 2017; Li et al., 2022a; Yu et al., 2013).

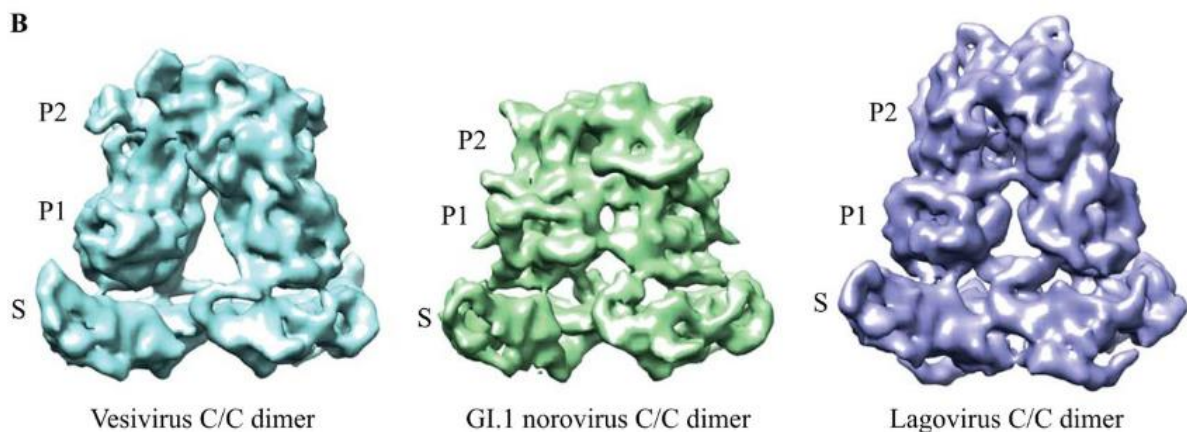
La région codante pour VP2 comporte entre 200 et 300 acides aminés, formant une protéine de 17 à 29 kDa une fois traduite selon le genre viral. Elle semble être présente en très faible quantité dans les capsides virales car des études sur les norovirus, sapovirus et FCV n'identifient qu'entre 2 à 12 copies par virions (Conley et al., 2019; Li et al., 2022b; Vongpunsawad et al., 2013). La présence de cette protéine virale est essentielle pour maintenir l'infectiosité des virions du FCV (Sosnovtsev et al., 2005). La protéine VP2 du FCV est également impliquée dans la formation d'un pore dans la capside virale, permettant de délivrer le génome viral dans le cytoplasme des cellules infectées (Conley et al., 2019). De manière globale, VP2 reste la protéine structurale dans le rôle est le moins connu parmi les différents genres viraux de la famille *Caliciviridae*, probablement en raison de la difficulté à l'isoler et du faible nombre de copies incluses dans les virions.

Certaines souches de sapovirus sont présentées comme possédant également une troisième ORF, chevauchant la région codante pour la protéine majeure de la capside, bien que le rôle de celle-ci reste encore indéterminé, que la protéine codée n'a jamais été isolée et que peu d'étude récentes en font mention (Okada et al., 2006; Tse et al., 2012).

### **I.1.B.d. Particules virales**

La capside icosaédrique est constituée d'un assemblage de 90 dimères de VP1, formant une particule comprise entre 27 et 40nm de symétrie icosaédrique T=3 (Prasad et al., 1999, 1996). Les dimères de VP1 présentent une organisation similaire comme montré sur la **figure 5** : un domaine S (Shell) localisé vers l'intérieur de la capside, et un domaine P (Protruding) vers l'extérieur. Ces deux domaines sont reliés ensemble par une région charnière (« hinge ») flexible. Le domaine P peut lui être subdivisé en 2 régions : P1 qui permet de former les homodimères en interagissant avec un autre

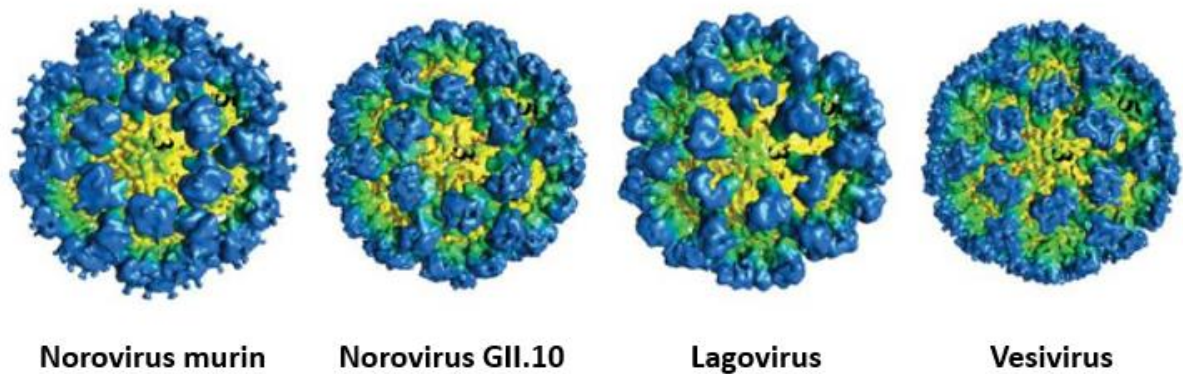
domaine P1, et P2 formant une région hypervariable constituant des épitopes antigéniques, et responsable de la liaison avec les récepteurs d'attachement viraux (Choi et al., 2008; Donaldson et al., 2010). Ce sont donc les mutations dans cette région particulière qui seraient responsables des modifications de l'antigénicité des calicivirus et la reconnaissance de ligands spécifiques (Cao et al., 2007; Lochridge et al., 2005; Shanker et al., 2011; Singh et al., 2014). Les capsides des différents genres de calicivirus présentent également des différences morphologiques au niveau des protrusions présentes à la surface des virions, en lien avec la forte variabilité des régions P (Chen et al., 2004).



*Figure 5 : Représentations tridimensionnelles des structures d'homodimères de VP1 de différents calicivirus (vesivirus, norovirus GI.1 et lagovirus) établies à partir de données de microscopie électronique à une résolution comprise entre 6,5 et 8,5 Å. Les différentes sous-parties sont indiquées par des lettres : S pour le domaine Shell, P1 et P2 pour les deux parties du domaine Protuding. Miyazaki et al. 2016.*

Les protéines de capside VP1 de certains genres (*Norovirus*, *Sapovirus*, *Lagovirus*, *Vesivirus*, *Nebovirus*) ont démontré leur capacité à s'auto-assembler pour former des particule pseudo-virales (VLP) ne contenant aucun génome mais présentant des caractéristiques structurales et antigéniques identiques à celles des virions infectieux (Cho et al., 2018; Jiang et al., 1992; Lochridge and Hardy, 2003; Miyazaki et al., 2022; Nagesha et al., 1999; Wang et al., 2013). Ces structures (**Figure 6**) sont essentielles pour l'étude des virus car elles permettent d'identifier la nature des interactions entre la capside virale et les récepteurs ou les facteurs d'attachement, ainsi que les réponses immunitaires dirigées contre la capside.





*Figure 6 : Représentation tridimensionnelle des capsides de différents calicivirus (Norovirus murin, norovirus humain GII.10, Lagovirus et Vesivirus) établies à partir de données de microscopie électronique et de cristallographie aux rayons X. Le code couleur indique la distance par rapport au centre de la particule (jaune = 144 Å, vert = 160 Å et bleu = 190 Å). Miyazaki et al. 2016.*

### **I.1.C. Cycle de réplication**

Les mécanismes d'entrée dans les cellules diffèrent selon les genres viraux considérés, mais le domaine P situé sur la partie externe de la capside est responsable de l'interaction avec les cellules. Certains calicivirus nécessitent une première interaction avec des facteurs d'attachement : les norovirus humains se lient dans un premier temps aux antigènes tissulaires de groupe sanguins pour pouvoir ensuite infecter la cellule (Ettayebi et al. 2016). Le virus de la maladie hémorragique du lapin et le virus Tulane ont également démontré leur interaction avec ces molécules lors des premières étapes du cycle viral (Zhang et al. 2014; Ruvoën-Clouet et al. 2000). Les deux mécanismes sont déjà décrits au sein d'autres familles virales utilisant des glycanes pour entrer dans les cellules : les reovirus favorisent leurs liaisons au récepteur protéique viral JAM-A (jouant un rôle dans la formation des jonctions serrées des cellules épithéliales) *via* des interactions avec des acides sialiques liés en alpha (Koehler et al., 2019). Au contraire, les particules virales du virus de la grippe se lient directement aux glycanes sialylés terminaux pour pénétrer dans les cellules, avec des affinités différentes selon les souches (acides sialiques liés en alpha-2,3 pour les souches aviaires, liés en alpha-2,6 pour les souches humaines) (de Graaf and Fouchier, 2014). D'autres récepteurs ont été décrits : de type glycoprotéique comme CD300lf pour le norovirus murin ou encore JAM-A pour le FCV (Graziano et al., 2020; Pesavento et al., 2011).

La capsid est internalisée après son interaction avec le (ou les) récepteurs d'entrée, puis elle est dégradée et le génome viral est libéré dans le cytoplasme (**Figure 7**). La traduction virale peut avoir lieu directement car le génome est de polarité positive. Dans le cas du FCV, du norovirus murin ou du sapovirus porcin, la traduction est initiée grâce à l'interaction de la protéine VPg liée au génome viral avec des facteurs cellulaires d'initiation de la traduction : eIF4E, eIF4G, la cap-binding protein ou eIF3 qui entraînent à son tour le recrutement de la sous-unité 40S ribosomale qui va identifier le codon d'initiation présent sur le génome et débiter la traduction (Chung et al., 2014; Goodfellow et al., 2005; Gutiérrez-Escolano, 2014; Hosmillo et al., 2014). La polyprotéine codée par l'ORF1 est alors traduite et clivée en protéines virales fonctionnelles par la protéase virale, mais également parfois avec l'aide de protéases cellulaires comme les caspases (Sosnovtsev et al., 2006).

Certaines de ces protéines virales, que nous avons détaillé précédemment, peuvent alors impacter négativement la synthèse protéique de la cellule hôte afin de favoriser la traduction des génomes viraux comme NS3 ou le facteur de virulence du norovirus murin (Fritzlar et al., 2019; Royall et al., 2015). De nombreux facteurs de la cellule hôte sont également recrutés (nucléoline, Poly(rC) binding protein, polypyrimidine tract binding protein ...) mais leur rôle n'est pas toujours identifié clairement, ou alors uniquement pour un seul genre viral au sein des *Calicivirus* (Bailey et al., 2010b; Hernández et al., 2016).

Des complexes de réplication sont générés à l'aide d'interactions entre les protéines virales non-structurales, qui conduisent au recrutement de membranes cellulaires dans la région périnucléaire. Cela engendre la formation de brins d'ARN double-brin, intermédiaire répliatif, grâce à l'action de l'ARN polymérase ARN dépendante (Green et al., 2002; Gutiérrez-Escolano, 2014; Smertina et al., 2021). Ces brins seront alors utilisés comme matrice pour la synthèse des ARN génomiques et sous-génomiques, de polarité positive. Les ARN sous-génomiques permettent la synthèse des protéines de capsid VP1 et VP2 grâce à leur traduction. Les mécanismes d'encapsidation et de libération des virions néoformés ne sont pas bien connus, bien que les protéines VP2 pourraient favoriser l'encapsidation du génome viral (Vongpunsawad et al., 2013). Certains mécanismes d'apoptose semble favoriser la libération des virions du FCV en favorisant la translocation de facteurs pro-apoptotiques (Bax, cytochrome C, ...) de la mitochondrie vers le cytoplasme, en activant des caspases ou en inhibant l'expression de certains facteurs cellulaires comme la survivine (Barrera-Vázquez et al., 2019). Les mécanismes précis ne sont pas encore connus pour chacun des calicivirus, et nous ne pouvons que transposer les connaissances disponibles grâce aux virus capables de répliquer sur les modèles cellulaires disponibles.



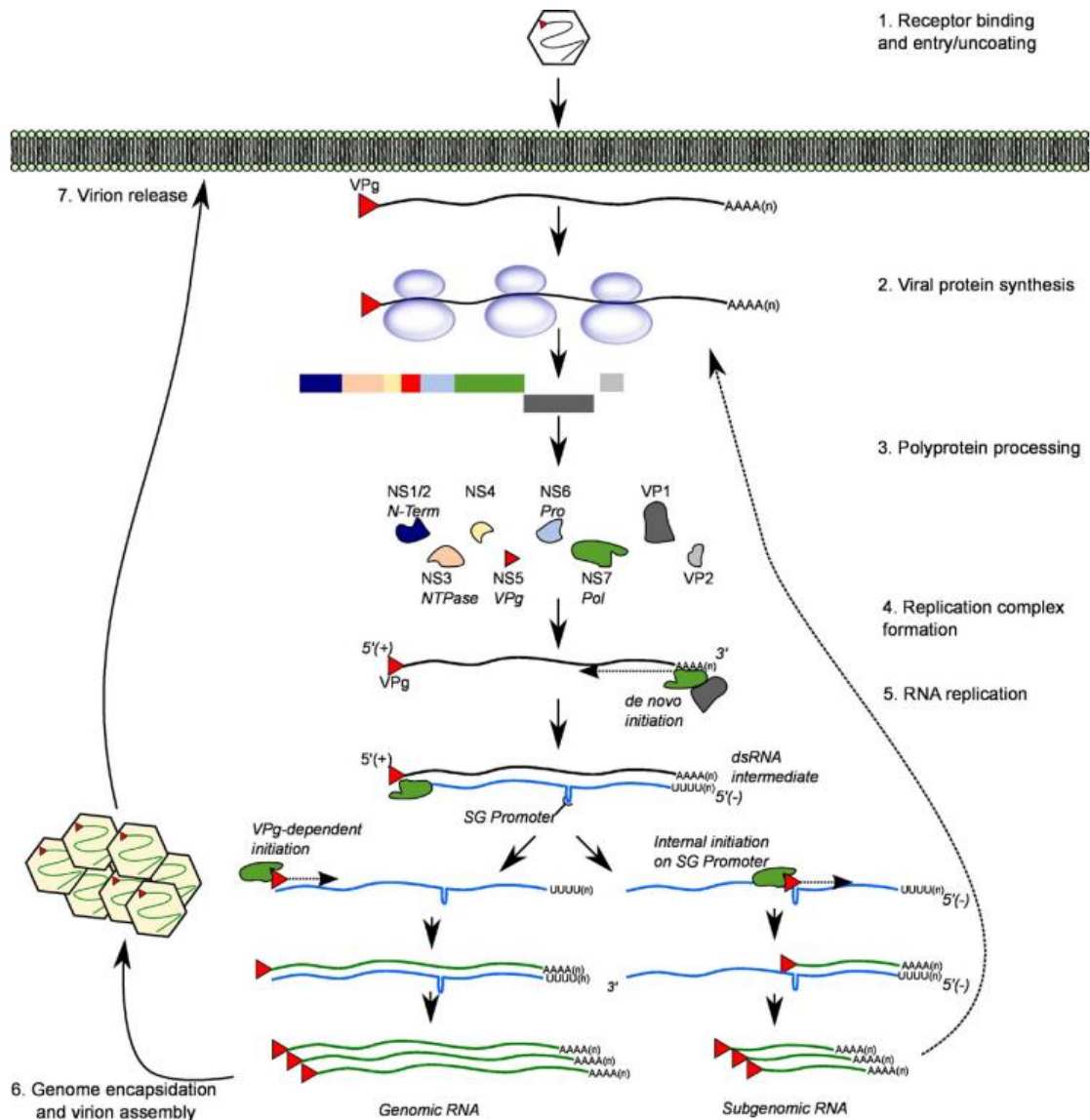


Figure 7 : Schéma résumant les étapes principales du cycle viral des Calicivirus dans les cellules infectées. Sept étapes principales sont représentées : 1) Liaison au récepteur et entrée virale 2) Traduction et synthèse de la polyprotéine virale 3) Clivage de la polyprotéine par la protéase virale 4) Formation des complexes de réplication 5) Réplication du génome viral avec synthèse d'ARN génomique et sous-génomique selon le site d'initiation 6) Encapsidation du génome viral dans des capsides néo-formées et 7) Relargage extracellulaire des nouvelles particules virales. Goodfellow and Taube, 2016.

## I.2. Le genre *Norovirus*

### I.2.A. Généralités

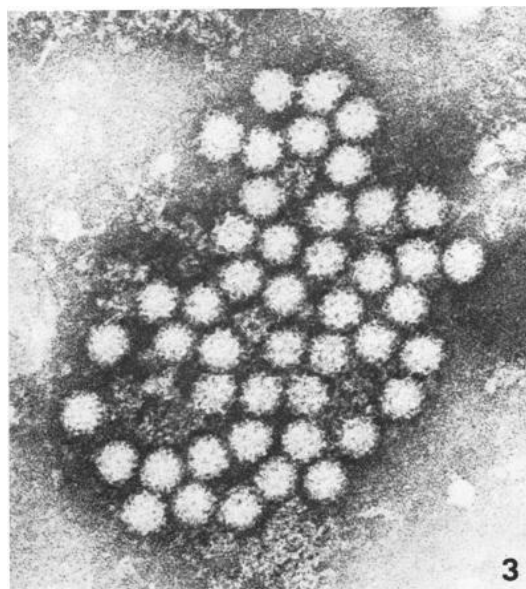
#### I.2.A.a. Historique

La pathologie induite par l'infection aux norovirus a été décrite en 1929 sous le terme de "Winter vomiting disease", le terme traduisant déjà la saisonnalité caractéristique de ces virus ainsi que l'un des symptômes majoritaires retrouvés chez les patients (Zahorsky J., 1929).

Historiquement, l'épidémie qui a donné lieu à l'identification du virus responsable se déroula dans l'Ohio aux Etats-Unis d'Amérique, dans la ville de Norwalk. Au cours de l'année 1968, une école primaire fut le siège d'une épidémie affectant environ 50% de ses élèves avec des symptômes typiques d'une gastro-entérite aiguë (Adler and Zickl, 1969).

Aucun pathogène ne fut identifié dans les échantillons récupérés avec les méthodes de l'époque, mais des expérimentations sur des prisonniers du Maryland menées en leur administrant des solutions filtrées contenant l'agent infectieux issu de patients de Norwalk permirent de reproduire des symptômes similaires chez ceux-ci (Dolin et al., 1971).

Il fallut attendre 1972 pour identifier la nature de cet agent infectieux, grâce à des techniques de visualisation en microscopie électronique des échantillons de selles fournis par les détenus infectés (Kapikian et al., 1972). Des particules virales non-enveloppées d'un diamètre d'environ 27 nm furent observées, et le virus responsable de cette pathologie nommé "virus de Norwalk" puis norovirus (**Figure 8**).



*Figure 8 : Visualisation par microscopie électronique des particules virales de norovirus formant un agrégat, provenant d'un filtrat de selles de patient infecté volontairement par ingestion d'un autre filtrat de selles issu de l'épidémie de 1972 à Norwalk. La préparation observée a été incubée préalablement avec du sérum de volontaire sain pendant 1 heure (dilution 1:5). Grossissement X231 500. Kapikian et al. 1972.*

### **I.2.A.b. Symptômes**

Les symptômes associés à l'infection par les norovirus sont, du plus au moins fréquent : diarrhée, vomissements, douleurs abdominales, fièvre peu importante et céphalées (Robilotti et al., 2015). Le délai d'incubation est compris entre 24 et 48 heures, et la résolution des symptômes est assez rapide chez les sujets en bonne santé : 12 heures à 3 jours après leur apparition initiale (Atmar et al., 2008). Jusqu'à 30% des personnes infectées ne vont pas présenter de symptômes d'après certaines analyses rétrospectives, mais ces valeurs peuvent varier en fonction de l'immunité préexistante de la population ainsi que de la souche en cause (Miura et al., 2018). Les personnes immunodéprimées, suite à un traitement médicamenteux consécutif à une greffe ou un cancer par exemple, ou souffrant d'immunodéficience génétique, peuvent présenter des formes d'infection chroniques pouvant durer des semaines, des mois voire plus d'un an (Brown et al., 2017; Saif et al., 2011). Ces infections ne sont toutefois pas nécessairement symptomatiques.

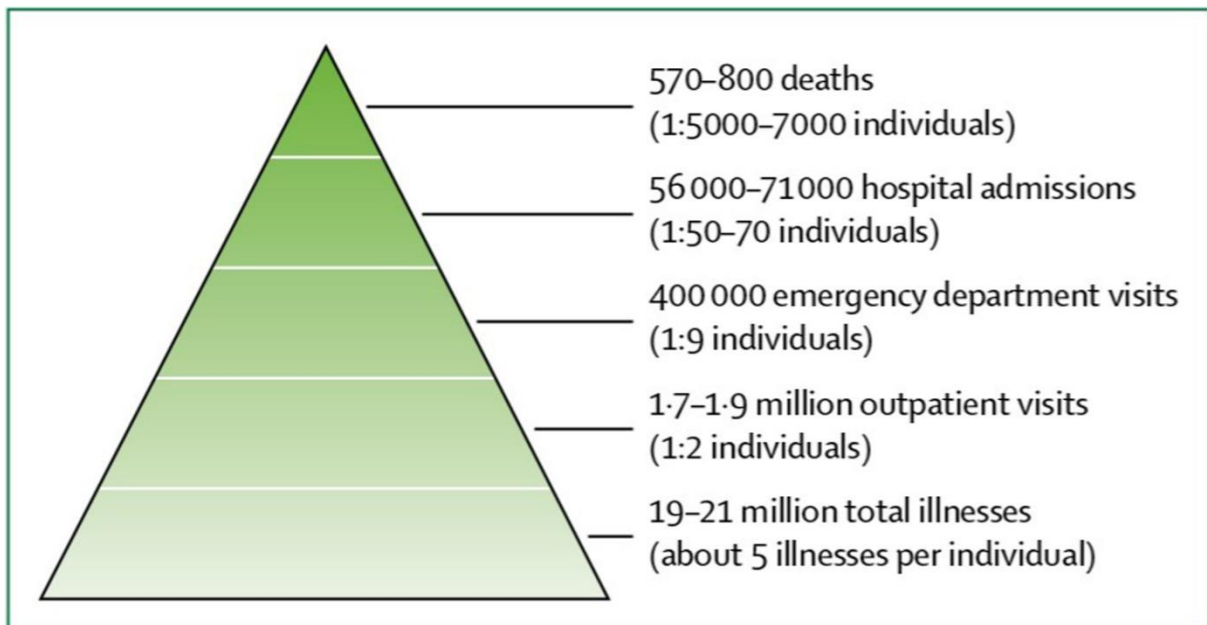
Des présentations plus sévères peuvent apparaître, en particulier chez les enfants en bas-âge. Il est ainsi possible d'observer des cas d'entérocolite nécrosante des intestins chez les prématurés, ou encore des diarrhées sanglantes chez les patients souffrants de maladies inflammatoires chroniques intestinales (Cheng et al., 2020; Khan et al., 2009). Des manifestations neurologiques ont également été décrites dans de rares cas, comme des crises de convulsions touchant les jeunes enfants, des encéphalopathies voire une possible implication dans le développement de pathologie neuro-dégénérative (Ito et al., 2006; Kawano et al., 2007; Moreno-Valladares et al., 2022). Ces associations doivent encore être investiguées pour identifier le rôle précis de l'infection à norovirus.

### **I.2.A.c. Infections et impact**

Les norovirus humains sont globalement responsables d'environ 685 millions de cas de gastroentérites chaque année, soit jusqu'à 20% des cas de gastro-entérites toutes causes infectieuses confondues (Hall et al., 2016). Dans les pays où la vaccination contre le rotavirus a été implémentée

depuis quelques années comme aux Etats-Unis d'Amérique ou en Finlande, les norovirus sont depuis devenus la première cause virale de gastroentérites en raison de la diminution de l'incidence des infections à rotavirus (Hemming et al., 2013; Payne et al., 2013).

Le suivi de cohortes de nouveau-nés a également permis d'identifier des nourrissons réinfectés à de multiples reprises (entre 2 et 17 fois) au cours de leurs deux premières années (Chhabra et al., 2020; Nelson et al., 2018; Saito et al., 2014). Ce phénomène de réinfection n'est donc pas rare et concerne également la population adulte, même si ces données sont plus rares. Une personne vivant aux Etats-Unis sera infectée à environ 5 reprises au cours de sa vie comme indiqué sur la **figure 9** ce qui entraîne de multiples conséquences : coûts économiques pour les entreprises, le système de santé, mais également des cas sévères pouvant conduire au décès.



*Figure 9 : Estimation des impacts qu'ont les infections à norovirus sur la population des Etats-Unis au cours d'une année, et au cours de la vie d'un individu ou à une échelle plus large (entre parenthèses). Estimations calculées à partir des données de 7 études différentes conduites aux Etats-Unis entre 1996 et 2011. Bányai et al. 2018*

La déshydratation causée par les épisodes de diarrhées et de vomissements suite à l'infection est responsable de la majorité des décès, notamment chez les jeunes enfants dans les pays ayant des difficultés d'accès à l'eau potable. Jusqu'à 200 000 décès annuels sont alors imputables aux norovirus, les pays les plus touchés étant le Nigeria, le Pakistan, le Niger ou encore l'Indonésie (GBD Diarrhoeal Diseases Collaborators, 2017; Patel et al., 2008).

Les personnes âgées forment également une population à risque dans les pays fortement industrialisés, car les épidémies de norovirus au sein d'établissements de type maison de retraite sont associées à une hausse de la mortalité observée (Greig and Lee, 2009; Lindsay et al., 2015). Une étude estime alors que les norovirus causent entre 2000 et 13 000 décès annuels au sein d'une population d'environ 400 millions de personnes de plus de 65 ans vivants dans des pays à moyens et hauts revenus (Lindsay et al., 2015). De plus, la durée des symptômes et donc le coût des hospitalisations augmentent pour les patients de cette tranche d'âge, et le vieillissement de la population va accentuer ces phénomènes : il est estimé que la proportion de personnes de plus de 60 ans va doubler entre 2010 et 2050 (Sander et al., 2015).

### **I.2.B. Classification**

La nécessité de classer les norovirus dans différents groupes génétiques est apparue nécessaire dès l'obtention des premières données de séquences partielles de l'ARN polymérase ARN dépendante (RdRp), pour les classer en génogroupes et génotypes (Ando et al., 1995). La séquence complète de la protéine de capsid VP1 fut ensuite utilisée pour discriminer les différentes souches. Un génogroupe (G) donné incluait des souches partageant au moins 60% des acides aminés pour VP1. Deux souches de même génotype partageaient au moins 80% de leurs acides aminés avec la souche de référence définie pour ce génotype, mais l'absence d'un système international entraîna des difficultés dans la classification de certaines souches de norovirus ainsi que l'impossibilité d'en classer certaines, la méthodologie différant entre certaines équipes (Kroneman et al., 2013; Zheng et al., 2006).

La nouvelle nomenclature, publiée en 2019, dénombre 10 génogroupes différents grâce aux données de séquençage de la région VP1, de GI à GX, qui eux-mêmes comprennent un total de 49 génotypes dont 9 pour GI, 27 pour GII et 13 répartis entre les autres génogroupes. Cependant cette classification n'était pas suffisante pour caractériser les souches en raison de nombreux recombinants. En se basant sur une partie de la séquence de la région codante pour la RdRp d'environ 750 nucléotides, les norovirus peuvent également être assignés dans 60 différents P-groupes et P-types, indépendant de leurs génogroupes et génotypes (**Figure 10**). Les variants intra-génotypes différenciés après séquençage sont nommés en fonction de la localisation et de l'année où ils ont été prélevés, et associé avec le type de polymérase qu'ils présentent comme par exemple : GII.4 Sydney[P16] (Chhabra et al., 2019).

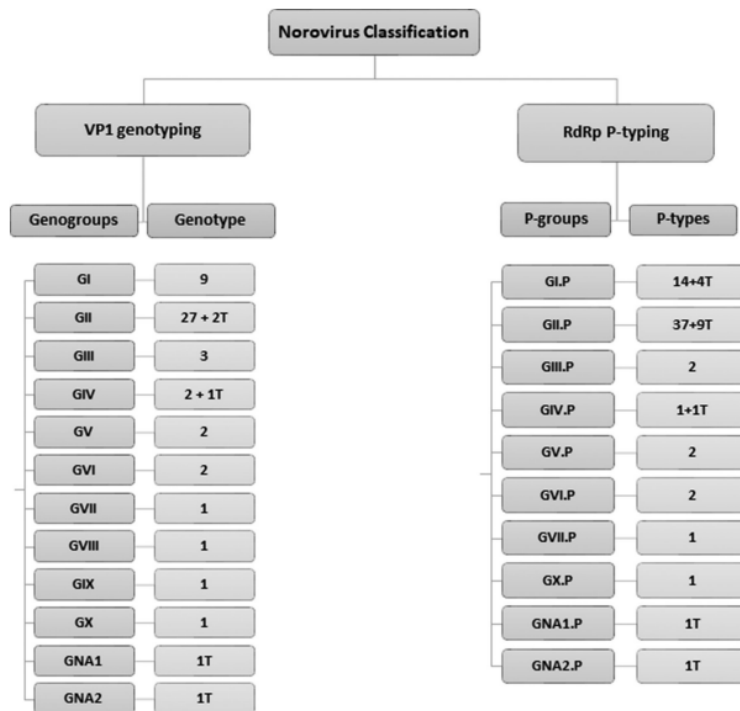


Figure 10 : Schéma de la nouvelle classification des norovirus selon le séquençage complet de la protéine de capside VP1 (VP1 genotyping) et d'une région partielle (762 nucléotides) de la polymérase virale codée par le gène NS7 (RdRp P-typing). T indique les tentatives de génotypes ou P-types. Chhabra et al. 2019.

Les virus infectant les humains appartiennent aux GI, GII, GVIII, GIX ainsi que GIV de manière plus sporadique, les virus classés dans ce dernier génogroupe infectant également des lions et des chiens (Martella et al., 2008). Les virus du GIII infectent les bovins, GV regroupe les norovirus murins, GVI et GVII les norovirus canins et GX les norovirus infectants les chauves-souris. Deux génogroupes non assignés ont également été proposé pour les souches pour lesquelles les séquences ne proviennent que d'une seule région géographique, ou pour lesquelles on ne dispose que d'une unique séquence complète de VP1. Ces génogroupes sont appelés GNA1 (not yet assigned new genogroup) et GNA2. GNA1 comporte des séquences de souches infectants les marsouins communs, et GNA2 des norovirus retrouvés chez le lion de mer (Chhabra et al., 2019).

## **I.2.C. Caractéristiques moléculaires**

### **I.2.C.a. Génome, protéines et particule virale**

Comme présenté en amont, les norovirus présentent un ARN monocaténaire de polarité positive, long de 7,4kb à 7,7kb, et présentent 3 cadres de lectures ouverts (Karst et al., 2014). Les norovirus murins présentent une 4ème ORF, superposée avec l'ORF 2, et la traduction de ce cadre de lecture alternatif permet la production d'une protéine appelée Virulence Factor 1 (VF1), non-essentielle à la réplication en culture cellulaire, qui permettrait au virus d'infecter plus efficacement ses hôtes en retardant la réponse immunitaire innée et l'apoptose des cellules infectées en interagissant avec les mitochondries (McFadden et al., 2011).

La protéine NS1/NS2 (p48) a un poids moléculaire compris entre 37 et 48kDa selon le génogroupe (Campillay-Véliz et al., 2020). Elle pourrait jouer un rôle dans la formation des complexes de réplication viraux en interagissant avec des protéines (VAP-A) associées aux membranes du réticulum endoplasmique, en sachant que la protéine non-structurale NS5A du virus de l'hépatite C (Flaviridae) interagit également avec VAP-A et a été associée à une fonction similaire (Tu et al., 1999).

La protéine NS3 (p41) a un poids moléculaire de 40 kDa et est une NTPase qui présente 3 motifs typiques associés à une hélicase à ARN, bien que son activité hélicase n'a pas été démontré en présence d'un hétéroduplex ARN-ADN synthétique (Pfister and Wimmer, 2001). Elle participerait à la réplication des génomes viraux avec la polymérase virale NS7 (Li et al., 2018).

La protéine NS4 (p22) de 20 à 22kDa partage un nombre limité de motifs protéiques avec les protéines virales 3A des picornavirus, et présente une région hydrophobe pouvant être associée à l'insertion membranaire de celle-ci. Elle jouerait donc peut-être un rôle d'antagoniste à la réponse immunitaire de la cellule ainsi qu'un perturbateur de sa synthèse protéique (Sharp et al., 2010).

NS5 (Vpg) est une protéine de 15,8 kDa qui se lie de façon covalente aux ARN génomiques et sous-génomiques produits lors de la réplication du norovirus, et favorise leur traduction par recrutement des ribosomes (Daughenbaugh et al., 2003; Hosmillo et al., 2019).

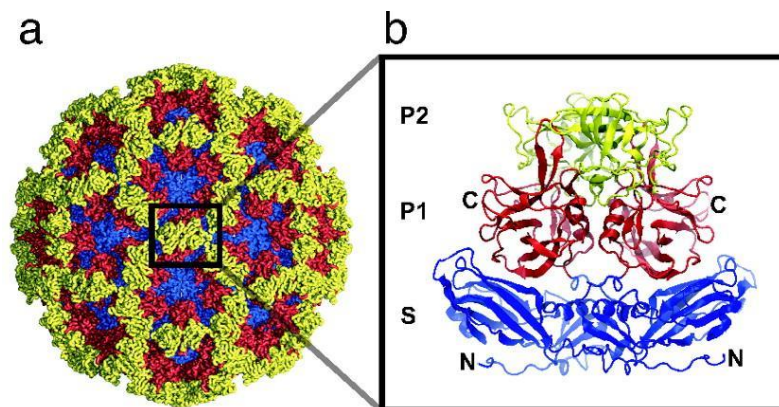
NS6 (3CL pro, pour 3C-like protease), protéine de 19,4 kDa, semble présenter au moins deux sites catalytiques, du moins pour les norovirus GI (Someya et al., 2002). Elle permet de cliver la polyprotéine et présente des capacités protéolytiques maximales à un pH de 8,6 et une température de 37°C (Someya et al., 2005).

NS7 (RdRp) est l'ARN polymérase ARN-dépendante du norovirus et présente un poids moléculaire de 56,8 kDa. Elle peut être exprimée sous la forme d'un précurseur intracellulaire en

association avec la protéase virale. Cette association protéique s'accumule dans les cellules infectées et possède des activités polymérase et protéase fonctionnelles (Campillay-Véliz et al., 2020).

Concernant les protéines structurales, VP1 est formée par environ 530 à 555 acides aminés, et est traduite en une protéine de 58 à 60 kDa. 180 copies de cette protéine s'associent pour former 90 dimères, et former la capsid virale présentant une symétrie T=3 (Jiang et al., 1992; Prasad et al., 1999). L'organisation classique des calicivirus y est retrouvée, avec les domaines S et P (divisé en sous-domaines P1 et P2) visibles sur la **figure 11**.

La région codante pour VP2 fait 208 à 268 acides aminés, formant une protéine de 22 à 29 kDa une fois traduite. Elle semble être présente en très faible quantité dans les virions, dans la face interne de la capsid, et y jouerait un rôle dans le maintien de la stabilité de la capsid et l'empaquetage du génome, bien qu'aucune activité de liaison à l'ARN n'a été démontrée pour cette protéine (Vongpunsawad et al., 2013). VP1 présente un domaine d'interaction avec VP2 et cette dernière pourrait jouer un rôle dans le transport de VP1 vers le noyau cellulaire, ce qui pourrait impacter les voies de signalisation, la transcription ou encore la chromatine (Liu et al., 2019).



*Figure 11 : a) Structure de la capsid virale du norovirus, déterminée à une résolution de 3,4 Å. Les domaines S (acides aminés 1-225), et les sous-domaines P1 (acides aminés 225-278, et 406-519) et P2 (acides aminés 279-405) sont respectivement colorés en bleu, rouge et jaune. b) Représentation tridimensionnelle d'un dimère de la protéine virale VP1. B. V. Venkataram Prasad et al. 2008.*



### I.2.C.b. Différences structurales entre les génotypes

Bien que des caractéristiques communes émergent aisément au sein du genre *Norovirus*, un certain polymorphisme structural peut malgré tout être identifiées entre les particules virales de différentes souches appartenant à des génotypes différents.

Les VLPs obtenues par assemblage spontané de protéines structurales VP1 ont permis de démontrer que la symétrie (T=1, T=3 ou T=4) et le nombre de dimères de VP1 (de 30 à 120) nécessaires pour former une capsid virale était variable selon les souches considérées, même si ces données doivent encore être validées par des observations de virions infectieux de différentes souches appartenant à des génotypes et génogroupes divers (Jung et al., 2019). La **figure 12** résume les différentes structures de VP1 selon les génotypes considérés, avec des différences importantes au niveau de certaines structures, notamment la zone T (« stalk ») assurant la liaison entre le domaine S et P1 pour les VLP de GII.4 par rapport aux autres, permettant une certaine flexibilité et de projeter les domaines P plus loin de la capsid. Cette flexibilité pourrait avoir un impact sur la capacité des capsides à interagir avec leurs ligands, ainsi que dans l'échappement à la réponse immunitaire (Smith and Smith, 2019). Le rôle d'ions métalliques de type  $Zn^{2+}$  dans le maintien de la stabilité du domaine d'interaction de certaines souches avec les facteurs d'attachement a également été suggéré.

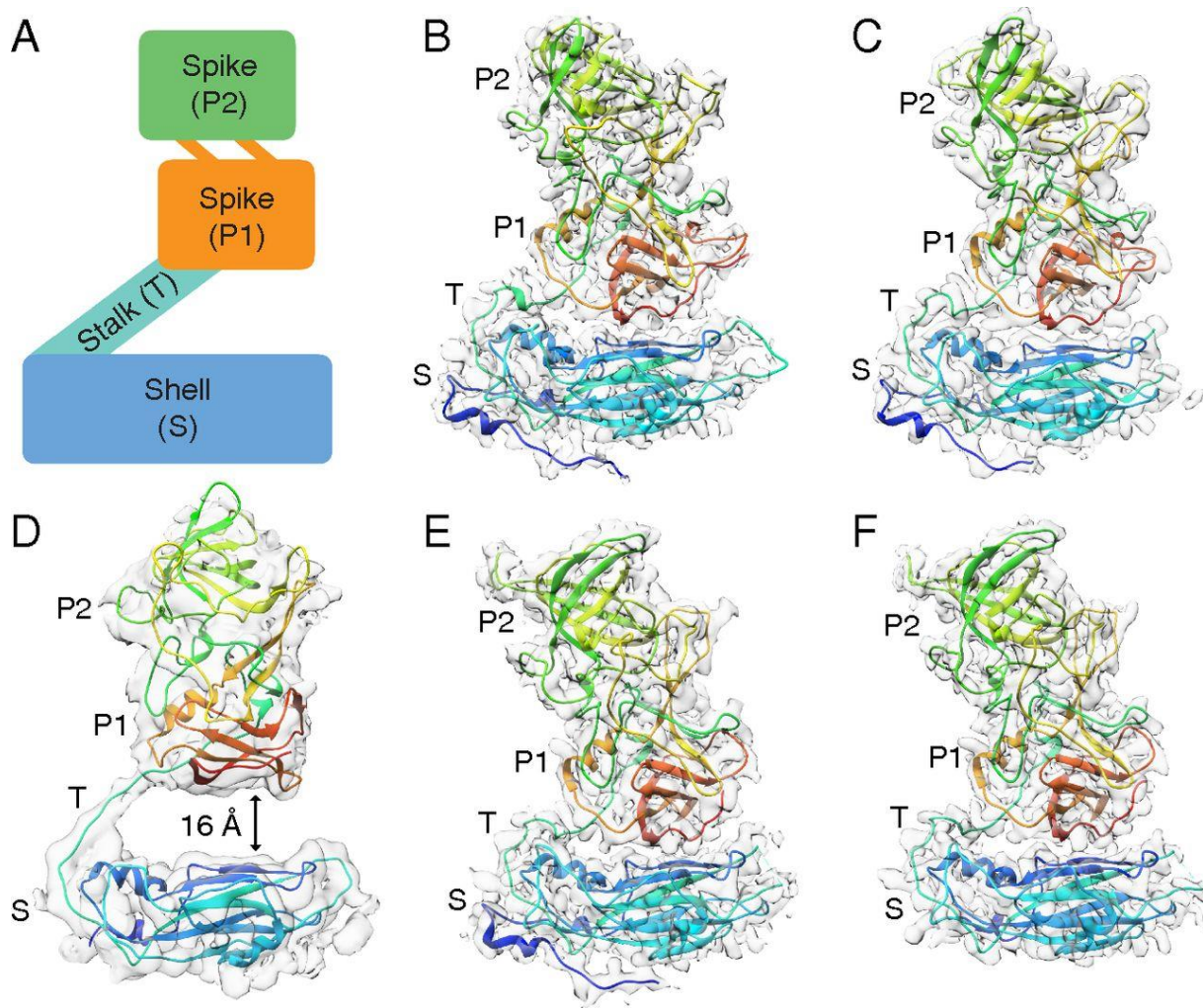
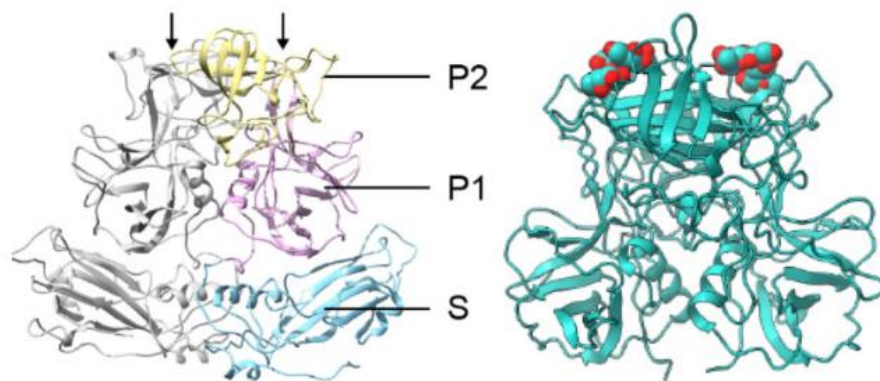


Figure 12 : Vues latérales des sous-unités de la protéine majeure de capsid VP1 pour différentes souches de norovirus. (A) résumé sous forme de schéma l'organisation des sous-unités et de ses différentes parties : domaine Shell, proche du cœur de la capsid, Stalk, et les deux sous-unités P1 et P2 exposées à la surface des capsides. Les différentes souches étudiées sont : (B) GI.1 (C) GI.7 (D) GII.4 (E) GII.2 avec une symétrie  $T=3$  (F) GII.2 avec une symétrie  $T=1$ . Jung et al. 2019

### I.2.C.c. Domaine d'interaction avec les HBGA

Comme évoqué précédemment, l'entrée virale des norovirus dans les cellules a lieu grâce à des interactions avec des structures glycaniques de type antigène tissulaire de groupes sanguins (Histo-Blood Group Antigen, HBGA), la région P2 de la protéine de capsid VP1 interagissant avec ces molécules (**Figure 13**), et potentiellement avec des gangliosides (Han et al., 2014; Marionneau et al., 2002).

Il est suspecté que ces glycanes doivent absolument être fucosylés pour servir de récepteurs d'attachement aux norovirus, cependant il est possible qu'ils agissent en tant que récepteurs d'attachement facilitant l'interaction avec un second co-récepteur (Haga et al., 2020). Cette spécificité d'interaction se retrouve au niveau de la capside virale avec la présence d'un domaine d'interaction aux HBGA dans la région hypervariable P2 de la protéine VP1 (Tan et al., 2003). La co-cristallisation de VLP de norovirus avec différents glycanes permet d'explorer les interactions qui existent entre les différentes souches et ces molécules. De grandes variabilités au niveau de ces domaines d'interaction existent en fonction des souches, ce qui impacte le nombre de motifs reconnus par chacune d'entre elles, ainsi que l'affinité qu'elles présentent pour ces glycanes (Tenge et al., 2021).



*Figure 13 : Représentation d'un dimère de VP1 avec les flèches indiquant les poches d'interactions présentes au niveau des sous-unités P2 avec les HBGA (facteurs d'attachement) à gauche, et à droite la modélisation d'un dimère de VP1 provenant d'une souche de norovirus humain GII.4 en interaction avec 2 molécules d'HBGA de type A. Tenge et al. 2021.*

## **I.2.D. Réplication virale**

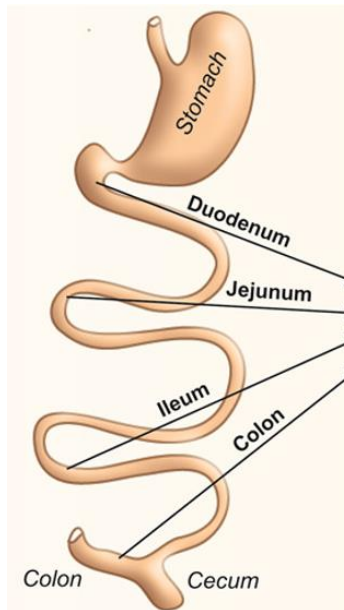
### **I.2.D.a. Tropisme des norovirus**

De par leur symptomatologie, le tropisme intestinal des norovirus humains a été depuis longtemps suspecté, mais l'absence de répliation sur les différentes lignées cellulaires d'origine intestinale (et extra-intestinale) a longtemps freiné la recherche sur ce sujet (Duizer et al., 2004).

Des observations sur des coupes histologiques d'intestins de personnes infectées ont permis d'identifier la protéine de capsid VP1 dans les entérocytes, qui semblent être les cellules majoritairement infectées chez l'Homme (Karandikar et al., 2016). De plus, la présence d'ARN viral de polarité négative (marqueur de répliation virale active dans les cellules) a été observé dans des

cellules exprimant la chromogranine A, marqueur des cellules entéro-endocrines (Green et al., 2020). Ces cellules représentent moins de 1% des cellules épithéliales totales de la muqueuse intestinale, et relarguent des peptides et des hormones par exocytose vers la membrane basolatérale lors de stimulations diverses. Il existe environ 6 sous-types de ces cellules, définis par l'hormone sécrétée majoritairement et leur localisation. Ces hormones sont par exemple la gastrine ou la somatostatine, qui favorisent ou inhibent la sécrétion d'acide gastrique, mais d'autres substances jouant également un rôle dans la motilité intestinale ou encore la régulation de la glycémie (Latorre et al., 2016). Il faut noter que ces deux séries d'observations histologiques ont été conduites grâce à des tissus provenant de patients immunodéficients.

L'utilisation du modèle entéroïde a permis de renforcer l'idée que les entérocytes étaient le siège de la réplication virale du norovirus humain. Ce modèle cellulaire est obtenu en prélevant des cellules souches à la base des cryptes intestinales et en les cultivant en 3 dimensions. Ces cellules peuvent être différenciées et cultivées sous la forme de monocouche cellulaire, permettant d'obtenir les différents types cellulaires exprimés au sein du tractus intestinal (Foulke-Abel et al., 2014). Des expériences de co-marquages entre les protéines de capsid VP1 et les marqueurs spécifiques à chaque sous-type cellulaire présents suite à la différenciation des cellules ont été menées : seules les entérocytes, positifs au marquage de la villine, sont également positives au marquage VP1 (Ettayebi et al., 2016). Les entérocytes provenant des 3 segments du petit intestin : jéjunum, duodénum et iléum (**Figure 14**) sont sensibles à l'infection par certaines souches de norovirus humain sous la forme d'entéroïdes. En revanche, les organoïdes formés avec des cellules du colon ne supportent pas la réplication des souches testées (GII.3 et GII.4), ce que les données histologiques suggéraient (Ettayebi et al., 2021; Karandikar et al., 2016).



*Figure 14 : Représentation schématique des différentes sections du tractus digestif humain, avec les différents segments de l'intestin (duodénum, jéjunum, iléum puis colon). Mahé et al. 2015*

Le norovirus murin a été également étudié pour tenter d'obtenir des réponses sur le tropisme des virus humains, cependant celui-ci utilise la protéine CMRF35-like molecule 1 (ou communément appelée CD300lf) en tant que récepteur viral. Cette molécule est principalement exprimée par les cellules lymphoïdes, macrophages, cellules dendritiques, ainsi que les cellules intestinales « Tuft », qui jouent un rôle majeur dans l'immunité antiparasitaire, la sécrétion d'interleukine 25, et plus largement la réponse immunitaire humorale Th2 (Hendel et al., 2022). Certaines souches de norovirus murins peuvent ainsi établir des infections persistantes en établissant un réservoir viral dans ces cellules Tuft (Lee et al., 2017). La molécule CD300lf humaine n'a aucune action compétitrice contre les VLP ou les virions infectieux de GII.4, et n'inhibe pas l'infection de cellules dérivées d'entéroïdes (Graziano et al., 2020). Cette molécule n'est donc pas un récepteur ou co-récepteur du norovirus chez l'Homme. Certains gangliosides portés par des macrophages comme GD1a semblent également capables de lier les norovirus murins (Taube et al., 2009).

Ces données sur le MNV sont donc difficilement transposables aux norovirus humains, car ce dernier ne se réplique pas de façon productive dans les macrophages et les cellules dendritiques collectées à partir de sang périphérique (Lay et al., 2010). L'observation histologique d'antigènes viraux dans des macrophages humains, et des cellules myéloïdes plus largement, pourrait être due à la phagocytose de cellules infectées, ou à l'internalisation d'endosomes empaquetant des virions (Green et al., 2020).

Un possible tropisme des norovirus humains pour les lymphocytes B a été suggéré. La lignée immortalisée BJAB a pu être infectée à l'aide d'un protocole particulier, nécessitant une coculture avec une lignée épithéliale (HT-29 : issue d'un adénocarcinome colorectal) et la pré-incubation de la souche GII.4 Sydney avec des cultures de la bactérie *Enterobacter cloacae* (Jones et al., 2015). Cette méthode est complexe à mettre en place et n'a pas été employée dans d'autres publications depuis. De plus, les faibles valeurs de facteurs d'amplification du génome viral par rapport au modèle entéroïde intestinaux limitent potentiellement la réplication de certaines souches et donc l'étude de celles-ci. Les individus atteints de déficiences génétiques impactant le développement des lymphocytes B ne présentent aucune résistance particulière à l'infection par norovirus (Brown et al., 2016). Des lymphocytes B isolés à partir de sang, de rate ou de ganglions ont également démontré une faible réplication, probablement abortive, qui n'a toujours pas été vérifiée *in vivo* (Mirabelli et al., 2022a).

Enfin, il a été démontré récemment que le norovirus murin ainsi que deux autres virus entériques murins (astrovirus et rotavirus) étaient capables de répliquer dans les glandes salivaires de la souris. Ainsi, certaines cellules épithéliales de la glande submandibulaire des souris étaient permissives à la réplication de souches murines de ces trois virus. Des organoïdes salivaires murins ont également permis la réplication de ces 2 souches virales, et des lignées cellulaires humaines transformées issues de glande salivaires poussant en monocouches ont démontré la réplication de norovirus humain GII.4, lors de 4 passages successifs (Ghosh et al., 2022).

Les norovirus présentent donc des tropismes différents selon l'hôte, les souches murines étant capables d'infecter les cellules intestinales Tuft ainsi que certaines cellules immunitaires, tandis que les souches humaines semblent infecter en immense majorité les entérocytes du petit intestin. Un tropisme pour la glande salivaire est également à explorer pour les différentes souches de norovirus, et le tropisme des autres souches animales reste encore peu connu, bien que des lésions histologiques au niveau du petit intestin aient été observées après l'infection (Otto et al., 2011; Shen et al., 2012).

### **I.2.D.b. Excrétion virale**

Les norovirus sont excrétés de façon importante dans les selles des personnes infectées, ce qui contribue à la transmission virale, notamment via les réseaux d'eaux usées ou les conditions d'hygiène ne sont pas suffisantes (Mavrouli et al., 2022). De plus, les personnes asymptomatiques peuvent excréter autant de virus que les personnes symptomatiques, avec jusqu'à  $10^9$  copies de génomes par gramme de fèces (Teunis et al., 2015). Il semble également que les virus excrétés soient empaquetés

dans des exosomes dérivés de la fusion de corps multi-vésiculaires, contenant de 1 à 5 virions chacun, et nommés vésicules virales ou clusters viraux dérivés de vésicules (Santiana et al., 2018).

Les durées d'excrétion sont également très variables selon les individus, mais dépassent généralement la durée des symptômes : le virus est excrété entre 8 et 60 jours, voire même de nombreux mois pour les personnes immunodéprimées (Davis et al., 2020; Milbrath et al., 2013). Ces patients peuvent donc représenter des sources de contamination nosocomiales, et sont parfois à l'origine de certaines épidémies hospitalières (Sukhrie et al., 2010). Bien que la pression de sélection entraînée par un système immunitaire compétent favorise l'apparition plus rapide de nouvelles mutations, l'infection chronique et l'excrétion prolongée chez les patients immunodéprimés peut également favoriser l'apparition de nouvelles souches et doit donc être surveillée sur le long terme (Siebenga et al., 2008).

Cette excrétion peut également avoir lieu par le biais de vomissements chez les patients qui souffrent de cette manifestation clinique, la présence de virions dans les vomissements étant attestées par plusieurs études. Jusqu'à 56% des patients enrôlés dans une étude présentaient un titre viral détectable dans leurs vomissements, pouvant atteindre entre  $4.10^4$  et  $8.10^5$  copies de génomes par mL selon les souches utilisées pour contaminer les sujets (GI.1 Norwalk, GII.1 Hawaii et GII.2 Snow Mountain) (Atmar et al., 2014; Kirby et al., 2016). Le caractère infectieux de ces virus excrétés par la voie digestive haute lors d'épisodes de vomissements a été démontré grâce au modèle entéroïde intestinal humain pour la souche GII.4 Sydney provenant de différents patients, preuve supplémentaire du rôle de ce symptôme commun aux gastroentérites virales dans la transmission grâce à la formation d'aérosols et au dépôt de gouttelettes contenant des particules infectieuses dans l'environnement proche (Hagbom et al., 2021; Overbey et al., 2021).

## **I.2.E. Epidémiologie**

### **I.2.E.a. Voies de transmission**

#### **- Personne à personne :**

La transmission des norovirus humains repose dans un premier temps sur l'excrétion des particules virales dans l'environnement par les fèces ou les vomissements, qui donneront ensuite lieu à des contacts sur des surfaces contaminées, notamment pour le génotype GII.4 qui est grandement majoritaire dans la plupart des épidémies humaines (de Graaf et al., 2016). Ces types de transmission (**Figure 15**) sont favorisés par les environnements où un nombre important de personnes se réunissent, comme les crèches, les hôpitaux, les maisons de retraite, les écoles, les camps militaires ou les bateaux

de croisière (Lucero et al., 2021). Les particules virales excrétées par les vomissements peuvent également rester en suspension dans l'air sous forme d'aérosols et être détectables jusqu'à 3 heures après les vomissements (Alsved et al., 2020).

Les norovirus ont également été détectés dans des échantillons de salive et de frottis buccaux obtenus auprès de personnes infectées, même asymptomatiques, et les personnes présentant du virus dans la salive présentaient également une concentration plus importante de virus excrété dans les selles. En revanche, la grande majorité des virus retrouvés dans la salive semblaient être du génogroupe GII, le GI étant beaucoup plus anecdotique (Anfruns-Estrada et al., 2020; Zhuo et al., 2018). Ces données suggèrent donc une transmission par la salive entre les individus, ce qui reste à démontrer.

#### - **Par consommation d'aliments ou d'eau**

La transmission de ces virus peut également être médiée *via* l'ingestion de nourriture ou de liquides contaminés. Les norovirus sont la première cause des infections causées par de la nourriture contaminée en Europe ou aux Etats-Unis (jusqu'à 58% des cas de causes connues) (Hall et al., 2012; Lee and Yoon, 2021). La contamination des aliments peut avoir lieu de façon directe ou indirecte : manipulation de la nourriture par une personne infectée, qui contaminera à son tour le produit potentiellement consommé par une tierce personne, ou par les eaux d'irrigation qui contiennent des rejets d'eaux non traitées déversées sur des cultures dont la production sera consommée (Hardstaff et al., 2018). Ainsi, des épidémies importantes peuvent avoir lieu lorsque de nombreux groupes de personnes consomment des repas préparés à l'avance par du personnel infecté touchant la nourriture sans porter de gants par exemple. Ces épidémies se caractérisent par des taux d'attaques très importants, pouvant atteindre plus de 40% des consommateurs, et donc un nombre de cas totaux pouvant se chiffrer par centaines (Hirakata et al., 2005; Zomer et al., 2010).

#### - **Associations entre aliments et norovirus**

Certains types d'aliments sont retrouvés de façon plus importante en association avec l'apparition d'épidémies suite à leur consommation. Les fruits rouges de type framboise ou fraise, mais également les crudités (tomates, concombre, salades) peuvent présenter des taux de détection et des concentrations virales élevées (Baert et al., 2011; De Keuckelaere et al., 2015). Les mollusques représentent une autre catégorie d'aliments contaminés de manière indirecte, en majorité les mollusques bivalves filtreurs tels que les huîtres, connues pour leur association avec les virus entériques, et plus précisément les norovirus depuis des décennies (Murphy et al., 1979). Des structures de surveillance européennes comme l'EFSA (Autorité Européenne de Sécurité des Aliments) ou nationales comme le REMI (REseau de contrôle MIcrobiologique) existent pour suivre



et identifier les zones conchylicoles contaminées, mais nous reviendrons sur les associations entre mollusques et virus entériques dans la partie II de cette thèse.

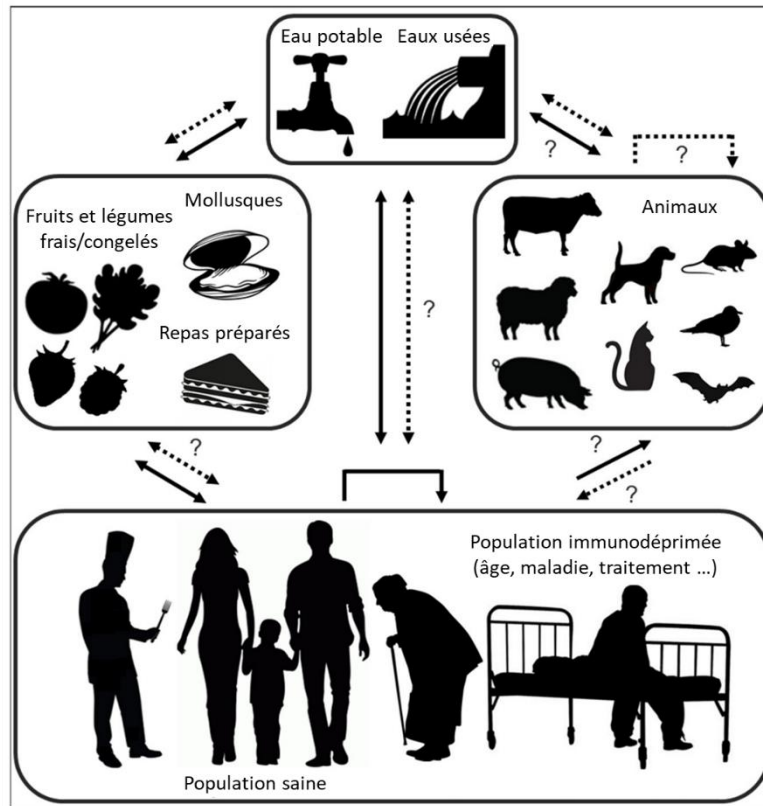


Figure 15 : Voies de transmission du norovirus avec les différentes sources de contamination possibles (alimentaire, hydriques, communautaire, voire zoonotique). Les flèches pleines indiquent les norovirus humains, les flèches hachurées les norovirus animaux. Les voies de transmission qui demeurent à confirmer sont indiquées par des points d'interrogation, comme c'est le cas pour l'hypothèse d'un échappement zoonotique des norovirus. Ludwig-Begall, Mauroy, et Thiry 2021.

### I.2.E.b. Saisonnalité

L'association entre la recrudescence des cas de norovirus et les mois les plus froids de l'année est observée depuis des décennies, d'où l'appellation classiquement utilisée pour les norovirus « winter vomiting disease » (Adler and Zickl, 1969; Zahorsky J., 1929). Cette association est solidement étayée par les observations épidémiologiques des dernières années qui démontrent clairement un pic dans l'incidence des cas lors de la période entre Décembre et Février, dans les pays de l'hémisphère Nord (**Figure 16**). En revanche, pour les pays de l'hémisphère Sud, cette corrélation est relative, possiblement en raison du manque de données robustes, ou de conditions climatiques différentes (Ahmed, Lopman, et Levy 2013). L'apparition d'épidémies semble

globalement influencée par 3 facteurs majoritaires : de faibles températures, une humidité relative et des épisodes de précipitations préalables (Shamkhali Chenar and Deng, 2017).

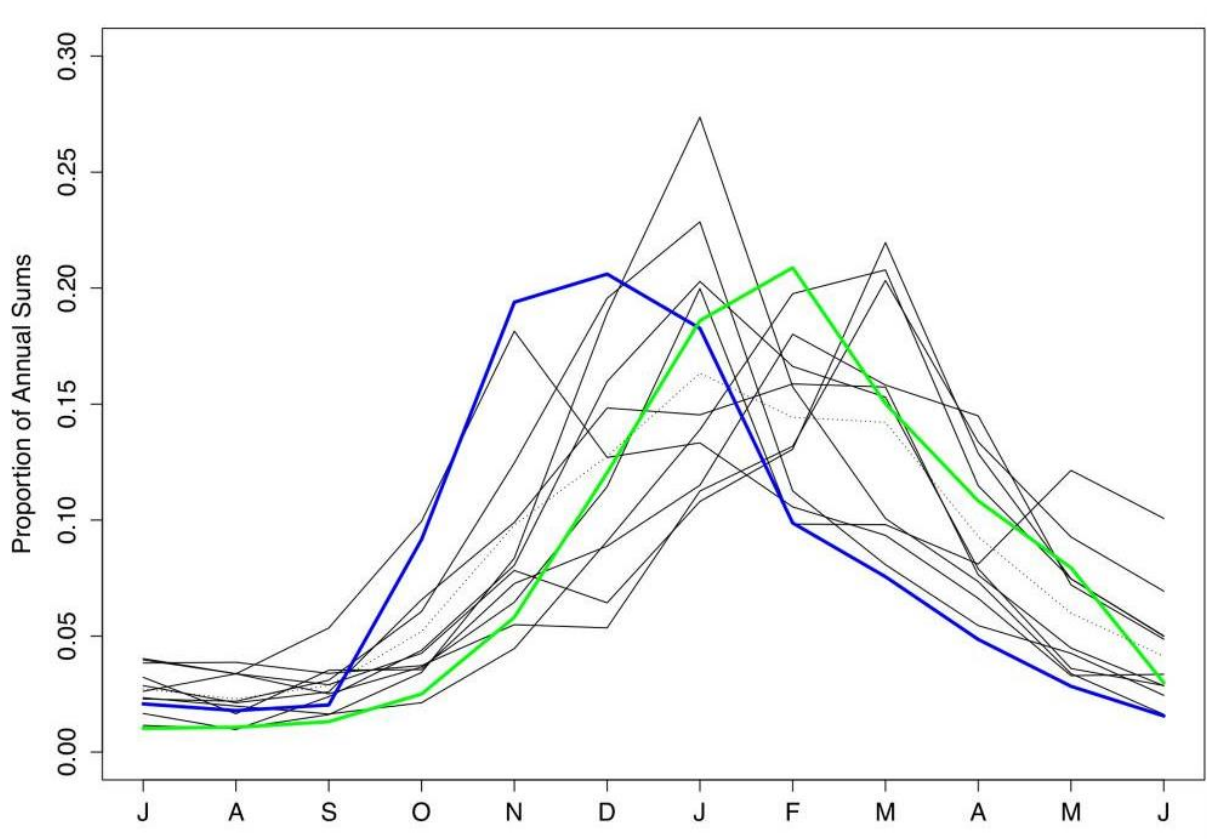


Figure 16 : Proportions de cas de norovirus détectés selon les mois de l'année dans l'hémisphère Nord, à partir de données provenant de 293 études réalisées entre 1997 et 2011. Chaque ligne indique les données d'une année particulière, la couleur bleue et verte correspondent à l'apparition respective des variants GII.4 Farmington Hills en 2002-2003 et Den Haag en 2006-2007. Ahmed, Lopman, et Levy 2013.

### I.2.E.c. Diversité et recombinaison

Les norovirus, virus à génome ARN positif simple brin, présentent une fréquence de mutations plus élevée que les virus à ADN du fait de l'absence d'activité exonucléase en 3' de l'ARN polymérase ARN dépendante virale. De nombreux autres facteurs sont responsables de cette instabilité génétique, celle-ci entraînant l'apparition de nouveaux variants à l'origine de nouvelles épidémies.

#### - **Le cas particulier des norovirus GII.4**

Plus de la moitié des infections mondiales à norovirus est provoqué par des norovirus du génotype GII.4 : entre 1990 et 2012, une nouvelle souche à potentiel pandémique semblait alors émerger tous les 2 à 3 ans. Six pandémies de norovirus GII.4 ont alors été identifiées, causées par des variants successifs, le dernier en date ayant été identifié pour la première fois à Sydney en 2012 (**Figure 17**). Ce variant circule encore dans la population, après l'acquisition d'une autre polymérase, GII.P16, en 2015 lors d'un événement de recombinaison (Beek et al., 2013; Hoa Tran et al., 2013). Il est suspecté que les norovirus GII.4 reconnaissent un nombre plus important d'antigènes tissulaires de groupe sanguins que les autres souches, ce qui expliquerait leur omniprésence dans les épidémies à grande échelle (Belliot et al., 2010; de Rougemont et al., 2011; Tohma et al., 2019). L'augmentation de l'affinité et du profil de reconnaissance envers ces molécules pour les variants Kawasaki de GII.17 sont probablement responsables de son succès épidémiologique au cours des années 2015-2017, qui n'a pas perduré pour d'autres raisons sur lesquelles nous reviendrons (Estienney et al., 2022).

#### - **Pression de sélection :**

La pression de sélection sur les souches en circulation s'observe également au sein des hôtes infectés où des variants peuvent apparaître en raison de la sélection positive qui s'exerce. Certaines séquences sont soumises à de nombreuses substitutions non-synonymes, et ce notamment au niveau de la protéine de capsid VP1 (Parra et al., 2017). Une partie de ces mutations affectent la sous-unité P2 du domaine P, qui présentent les sites responsables de la liaison aux HBGA, ainsi que les épitopes susceptibles d'être ciblés par les anticorps neutralisants de l'hôte (Lindesmith et al., 2008; Petronella et al., 2018). Ainsi, la diversification intra-hôte des souches est responsable de leur évolution à l'échelle globale, notamment pour les souches GII.4 qui semble favoriser l'apparition de mutations *de novo* par rapport aux autres souches (Tohma et al., 2021). Il en résulte la production de nouveaux variants pouvant échapper à l'immunité de groupe ou reconnaissant de nouveaux facteurs d'attachement. Les hôtes immunodéprimés peuvent alors agir en tant que réservoirs du point de vue épidémiologique, mais les profils d'accumulation de mutation dans ces hôtes semblent avoir peu d'impact sur l'évolution globale des souches retrouvées par la suite dans la population humaine (Tohma et al., 2021; Yu et al., 2020).

#### - **Recombinaison :**

La recombinaison est la génération d'un génome viral comprenant des parties de génomes parentaux différents. Elle a lieu dans des cellules coinfectées par au moins deux virus parentaux différents, et se produit vraisemblablement par « template switching » : l'ARN polymérase-ARN dépendante passe

d'un génome parental à un autre lors de la réplication, générant une molécule d'ARN complémentaire hybride. Ces événements se produisent principalement au niveau du chevauchement entre les ORF1 et 2, en raison de la grande conservation de cette séquence (Bull et al., 2005). Ces recombinaisons permettent l'échange de gènes codant pour des protéines structurales et non-structurales issues de différentes lignées phylogénétiques, favorisant l'apparition de nouveaux variants avec des caractéristiques antigéniques nouvelles de façon similaire au virus de la grippe (Cannon et al., 2017; Mahar et al., 2013; Tan et al., 2009). Ces phénomènes sont particulièrement visibles pour les souches GII.4 sur la **figure 17** où l'on observe la succession des variants majoritaires de GII.4, et leur association avec des polymérases virales qui peuvent provenir d'événements de recombinaison. Ainsi depuis 2012, la capsid issue de la souche GII.4 Sydney a tendance à la recombinaison avec des polymérases virales d'autres souches, dont le fitness est particulièrement important au sein de la population humaine (dont GII.P16 depuis 2016, succédant à GII.P31) ce qui explique en partie la dominance de GII.4 Sydney depuis son apparition (Barclay et al., 2019; Zheng et al., 2022).

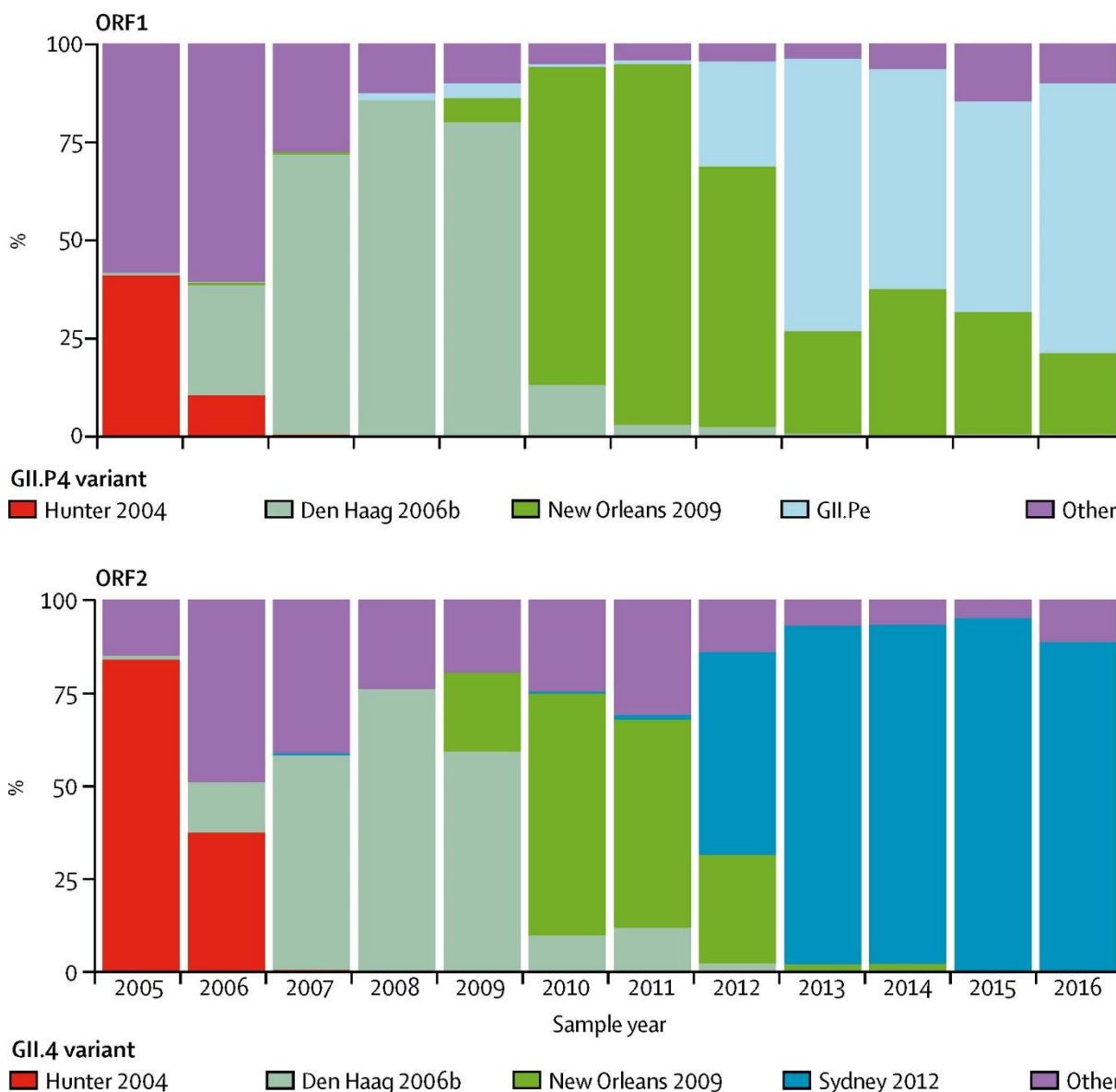
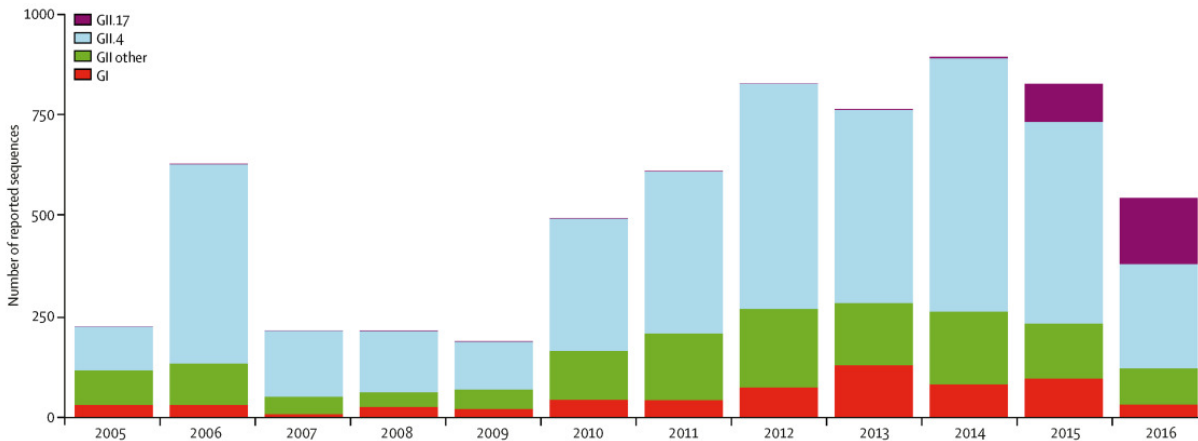


Figure 17 : Proportions des différents variants de GII.4 parmi 8083 séquences de l'ORF1 (polymérase virale, P-type) et 4184 séquences de l'ORF2 (capside virale) de norovirus humain détectées entre 2005 et 2016 en Europe, Asie et Océanie. Van Beek et al. 2018.

### I.2.E.d. Épidémiologie moléculaire

Grâce au réseau de surveillance NoroNet, les séquences de plus de 16 000 norovirus responsables d'épidémies et de cas sporadiques entre 2005 et 2016 ont pu être répertoriées et analysées. Ces données permettent d'instaurer un système de suivi des tendances épidémiologiques à travers le monde et d'identifier les caractéristiques des nombreuses souches de norovirus qui circulent dans la population à travers les années. L'immense majorité (91,7%) des cas pour lesquels les souches ont été séquencées entre les années 2005 et 2016 sont dus à des souches du génogroupe GII, 8,2% à des

souches du génogroupe GI et enfin moins de 0,1% à des souches GIV (van Beek et al., 2018). La distribution des différentes séquences obtenues selon l'année, le génogroupe et le génotype des souches analysées peut être visualisée sur la **figure 18**.



*Figure 18 : Nombre de séquences de l'ORF2 de norovirus humains selon le génotype, le génogroupe et l'année identifiées entre 2005 et 2016. Un total de 6423 séquences provenant d'Europe, d'Asie et d'Océanie sont représentées. Van Beek et al. 2018*

Ce type de suivi a également été réalisé sur la période 2015-2020 à l'aide des données de 123 articles provenant de 45 pays à travers le monde. Elles ne concernent cette fois que les enfants de moins de 18 ans, mais démontrent également le poids épidémiologique du génogroupe GII, identifié dans 92,9% des cas, contre 6,7% pour GI. Plus précisément, 59,3% des infections étaient liées à la présence de GII.4 et 14,9% par GII.3, confortant l'importance du génotype GII.4 dans les infections et sa capacité à rester prédominant au fil des années (Farahmand et al., 2022). Les souches GII.12 sont également responsables d'un nombre de cas important puisqu'elles ont été retrouvées dans 5,1% des cas, tandis que le génotype GII.17 n'est responsable que de 3,9% des infections, ce qui contraste avec les données des années 2015 et 2016 collectées par NoroNet. La brutale augmentation du nombre d'infection liée à GII.17 au cours de ces deux années avait conduit à conjecturer sa possible domination sur les autres souches, conduisant à un changement de paradigme vis à vis de l'omniprésence de GII.4 depuis des décennies (de Graaf et al., 2015). Cependant, ce génotype ne s'est pas implanté durablement, et le nombre de cas causé par celui-ci a diminué dès 2018 comme indiqué par les données de la littérature ou le réseau de surveillance NoroSurv sur la période 2016-2020 (Cannon et al., 2021; Tinker et al., 2021; Utsumi et al., 2021).

## I.2.F. Interactions hôte-virus

### I.2.F.a. Les antigènes tissulaires de groupe sanguin

La capside virale des norovirus présente des domaines d'interactions avec leur facteur d'attachement, les antigènes tissulaires de groupe sanguin ou HBGA (Histo Blood Group Antigen).

Il s'agit de chaînes de glycanes associés à des glycolipides et des glycoprotéines à la surface des cellules épithéliales du système digestif, des cellules endothéliales et des érythrocytes, sur lesquelles elles déterminent le groupe sanguin des individus. Une enzyme codée par le gène FUT2, la  $\alpha$ 1,2fucosyltransferase, ajoute un groupe fucose à un précurseur oligosaccharidique, formant alors l'antigène H. Ce dernier est ensuite ciblé par les enzymes glycosyltransférases A ou B codées par le gène ABO, formant les antigènes A et/ou B selon le génotype de l'individu. Cela consiste en l'ajout d'une N-acetylgalactosamine (donnant le groupe A) et/ou d'un galactose (correspondant au groupe sanguin B) en  $\alpha$ 1,3 du galactose déjà présent sur l'antigène H formé en amont. Ces glycanes peuvent également être sécrétés dans les liquides biologiques tels que la salive, le sang, le mucus intestinal ou le lait maternel par les individus présentant un gène FUT2 fonctionnel, et donc un phénotype dit "sécréteur" (Marionneau et al., 2002). Environ 80% de la population caucasienne présente le phénotype sécréteur, tandis que sa proportion dans les populations méso-américaines peut atteindre 95% (Nordgren and Svensson, 2019). Chez ces individus, les HBGA de type H, A et/ou B sont exprimés dans les liquides biologiques. Cela signifie qu'une personne de phénotype "sécréteur" positif de groupe sanguin A exprime des antigènes A et H dans sa salive, son mucus digestif et sur les cellules intestinales. Chez les 20% restants de la population caucasienne par exemple, la présence simultanée de deux allèles FUT2 récessifs avec un codon STOP prématuré se traduit par un phénotype "non-sécréteur", et se traduit par l'absence de ces HBGA dans leurs sécrétions.

Une troisième enzyme,  $\alpha$ 3,4fucosyltransferase, codée par le gène FUT3 induit une modification supplémentaire de ces glycanes chez les individus qui expriment une version active du gène, correspondant à un phénotype dit "Lewis positif". Cette enzyme lie un fucose en  $\alpha$ 1,4 des précurseurs, pouvant alors former différents glycanes : les trisaccharides Lewis a ou Lewis x chez les personnes FUT-2 négatives (non-sécréteurs), et les tétrasaccharides Lewis b et Lewis y pour les personnes FUT-2 positives (sécréteurs). Ces différentes étapes sont résumées sur la **figure 19**.

Il existe également des individus présentant un génotype FUT3 avec les deux allèles inactifs (*FUT3* -/-), qui sont alors "Lewis négatifs", n'exprimant pas d'antigènes de Lewis. On retrouve ce phénotype dans des proportions différentes selon les populations considérées : de 20 à 30% chez des

populations africaines, jusqu'à 17% en Amérique du Sud, 6 à 10% chez les populations européennes et asiatiques (Guo et al., 2017; Loureiro Tonini et al., 2020; Nordgren et al., 2013). Il existe donc une vaste diversité génétique des profils de glycosylation au sein des populations selon le profil d'activité de ces diverses enzymes. Nous pouvons citer l'exemple des phénotypes dits « sécréteurs faibles » causés par une mutation faux-sens A en T en position 385 de FUT2 assez répandus en Asie. Les porteurs homozygotes de cette mutation peuvent présenter une expression des HBGA, bien que réduite par rapport aux sécréteurs positifs (Liu et al., 2014; Yu et al., 1995).

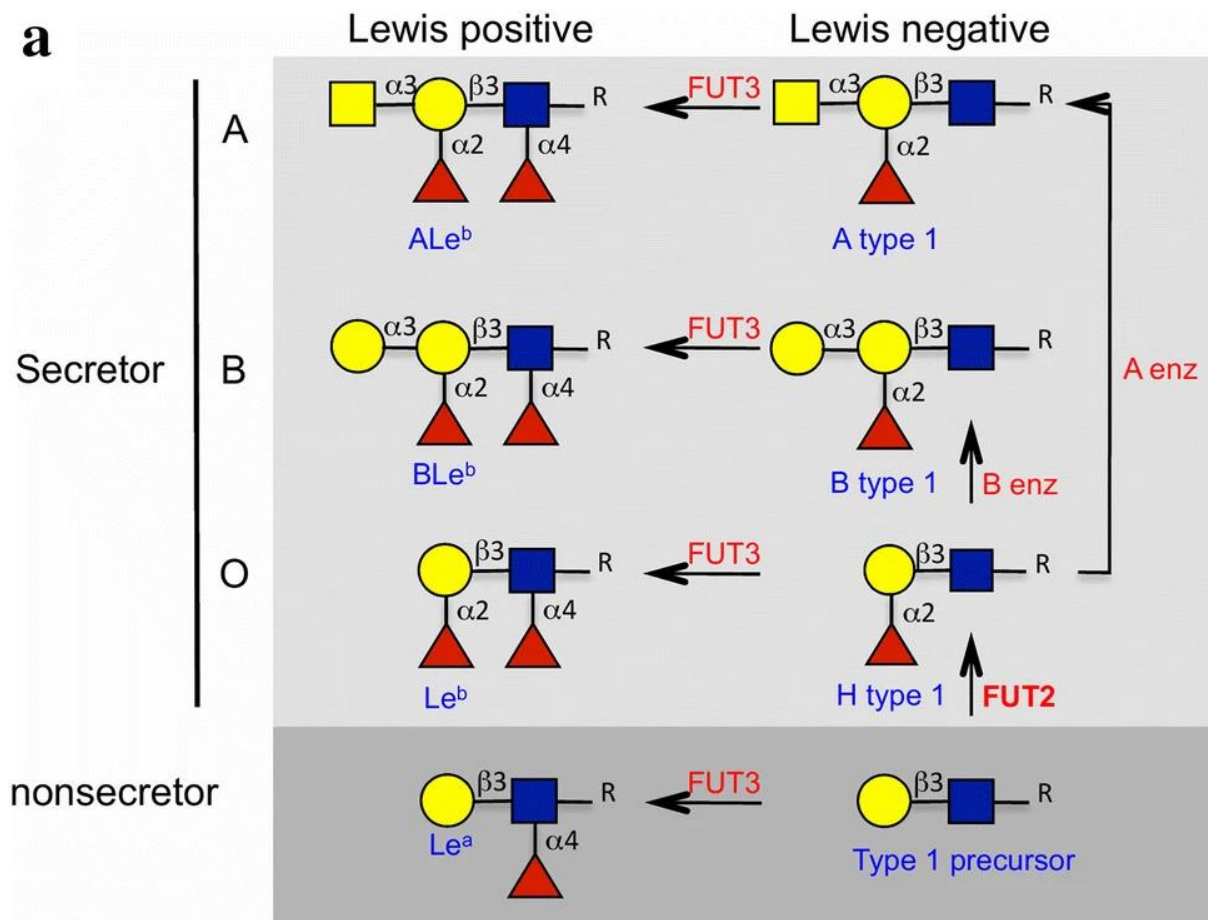


Figure 19 : Représentation schématique des voies de biosynthèse des HBGA par les cellules épithéliales. L'action des enzymes FUT2, FUT3, A et B (en rouge) ajoutent de façon séquentielle des groupement monosaccharides (rond jaune : galactose, carré jaune : N-acétylgalactosamine, carré bleu : N-acétylglucosamine et triangle rouge : fucose) à de précurseurs disaccharides pour former les antigènes A, B, H et Lewis (en bleu). Le Pendu et Ruvoën-Clouet 2020.



### **I.2.F.b. Affinités entre souches et HBGA**

Les norovirus humains ont des affinités variables pour les différents HBGA selon la souche considérée, ce qui se traduit par une sensibilité ou une résistance génétique aux différents norovirus pour les individus en fonction de leur phénotype (Marionneau et al., 2002). Ainsi, les individus de phénotype non-sécréteur sont résistants à l'infection par les norovirus GI.1, et sont moins sensibles aux GII.4 que les individus sécréteurs. En revanche, ils sont toujours sensibles à l'infection par les souches GI.3 ou GII.2 (Villabruna et al. 2020). D'autres souches peuvent présenter des résultats différents selon les études, et l'utilisation d'autres méthodes peut permettre d'éclaircir ces mécanismes d'interactions virales, avec des VLP par exemple. Celles-ci présentant les mêmes affinités pour les HBGA que les virus à partir desquels elles sont produites, leurs interactions avec les glycanes présents dans la salive ou les coupes de tissus permettent donc de supposer la sensibilité des personnes ou des espèces animales selon leur génotype et leurs groupes sanguins. Les HBGA présents dans les tissus d'animaux peuvent également lier de nombreux VLP de norovirus humains, voire même l'immense majorité des souches testées dans le cas des chiens et des pipistrelles (Villabruna et al., 2020).

Le modèle entéroïde s'est montré utile pour étudier les phénomènes de sensibilité génétique à l'infection selon le statut HBGA des donneurs (Ettayebi et al., 2016). Les différentes données obtenues (épidémiologiques, à l'aide de VLP ou grâce au modèle de culture cellulaire) permettent donc d'établir certains profils de liaisons en fonction des génogroupes et génotypes (Huang et al., 2005; Nordgren and Svensson, 2019). Bien que les mécanismes d'interaction entre norovirus et les HBGA soient étudiés de façon approfondie depuis des années, certains résultats restent complexes à interpréter, en raison de problèmes méthodologiques ou de l'implication possible d'interactions encore non identifiés, et de la diversité des souches (Peters et al., 2022). Des différences entre les hôtes au niveau génétique ou immunitaire peuvent également impacter la sensibilité de ceux-ci à l'infection (Ruvoën-Clouet et al., 2013). Comme déjà évoqué précédemment, les différences génétiques entre des variants peuvent également jouer un rôle : les variants successifs de GII.4 démontrent ainsi des affinités de plus en plus fortes avec une variété d'HBGA de plus en plus importante, possiblement à la source de leur dominance épidémiologique (Liang et al., 2021). L'augmentation transitoire des cas dû aux variants de GII.17 il y a quelques années semble également lié à des mécanismes similaires (Estienney et al., 2022). Les différences d'affinités pour les HBGA ne sont toutefois pas les seuls déterminants du succès épidémiologiques des souches, et il faut alors considérer d'autres facteurs : polymérase virale associée, mécanismes immunologiques, ...

### **I.2.F.c. Autres interactions**

Les capsides des norovirus sont également capables d'interagir avec une grande variété d'autres molécules et composés, résumée ci-dessous :

#### **- Bactéries**

Le rôle des bactéries du microbiote est à considérer : des molécules similaires aux HBGA, sécrétées par des bactéries commensales, pourraient faciliter l'infection à norovirus, et ce même chez des individus non-sécréteurs, mais un effet protecteur de certaines populations bactériennes face à une infection symptomatique par GI.1 est également suggéré (Magwira et al., 2021; Patin et al., 2020). Des bactéries exprimant des molécules similaires aux HBGA (*E. cloacae*) sont nécessaires en tant que cofacteur pour permettre l'infection d'une lignée de cellule B humaines par des norovirus (Jones et al., 2015; Miura et al., 2013a)

#### **- Lait maternel**

De très nombreux oligosaccharides sont présents dans le lait maternel et certains sont capables de se lier aux sites de liaison aux HBGA des particules virales de GI.1 West Chester, GII.10 Vietnam026 ou GII.17 Kawasaki 308 empêchant une interaction avec des HBGA salivaires après une incubation avec certains oligosaccharides (Koromyslova et al., 2017; Weichert et al., 2016).

#### **- Acides sialiques**

Les dimères de GII.4 VA387 ont été présentés comme capables de lier des acides sialiques (Han et al., 2014) portés par des glycanes (gangliosides), mais ces résultats ne sont pas retrouvés par des études ultérieures (Creutzmacher et al., 2021). Certaines différences au niveau des interactions peuvent être observées entre des dimères du domaine P des capsides et des VLP (capsides complètes).

#### **- Acides biliaries**

Les acides biliaries sont des produits du catabolisme du cholestérol et sont sécrétés par le foie, puis stockés sous forme de micelles en association avec d'autres molécules dans la vésicule biliaire. Ils sont sécrétés dans le tractus digestif et facilitent la digestion et l'absorption des nutriments, et la majorité est recyclée en étant recapturé dans l'iléon, la portion terminale du petit intestin, puis réacheminée vers le foie grâce à la circulation sanguine (Chiang, 2013). Les domaines P des capsides des génotypes GII.1, GII.10 ou GII.19 lient les molécules d'acides biliaries primaires au niveau d'une poche de liaison présentant une densité électronique particulière qui n'est pas présente chez les capsides des génotypes GI.1, GII.3, GII.4 ou GII.17 qui ne forment aucune liaison avec des acides biliaries (Kilic et al., 2019). Cette affinité relativement faible avec ces molécules produit un effet particulier sur certains génotypes : elle augmente l'affinité des capsides virales pour le récepteur d'attachement du norovirus humain.

L'incubation préalable de VLP des souches GII.1, GII.2 et GII.10 avec des acides biliaires ou de la bile modifie la structure tridimensionnelle de la capsid et permet une meilleure affinité de celles-ci pour les HBGA.

#### - **Autres**

Enfin, de nombreuses autres molécules ont montré une interaction avec des VLP, comme les héparanes sulfates avec des souches GII (Ueno et Chitta), le citrate avec GII.10 Vietnam026, le glycérol avec GII.21 OIF (Almand et al., 2017a). Ces études pourraient permettre d'identifier des molécules capables d'agir en tant que ligands (facteurs d'attachement, récepteurs) alternatifs, voire même des composés capables d'inhiber l'infection à norovirus dans un but thérapeutique.

### **I.2.G. Pathogénèse**

#### **I.2.G.a. Physiopathologie de l'infection à norovirus**

Après l'attachement aux cellules, les norovirus vont être internalisés dans les cellules cibles, probablement les entérocytes, des différentes portions de l'intestin : à savoir duodénum, jéjunum et iléum. L'infection semble entraîner des changements histologiques au niveau du petit intestin, se traduisant par des villosités élargies et plus courtes (Troeger et al., 2009). Ces modifications transitoires du tissu intestinal s'accompagnent sur le plan physiologique d'une malabsorption de molécules telles que le xylose, les acides gras et le lactose, probablement liée à une diminution de l'activité enzymatique de la bordure en brosse des entérocytes infectés (Karst, 2010). En d'autres termes, les symptômes diarrhéiques résultants de l'infection par les norovirus ne sont pas liés à des altérations structurelles des organes digestifs, mais plutôt au niveau des fonctions de sécrétion et d'absorption des entérocytes notamment (Meeroff et al., 1980). Une autre manifestation sera l'apparition de vomissements et de nausées, reflets de l'impact de l'infection sur le fonctionnement moteur de l'estomac. Ces symptômes peuvent être imputés au possible tropisme du norovirus humain, pour les cellules entéroendocrines, responsables de la sécrétion de nombreuses hormones et peptides aux activités diverses : régulation de la glycémie, de la satiété, de la sécrétion d'acides gastrique ou encore de neurotransmetteurs type sérotonine (Karandikar et al., 2016).

Un parallèle intéressant a été fait avec le mécanisme connu de l'entérotoxine NSP4 des rotavirus : cette protéine provoque l'augmentation d'ions  $Ca^{2+}$  intracellulaires et de la sécrétion de 5-hydroxytryptamine (sérotonine) par les cellules entérochromaffines, un sous-type de cellules entéroendocrines. Cette surproduction de 5-HT est associée avec la survenue de diarrhées et d'activation des structures neuronales responsables des vomissements chez les souris (Hagbom et al., 2011). Il est possible que l'infection par norovirus impacte les mêmes cellules et favorise l'apparition

des symptômes gastrointestinaux de type diarrhées et vomissements. A ce sujet il est opportun de mentionner que la protéine virale NS1/2 du virus Tulane, appartenant à la famille des *Caliciviridae*, cause une dérégulation des concentrations intra-cellulaires en ions  $Ca^{2+}$ . Des mécanismes similaires semblent être à l'œuvre lors de l'infection par norovirus humains (Strtak et al., 2019).

### **I.2.G.b. Immunité**

Les premières études sur la durée de la protection conférée par une infection à norovirus ont suggéré une immunité d'une durée de quelques semaines à quelques mois vis-à-vis de la souche prototype du Norwalk virus, appartenant au génogroupe I (Parrino et al., 1977). Ces études ne prenaient pas en compte le statut immunologique du patient, son statut sécréteur ou encore le titre viral utilisé pour l'infection. De plus, l'infection par une souche donnée n'empêche pas de développer des signes cliniques lors d'une infection liée à une autre souche du même génogroupe, preuve d'une différence antigénique suffisante pour ne pas conférer de protection croisée dans certains cas (Karangwa et al., 2017). La grande diversité antigénique des variants d'une souche telle que GII.4, avec des épitopes variables, peut également donner lieu à des réinfections (Saito et al., 2014). Certaines études sur des cohortes d'enfant mettent également en lumière ce phénomène de réinfections, avec des individus ayant contracté la pathologie plus de dix fois en 2 ans (Chhabra et al., 2020).

Les corrélats de protection immunologique contre la maladie peuvent être résumés en quatre points (Ramani et al., 2015) :

- La présence d'IgA salivaires dirigés contre les norovirus, dont la concentration corrèle positivement avec une réduction du risque de développer une gastro-entérite
- Les niveaux d'anticorps bloquants, qui empêchent de manière fonctionnelle l'interactions entre capsides virales et HBGA
- Les lymphocytes B mémoires capables de sécréter des IgG spécifiques aux norovirus, signe d'une infection précédente, capables de lier les domaines P et S des capsides
- Le niveau d'IgA fécaux, qui suggèrent un contrôle de la réplication virale dans les organes infectés et une excrétion virale réduite

### **I.2.G.b. Réponse interféron**

Les données obtenues *in vitro* à partir du modèle entéroïde démontrent l'activation d'une réponse interféron lors de l'infection, dont l'impact reste à démontrer *in vivo*. L'inhibition des kinases JAK-1

et JAK-2, impliquées dans la voie de signalisation des interféron IFN I et IFN III entraînent une augmentation de la réplication des souches GII.3 et GII.4 dans ce modèle (Hosmillo et al., 2020). Cette implication de la réponse interféron endogène dans la réponse antivirale n'est pas la même selon les souches : une lignée modifiée génétiquement par Cas9 pour supprimer l'expression de STAT-1 n'améliore pas la réplication de la souche GII.4, mais augmente celle de GII.3. En revanche l'interféron exogène limite la réplication des deux souches, en augmentant l'activation des gènes sensibles à l'interféron (ISGs) et suggérant un effet thérapeutique de ces molécules contre les norovirus (Lin et al., 2020). Cette différence de réponse à l'interféron endogène pourrait expliquer en partie le succès épidémiologique de certaines souches par rapport à d'autres, bien que les facteurs restrictifs ne soient toujours pas connus. De nombreux mécanismes restent à élucider, en gardant à l'esprit que le modèle entéroïde peut présenter une forte variabilité selon le génotype des donneurs et reflète une réponse particulière liée à la nature des cellules qu'il présente, notamment les entérocytes qui sont capables de produire de l'IFN III (Jahun and Goodfellow, 2021).

La protéine virale NS1 (p48) semble également jouer un rôle dans l'activation des lymphocytes B et dans la réponse immunitaire humorale lors de l'infection aux norovirus humains. On retrouve une surexpression du marqueur cellulaire CD86 et un métabolisme cellulaire plus important chez les lymphocytes B primaires au contact de cette protéine virale *in vitro* (Mirabelli et al., 2022a).

Des anticorps dirigés contre cette protéine virale NS1 sont également retrouvés dans le sérum d'une cohorte d'enfants, la majorité des autres anticorps étant dirigés contre la protéine structurale VP1 qui porte l'antigénicité des virions. Cependant, le rôle de ces anticorps dirigés contre les protéines non-structurales reste encore à éclaircir, et il est probable qu'ils soient le reflet de multiples infections passées (Villabruna et al., 2022).

#### **I.2.G.d. Outils thérapeutiques**

Il n'existe actuellement pas de vaccin contre les norovirus sur le marché, mais plusieurs sont en développement. La méthode privilégiée repose sur l'utilisation de VLP. Une bivalence partagée entre des particules de génotype GII.4 et GI.1 permettrait une protection contre les souches les plus représentées au niveau épidémiologique, car l'immunité contre un génogroupe ne protège pas de façon certaine contre un virus appartenant à un second génogroupe. Les études préalablement réalisées ont permis de prouver que l'utilisation de VLP en tant que vaccin était bien immunogène, et ne provoquait pas d'effets secondaires importants (Lindesmith et al., 2015). Ce vaccin bivalent est actuellement en phase III de recherche clinique, et doit désormais être testé chez des enfants et des adultes.

Un autre mécanisme envisagé vise à lier les capsides virales au niveau des domaines d'interaction avec les HBGA, pour empêcher les norovirus d'interagir avec les cellules et bloquer son potentiel infectieux. Ainsi, des « nanobodies », formés à partir d'anticorps de camélidés, possèdent une forte affinité envers un large spectre de norovirus, et ce même pour des souches appartenant à différents génogroupes. Malgré tout, ces résultats encourageants ont principalement été obtenus à l'aide de VLP, ce qui ne reflète pas nécessairement leur activité *in vivo* (Koromyslova and Hansman, 2017). Les composés capables d'interagir avec les capsides décrits dans la partie **I.2.F.c.** (mis à part les acides biliaires) ont également été étudiés dans un but similaire d'encombrement stérique (Netzler et al., 2019). D'autres anticorps monoclonaux comme le NORO-320 Fab ont la capacité à limiter la réplication de GII.4 et GII.17 sur le modèle entéroïde, mais sans se lier spécifiquement au site de liaison aux HBGA de ces virus (Alvarado et al., 2021).

Enfin, des molécules antivirales ayant pour cible les enzymes virales, comme la RdRp ou la protéase sont étudiées. L'analogue nucléosidique 2'-C-methylcytidine (2CMC) est le plus connu, avec une efficacité intéressante sur la transmission du norovirus murin *in vivo* et les niveaux de réplication du norovirus humain en modèle entéroïde, mais des questions d'effets secondaires restent présentes (Mirabelli et al., 2022b; Rocha-Pereira et al., 2015).

## **I.2.H. Méthodes d'étude**

### **I.2.H.a. Culture en lignées cellulaires**

La culture des norovirus en cellule *in vitro* a représenté pendant longtemps une limite importante à l'étude de ce virus, malgré plus de cinquante années d'essais. Les scientifiques avaient déjà compris que la majorité des épidémies de gastroentérites n'étaient alors pas causés par des bactéries mais par des agents viraux dont la transmission pouvait être étudiée grâce à des volontaires humains, et dont les particules étaient observables au microscope électronique, mais impossible à répliquer sur des cellules (Kapikian, 2000).

Une trentaine de souches de norovirus ont ainsi été étudiées sur des dizaines de lignées cellulaires d'origine variée : adénocarcinome des différentes portions du petit intestin, fibroblastes ou cellules embryonnaires, pulmonaires mais également des lignées de cellules animales comme la lignée rénale Vero du Singe vert d'Afrique (Duizer et al., 2004) ... De très nombreux paramètres ont également été testés, comme la différenciation des cellules par l'ajout de composés type insuline, acide butyrique, mais aussi de salive ou de bile pour augmenter la liaison aux cellules et l'internalisation des particules virales. Malheureusement aucun résultat probant ne fût obtenu.

L'émergence de modèles de culture cellulaire en 3 dimensions pour les pathogènes entériques conduit alors à la mise au point de techniques de culture des lignées intestinales embryonnaires Int-407 et du carcinome colorectal Caco-2 sur des microbilles recouvertes de collagène dans des bioréacteurs (Straub et al., 2011, 2007). Malgré cela, ces résultats ne furent pas reproduits (Papafragkou et al., 2013; Takanashi et al., 2014). Une autre équipe a utilisé des lymphocytes B provenant d'un lymphome comme décrit en **I.2.D.a.** (Jones et al., 2015).

### **I.2.H.b. Le modèle entéroïde humain et les acides biliaires**

#### **- Le modèle entéroïde**

La mise au point et le perfectionnement du modèle entéroïde humain a permis son application en virologie, avec des résultats positifs pour la culture du rotavirus, un autre virus responsable de gastroentérites (Sato et al., 2011; Saxena et al., 2015). Son utilisation en 2016 a permis de révolutionner le domaine d'étude des norovirus, car il s'agit du premier modèle cellulaire permettant une réplication reproductible et stable dans le temps de nombreuses souches de norovirus dont GI.1 Norwalk, GII.3, GII.4 (Yerseke, Den Haag, New Orleans et Sydney) ou GII.17 (Ettayebi et al., 2016). Il a également permis l'étude d'autres virus humains d'intérêts tels que les astrovirus, adenovirus, enterovirus et le Sars-CoV-2 plus récemment (Crawford et al., 2021).

Le succès de ce modèle est lié à sa capacité de reproduire un environnement cellulaire physiologiquement proche de celui retrouvé dans le tissu intestinal. L'épithélium des différents segments du tractus intestinal est constitué de nombreuses cellules polarisées et différenciées, effectuant chacune des rôles particuliers. Cet épithélium se renouvelle en permanence à un rythme élevé (3 à 5 jours) à partir de cellules souches situées à la base de structures appelées cryptes intestinales. Celles-ci expriment le récepteur couplé aux protéines G Lgr5 : il interagit avec les facteurs R-spondins et joue un rôle dans la voie de signalisation Wnt impliquée dans le développement des cellules souches (Glinka et al. 2011).

Ces cellules souches engendrent ainsi les différentes lignées constitutives de l'épithélium : entérocytes, cellules caliciformes, entéroendocrines, Tuft et de Paneth (**Figure 20**). Les cellules obtenues à partir de ces précurseurs vont suivre une progression ascendante le long des cryptes intestinales, se divisent un nombre limité de fois sous le nom de « transit-amplifying cells », puis se différencient et acquiert leur phénotype final, avant d'atteindre le sommet des villosités intestinales et d'être éliminées dans la lumière de l'organe. La flexibilité est l'un des principaux atouts du modèle entéroïde car les cellules souches peuvent provenir d'individus de caractéristiques génétiques différentes (groupes sanguins,

statut sécréteur, ...). La zone prélevée peut également varier (jéjunum, duodénum, iléon et colon) et il est possible de modifier génétiquement les cellules souches afin d'induire ou de supprimer l'expression de certains gènes, et d'observer les effets sur la réplication virale. On peut notamment citer l'utilisation de lignées pour lesquelles le gène FUT2 a été rendu inactif, ce qui a permis de démontrer la nécessité de son expression et des HBGA pour l'infection par des souches de norovirus GI.1, GII.4 et GII.17 par exemple (Haga et al., 2020).

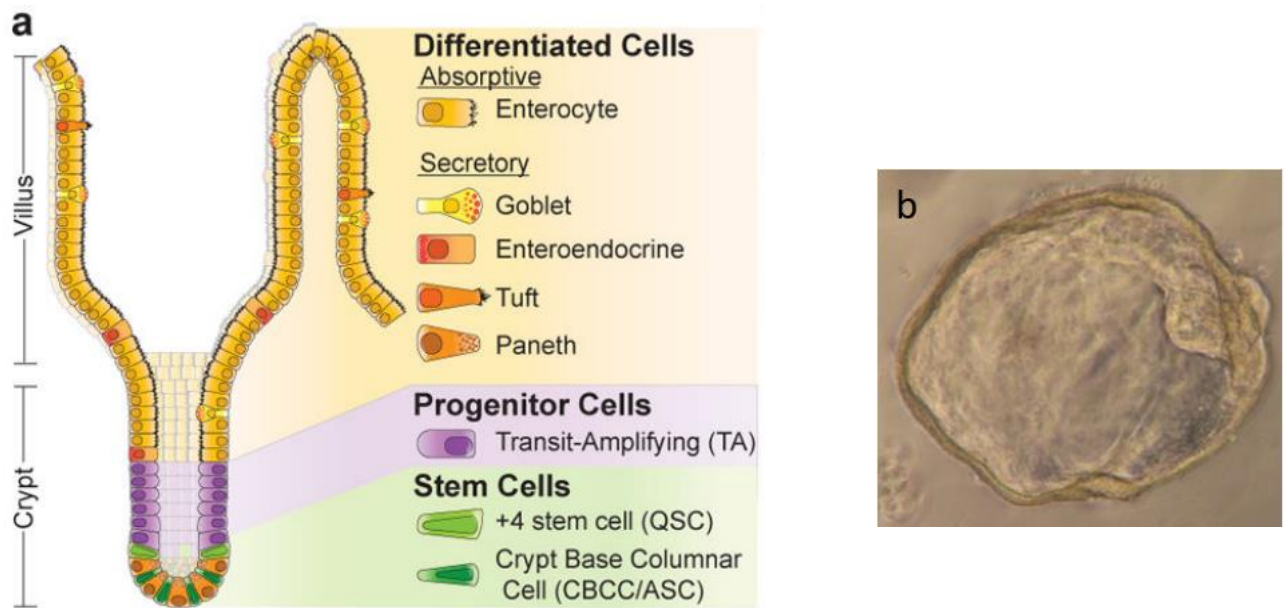


Figure 20 : a) Schéma récapitulatif de l'organisation de l'épithélium intestinal, présentant les différents marqueurs exprimés par les cellules souches et les différents types de cellules différenciées (Carulli et al., 2014) et b) image d'un entéroïde intestinal de jéjunum (HIE J2) après 7 jours de culture, observé au microscope optique x40 (image personnelle).

### - Le rôle des acides biliaires

Le modèle entéroïde humain a également permis de démontrer l'importance des acides biliaires dans la réplication des norovirus, car certaines souches ne montrent aucune réplication virale sauf lorsque ce cofacteur est ajouté au milieu. L'étude initiale sur l'utilité du modèle entéroïde démontre la nécessité de la bile pour observer une réplication des souches GI.1, GII.3 et GII.17. En revanche, la réplication de la souche GII.4 est améliorée par la bile, mais son absence n'empêche pas la multiplication virale (Ettayebi et al., 2016). Par la suite, l'acide glycodésoxycholique ou GCDCA (glycodeoxycholic acid)



sera principalement utilisé : il s'agit d'un des principaux acides biliaires couplé à de la glycine pour réduire son hydrophobie caractéristique des acides biliaires primaires, et donc sa cytotoxicité. Ce cofacteur a démontré son importance dans les étapes précoces de l'infection virale (dès les 3 premières heures), et donc un rôle au niveau de l'entrée virale. En effet, le GCDCA améliore de façon rapide et transitoire les capacités d'endocytose des cellules, ainsi que l'acidification des endosomes, qui semblent être des paramètres déterminants dans la capacité à infecter le modèle entéroïde de la souche GII.3 (Murakami et al., 2020). Le récepteur couplé à la protéine G S1PR2 est impliqué dans la liaison aux acides biliaires primaires et donc joue potentiellement un rôle dans les premières étapes du cycle viral, mais son rôle dans les intestins est peu connu, tout comme dans le cas des autres souches. En revanche, les acides biliaires secondaires, produits par la dégradation bactérienne des acides biliaires initiaux, sont moins voire non efficaces dans l'activation de cette activité d'endocytose cellulaire. D'un point de vue plus global, les acides biliaires sont des acteurs importants et jouent des rôles complexes sur plusieurs niveaux dans la réplication des virus entériques (Kong et al., 2021). Leurs implications dans le cycle viral des norovirus humains restent encore à explorer en fonction des nombreuses souches.

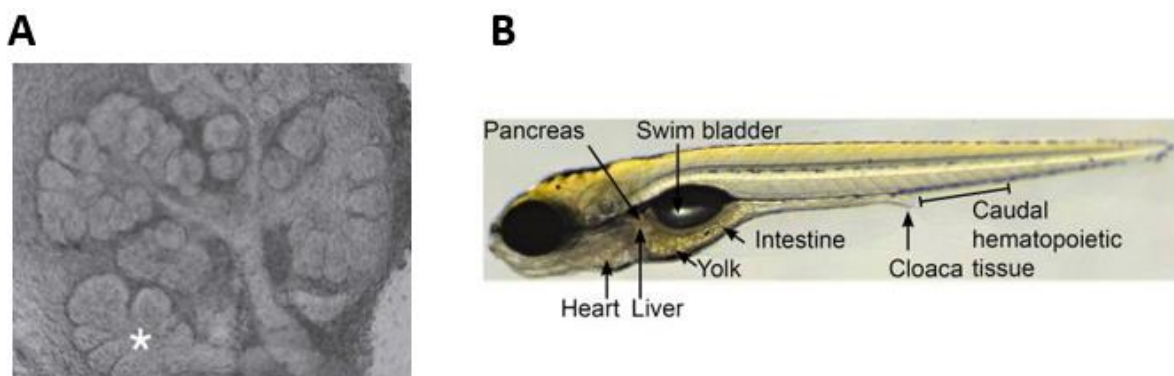
### **I.2.H.c. Autres modèles**

Les modèles animaux ont également été utilisés pour étudier le norovirus humain, comme les souris humanisées (Taube et al., 2013), des chimpanzés (Bok et al., 2011) ou encore des porcs gnotobiotiques (Cheetham et al., 2006). Cependant ces modèles ne se sont pas installés durablement, pour des raisons éthiques ou de réplication virale détectée trop peu importante.

Le norovirus murin a longtemps servi d'alternative au norovirus humain pour permettre son étude, en tant que virus de substitution. Découvert en 2003, sa réplication a rapidement été démontré dans les cellules dendritiques et les macrophages des souris infectées (Wobus et al., 2004). Sa proximité morphologique et génomique avec le norovirus humain, sa capacité à infecter le tractus intestinal, sa transmission féco-orale et son excrétion dans les fèces ont permis de suggérer des mécanismes de réplication similaires entre les deux (Bhar and Jones, 2019). Malgré tout comme décrit **page 41**, des différences importantes existent entre les norovirus humains et murins au niveau du tropisme et de la nature de l'infection, qui peut être persistante en infectant des cellules Tuft qui agissent en tant que réservoir viral (Graziano et al., 2020; Wobus, 2018).

La capacité des norovirus murins à répliquer dans les glandes salivaires murines (**Figure 21 A**) a été démontrée très récemment sur un modèle cellulaire obtenu à partir de ces glandes appelé « salisphères » (Ghosh et al., 2022). Des modèles de ce type pourront être développés et utilisés de façon plus importante dans le futur.

Le poisson-zèbre (*Danio rerio*) a été utilisé ces dernières années pour la répllication de certaines souches de norovirus humains (Van Dycke et al. 2019). Cet organisme modèle présente de fortes similarités génétiques et physiologiques avec l'être humain, et a permis d'étudier la répllication d'autres virus comme influenza A ou herpès simplex I (Burgos et al., 2008; Gabor et al., 2014). Des micro-injections d'inoculum viraux dans le vitellus (yolk sur la **Figure 21 B**) des larves de poissons-zèbres âgées de 3 jours ont ainsi permis d'observer la répllication virale de souches GI.7, GII.2, GII.3 et GII.4 Sydney, mais également les effets sur la répllication de certaines molécules antivirales comme le 2'CMC (Van Dycke et al., 2021).



*Figure 21 : Deux modèles cellulaires d'étude de la répllication virale du norovirus. A) Culture ex vivo de glande salivaire sous-mandibulaire de souris et B) Anatomie d'une larve de poisson-zèbre de 6 jours. Knosp, Knox, et Hoffman 2012 et Dycke et al. 2019.*

#### **I.2.H.d. Détection génomique**

La détection du génome du norovirus humains dans des échantillons de diverses matrices est extrêmement importante pour réaliser un diagnostic ou identifier la source d'une épidémie. Ainsi, il peut être recherché dans des échantillons environnementaux, des aliments contaminés ou en diagnostic clinique...

Ces méthodes de biologie moléculaire, d'abord qualitative et permettant uniquement de discriminer entre la présence ou l'absence du virus recherché, ont par la suite évolué et permis également d'identifier un nombre de copies de génomes, renseignant sur l'ampleur de la contamination d'un

échantillon, ou du niveau d'amplification d'une souche virale dans un modèle de culture cellulaire au cours d'une période de temps.

Les différentes matrices requièrent des traitements préalables adaptés, par exemple pour supprimer la présence d'inhibiteurs des enzymes utilisées en biologie moléculaires, notamment dans les eaux usées ou les tissus de coquillages.

La méthode ISO 15216, méthode de référence pour la détection dans les aliments, recommande une lyse de la capsidie par un traitement chimique, à l'aide d'un agent dénaturant de type thiocyanate de guanidinium, qui va également lyser les cellules infectées et libérer leur contenu (Boom et al., 1990). D'autres méthodes reposent sur un traitement enzymatique et thermique, ou alors l'utilisation de billes qui vont lier les acides nucléiques (Gyawali et al., 2019). Les acides nucléiques obtenus sont ensuite détectés par des techniques d'amplification du génome de type PCR en temps réel (Polymerase Chain Reaction). Du fait de leur génome ARN, une étape préliminaire de transcription de l'ARN en ADN est nécessaire. Des cycles d'amplification vont ensuite avoir lieu, et la présence d'une sonde fluorescente lors de son hydrolyse son permet de suivre la synthèse des brins néo-formés. Ce suivi permet d'obtenir une information quantitative (sous la forme d'une valeur de Ct, pour Cycle Threshold ou cycle de seuil) lorsqu'il est associé à une courbe standard dont la concentration est connue (Loisy et al., 2005).

Enfin, l'utilisation de couples d'amorces spécifiques à chaque génogroupe permet de cibler des régions très conservées, entre l'ORF1 et ORF2 pour les norovirus par exemple (da Silva et al., 2007).

Il faut noter que les informations obtenues par cette technique ne permettent pas de renseigner sur le caractère infectieux des particules virales qui sont détectées dans l'échantillon analysé. Cette caractéristique peut être analysée grâce à des modèles de culture cellulaire, comme cités précédemment (Desdouits et al., 2022; Ettayebi et al., 2016). D'autres méthodes peuvent également explorer l'intégrité des capsides ou des génomes viraux grâce au suivi de la capacité des capsides à interagir avec des HBGA ou des anticorps, ou de l'utilisation d'agents intercalants qui vont se lier aux génomes accessibles provenant donc de capsides endommagées, empêchant leur amplification ultérieure par PCR (Leifels et al., 2020; Moore et al., 2017).

Comme abordé au cours de cette partie, les norovirus humains constituent les virus les plus fréquemment associés aux gastroentérites aiguës chez l'Homme, et les plus étudiés parmi les *Caliciviridae*. Un autre genre de cette famille, *Sapovirus*, peut infecter l'Homme mais est beaucoup moins étudié et connu malgré une importance épidémiologique qui apparaît comme croissante au fil des années. Ces virus possèdent des caractéristiques structurales et génomiques similaire à celles des *Norovirus*, mais les données concernant son tropisme ou sa dépendance aux HBGA sont à éclaircir.

## **I.3. Le genre *Sapovirus***

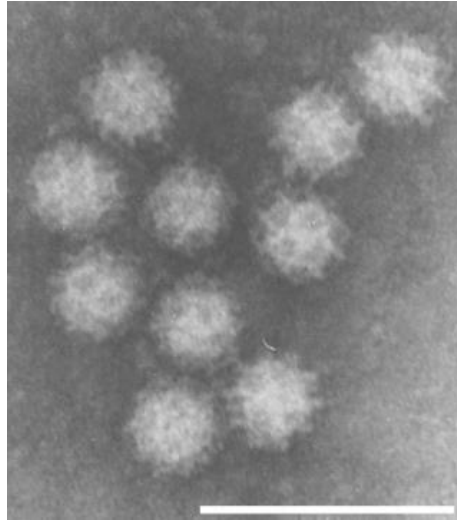
### **I.3.A. Généralités**

#### **I.3.A.a. Historique**

La première visualisation de particules virales de sapovirus fut réalisée en 1976, grâce aux techniques de microscopie électronique. Les virions avaient été observés dans des échantillons provenant d'épidémies sévissant parmi des nourrissons à Glasgow (Madeley and Cosgrove, 1976). Ces particules présentaient alors une morphologie similaire au FCV, mais leur nature restait inconnue. Des observations de particules virales similaires excrétées par des patients furent ensuite rapportées par des chercheurs présents dans divers pays à travers la planète, comme la Finlande, le Kenya et l'Australie, suggérant une circulation de ce virus à une échelle bien plus large (Chiba et al., 2000). Entre les années 1977 et 1979, dans la ville de Sapporo au Japon, des épidémies de gastroentérites touchant majoritairement des enfants au sein d'un orphelinat furent étudiées afin d'en identifier l'agent infectieux responsable sans résultat. Dans les années 80, une nouvelle analyse de ces échantillons analysés permirent de visualiser des particules virales et l'agent infectieux fut dénommé « sapporo agent » (**Figure 22**). La souche de l'épidémie de 1982 devint l'une des souches prototype des sapovirus (SV82), car elle fut étudiée de façon importante pour identifier les caractéristiques génomiques et structurale de ce nouveau virus (Nakanishi et al., 2011; Numata et al., 1997; Terashima et al., 1983).

Des études sérologiques démontrèrent que ce virus était responsable d'une partie des cas de gastroentérites virales à travers la planète, dans des proportions pouvant être parfois sous-estimées en raison de la prévalence majoritaire des norovirus et rotavirus, affectant principalement les enfants de moins de 5 ans (Nakata et al., 1988). Enfin, le premier séquençage complet du génome d'un sapovirus fut effectué à partir d'une souche obtenue à Manchester en 1995, et permit d'identifier des différences génomiques entre les sapovirus et les norovirus, malgré un tableau clinique similaire (Liu et al., 1995). Les sapovirus ont donc été identifiés à peu près à la même période que les norovirus, mais ces derniers ont été bien plus étudiés, probablement en raison de leur plus grande prévalence au sein de la population humaine et donc leur importance épidémiologique. Comme pour les norovirus, l'absence de modèle cellulaire a longtemps limité les possibilités de recherche, en contraignant son étude par le biais de virus de substitution dont une souche porcine adaptée à la culture cellulaire grâce à certaines mutations (Lu et al., 2016).

Cependant ces paradigmes semblent évoluer avec la mise au point récente de différentes techniques de culture *in vitro*, et l'augmentation de leur détection au sein des populations pour différentes raisons que nous présenterons.



*Figure 22 : Visualisation de sapovirus à l'aide de la microscopie électronique à transmission, la barre blanche indique 100nm. Image de Y. Yamashita, publiée par Oka et al. 2015.*

### **I.3.A.b. Symptômes**

La période d'incubation des sapovirus est en moyenne de 2 jours environ, mais l'apparition des premiers symptômes peut survenir entre 1 et 4 jours après contact avec le virus. Les symptômes sont une présentation classique d'une gastro-entérite virale. Ils sont généralement considérés plus légers que la pathologie causée par les rotavirus et norovirus, bien que les études récentes ne dénotent pas de différences particulières par rapport à ces autres pathogènes au niveau de la sévérité des symptômes diarrhéiques (Rouhani et al., 2022). Les symptômes durent entre 2 et 5 jours (Liu et al., 2016; Wu et al., 2008). Certaines présentations plus atypiques peuvent néanmoins entraîner des chocs septiques ou des distensions abdominales (Landa et al., 2022; Model and Burnweit, 2016). Les formes les plus sévères peuvent conduire à l'hospitalisation voire au décès, notamment dans le cas d'épidémies qui impliquent des patients à risque, comme les personnes âgées dans les maisons de retraite ou les nourrissons dans les pays avec un accès limité à l'eau potable (Lee et al., 2012).

Des formes chroniques sont décrites chez les patients immunodéprimés, pouvant durer plusieurs dizaines voire une centaine de jours (Rousset et al., 2018). Peu d'études sont disponibles sur les infections chroniques à sapovirus, sa prévalence parmi les patients souffrant d'immunodépression

médicamenteuse ou congénitale étant probablement sous-évaluée (Daniel-Wayman et al., 2018; Pietsch and Liebert, 2019).

Certaines personnes infectées par les sapovirus ne vont pas développer de symptômes, mais peuvent malgré tout excréter le virus et contribuer à l'apparition de nouveaux cas, comme pour les autres virus responsables de gastroentérites. Certaines personnes asymptomatiques peuvent ainsi présenter des titres viraux extrêmement importants et favoriser la transmission du virus à de nombreuses personnes grâce à la manipulation d'aliments par exemple (Yoshida et al., 2009).

### **I.3.A.c. Prévalence**

Une méta-analyse récente (106 articles provenant de 35 pays) étudiant la prévalence du sapovirus parmi des patients atteints de symptômes gastro-entériques estime qu'environ 3,4% des malades étaient atteints par ce pathogène (Valcarce et al., 2021). Certaines données incluses ayant plus de 20 ans, il est possible que la dynamique de circulation du sapovirus ait pu changer selon les pays en raison de divers facteurs : changements socio-démographiques, modifications météorologiques liées au changement climatique ou encore introduction de la vaccination contre le rotavirus dans de nombreux pays. L'étude MAL-ED de 2018 a suivi des enfants de la naissance à l'âge de 2 ans, et relevé la présence de pathogènes (viraux, parasitaires ou bactériens) dans leurs selles, qu'ils soient symptomatiques ou non. Les sapovirus étaient alors le troisième pathogène responsable de diarrhées chez les enfants de moins de 1 an, et en seconde position pour les enfants entre 1 et 2 ans (Platts-Mills et al., 2018).

Les sapovirus peuvent également représenter jusqu'à la deuxième cause virale de cette pathologie chez les enfants de moins de 5 ans dans certains pays comme les Etats-Unis d'Amérique, le Nicaragua, l'Espagne (**Figure 23**) ou au Cap-Vert, les trois premiers ayant un programme national de vaccination contre le rotavirus (Becker-Dreps et al., 2014; Colito et al., 2022; de Oliveira-Tozetto et al., 2021; Halasa et al., 2020).

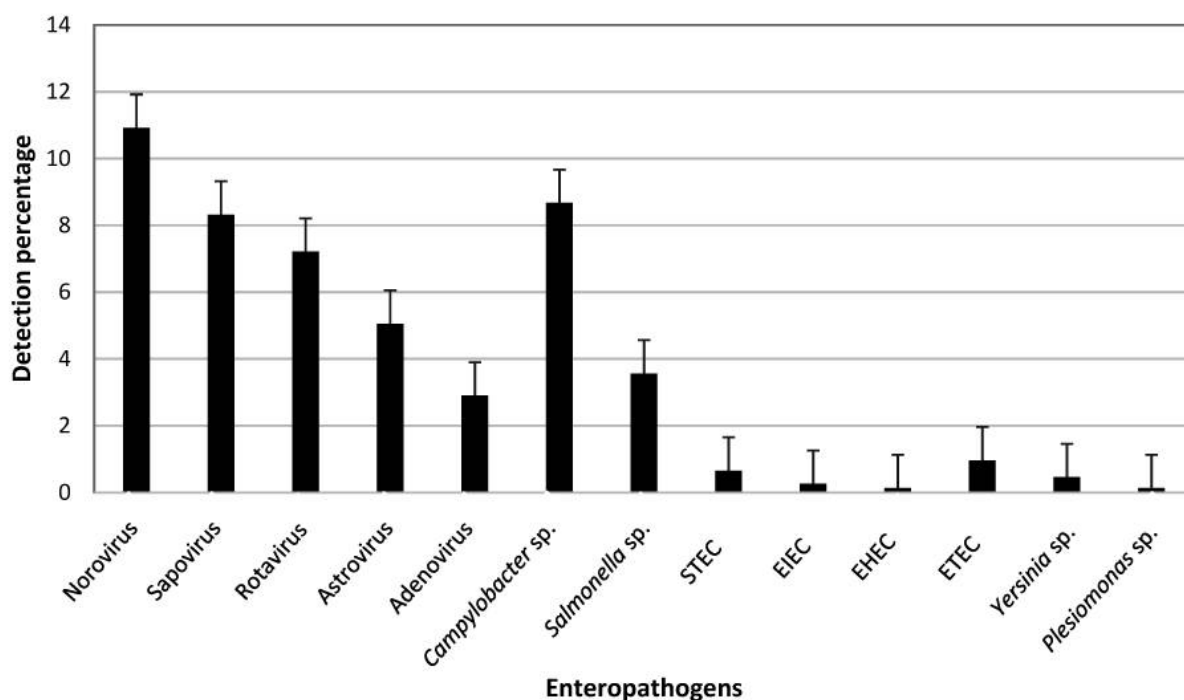


Figure 23 : Pourcentage de détection de divers pathogènes dans les selles provenant de patients atteints de gastroentérites obtenus entre 2018 et 2020 à Valence (Espagne). Les norovirus représentent 11% des cas, les sapovirus 8% puis les rotavirus 7%. Oliveira-Tozetto et al. 2021

Des progrès au niveau de la détection des sapovirus doivent également être menés, car certaines épidémies ont pu être ignorées, ou passer inaperçues en raison de l'échec de techniques de détection classique à identifier le sapovirus dans les échantillons. Une épidémie à sapovirus GV.2 concernant jusqu'à 650 cas n'a ainsi pu être identifiée qu'après visualisation des particules virales par microscopie électronique puis par séquençage complet des génomes des souches virales impliqués, les techniques classiques de RT-PCR n'ayant pas présenté de résultats positifs (Hergens et al., 2017). Cela laisse penser qu'une partie des cas de sapovirus reste sous-déclarée et que leur poids épidémiologique parmi les agents responsables de gastro-entérites aiguës est plus important (Becker-Dreps et al., 2020). La méta-analyse évoquée précédemment apporte également la même conclusion, en identifiant une différence significative de la prévalence observée du sapovirus parmi les cas de gastro-entérites virales selon la méthode utilisée (RT-PCR ou RT-qPCR) (Valcarce et al., 2021).

### I.3.B. Classification

Ces virus ont été initialement désignés sous l'appellation "Calicivirus humains" ou "Sapporo-like virus" en raison de l'origine géographique des particules virales étudiées durant la période de sa découverte. Au cours de l'année 2002, le Comité international de taxonomie des virus changea la

dénomination habituelle “Sapporo-like virus” en créant le genre *Sapovirus*, au sein de la famille des *Caliciviridae*, que nous avons décrit préalablement dans ce manuscrit (Mayo, 2002).

Les sapovirus sont répartis au sein de 19 génogroupes différents (**Tableau 2**), et présentent un large spectre d’hôte parmi les mammifères. Les souches appartenant aux génogroupes GI, GII, GIV et GV sont responsables des infections humaines, et distribuées au sein de 18 génotypes différents : GI.1-GI.7, GII.1-GII.8, GIV ne contient qu’un seul génotype, et GV en présentent deux capables d’infecter les humains (GV.1 et GV.2), les virus du génotype GV.3 infectent les porcs et GV.4 les otaries (Oka et al., 2016). La recherche de virus dans les fèces d’autres espèces animales a également permis d’identifier d’autres génogroupes viraux, parmi lesquelles les rats, chauve-souris, chiens ...

Hôte	Génogroupe
Homme	GI, GII, GIV, GV
Chien	GXIII
Porc	GIII, GV, GVI, GVII, GVIII, GIX, GX, GXI
Chauve-souris	GXIV, GXVIII, GXIX
Vison	GXII
Chimpanzé	GI
Otarie	GV
Rat	GII, GXV

*Tableau 2 : Tableau récapitulatif des différents génogroupes de sapovirus existants ainsi que leurs hôtes respectifs. Makhaola, Moyo, et Kebaabetswe 2020.*

L’ICTV a proposé que cette classification s’effectue à partir du séquençage complet du gène codant pour la capsid virale VP1, très probablement porteuse de l’antigénicité des différentes souches (Hansman et al., 2005; Oka et al., 2012).



### I.3.C. Caractéristiques moléculaires

#### I.3.C.a. Caractéristiques génomiques

A la différence des norovirus, l'ORF1 englobe à la fois la polyprotéine qui sera clivée par la suite pour donner les différentes protéines non-structurales, mais également la protéine de structure majeure VP1. L'ORF2 encode donc seulement la protéine mineure de structure VP2. Une troisième ORF a été suggérée par le passé pour certaines souches de sapovirus, dont des sapovirus infectant des chauve-souris (Numata et al., 1997; Tse et al., 2012). Ce troisième cadre de lecture chevaucherait l'ORF1, mais son existence n'est toujours pas démontrée, et une telle caractéristique n'est pas retrouvée ni pour tous les génogroupes de sapovirus, ni au sein d'autres genres appartenant aux *Caliciviridae*. Enfin, la séquence protéique codée par cette ORF hypothétique ne correspond à aucune protéine existante dans les bases de données.

Globalement, les sapovirus partagent quelques caractéristiques génomiques communes : une séquence GTG avec une courte région non traduite (UTR) de 9 à 14 nucléotides en 5' du génome, et une UTR de 78 à 112 nucléotides en 3'. Certains génogroupes, dont ceux infectant l'Homme, présentent également des motifs d'acides aminés conservés au niveau de la séquence protéique de NS1 et du site de clivage entre NS7 (RdRp) et VP1 (Oka et al., 2018, 2016).

#### I.3.C.b. Caractéristiques structurales

Tout comme les protéines VP1 des norovirus, les protéines majeures de capsid VP1 (d'environ 60 kDa) des sapovirus s'auto-assemblent en VLP lorsque le gène associé est exprimé dans des cellules animales ou d'insectes (Oka et al., 2009b). Ces particules présentent une morphologie et une antigénicité identique à des particules virales infectieuses et sont utilisées dans de nombreuses expérimentations pour étudier les caractéristiques des virions (Jiang et al., 1999).

Les études structurales sont relativement rares, mais, par exemple, la capsid d'un sapovirus GI.6 se compose de 180 copies de VP1, assemblées en 90 dimères avec un symétrie icosaédrique T=3 (Miyazaki et al., 2022). VP1 peut également être divisée en sous-domaine S et P comme dépeint sur la **figure 24**. Le sous-domaine P2 présente 4 régions appelées hypervariables, les domaines S et P1 semblent présenter des séquences beaucoup plus conservées entre deux souches différentes de sapovirus (Miyazaki et al., 2022; Okada et al., 2006). Enfin, le domaine P est vraisemblablement porteur des acides aminés impliqués dans la liaison des particules virales à ses récepteurs lors de l'infection, bien que ceux-ci ne soient pas encore identifiés pour les souches humaines.

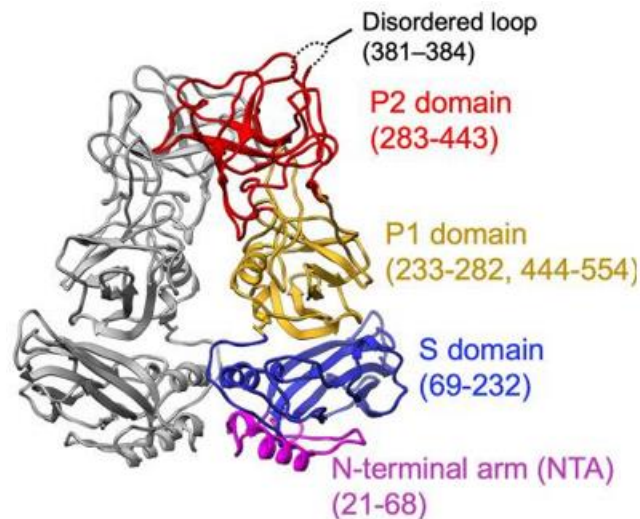


Figure 24 : Représentation schématique d'un dimère de VP1 de sapovirus GI.6, avec les différents domaines (N, S et P) et sous-domaines (P1 et P2). Les nombres entre parenthèses indiquent la numérotation des acides aminés impliqués dans chaque domaine. Miyazaki et al. 2022

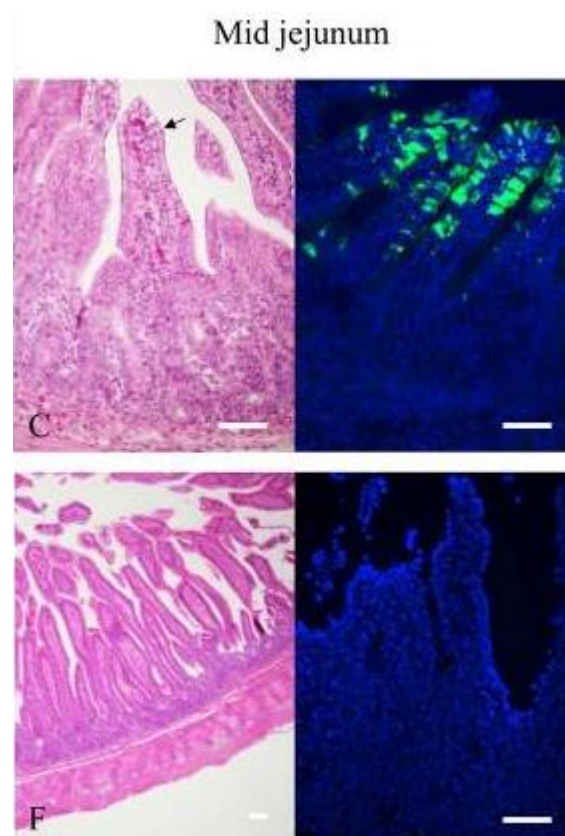
La protéine mineure de structure VP2 d'environ 17kDa est présente en faible quantité dans les virions avec une dizaine de copies par virions. En effet, cette protéine mineure de structure n'a été identifiée de façon formelle que récemment dans des virions d'une souche humaine GII.3 obtenus grâce à des techniques de génétique inverse (T.-C. Li et al. 2022). Sa synthèse a également pu être mise en évidence pour la souche porcine adaptée à la culture, également grâce à un système de génétique inverse (Chang et al., 2005). Malgré tout, les connaissances au sujet de ses fonctions et de son rôle dans le cycle ou la structure virale restent extrêmement limitées.

## I.2.D. Réplication virale

### I.2.D.a. Tropisme du sapovirus

Le tropisme des sapovirus humains est encore très peu connu, car l'absence de modèle de culture cellulaire des souches humaines jusqu'en fin 2020 a conduit la recherche sur ce sujet à s'intéresser à des souches animales afin d'en tirer des informations, qui ne sont pas toujours transposables aux souches humaines. Des porcs infectés par une souche GIII ont montré des changements histologiques au niveau des tissus du duodénum et du jéjunum : les villosités de ces tissus sont alors raccourcies de façon très importante. De plus, la proportion de cellules positives à la détection d'antigènes viraux dans ces deux portions de l'intestin peut atteindre 15% (**Figure 25**) (Guo et al., 2001; Lu et al., 2016).

La nature des symptômes causés par l'infection chez l'Homme laisse également penser que le tropisme est essentiellement intestinal. En revanche, la nature même des cellules infectées reste inconnue ainsi que les récepteurs associés. Des travaux *in vitro* ont déterminé que cette souche porcine requiert la présence d'acides biliaires pour se répliquer, ce qui renforce l'idée d'un tropisme essentiellement intestinal bien que la lignée cellulaire utilisée soit d'origine rénale (Shivanna, Kim, et Chang 2014). De plus, d'autres organes pourraient être sensibles à la réplication virale, car des échantillons provenant d'hyènes démontrent une présence d'ARN virale dans la rate, le foie ou les ganglions lymphatiques (Olarde-Castillo et al., 2016).



*Figure 25 : Observation de coupes histologiques de duodénum de porcs infectés par la souche de sapovirus Cowden sauvage (en haut) et la souche adaptée à la culture cellulaire (en bas). Les images à gauche permettent d'observer les modifications au niveau des cryptes et des villosités intestinales, tandis que les images à droite détectent la présence de VP1 dans les cellules par immunofluorescence. Lu et al. 2016.*

### **I.2.D.b. Excrétion virale**

Tout comme les norovirus, des virions de sapovirus sont excrétés dans les selles des patients. Le titre viral peut atteindre  $10^{11}$  copies de génome par gramme de selle mais est en moyenne proche de  $10^5$

copies par gramme (Varela et al., 2019). Ce titre diminue rapidement avec la disparition des symptômes, mais la durée d'excrétion est souvent d'environ deux semaines, voire le double chez certains patients (Iwakiri et al., 2009).

De plus, il n'y a pas de différence au niveau de la durée d'excrétion virale entre les patients symptomatiques et asymptomatiques, ni en fonction du génogroupe de la souche impliquée (Sánchez et al., 2018). Cette excrétion est prolongée chez les patients présentant des formes chroniques, causées par un déficit immunitaire empêchant de contrôler l'infection, et entraîne l'excrétion de virions présentant une accumulation de mutations au fur et à mesure du temps. Il pourrait alors s'agir d'une potentielle source de nouveaux variants, responsables de futures nouvelles épidémies (Pietsch and Liebert, 2019).

## **I.2.E. Epidémiologie**

### **I.2.E.a. Voies de transmission**

Les sapovirus se transmettent, comme les norovirus, par voie féco-orale, ou par contact avec des surfaces contaminées. Les structures d'accueil pour enfants telles que les crèches peuvent favoriser la circulation du virus tout au long de l'année, car une proportion importante d'enfants excrète du sapovirus en étant symptomatique ou non. On peut retrouver ainsi jusqu'à 21% d'enfants (âge médian de 2 an et demi) chez lesquels le sapovirus sera détecté au sein d'une garderie (Jensen et al., 2019). La survenue d'épidémies dans des milieux tels que les maisons de retraite ou les hôpitaux est également un phénomène observé, favorisé par la nature de ces environnements semi-fermés (Hugo Johansson et al., 2005; Pang et al., 2009; Wu et al., 2008).

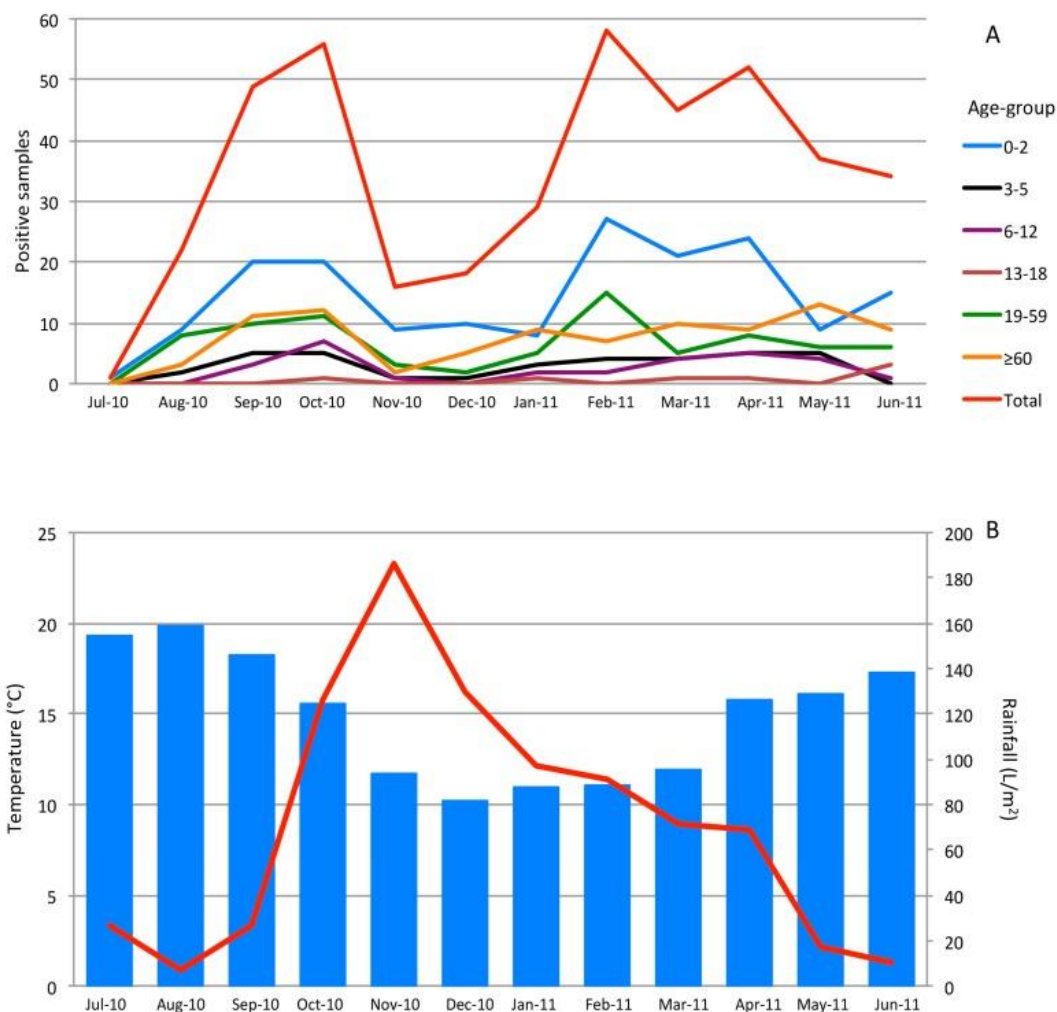
Les épidémies liées à la consommation de nourriture contaminée sont également possibles, et peuvent parfois entraîner un nombre important de cas. Un évènement ayant entraîné des symptômes chez 655 personnes ayant toutes consommé de la nourriture préparée par des employés infectés a ainsi pu être recensée (Kobayashi et al., 2012). D'autres épidémies liées à des cuisiniers asymptomatiques ont été relevées, preuve de leur rôle important dans ce type de transmission virale (Usuku et al., 2008; Yoshida et al., 2009). Enfin, la consommation d'huîtres contaminées peut également être à l'origine de cas humains (Iizuka et al., 2010; Nakagawa-Okamoto et al., 2009).

De façon plus anecdotique, les infections peuvent également être médiées par l'eau, en raison d'une contamination du réseau d'eau potable par des rejets d'eaux usées non traitées (Kauppinen et al., 2019).

### I.2.E.b. Saisonnalité

La saisonnalité des sapovirus est moins évidente que pour les norovirus. Elle semble malgré tout en être relativement proche, avec une corrélation probable entre les pics épidémiques et des paramètres météorologiques tels que la baisse des températures ou de fortes précipitations.

Certaines études identifient une recrudescence des cas positifs aux sapovirus durant les mois les plus froids de l'année, comme en Allemagne ou en Espagne, bien que certaines exceptions apparaissent. Sur la période 2010-2011 en Espagne, le nombre de cas était en effet au plus bas au cours de l'hiver, malgré des précipitations importantes (**Figure 26**). La majorité des infections avaient alors lieu à la fin de l'hiver et de l'automne ainsi que durant le printemps (Varela et al., 2019). Ce schéma n'a pas été retrouvé durant la période 2018-2020 où l'immense majorité des cas identifiés étaient entre octobre et décembre, avec un léger pic également observable durant les mois de Juillet (de Oliveira-Tozetto et al., 2021). Une étude rétrospective japonaise n'identifie quant à elle une incidence hivernale plus élevée des cas sporadiques de sapovirus qu'au cours de six années sur seize, aucun aspect saisonnier particulier n'émergeant des données collectées sur les dix autres années (Sakagami et al., 2020).



*Figure 26 : A) Nombre de prélèvements de selles positives aux sapovirus (avec l'âge des donneurs) en fonction du mois et B) moyenne des températures et des précipitations relevées sur la période 2010-2011 dans la région de La Coruña, Espagne. Varela et al. 2019*

Les sapovirus restent souvent associés aux périodes de l'année sujettes à une baisse des températures et/ou à une augmentation de la pluviométrie, malgré certaines différences selon les années et les pays étudiés (Lasure and Gopalkrishna, 2017; Nakata et al., 1998; Sakagami et al., 2020; Varela et al., 2019). De plus amples études sur le sujet permettraient d'affiner la compréhension de ces phénomènes et des mécanismes à l'origine des exceptions observées.

### **I.2.E.c. Epidémiologie moléculaire**

Depuis la fin de la décennie 2000-2010, des publications ont documenté une augmentation des cas de sapovirus, décrits comme quasiment pas ou peu détectés auparavant (Harada et al., 2009; Pankovics et al., 2009; Svraka et al., 2010). Plus précisément, une grande partie des cas sont liés au génotype GI.2, et ce dans des pays géographiquement éloignés avec des similarités de séquence assez importantes. Des données du Japon ou des Etats-Unis font en revanche état d'une sur-représentation du génogroupe GIV sur la période 2002-2009, en supposant une prévalence préalable faible et donc d'une immunité de groupe moins importante face à ces souches (Harada et al., 2009; Lee et al., 2012). Au vu des données collectées plus récemment, ces phénomènes décrits par le passé ne sont plus tout à fait d'actualité et ne reflétaient probablement qu'une partie de la situation épidémiologique globale. Tout d'abord l'amélioration des différentes techniques de détection et de séquençage ont permis d'améliorer la sensibilité de détection ainsi que le génotypage des souches identifiées (Oka et al., 2006). De plus, les données précédentes des années 1980 rapportaient des taux de séroprévalence extrêmement élevé (entre 70 et 94% de positivité) dans la population adulte à des localisations géographiques variées (Japon, Kenya, Etats-Unis d'Amérique ...), preuve que les sapovirus circulaient déjà de façon importante auparavant (Nakata et al., 1998, 1988, 1985).

L'immense majorité des souches circulants ces dernières années appartiennent aux deux premiers génogroupes, et plus précisément aux génotypes GI.1 et GI.2 d'une part, GII.1 et GII.2 de l'autre comme en témoignent les études disponibles représentées sur la **figure 27** dans divers pays européens, nord-américains et asiatiques (de Oliveira-Tozetto et al., 2021; Oka et al., 2015; Varela et al., 2019; Zhuo et al., 2021, 2021). Les autres génogroupes sont plus rarement détectés mais peuvent malgré tout être à l'origine d'épidémies, notamment pour les souches GIV.1 qui peuvent être le troisième génotype le plus détecté chez des enfants hospitalisés (de Moraes et al., 2021).



Les sapovirus sont fréquemment retrouvés en association avec d'autres pathogènes. Ces co-infections peuvent avoir contribué à sous-estimer la circulation de ce virus lorsqu'un autre pathogène était identifié préalablement, limitant la recherche d'autres virus dans l'échantillon (Sakagami et al., 2020). Il s'agit alors majoritairement des norovirus, des rotavirus mais également des souches entéropathogènes d'E. coli (de Oliveira-Tozetto et al., 2021; Rouhani et al., 2022). Bien que la sévérité des symptômes ne semble pas être différente lors des co-infections avec norovirus et rotavirus, l'association de ces divers pathogènes et l'effet de ces interactions avec le sapovirus restent encore à étudier (Mikounou Louya et al., 2019).

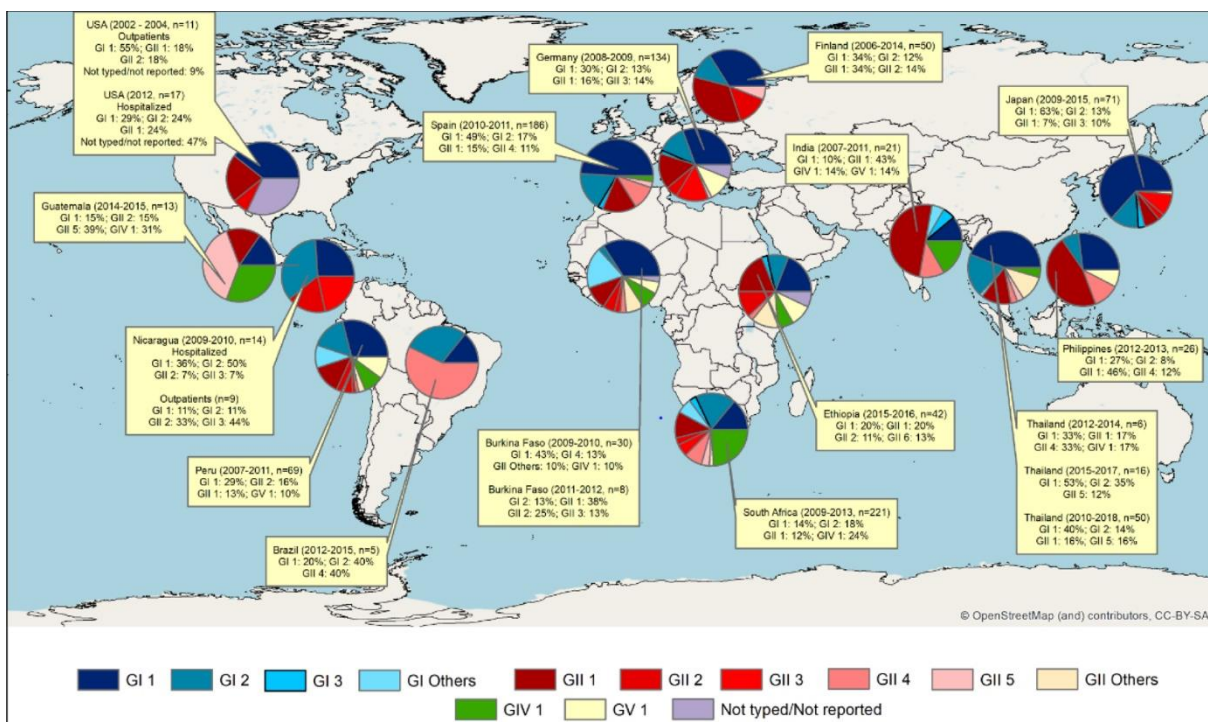


Figure 27 : Distribution des génotypes de sapovirus identifiés au cours de 38 études de surveillance incluant chacune plus de 300 patients à travers la planète entre 2014 et 2020. On note la surreprésentation des couleurs bleu foncé (GI.1), bleu-gris (GI.2) et rouge foncé (GII.2).  
Becker-Dreps et al. 2021

### I.2.E.d. Diversité et recombinaison

#### - Le cas particulier des sapovirus GI.2

Les souches GI.2 identifiées à la fin des années 2010 sont suspectées d'être à l'origine de la majorité des cas dans différents pays, alors qu'elles n'étaient relativement pas détectées auparavant. Ce génotype serait devenu subitement prédominant en raison d'une potentielle dynamique évolutive

particulière, comparable à celle des variants successifs du norovirus GII.4 (Pankovics et al., 2009; Svračka et al., 2010).

Une analyse rétrospective à partir des séquences complètes de souches obtenues sur une période de 40 ans a permis d'analyser les phénomènes de diversification intra-génotypique au sein des génogroupes GI, GII et GIV. Il en ressort que les protéines VP1 des souches des génotypes GI.2 et GIV.2 diffèrent d'environ 40 acides aminés sur une période de 40 ans, tandis que les VP1 des souches GI.1 ne présentent qu'entre 15 et 20 acides aminés différents, et environ une dizaine pour GII.2 (Tohma et al., 2020). Bien que les sapovirus GI.2 et GIV.1 semblent accumuler légèrement plus de mutations que les autres souches au niveau de la protéine majeure de capsid, cette différence reste insuffisante pour voir l'apparition successive de variants majoritaires responsables d'épidémies, voire de pandémies. En comparaison, les VP1 de souches de norovirus GII.4 entre 2012 et 2016 présentent une proportion de 60% (36/60) de substitutions en acides aminés au niveau de la région P2 (Petronella et al., 2018). La région N-terminale de VP1 des sapovirus est le siège d'une forte variabilité en plus du sous-domaine P2 comme cela est visible sur la **figure 28** (Iwakiri et al., 2009), alors que la majorité des modifications intervariants des norovirus GII.4 concernent le sous-domaine P2 (Tohma et al., 2020).

L'attribution d'une dynamique évolutive similaire aux variants de norovirus GII.4 pour les souches de sapovirus GI.2 reste donc difficilement en accord avec la réalité, car la diversification intra-génotypique des sapovirus au cours du temps reste relativement limitée par rapport à ce qui est observé pour les norovirus, et les données épidémiologiques ne font pas remonter l'apparition de variants particulièrement prédominants depuis cette période. Au contraire, les virus du génotype GI.1 sont responsables d'un nombre d'infections plus élevé par rapport au GI.2 (de Oliveira-Tozetto et al., 2021; Okitsu et al., 2021; Zhuo et al., 2021).



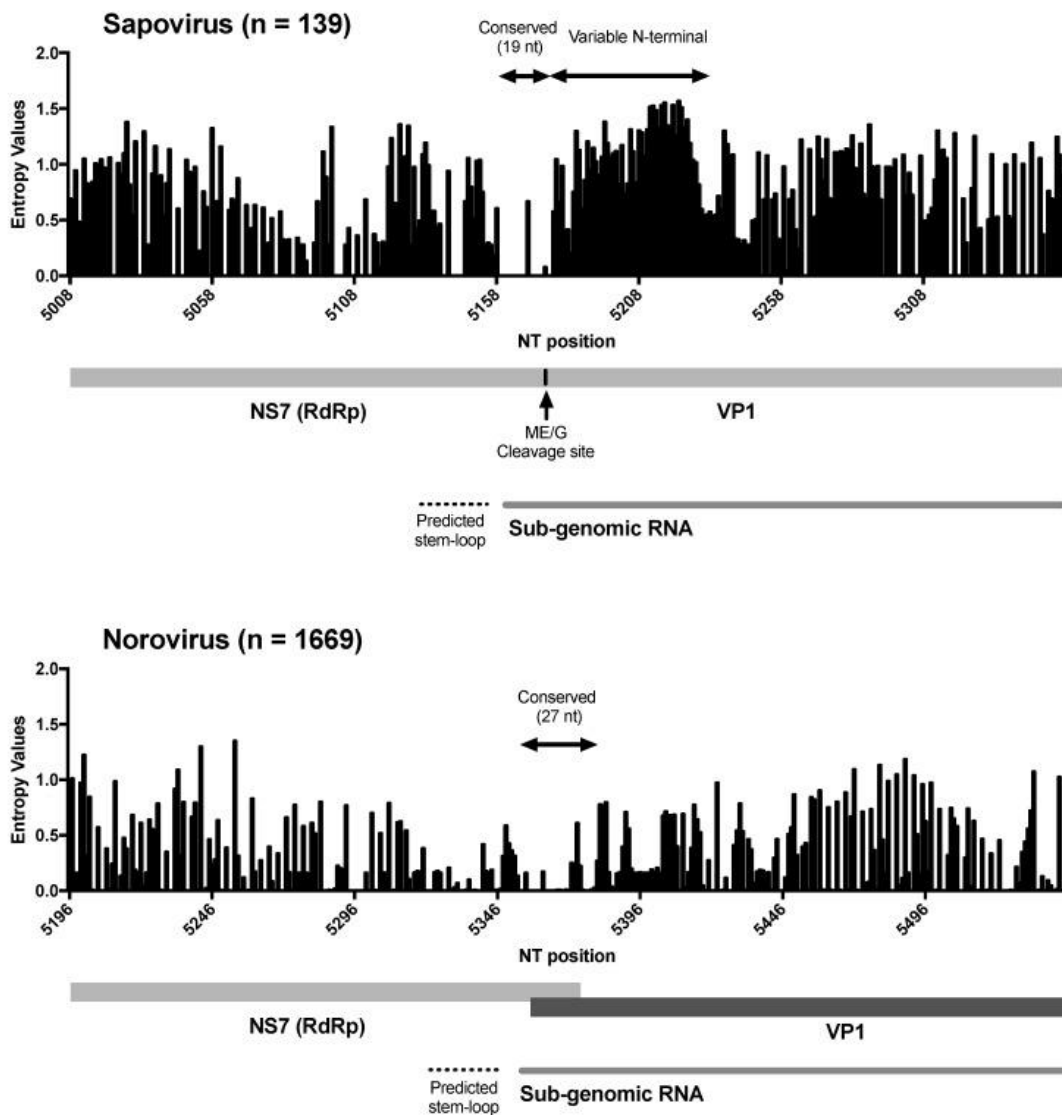
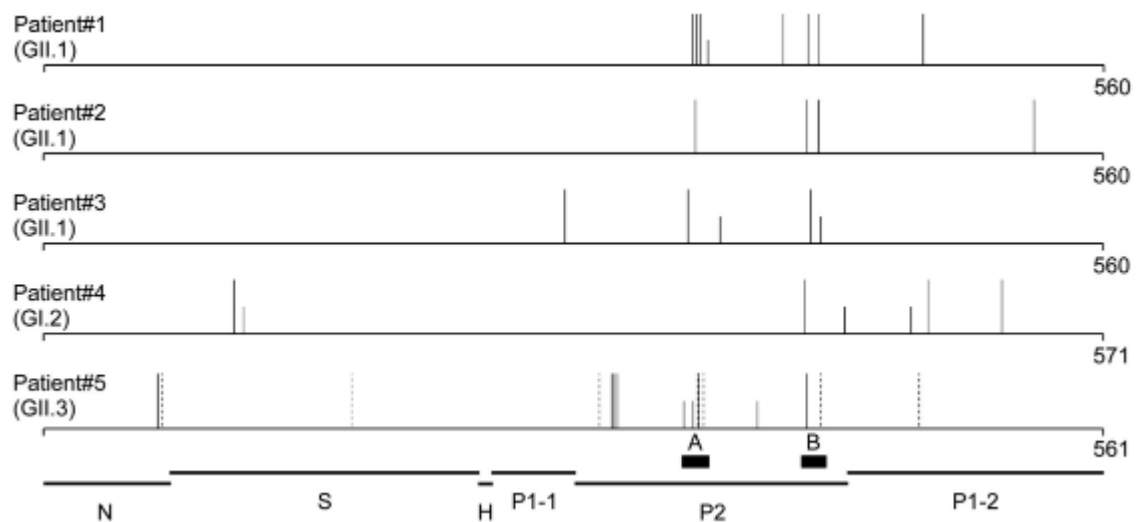


Figure 28 : Quantification de la conservation des nucléotides au niveau de la jonction du génome codant pour l'ARN polymérase ARN-dépendante (RdRp) et VP1 chez les sapovirus (n=139 séquences) et les norovirus (n=1669) grâce aux valeurs d'entropie de Shannon. Le manque de conservation de la région N-terminale codant pour VP1 des sapovirus est mise en avant, alors qu'elle est conservée chez les norovirus. Tohma et al. 2020.

- **Pression de sélection :**

De rares études sur quelques personnes immunodéprimées infectées de manière chronique ont permis d'observer les mutations intra-hôte sur des périodes de temps prolongées (Donaldson et al., 2010). Les changements d'acides aminés semblent alors s'accumuler de manière préférentielle dans des zones appelées « hotspot » A et B du sous-domaine P2 de VP1 (**Figure 29**), mais des études

supplémentaires sur le sujet sont nécessaires pour confirmer ces résultats, car le nombre de patients et de souches étudiées restent encore très limités.



*Figure 29 : Position des substitutions d'acides aminés de la protéine virale VP1 accumulés par les souches infectant 5 patients de façon chronique. Les changements annotés ont été identifiés en comparant la souche séquencée initialement avec les séquences obtenues au cours du suivi. Les changements et leurs positions sont indiqués par un trait vertical, un trait plus court indique une mutation qui ne s'est pas maintenue au cours du temps. Deux zones de mutations privilégiées (supposées) sont indiquées par les régions A et B. Pietsch and Liebert, 2019.*

Ces changements de séquence protéique virale peuvent également être observés chez les patients au statut immunitaire fonctionnel présentant une excrétion virale prolongée, pouvant atteindre 25 à 28 jours. Le nombre de changements de nucléotides dans les génomes viraux est plus limité, mais certaines mutations affectent également VP1 (Iwakiri et al., 2009). Ces mécanismes pourraient donc participer à la diversification génétique virale et nécessitent davantage d'études sur le sujet.

#### - **Recombinaison :**

Les sapovirus sont moins sujets aux phénomènes de recombinaison entre deux souches, du fait de la présence des gènes codants pour la protéine VP1 et pour l'ARN polymérase ARN-dépendante sur le même cadre de lecture. La jonction entre les deux cadres de lecture est peu conservée, ce qui limite l'apparition de recombinants par échange de matrice entre les ARN génomiques de deux souches différentes (Tohma et al., 2020). Des cas de recombinaisons intra-génotypiques ont été décrit de manière récente, au niveau de la jonction entre le gène NS7 et celui codant pour VP1, entre des

souches GII.1 et GII.4 (Diez-Valcarce et al., 2018; Kumthip et al., 2020; Lasure and Gopalkrishna, 2017). L'accumulation préférentielle de mutations au niveau de la séquence codante pour VP1 par rapport à celle codant pour la polymérase virale a également pu mener certaines études plus anciennes à considérer certaines souches comme issues de recombinaisons, alors que les souches parentales n'étaient jamais identifiées (Tohma et al., 2020). La nécessité de répertorier un nombre plus important de séquences codantes dans les banques de données, notamment de la polymérase virale est également cruciale pour établir une classification solide et éviter les confusions, car le manque de données disponible a pu conduire par le passé à considérer de manière erronée certaines souches comme provenant d'une recombinaison (Oka et al., 2015).

## **I.2.F. Interactions hôte-virus**

### **I.2.F.a. Récepteurs du sapovirus**

Les récepteurs d'attachement et/ou d'entrée des sapovirus humains sont encore inconnus, mais il a été démontré que les sapovirus porcins se lient aux acides sialiques liés en  $\alpha$ 2,3 et  $\alpha$ 2,6 portés par des glycoprotéines O-glycosylées (Kim et al., 2014). Il s'agit alors de la seule donnée disponible, et cela démontre l'importance de disposer de modèles de culture cellulaire pour élucider cette question, qui n'a pas encore été explorée avec le nouveau modèle récemment mis au point (Takagi et al., 2020). Des expérimentations étudiant les interactions entre ces molécules présentes chez l'Homme et des VLP de sapovirus permettraient d'approfondir cette question et d'identifier leur potentielle implication, comme cela a pu être réalisé avec des VLP de norovirus et des HBGA synthétiques.

### **I.2.F.b. Sapovirus et HBGA**

A la différence des norovirus humains, il n'existe à priori pas de lien entre le phénotype d'expression intestinale des antigènes de groupes sanguins, ou le statut de sécréteur, et la probabilité d'être infecté de façon symptomatique ou non par les sapovirus. Cette hypothèse est soutenue par quelques études épidémiologiques sur des cohortes de patients pour lesquels ces deux paramètres sont connus, mais gagnerait à être renforcée par d'autres études similaires pour parvenir à un consensus total sur le sujet, pour trois raisons :

- Le nombre de cas positifs aux sapovirus varie entre 9 et 52 selon les études, et bien qu'aucune ne relève de différences statistiquement significatives entre les différents groupes

étudiés, il est possible que cela soit dû au nombre limité de cas étudiés (Bucardo et al., 2012; Olivares et al., 2021; Rossouw et al., 2021; Vielot et al., 2022).

- La grande diversité des profils génétiques et phénotypiques des HBGA selon l'ethnicité des patients (Nordgren and Svensson, 2019). Les populations méso-américaines sont connues pour présenter des taux plus importants d'individus sécréteur-positifs, et les deux études menées au Nicaragua rapportent seulement 4 et 2 individus non-sécréteurs infectés par le sapovirus. Des études auprès de populations présentant des proportions différentes d'individus non-sécréteurs et sécréteurs apporteraient de nouvelles informations.
- Enfin, l'une de ces quatre études étudiant la sensibilité génétique à l'infection aux sapovirus ne retrouve pas la corrélation classiquement observée entre le phénotype non-sécréteur des individus et une certaine protection contre l'infection par norovirus, dont les souches ne sont pas précisées (Olivares et al., 2021). De potentielles différences en termes d'affinité entre les souches de sapovirus avec les différents phénotypes devraient également être écartées, ce qui requiert un génotypage des souches identifiées et qui n'a été effectué que dans deux des quatre études mentionnées.

La seule étude sur le sujet ayant utilisé des VLP de sapovirus des génogroupes GI et GV n'a démontré aucune activité de liaison aux HBGA utilisés, qu'ils soient issus de salives d'individus sécréteurs ou non-sécréteurs mais également synthétiques (Shirato-Horikoshi et al., 2007). Ainsi, les données disponibles convergent vers une absence d'interaction entre sapovirus et HBGA, mais d'autres études sont nécessaires pour s'en assurer.

## **I.2.G. Immunité**

### **I.2.G.a. Sensibilité selon l'âge**

La majorité des infections par sapovirus se produirait entre l'âge de 6 mois et 2 ans, lorsque l'immunité maternelle décline (Magwalivha et al., 2021; Page et al., 2016; Varela et al., 2019). Il a été suggéré que les personnes âgées seraient plus susceptibles de développer la pathologie, probablement en raison d'une immunité spécifique qui s'est progressivement amoindrie avec l'âge. Une distribution des cas en fonction de l'âge peut alors être observée avec une forme particulière « en U », comme sur la **figure 30** et **31** (Pang et al., 2009; Svraka et al., 2010; Varela et al., 2019).

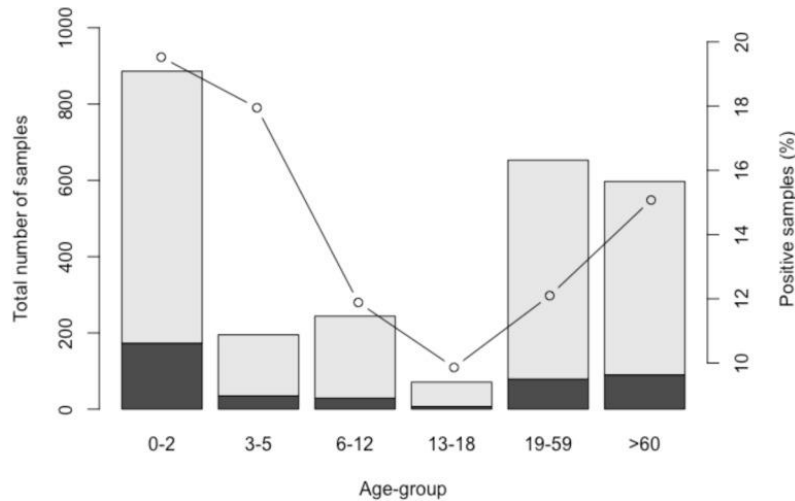


Figure 30 : Distribution des échantillons de selles positifs (gris foncé, n= 417) et négatifs (gris clair, n=2250) à la détection en sapovirus en fonction de l'âge des personnes suivies en Espagne sur la période 2010-2011. Varela et al. 2019

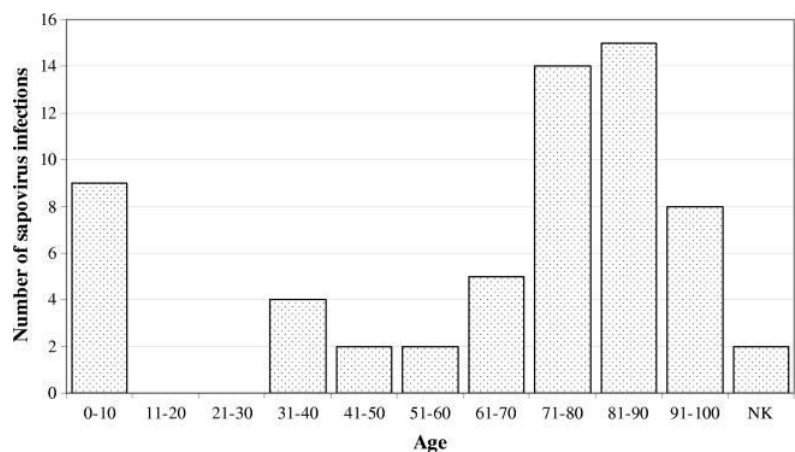
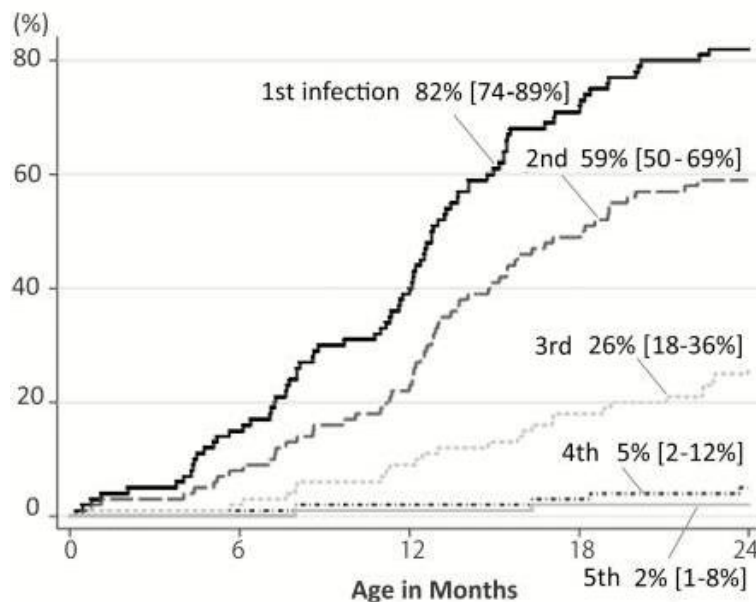


Figure 31 : Distribution des échantillons de selles positifs en sapovirus (n=61) en fonction de l'âge des personnes suivies en Hollande sur la période 2007-2009. Svraka et al. 2010

### I.2.G.b. Réinfections et protection

La réponse immunitaire face à l'infection est également très peu connue, mais il semble y avoir le développement d'une possible protection contre des souches antigéniquement similaires à celle responsable d'une infection antérieure (Becker-Dreps et al., 2020). Les réinfections par des souches de même génotype sont à priori peu fréquentes, et on observe plutôt des infections successives par des souches appartenant à des génotypes voire des génogroupes différents (Harada et al., 2012; Liu et al., 2016; Sánchez et al., 2018; Zhuo et al., 2021). Ces hypothèses sont à consolider par d'autres travaux, car les données disponibles ne concernent qu'un faible nombre de patients, et peuvent

présenter des biais comme les cas de co-infection qui ne sont pas si anecdotiques. L'une de ces études portant sur une cohorte de nouveau-nés au Pérou met en lumière le fait que ces réinfections par des souches différentes sont courantes : sur 89 enfants présentant une infection au sapovirus entre leur naissance et l'âge de 2 ans, 59 (66%) ont été réinfectés (entre 2 et 6 fois pour certains, visible sur la **figure 32**). Seuls 3 enfants ont été réinfectés par une souche de même génotype (GI.1) (Sánchez et al., 2018).



*Figure 32 : Incidence cumulative des infections à sapovirus au sein d'une cohorte de 100 enfants en fonction de leur âge (entre la naissance et 2 ans). 23 enfants n'ont été infecté qu'une fois, 59 ont présenté des réinfections (entre 2 et 6). Sánchez et al. 2018.*

Une analyse rétrospective des résultats obtenus par l'étude MAL-ED démontre qu'une infection à sapovirus ne confère qu'une protection modeste vis-à-vis de potentielles réinfections futures au cours des deux premières années de la vie d'un nourrisson (Rogawski McQuade et al., 2020).

Une primo-infection à sapovirus ne diminuerait que de 15% la probabilité d'être réinfecté, et 2 infections ou plus amènerait cette valeur à 31% par rapport aux enfants qui n'ont jamais été infectés par le sapovirus (Rouhani et al., 2022). Ces résultats semblent indiquer une diversité antigénique très importante des sapovirus, qui ne permet pas de conférer une protection croisée inter-génotypique. Malheureusement l'étude en question ne dispose pas des données de typage des sapovirus impliqués dans les infections et les réinfections des enfants suivis. Il est important que ces données soient acquises pour permettre d'établir certains corrélats de protection face à ces virus.

L'utilisation d'anticorps dirigés contre des VLP de différentes souches a permis de révéler les importantes différences antigéniques qui existent entre les génogroupes, mais également au sein des génotypes (Hansman et al., 2007; Oka et al., 2009a). Certains anticorps monoclonaux capables d'interagir avec des VLP de souches appartenant aux quatre génogroupes différents ont pu être mis en évidence grâce à des tests ELISA, ce qui pourrait être encourageant dans le développement d'outils antiviraux spécifiques au sapovirus (Kitamoto et al., 2012).

## **I.2.H. Modèles d'étude cellulaire**

### **I.2.H.a. Historique**

Dès les premières fois où ce virus a été isolé, les chercheurs ont tenté de le multiplier sur diverses lignées cellulaires sans résultats probants. Une étude évoque un effet cytopathique sur des cellules rénales de singe vert au bout d'un passage, et une confirmation visuelle par observation de virions en microscopie électronique après deux passages (Kjeldsberg, 1977). Une seconde étude affirme avoir réalisé des passages successifs de sapovirus sur des cellules embryonnaires rénales humaines (HEK) lorsque de la trypsine (10µg/mL) était ajoutée au milieu de culture (Cubitt and Barrett, 1984). Ces deux tentatives abouties de culture n'ont jamais été reproduites par d'autres équipes par la suite, que ce soit avec les deux lignées cellulaires présentées, ou avec d'autres : des cellules fœtales de chat, des cellules embryonnaires de poumons humaines (MRC-5, HEL-R66), la lignée Hep-2 (provenant d'un cancer du larynx mais contaminée par la lignée HeLa), HeLa ... Enfin, des souriceaux ont également été infectés à partir d'inoculum viraux et suivis pour évaluer si ils développaient des signes cliniques de l'infection, sans résultats (Cubitt et al., 1979; Madeley and Cosgrove, 1976; Spratt et al., 1978). Les efforts consacrés à la culture de souches humaines se sont alors heurtés à de nombreux échecs, et la mise en évidence de la réplication d'une souche porcine adaptée à la culture cellulaire en 1988 a conduit les chercheurs à utiliser ce virus de substitution comme modèle des souches humaines (Flynn and Saif, 1988).

### **I.2.H.b. La souche porcine Cowden**

La souche porcine Cowden (GIII) a été adaptée à la culture cellulaire grâce à des passages successifs sur la lignée cellulaire LLC-PK (cellules rénales porcines). La réplication virale n'était observée que lorsqu'une substance supplémentaire était ajoutée au milieu de culture : du contenu intestinal de porc non-infecté (Flynn and Saif, 1988). Cela permettait alors de compléter le milieu de culture en

acides biliaires, dont le virus est dépendant pour établir une infection, ce qui n'a été compris que plus tard (Chang et al., 2004; Flynn and Saif, 1988).

Ces acides biliaires jouent un rôle essentiel dans les étapes précoces de l'infection, car le pré-traitement des particules virales avec ces composés n'entraîne aucune réplication, tout comme leur ajout dans le milieu de culture 4 heures après l'inoculation virale (Shivanna et al., 2014). Ces composés jouent alors probablement un rôle au niveau de l'entrée virale, et de la libération des virions dans le cytoplasme une fois que ceux-ci sont dans les endosomes tardifs. De plus, un potentiel effet inhibiteur des acides biliaires sur les effecteurs de l'immunité innée a été rapporté, dont la réponse interféron médiée par STAT-1, facilitant la réplication du virus dans les cellules (Chang et al., 2004). Cependant, cette souche adaptée à la culture cellulaire n'est pas tout à fait identique à la souche sauvage capable d'établir des infections chez les porcs. Elle présente 8 substitutions d'acides aminés par rapport à la souche originelle : 2 substitutions au niveau de l'ARN polymérase ARN-dépendante virale, et 6 au niveau de la protéine de capsid majeure VP1 (Lu et al., 2016). Elle n'est alors plus capable de provoquer des symptômes chez les porcs infectés, n'entraîne chez eux aucune lésion des segments du petit intestin (contrairement à la souche sauvage), mais se réplique malgré tout suffisamment pour observer une excrétion virale atténuée dans les fèces des animaux. De plus, ces études ont permis d'identifier deux acides aminés d'importance majeure au niveau du sous-domaine P2, dont les révertants (de la souche adaptée à la culture cellulaire vers la souche sauvage) permettaient de diminuer sa capacité à répliquer sur les LLC-PK, mais d'améliorer la réplication *in vivo*. Toutes ces données ont permis d'avoir une meilleure compréhension des mécanismes de réplication du sapovirus porcin, et permettent d'orienter les recherches sur le sapovirus humain.

### **I.2.H.c. Récents succès**

Les essais infructueux de mise au point d'un modèle cellulaire permettant la réplication de souches humaines ont marqué une période d'une quarantaine d'années, qui s'est achevée fin 2020 avec la première mise en évidence d'une lignée permissive à l'infection par des sapovirus humains (Takagi et al., 2020).

La lignée humaine HuTu80 dérivée d'un adénocarcinome du duodénum permet donc la réplication et le passage de souches de génotype GI.1, GI.2 et GII.3, avec des titres viraux qui peuvent passer de  $3,5\log_{10}$  à plus de  $7\log_{10}$  copies d'ARN pour  $100\mu\text{L}$  de surnageant de culture en 5 jours d'infection (**Figure 33**). La lignée NEC8, dérivée d'un carcinome testiculaire, a également permis la réplication de GI.1 et GII.3, mais à des niveaux moins importants par rapport à HuTu80 qui a été utilisée pour la majorité des expérimentations ultérieures dans l'étude. Un détail important est à relever : la réplication



virale sur ce modèle n'est possible qu'en présence d'un cofacteur particulier déjà mis en évidence pour certaines souches de norovirus humains et la souche porcine des sapovirus : les acides biliaires conjugués, comme le GCDCA (Chang et al., 2004; Ettayebi et al., 2021).

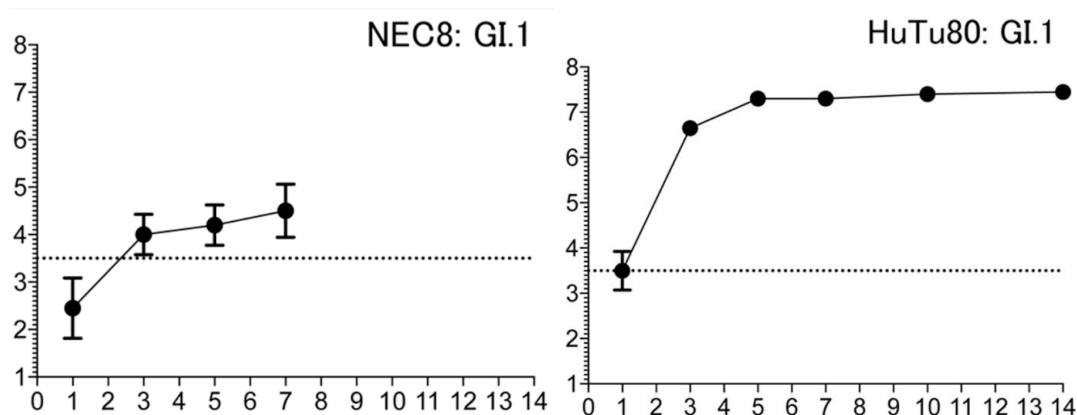


Figure 33 : Cinétique de répllication d'une souche de sapovirus humaine utilisée pour infecter la lignée NEC8 (à gauche) et la lignée HuTu80 (à droite). Les données indiquées représentent la concentration virale (log<sub>10</sub> copies génome) quantifiée dans 100μL surnageant des cellules infectées prélevé à différents temps (n=2 expériences indépendantes sur des cellules à différents passages).

La ligne en pointillées indique la limite de détection du génome viral par biologie moléculaire.

Takagi et al. 2020

Cette lignée humaine a également permis de produire des virions d'une souche GII.3 grâce à un système de génétique inverse, permettant l'étude des protéines de structure VP1 et VP2 (page 69). Ces virions ont également démontré leur caractère infectieux car une fois produit par génétique inverse, ils seraient capable d'infecter la lignée HuTu80 (Li et al., 2022b).

Enfin, ce modèle a déjà permis d'étudier l'effet de certains traitements (température, ultraviolet) sur l'infectiosité des particules virales des souches de sapovirus humaines GI.1 et GII.3, ce qui n'était pas possible jusqu'à présent. D'autres paramètres restent à explorer, comme la question centrale du tropisme viral. En effet, seule une fraction des cellules HuTu80 en culture semblent sensibles à l'infection d'après les données d'immunofluorescence obtenues par l'équipe ayant mis en place ce modèle (Takagi et al. 2020).

#### I.2.H.d. Détection génomique

Avant l'avènement des techniques d'amplification du génome par RT-PCR, les détections de sapovirus dans les échantillons étaient principalement effectuées grâce à la détection des antigènes

viraux par test ELISA. Cette méthode a permis de mettre en lumière la circulation importante du virus au sein de la population de différents pays, et les valeurs de séroprévalence augmentant avec l'âge des enfants testés (Nakata et al., 1998, 1988).

Avec le développement de la biologie moléculaire, reconnue pour sa sensibilité élevée et sa capacité à identifier des souches très diverses, des amorces ont été mises au point pour détecter les acides nucléiques viraux. Les régions ciblées peuvent alors être la polymérase virale, la région codant pour la protéine VP1, ou la jonction entre ces deux régions (Noel et al., 1997; Oka et al., 2006). Les amorces ciblant la jonction entre la région codante pour l'ARN-polymérase et VP1 semble donner lieu à de meilleurs résultats en terme de taux de détection, mais des amorces ciblant partiellement VP1 sont souvent préférées car elles permettent d'identifier aisément les génotypes des souches détectées grâce au séquençage des produits de PCR (Harada et al., 2012, 2009).

La détection de sapovirus est également possible grâce aux méthodes de métagénomique utilisant des amorces non-spécifiques dans des échantillons divers comme les eaux usées ou des fèces d'animaux (Li et al., 2011; Ng et al., 2012). Ces approches permettent d'identifier la circulation de souches (humaines ou animales) dans l'environnement, et d'améliorer les banques de données génomiques des sapovirus.

## II. Huîtres et environnement

### II.1. L’huître, un aliment pour l’Homme

#### II.1.A. Historique

La consommation d’huîtres par des populations humaines est documentée depuis des millénaires. Il peut s’agir d’une source importante de nourriture pour les populations locales. En effet, les huîtres permettent un apport très important en oligo-éléments comme le fer et le zinc, et sont une source de protéines animales accessibles. De nombreux sites présentant une grande accumulation de coquilles d’huîtres ont été identifiés (**figure 34**), traduisant l’ampleur de la consommation ainsi que le rôle culturel, voire rituel, qu’occupait ce mollusque dans des sociétés préhistoriques (Reeder-Myers et al., 2022). Les Romains ont mis en place la culture de mollusques à l’aide de canaux alimentant en eau de mer des bassins, et on retrouve des coquilles d’huîtres parmi les déchets alimentaires identifiés par des fouilles archéologiques d’une ville ayant été ensevelie par une éruption du Vésuve en 79 av. J.C. (Nicholson et al., 2018). Cette culture a perduré à travers les siècles et l’espèce traditionnellement présente sur les côtes françaises était *Ostrea edulis*, l’huître plate. Vers le 17<sup>ème</sup> siècle l’utilisation de bassins d’évaporation, anciennement utilisés pour la production de sel, pour la production conchylicole a été documenté dans certaines régions, et l’apparition en 1852 de textes législatifs encadrant les zones de production traduisent l’importance croissante qu’occupa cette activité en France.



Figure 34 : Site d’accumulation d’environ 2 millions de coquilles d’huîtres *Crassostrea virginica* datant d’il y a environ 1100 années dans le Maryland, Etats-Unis. Reeder-Myers et al., 2022

### II.1.B. L'ostréiculture moderne

Les productions devinrent de plus en plus importantes, mais marquées par des épisodes de mortalité importantes liées à des micro-organismes pathogènes des mollusques, probablement favorisé par la densification des zones de production. Pour y remédier, l'espèce *Crassostrea angulata* fut importée du Portugal pour compenser la raréfaction de *O. edulis* due à des épidémies parasitaires successives. Ensuite vient l'importation de l'huître japonaise, ou huître creuse *Crassostrea gigas* dans les années 1970 qui devint rapidement majoritaire, et représente la quasi-totalité de la production actuelle (Buestel et al., 2009). Un quart de la production française de *C. gigas* est représenté par des huîtres triploïdes produites par biotechnologie, capables de croître plus rapidement et de s'affranchir de la période de laitance moins appréciée par les consommateurs.

En 2018, plus de 92 000 tonnes d'huîtres creuses ont été produite sur le territoire français, ce qui en fait le premier producteur européen, contre 721 tonnes d'huîtres plates, pour un chiffre de vente qui s'élève à quasiment 400 millions d'euros d'après le Ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation.

Enfin, l'ostréiculture est la branche de la pisciculture qui émet le moins de gaz à effet de serre et contribue à piéger les nitrates et les molécules phosphorées dans les milieux où l'huître est présente (Gephart et al., 2021). Les bivalves sont donc une source de protéines et de nutriments présentant un impact écologique bien moins important que les poissons d'élevage ou issus de la pêche intensive, même si leur production a lieu généralement dans des zones soumises à une forte pression anthropique, avec des risques associés de contamination microbiologique et environnementale. L'huître est connue pour sa capacité à bioaccumuler certains métaux, notamment le zinc et le cuivre, mais également le cadmium, le plomb et l'arsenic qui peuvent avoir des impacts toxicologiques importants lorsqu'ils sont absorbés en trop grande quantité dans un organisme (Wang et al., 2022).

### II.1.C. Anatomie et mécanismes de nutrition

Les huîtres sont des mollusques marins bivalves appartenant à la famille des *Ostreidae* et vivent dans l'eau salée des baies et des estuaires. Elles présentent un stade larvaire après l'éclosion des œufs, qui vont ensuite se fixer sur un substrat rocheux de manière permanente, permettant la métamorphose de la larve en naissain (**Figure 35**). Elle subit alors une métamorphose qui implique l'apparition des organes que l'on va retrouver chez l'huître adulte. Une croissance durant entre 18 et 30 mois est généralement nécessaire pour obtenir une huître suffisamment développée pour être commercialisable (pour *C. gigas*) (Stechele et al., 2022; Vogeler et al., 2016). Différents calibres permettent de

catégoriser les huîtres selon le poids, qui peut varier entre 30 grammes (calibre 5) et 150 grammes (calibre 1) (Accord interprofessionnel sur la dénomination et la classification des huîtres creuses du 29 Novembre 2017, Comité National de la Conchyliculture).

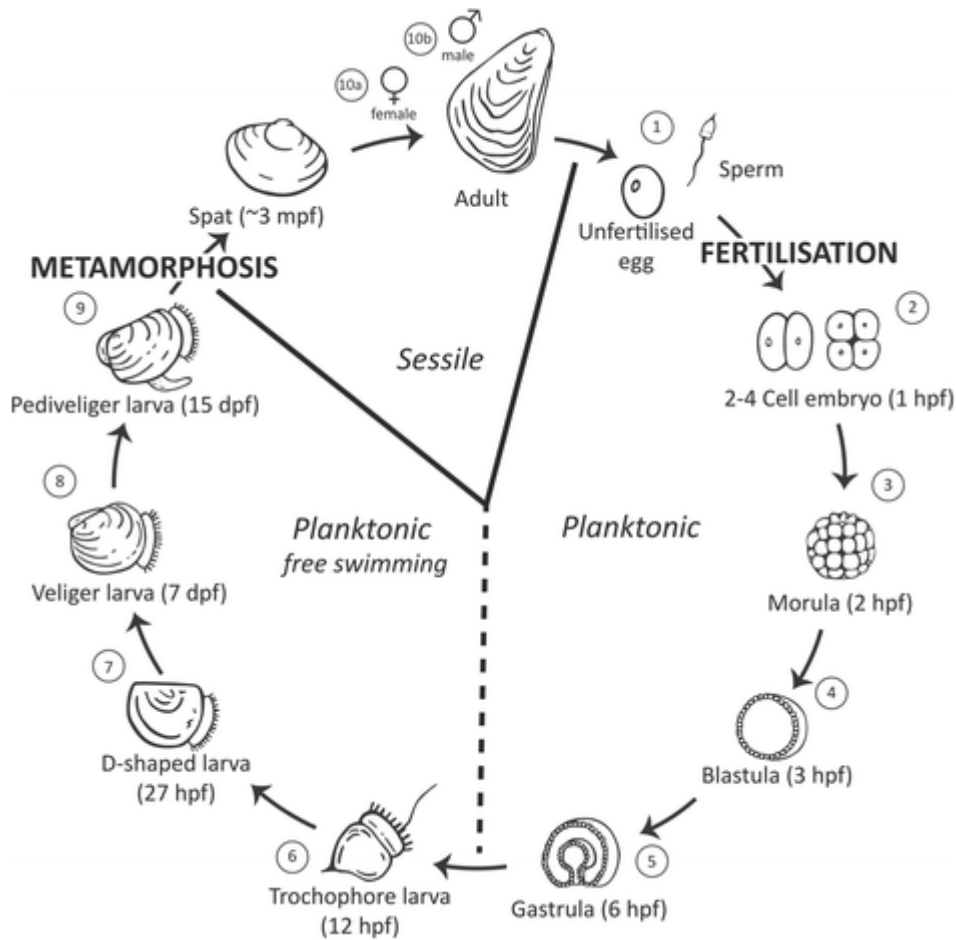


Figure 35 : Représentation schématique des différentes étapes du développement d'une huître creuse *Crassostrea gigas*. Les œufs fertilisés vont se diviser pour former une larve pédiveligère en une quinzaine de jours. Celle-ci va se métamorphoser et devenir sessile en se fixant à un substrat puis croître sous sa forme définitive. Vogeler et al., 2016

L'ensemble des tissus mous qui enveloppent les organes est appelé le manteau (visible sur la **figure 36**), et renferme l'hémolymphe qui transporte l'oxygène et joue un rôle similaire à celui du sang. Le manteau assure également des fonctions de réserve de glycogène et de lipides, ainsi qu'un rôle sensoriel, de sécrétion du mucus et de la matrice minérale composant la coquille, composée de conchyoline et de calcite. Les branchies sont le site d'absorption de l'oxygène, qui est transporté sous forme dissoute dans l'hémolymphe. Elles permettent également la formation d'un courant d'eau qui dirige les microalgues captées par les lectines du mucus vers les palpes labiaux, qui permettent alors

de trier par taille et par affinité les différentes particules alimentaires (Pales Espinosa et al., 2009). La fraction de particules non-digérée par l'huître est donc enveloppée dans du mucus et rejetée sous forme de pseudo-fèces. Les autres passent de la bouche à l'œsophage, puis à l'estomac, dans lequel a lieu leur digestion enzymatique et mécanique via la rotation d'un stylet cristallin qui écrase les particules contre les parois, tout en libérant différentes enzymes : protéases, lipases, amylases (Alberto et al., 2020).

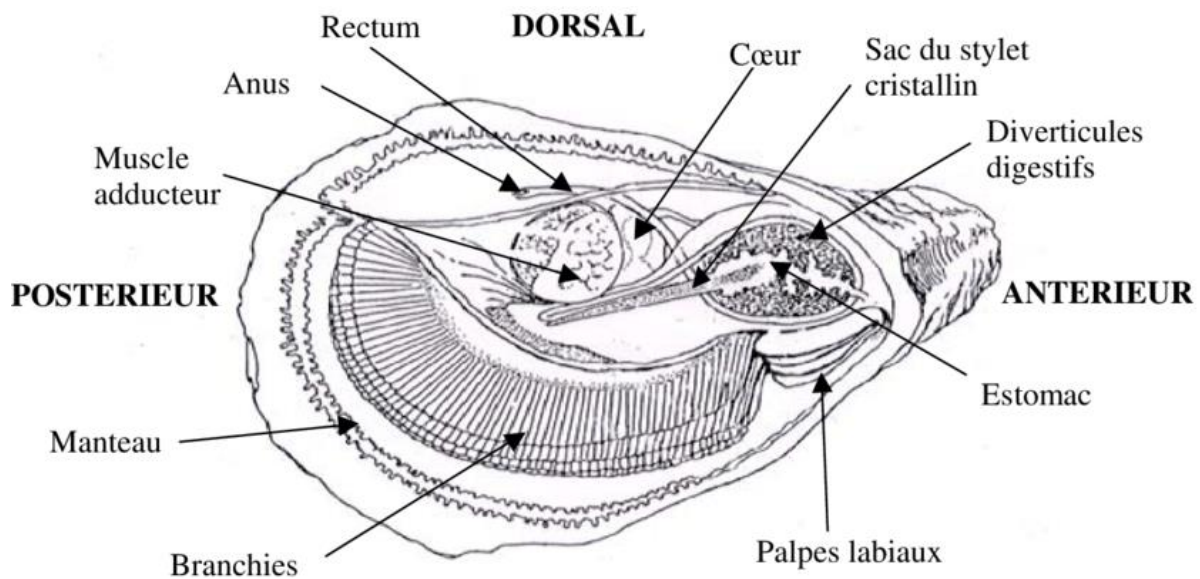
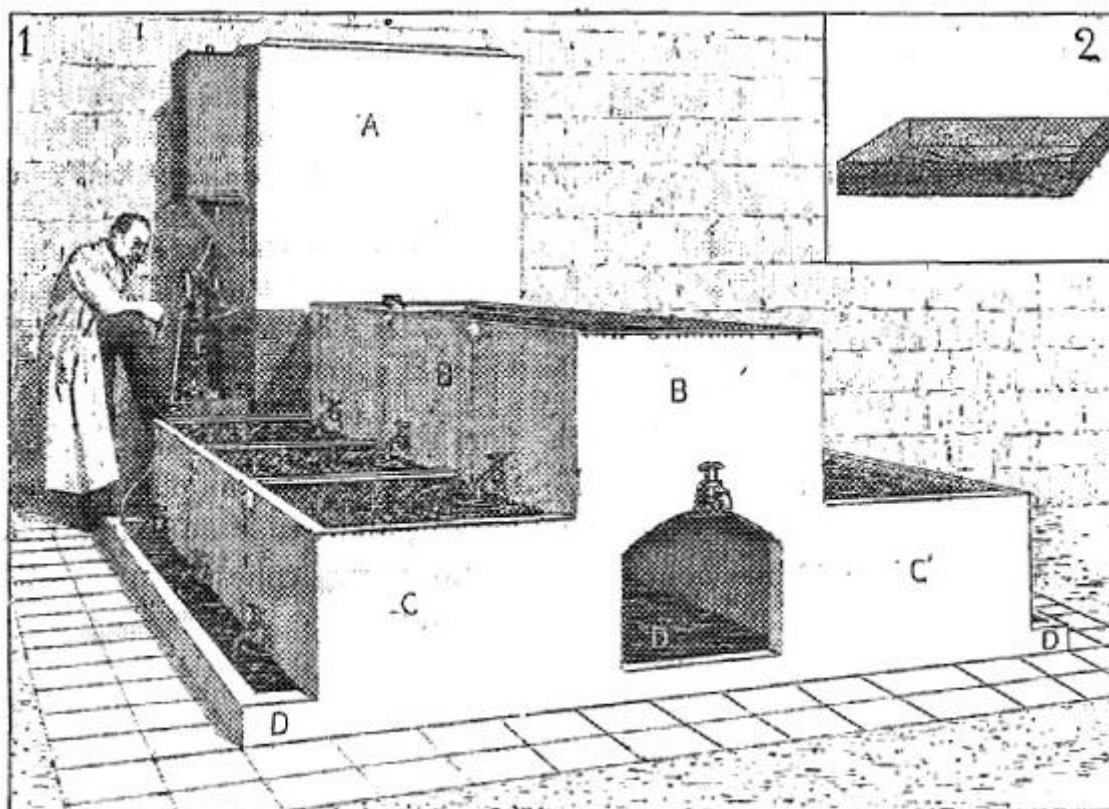


Figure 36 : Représentation schématique de l'anatomie de *Crassostrea gigas*. On identifie alors les organes tels que l'estomac, le manteau, les branchies, le muscle adducteur ... Mélanie Gay, 2004.

#### II.2.D. Les huîtres, source de pathologie chez le consommateur

La présence potentielle de contaminants microbiologiques dans les huîtres destinées à la consommation est connue depuis des années voire des siècles, tout comme les questionnements portant sur la marche à suivre pour éliminer cette contamination potentielle et assurer une consommation sûre à la population. Les dangers principaux relevant de la consommation de ces mollusques à l'époque étaient d'origine bactérienne, avec des épidémies de fièvre typhoïde parfois sévères (Boinet and Teissonniere, 1929; Vigot, 1904). Dès les années 1912-1913, le naturaliste Paul Fabre-Domergue (et ses collègues par la suite) démontre que la mise en eau de mer filtrée de lots d'huîtres (**Figure 37**) permettait de réduire la présence de bactéries coliformes dans les mollusques en quelques jours. Le poids des animaux ainsi que leurs valeurs nutritives ne semblaient pas impactés, ce qui était alors parmi les inquiétudes des producteurs de l'époque.



*Figure 37 : Procédé de stabulation des huîtres en eau de mer filtrée proposé par Fabre-Domergue en 1912 pour décontaminer les huîtres fraîchement récoltées. On y retrouve un filtre à sable (A), un réservoir d'eau filtrée (B), les bassins accueillants les huîtres (C) et enfin l'eau de mer brute (D). Compte-rendu de l'Académie des Sciences du 1<sup>er</sup> janvier 1912.*

Des procédures de purification étaient alors mises en place par les producteurs et les distributeurs, généralement pour une durée de 48 à 72 heures, et consistaient à immerger les huîtres dans de l'eau de mer propre avant leur consommation finale, sans réelles obligations ni standards à respecter.

### **II.1.E. Classement des zones de production**

La législation française, puis européenne a instauré une réglementation portant sur des critères microbiologiques (**figure 38**) pour le classement des zones de production, notées de A à C. Ce critère est basé sur un indicateur de contamination fécale, *Escherichia coli*, en se basant sur le niveau de contamination bactériologique d'origine fécale dans 100 grammes de chair et de liquide intervalvaire des mollusques concernés. Les zones A correspondent à la présence de moins de 230 *E. coli* pour 100 grammes de chair dans les coquillages produits, et ne requièrent alors aucun traitement particulier de dépuration des coquillages provenant de cette zone avant leur commercialisation. En revanche, les zones B et C correspondent à la présence de jusqu'à 4600 *E. coli* pour la première et jusqu'à 46 000

pour la seconde (Règlement (CE) No 854/2004 du Parlement Européen et du Conseil du 29 Avril 2004).

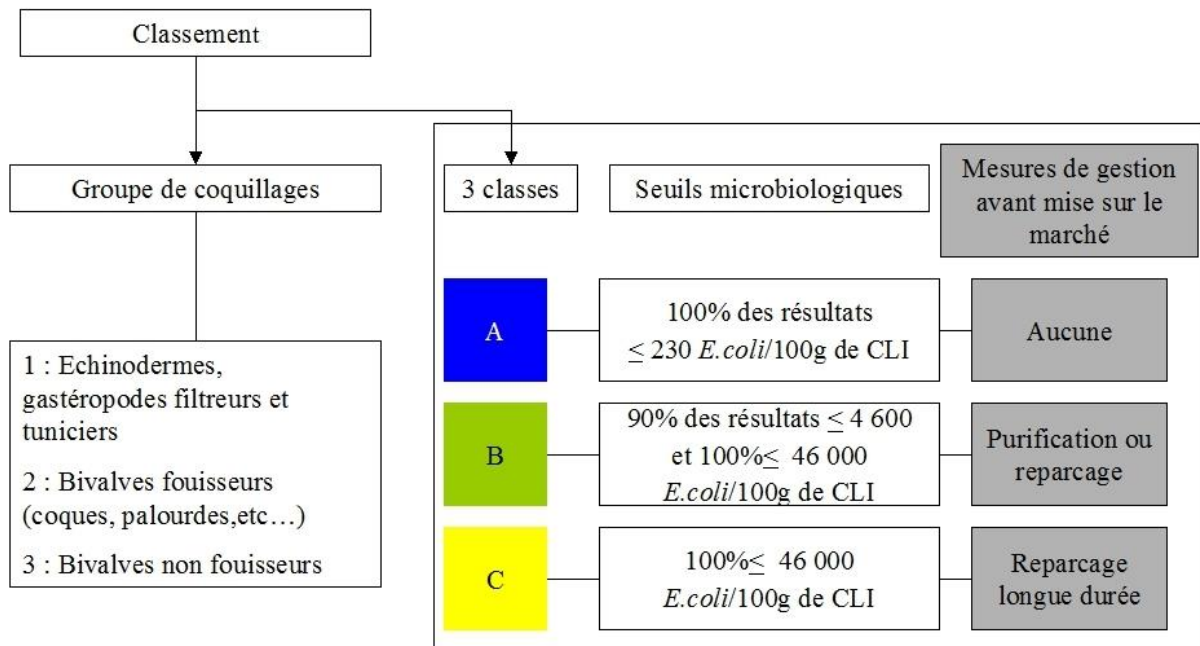


Figure 38 : Récapitulatif du classement des zones de production selon la qualité microbiologique des coquillages produits basés sur des seuils de concentration en *Escherichia coli* dans le CLI (chair et liquide inter-valvaire) selon la réglementation CE n°854/2004. Dimitri Morin, 2018.

Les zones B représentant près de 60% des zones de production d’huîtres en Europe, une quantité importante de mollusques doivent subir un procédé de purification qui permet d’abaisser la contamination des coquillages de ces zones. La législation européenne ne précise aucune directive quant à la température minimale ou la durée de cette étape, qui est donc spécifique à chaque pays voire à chaque producteur. La visée de chaque processus utilisé est d’une part (1) la reprise de l’activité de filtration de la part des mollusques, qui nécessite des conditions particulières pour diminuer le stress des animaux : salinité, température de l’eau, niveau d’oxygène dissous, ... et d’autre part (2) l’élimination des contaminants rejetés par les mollusques pour éviter une recontamination en raison du circuit fermé (traitement de l’eau par UV/ozone/chlore, localisation des aérations, ...).

La mise en place de cette réglementation a contribué à une forte diminution des épidémies bactériennes liées à la consommation de coquillage, cependant, les épidémies virales persistent. Certaines données telles que l’observation de particules virales dans les selles de malades ou une séroconversion de ces derniers ont été avancées comme des preuves de contamination par norovirus après la consommation



d'huîtres pourtant considérée comme exemptes de contamination selon les critères bactériologiques (Chalmers and McMillan, 1995; Gill et al., 1983; McLeod et al., 2017; Morse et al., 1986).

## **II.2. Circulation des souches de norovirus et sapovirus dans l'environnement**

### **II.2.A. Dans les eaux usées**

L'excrétion virale dans les fèces des personnes infectées, symptomatiques ou non, entraîne la présence d'une certaine concentration virale dans les eaux usées. Ces eaux usées sont le plus souvent collectées par un réseau et amenées aux stations d'épuration afin d'y être traitées pour éliminer les contaminants chimiques notamment. Certains dysfonctionnements ou situations particulières peuvent entraîner leur rejet dans l'environnement sans avoir éliminé les pathogènes qu'elles contiennent. Les fosses septiques, utilisées dans les régions où les foyers ne sont pas connectés au réseau municipal de collecte des eaux usées peuvent être à l'origine de ces contaminations. Aux Etats-Unis, environ 25% des maisons disposent d'une fosse septique et il s'agit d'une source importante de contamination de l'eau du robinet consommée par les résidents (Mattioli et al., 2021). Cette eau peut provenir de réserves d'eaux souterraines qui peuvent être souillées par des infiltrations d'eaux usées provenant de fosses septiques ou de canalisations endommagées, surtout si elle n'est pas soumise préalablement à des protocoles de désinfection, entraînant la présence de nombreux virus entériques (Borchardt et al., 2012).

Le taux de détection de norovirus dans les eaux usées arrivant en station d'épuration peut s'élever à plus de 82% d'après une méta-analyse couvrant 46 études menées entre 2006 et 2021 dans des pays sur chaque continent (Huang et al., 2022). Les concentrations relevées dans 26 études font état d'une moyenne d'environ  $5.10^5$  copies de génome pour les norovirus GI et  $2.10^5$  copies pour ceux du GII par litre d'eaux usées, avec de fortes variations selon les pays ou encore les périodes de l'année. Les sapovirus peuvent être retrouvés à des concentrations de  $10^3$  à  $10^6$  copies génomes/litre d'eaux brutes, mais les études quantitatives sur le sujet sont plus rares que pour les norovirus et se limitent à quelques pays (Fioretti et al., 2016; Haramoto et al., 2008; Sima et al., 2011; Song et al., 2021).

### **II.2.B. Après traitement**

En fonction des types de technologies employés par les stations, le taux d'abattement de la concentration virale entre les eaux entrantes et sortantes peut fortement varier. Une seconde méta-analyse regroupant les données de 76 stations entre 2007 et 2013 relate des réductions moyenne

d'environ  $8.10^3$  copies de norovirus GII et 30 copies de norovirus GI par litre d'eaux usées traitées (Pouillot et al., 2015). Dans ces eaux usées, les virions apparaissent principalement associées à des particules de petite taille (moins de  $180\mu\text{m}$ ) que la sédimentation seule ne suffit pas à les éliminer, ce qui permet notamment leur passage à travers des membranes (Silva et al., 2008). Ces dernières présentent des pores de petite taille ( $0,45\mu\text{m}$ ) mais l'adhésion préalable des virus à des boues solides permet une rétention mécanique (Sima et al., 2011). L'utilisation de technologies successives permet d'optimiser l'élimination des particules virales de l'eau, bien que le système de bioréacteur à membrane seul démontre des capacités de réduction des concentrations en virus entériques plus importantes que le système de boues activées (Sano et al., 2016).

De nombreux paramètres peuvent entrer en jeu comme le temps de rétention des eaux usées, la durée d'exposition au soleil dans les stations à boue activée, la turbidité, mais aussi l'ancienneté des stations ou les surcharges du réseau. Ces taux d'abattement des concentrations virales peuvent alors être extrêmement faibles, ce qui conduit au rejet d'eaux contenant toujours une charge virale non négligeable aux sorties des stations (Campos and Lees, 2014).

### **II.2.C. Dans les eaux littorales**

Selon les zones géographiques, les eaux usées plus ou moins correctement épurées peuvent être rejetées dans le littoral. Les eaux côtières peuvent alors être contaminées par les virus entériques dont le norovirus, ce qui entraîne leur présence dans les eaux marines côtières, avec des pourcentages de détection variant fortement selon les études et les localisations géographiques mais pouvant atteindre les 30% d'échantillons positifs pour des eaux provenant d'estuaires et jusqu'à 26% pour des eaux marines (Ekundayo et al., 2021; Kim et al., 2016). Les concentrations virales détectées peuvent atteindre jusqu'à  $10^2$  copies de norovirus par litre d'eau de mer. Il a alors été démontré qu'il peut persister plusieurs semaines et conserver son caractère infectieux (Cioffi et al., 2021; Desdouits et al., 2022; Kaas et al., 2016). Plus rarement quantifiées, les concentrations de sapovirus dans les eaux côtières ont été mesurées jusqu'à  $10^5$  copies de génome par litre d'eau de mer dans le golfe de Naples (Italie) comme présenté sur la **figure 39** (Cioffi et al., 2021).

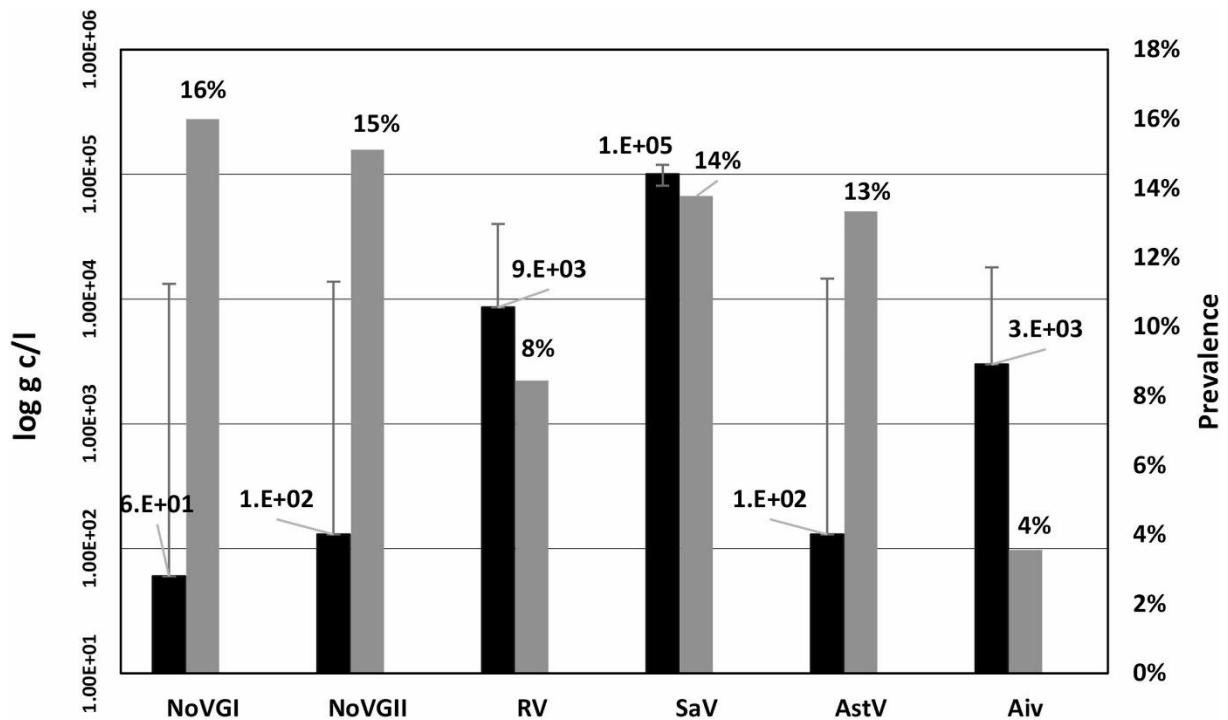


Figure 39 : Moyenne arithmétique des concentrations virales quantifiées par qRT-PCR dans 255 échantillons d'eau de mer indiquées en noir, et taux de détection des virus associés en gris. NoV GI :  $6 \cdot 10^1$  copies par litre (c/L), NoV GII :  $1 \cdot 10^2$  c/L et SaV :  $10^5$  c/L. Ces échantillons ont été collectés à proximité de rejets d'eaux propres et usées (traitées ou non).  
Cioffi et al. 2021

Des conséquences au niveau sanitaire sont donc possibles, sporadiquement par contamination les baigneurs et usagers de l'espace côtier, ou de façon plus importante et à plus large échelle sur les mollusques qui se développent dans cet environnement. Les coquillages peuvent alors participer à la transmission de ces virus entériques au sein de la population (Le Guyader et al., 2008; Ollivier et al., 2022; Ueki et al., 2010).

#### II.2.D. Phénomènes météorologiques et conséquences

Comme indiqué ci-dessus, une augmentation du nombre de cas dans la population entraîne une concentration plus élevée dans les rejets en raison de l'excrétion virale associée. Les précipitations importantes peuvent conduire à des débordements et des rejets d'eaux usées brutes ayant pour conséquence une augmentation de la contamination des eaux littorales (Haramoto et al., 2008; Huang et al., 2022; Kazama et al., 2017; Mancini et al., 2019). De manière plus générale, les phénomènes d'intenses

précipitations participent à la dissémination du virus en grande quantité dans l'environnement, comme cela peut être le cas lors d'inondations. La montée des eaux va alors faire déborder les conduits et le réseau de collecte, permettant aux matières fécales contaminées d'être mises en suspension et transportées dans des volumes importants au contact des habitations et des infrastructures (Gholipour et al., 2022; Kittigul et al., 2019; Murray and Taylor, 2015; Varela et al., 2018). Les contaminations peuvent alors avoir lieu par contact direct avec les eaux souillées, mais également par infiltration dans les puits, les lacs, les rivières, le littoral, les nappes phréatiques ou encore par contact avec les champs et les aliments (Mavrouli et al., 2022).

## **II.3. Contamination des huîtres**

### **II.3.A. Par norovirus et sapovirus**

En raison des rejets de différentes sources dans l'environnement, les virus entériques peuvent être présent dans les eaux côtières où vivent les huîtres, qu'elles soient sauvages ou d'élevage. Cela peut entraîner une bioaccumulation dans les tissus de ces organismes : le courant d'eau utilisé par l'huître pour capter les particules alimentaires en suspension va également permettre aux particules virales présentes dans le milieu de se retrouver ingérées de manière passive.

L'étude diligentée par l'Autorité Européenne de la Sécurité des Aliments (EFSA) publiée en 2019 a permis de clarifier la prévalence des norovirus dans les huîtres. Sur les 2180 échantillons provenant de zones de production, on retrouve environ 34,5% d'huîtres contaminées avec une concentration virale moyenne de 337 copies génomes par gramme de tissu digestif. Pour ce qui est des centres de distribution, cette prévalence atteint 10,8% avec une concentration moyenne de 168 copies par gramme (Authority (EFSA), 2019; Ollivier et al., 2022).

En revanche, des huîtres contenant des concentrations virales bien plus élevées que les moyennes mentionnées (jusqu'à 18 000 copies génomes par gramme) peuvent aisément être à l'origine d'épidémies suite à leur consommation (Lowther et al., 2012). Il faut noter que les huîtres sont majoritairement consommées crues, et les virus bioaccumulés ne seront pas inactivé par un quelconque traitement thermique. De même, une cuisson insuffisante ne permet pas d'éliminer le risque et peut contribuer à des infections (Alfano-Sobsey et al., 2012). Cependant, la concentration virale ne reflète pas toujours la capacité infectieuse des virions bioaccumulés, qui peuvent alors présenter une capsid endommagée, voire absente, ou des génomes partiels, donc incapables de se répliquer.

Les sapovirus sont plus rarement recherchés dans les mollusques pour diverses raisons, et les informations quant à sa dose infectieuse restent encore à définir, malgré le fait que ces virus contribuent de façon importante aux épisodes de gastro-entérites virales (Becker-Dreps et al., 2020). Ils ont également pu être identifiés dans différentes espèces de mollusques : les palourdes, les coques ainsi que les moules, dans lesquels la contamination peut atteindre entre  $10^3$  et  $10^5$  copies de génomes par gramme de chair (Benabbes et al., 2013; Ueki et al., 2010; Varela et al., 2016). Il est également possible de retrouver la présence d'adénovirus humains, d'hépatite E porcine et hépatite A, de rotavirus ou encore d'aichivirus et enterovirus (Guillois-Bécel et al., 2009; Ito et al., 2021; Le Guyader et al., 2008; Nagarajan et al., 2022; Wolf et al., 2013).

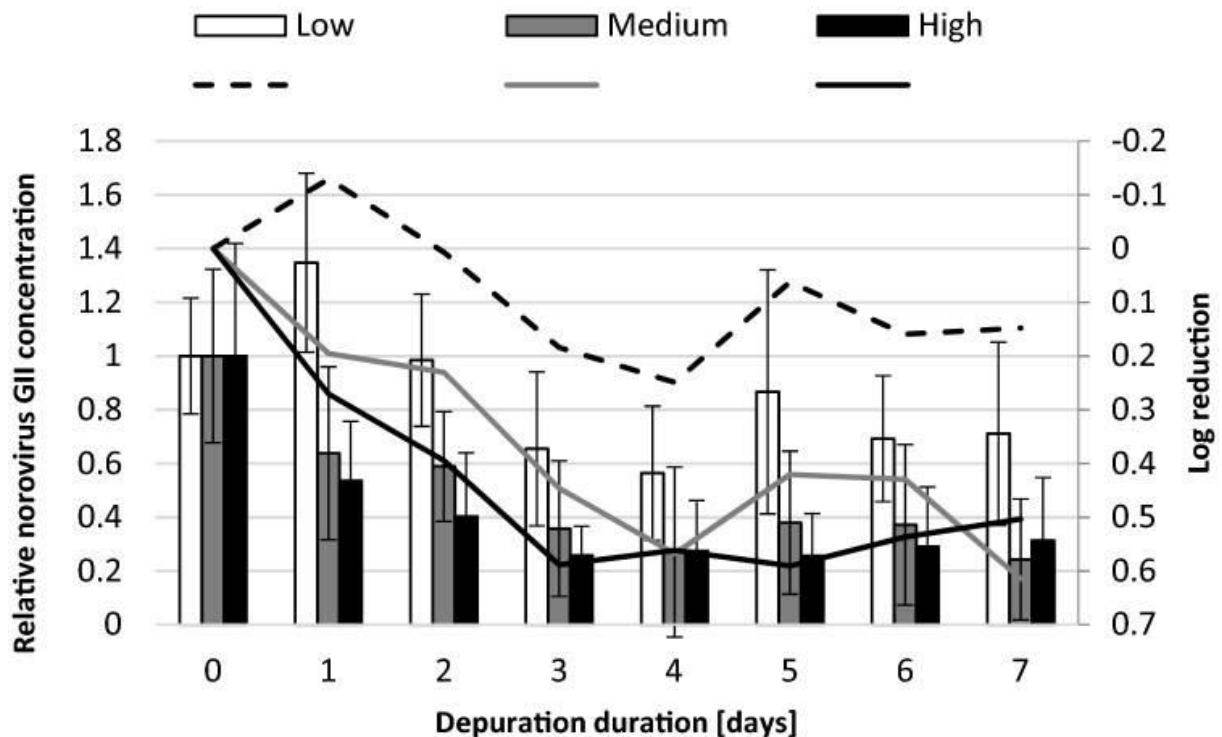
Le lien entre excrétion virale, eaux usées et bioaccumulation des virions par les huîtres est d'autant plus important lorsqu'on identifie la présence de ces virus dans des échantillons d'eau collectés à proximité de points de rejets d'eaux usées, proches de certaines zones de production conchylicole (Iizuka et al., 2010; La Rosa et al., 2017; Sano et al., 2011; Ueki et al., 2005).

### **II.3.B. Décontamination des huîtres**

La suggestion de la mise en place d'une étape de purification obligatoire durant plusieurs jours de tous les bivalves produits en Europe fût proposée dès 1994 pour réduire les concentrations des différents micro-organismes bioaccumulés, qu'ils soient bactériens (bactéries coliformes, *E. coli*, ...) ou virologiques (rotavirus, adénovirus, poliovirus) (Bosch et al., 1994). Cependant, ces méthodes démontrent bel et bien un abattement rapide et efficace de la concentration en micro-organismes bactériens comme *E. coli* dans les glandes digestives, permettant ainsi aux huîtres soumises à cette étape de passer sous les seuils définis, mais il est connu depuis des décennies maintenant que la charge virale en norovirus ne subit que peu ou pas de changement lorsque cette étape de purification ne s'étale pas sur une période de temps suffisante. On relève alors une diminution de 95% des bactéries présentes dans la glande digestive, mais seulement 7% des norovirus en 48 heures (Schwab et al., 1998). Ces données ont été récemment confirmées par de nouvelles études qui démontrent la cinétique de purification particulièrement lente du norovirus dans les huîtres contaminées (Battistini et al., 2021; McLeod et al., 2017; Rupnik et al., 2021; Younger et al., 2020).

Des cas de gastro-entérites causés par la consommation d'huîtres ayant pourtant subies un processus de purification (jusqu'à 23 jours pour l'un des lots contaminés) et satisfaisants les critères bactériologiques ont été identifiés (Le Guyader et al., 2010, 2008; Le Mennec et al., 2017; McLeod et al., 2017; Rajko-Nenow et al., 2014).

La durée nécessaire pour observer un taux d'abattement d'1 log de la concentration en norovirus dans les coquillages contaminés est comprise entre 9 et 45 jours selon les études citées précédemment. Pour améliorer ce processus, l'utilisation d'une température de l'eau élevée a été suggérée, mais a produit des résultats contradictoires et rarement significatifs sauf sur des périodes de plusieurs semaines où une eau à 25°C semble abaisser plus rapidement les concentrations virales que des eaux à 7 ou 15°C (McLeod et al., 2017). De façon générale, une eau supérieure à 11°C semble être optimale pour abaisser le niveau de contamination comme visible sur la **figure 40** (Rupnik et al., 2021).



*Figure 40 : Comparaison de la décroissance virale dans les tissus digestifs de 10 huîtres toutes les 24 heures selon la température de l'eau utilisée pour la purification. La concentration virale en norovirus GII est quantifiée par qRT-PCR à partir de 2 grammes de tissu digestif. Les trois conditions thermiques sont : low (8°C), medium (12 à 14°C) et high (18 à 20°C). Rupnik et al. 2021.*

Des méthodes de gestion, lors de la détection de contaminations avérées de lots de coquillage, suggèrent de déplacer les huîtres vers des sites moins contaminés, pour des périodes plus longues (de 17 jours à plusieurs mois) (Doré et al., 2010; Rupnik et al., 2021, 2018).

## II.4. Bioaccumulation virale

### II.4.A. Premières expérimentations

Cette capacité des huîtres à pouvoir accumuler des pathogènes est connue depuis des décennies, et plusieurs travaux datant des années 1960 à 1980 suggèrent le rôle de ces organismes en tant que vecteurs de contaminations virales, tout en conférant une certaine stabilité aux virions captés dans les tissus, ces derniers étant incapables d'infecter les cellules de ces organismes (Hay and Scott, 1986; Hedström and Lycke, 1964). Ces premières études sur la localisation histologique des virions sont conduites avec différentes méthodes plus ou moins précises comme l'utilisation d'un virus d'insecte marqué radioactivement. La localisation essentiellement digestive des virions est alors remarquée, probablement en raison du mucus qui piège les particules (Hay and Scott, 1986).

Les études mentionnées auparavant sur la prévalence des norovirus au sein des tissus d'huîtres ont été réalisées à partir de l'animal entier. Elles ne permettent donc pas d'identifier la localisation précise des virus bioaccumulés, si ce n'est qu'une partie d'entre eux au moins sont présents dans les organes digestifs (Schwab et al., 1998).

### II.4.B. Bioaccumulation de VLP

Pour approfondir cette question dans le cas des norovirus, des expérimentations de bioaccumulation ont permis d'analyser la capacité de ces particules à se fixer de façon durable dans les huîtres : elles sont alors mises en présence d'eau contenant une concentration connue de particules virales ou des VLP, entre 12 et 24h, et des coupes ainsi que des marquages immuno-histologiques ont été réalisées pour visualiser la distribution des virus dans les tissus (Le Guyader et al., 2006). On retrouve dans un premier temps (12h) une localisation virale majoritairement digestive, mais après 24h la présence de virions est également visible dans le tissu conjonctif proche (signaux moins abondants) (**Figure 41**).

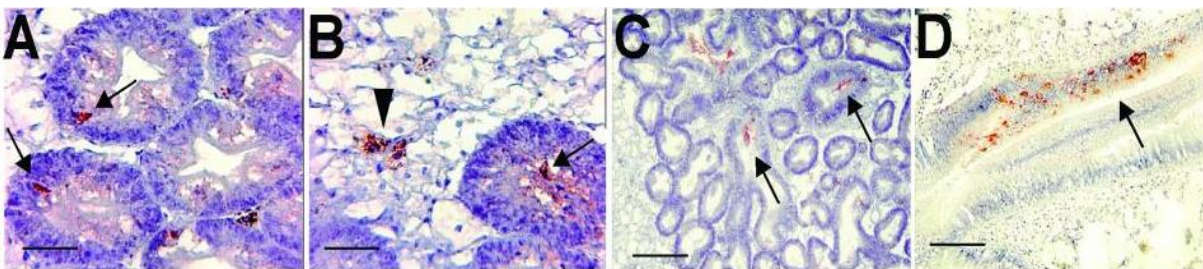


Figure 41 : Coupes de tissus d'huîtres ayant bioaccumulé des VLP recombinantes de norovirus GI.1 8FIIa durant 12 heures (entre  $10^9$  et  $10^{12}$  particules par expérimentations) avec une révélation à

*l'aide d'un anticorps polyclonal de lapin dirigé contre ces particules, visible en rouge-marron et indiqués par des flèches. Les différentes sections présentées sont des diverticules digestifs (A,B) ou des canaux du diverticule (C,D) visibles par leur coloration bleu foncé, avec du tissu conjonctif plus clair autour. Le Guyader et al., 2006.*

Le courant d'eau formé par les huîtres au cours de leur nutrition conduit également ces virions présents à interagir avec les organes externes comme le manteau ou les branchies, premiers organes en contact avec l'eau de mer (Wang et al., 2008). Les cellules du tissu conjonctif de l'organe digestif démontrent une co-localisation avec des particules virales, possiblement des cellules phagocytaires (McLeod et al., 2009). Ces expérimentations sont complexes à interpréter car de nombreux facteurs entrent en jeu :

- les animaux eux-mêmes, soumis à de nombreux facteurs tels que leur âge, leur statut chromosomique (diploïde ou triploïde), leur microbiote, la température de l'eau, la saison qui peuvent influencer le volume d'eau filtré par unité de temps ou la teneur en glycogène et en lipides des tissus (Linehan et al., 1999; Lokmer and Mathias Wegner, 2015)
- la qualité de la fixation des tissus ainsi que du marquage utilisé
- la nature de la souche virale employée, car des affinités différentes existeraient selon le génotype ou génogroupe des virus avec les ligands présents dans les huîtres

## **II.5. Huîtres, glycanes et norovirus**

### **II.5.A. Présence de glycanes similaires aux HBGA**

Les études initiales ayant déterminé la capacité des tissus d'huîtres à interagir avec des VLP de norovirus humains ont également pu identifier les structures reconnues par les VLP de norovirus sur les tissus d'huîtres. Dans un premier temps, grâce à l'utilisation d'anticorps et de lectines dirigées contre les glycanes ainsi que les épitopes HBGA, les cellules épithéliales de l'organe digestif de ces mollusques démontrent l'expression d'un analogue aux HBGA humains, principalement des A et O-like, qui seraient responsable de la liaison spécifique aux norovirus humains (Le Guyader et al., 2006; Maalouf et al., 2010)..

La présence de ces « HBGA-like » a été identifiée chez trois espèces d'huîtres différentes (*C. gigas*, *C. virginica* et *C. sikamea*), mais également chez d'autres mollusques dont la palourde japonaise *Venerupis japonica* et la moule bleue *Mytilis edulis* (Tian et al., 2007, 2006).



### II.5.B. Inhibition de l'interaction

La capacité d'interaction entre ces glycanes de mollusques et les VLP de norovirus humains peut être inhibée lorsque les VLP sont incubées préalablement avec certains HBGA d'origine humaine ou synthétiques. La pré-incubation permet alors d'occuper les domaines de liaison aux HBGA des particules virales, ce qui empêche les interactions suivantes avec les autres molécules de type HBGA présentes sur les tissus testés.

L'utilisation de salive d'individus sécréteur A démontre alors cette capacité à inhiber de façon concentration-dépendante la capacité des VLP (GI.1 8FIIa, GII.4 VA387, GII.5 MOH ou GII.9 VA207 selon les publications) traités à se fixer sur différentes matrices : des coupes de tissus fixées de *C. gigas* (Le Guyader et al., 2006), tissus digestifs de *C. virginica* seuls (Tian et al., 2006) et enfin mélange de tissus digestifs provenant de trois espèces différentes (*C. gigas*, *C. virginica* et *C. sikamea*) par Peng Tian, Engelbrektsen, et al. 2007. Ce phénomène est également visible avec de la salive d'individu O sécréteur mais de façon beaucoup moins importante, et n'est pas retrouvé lorsque de la salive d'individu B sécréteur est employée. Le même phénomène d'inhibition apparaît lorsque des anticorps monoclonaux dirigés contre des HBGA de type A sont utilisés au cours d'une pré-incubation. Enfin, des VLP de la souche GI.1 mutées dans leur domaine P2 responsable de la liaison aux motifs HBGA perdent leur capacité d'interagir avec les tissus d'huîtres (Le Guyader et al., 2006). En effet, des études précédentes avaient identifié que le résidu en position 331 n'est pas responsable d'interactions avec les HBGA, tandis que les résidus en position 375 et 329 permettent l'interaction avec des sucres portés par les HBGA de type H ou A (Chakravarty et al., 2005; Hutson et al., 2003).

### II.5.C. Distribution tissulaire des glycanes

Ainsi, les cellules présentes dans les organes digestifs de l'huître (principalement *C. gigas*) sont marquées par des anticorps spécifiques aux HBGA de type A, et dans une moindre mesure aux HBGA de type H1 (Ma et al., 2018, 2017; Morozov et al., 2018; Yang et al., 2022). Concernant les autres organes, la présence de ces deux glycanes dans les branchies et le manteau est également attestée. Il semble également y avoir une expression différente de certains glycanes « secondaires » selon les tissus considérés, dans des proportions plus faibles comme l'antigène Lewis b dans les branchies visible sur la **figure 42** (Su et al., 2018). Des travaux étudiant les voies de biosynthèse des glycosphingolipides et de ces glycanes par séquençage ARN peuvent également contribuer à l'étude de ce sujet malgré le fait que les gènes impliqués sont encore peu connus, bien que certains candidats codant pour des glycosyltransférases et possédant une fonction similaire au gène humain *FUT2*

semblent présents. Ces gènes pourraient même être surexprimés lors d’une bioaccumulation de particules virales et participer à une concentration plus importante d’HBGA dans l’huître au cours du temps (Ma et al., 2017; Su et al., 2018; Yang et al., 2022).

D’autres résultats devraient permettre d’approfondir les connaissances sur ce sujet, comme par exemple une caractérisation chimique et structurale claire des différents glycanes présents chez *C. gigas* afin de pouvoir modéliser les interactions existantes entre norovirus et ces molécules.

La nature des glycanes exprimés dans les tissus d’huîtres est une question fondamentale dans la compréhension de ces mécanismes de bioaccumulation virale pour les raisons évoquées précédemment.

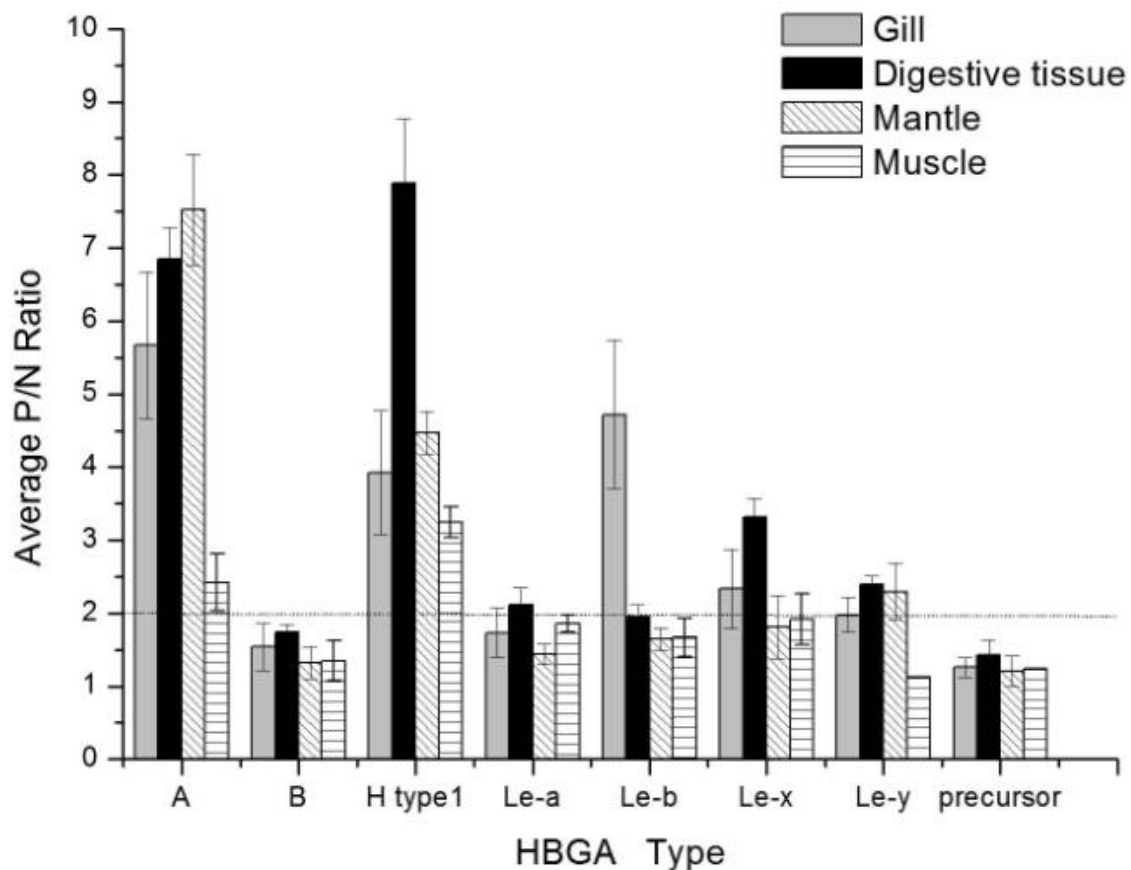


Figure 42 : Ratio moyen de détection par ELISA des différents HBGA dans les tissus de *C. gigas* échantillonnés sur une année complète en Chine entre Août 2014 et Juillet 2015 (n=240) par Su et al. 2018. Des anticorps monoclonaux de souris dirigés contre les différents motifs HBGA sont utilisés et révélés par un anticorps secondaire anti-souris couplé à la peroxydase.

#### II.5.D. Variations saisonnières

Il est acquis que le norovirus humain circule dans l'environnement et la population principalement au cours de la période hivernale, lorsque les fortes précipitations et les conditions météorologiques favorisent le rejet d'eaux contaminées dans le bassin versant. Seuls quelques travaux se sont penchés sur la potentielle variabilité des niveaux d'expression de ces molécules dans les tissus des huîtres selon la saison, en supposant une corrélation entre les phénomènes de bioaccumulation virale avec une surexpression des molécules responsables de la liaison aux particules virales dans les tissus lors de ces périodes hivernales.

Concernant les huîtres creuses *C. gigas*, l'expression des HBGA de type A dans les tissus digestifs apparaît comme supérieure ou similaire selon les études au cours des mois d'avril à octobre, en dehors de la période épidémique classique des norovirus (Ma et al., 2018; Tian et al., 2008). En revanche, la capacité des VLP utilisées à lier les tissus en fonction de l'année est différente. Au laboratoire nos résultats (**Figure 43**) ont démontré une capacité de liaison des VLP GI.1 (Norwalk virus, 8FIIa) particulièrement importante de janvier à mai, ce qui cette fois inclue la période épidémique « classique ». Cette interaction renforcée diminue brusquement dès juin, et cette baisse d'affinité se maintient jusqu'en Décembre (Maalouf et al., 2010). D'une manière similaire, les VLP GII.4 (Houston) voient leur capacité à lier les tissus digestifs, les branchies et le manteau de manière significativement plus importante de Janvier à Mai, bien que la perte d'affinité soit moins frappante que pour GI.1 (Maalouf et al., 2010).

Il est nécessaire de garder à l'esprit que de nombreux paramètres sont également à prendre en compte dans ces phénomènes de variabilité saisonnière, et l'utilisation de la même espèce d'huître seule ne garantit pas des résultats aisément reproductibles. Des différences inter-individuelles peuvent également être présentes car il est courant d'utiliser un homogénat de tissus provenant de différents animaux pour les tests ELISA par exemple. La température de l'eau, sa salinité, sa turbidité mais également les souches de VLP utilisées sont aussi à considérer.

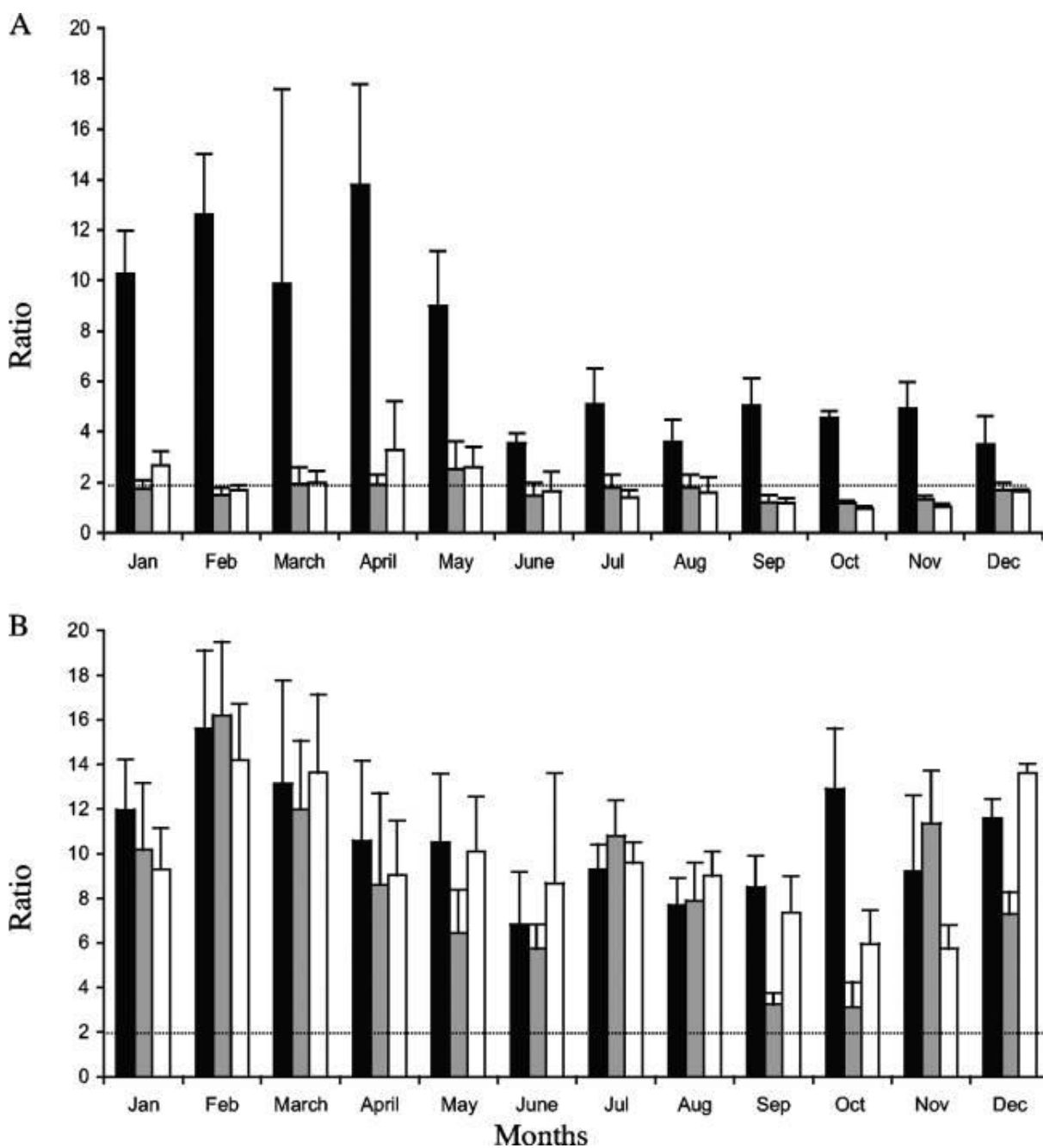


Figure 43 : Suivi mensuel par ELISA de l'affinité des VLP de norovirus (A) GI.1 et (B) GII.4 pour les différents tissus de *C. gigas* (noir : tissu digestif, gris : branchies et blanc : manteau). Le seuil de positivité est défini par la ligne en pointillés. Maalouf et al., 2010.

### II.5.E. Variations inter-espèces

De la même façon, les différences inter-espèces sont intéressantes et ont rarement été analysées, car moins impliquées dans les contaminations et les épidémies. Des travaux mentionnés à la fin de ce paragraphe ont porté sur l'étude de la variation saisonnière de l'expression des HBGA par les espèces

*C. sikamea* et *C. virginica*. Bien que supérieure au cours de la période avril-octobre, leur expression des HBGA de type A n'est pas significativement différente de la période novembre-mars. En revanche *C. virginica* exprimerait plus d'HBGA de type O (antigène H1) durant la période épidémique. Ces données sont à explorer pour étudier les mécanismes de bioaccumulation des autres espèces, qui présentent potentiellement des différences majeures avec ceux de *C. gigas*, bien plus étudiée depuis des années, et le rôle de la salinité de l'eau semble impacter particulièrement la capacité de bioaccumulation des différentes espèces (Maalouf et al., 2010; Nappier et al., 2008; Tian et al., 2008).

## II.6. Différences d'affinités entre norovirus et HBGA

### II.6.A. Selon les souches

Le mécanisme précis de bioaccumulation reste donc difficile à modéliser, et les liens entre reconnaissances de motifs HBGA et capacité à s'accumuler dans les tissus d'huîtres sont encore complexes à établir. L'une des façons d'approfondir les connaissances sur ce sujet est l'utilisation d'HBGA synthétiques afin d'analyser les interactions avec des VLP ou des dimères du sous-domaine P de la capsid de différentes souches de norovirus. Ces données peuvent potentiellement être transposées aux huîtres, dont on peut suivre l'expression des glycanes et donc les souches qui vont interagir avec ces tissus.

Comme résumé dans le **tableau 3** suivant, une équipe a pu démontrer que certaines souches liaient ou non des HBGA synthétiques ou provenant de salives de personnes en fonction de leur appartenance à certain génotype ou génogroupe (Morozov et al., 2018).

	A	B	H type 1	Lewis a	Lewis b	Lewis x	Lewis y
GI.1 West Chester	+	-	+	-	+	-	-
GII.4 Sydney	-	+	+	-	+	-	+
GII.17 Kawasaki308	+	+	+	-	+	-	-

*Tableau 3 : Résumé des affinités entre certaines souches de norovirus et les HBGA (synthétiques et salivaires) à partir des résultats d'expérimentations conduites par Morozov et al. 2018. Des HBGA synthétiques couplés à du polyacrylamide et biotinylés ont été utilisés, ainsi que des échantillons de salive dilués au 1:50. Les VLP liées aux HBGA présents sont révélées par anticorps secondaires couplés à la peroxydase.*

Cependant, ces données d'affinités sont à considérer avec précaution, car d'autres travaux identifient des résultats partiellement différents. Tout d'abord, la souche GII.17 reconnaît à priori un spectre

d'HBGA assez large, ce qui expliquerait son succès épidémiologique lors de l'apparition de certains variants mentionnés précédemment. Toutefois elle est peu retrouvée dans les huîtres, probablement pour deux raisons : d'une part elle n'interagit que sur les tissus digestifs d'un seul individu *C. gigas* parmi les 4 testés (Villabruna et al., 2020), voire ne démontre aucune liaison avec les différents tissus (digestif, branchies, manteau ou palpes labiaux) dans l'étude d'où provient le tableau (Morozov et al., 2018). D'une autre part, GII.17 circule beaucoup moins dans la population par rapport à la période de son émergence, entre 2014 et 2016 selon les pays, et est désormais minoritaire dans la population (Anfruns-Estrada et al., 2022; Fang et al., 2022; Farahmand et al., 2022). Malgré tout, cette souche a pu être identifiée dans des palourdes et dans des huîtres par le passé, la consommation de ces dernières ayant donné lieu à des contaminations humaines (Koo et al. 2017 ; Rasmussen et al. 2016 ; La Rosa et al. 2017 ; Pu et al. 2016).

De la même façon, les résultats qu'affichent le tableau sur les affinités de GII.4 Sydney avec les HBGA de type A sont également à considérer avec prudence. La souche GII.4 Sydney a en effet prouvé sa capacité à lier des HBGA de type A à de nombreuses reprises, et les variants successifs de ce génotype ont progressivement acquis une capacité d'interaction avec ces glycanes de plus en plus importante, preuve de son succès épidémiologique conféré par l'obtention de mutations successives impliquant les régions de la capsidie qui interagissent avec ces facteurs d'attachements (Liang et al., 2021; Villabruna et al., 2020; Wegener et al., 2017).

Nous pouvons également mentionner les phénomènes de modifications post-traductionnelles qui ont lieu au niveau des dimères de sous-domaine P des protéines de capsidie utilisés dans certaines expériences de liaison avec des glycanes. Pour les souches GII.4, le résidu N373 se modifie en iso-aspartate dans un laps de temps qui peut atteindre moins de deux jours selon la température. Cette modification concerne un site impliqué dans la reconnaissance des résidus fucose et modifie donc les capacités d'interaction de ces dimères avec les différentes molécules de type glycanes, ce qui peut impacter les conclusions obtenues (Mallagaray et al., 2019).

### **II.6.B. Dans les huîtres**

Des différences entre la capacité des différentes souches à interagir avec les tissus d'huître ont été observées. On peut alors citer la présence de VLP GI.1 (Norwalk 8IIFa et Chester) principalement dans les organes digestifs après bioaccumulation expérimentale, tandis que les VLP GII.4 (Houston et Sydney) sont retrouvées dans tous les organes (branchies, manteau, palpes labiaux, organes digestifs) (Maalouf et al., 2010; Morozov et al., 2018). Ces données suggèrent que les souches GII.4

reconnaissent un ligand supplémentaire par rapport aux souches GI.1, probablement associé à des acides sialiques (Maalouf et al., 2010).

Des expériences de bioaccumulation à l'aide de souches virales provenant de selles de patients ont également permis d'explorer ces mécanismes. L'analyse quantitative des concentrations virales retrouvées selon les organes extraits ont permis de n'identifier du norovirus GI.1 (Norwalk 8FIIa) exclusivement dans le tissu digestif, tandis que les souches GII.3 (Toronto) et GII.4 (Houston) sont retrouvées dans les branchies, le manteau et le tissu digestif après 24 heures. La souche GII.3 est alors présentée comme adoptant un comportement différent de GII.4 car elle n'est présente que de façon transitoire dans les branchies et le manteau, et n'est retrouvée que dans le tissu digestif après 24 heures (Maalouf et al., 2011). La capacité de GII.4 à être bioaccumulée est différente entre les études et les souches utilisées : la présence de GII.4 (Beijing 2007) dans tous les tissus étudiés à des concentrations importantes a été observée après 48h de bioaccumulation (Su et al., 2018).

### II.6.C. Un phénomène de sélection

Ces différences d'affinité pour les tissus d'huîtres entre les souches pourraient être la cause du contraste épidémiologique dans le cas des contaminations par consommation d'huîtres.

Les différentes revues et les rapports du réseau de surveillance NoroNet rapportent que plus de 90% des cas sporadiques dans la population humaine sont causés par des souches du génogroupe GII, et moins de 10% par des souches GI (Hoa Tran et al., 2013; van Beek et al., 2018).

Pourtant, on relève des proportions d'environ 66% de souches GII contre 33% de souches GI parmi les séquences échantillonnées à partir d'huîtres ou de personnes contaminées par consommation de ces mollusques entre 1983 et 2014 (Yu et al., 2015). Ces données pourraient révéler un phénomène de « sélection » des souches virales bioaccumulées par les huîtres, ce qui avait été suggéré dès 2012 face à la proportion importante de cas causés par des souches de génogroupe GI associés à la consommation d'huîtres (Le Guyader et al., 2012). Ce phénomène se révèle en favorisant l'accumulation dans ces mollusques de souches qui sont pourtant moins présentes parmi les cas sporadiques dans la population humaine, dont la transmission s'effectue par voie féco-orale.

Les souches de génogroupe I sont ainsi sur-représentées dans les coquillages contaminés, avec des pourcentages de détection pouvant atteindre 6 à 8% pour GI.2 et GI.4 (Chassaing et al., 2020), comme représenté sur la **figure 44**. Une étude diligentée par l'EFSA publiée en 2022 a également étudié la diversité des souches de norovirus présente dans des lots d'huîtres contaminées de plusieurs pays, et a révélé des phénomènes similaires : GI.4 étant retrouvé dans au moins 43% des échantillons des 6

pays confondus. GI.1 et GI.2 étaient également retrouvées dans de très nombreux échantillons, avec cependant une variabilité plus importante entre les pays d'origine (Ollivier et al., 2022).

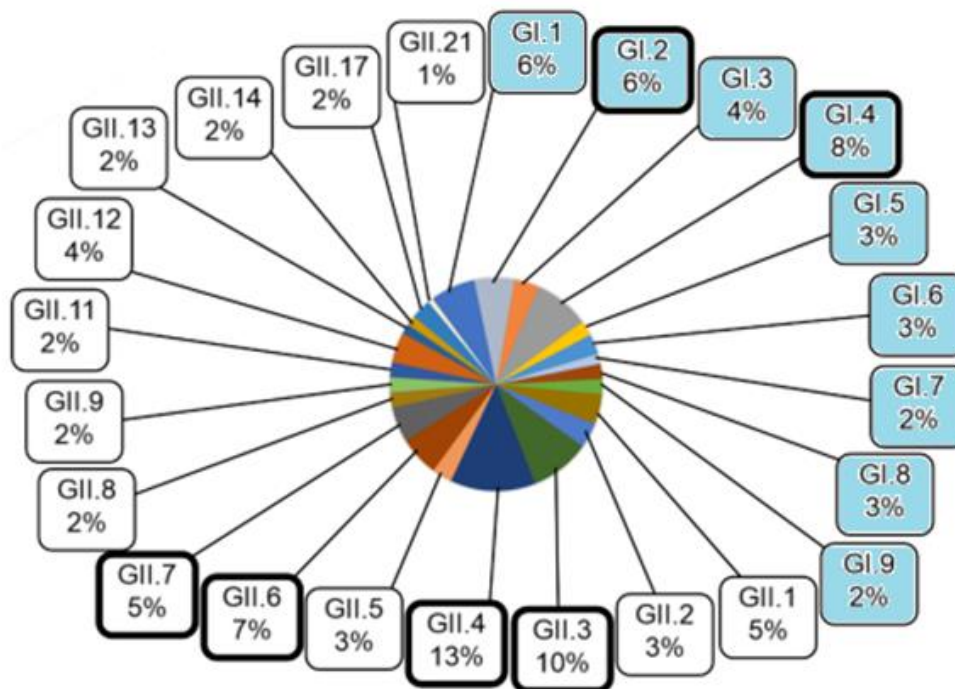


Figure 44 : Génotypes de norovirus humains détectés dans les huîtres d'après une compilation de 26 rapports publiés entre 2005 et 2016 concernant des épidémies causées par la consommation d'huîtres. Les souches appartenant au génogroupe I sont en bleu ciel et les bords épais indiquent des souches détectées dans plus de 5% des échantillons. Chassaing et al. 2020.

#### II.6.D. Biais et limites

Les données épidémiologiques permettant d'évaluer la proportion des différentes souches circulantes au sein de la population sont limitées par plusieurs facteurs qui peuvent favoriser l'apparition de biais en faveur de certaines souches. Les norovirus GII.4 sont suspectés d'entraîner une sévérité plus importante de l'infection par rapport à d'autres génotypes (durée des épisodes diarrhéiques ou des vomissements par exemple), ce qui pourrait conduire à une sur-représentation de certaines souches par rapport à d'autres (Bhavanam et al., 2020; Duan et al., 2021).

La nature même de l'infection par norovirus ou sapovirus conduit à une sous-déclaration des cas, liée à la résolution rapide des symptômes et à une sévérité modérée dans la population sans facteur de



risque particulier (Bernard et al., 2014; Ondrikova et al., 2021). De plus, ces infections sporadiques sont rarement à déclaration obligatoire, sauf lorsqu'elles concernent des cas multiples liés à la consommation d'un même produit alimentaire (toxi-infection alimentaire, TIAC).

## **II.7. Interactions entre souches virales et environnement**

### **II.7.A. Circulation des souches animales**

Les norovirus de génotype GIII.1 et GIII.2 infectant les bovins circulent de façon plus ou moins importante au sein des troupeaux selon les pays considérés, avec des taux de détection pouvant atteindre 49% des échantillons de fèces analysés comme en Norvège (Jor et al., 2010). Ces virus sont rejetés dans l'environnement par les animaux infectés et peuvent être retrouvés dans des échantillons d'eau de mer provenant d'estuaires proches de zones d'élevage bovins (Zakhour et al., 2010). Ainsi, 14% des échantillons d'eau analysés contenaient des norovirus GIII, contre respectivement 7% et 24% pour les génogroupes GI et GII infectant l'Homme, ce qui laisse penser que ces souches circulent de façon aussi importante que les souches humaines sur le littoral. Des souches bovines ont pu être identifiées de façon très anecdotique dans un échantillon d'huîtres (1/47), et ces dernières n'expriment pas non plus le ligand HBGA spécifique aux souches bovines (épitope  $\alpha$ Gal), ce qui n'exclut pas une bioaccumulation transitoire non-spécifique (Zakhour et al., 2010). Concernant d'autres espèces animales, un norovirus d'origine canine (GVII) a été identifié à partir d'échantillons provenant d'eaux usées en Uruguay en 2015 (Lizasoain et al., 2015).

Cette dernière étude a également mis en évidence la présence de sapovirus porcin dans des tissus d'huîtres américaines destinées à être commercialisées. De la même façon, les élevages de porcs peuvent contribuer à cette excrétion de norovirus et sapovirus dans l'environnement (Keum et al., 2009; Laconi et al., 2020).

Ce type de surveillance est rarement effectué mais met en lumière la co-circulation de souches animales et humaines dans l'environnement, et la possible co-infection de consommateurs de coquillages par des souches qui pourraient recombinaison entre elles, ou voir l'émergence d'une souche zoonotique par des phénomènes similaires (Costantini et al., 2006).

### **II.7.B. Souches animales et HBGA**

La capacité de certaines souches de norovirus à interagir avec des motifs HBGA spécifiques permet d'évaluer une partie de leur potentiel zoonotique. Par exemple, les norovirus bovins interagissent de façon préférentielle avec un glycanes (épitope  $\alpha$ Gal) qui n'est pas exprimé par les membres de la

famille des Hominidés, car le gène codant associé *GGTA1* a subi de nombreuses mutations conduisant à son inactivation il y a environ 28 millions d'années (Macher and Galili, 2008; Zakhour et al., 2009). Cette absence de ligand spécifique permet donc de limiter la possible transmission zoonotique des souches bovines à l'Homme. Malgré tout, le rôle exact des HBGA n'est toujours pas connu dans les mécanismes d'infection des norovirus, et d'autres molécules exprimées par de nombreuses espèces comme les acides sialiques semblent également jouer un rôle, même mineur, dans la liaison des particules de norovirus bovins (Mauroy et al., 2011).

En revanche, des VLP de souches de norovirus canins sont capables d'interagir avec des antigènes de type A et H, et des VLP de norovirus humains GI et GII sont capables de se lier sur des coupes de duodénum canins (Caddy et al., 2014; Villabruna et al., 2020). Les souches porcines GII.11 et GII.19 n'ont aucune interaction avec les HBGA humains, mais il est possible d'induire cette capacité d'interaction en mutant certains acides aminés situés dans le domaine P2 des capsides (Yang et al., 2019). Enfin, les souches provenant de chauve-souris sont peu connues mais il semble que certaines interagissent faiblement avec des HBGA classiquement exprimés par l'Homme, ainsi que des acides sialiques de type alpha2,6 (Kocher et al., 2018). Les tissus digestifs de pipistrelle sont en revanche capables d'interagir avec la vaste majorité des VLP de norovirus humains (Villabruna et al., 2020). Ces différentes interactions sont résumées sur la **figure 45**, et rappellent la nécessité d'une surveillance accrue pour déceler l'apparition de mutations particulières qui pourraient permettre à certaines souches d'infecter des hôtes inhabituels, pouvant être à l'origine d'épidémies inter-espèces.

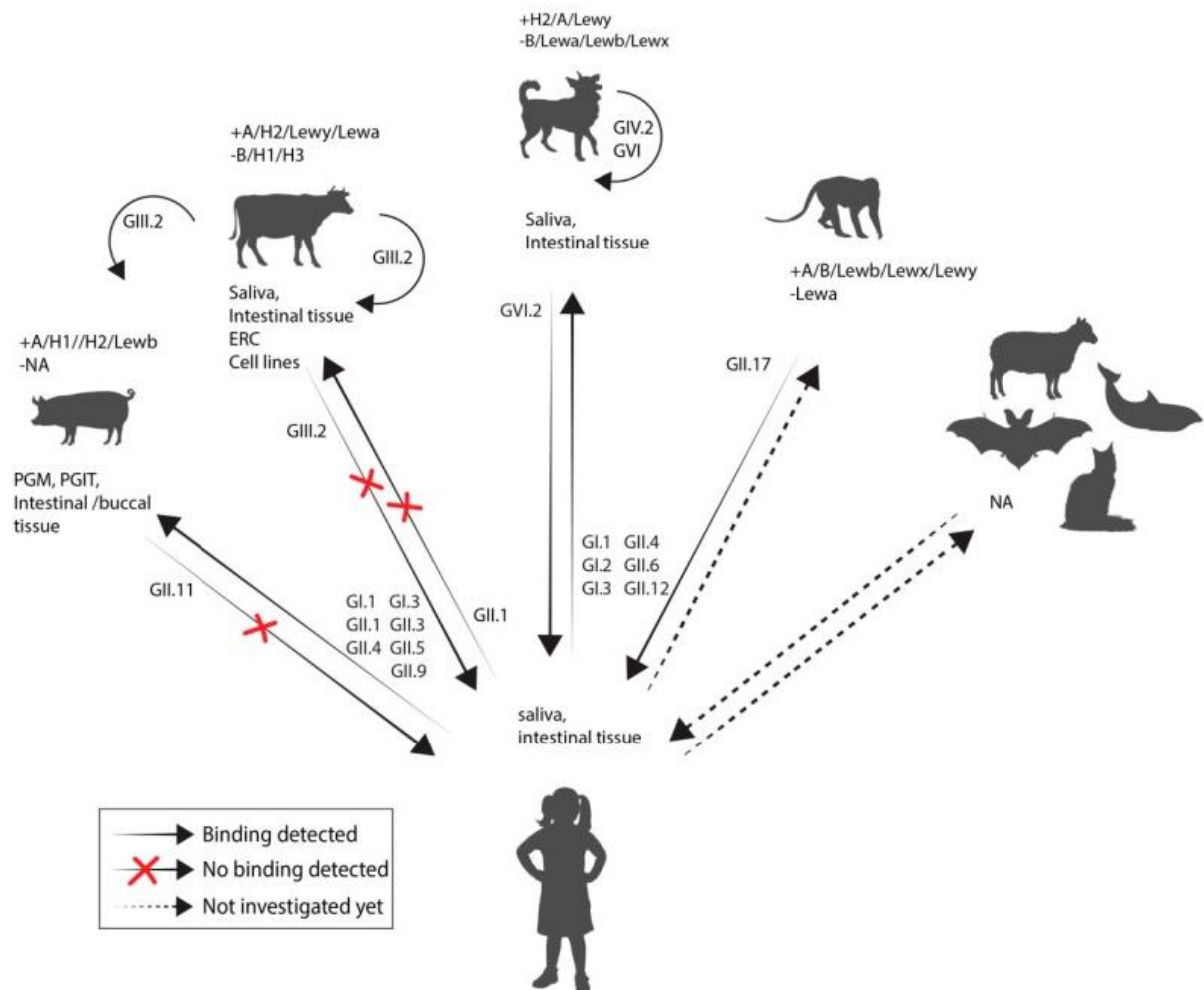


Figure 45 : Résumé des études portant sur l'interaction entre des VLP de norovirus d'origines animale et humaine avec les tissus des différentes espèces investiguées. La présence des HBGA de différents types chez les espèces indiquées est indiquée par le signe « + » et leur absence par le signe « - ». Les lignes pleines indiquent une liaison identifiée, la croix rouge l'absence d'interaction et les pointillés les données qui restent à acquérir. Villabruna, Koopmans, et de Graaf 2019.

### II.7.C. Autres interactions

Il a été suggéré que de nombreuses espèces bactériennes interagissent avec des VLP de norovirus sans réelle compréhension du phénomène sous-jacent, avec des VLP capables de lier les pilis ou les membranes des bactéries de très nombreuses espèces (**Figure 46**) (Almand et al., 2017b).

Une bactérie du genre *Pseudomonas*, particulièrement représenté parmi les communautés bactériennes résidentes sur les laitues, a démontré sa capacité à synthétiser des substances similaires aux HBGA humains sous forme d'exopolysaccharides capables de lier différents VLP de norovirus (Deng and Gibson, 2017; Liu et al., 2020). Cette capacité a également été observée chez des souches du

genre *Enterobacter*, dont les EPS sécrétés interagissent avec les norovirus de façon extrêmement variable (Almand et al., 2019, 2017b). Ces bactéries peuvent faire partie du microbiote intestinal et leur abondance au sein d'un hôte a même été suggérée en tant que facteur de risque à l'infection par norovirus (Magwira et al., 2021; Miura et al., 2013b).

Il est important de rappeler que certaines de ces bactéries sont excrétées dans les fèces par les hôtes infectés, au même titre que les norovirus. La présence de bactéries d'origine fécale mais également des bactéries environnementales peut donc jouer un rôle dans la dispersion et la persistance des norovirus par des mécanismes d'interactions virus-bactéries qui restent encore à élucider (Amarasiri and Sano, 2019; Li et al., 2015; Xu et al., 2021).

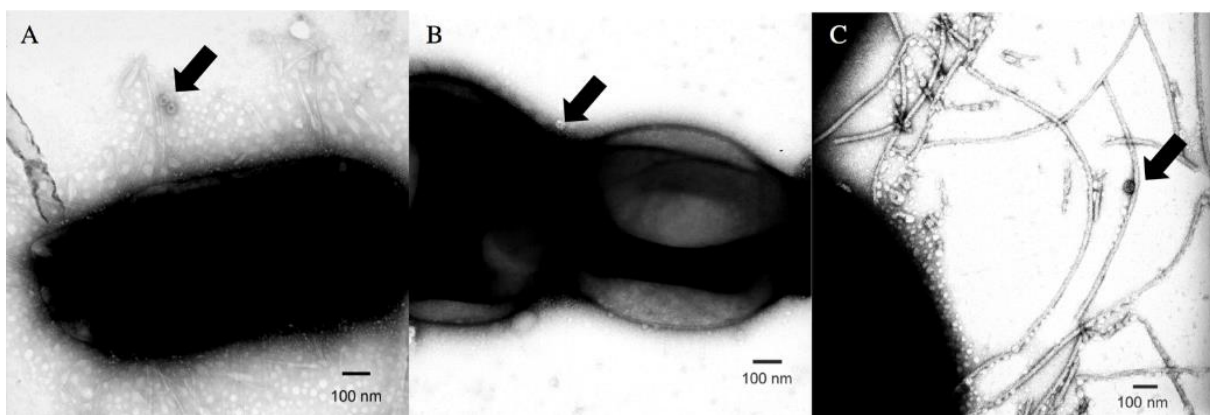


Figure 46 : Images de bactéries interagissant avec des VLP de norovirus GII.4 Sydney obtenues par microscopie électronique à transmission (x50 000). Les souches bactériennes utilisées sont A) *E. cloacae* B) *S. aureus* et C) *Bacillus spp.* Almand et al. 2017.

## II.8. Résistance des particules virales

### II.8.A. A la décontamination

Les norovirus sont considérés depuis longtemps comme des virus très contagieux et résistants, du fait de la capacité de leur capsid virale à supporter les traitements chimiques comme la chloration de l'eau (Keswick et al., 1985). Il était alors suggéré que les norovirus humains étaient résistants à des doses allant jusqu'à 10mg de chlore par litre d'eau, mais des études plus récentes semblent contrebalancer ces données, avec des réductions importantes du génome viral dans l'eau à des concentrations de chlore 10 à 20 fois inférieures à ces 10mg (Kitajima et al., 2010; Shin and Sobsey, 2008). Toutefois ces données ne permettaient pas d'étudier l'impact du chlore sur le caractère infectieux des particules virales et extrapolaient les résultats obtenus grâce au norovirus murins. L'étude du modèle entéroïde

humain permet de rendre compte que des concentrations de 50mg/L de chlore inactivait totalement la capacité de deux variants distincts de GII.4 (Den Haag et Sydney) à répliquer sur les cellules. En revanche des concentrations de 5mg/L n'ont pas d'effet significatif sur le caractère infectieux de ces souches. Pour le cas de l'utilisation d'éthanol, même un traitement de 5 minutes des inoculum viraux avec de l'éthanol 70% ne réduit que très légèrement les titres viraux obtenus après 72 heures d'infection du modèle entéroïde intestinal humain. (Costantini et al., 2018).

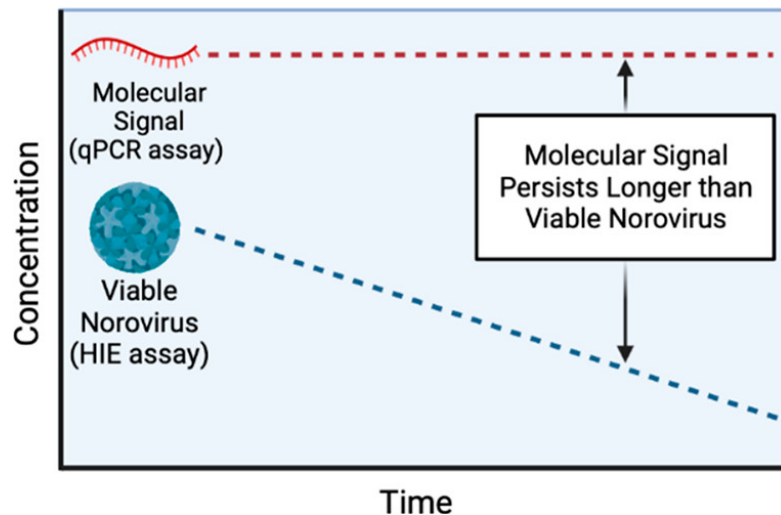
La sensibilité génétique de chaque individu en fonction de son profil sécréteur ou de son statut HBGA peut également impacter la capacité de chaque souche à l'infecter de façon plus ou moins efficace (Nordgren and Svensson, 2019). Malgré tout, le caractère infectieux du norovirus reste extrêmement élevé, particulièrement chez les personnes avec un phénotype sécréteur positif (Le Guyader et al., 2010; Teunis et al., 2020).

En raison de l'absence durant des décennies d'un modèle de culture cellulaire du sapovirus humain, les données sur le sujet ne sont pas disponibles et doivent être extrapolées à partir des résultats obtenus grâce au sapovirus porcin. Celui-ci semble présenter une résistance similaire aux norovirus en cas de traitement par hypochlorite de sodium, ainsi qu'à des pH acides (Wang et al., 2012).

### **II.8.B. Dans l'environnement**

Les norovirus étant des virus non-enveloppés, leur capacité de résistance dans l'environnement reste importante (Vasickova et al., 2010). Une différence doit être apportée entre la capacité de persistance des particules virales et la capacité de la particule virale à rester infectieuse, la détection par RT-qPCR ne couvrant qu'une certaine zone du génome, et ignorant le statut d'intégrité de la capsid virale ou de l'intégrité du génome. Des particules de norovirus humains peuvent rester infectieuses durant des dizaines de jours et persister pendant des centaines de jours dans des échantillons d'eau souterraine ou d'eau minérale laissés à 4°C dans le noir, et l'utilisation du modèle entéroïde a permis de mesurer la décroissance plus rapide du potentiel infectieux des virions (**Figure 47**) par rapport à leur détection génomique dans le milieu (Seitz et al., 2011; Shaffer et al., 2022). De nombreux virus entériques démontrent des capacités similaires, que ce soit les poliovirus, coxsackievirus, adenovirus ou astrovirus, qui ont tous démontré une persistance de leur détection voire de leur caractère infectieux sur le long terme dans des eaux souterraines (Charles et al., 2009; Espinosa et al., 2008). La persistance dans l'eau de mer est également reconnue, avec un caractère infectieux pouvant se maintenir pendant une trentaine de jours pour les souches de norovirus GII.3 et GII.4 (Desdouits et al., 2022). La capacité de ces virus à persister sur les surfaces est également importante : une étude de 2004 a démontré qu'il

était possible de contaminer à la suite 7 surfaces différentes par simple contact cutané (Barker et al., 2004). De plus, la désinfection de ces surfaces à l'aide d'hypochlorite de sodium s'est démontrée moins efficace lorsque les virus étaient associés à de la matière organique, simulée par du fluide gastrique artificiel. L'agrégation des particules virales sur les surfaces contaminées ainsi que l'effet protecteur qu'exerce le fluide dans lequel se trouve ces particules expliquerait ce manque d'efficacité des protocoles de désinfection (Djebbi-Simmons et al., 2020). Des données similaires restent à acquérir pour les sapovirus humains afin d'identifier ses caractéristiques.



*Figure 47 : Illustration schématique de la différence entre la quantification de génome de norovirus dans l'environnement par rapport à son infectiosité sur le modèle cellulaire des entéroïdes intestinaux au cours du temps. Son potentiel infectieux décroît bien plus rapidement que sa détection par biologie moléculaire. Shaffer et al. 2022.*

## **Objectif des travaux de thèse**

Mes travaux se sont divisés en deux axes, tous deux rattachés à la question centrale des glycanes dans leurs interactions avec les virus entériques étudiés (norovirus et sapovirus).

Le premier axe concerne l'étude de la nature et du rôle des glycanes dans les interactions norovirus – huîtres. Il repose sur un développement méthodologique important permettant l'étude des cellules d'huîtres dissociées de leurs tissus, qui a fait l'objet d'un article soumis à *Journal of Experimental Biology* (article 1). Cette méthode a ensuite permis d'apporter des résultats originaux quant aux interactions entre norovirus et glycanes HBGA d'huîtres à l'échelle cellulaire.

Dans le deuxième axe, j'ai tiré parti du modèle d'entéroïdes humains afin d'identifier des souches de sapovirus capables de s'y répliquer. Ce modèle m'a permis d'étudier le tropisme des sapovirus humains et de leurs interactions avec les glycanes HBGA sur les cellules humaines. Ces travaux ont donné lieu à un article accepté pour publication dans *Journal of Virology* (article 2).

### **III. Travaux originaux**

#### **III.1. Rôle des glycanes dans les interactions entre huîtres et norovirus**

Cette thèse s'inscrit dans le cadre du projet GOyAVE (Glycans and Oysters Attachment to enteric Viruses in the coastal Environment) financé par l'ANR (*n°19-CE35-0014-01*). Ce projet s'articule autour des interactions particulières entre les huîtres creuses *C. gigas* et les norovirus, via l'expression de glycanes de type HBGA dans les tissus de ces mollusques. L'une des principales hypothèses est que la nature spécifique des HBGA présents dans les huîtres favoriserait l'accumulation de certaines souches virales présentes dans l'environnement littoral avec pour conséquence la sélection de ces souches. Ces glycanes doivent donc être étudiés à travers diverses approches pour répondre à certaines questions, notamment sur leur structure moléculaire. Leur localisation dans les huîtres ainsi que leurs capacités d'interactions avec différentes souches de norovirus sont étudiées dans mes travaux.

##### **III.1.A. Développement d'un protocole pour isoler des cellules viables des tissus d'huîtres**

###### **Objectifs de l'étude et résultats principaux**

L'objectif principal de cette étude est de mettre au point un protocole permettant d'isoler des cellules individuelles à partir de tissus d'huîtres, pour pouvoir par la suite étudier les interactions entre huîtres et virus au niveau cellulaire. Nous avons mis au point une méthode de dissociation mécanique des tissus d'huîtres provenant de différents organes (glande digestive, manteau, branchies) qui a démontré l'obtention d'une fraction de cellules vivantes importante, mise en évidence par l'utilisation d'un marqueur de l'activité métabolique. Les cellules obtenues ont pu être marquées par une lectine reconnaissant des glycanes HBGA, de façon reproductible. Ce changement d'approche permet ainsi d'ouvrir de nouvelles pistes d'études. Il est alors possible de suivre l'expression de certaines molécules par les cellules d'huîtres grâce à des lectines ou des anticorps, dont la détection sera assurée par cytométrie en flux. Cette approche est potentiellement applicable à d'autres domaines et d'autres organismes.



1        **1. Title page**

2

3        **Isolation of live single cells from oyster tissues for flow cytometry**

4

5        **Authors**

6        Gabriel Euller-Nicolas<sup>a</sup>, Françoise S. Le Guyader<sup>a</sup> and Marion Desdouits<sup>a,#</sup>

7

8        **Affiliations**

9        <sup>a</sup> MASAE Microbiologie Aliment Santé Environnement, Ifremer, FR-44000 Nantes, France

10       # corresponding author : MD - [marion.desdouits@ifremer.fr](mailto:marion.desdouits@ifremer.fr) - IFREMER, laboratoire Santé  
11       Environnement Microbiologie (LSEM), unité MASAE, rue de l'île d'Yeu, 44311 Nantes CEDEX 03.

12

13       **Keywords**

14       Oyster, shellfish, tissue dissociation, single cell, flow cytometry

15

16

17       **2. Abstract**

18       Oysters represent an important food source and aquaculture economy worldwide. This filter-  
19       feeding bivalve is known for its capacity to accumulate compounds available in its  
20       environment such as trace metals or pathogenic microorganisms that can lead to either oyster  
21       or human diseases. Most studies on oysters are conducted on whole animals or at a tissular  
22       level, as organs can be isolated by anatomic dissection, but not on individual cells. We  
23       developed a method to mechanically dissociate oysters' organs, allowing the recovery of  
24       viable cells from each tissue that can be used for further experiments such as fluorescent  
25       staining and flow cytometry analysis. A metabolic viability assay showed recovery of up to 80%  
26       of viable cells from three organs: digestive gland, gills and mantle. Live isolated cells can be  
27       stained with lectins or antibodies for flow-cytometry experiments, allowing further  
28       investigations of oyster interactions with its environment and exogenous factors.

29

30

### 31           **3. Introduction**

32   Oysters are filter-feeding bivalves from the *Ostreida* family that live in saline waters from bays  
33   and coastal estuaries. Local species are harvested or farmed worldwide for feeding human  
34   populations. The *Crassostrea gigas* species is native to the Pacific coast of northeast Asia and  
35   has been successfully introduced in many countries in order to supplement depleted stocks of  
36   native species such as *Ostrea edulis* in France (Buestel et al. 2009). According to Food and  
37   Agriculture Organization, worldwide production was estimated at more than 4 million tons  
38   per year, with China being the leading producer followed by South Korea, Japan and France  
39   (FAO 2022).

40   The life cycle of oysters involves several development steps, from a larval stage after hatching  
41   to the permanent attachment to bedrock, allowing metamorphosis into spat and organs  
42   growth. Oysters feed by creating a water current that direct food particles present in the  
43   surrounding seawater to their labial palps. Most of those particles are microalgae and are  
44   directed towards the digestive gland, where a mechanical and enzymatic digestion takes place  
45   (Evan Ward et Shumway 2004). Smaller particles suspended in water such as microbial  
46   pathogens can also be ingested by oysters, causing potential sanitary issues. Accumulation of  
47   human enteric viruses such as norovirus, or pathogenic bacteria such as some *Vibrio* or  
48   *Salmonella* species by oysters can lead to hundreds of thousands of foodborne infections each  
49   year, and even fatal cases (Pouillot et al. 2022; Froelich et Noble 2016; Williams et O'Brien  
50   2020). Accumulation of trace metals in oysters such as copper or lead has been extensively  
51   documented, and growing anthropic pressure on coastal environment might contribute even  
52   more to this external pollution in the future (Wang et al. 2022). Oyster farming is also  
53   impacted by oyster pathogens, such as ostreid herpesvirus 1, bacteria from the *Vibrio* genus,  
54   and protist parasites (Segarra et al. 2010; Petton et al. 2021; Itoiz et al. 2022).

55   To this date, only a single immortalized cell line has been isolated from molluscan organisms  
56   (Maramorosch 2012). Isolating live molluscan cells may thus contribute the development of  
57   cell cultures. In addition, primary molluscan cell cultures present numerous challenges and  
58   are quickly subject to senescence (Yoshino, Bickham, et Bayne 2013). Oyster cell isolation can  
59   also be useful for direct cellular studies independently of cell culture, for instance using flow  
60   cytometry. The method presented here may provide new tools for various fields of research  
61   such as ecotoxicology, microbiology, or the study of genetic resistance to pathogens that  
62   negatively impact the aquaculture economy. Working on a cellular level instead of working on  
63   chemically fixed tissues or whole animals can indeed provide further information for  
64   researchers about metabolism, functions, stress and cellular interactions with exogenous  
65   factors.

66

### 67           **4. Material and methods**

68   **Oysters processing.** Adult Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) were grown in an experimental  
69   oyster farm (Plate-Forme Mollusque Marin de Bouin, Ifremer, France) or bought at a local  
70   retail. Shells were brushed to remove algae and deposits and oysters were depurated for 3  
71   days in tanks filled with aerated seawater (0,5L per oyster) in a temperature-controlled room

72 at the laboratory, without feed. Seawater may be replaced several times to ensure removal of  
73 particles and pseudo-feces rejected by oysters.

74 Oysters were then shucked and dissected on ice: digestive tissue, gills and mantle were  
75 isolated from at least 3 individuals for each studied batch. Corresponding tissues were pooled,  
76 finely chopped with a sterile scalpel and weighed.

77 **Solution preparation.** Two solutions were used through this protocol: Calcium/Magnesium  
78 Free Saline (CMFS) (Faucet et al. 2003) for cell dissociation and Marine Mollusc Balanced Salt  
79 Solution (MMBSS) (Machii et Wada 1989) for cell recovery. Both solutions are prepared  
80 according to **Table 1** with volumes adjusted to 1L with sterile water and pH adjusted to 7 with  
81 HCl or NaOH. For long-term storage, these solutions were sterile-filtered on a 0.22 µm filtering  
82 unit (VWR). An additional solution of marine PBS is used for lectin, antibodies or viability assay  
83 staining and can also be found in **Table 1**.

84 **Mechanical dissociation of tissues.** Procedures are performed with cold solutions. Tissue and  
85 cells are always kept on ice or at 4°C until use, unless stated otherwise. GentleMACS C-tube  
86 (Miltenyi Biotec) were filled with 0.5 g of pooled tissues and 5mL of CMFS. Tubes were placed  
87 onto the GentleMacs Dissociator (Miltenyi Biotec) and tissues were dissociated for 1 min with  
88 the “m-spleen-01” program provided by the manufacturer.

89 **Removal of debris and single cells recovery.** After completion, tubes were opened and 5mL  
90 of MMBSS was added. Remaining undissociated tissues and debris were filtered-out on a 40  
91 µm cell strainer (Fisher Scientific) adapted on a 50 mL tube where single cells were collected.  
92 Cells were centrifugated at 400g for 5min at 4°C twice, keeping the cell pellet and removing  
93 the supernatant. Cell pellets were resuspended in 5mL of MBSS after the first centrifugation  
94 step, and in 2 mL of MMBSS after the second one. Cell concentration was estimated using an  
95 optic microscope (Axiovert 40C, Zeiss) and a KOVA Glasstic Slide 10 counting chamber (Fisher  
96 Scientific). MMBSS was added to the cell suspension to adjust the concentration between 10<sup>3</sup>  
97 to 10<sup>4</sup> cells per µL.

98 **Cells marking for flow cytometry experiments.** 100µL of each cell suspension was deposited  
99 in wells from a 96 well plate with round bottom (VWR) for each condition. Plate was  
100 centrifugated at 500g for 5 min at 4°C and supernatants were discarded by quickly flicking the  
101 plate. A small ring-shaped pellet should be visible for each type of tissue (brownish for  
102 digestive organ, white for mantle and gills). The biotintylated lectin BC2L-C-Nt from *B.*  
103 *ceenocepacia* (provided by collaborator Adrien Breiman and Jacques le Pendu, CRCINA, INSERM  
104 UAR 016 / CNRS UAR 3556 / UMR\_S 1302) was incubated with cells at 5µg/mL in 50µl marine  
105 PBS per well, for 1 h at 4°C. After incubation, cells were washed 3 times: plate was  
106 centrifugated at 500g for 5 min at 4°C, flicked and cells resuspended in 100 µL marine PBS.  
107 After the third centrifugation, cells were resuspended in 50µL of marine PBS with 2µg/mL  
108 AF647-conjugated streptavidin (InVitrogen) and incubated for 30 min at 4°C in the dark. Cells  
109 were washed 3 times as previously described and resuspended in 50 to 200µl of marine PBS  
110 depending on the pellet size.

111 **Viability assay.** For each tissue, a cell death positive control was obtained by heating 100µL of  
112 unstained cells at 60°C for 15 min. Calcein acetoxymethyl ester (Calcein-AM) (Biotium) was

113 added on heat-treated and live cells at 400nM final concentration in marine PBS and incubated  
114 for 10 min at room temperature in the dark before data acquisition with a flow cytometer.

115 **Flow cytometry analysis.** Cells were analysed using a MACSQuant Analyzer 10 Flow Cytometer  
116 (Miltenyi Biotech). Results were depicted as cell cytograms and reported as log-scale  
117 fluorescence levels of each marker used. Gates were created using size and granularity  
118 discrimination to exclude debris and including the calcein-positive cell population. Calcein-  
119 AM-stained live cells emit green fluorescent light (517 nm) observed in the B1 channel (525/50  
120 nm) and streptavidin AF647-positive cells emits far-red fluorescent light (671 nm) observed in  
121 the R1 channel (655-730 nm). For each sample, at least 10 000 events included in the calcein-  
122 positive gate were acquired. Flow cytometry data were analysed using FlowLogic software 8.7  
123 (Inivai Technologies Pty. Ltd.).

124

## 125 **5. Results and discussion**

### 126 **Recovery of single live cells from three organs of *C. gigas*.**

127 Applying the dissociation procedure described above on the digestive tissue of *C. gigas*  
128 oysters, we obtained a population of cells mixed with remaining debris as observed using a  
129 wide field optic microscope (not shown). Using a flow cytometer, we observed a main  
130 population with homogeneous size and granularity (**Figure 1, A**). Small size events can be  
131 noticed on the lower-right of the figure, and are probably cellular debris or ingested particles.  
132 To check whether the isolated cells were still viable, and further discriminate between cells  
133 and debris, we used the calcein-AM viability assay (Biotium). Flow cytometry analysis of  
134 calcein-AM stained digestive cells showed an high proportion (up to 80%) of cells with calcein-  
135 specific fluorescence, that were not observed with unstained cells or stained dead cells that  
136 were heat-treated (**Figure 1, B**). Calcein-AM conversion into fluorescent calcein reflects the  
137 metabolic activity of live cells. The proportion of live cells recovered from three tissues was  
138 evaluated repeatedly (**Figure 1, C**, n=8 experiments) and was similar between mantle cells  
139 (mean 66.2%, range 51.6 – 81.7%), digestive cells (mean 58.4%, range 44.6 – 80 %), and gill  
140 cells (mean 63.5%, range 50.5 – 76.4). Small differences between tissues or experiments could  
141 be explained by natural heterogeneity and inter-tissue variations, and by the presence of more  
142 debris or alimentary particles in the digestive tissue, that could not be excluded from the  
143 analysis.

144 This protocol allows isolation of single cells from other organs rather than the usually studied  
145 haemocytes. Haemocytes are the only single cells easily obtained from oysters, by  
146 withdrawing haemolymph from the adductor muscle with a syringe, hence their extensive  
147 investigation by numerous publications (Picot et al. 2019; Provost et al. 2011; Martenot et al.  
148 2017). Organs such as digestive gland, mantle and gills have only been studied as a whole, by  
149 dissecting them and/or applying various treatment: enzymatic digestion, chemical fixation and  
150 paraffin embedding, immunohistochemistry, ELISA assay (Shenai-Tirodkar et al. 2017;  
151 Sussarellu et al. 2016; Mcleod et al. 2009; Maalouf et al. 2010). Such treatments might damage

152 oyster cells and potentially impact results. Working on live single cells can avoid some of these  
153 biases and allow to investigate live biological characteristics.

154

### 155 **Lectin binding to isolated single oyster cells**

156 Next, we asked whether viable single oyster cells still displayed their molecular characteristics  
157 and could be stained to investigate antigen expression at a cellular level. For this, we used the  
158 BC2L-C-Nt lectin from bacteria *Burkholderia cenocepacia*, that is known to interact with  
159 human histo-blood group antigens H-type 1, Lewis b and Lewis Y (Šulák et al. 2010). These  
160 oligosaccharides are expressed by human epithelial cells and similar molecules were  
161 previously reported to be present in oysters tissues, notably A type antigen and H type 1  
162 (Morozov et al. 2018; Ma et al. 2018; Yang et al. 2022). As control, cells from three tissues  
163 were incubated with streptavidin coupled to the fluorescent dye AF647 (streptavidin-AF647)  
164 only. The resulting background staining was higher in digestive cells than in cells from the  
165 other tissues, but generally low (**Figure 2, A, B and C, light blue**). Addition of biotinylated BC2L-  
166 C-Nt markedly increased the fluorescent signal, indicative of specific binding of the lectin to  
167 its ligand (**Figure 2, A, B and C, dark blue**). Using digestive cells, we observed an average of  
168 79% of BC2L-C-Nt-bound cells in 5 independent experiments (**Figure 2, D**).

169 Binding of BC2L-C-Nt lectin on isolated oyster digestive cells confirms previous results  
170 indicating that *C. gigas* oysters express molecules similar to H type 1 glycans. Thus, this  
171 protocol provides an additional tool to study the glycan expression of oysters, which is  
172 implicated in interactions between oysters and human viruses such as norovirus (Le Guyader  
173 et al. 2006; Tian et al. 2006; Maalouf et al. 2010).

174 Some improvements in this protocol could refine acquired data. Depuration of oysters in  
175 clean seawater for several days (up to 1 week) may help to reduce the background  
176 fluorescence of digestive cells that is likely due to photosynthetic pigments of microalgae  
177 present in the digestive tract of freshly harvested oysters (Grigoryeva 2019). Use of  
178 fluorescent dyes with an emission peak in another channel might also solve this issue.  
179 Following the dissociation step, filter clogging sometimes happen (depending on the season),  
180 and a pre-filtration on a 70µm cell strainer may prove useful.

181 Here, we applied our protocol to the three main tissues of *C. gigas* oysters, but it also could  
182 be used to study other organs such as the heart or labial palps. Other molluscan bivalve  
183 shellfish species could be investigated similarly, as we successfully applied the protocol to flat  
184 oysters (*Ostrea edulis*) (data not shown). We used the isolated cells in flow cytometry  
185 experiments, but such cells could be subjected to other types of cell-based assays, such as  
186 COMET assay, enzymatic viability assays, immunofluorescence, host-pathogen binding  
187 assays... Therefore, this protocol can find broader applications in previously mentioned fields  
188 such as ecotoxicology, genetics, microbiology, and offers a new way to investigate *C. gigas*  
189 cells interactions with its environment.

190

191

192

## 6. Acknowledgements

193 The authors are grateful to the marine mollusk platform of Bouin (PMMB, unit EMMA,  
194 Ifremer) for providing *C. gigas* oysters used in this study, for their technical help with animals  
195 and the reactivity of the team. We thank Jacques Le Pendu and Adrien Breiman (CRCINA,  
196 INSERM UAR 016 / CNRS UAR 3556 / UMR\_S 1302), for sharing reagents and helpful  
197 discussions.

198

199

## 7. Competing interests

200 The authors declare that they have no known competing financial interests or personal  
201 relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

202

203

## 8. Author contributions

204 Conceptualization and supervision: FSLG and MD. Methodology: GEN and MD. Investigation  
205 and validation: GEN and MD. Funding acquisition: FSLG. Writing – original draft preparation:  
206 GEN. Writing – review and editing: GEN, FSLG and MD. All authors agreed to the final version  
207 of the manuscript.

208

209

## 9. Funding

210 This work was funded by the French National Research Agency (Agence Nationale de la  
211 Recherche, ANR) as part of the project GOyAVE (n°19-CE35-0014-01) coordinated by FSLG.

212

213

## 10. Data Availability

214 Raw cytometry data are available upon request at the corresponding author, MD.

215 A CC-BY public copyright license has been applied by the authors to the present document and its  
216 accompanying figures, for the purpose of Open Access, up to the version accepted for publication.

217

218

## 11. References

- 219 Buestel, D., M. Ropert, J. Prou, et P. Gouletquer. 2009. « History, Status, and Future of  
220 Oyster Culture in France ». *Journal of Shellfish Research* 28 (4): 813-20.  
221 <https://doi.org/10.2983/035.028.0410>.  
222 Evan Ward, J, et Sandra E Shumway. 2004. « Separating the Grain from the Chaff: Particle  
223 Selection in Suspension- and Deposit-Feeding Bivalves ». *Journal of Experimental*

224 *Marine Biology and Ecology*, VOLUME 300 Special Issue, 300 (1): 83-130.  
 225 <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2004.03.002>.

226 FAO. 2022. *The State of World Fisheries and Aquaculture 2022*. FAO.  
 227 <https://doi.org/10.4060/cc0461en>.

228 Faucet, Jérôme, Manuelle Maurice, Béatrice Gagnaire, Tristan Renault, et Thierry Burgeot.  
 229 2003. « Isolation and primary culture gill and digestive gland cells from the common  
 230 mussel *Mytilus edulis* ». *Methods in cell science : an official journal of the Society for*  
 231 *In Vitro Biology* 25 (février): 177-84. <https://doi.org/10.1007/s11022-004-8227-4>.

232 Froelich, Brett A., et Rachel T. Noble. 2016. « *Vibrio* bacteria in raw oysters: managing risks  
 233 to human health ». *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological*  
 234 *Sciences* 371 (1689): 20150209. <https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0209>.

235 Grigoryeva, Natalia. 2019. *Self-Fluorescence of Photosynthetic System: A Powerful Tool for*  
 236 *Investigation of Microalgal Biological Diversity*. *Microalgae - From Physiology to*  
 237 *Application*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.88785>.

238 Itoïz, Sarah, Sebastian Metz, Evelyne Derelle, Albert Reñé, Esther Garcés, David Bass,  
 239 Philippe Soudant, et Aurélie Chambouvet. 2022. « Emerging Parasitic Protists: The  
 240 Case of *Perkinsea* ». *Frontiers in Microbiology* 12 (janvier): 735815.  
 241 <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.735815>.

242 Le Guyader, Françoise S., Fabienne Loisy, Robert L. Atmar, Anne M. Hutson, Mary K. Estes,  
 243 Nathalie Ruvoën-Clouet, Monique Pommepuy, et Jacques Le Pendu. 2006. « Norwalk  
 244 Virus–specific Binding to Oyster Digestive Tissues ». *Emerging Infectious Diseases* 12  
 245 (6): 931-36. <https://doi.org/10.3201/eid1206.051519>.

246 Ma, Liping, Hui Liu, Laijin Su, Feng Zhao, Deqing Zhou, et Delin Duan. 2018. « Histo-Blood  
 247 Group Antigens in *Crassostrea Gigas* and Binding Profiles with GII.4 Norovirus ». *Journal of Oceanology and Limnology* 36 (4): 1383-91.  
 248 <https://doi.org/10.1007/s00343-018-7024-x>.

249 Maalouf, Haifa, Maha Zakhour, Jacques Le Pendu, Jean-Claude Le Saux, Robert L. Atmar, et  
 250 Françoise S. Le Guyader. 2010. « Distribution in Tissue and Seasonal Variation of  
 251 Norovirus Genogroup I and II Ligands in Oysters ». *Applied and Environmental*  
 252 *Microbiology* 76 (16): 5621-30. <https://doi.org/10.1128/AEM.00148-10>.

253 Machii, A., et K. T. Wada. 1989. « Some marine invertebrates tissue culture ». *Invertebrate*  
 254 *cell system application by Jun Mitsuhashi*, 1989, Volume II 1st édition.

255 Maramorosch, Karl. 2012. *Invertebrate Tissue Culture: Research Applications*. Elsevier.

256 Martenot, Claire, Ophélie Gervais, Bruno Chollet, Maryline Houssin, et Tristan Renault. 2017.  
 257 « Haemocytes collected from experimentally infected Pacific oysters, *Crassostrea*  
 258 *gigas*: Detection of ostreid herpesvirus 1 DNA, RNA, and proteins in relation with  
 259 inhibition of apoptosis ». *PLoS ONE* 12 (5): e0177448.  
 260 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177448>.

261 Mcleod, C., B. Hay, C. Grant, G. Greening, et D. Day. 2009. « Localization of Norovirus and  
 262 Poliovirus in Pacific Oysters ». *Journal of Applied Microbiology* 106 (4): 1220-30.  
 263 <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.04091.x>.

264 Morozov, Vasily, Franz-Georg Hanisch, K. Mathias Wegner, et Horst Schrotten. 2018.  
 265 « Pandemic GII.4 Sydney and Epidemic GII.17 Kawasaki308 Noroviruses Display  
 266 Distinct Specificities for Histo-Blood Group Antigens Leading to Different  
 267 Transmission Vector Dynamics in Pacific Oysters ». *Frontiers in Microbiology* 9.  
 268 <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02826>.

270 Petton, Bruno, Delphine Destoumieux-Garzón, Fabrice Pernet, Eve Toulza, Julien de Lorgeril,  
271 Lionel Degremont, et Guillaume Mitta. 2021. « The Pacific Oyster Mortality  
272 Syndrome, a Polymicrobial and Multifactorial Disease: State of Knowledge and Future  
273 Directions ». *Frontiers in Immunology* 12 (février): 630343.  
274 <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.630343>.

275 Picot, Sandy, Benjamin Morga, Nicole Fauray, Bruno Chollet, Lionel Dégrement, Marie-Agnès  
276 Travers, Tristan Renault, et Isabelle Arzul. 2019. « A study of autophagy in hemocytes  
277 of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* ». *Autophagy* 15 (10): 1801-9.  
278 <https://doi.org/10.1080/15548627.2019.1596490>.

279 Pouillot, Régis, Mark Smith, Jane M. Van Doren, Angela Catford, Jennifer Holtzman, Kevin R.  
280 Calci, Robyn Edwards, et al. 2022. « Risk Assessment of Norovirus Illness from  
281 Consumption of Raw Oysters in the United States and in Canada ». *Risk Analysis* 42  
282 (2): 344-69. <https://doi.org/10.1111/risa.13755>.

283 Provost, Keleigh, Brooke A. Dancho, Gulnihal Ozbay, Robert S. Anderson, Gary P. Richards, et  
284 David H. Kingsley. 2011. « Hemocytes Are Sites of Enteric Virus Persistence within  
285 Oysters ▽ ». *Applied and Environmental Microbiology* 77 (23): 8360-69.  
286 <https://doi.org/10.1128/AEM.06887-11>.

287 Segarra, Amélie, Jean François Pépin, Isabelle Arzul, Benjamin Morga, Nicole Fauray, et Tristan  
288 Renault. 2010. « Detection and Description of a Particular Ostreid Herpesvirus 1  
289 Genotype Associated with Massive Mortality Outbreaks of Pacific Oysters,  
290 *Crassostrea Gigas*, in France in 2008 ». *Virus Research* 153 (1): 92-99.  
291 <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2010.07.011>.

292 Shenai-Tirodkar, Prachi S., Mangesh U. Gauns, Mohammad Wassim A. Mujawar, et Zakir A.  
293 Ansari. 2017. « Antioxidant Responses in Gills and Digestive Gland of Oyster  
294 *Crassostrea Madrasensis* (Preston) under Lead Exposure ». *Ecotoxicology and  
295 Environmental Safety* 142 (août): 87-94.  
296 <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.03.056>.

297 Šulák, Ondřej, Gianluca Cioci, Monia Delia, Martina Lahmann, Annabelle Varrot, Anne  
298 Imberty, et Michaela Wimmerová. 2010. « A TNF-like Trimeric Lectin Domain from  
299 *Burkholderia Cenocepacia* with Specificity for Fucosylated Human Histo-Blood Group  
300 Antigens ». *Structure* 18 (1): 59-72. <https://doi.org/10.1016/j.str.2009.10.021>.

301 Sussarellu, Rossana, Marc Suquet, Yoann Thomas, Christophe Lambert, Caroline Fabioux,  
302 Marie Eve Julie Pernet, Nelly Le Goïc, et al. 2016. « Oyster reproduction is affected by  
303 exposure to polystyrene microplastics ». *Proceedings of the National Academy of  
304 Sciences* 113 (9): 2430-35. <https://doi.org/10.1073/pnas.1519019113>.

305 Tian, P., A.h. Bates, H.m. Jensen, et R.e. Mandrell. 2006. « Norovirus Binds to Blood Group A-  
306 like Antigens in Oyster Gastrointestinal Cells ». *Letters in Applied Microbiology* 43 (6):  
307 645-51. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2006.02010.x>.

308 Wang, Lifei, Xuefeng Wang, Haigang Chen, Zenghuan Wang, et Xiaoping Jia. 2022. « Oyster  
309 Arsenic, Cadmium, Copper, Mercury, Lead and Zinc Levels in the Northern South  
310 China Sea: Long-Term Spatiotemporal Distributions, Combined Effects, and Risk  
311 Assessment to Human Health ». *Environmental Science and Pollution Research* 29 (9):  
312 12706-19. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-18150-6>.

313 Williams, S. C., et Sarah J. O'Brien. 2020. « Assessing the Contribution Made by the Food  
314 Chain to the Burden of UK-Acquired Norovirus Infection ».

315 Yang, Min, Lihui Tong, Shanshan Wang, Nan Liu, Feng Zhao, Yong Sun, Guohui Sun, et Deqing  
316 Zhou. 2022. « Gut Microbiota and Transcriptomics Reveal the Effect of Human



317 Norovirus Bioaccumulation on Oysters (*Crassostrea gigas*) ». *Microbiology Spectrum*  
318 10 (4): e00161-22. <https://doi.org/10.1128/spectrum.00161-22>.  
319 Yoshino, T. P., U. Bickham, et C. J. Bayne. 2013. « Molluscan Cells in Culture: Primary Cell  
320 Cultures and Cell Lines ». *Canadian Journal of Zoology* 91 (6).  
321 <https://doi.org/10.1139/cjz-2012-0258>.  
322

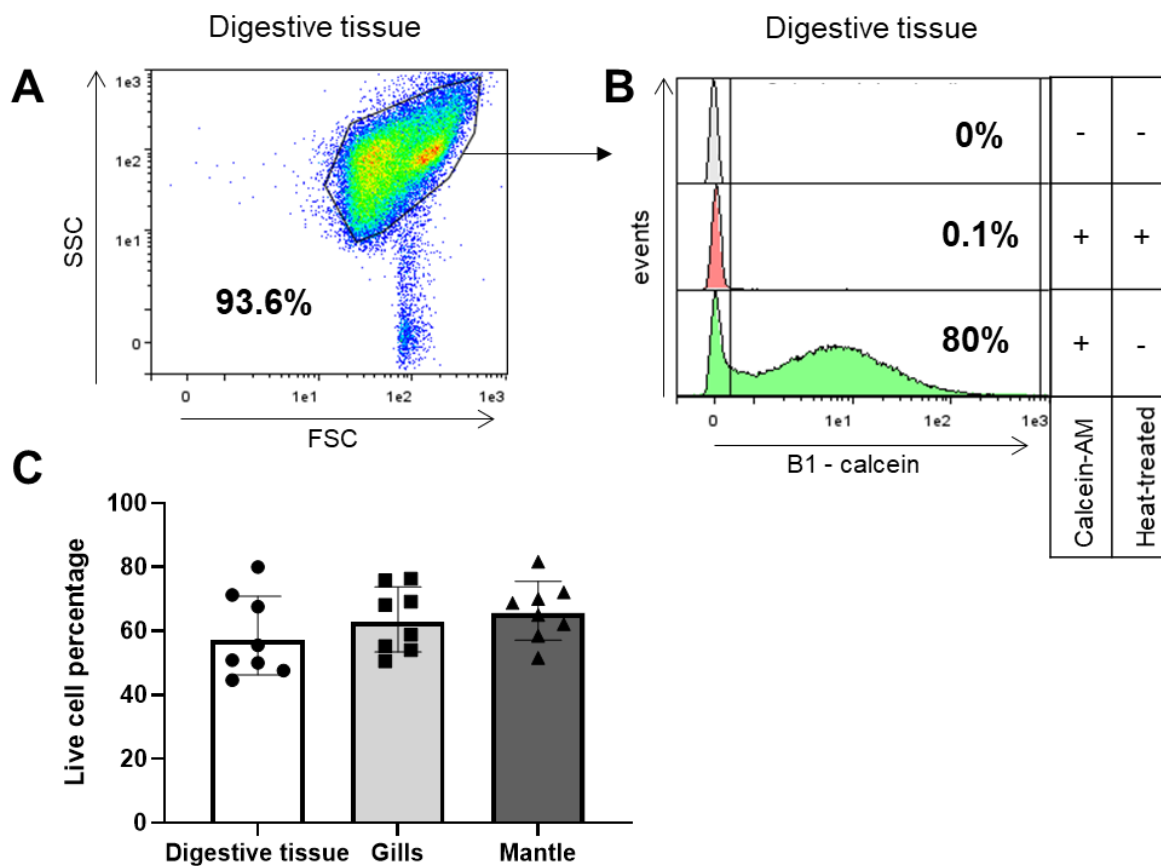
323

324

325

326 **12. Figures**

327



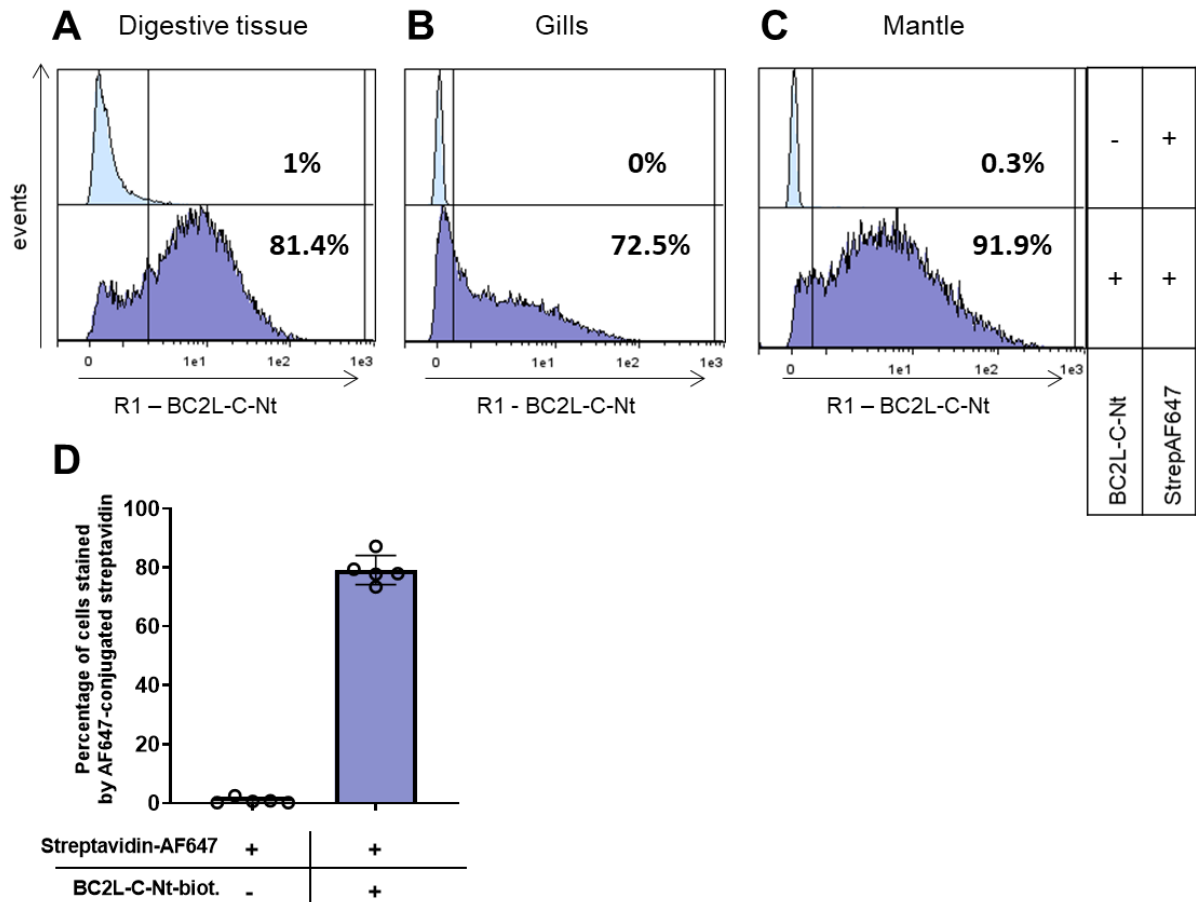
328

329

330 **Figure 1. Recovery of live cells from three organs of *C. gigas*.** Oyster cells were isolated as  
 331 described and analysed by flow cytometry.

332 **A.** Cells from digestive tissues were identified based on size and granularity using the  
 333 forward and side scatter (FSC, SSC) and gated to exclude debris from further analysis. Red  
 334 colour indicates high number of events, green medium and blue low. All further data is  
 335 based on this gated population. N=1 experiment representative of 8. **B.** Detection of calcein  
 336 fluorescence in the B1 channel (525/50 nm) for three different conditions from top to  
 337 bottom: unstained digestive cells (gray), heat-treated and stained digestive cells (red) and  
 338 stained digestive cells (green). The percentage of calcein-positive cells is indicated on the  
 339 right. N=1 experiment representative of 8. **C.** Percentage of calcein-positive cells obtained  
 340 for each dissociated oyster tissue: digestive tissue (circles), gills (squares) and mantle  
 341 (triangles) in n=8 independent experiments, with the mean (white, light gray and dark grey  
 342 bars, respectively) and standard deviation (error bars). Pairwise comparison between tissues  
 343 were not statistically significant ( $p < 0.05$ , Wilcoxon signed rank test).

344



345

346

347 **Figure 2. Lectin-staining of isolated oyster cells.** Oyster cells were isolated from three  
 348 tissues using our protocol and stained using the BC2L-C-Nt lectin and AF647-streptavidin.  
 349 The gates presented in Figure 1 were used to select live cells.

350 **A. B. C.** Detection of AF-647-streptavidin fluorescence in the R1 channel for cells isolated  
 351 from the digestive tissue, gills and mantle, respectively, for n=1 experiment. Cells were  
 352 either incubated with streptavidin-AF647 only (**light blue**), or with both the biotinylated  
 353 BC2L-C-Nt lectin and streptavidin-AF647 (**dark blue**). For the three tissues, a high proportion  
 354 of cells binds the lectin.

355 **D.** Percentage of streptavidin-AF647-positive digestive cells when incubated or not with  
 356 BC2L-C-Nt lectin in n=5 independent experiments (circles) with mean (blue bar) and standard  
 357 deviation.

358

359

360

361 **13. Tables**

362

363 **Table 1.** Composition of working solutions used for *C. gigas* tissue dissociation

Solution name	Component	Quantity
CMFS	HEPES	5.2 g
	NaCl	29.22 g
	KCl	0.93 g
	EDTA	1.86 g
	Water	qsp 1 l
MBSS	NaCl	26.22 g
	KCl	1.08 g
	MgSO4	3.18 g
	MgCl2	2.2 g
	CaCl2	1.12 g
	NaHCO3	0.3 g
	NaH2PO4	0.044 g
	Glucose	0.3 g
	Water	qsp 1 l
Marine PBS	NaCl	22 g
	Bovine Serum Albumin (BSA)	5 g
	Phosphate buffered saline (PBS)	qsp 1 l

364

### **III.1.B. Interactions entre norovirus et cellules d'huîtres**

#### **Introduction et objectifs**

Dans le cadre du projet GOyAVE, nous avons collaboré avec les équipes de Yann Guérardel (Unité de glycobiologie structurale et fonctionnelle, Lille, UMR 8576) et de Jacques Le Pendu (CRCINA, Nantes, INSERM U1232) dans le but d'étudier les spécificités de l'interaction de différentes souches du norovirus avec les glycanes présents dans l'huître creuse *Crassostrea gigas*.

La nature ainsi que la distribution de glycanes HBGA a été étudiée à de nombreuses reprises sur les tissus de l'huître grâce à différentes méthodes sur tissus entiers, utilisant des lectines et des anticorps pour révéler la présence de ces antigènes (ou de molécules similaires) par des tests ELISA utilisant des broyats de différents organes ou sur des coupes de tissus fixés (Maalouf et al. 2010; Ma et al. 2018; Su et al. 2018). De la même façon, les interactions avec les particules virales de norovirus ont pu être étudiées grâce à l'utilisation de particules pseudo-virales (non-infectieuses) sur des coupes de tissus, ou par des expérimentations de bioaccumulation virale puis de détection *via* des techniques de biologie moléculaire classique (qRT-PCR). Ces données ont démontré une interaction importante entre les souches de norovirus GI avec les tissus digestifs de l'huître grâce à la présence d'une molécule similaire aux antigènes tissulaires de groupe sanguin A (Maalouf et al. 2010 ; 2011). Les souches GII sont aussi capables d'interagir avec d'autres tissus (manteau, branchies), probablement grâce à l'interaction avec un autre glycanes présent. Cependant, la nature exacte de ces glycanes reste à déterminer ainsi que leur localisation précise dans les tissus (à la surface des cellules, dans la matrice extracellulaire, le mucus digestif ou branchial). Des données préliminaires de spectrométrie de masse, obtenues par l'équipe de Y. Guérardel au tout début de ma thèse, ont permis de révéler la présence d'un motif HBGA A de type 1 dans le tissu digestif de l'huître sous la forme d'un N-glycane.

La mise au point du protocole présenté précédemment permet une nouvelle approche complémentaire dans l'étude de l'expression cellulaire des glycanes par l'huître creuse *C. gigas* ainsi que l'interaction des cellules provenant de différents organes avec des particules pseudo-virales de deux souches différentes.

Les objectifs sont donc :

- d'identifier les glycanes exprimés par les cellules de différents organes de l'huître creuse *C. gigas*, et étudier d'éventuelles variations saisonnières de cette expression
- d'étudier les interactions entre ces cellules d'huîtres et les norovirus par l'emploi de VLP fluorescentes de deux souches virales différentes (GI.1 et GII.4)
- de caractériser les cellules liant les particules virales par transcriptomique

## Matériel et méthodes

**Huîtres.** Des huîtres creuses *C. gigas* provenant d'une cohorte d'animaux vivant dans des conditions contrôlées au sein de la plateforme mollusques marins de Bouin (PMMB, unité EMMA, Ifremer) sont prélevées et placées dans un bac d'eau de mer oxygénée et renouvelée pendant 1 à 5 jours. Pour chaque expérience, quatre individus sont prélevés et suivent le protocole de dissociation. Ponctuellement, des huîtres creuses ou plates (*Ostrea edulis*) commerciales d'origine bretonne sont utilisées.

**Obtention des cellules isolées :** Le protocole de dissociation des tissus d'huître décrit auparavant a été utilisé pour obtenir les cellules des trois organes (glande digestive, branchies et manteau) à partir de 0,5g de tissu disséqué. Dans un premier temps (entre janvier et avril 2021), les tissus disséqués de chaque individu étaient analysés en parallèle. Dans un second temps (mai 2021 à janvier 2022), les tissus de 4 animaux ont été regroupés pour chaque mesure. Un contrôle de la viabilité est réalisé grâce à de la calcéine-AM (Biotium) incubée à 400nM en PBS-BSA marin (PBS avec 2,2% de NaCl et 0,5% d'albumine sérique bovine (BSA)) pendant 10min à l'obscurité pour les suspensions cellulaires des 3 organes.

**Marquage des cellules :** 100µL de suspensions cellulaires sont déposés par puit d'une plaque 96 puits à fond U (Gibco) pour chaque condition. La plaque est alors centrifugée à 500g 4°C pendant 5 minutes, le surnageant est enlevé par retournement rapide. Les anticorps, lectines ou VLP ont été préparées et diluées auparavant dans du PBS-BSA marin. Les dilutions utilisées ainsi que les références des différents marqueurs utilisés sont présentées dans l'**annexe I**. 50µL de marqueur primaire sont ajoutés par puit, et incubé pendant 1 heure à 4°C dans l'obscurité. Les puits sont lavés 3 fois de suite en centrifugeant, éliminant le surnageant et ajoutant 100µL du PBS-BSA marin par puit. Après la dernière centrifugation, si nécessaire, 50µL du marqueur secondaire sont ajoutés et incubés pendant 30min au moins. Une étape de 3 lavages a ensuite lieu, puis 50µL de PBS-BSA marin sont rajoutés par puit pour resuspendre les cellules avant

acquisition des données. Les données de cytométrie en flux sont ensuite acquises sur un cytomètre Accuri C6 (BD) ou un MACSQuant 10 (Miltenyi Biotec), avec un seuil fixé à 10 000 évènements considérés comme des cellules grâce à leur caractéristique de taille et de granularité.

**Tri cellulaire :** Afin d'obtenir une quantité importante de cellules, chaque condition de marquage par VLP est réalisée dans 6 à 8 puits, soit avec 600 à 800 $\mu$ L de suspension cellulaire de chaque tissu, selon le protocole décrit plus haut. Les conditions identiques sont ensuite regroupées et transportées sur glace jusqu'à la plate-forme de tri CytoCell (Nantes Université). Les cellules sont marquées à la calcéine-AM 400nM 10 minutes avant leur passage dans un FACSaria III Cell Sorter (BD Biosciences). Les évènements correspondant à des doublets, des débris, et des cellules négatives au marquage calcéine sont éliminés. Entre 10<sup>4</sup> et 10<sup>5</sup> cellules sont collectées par organe dans des tubes 1,5mL, avec à chaque fois deux populations triées : cellules interagissant avec les VLP et cellules non marquées par ceux-ci. Une fois obtenues, les cellules sont centrifugées à 500g 5min à 4°C, le surnageant est enlevé et le culot cellulaire congelé à -80°C.

**Extraction de l'ARN des cellules triées :** Deux conditions sont testées, avec 10<sup>5</sup> et 2.10<sup>5</sup> cellules positives à la calcéine pour chaque tissu. Un volume de 0,8mL d'Extract All (Eurobio Scientific) est ajouté par tube contenant les cellules est incubé pendant 5min à température ambiante. Un volume de 0,16mL de chloroforme est ajouté, puis les tubes sont centrifugés à 12 000g pendant 15min à 4°C. La phase aqueuse est pipetée délicatement dans un nouveau tube avec 0,8mL d'isopropanol, puis centrifugée à 12 000g pendant 30min à 4°C. Le surnageant est éliminé et le culot d'ARN est lavé avec 0,8mL d'éthanol à 75%, puis une dernière centrifugation de 5min à 7500g. Les ARN sont séchés à l'air libre et dissous dans 20 $\mu$ L d'eau ultrapure. La concentration en ARN et la pureté de l'extrait sont évaluées grâce au NanoDrop 2000 (Thermo Scientific).

**Bioaccumulation contrôlée d'huîtres par norovirus :** des lots de 8 à 12 huîtres sont placés dans un bac avec 2 à 3 L d'eau de mer oxygénée. Deux échantillons de selles positives pour norovirus GI.1 et GII.4\_Sydney2012 sont utilisés, et une quantité correspondant à 5.10<sup>6</sup> copies génome est ajoutée dans l'eau de mer pour chaque souche virale, pendant 24 heures à 14°C. Huit huîtres sont alors prélevées, disséquées et les tissus digestifs découpés et regroupés. 2 grammes de tissu digestif sont directement utilisés pour le protocole d'élution par la PK (protéinase K) détaillé plus loin.

Entre 0,5 et 1 gramme de tissu est également dissocié par le protocole décrit plus tôt afin d'obtenir des cellules isolées. Les débris présents sur le tamis, les surnageants des deux centrifugations et les culots cellulaires finaux sont récupérés.  $5 \cdot 10^6$  copies génomes de Mengovirus sont ajoutés à chacune de ces fractions intermédiaires avant de suivre deux protocoles différents : une extraction d'acides nucléiques par lyse directe *via* tampon guanidium (kit Nuclisens ,BioMérieux ) pour la première moitié du volume, et une élution par protéinase K pour la seconde moitié du volume obtenu.

Deux autres expériences de bioaccumulation ont été réalisées avec l'ajout de  $5 \cdot 10^6$  copies génome de mengovirus en plus des concentrations classiques de GI.1 et GII.4. Les huîtres sont laissées 24 heures avec l'eau contaminée, puis une première partie est prélevée et suit le même protocole que précédemment. Une autre partie des huîtres est placée dans de l'eau propre pendant 1 semaine avant d'être à son tour prélevée. Les génomes viraux extraits et détectés par RT-qPCR de chaque fraction sont comparés par rapport à la somme des génomes viraux totaux pour chaque réplicat.

**Elution par protéinase K :** Les 2 grammes de tissu digestif découpés grossièrement, ou les fractions obtenues lors de la préparation des cellules, sont incubés dans en présence de PK (30U/mg) sous agitation rotative (32rpm) à 37°C pendant 15 min, puis à 60°C pendant 15 min. Une centrifugation de 3000g pendant 5 min a lieu, le surnageant est récupéré et les acides nucléiques extraits avec le kit Nuclisens (BioMérieux) sur un automate EasyMag (BioMérieux), selon le protocole du fabricant.

**Quantification des virus par qRT-PCR :** Les amplifications ont été réalisées à l'aide du kit UltraSense (Invitrogen), avec les amorces pour norovirus GI, GII et mengovirus selon la norme ISO 15216-1:2017 (décrites dans Pintó, Costafreda and Bosch 2009; Le Guyader et al. 2009) sur des appareils de PCR en temps réel Mx3000P (Agilent Technologies ®). Tous les échantillons ont été analysés en duplicat ou triplicat, sous la forme de 5 µL d'extraits d'ARN dans 20 µL de mélange réactionnel. Des témoins négatifs sont réalisés pour chaque série d'amplification avec 5 µL d'eau stérile, ainsi qu'une gamme ou des témoins positifs de concentrations connues afin de calculer la concentration virale des échantillons analysés.



## Résultats

### Identification des glycanes HBGA exprimés par les cellules d'huîtres.

Grâce au protocole de dissociation des tissus d'huîtres permettant d'obtenir des cellules isolées, l'expression de différents HBGA par les cellules de 3 tissus (glande digestive, branchies, manteau) a été évaluée par cytométrie en flux. Un anticorps secondaire révèle la proportion de cellules marquées par un anticorps primaire dirigé contre les différents HBGA étudiés (**Figure 48, A et B**)

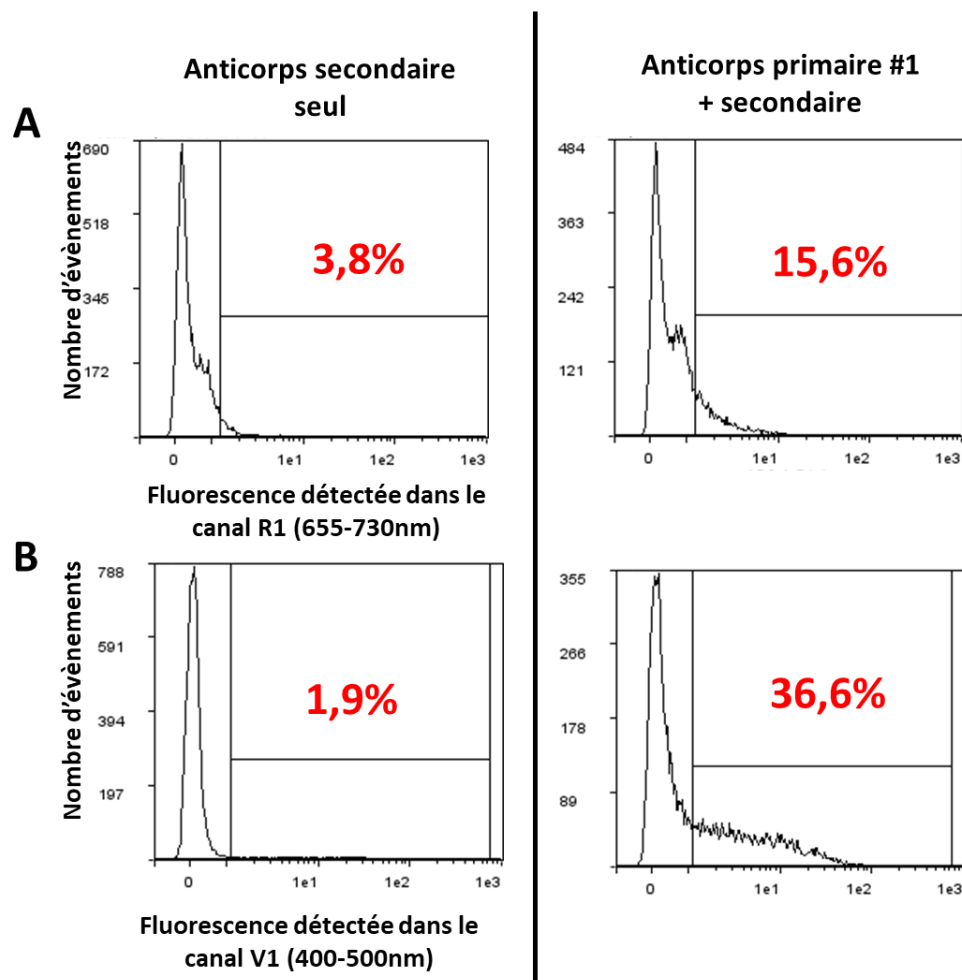
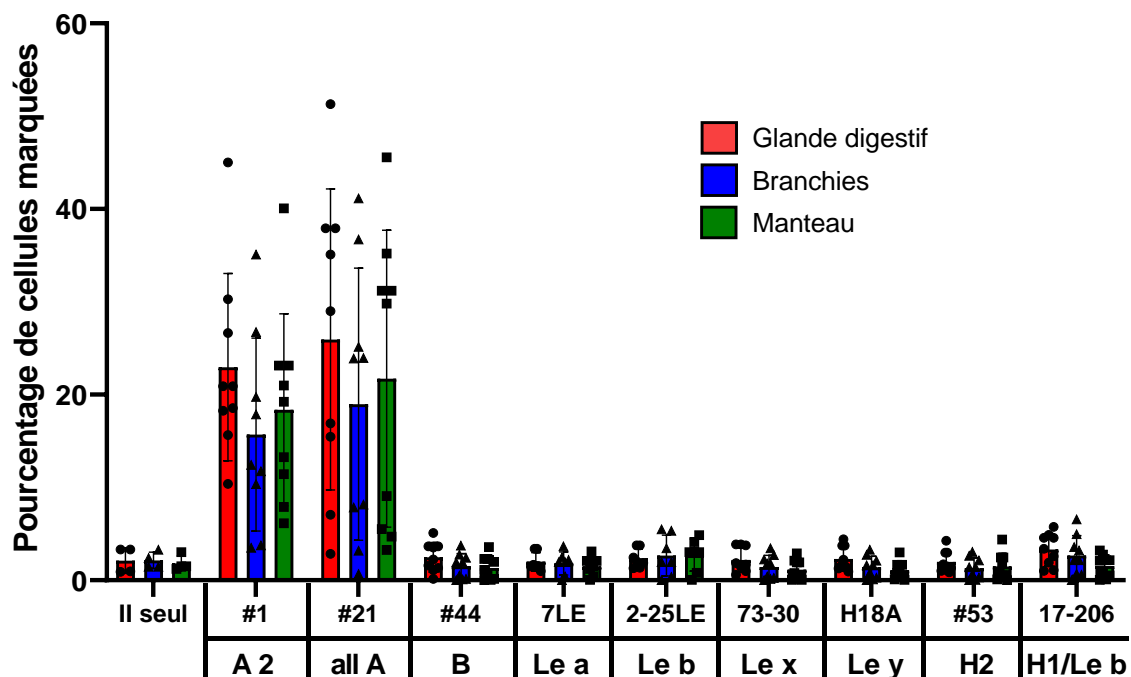


Figure 48 : Détection de la fluorescence émise par les cellules digestives de *C. gigas* dans le canal (A) R1 (655-730nm) ou (B) V1 (450/50nm) après incubation avec 50 $\mu$ L d'anticorps de souris anti-A (#1, dilué au 1:50 en PBS adapté) pendant 1 heure, puis après lavages et incubation avec 50 $\mu$ L d'anticorps secondaire anti-souris couplé à (A) l'Alexa Fluor 405 ou (B) l'Alexa Fluor 647 (1:200 en PBS marin-BSA) pendant 30min. Un compte de 10 000

*évènements considérés comme des cellules ont été acquis, en excluant les évènements de taille trop faible pour être considérés comme des cellules.*

Un panel de 9 anticorps dirigés contre différents antigènes de type HBGA a été utilisé au cours de 9 expérimentations réparties du mois de janvier 2021 à janvier 2022. Les principaux anticorps capables de lier les cellules de façon récurrente et à des niveaux supérieurs aux conditions contrôle sont ceux dirigés contre les motifs HBGA de type A (anticorps #1 et #21) (**Figure 49**). L'anticorps #1 marque en moyenne 22,9% des cellules digestives, 15,7% des cellules de branchies et 18,4% des cellules de manteau, contre respectivement 25,9%, 19% et 21,7% lorsque l'on utilise l'anticorps #21. Ces différences ne sont pas significatives pour les trois tissus selon l'anticorps utilisé ( $p=0,625$  pour les cellules digestives,  $p=0,3$  pour les branchies et  $p=0,19$  pour le manteau).



*Figure 49 : Expression de HBGA par les cellules isolées de trois tissus de *C. gigas* de janvier 2021 à janvier 2022 par cytométrie en flux (n=9). Chaque histogramme représente le pourcentage de cellules isolées de glande digestive, de branchies et de manteau marquée positivement avec différents anticorps anti-HBGA détectés par un anticorps secondaire. Le nom de chaque anticorps est précisé ainsi que le motif HBGA qu'il reconnaît.*

Par la suite, nous allons donc analyser les variations dans l'expression des antigènes de type A par les cellules des trois tissus en utilisant l'anticorps #21.

Deux méthodologies ont été employées dans l'isolement des cellules d'huîtres au cours de ce suivi. Lors des quatre premières expérimentations (janvier à avril), deux huîtres étaient analysées individuellement (**Figure 50, A**) et on remarque la forte variabilité des valeurs de détection de l'HBGA de type A avec l'anticorps #21 dans les cellules issues de tissu digestif notamment. De plus, les contrôles avec cellules non marquées présentaient une autofluorescence basale rendant difficile l'analyse de la fluorescence spécifiquement liée à l'expression des HBGA (**Figure 48, A**). Au vu de la forte variabilité, lors des 5 expériences suivantes, les tissus de deux individus ont été réunis en deux pools, et les mesures d'expression des glycanes réalisées une fois sur chacun de ces deux mélanges. Comme attendu, les deux points de mesure présentent des variabilités beaucoup plus faibles (**Figure 50, B**). Un anticorps secondaire portant un autre fluorophore (AF405) a été utilisé, permettant de travailler dans un canal où l'autofluorescence des cellules étudiées est faible (**Figure 48, B**). Cela se traduit par une optimisation des paramètres d'analyse, et une proportion plus importante de cellules considérées comme positives. Entre janvier et avril, entre 0,6 et 16,8% des cellules sont détectées par cet anticorps en cytométrie en flux, mais compte tenu des limites techniques, ces valeurs sont probablement sous-estimées. Entre juin et janvier 2022, ces valeurs sont comprises entre 23,9 et 51,3%.

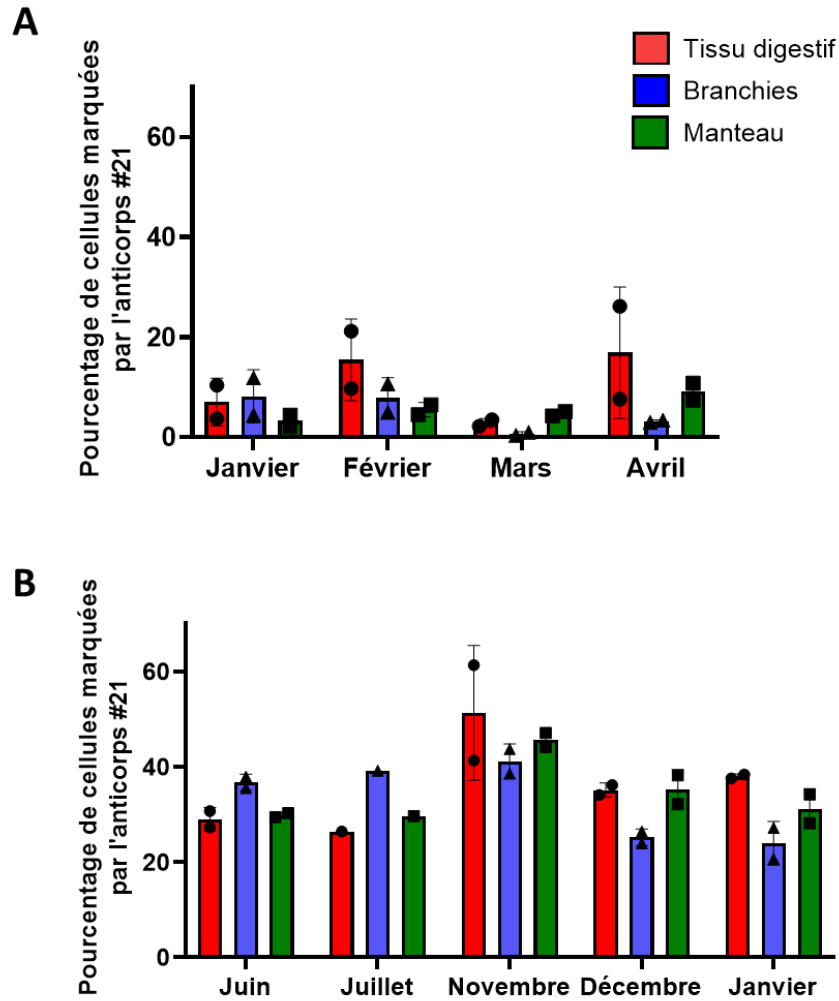


Figure 50 : Pourcentage de cellules isolées des 3 tissus de *C. gigas* positives après marquage avec l'anticorps #21 ciblant les HBGA de type A, révélé par la fluorescence d'un anticorps secondaire couplé à l'Alexa Fluor 405 dans le canal VI (A) ou Alexa Fluor 647 dans le canal R1 (B). Pour la figure (A) deux huîtres différentes sont analysées par mois, et chaque mesure est indiquée par un point, les points de la figure (B) indiquent les deux mesures effectuées à partir de deux pools de cellules obtenues à partir de 4 individus, avec la barre d'erreur associée (moyenne des répliqués).

Ces résultats montrent qu'une molécule reconnue par deux anticorps ciblant les HBGA A (A tous types pour #21, A type 2 pour #1), est exprimée par une forte proportion des cellules isolées de trois tissus de *C. gigas* avec le protocole optimisé. De plus, son niveau d'expression varie peu au cours de l'année et entre les trois tissus.

## Interactions entre cellules d'huîtres et norovirus.

Certaines souches de norovirus étant connues pour lier les HBGA A chez l'Homme, l'expression de cette molécule par les cellules d'huître implique qu'elles pourraient lier ces virus. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons utilisé des VLP fluorescentes de deux souches différentes (GI.1 et GII.4) et quantifié le pourcentage de cellules des différents tissus en interaction avec ces VLP par cytométrie en flux (**Figure 51**). En contrôle, des cellules intestinales humaines (entéroïdes intestinaux J2) ont été utilisées pour vérifier la capacité des VLP utilisées à interagir avec leurs cibles dans les mêmes conditions expérimentales. On remarque alors une interaction plus marquée et stable entre les réplicats d'expériences des VLP GII.4 avec les tissus d'huîtres par rapport aux VLP GI.1, qui se traduit par des pourcentages de cellules marquées plus importante. Les contrôles réalisés sur des cellules dissociées d'entéroïde J2, sensible à l'infection par les souches GI.1 et GII.4, démontrent quant à eux que plus de 99% des cellules sont capables d'interagir avec ces VLP (Ettayebi et al. 2016). De plus, certains lots de VLP GI.1 ont présenté une capacité plus faible à se lier aux cellules. Cela se traduit par un écart-type important visible sur **la figure 51**, et plus particulièrement lorsqu'ils ont été utilisés sur les cellules d'entéroïdes. Cet écart type est toutefois limité par l'utilisation d'une plus forte concentration de VLP GI.1 (20µg/ml au lieu de 5µg/ml) qui sera donc employée par la suite.

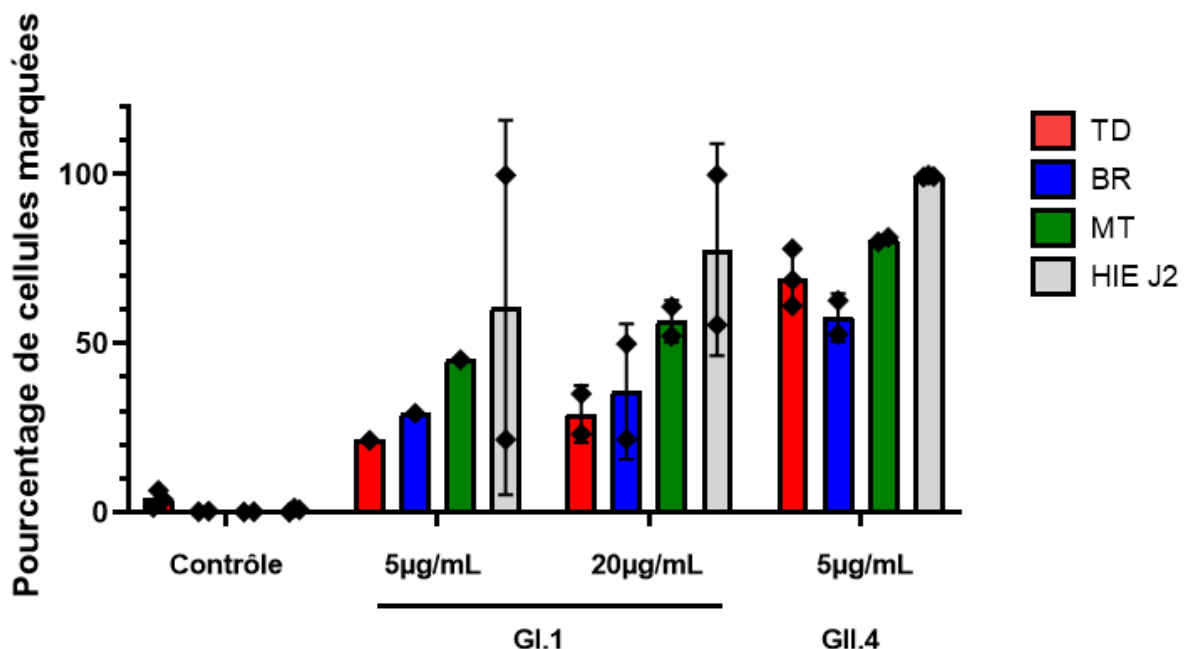


Figure 51 : Pourcentage des cellules isolées de 3 tissus de *C. gigas* et d'entéroïde intestinal J2 (10 000 évènements) émettant de la fluorescence dans le canal R1 (655-730nm) lorsqu'elles sont non-marquées (contrôle) ou incubées 30 minutes avec différentes

*concentrations de VLP de norovirus GI.1 et GII.4. N=3 expérimentations indépendantes sur les cellules digestives (TD) d'huître et les cellules entéroïde intestinal (HIE J2), n=2 pour les cellules de branchies (BR) et de manteau (MT). Chaque point indique un réplicat de mesure avec les barres d'erreurs associées (moyenne des réplicats).*

Ces données confirment que les cellules des trois tissus sont capables d'interagir avec des particules de norovirus de deux souches différentes.

### **Mécanismes de l'interaction norovirus – cellules d'huître.**

J'ai ensuite cherché à savoir si les VLP liaient la molécule reconnue par l'anti-A à la surface des cellules d'huîtres. Pour cela, j'ai réalisé un double-marquage de cellules de tissu digestif provenant de 4 huîtres *C. gigas* regroupées, en utilisant des concentrations variables de VLP GII.4 ainsi que d'anticorps anti-A #21. Environ 60% des cellules digestives d'huîtres sont marquées par les VLP GII.4 dès une concentration de 2µg/mL, et un plateau est rapidement atteint dès 5µg/mL, avec des proportions de cellules VLP-positives comprises entre 68 et 74% quelle que soit la concentration en anticorps anti-A utilisée (**Figure 52**). Ceci indique que les sites de liaison des VLP GII.4 sont saturés à partir de 5µg/mL, et que la présence de l'anticorps anti-A n'affecte pas l'interaction VLP – cellules. En revanche, on note que l'anticorps anti-A marque légèrement mieux les cellules en présence des VLP (**Figure 53**). Ces résultats doivent être répétés pour pouvoir conclure, car ils indiqueraient que la liaison avec les VLP faciliterait le marquage des antigènes A.

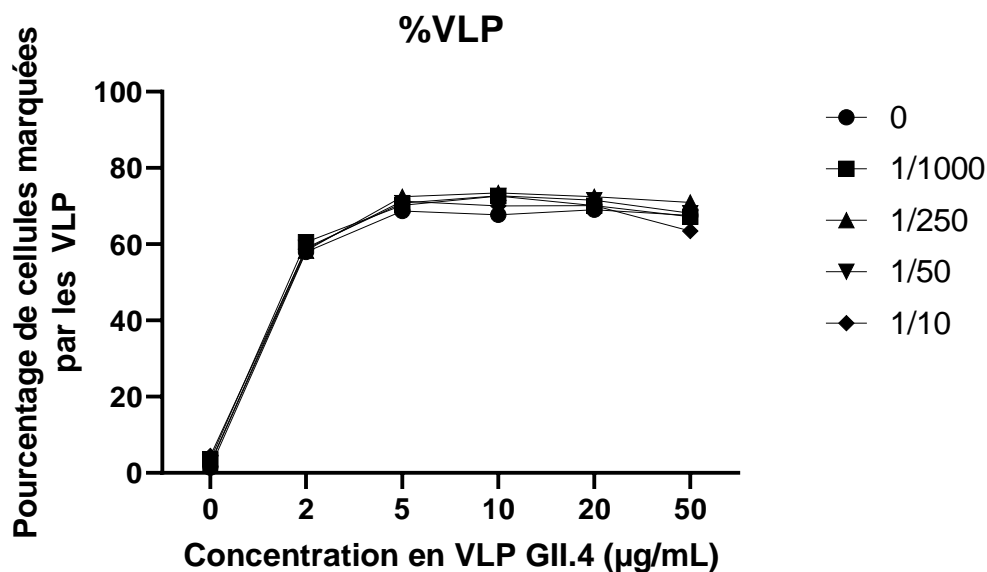


Figure 52 : Pourcentage de cellules digestives isolées à partir de 4 huîtres positives au marquage VLP GII.4. Les cellules ont été incubées avec des concentrations de VLP GII.4 et d'anti-A variables représentées par les différents symboles.

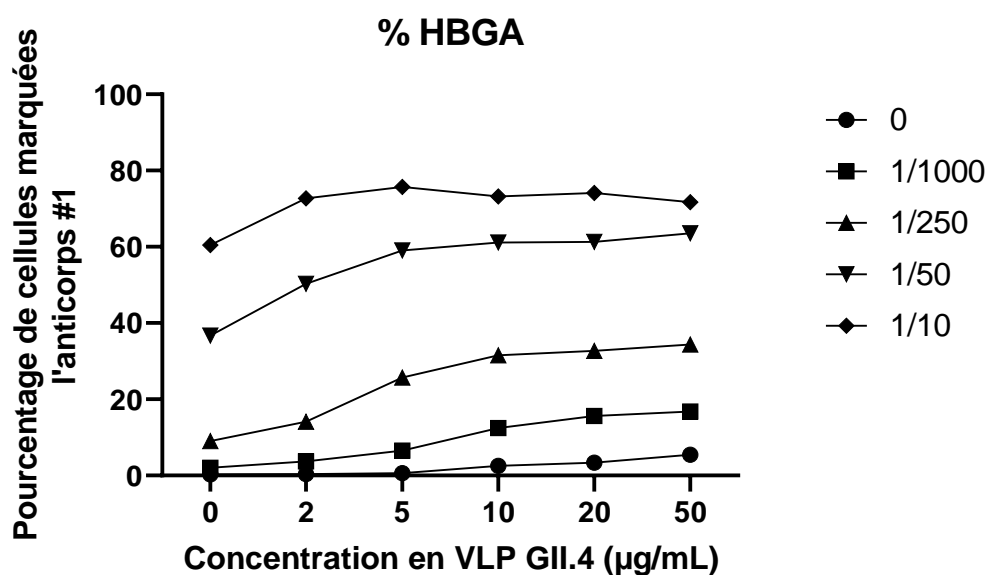


Figure 53 : Pourcentage de cellules digestives isolées à partir de 4 huîtres positives au marquage anti-A #21 détectées par la fluorescence d'un anticorps secondaire dans le canal V1. Les cellules ont été incubées avec des concentrations de VLP GII.4 et d'anti-A variables représentées par les différents symboles.

La capacité des cellules de l'huître creuse *C. gigas* à lier les VLP GI.1 et GII.4 a également été comparée à celle des cellules de l'huître plate *O. edulis* au cours d'une expérimentation. On note une détection de l'HBGA A proche de 40% dans les 3 tissus des deux espèces (**Figure 54**). Au niveau des cellules marquées par les VLP GI.1, leur proportion est plus faible mais également similaire (entre 15 et 22,9% pour *C. gigas*, 14,9 et 23,7% pour *O. edulis* selon les tissus). En revanche la capacité d'interaction avec les VLP GII.4 présente d'importantes différences : 23% des cellules digestives d'*O. edulis* lient celui-ci, contre 57% pour *C. gigas* (**Figure 55**). Les cellules de branchies et de manteau de l'huître plate n'interagissent quasiment pas avec ces VLP GII.4, présentant des pourcentages de cellules marquées compris entre 3 et 5%.

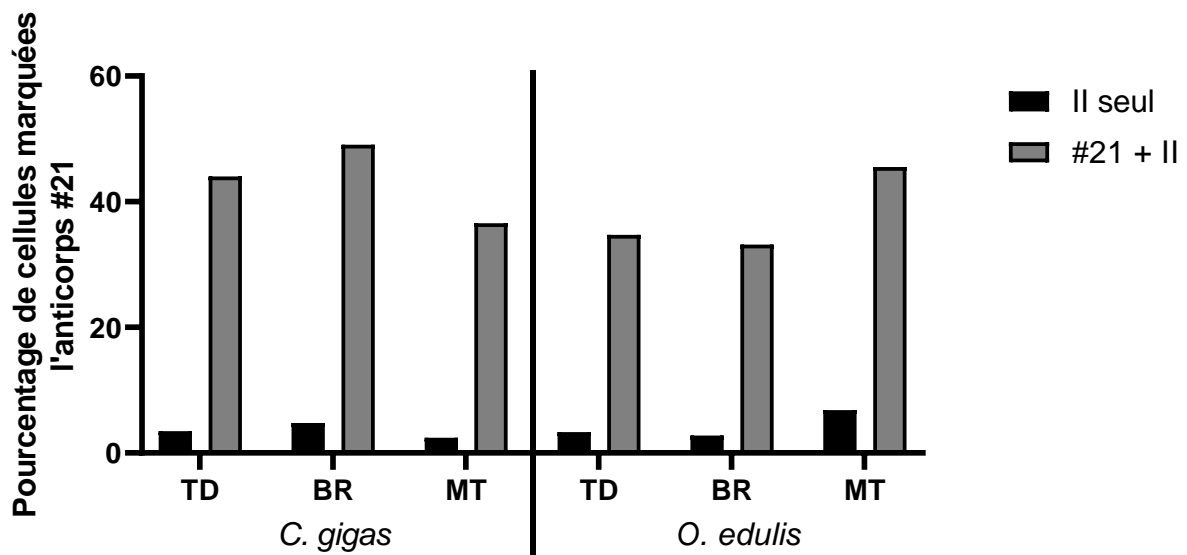


Figure 54 : Pourcentage de cellules isolées de trois tissus de *C. gigas* et *O. edulis* positives au marquage anti-A en cytométrie. Le contrôle est réalisé par un marquage à l'anticorps secondaire seul. N=1



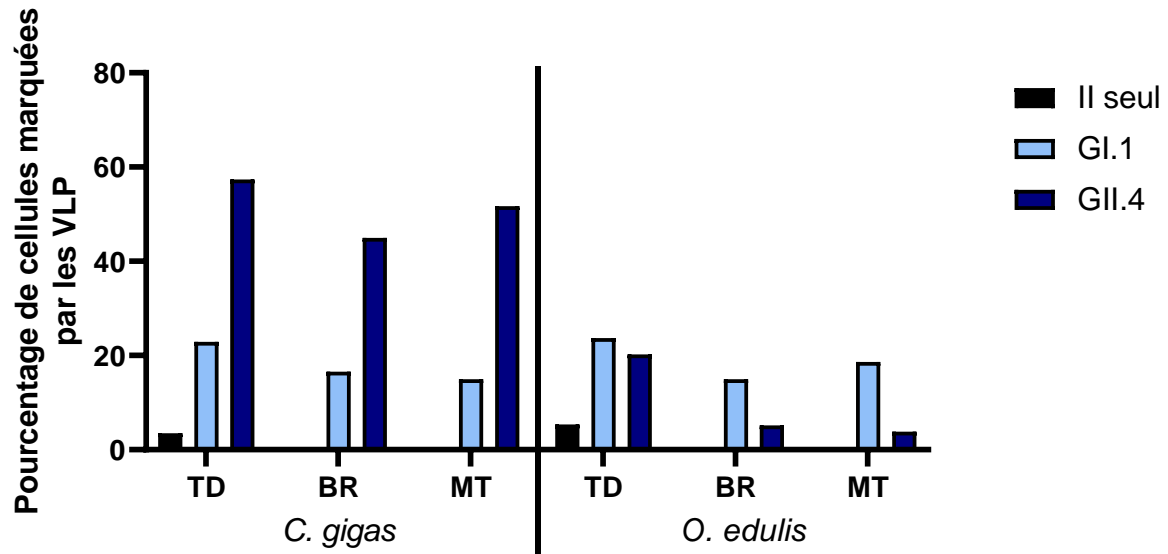


Figure 55 : Pourcentage de cellules isolées de trois tissus de *C. gigas* et *O. edulis* positives au marquage avec des VLP GI.1 et GII.4 en cytométrie. Le contrôle est réalisé par un marquage à l'anticorps secondaire seul. N=1

Enfin, la quasi-totalité des cellules de *C.gigas* marquées positivement par l'anticorps anti-A sont également celles qui seront capables de lier les VLP GII.4 (**Figure 56**). Cette observation n'est pas retrouvée avec les VLP GI.1. Dans le cas d'*O. edulis*, seule une fraction des cellules exprimant l'antigène A interagit avec les VLP, qu'il s'agisse de GII.4 ou GI.1. Ces données, qui doivent être confirmées par des expériences supplémentaires, suggèrent que les cellules des deux espèces d'huître ont des affinités différentes pour les différentes souches de norovirus, et que la présence d'un antigène reconnu par l'anticorps anti-A ne permet pas de conclure sur le potentiel des cellules à interagir avec des VLP.

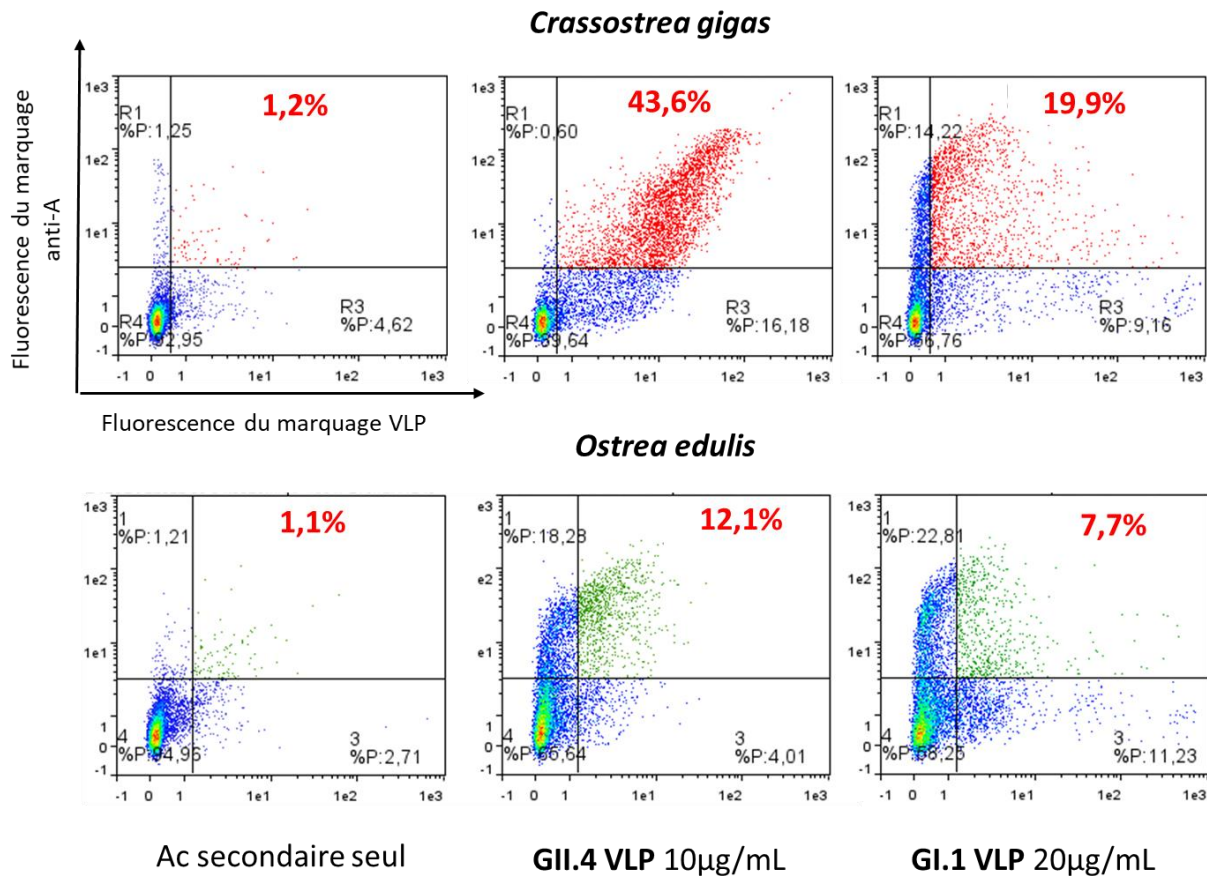


Figure 56 : Pourcentage de cellules isolées de trois tissus de *C. gigas* et *O. edulis* positives au double-marquage anti-A et VLP : avec un anticorps anti-A #21 détectées par la fluorescence d'un anticorps secondaire dans le canal VI (axe des ordonnées) et par VLP GI.1 ou GII.4 émettant dans le canal R1 (axe des abscisses) en cytométrie. Les populations cellulaires marquées à la fois par l'anticorps #21 et les VLP sont figurées en rouge pour *C. gigas* et en vert pour *O. edulis*. Le contrôle est réalisé par un marquage à l'anticorps secondaire seul.

N=1

### Caractérisation des cellules d'huîtres liant les norovirus.

Afin d'identifier et caractériser les cellules capables d'interagir avec les norovirus, nous avons tiré parti des protocoles d'isolement et de marquage de cellules établi précédemment, pour trier ces cellules. Entre 1 et 5 millions de cellules isolées des trois tissus ont été incubées avec les VLP GI.1 ou GII.4 couplées au fluorochrome AF647, puis marquées à la calcéine-AM afin d'identifier les cellules vivantes. Ces populations cellulaires ont été triées sur la base de leur affinité pour les VLP de chacune des deux souches de norovirus. 5 expériences indépendantes

ont montré des motifs d'interaction avec les VLP similaires à ceux observés précédemment : les VLP GII.4 semblent se lier en plus grand nombre sur les cellules, d'où une fluorescence plus importante. Les populations fortement marquées par les VLP (**Figure 57, bleu**) et non-marquées (**figure 57, rouge**) sont alors récupérées puis conservées congelées.

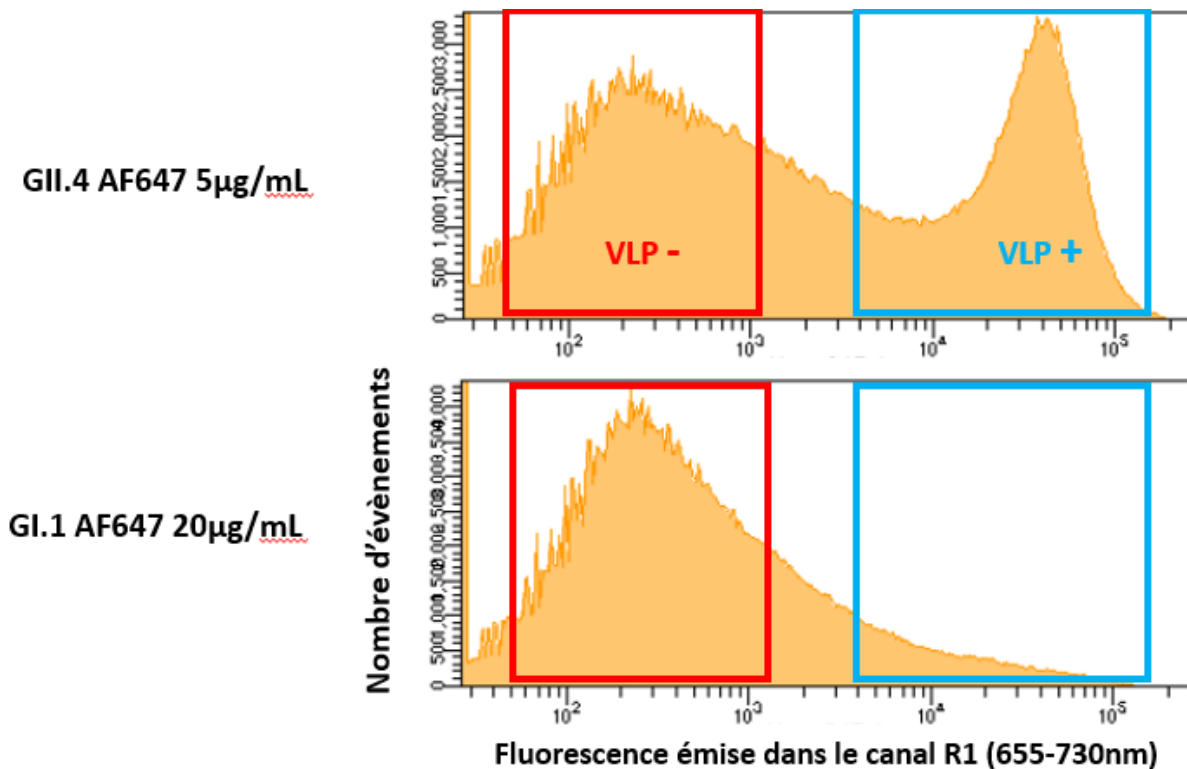


Figure 57 : Représentation des données acquises par BD FACSAria III Cell Sorter lors du tri cellulaire de cellules de branchies de *C. gigas* marquées par des VLP de norovirus GI.1 ou GII.4 couplées à l'AF647. On distingue deux populations différentes, marquées par les VLP et émettant de la fluorescence (VLP+), ou non-marquées et non-fluorescentes (VLP-).

En l'absence de panels d'anticorps commerciaux permettant de caractériser les populations cellulaires de *C. gigas*, nous avons tenté de caractériser ces cellules isolées et triées par transcriptomique. L'étape suivante était alors d'obtenir de l'ARN de bonne qualité et en concentration suffisante pour un séquençage RNASeq. Différents protocoles d'extraction ont été testés, mais aucun n'a permis de purifier des ARN en concentration et qualité suffisante pour une telle application selon des mesures d'absorbance (**Tableau 4**). Pour vérifier la qualité de l'ARN extrait, nous avons également tenté d'amplifier par RT-qPCR deux gènes de ménage de l'huître *C. gigas* (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase et Elongation factor-1 $\alpha$ ) sans succès. L'analyse transcriptomique prévue n'a donc pas pu être réalisée.

Echantillon	ng/ul	A260	A280	260/280	260/230
TD200	77,3	2,2	1,5	1,5	0,4
TD100	56,5	2,2	1,5	1,4	0,4
BR200	111,4	3,2	2,1	1,6	0,5
BR100	96,0	2,7	1,8	1,4	0,5
MT200	75,7	2,3	1,6	1,4	0,5
MT100	88,2	2,6	1,8	2,1	0,4
H2O	6,7	0,3	0,2	1,1	0,1

Tableau 4 : Moyenne des valeurs de concentration en acides nucléiques et des ratios d'absorbance mesurés par NanoDrop 2000 à partir d'ARN extraits de  $2 \cdot 10^5$  ou  $10^5$  cellules d'huîtres isolées des trois tissus étudiés. (n=6)

#### Rôle des interactions norovirus – cellules d'huîtres lors de la bio-accumulation.

L'isolement de cellules d'huîtres et leur analyse par cytométrie en flux nous a permis de montrer que ces cellules sont bien capables d'interagir avec les particules de norovirus GII.4 et, dans une moindre mesure, GI.1, probablement via l'expression à leur surface d'un glycanne de type HBGA A. Cependant, ces interactions ayant lieu *in vitro*, leur importance dans le processus physiologique de bio-accumulation des particules virales par les huîtres reste à valider, d'autant plus qu'elles concernent de manière équivalente trois tissus de l'huître *C. gigas*, alors que la bioaccumulation des norovirus se concentre dans le tissu digestif *in vivo*.

Pour étudier cette question, nous avons réalisé des expériences de bioaccumulation contrôlées. Des huîtres *C. gigas* ont été contaminées au laboratoire par baignade en présence de selles humaines positives pour norovirus GI.1 et GII.4. Après 24h, les huîtres sont disséquées. Une partie des tissus digestifs est utilisée pour la quantification des virus bio-accumulés dans les tissus entiers par une digestion par la protéinase K (PK), une extraction des acides nucléiques, et une RT-PCR quantitative spécifique des norovirus. L'autre partie des tissus digestifs est dissociée selon notre protocole, et les différentes fractions générées au cours de l'isolement des cellules (agrégats tissulaires retenus sur le tamis, surnageants de centrifugation et culot cellulaire final) sont également traitées la PK et les ARN extraits pour y quantifier la présence des deux souches de norovirus. Les ARN viraux sont ainsi quantifiés par RT-PCR quantitative

en une étape, ciblant norovirus GI ou GII, dans les TD entiers et dans chaque fraction du protocole de dissociation.

Nous observons que seule une faible partie des norovirus est liée aux cellules digestives (**Figure 58**). Les valeurs de copies de génomes détectées par RT-qPCR indiquent une concentration virale plus importante dans les différentes fractions obtenues au cours du protocole de dissociation, à savoir les surnageants des centrifugations des cellules et dans la matière retenue par le tamis cellulaire. Les différences ne sont pas significatives, probablement en raison d'un des réplicats d'expérience qui n'a pas permis de détecter de virus dans les surnageants et cause une déviation importante.

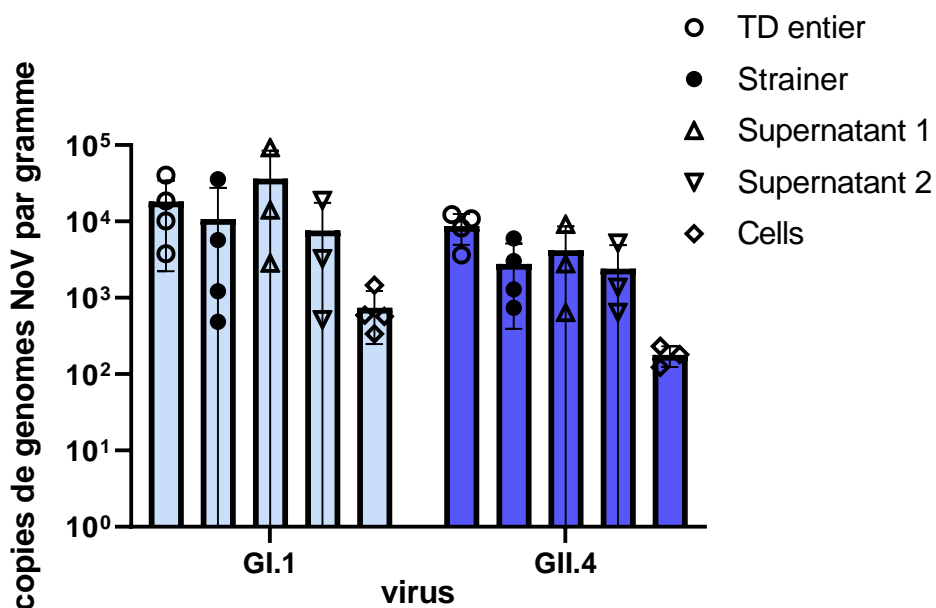


Figure 58 : Valeurs moyennes de copies de génome de norovirus GI et GII par gramme de tissu détectées par qRT-PCR dans les différentes fractions obtenues au cours la dissociation cellulaire de tissu digestif d'huître ayant été bioaccumulées au préalable pendant 24 heures avec  $5 \cdot 10^6$  cg de GI.1 et  $5 \cdot 10^6$  cg de GII.4 Sydney 2012. Chaque fraction est traitée à la protéinase K avant d'extraire les acides nucléiques. La condition « TD entier » correspond au tissu digestif directement traitées par protéinase K et non par le protocole de dissociation.  $n=4$  expériences indépendantes, chaque point indique la mesure d'une expérience, les barres verticales donnent la moyenne des 4 expériences, et les barres d'erreurs, la déviation standard. Les différences sont non-significatives (Test ANOVA, GraphPad, Prism)

De plus, quatre autres expériences ont été réalisées en rajoutant du mengovirus à bioaccumuler avec les souches GI.1 et GII.4 ( $5.10^6$  copies génome) pendant 24 heures. Ce dernier n'interagit normalement pas avec les HBGA, se bioaccumule peu efficacement et a déjà été utilisé comme contrôle négatif par le passé (Drouaz et al 2015). Après 24h de bioaccumulation, une partie des huîtres ont été ouvertes, disséquées et, pour une partie des tissus digestifs, les cellules ont été dissociées comme présenté précédemment. Une autre partie des huîtres a été rincée et transférée en eau de mer propre pour être prélevée une semaine plus tard. Après analyse, on retrouve à nouveau les norovirus GI.1 et GII.4 principalement dans le surnageant et peu associé aux cellules, après 24h (**Figure 59, A**) comme après 1 semaine (**Figure 59, B**). Au contraire, le mengovirus est dispersé dans les différentes fractions et beaucoup plus retrouvé dans les culots cellulaires finaux que les norovirus. Les débris présents sur le tamis ne semblent pas interagir avec une quantité importante des trois virus.

Ces résultats montrent que, *in vivo*, pendant le processus de bioaccumulation, les norovirus ne sont pas en interactions forte avec les cellules isolées par notre protocole de dissociation. Il semble que des ligands extracellulaires, qui sont perdus pendant les étapes de centrifugation, soient responsables de la majorité de la rétention de ces virus dans les huîtres.

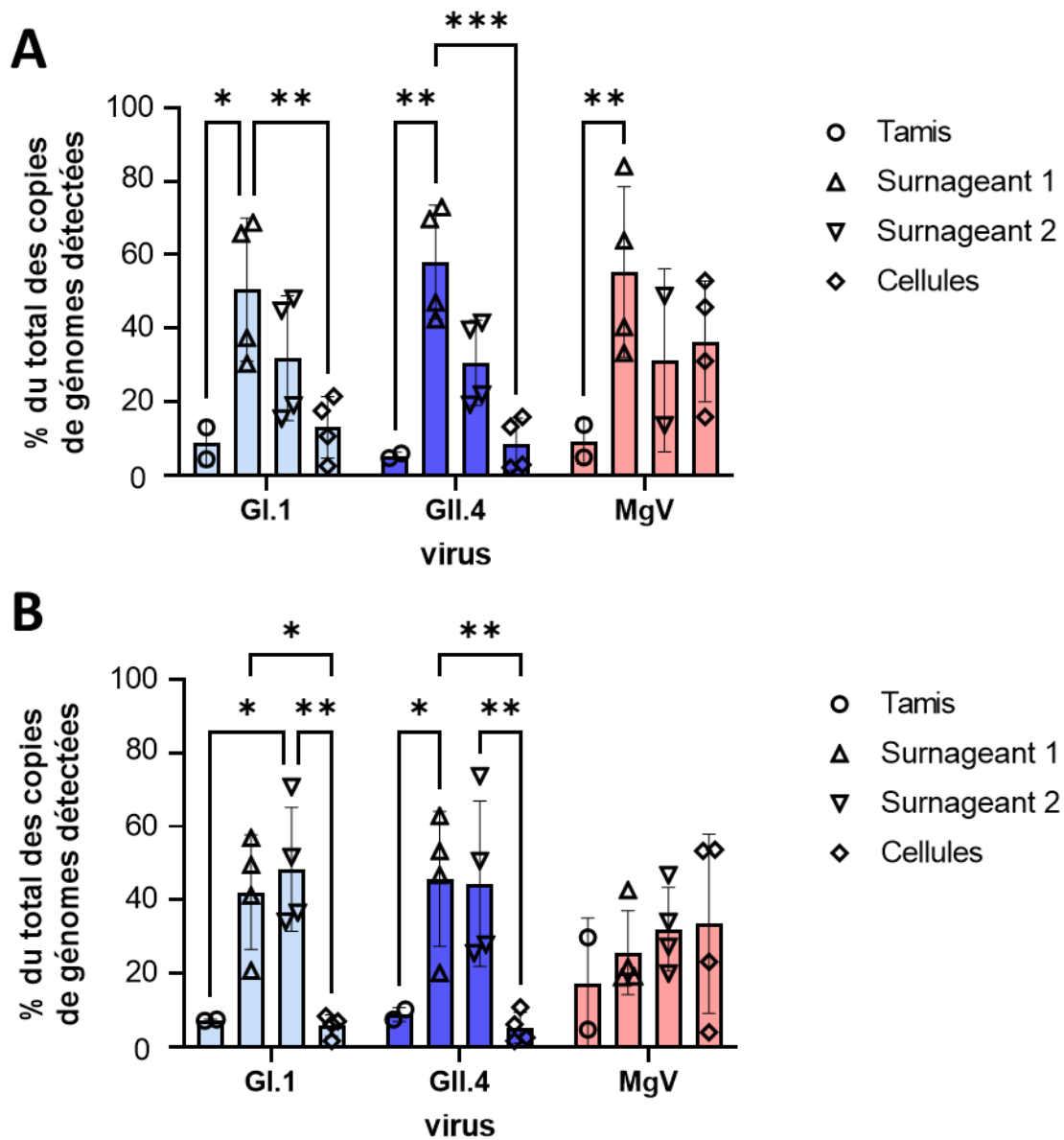


Figure 59 : Pourcentage du génome viral détecté par RT-qPCR dans chaque fraction du protocole de dissociation du tissu digestif par rapport à la somme des génomes viraux identifiée dans chaque fraction (qui représente 100%) pour le norovirus GI.1, GII.4 et le mengovirus ( $5.10^6$  cg pour chaque virus) directement après 24 heures de bioaccumulation ou 7 jours après dépuration. N=2 expériences indépendantes.

## Discussion

Dans notre étude, nous avons pu détecter des glycanes HBGA de type A à la surface des cellules d'huîtres issues du tissu digestif, du manteau et des branchies, mais pas d'autres HBGA. Cela correspond aux résultats attendus et identifiés par d'autres travaux (Peng Tian et al. 2007; Morozov et al. 2018). Bien que légèrement plus faibles, les niveaux de détection des HBGA de type A dans les cellules des branchies et du manteau sont similaires à ceux retrouvés pour les cellules digestives. Les études précédentes, sur tissus entiers par ELISA n'identifiaient pas toujours d'expression détectable de l'antigène A dans les branchies ou le manteau (Morozov et al. 2018).

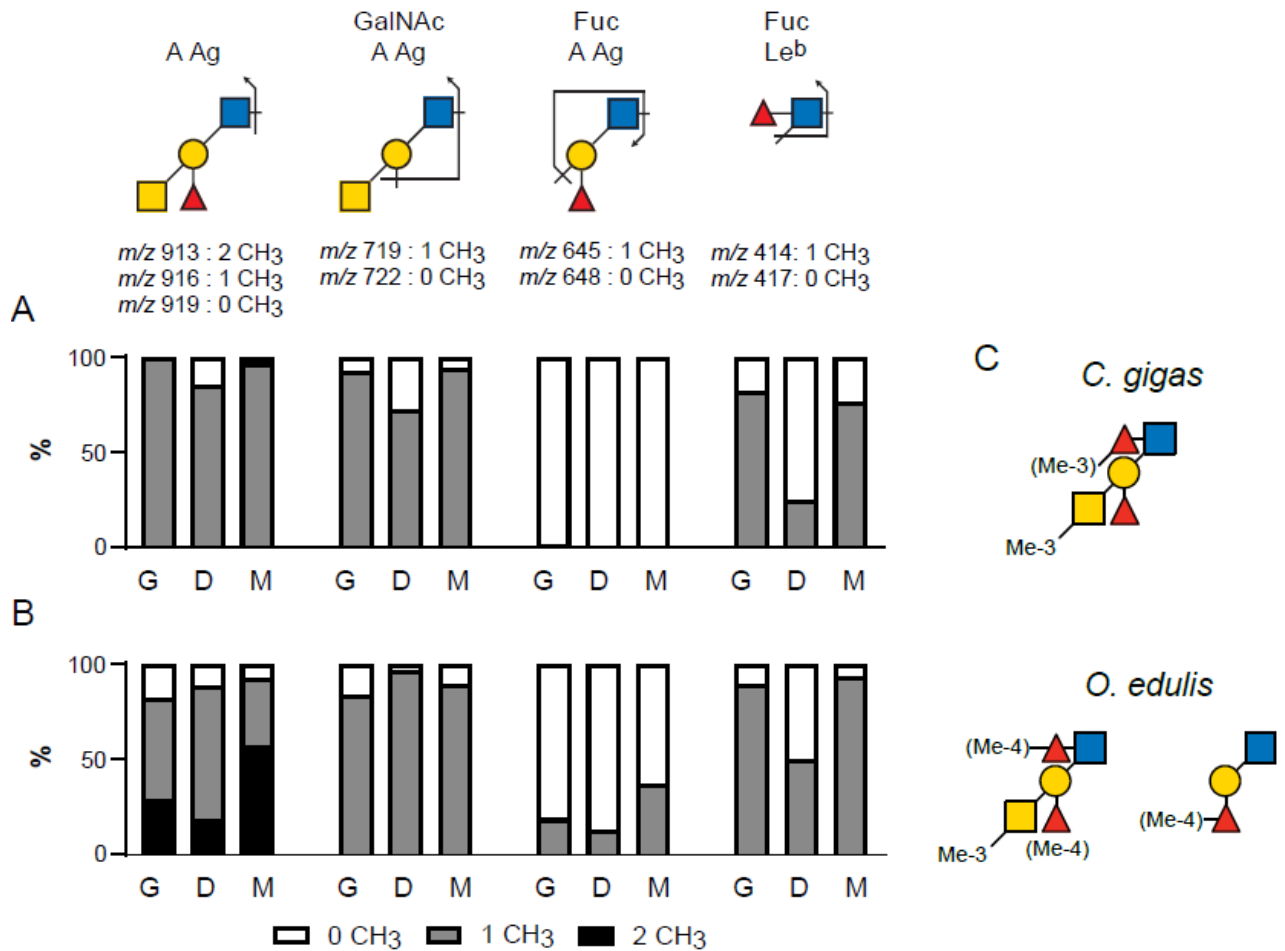
Ici, les taux de détection des antigènes lewis b et H de type 1 sont beaucoup moins importants, voire nuls, par rapport aux résultats décrits par d'autres travaux : lewis b est identifié par ELISA dans les branchies de 91% des huîtres testées par Ma et al. 2018, et le H type 1 dans les cellules digestives présente des ratios de détection P/N supérieurs à ceux du type A dans les travaux de Su et al. 2018. Ces différences peuvent provenir des anticorps utilisés, car les recherches citées utilisent des anticorps identiques (Covance), qui ne sont pas ceux que nous avons utilisés. Cependant, malgré cette utilisation de réactifs similaires, leurs résultats divergent sensiblement pour la détection de lewis a ou d'HBGA de type B. L'utilisation de populations d'huîtres différentes pourrait également expliquer ces différences, compte tenu de la forte variabilité inter-individuelle que nous avons observée. L'utilisation de ces anticorps sur des cellules isolées à l'aide du protocole utilisé dans nos travaux pourrait permettre d'obtenir des informations supplémentaires, de même que l'application de notre approche sur des populations diverses de *C. gigas* (expérimentales, commerciales, de différentes régions).

Les différences d'expression des HBGA par les huîtres peuvent être également dues à des variations saisonnières. Notre équipe a montré précédemment que l'expression de l'antigène A au niveau tissulaire est maximale en hiver et décroît en été (Maalouf et al., 2010). Dans notre suivi de l'expression de l'antigène A par les cellules, nous n'avons pas observé de différences importantes entre la période hivernale et la période estivale. Mais ce suivi a été compliqué par des modifications du protocole (changement d'anticorps secondaire, regroupement des tissus d'individus) et mériterait d'être confirmé sur une nouvelle année de suivi, et si possible sur des animaux de différentes origines.

En parallèle de notre étude sur cellules isolées, nos collaborateurs du projet GOyAVE ont conduit des analyses de spectrométrie de masse sur les mêmes tissus de *C. gigas* et *O. edulis*.



Dans un premier temps, ils ont étudié les glycanes portés sur les fonctions amines de protéines (N-glycanes) et ont ainsi caractérisé le N-glycome de *C. gigas* et *O. edulis* et en ont ainsi caractérisé le N-glycome (Auger et al., 2023). Ils ont notamment mis en évidence une structure analogue à l'antigène A dans les trois tissus étudiés (manteau, branchies, tissu digestif), tout à fait en accord avec nos résultats (**Figure 60**).



**Figure 60 : A) et B)** Quantification relative des antigènes A et Leb natifs ou méthylés dans les N-glycanes de 3 tissus (G, branchies, D, tissu digestif, M, manteau) de *C. gigas* (A) et *O. edulis* (B). En blanc, la part des antigènes non méthylés, en gris ceux portant un méthyle et en noir, ceux portant deux méthyles. C) Résumé de l'état de méthylation des HBGA des deux espèces. Adapté de Auger et al. 2023.

Il est à noter que les N-glycanes sont portés à la surface des cellules, par des protéines glycosylées, ce qui est effectivement compatible avec notre approche sur cellules isolées.

Notre approche cellulaire nous a permis de montrer que les cellules des trois tissus de *C. gigas* qui expriment l'antigène A (plus ou moins méthylé, cf **figure 49 et 59**) sont capable des lier des VLP de norovirus GI.1 et GII.4. Cependant, nous n'avons pas observé de compétition entre l'anticorps anti-A et les VLP pour ces ligands. L'utilisation de molécules synthétiques ayant la structure de l'antigène A de l'huître, pourrait permettre de mener de telles expériences de compétition afin de confirmer que l'interactions entre cellules d'huîtres et norovirus est bien médiée par l'antigène A.

Le projet prévoyait initialement de comparer les interactions huîtres – virus de plusieurs souches virales, en utilisant des VLP de norovirus GII.3 ou GII.6 (des génotypes assez fréquemment identifiés dans l'environnement et les huîtres) et d'autres virus entériques liant les HBGA, comme les rotavirus (Barbé et al., 2018; Imbert-Marcille et al., 2014). Cependant, des difficultés techniques dans la production de ces VLP n'ont pas permis d'étendre l'étude à ces souches. Nous avons également été limités par la faible quantité de VLP GI.1 disponible, et par des variations dans les résultats obtenus en cytométrie, en fonction des lots utilisés (**figure 50**).

De même, malgré plusieurs essais de mise au point de l'extraction des ARN, la caractérisation du transcriptome des cellules d'huîtres interagissant avec les norovirus n'a pas pu être menée à bien. Ces données auraient pu permettre d'identifier des gènes responsables de la synthèse des HBGA, et de caractériser les populations cellulaires qui les expriment dans les trois tissus étudiés. Une amélioration du protocole d'extraction est donc à envisager afin de limiter la contamination observée lors du contrôle de l'absorbance des échantillons d'ARN et d'assurer l'obtention d'une quantité suffisante d'ARN pour mener à bien le séquençage.

En lien avec les résultats obtenus par l'équipe de Yann Guérardel (UMR 8576, Université de Lille), partenaire du projet GOyAVE, des différences dans les glycanes exprimés par deux espèces d'huîtres différentes semblent se refléter sur leur capacité à interagir avec des VLP de norovirus (Auger et al, en préparation). Comme *C. gigas*, l'huître plate *Ostrea edulis* exprime des HBGA de type A qui sont reconnus par les anticorps que nous avons utilisés. L'étude du N-glycome de *O.edulis*, menée en parallèle de *C. gigas*, a montré que des structures analogues à l'antigène A sont bien présentes dans ses tissus, mais avec un profil de méthylation différent (**Figure 59**) qui pourrait bloquer de manière stérique les interactions avec les norovirus (Auger

et al., 2023). Les résultats préliminaires que nous avons obtenus montrent effectivement une capacité limitée des cellules d'*O. edulis* à lier des VLP notamment GII.4 par rapport aux cellules de *C. gigas*, malgré des niveaux de détection similaire de l'antigène A. Ces résultats nécessitent d'être reproduits et pourraient permettre d'approfondir le lien entre la nature et la structure des HBGA exprimés avec leur capacité à interagir avec les norovirus de différentes souches.

Par le passé, les travaux de notre équipe avaient montré l'implication d'une molécule similaire à l'HBGA A dans la liaison des norovirus GI.1 et GII.4 aux tissus digestifs entiers, et montraient des différences pour les autres tissus, par histologie et ELISA (Maalouf et al. 2010). Ici, les cellules des trois tissus sont capables de lier les norovirus à des niveaux similaires. Afin de mieux comprendre la différence observée entre tissus entiers et cellules dissociées, nous avons réalisé une série de bioaccumulations contrôlées de norovirus GI.1 et GII.4 dans les huîtres qui montrent que seule une faible partie de ces virus est en interaction avec les cellules digestives. La majorité des virus est alors retrouvée dans les fractions intermédiaires, en interaction avec une substance extracellulaire qui pourrait être composée de mucines sécrétées par l'huître. Ces substances sont fortement glycosylées et pourraient piéger les particules virales lors de leur accumulation par ces organismes. Ces hypothèses sont renforcées par les deux expériences de bioaccumulation utilisant également du mengovirus. Ce dernier n'a normalement aucune interaction particulière avec les HBGA, et il est retrouvé de façon plus importante dans la fraction finale, c'est-à-dire le culot cellulaire, par rapport aux deux souches de norovirus utilisées. L'étude du O-glycome de *C. gigas*, qui comprend de telles mucines, est en cours, pour confirmer la présence de l'antigène A dans ces molécules.

## **Conclusion de la partie I :**

Dans ce premier axe de ma thèse, j'ai développé une nouvelle méthode d'étude des interactions huîtres – norovirus, au niveau cellulaire, qui a trouvé une application directe dans la caractérisation des HBGA exprimés par les huîtres, mais qui pourrait avoir des applications beaucoup plus larges en écotoxicologie ou microbiologie des coquillages. En collaboration avec les autres équipes impliquées dans le projet GOyAVE, nous avons montré qu'une molécule similaire à l'antigène A est présente dans des N-glycanes portés par les cellules de trois tissus de l'huître creuse *C. gigas*. Cette molécule serait responsable des interactions avec les norovirus GI.1 et GII.4 au niveau cellulaire. Des différences de structure entre les antigènes A de *C. gigas* et *O. edulis* expliqueraient leurs affinités contrastées pour les norovirus (Auger et al, en préparation). Cependant, *in vivo*, la majorité des norovirus bioaccumulés dans les tissus digestifs s'avèrent être en interaction avec des molécules présentes dans ce tissu mais non portées par les cellules. Notre nouvelle hypothèse est qu'il s'agit de mucines, et des expériences sont en cours pour le confirmer. Ces résultats feront l'objet d'un article rassemblant les données complémentaires obtenues par les équipes du consortium GOyAVE.

## **III.2. Réplication de sapovirus humains dans le modèle entéroïde intestinal**

### **Introduction à l'étude**

Nous avons vu précédemment que les sapovirus présentent de nombreuses similarités avec les norovirus. Ainsi, ils sont également fréquemment identifiés dans les coquillages, même s'ils sont beaucoup moins recherchés. En effet, les sapovirus humains sont moins étudiés que les norovirus, et leurs modèles d'études sont limités. Au début de cette thèse, aucun modèle de culture des sapovirus humain n'avait été publié.

L'utilisation des entéroïdes intestinaux humains a permis d'observer la réplication de nombreux virus entériques comme les adénovirus, les astrovirus et même le SARS-CoV-2. Obtenu à partir de cellules souches prélevées dans des cryptes intestinales (jéjunum, duodénum, iléon ou colon), ce modèle permet de reproduire l'épithélium intestinal et les sous-types cellulaires qui y sont présents. Il s'agit également du premier modèle cellulaire ayant permis la réplication de souches de norovirus humain depuis leur découverte. Grâce à sa grande flexibilité, il permet d'obtenir de nombreuses informations sur les virus étudiés et pouvait donc contribuer à l'amélioration des connaissances disponibles sur les sapovirus humain. La réplication des sapovirus dans ce modèle représente aussi un outil précieux pour l'étude de leur transmission environnementale, qui reste encore mal connue.

### **Objectifs de l'étude et résultats principaux**

L'objectif principal de l'étude était d'identifier des souches de sapovirus humain capables de répliquer sur le modèle entéroïde intestinal humain, et de caractériser certains paramètres de cette infection, comme le tropisme tissulaire ou la nécessité de cofacteurs comme les acides biliaires. En effet, l'implication de ces derniers dans le processus d'infection avait déjà été démontrée sur le modèle de culture des sapovirus porcins.

Sur les 5 souches de sapovirus incluses dans l'étude, deux ont montré une réplication modérée mais reproductible dans les entéroïdes humains. La présence d'acides biliaires et la différenciation des cellules intestinales sont obligatoires. Les deux souches de sapovirus se sont répliquées dans des cellules issues de l'intestin grêle (duodénum, jéjunum ou iléon) mais pas du colon. Des entéroïdes issu du jéjunum de différents donneurs, de génotype et phénotype

HBGA contrastés, ont permis de montrer que les sapovirus ne sont pas dépendants des HBGA pour établir une infection dans le modèle entéroïde intestinal humain.

**Article publié dans Journal of Virology (American Society for  
Microbiology) – <https://doi.org/10.1128/jvi.00383-23>**

(Euller-Nicolas et al., 2023)

# Human sapovirus replication in human intestinal enteroids

## Authors

Gabriel Euler-Nicolas<sup>a</sup>, Cécile Le Mennec<sup>a</sup>, Julien Schaeffer<sup>a</sup>, Xi-Lei Zeng<sup>b</sup>, Khalil Ettayebi<sup>b</sup>, Robert L. Atmar<sup>b,c</sup>, Françoise S. Le Guyader<sup>a</sup>, Mary K. Estes<sup>b</sup> and Marion Desdouits<sup>a,#</sup>

## Affiliations

<sup>a</sup> MASAE Microbiologie Aliment Santé Environnement, Ifremer, FR-44000 Nantes, France

<sup>b</sup> Department of Molecular Virology and Microbiology, Baylor College of Medicine, Houston, TX 77030, USA

<sup>c</sup> Department of Medicine, Baylor College of Medicine, Houston, TX 77030, USA

<sup>#</sup> Correspondence to: Marion Desdouits, LSEM/MASAE, Ifremer, rue d'Île d'Yeu, 44311 Nantes Cedex 03 – marion.desdouits@ifremer.fr

## Abstract

Human sapoviruses (HuSaVs), like human noroviruses (HuNoV), belong to the *Caliciviridae* family and cause acute gastroenteritis in humans. Since their discovery in 1976, numerous attempts to grow HuSaVs *in vitro* were unsuccessful until 2020, when these viruses were reported to replicate in a duodenal cancer cell-derived line. Physiological cellular models allowing viral replication are essential to investigate HuSaV biology and replication mechanisms such as genetic susceptibility, restriction factors and immune responses to infection. In this study, we demonstrate replication of two HuSaV strains in human intestinal enteroids (HIEs) known to support the replication of HuNoV and other human enteric viruses. HuSaVs replicated in differentiated HIEs originating from jejunum, duodenum and ileum, but not from the colon, and bile acids were required. Between 2h and 3 to 6 days post-infection, viral RNA levels increased up from 0.5 to 1.8 log<sub>10</sub>-fold. Importantly, HuSaVs were able to replicate in HIEs independent of their secretor status and histo-blood group antigen expression. The HIE model supports HuSaV replication and allows a better understanding of host-pathogen mechanisms such as cellular tropism and mechanisms of viral replication.

## Importance

Human sapoviruses (HuSaVs) are a frequent but overlooked cause of acute gastroenteritis, especially in children. Little is known about this pathogen, whose successful *in vitro* cultivation was reported only recently, in a cancer cell-derived line. Here, we assessed the replication of HuSaV in human intestinal enteroids (HIEs), which are non-transformed cultures originally derived from human intestinal stem cells that can be grown *in vitro* and are known to allow the replication of other enteric viruses. Successful infection of HIEs with two strains belonging to different genotypes of the virus allowed discovery that the tropism of these HuSaVs is restricted to the small intestine, does not occur in the colon, and replication requires bile acid but is independent of the expression of histo-blood group antigens. Thus, HIEs represent a physiologically relevant model to further investigate HuSaV biology and a suitable platform for the future development of vaccines and antivirals.

## Keywords

Sapovirus, norovirus, human intestinal enteroids, histo-blood group antigens, enteric virus

## Introduction

*Sapovirus* (SaV) is a genus of small RNA viruses within the *Caliciviridae* family, which also contains the *Norovirus* (NoV) genus. HuSaV was first discovered in 1976, by electron microscopic observation of fecal samples from patients with gastroenteritis in the United Kingdom (1), but the most studied strain originated in the early 1980s, from samples from children in a Japanese orphanage located in Sapporo (2). HuSaVs contain a single stranded, positive-sense, poly-A tailed RNA genome of 7.1kb to 7.7kb, encoding 2 open reading frames (ORF) that are packaged in an icosahedral capsid ranging from 30 to 38 nanometers in diameter (3). ORF1 encodes a polyprotein that is proteolytically cleaved into at least six nonstructural proteins and possibly the major structural protein VP1 (4), which self-assembles to form a particle of 180 copies of VP1 (5). ORF2 encodes a minor structural protein, VP2 (6). A subgenomic RNA comprising the coding sequence of VP1 and VP2 has been identified in a porcine strain; thus, VP1 may arise from the cleavage of the polyprotein, or from the translation of this subgenomic RNA (3). *Caliciviridae* share a common capsid structure, with VP1 divided in two domains: a S domain, mostly conserved between strains, and a P domain, with a subdomain P2 displaying the most variable region in amino acid sequences, primarily accounting for antigenic and immunogenic diversity (5). VLP production does not require VP2 owing to the self-assembling properties of VP1 dimers, and HuSaV VP2 structure and function are still largely uncharacterized. HuSaVs are classified into four genogroups: GI, GII, GIV and GV (7). Other SaV genogroups have been identified in various animal species such as minks, bats, sea lions, dogs, rodents, or chimpanzees (8).

HuSaV infection causes classical acute gastroenteritis (AGE) symptoms that are considered milder or similar to those caused by HuNoV and human rotavirus (RV) (9). Molecular detection is required to properly identify the causative pathogen and is infrequently performed for HuSaVs. Yet, HuSaVs are one of the common causes of viral gastroenteritis globally, causing ~3.4% of cases based on a meta-analysis of 106 studies around the world (10). In recent studies, HuSaVs have been detected more frequently than human RV in countries with childhood vaccination programs targeting RV (11–13). Infection is likely to occur across the human population at a young age, usually before 2 years (14,15). Viral progeny is excreted in feces, up to  $10^{11}$  copies per grams of stool (16), and HuSaV transmission occurs through the fecal-oral route via contact with HuSaV-positive feces, vomitus, contaminated surfaces, contaminated food and/or drinks. Yet, as opposed to the marked winter seasonality of HuNoV in the northern hemisphere, seasonality is less apparent for HuSaV. Studies on different continents show differing seasonal patterns, but correlation with high rainfall, low temperature and floods is suspected (9). In sewage, HuSaV may be detected year-round (17).

Similar to HuNoV, *in vitro* replication of HuSaV was a challenge for more than 40 years from when the virus was first isolated. A porcine sapovirus (PoSaV), the Cowden strain, can be cultivated in porcine LLC-PK1 cells in a bile-dependent manner (18). More recently, Takagi et al. succeeded in propagating GI.1 and GII.3 HuSaV strains in HuTu80 (duodenum) and NEC8 (ileocecum) cancer cell lines, in the presence of bile acids, further demonstrating the important role of this cofactor in HuSaV infection (19). However, due to the previous lack of a reliable culture system, there is still little information about the HuSaV viral life cycle and tropism.



Studies of tissues obtained from infected piglets suggest that replication of the PoSaV Cowden strain occurs in the small intestine, especially in the duodenum and jejunum (20). PoSaV requires sialic acids linked to O-glycoproteins as receptors, but the HuSaV tropism and receptor(s) remain unknown (21). Regarding HuNoV, epidemiological studies have demonstrated that some HuNoV strains are, at least partially, restricted to people with the secretor phenotype (22), who express histo-blood group antigens (HBGAs) in their intestinal mucosa. Most HuNoV strains bind to HBGAs (23,24). Conversely, HuSaV has not previously been shown to interact with HBGAs (25).

Human intestinal enteroids (HIEs) have become an essential tool to study HuNoV replication in human cells, overcoming decades of unsuccessful attempts at creating a cellular model allowing culture of these viruses (26). HIEs are derived from LGR5+ stem cells isolated from intestinal crypts, maintained in a 3-dimensional environment, and can be grown to form multicellular structures recapitulating small intestine tissues or as two-dimensional monolayers. Using this physiological model has allowed a better understanding of HuNoV–host interactions and confirmed the dependency of several HuNoV strains for the expression of HBGA to initiate successful infection (27–30). This model also allows replication of enteric viruses including rotavirus, enterovirus, coronavirus, adenovirus, astrovirus (31).

Here, we undertook this study to evaluate whether HIEs support the replication of HuSaVs, to examine whether replication requires bile acids, investigate HuSaV tropism and the requirement of HBGAs for infection using HIEs from different segments of the gut and from different human donors with different HBGA phenotypes. Our results show that the HIE model is fit to investigate HuSaV–host interactions.

## Material and methods

**Viral strains.** HuSaV-positive or HuNoV-positive 10% fecal suspensions were prepared in PBS, 0.22µm-filtered, aliquoted and stored at -80°C, as described previously (26), before being used to inoculate cells. Viral titers were determined by quantitative, one-step reverse transcription and PCR (qRT-PCR) on extracted nucleic acids, as described previously for HuNoV (32). **Table 1** describes the viral strains used for subsequent experiments. The HuSaV S611 strain was heat-inactivated for 15 minutes at 60°C before being used to inoculate HIE monolayers in some experiments.

**Table 1: list of viral strains used to perform infection experiments**

Virus	Strain	Titer (gc/mL)*	Genotype	Accession # or ref
HuNoV	TCH11-64	5.8x10 <sup>9</sup>	GII.4	(26,29)
	TCH04-577	1.07x10 <sup>10</sup>	GII.3	GU930737 (26,29)
HuSaV	S496	1.2x10 <sup>9</sup>	GIV.1	OP654149
	S513	5.81x10 <sup>8</sup>	GI.2	OP654151
	S578	2.89x10 <sup>8</sup>	GI.2	OP654152
	S586	7.2x10 <sup>10</sup>	GII.3	OP654150
	S611	3.66x10 <sup>10</sup>	GI.1	OP654153

\*gc/ml: genome copies / ml of fecal filtrate.

**Viral strain sequencing.** Stool fecal suspensions were incubated with 2000 U of OmniCleave Endonuclease (Epicentre, Madison, US) for one hour at 37 °C to eliminate free nucleic acids, followed by nucleic acid extraction as in (33). A final step of RNA purification and concentration was performed using a Zymo-spin column (RNA Clean & Concentrator, Zymo Research, Irvine, USA). Libraries were prepared by synthesizing cDNA using the Superscript IV kit (Life Technologies) with random hexamers according to the manufacturer’s instructions (Life Technologies). cDNA first strand was physically fragmented (Ultrasonicator M220, Covaris) for 2.5 min. and afterwards, the NEBNext® Ultra™ II RNA Library Prep Kit for Illumina (E7770L –NEB) was used for Illumina pools. Sequencing was performed on an Illumina MiSeq to generate 2 × 250 bp reads. Viral reads were assembled into full genomes and genotyped using the Genome Detective online tool (<https://www.genomedetective.com/>).

**HIE cells.** HIEs used in this study were obtained from healthy tissues of human donors who gave informed consent, according to a protocol approved by the Baylor College of Medicine Institutional Review Board (BCM IRB). The HIE cultures were maintained as described previously (29) in agreement with the ethical evaluation committee of the French Institute of medical research and Health (CEEI,). The tissue origin of the stem cells is designated using letters: J for jejunum, D for duodenum, IL for ileum and C for colon, and the number indicates the donor. In addition, a genetically modified J2 HIE line (J2FUT2KO) that is an isogenic J2 line with the *FUT2* gene responsible for the secretor phenotype knocked out and J4 cells genetically-modified to express a functional *FUT2* gene (J4FUT2KI), as described previously, were also used for experiments (34).

**Table 2: List of HIE lines used in this study**

HIE line	Tissue of origin	Phenotype		Reference
		Secretor status	ABO	
J2	jejunum	Sec +	B, Lewis b	Ettayebi et al., 2016 (26)
J11	jejunum	Sec +	Lewis b	
J2002	jejunum	Sec +	Lewis b	Ettayebi et al., unpublished data
D2002	duodenum			
IL2002	ileum			
TC2002	transverse colon			
J4FUT2KI	jejunum	Sec +	Lewis b	Haga et al., 2020 (34)
D109	duodenum	Sec +	A, Lewis b	Rajan et al., 2018 (35)
IL109	ileum			
C109	colon			
J2FUT2KO	jejunum	Sec -	Lewis a	Haga et al., 2020 (34)
J4	jejunum	Sec -	Lewis a	Haga et al., 2020 (34)
J10	jejunum	Sec -	A	Rimkute et al., 2020 (30)

HIE culture. All HIEs were grown in a 30µl dome of Matrigel growth-factor-reduced basement membrane matrix (Corning) surrounded with 500µl of Intesticult Intestinal Organoid Growth Medium (OGM; StemCell) supplemented with antibiotics (0.3% PenStrep) in 24-well plates (Nunclon, ThermoScientific). Cells were incubated at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. Medium was changed every 2 to 3 days, and cells were passaged every week using trypsin 0.05% - EDTA (Gibco, ThermoFisher) and repeated pipetting to dissociate cells within the enteroids, before being centrifuged, re-suspended in Matrigel and plated.

For infection experiments, 3D grown enteroids were dissociated for 4 min at 37°C in a water bath with Trypsin-EDTA 0.05% (Invitrogen) and mixed by repeated pipetting in order to obtain a single cell suspension. A minimum of 1x10<sup>5</sup> cells per well were plated in 96-wells plates (Nunclon, ThermoScientific) coated with 33µg/ml human collagen type IV (Sigma Aldrich) in molecular-grade water. After 24 to 48 hours of culture at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> with OGM supplemented with Y-27632 (10µM, Sigma Aldrich), medium was replaced with differentiation medium made of 50% Intestinal Organoid Growth Medium basal component, and 50% complete medium without growth factor (CMGF-), which is advanced DMEM/F12 medium (ThermoFisher) supplemented with 2mM GlutaMax (Life technologies) and 10mM HEPES for 4 days to induce cellular differentiation.

Infection experiments. Infections were performed on confluent monolayers 4 days after initiating differentiation. When not specified, the viral inoculum concentration used per well was as described in **Table 3**. Viral inocula were prepared with CMGF- supplemented with various concentrations of glycochenodeoxycholic acid (GCDCA, Sigma-Aldrich), ranging from 5µM to 1mM, and 500µM when not specified. Cells were incubated with viral inoculum for 1 to 2 hours. Inocula were then removed, and cells were washed 3 times with CMGF-. 100µL of differentiation medium with GCDCA were then added to each well, and for each set of infections, one plate was immediately frozen at -20°C. The other plate was incubated at 37°C under 5% CO<sub>2</sub> for 3 to 7 days, then frozen at -20°C until undergoing RNA extraction.

**Table 3: Viral concentrations of inocula used for infection experiments**

Virus	Strain	Concentration / well	Genotype
HuNoV	TCH11-64	1x10 <sup>5</sup>	GII.4
	TCH04-577	1x10 <sup>6</sup>	GII.3
HuSaV	S611	1x10 <sup>8</sup>	GI.1
	S513	1x10 <sup>7</sup>	GI.2

HuTu80 culture and infection. The HuTu80 cell line (ATCC, #HTB-40) was cultured in DMEM supplemented with 2mM Glutamax, 0,3% PenStrep and 5% FBS at 37°C under 5% CO<sub>2</sub>. Monolayers were made by dissociating cells from a confluent flask and seeding 24-well plates with 5x10<sup>5</sup> cells in 0.5ml of culture medium. Before infection, the medium was replaced with 0.5mL of virus growth media, which is a 3% FBS culture media supplemented with the bile acid GCDCA at concentrations varying from 250µM to 1mM. The viral inoculum was then added to each well, and cells were washed twice with 2% FBS DMEM 1 day after inoculation. 1mL of virus growth media was then added to each well, and 100µL of supernatant was

harvested at each time-point and frozen until RNA extraction. The protocol was adapted from (19).

RNA extraction from cell cultures. RNA was extracted from cell cultures in 96-well plates with the NucliSens kit (BioMérieux) using the EasyMag automated system. The plates were left at room temperatures to thaw, and then 100µl of lysis buffer was added to each well and incubated for 10 min. The 200µl-content of each well was then homogenized and transferred to an EasyMag well containing 2ml of lysis buffer, and 50µl of magnetic silica was added. The manufacturer's program was then used for nucleic acid extraction with 100µl elution buffer.

Viral quantification by qRT-PCR. The genomic viral titers were measured by qRT-PCR, using the RNA UltraSense™ One-Step Quantitative RT-PCR kit. For HuSaV, the forward primers were SaV1F, 5'-TTG GCC CTC GCC ACC TAC-3' and SaV124F, 5'-GAY CAS GCT CTC GCY ACC TAC-3', the reverse primer was SaV1245R, 5'CCC TCC ATY TCA AAC ACT A-3' and the probe was SaV124TP, 5'-FAM-CCR CCT ATR AAC CA-MGBNFQ (36). For HuNoV, the primers were used as previously described (37). Initial denaturation was carried out at 55°C for 15 min followed by 5 min at 95°C, and then 45 cycles consisting of 15 s at 95°C followed by 30 s at 60°C and 30 s at 65°C were performed.

Quantification of viral copy numbers was calculated with a 2x6 points standard curve made by 10-fold serial dilutions of synthetic DNA (Integrated DNA Technologies), with the target sequence between nucleotide 4626 and 5683 of HuSaV strain Mc114 (GenBank AY237422.3), or the sequence between nucleotide 4191 and 5863 of HuNoV GII.4 Houston virus (38) (Genbank EU310927).

Gene expression assay by fluidic qPCR. To assess the differentiation of intestinal cells at the time of infection, the expression of 6 genes was measured in RNA extracted 2 hours post-infection (hpi) using a microfluidic qPCR system (Standard Biotoools). Primer and probes for gene expression assays (GEA, Applied Biosystems) were chosen to target a reference gene (GAPDH), markers of proliferating (Ki67) and stem cells (LGR5, CD44) and two differentiation markers, Sucrase-Isomaltase (SI) for enterocytes and Mucine 2 (Muc2) for goblet cells. Briefly, 7µl of RNA was reverse-transcribed using the SuperScript II kit (Thermo Scientific), as per the manufacturer's instructions, in 20µl reaction mixtures with 2.5µM random hexamers and nonamers (Thermo Scientific). Complementary DNA (1.25µl per sample) was pre-amplified in 5µl reaction mixtures using 1µl of Preamp Master Mix (Standard Biotoools) with 1.25µl of 0.2X primers-probe assays pooled together, through 2 min denaturation at 95°C followed by 14 cycles of 15s denaturation at 95°C and 4 min. hybridation-elongation at 60°C. Immediately after the pre-amplification, PCR products were diluted (1:5) by adding 20µl of TE and stored at 4°C prior to use in qPCR. For the qPCR assay, a Flex Six integrated fluidic circuit (Standard Biotoools) was loaded on one side with 12 x 3µl reaction mixtures based on the UltraSense One-Step Quantitative RT-PCR kit (Thermo Scientific) in a BioMark device (Standard Biotoools), together with 1X GE Sample Loading Reagent (Standard Biotoools) and 1.35µl of preamplified DNA, and on the other side with 3µl of assay mix containing 1.5µl of one gene expression assay (10X final) and 1.5µl assay loading reagent (Standard Biotoools), in duplicate for each of the six assays. The qPCR program included a thermal mix with 30min at 25°C and 1h at 70°C, 5 min. denaturation at 95°C and 45 cycles of 15s denaturation at 95°C, 30s hybridation at 60°C and 30s elongation at 65°C with fluorescence acquisition. It was run in a BioMark device (Standard Biotoools). Results were analyzed using the BioMark analysis software (Standard Biotoools).

Evaluation of cell viability during HuSaV infection. Infected HIE monolayers were incubated with 25 $\mu$ L of Blue Cell Titer (Promega) diluted in 75 $\mu$ L of differentiation medium, for 3 hours. Fluorescence was then measured with a TECAN Infinite 200 Pro (Tecan Group Ltd.) at an excitation wavelength of 560nm and emission wavelength of 590nm. Next, the wells were washed twice with CMGF- and the differentiation medium was replaced. Wells without cells were used as baseline absorbance values. The percentage of viable cells was calculated by comparing the absorbance of the measured wells for each condition (inoculated with live or heat-treated S611) to the corresponding control wells, which contained cells that were not infected and were considered to display 100% viability value at each time-point.

Controls and statistical analysis. Viral replication was evaluated by calculating the geometric mean fold change for each set of experiments, as the mean of triplicate  $2^{\Delta\Delta Ct}$  measured between a late time point (usually 72hpi) and the first time point (1-2h pi) for each replicate. Hence, a geometrical mean fold change above 1 corresponds to an increase in viral genome quantities over time, and below 1, to a decrease. The virus was considered to replicate when the geometrical mean fold change was equal or greater than 3 ( $\sim 0.5 \log_{10}$ ). For most experiments with HuSaV, HIE monolayers were inoculated with HuNoV GII.4 (TCH11-64) in parallel as a positive control. Three experiments were excluded from analysis when HuNoV unexpectedly did not replicate (fold increase 0.5  $\log_{10}$  or less), indicating that the culture conditions were suboptimal. Statistical analyses were run using GraphPad Prism version 9.4.0.

## Results

### HIE cultures support HuSaV replication

To evaluate if HIEs could support HuSaV replication, we inoculated differentiated J2 HIE monolayers with HuSaV-positive stool filtrates at different concentrations in the presence of the bile acid GCDCA, similar to the protocol used previously for HuNoVs (39). Of the five stool filtrates evaluated, two (S611 and S513) showed 0.5-1.8  $\log_{10}$ , ie 3 to 63-fold, increases in genome copies from 1-2hpi to 72hpi respectively, depending on the amount of virus in the inoculum (**Fig. 1A**). We confirmed that the S611 strain replicated successfully on J2 HIE monolayers more than 40 times over a 2-year period, with a geometric mean fold change in viral genome of 32 between 1-2hpi and 72hpi ( $p < 0.0001$ , Wilcoxon signed-rank test) (**Fig. 1B**). Due to a lower titer, S513 was used in 9 experiments on J2 HIE monolayers, and showed replication in 6, with a mean fold change of 7.7 between 1-2h and 72hpi ( $p = 0.01$ , Wilcoxon signed-rank test), lower than S611 in the same HIE line (**Fig. 1C**). In most experiments, monolayers were also inoculated with HuNoV GII.4 TCH11-64 strain as a control (**Fig 1D**), for which the mean fold change was much higher (4388 mean fold change;  $p < 0.0001$ , 1-2hpi vs 72hpi, Wilcoxon signed-rank test) than for the two tested HuSaV strains. Together, these results demonstrate that two strains of HuSaV replicated repeatedly in J2 HIEs, albeit with lower fold changes after 3 days of infection compared to a HuNoV GII.4 strain.

We next investigated the kinetics and magnitude of S611 replication in HIEs. To assess if the low fold changes observed at 72hpi were due to a more protracted course of infection for HuSaV in HIEs, we measured the fold increase after 6 days (144h) of infection (**Fig. 2A**). Viral

genome concentrations were higher at 72hpi and 144hpi than at 2hpi ( $p < 0.05$  for both, Wilcoxon signed rank test), with fold changes in viral genome of 9.8 and 17.1 at 72h and 144hpi, respectively, confirming successful viral replication. There was a small but significant difference between the two late time points ( $p$  value = 0.047). We next tested the replication of the S611 strain in the HuTu80 duodenal cell line that was recently shown to support replication of HuSaV GI.1, with varying amounts of virus in the inoculum. Like in HIEs, S611 replicated in HuTu80 cultures, with fold changes in viral genome copies of  $\sim 2 \log_{10}$  between 1 day and 3 or 6-days post-infection (**Fig. 2B**), lower than the fold increase previously reported for another GI.1 strain (19). Of note, we were able once to use the S611 fresh after collection, before any freeze-thaw cycle, on J2 HIEs in a single experiment that showed a high fold increase ( $\times 1115$ ) of the viral genome in 72hpi (**Fig. S1**). The kinetics of S611 replication in the D109 HIE line showed an increase in viral genome copies between 1 and 72h post-infection, followed by a plateau until 6 days (144h) post-infection (**Fig. 2C**). To control for the exposure of HIEs to fecal filtrates, in the absence of viral replication, we inoculated cultures with heat-inactivated virus, where the viral genome copies showed a slow but steady decline as expected (**Fig. 2C**). In parallel, the viability of the cell culture was monitored using a metabolic assay and was not affected by the HuSaV replication, nor by exposure to the inactivated virus (**Fig. 2D**). These results show that in our experimental conditions, HuSaV S611 replicates at low levels and does not alter the viability of HIEs.

### **Replication of S611 HuSaV strain in jejunal HIE is dependent on bile acid and cell differentiation**

We next assessed whether bile acids were necessary for HuSaV S611 replication in HIEs as previously shown for replication of the PoSaV Cowden strain (40) and in previous work conducted with HuSaV in the HuTu80 human duodenal cell line (19). J2 HIE monolayers were inoculated with HuSaV S611 in the presence of increasing concentrations (from  $0 \mu\text{M}$  to  $1 \text{mM}$ ) of the bile acid GCDCA. We observed that GCDCA was necessary for a productive infection of J2 HIE monolayers by HuSaV S611, with fold changes in viral genome copies  $> 3$  appearing when GCDCA concentrations were between  $250 \mu\text{M}$  and  $1 \text{mM}$  (**Fig. 3A**). A concentration of  $500 \mu\text{M}$  was set for the next experiments.

We also tested the effect of another bile acid, sodium glycocholate (GlyCA), as it was used in the study of HuSaV replication in HuTu80 cells (19). HuSaV S611 replicated similarly with  $500 \mu\text{M}$  of GCDCA (mean fold change of 10.8 between 2h and 72h pi) or GlyCA (mean fold change of 16.3) (**Fig. 3B**).

HuNoV bile-dependent strain (GII.3) and partially independent strain (GII.4) were also inoculated in parallel as controls and recapitulated results obtained previously (26) (**Fig. 3C and 3D**).

We then took advantage of the HIEs to investigate whether HuSaV infects intestinal stem cells and/or differentiated cells, such as enterocytes that are a target of HuNoV. J2 HIEs were plated as monolayers and either infected the following day and kept in stem-cell growth medium (Intesticult OGM) or induced to differentiate using a medium with reduced concentrations of niche growth factors for 4 days before being infected. HuSaV replicated to higher fold changes in differentiated cells compared to in un-differentiated cells (**Fig. 4A**). Similar results, albeit with higher fold increases, were observed with HuNoV GII.4 (**Fig. 4B**). The expression of 5 genes known to be modulated during differentiation was assessed by qRT-PCR. Relative expression of stem cell and proliferation markers (Ki67, LGR5, CD44) was lower in the

condition with differentiation medium (mean fold changes of 0.22, 0.036, 0.19 respectively; p values <0.0001, paired t-test). Conversely, Sucrase-isomaltase (SI) was markedly induced (fold change of 2592, p value <0.05, paired t-test), indicating that cells differentiated into enterocytes. The mucus 2 (Muc2) marker of goblet cells was not affected (fold change 0.92, p value = 0.74, paired t-test). Altogether these results show that HIE differentiation is necessary for a consistent replication of HuSaV.

### **HuSaV replicates in cells of the three portions of small intestine from different donors**

To assess the tropism of HuSaV in the human gut, we used HIEs originating from different segments of the intestine of the same donor. In donor 109, we observed the replication of both S611 (**Fig. 5A**) and S513 (**Fig. 5B**) in duodenal (D109) and ileal (IL109) cells, after 72 or 144hpi, but not in cells from the colon (C109). The HuNoV GII.4 TCH11-64 strain showed the same pattern (**Fig. 5C**), as previously reported (29). S611 replicated poorly in IL109, whereas S513 showed higher fold increases in ileal cells. In HIEs from donor 2002 (**Fig. 5D**), for which cultures from all segments from a single individual were available, S611 replicated in cells from the jejunum (J2002) and the ileum (IL2002), but not from the duodenum (D2002) or the transverse colon (TC2002). From these results, we conclude that HuSaV can replicate in HIEs from different donors, and in cells from the 3 portions of the small intestine, but that strain-related or donor-related factors may modulate this tropism.

### **HuSaV replication in HIE is independent of secretor status**

The tested HuSaV strains replicated in HIE cell monolayers from three different donors: 2, 109 and 2002, all secretor positive (**Table 2**). We next investigated if secretor phenotype and blood type (HBGA phenotype) could impact HuSaV replication, as it does restrict several HuNoV strains. S611 replicated successfully in 3 of 7 experiments in jejunal HIE J10 (secretor and Lewis negative) and in 6 of 7 experiments in J11 (secretor positive) (**Fig. 6A, left panel**), whereas HuNoV GII.4 did not replicate in J10 (**Fig. 6A, right panel**). Interestingly, S611 initial binding and viral genome fold changes in 72hpi appeared to be lower on the J10 HIE line than in the two secretor positive lines.

Next, we tested the dependency to the secretor phenotype in isogenic cells, using two HIE lines and their genetically-modified counterparts: J4, a secretor negative line, with the J4FUT2KI knock-in, and J2, a secretor positive, with the J2FUT2KO knock-out. HuSaV S611 was able to replicate in all HIEs independently of the expression of *FUT2* (**Fig. 6B and C**). As observed previously (26,34), HuNoV did not show replication in secretor negative J10, J4 and J2FUT2KO HIE lines. These results show that S611 HuSaV strain can replicate in both secretor positive and negative jejunum HIEs from different donors, with 5 secretor positive and 3 secretor negative HIE lines being tested. As expected, GII.4 HuNoV showed no replication in the 3 secretor negative HIE lines (**Fig. 6A, B and C, right panels**). Of note, most of the tested HIEs are O blood group but S611 also replicated in A and B type group HIEs (D-IL109 for A group, and J2 for B group, Table 2).

## **Discussion**

Prior attempts to grow HuSaV have been published, mostly in primary kidney and intestine cells of human or simian origin, but many have produced either inconclusive or non-

reproducible results (41–43). On the other hand, the PoSaV Cowden strain replicates successfully in porcine kidney cells (18,44), and its replication is dependent on bile acids with sialic acids acting as a binding factor. Recently, Takagi and al. reported efficient replication and passaging of GI.1 and GII.3 HuSaV strains in a HuTu80 adenocarcinoma cell line of duodenal origin in presence of bile acids, and a reverse genetics system also produced GII.3 virions after transfection of HuTu80 cells (6,19). Our work focused on HIEs, a physiological model of human intestine in which several enteric viruses can replicate. The genetically diverse range of donors and genetically modified HIE lines also allows investigation of viral tropism and cofactors required for replication.

In this work, we were able to successfully grow two HuSaV strains in HIEs: S611 (GI.1) and S513 (GI.2) (**Table 1**). These two genotypes cause the majority of cases in Europe (45,46), and were the most frequently detected in HuSaV-positive fecal samples in a 2021 study in Spain (11). These two strains showed consistent viral replication in the HIE J2 line of jejunal origin, over a time-frame of 2 years for S611, characterized by a moderate multiplication. Indeed, the viral genome fold changes within 3 or 6 days post-infection did not reach levels as high as those achieved by GII.4 HuNoV in HIEs (2-3  $\log_{10}$ ) or HuSaV in HuTu80 (19) (from 2 to 6  $\log_{10}$ ), which precluded serial propagation experiments in our study. However, in our hands, S611 replication in the HuTu80 cell line was also moderate (1-2  $\log_{10}$ ), which suggests that this may be a characteristic of the strains used in this study. Indeed, previous work has shown that some HuNoV strains also display a low or moderate viral replication in HIEs (26,47,48). A unique experiment conducted with fresh S611, before any freezing, showed a higher 3  $\log_{10}$  fold ( $\times 1115$ ) increase in the J2 HIE line (**Fig. S1**), but additional fresh stool samples containing virus were not available to evaluate the repeatability of this observation. Hence, our results showing moderate fold changes in viral genomes for HuSaV S611 and S513 need to be repeated with more strains, and if possible, fresh stool samples, before drawing conclusions on the magnitude of HuSaV replication in HIE in general. In addition, kinetic experiments showing that the viral replication mostly occurs in the first day of infection suggest that HuSaV S611 did not propagate efficiently in HIE cultures, and was limited to one replication cycle, as also observed for several HuNoV strains (49). Finally, although most experiments showed replication of S611 (38 out of 40 experiments) and S513 (6 out of 9), in some cases with similar inoculum and experimental conditions, the viruses did not grow. This has been observed previously for some HuNoV strains with low or moderate amplification (47). Similarly, heterogeneity in viral fold change was also reported for a HuNoV strain across repeated experiments (48). Here, HuNoV GII.4 was included in most experiments to control for the ability of the cell cultures to sustain an infection (see material and methods). Thus, the resulting heterogeneity in HuSaV replication may be linked to a possible heterogeneity of the stool samples where the viral particles may form aggregates or vesicle-cloaked clusters, as reported for HuNoV (50,51).

Despite these moderate levels of replication, the HIE model was still adequate to investigate HuSaV biology. We first confirmed that bile acids are required for efficient replication of HuSaV S611 in HIEs. Here, GCDCA was mainly used, similarly to the norovirus replication model (26), but could be replaced by GlyCA (**Fig. 3B**), as was done on HuTu80 cells (19). Some strains of HuNoV replicated in HIEs independently of bile acid (**Fig 3D**) (26), other HuSaV samples should be tested in this model as well to generalize this observation. Based on HuNoV work, bile acids are thought to promote viral replication by enhancing endosomal uptake, acidification and ceramide levels on the apical membrane (39). Work on PoSaV also



showed similar effects, as bile acids are required for virions to escape endosomes into the cytoplasm and for the production of ceramide (52).

Likewise, intestinal stem-cell differentiation was necessary to support efficient replication of HuSaV S611 in jejunal HIE (**Fig. 4A**), as observed previously for HuNoV (**Fig. 4B**) (29). Moreover, since this differentiation was mostly characterized by a strong induction in SI expression, a marker of enterocytes, rather than Muc2, a marker of goblet cells (**Fig. 4C**), our results suggest that enterocytes may be the main cell type sustaining HuSaV replication in HIE cultures, although the contribution of other cell types cannot be excluded.

Using the HIE model also allowed us to investigate the potential tropism of HuSaV in the human intestine, with cells originating from jejunum, duodenum, ileum and colon of two different donors. We observed the replication of both HuSaV strains in HIEs derived from the three segments of the small intestine, with variations between the cultures from the two tested donors. D2002 showed only one experiment with >3 fold change in viral genome at 72hpi, but efficient replication occurred in duodenal cells from the other donor, D109 cells. Conversely, in the colonic HIE (C109 and TC2002), viral titers of HuSaV S611 or S513 decreased over 3 days (**Fig. 5A and Fig. 5D**), indicating that cells derived from this section of the intestine do not support measurable viral replication. Our data strongly suggest that the tested HuSaV strains replicate in the small intestine but not in the colon. Likewise, PoSaV is believed to mainly infect small intestinal tissues based on histological localization of virus-induced damage in gnotobiotic piglets (53). This is also consistent with the fact that the small intestine is physiologically exposed to bile acids, a necessary cofactor for replication of the PoSaV Cowden strain and the HuSaV strains tested to date.

HBGA polymorphisms in the human population are known to drive sensitivity or resistance to infection with HuNoV and other enteric pathogens (54). Epidemiological data suggest that this is not the case for HuSaV (55,56), but these studies were conducted on small cohorts (with number of HuSaV infected patients between 33 and 42) and some did not observe the usual secretor-associated trend when looking at HuNoV infections (57). Here, we took advantage of HIEs originating from donors expressing various HBGAs to assess the dependency of HuSaV on secretor or ABO phenotypes. S611 replicated both in secretor-positive (J2, J11, J4FUT2KI) and secretor negative (J10, J4, J2FUT2KO) jejunal HIE cells and in HIE from A, B and O blood group donors. Some small differences can be noted, such as a reduced viral binding at 2hpi, less experiments showing viral replication (3 out of 7 experiments) and lower viral replication when infecting the secretor-negative J10 HIEs compared to secretor positive J2. However, this could be due to other unknown differences between J2 and J10, which were derived from different donors and could have different levels of expression of the viral receptor or other cellular cofactors. To exclude these, we then used isogenic cell lines differing only with the expression of FUT2. J4 HIEs, initially secretor negative with homozygous se428/se428 in the *FUT2* gene, supported S611 replication, with viral binding at 2hpi similar to that of J2 cells. When knocked-in for *FUT2* (J4FUT2KI), these cultures remained infected by S611. Our results are also in agreement with previous studies made with GI and GV HuSaV VLPs that showed no interactions between VLPs and human HBGAs from saliva or synthetic carbohydrates (25). Further epidemiological studies conducted on a larger scale could totally eliminate a possible link between secretor status and susceptibility to HuSaV infection, although data presented in this paper and previous studies strongly suggest that HuSaV infection and replication are independent from intestinal HBGAs.

Due to a lower viral concentration and volume of sample, S513 could not be used in all experiments, which would have allowed more comparisons between the two HuSaV GI genotypes. In 4 different cell lines tested with both viruses (J2, D109, IL109 and C109), the two strains behaved similarly. Three other tested strains did not replicate on HIE J2 (**Fig. 1A**), which could be due to their lower titers, especially for S496 and S578. Thus, additional strains will need to be tested to investigate whether other GI genotypes or other HuSaV genogroups also replicate in HIEs.

Initially overshadowed by more pathogenic viral AGE agents, HuSaVs have increasingly been detected in the human population, possibly due to the more widespread use of molecular diagnosis tools and/or to an actual epidemiological change, following RV vaccine implementation. Recent research highlight some unique characteristics of the SaV genus in comparison with the more studied NoV (5,58). Most of the HuSaV biology remains to be explored, and we show here that HIEs represent a physiologically relevant model for further investigation of HuSaVs replication cycle and virus-host interactions.

### **Acknowledgements**

We are grateful to Dr Jacques Le Pendu for helpful discussions and insight.

This research was funded by the French Ministry for Agriculture, Direction Générale de l'Alimentation (to FSLG) and in part by PO1-AI057788 from the National Institutes of Health (to MKE and RLA). The funders had no role in study design, data collection and interpretation, or the decision to submit the work for publication.

A CC-BY public copyright license has been applied by the authors to the present document and its accompanying figures, and will be applied to all subsequent versions, up to the Author Accepted Manuscript arising from this submission, for the purpose of Open Access.

### **Authors contribution**

FLSG, MKE and RLA obtained funding; GEN, CLM, JS, XLZ, KE and MD performed experiments; GEN, JS, MD analyzed the results; GEN, CLM, MD wrote the first version of the manuscript; GEN, KE, RLA, FSLG, MKE and MD contributed to the final manuscript.

### **Bibliography**

1. Madeley CR, Cosgrove BP. CALICIVIRUSES IN MAN. *The Lancet*. 1976 Jan 24;307(7952):199–200.
2. Chiba S, Sakuma Y, Kogasaka R, Akihara M, Horino K, Nakao T, et al. An outbreak of gastroenteritis associated with calicivirus in an infant home. *J Med Virol*. 1979;4(4):249–54.
3. Oka T, Wang Q, Katayama K, Saif LJ. Comprehensive Review of Human Sapoviruses. *Clin Microbiol Rev*. 2015 Jan;28(1):32–53.

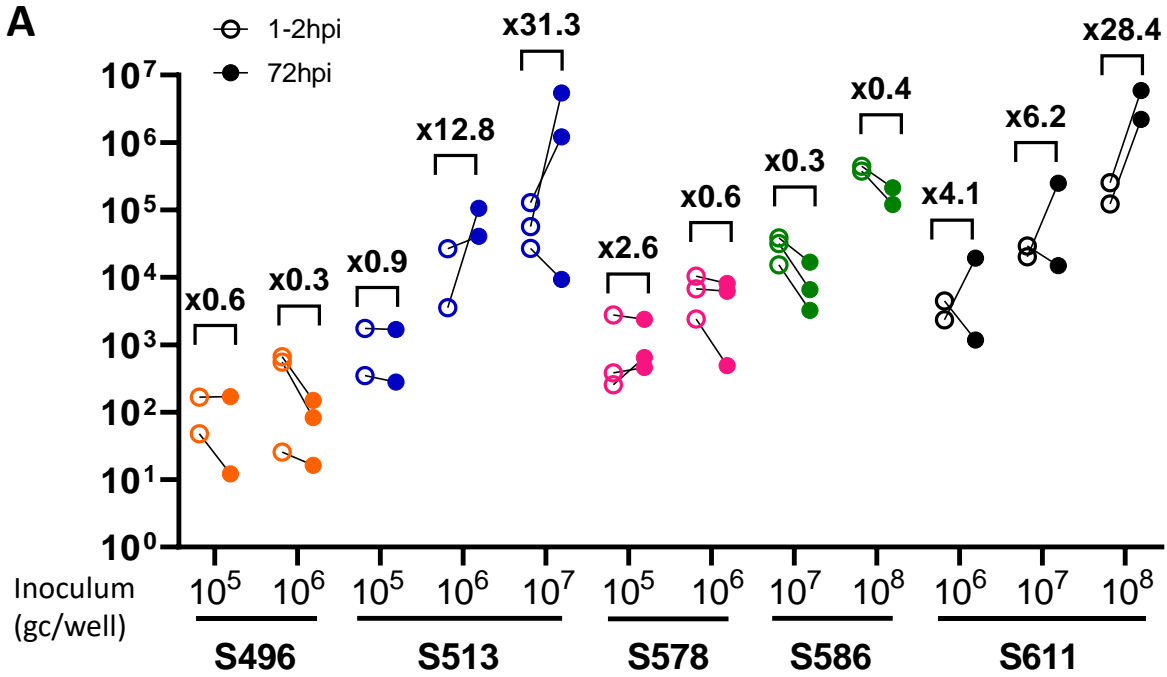
4. Oka T, Katayama K, Ogawa S, Hansman GS, Kageyama T, Ushijima H, et al. Proteolytic Processing of Sapovirus ORF1 Polyprotein. *J Virol*. 2005 Jun;79(12):7283–90.
5. Miyazaki N, Song C, Oka T, Miki M, Murakami K, Iwasaki K, et al. Atomic Structure of the Human Sapovirus Capsid Reveals a Unique Capsid Protein Conformation in Caliciviruses. *Dutch RE, editor. J Virol*. 2022 May 11;96(9):e00298-22.
6. Li TC, Kataoka M, Doan YH, Saito H, Takagi H, Muramatsu M, et al. Characterization of a Human Sapovirus Genotype GII.3 Strain Generated by a Reverse Genetics System: VP2 Is a Minor Structural Protein of the Virion. *Viruses*. 2022 Aug;14(8):1649.
7. Oka T, Mori K, Iritani N, Harada S, Ueki Y, Iizuka S, et al. Human sapovirus classification based on complete capsid nucleotide sequences. *Arch Virol*. 2012 Feb 1;157(2):349–52.
8. Li J, Zhang W, Cui L, Shen Q, Hua X. Metagenomic identification, genetic characterization and genotyping of porcine sapoviruses. *Infect Genet Evol*. 2018 Aug 1;62:244–52.
9. Becker-Dreps S, González F, Bucardo F. Sapovirus: an emerging cause of childhood diarrhea. *Curr Opin Infect Dis*. 2020 Oct;33(5):388–97.
10. Valcarce MD, Kambhampati AK, Calderwood LE, Hall AJ, Mirza SA, Vinjé J. Global distribution of sporadic sapovirus infections: A systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE [Internet]*. 2021 [cited 2022 Oct 17];16(8). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8376006/>
11. de Oliveira-Tozetto S, Santiso-Bellón C, Ferrer-Chirivella JM, Navarro-Lleó N, Vila-Vicent S, Rodríguez-Díaz J, et al. Epidemiological and Genetic Characterization of Sapovirus in Patients with Acute Gastroenteritis in Valencia (Spain). *Viruses*. 2021 Jan 26;13(2):184.
12. Pitkänen O, Vesikari T, Hemming-Harlow M. The role of the sapovirus infection increased in gastroenteritis after national immunisation was introduced. *Acta Paediatr*. 2019;108(7):1338–44.
13. Halasa N, Piya B, Stewart LS, Rahman H, Payne DC, Woron A, et al. The Changing Landscape of Pediatric Viral Enteropathogens in the Post-Rotavirus Vaccine Era. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 2020 Feb 3;72(4):576–85.
14. Farkas T, Deng X, Ruiz-Palacios G, Morrow A, Jiang X. Development of an Enzyme Immunoassay for Detection of Sapovirus-Specific Antibodies and Its Application in a Study of Seroprevalence in Children. *J Clin Microbiol*. 2006 Oct;44(10):3674–9.
15. Liu X, Jahuir H, Gilman RH, Alva A, Cabrera L, Okamoto M, et al. Etiological Role and Repeated Infections of Sapovirus among Children Aged Less than 2 Years in a Cohort Study in a Peri-urban Community of Peru. *J Clin Microbiol*. 2016 Jun;54(6):1598–604.
16. Harada S, Okada M, Yahiro S, Nishimura K, Matsuo S, Miyasaka J, et al. Surveillance of pathogens in outpatients with gastroenteritis and characterization of sapovirus strains between 2002 and 2007 in Kumamoto Prefecture, Japan. *J Med Virol*. 2009;81(6):1117–27.
17. Kitajima M, Iker BC, Pepper IL, Gerba CP. Relative abundance and treatment reduction of viruses during wastewater treatment processes — Identification of potential viral indicators. *Sci Total Environ*. 2014 Aug 1;488–489:290–6.

18. Soliman M, Kim DS, Kim C, Seo JY, Kim JY, Park JG, et al. Porcine sapovirus Cowden strain enters LLC-PK cells via clathrin- and cholesterol-dependent endocytosis with the requirement of dynamin II. *Vet Res*. 2018 Sep 17;49(1):92.
19. Takagi H, Oka T, Shimoike T, Saito H, Kobayashi T, Takahashi T, et al. Human sapovirus propagation in human cell lines supplemented with bile acids. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2020 Nov 30 [cited 2020 Dec 2]; Available from: <https://www.pnas.org/content/early/2020/11/25/2007310117>
20. Flynn WT, Saif LJ, Moorhead PD. Pathogenesis of porcine enteric calicivirus-like virus in four-day-old gnotobiotic pigs. *Am J Vet Res*. 1988 Jun 1;49(6):819–25.
21. Kim DS, Hosmillo M, Alfajaro MM, Kim JY, Park JG, Son KY, et al. Both  $\alpha$ 2,3- and  $\alpha$ 2,6-Linked Sialic Acids on O-Linked Glycoproteins Act as Functional Receptors for Porcine Sapovirus. *PLOS Pathog*. 2014 Jun 5;10(6):e1004172.
22. Nordgren J, Svensson L. Genetic Susceptibility to Human Norovirus Infection: An Update. *Viruses*. 2019 Mar 6;11(3):226.
23. 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 Jun;122(7):1967–77.
24. Huang P, Farkas T, Zhong W, Tan M, Thornton S, Morrow AL, et al. Norovirus and Histo-Blood Group Antigens: Demonstration of a Wide Spectrum of Strain Specificities and Classification of Two Major Binding Groups among Multiple Binding Patterns. *J Virol*. 2005 Jun;79(11):6714–22.
25. Shirato-Horikoshi H, Ogawa S, Wakita T, Takeda N, Hansman GS. Binding activity of norovirus and sapovirus to histo-blood group antigens. *Arch Virol*. 2007 Mar 6;152(3):457–61.
26. Ettayebi K, Crawford SE, Murakami K, Broughman JR, Karandikar U, Tenge VR, et al. Replication of human noroviruses in stem cell-derived human enteroids. *Science*. 2016 23;353(6306):1387–93.
27. Hosmillo M, Chaudhry Y, Nayak K, Sorgeloos F, Koo BK, Merenda A, et al. Norovirus Replication in Human Intestinal Epithelial Cells Is Restricted by the Interferon-Induced JAK/STAT Signaling Pathway and RNA Polymerase II-Mediated Transcriptional Responses. *mBio* [Internet]. 2020 Mar 17 [cited 2020 Jun 19];11(2). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7078467/>
28. Estes MK, Ettayebi K, Tenge VR, Murakami K, Karandikar U, Lin SC, et al. Human Norovirus Cultivation in Nontransformed Stem Cell-Derived Human Intestinal Enteroid Cultures: Success and Challenges. *Viruses*. 2019 Jul 11;11(7):638.
29. Ettayebi K, Tenge VR, Cortes-Penfield NW, Crawford SE, Neill FH, Zeng XL, et al. New Insights and Enhanced Human Norovirus Cultivation in Human Intestinal Enteroids. *mSphere*. 2021 Jan 27;6(1):e01136-20.
30. Rimkutė I, Thorsteinsson K, Henricsson M, Tenge VR, Yu X, Lin SC, et al. Histo-blood group antigens of glycosphingolipids predict susceptibility of human intestinal enteroids to norovirus infection. *J Biol Chem*. 2020 Sep 10;jbc.RA120.014855.

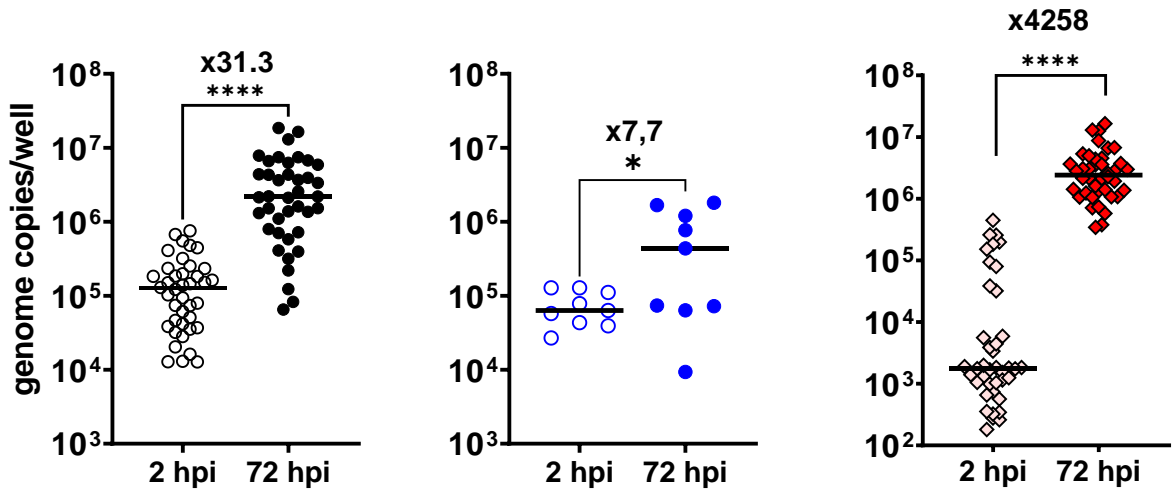
31. Crawford SE, Ramani S, Blutt SE, Estes MK. Organoids to Dissect Gastrointestinal Virus–Host Interactions: What Have We Learned? *Viruses*. 2021 May 27;13(6):999.
32. Desdouits M, Polo D, Le Mennec C, Strubbia S, Zeng XL, Ettayebi K, et al. Use of Human Intestinal Enteroids to Evaluate Persistence of Infectious Human Norovirus in Seawater. *Emerg Infect Dis*. 2022 Jul;28(7):1475–9.
33. Strubbia S, Phan MVT, Schaeffer J, Koopmans M, Cotten M, Le Guyader FS. Characterization of Norovirus and Other Human Enteric Viruses in Sewage and Stool Samples Through Next-Generation Sequencing. *Food Environ Virol*. 2019 Dec 1;11(4):400–9.
34. Haga K, Ettayebi K, Tenge VR, Karandikar UC, Lewis MA, Lin SC, et al. Genetic Manipulation of Human Intestinal Enteroids Demonstrates the Necessity of a Functional Fucosyltransferase 2 Gene for Secretor-Dependent Human Norovirus Infection. *mBio*. 2020 Mar 17;11(2):e00251-20.
35. Rajan A, Vela L, Zeng XL, Yu X, Shroyer N, Blutt SE, et al. Novel Segment- and Host-Specific Patterns of Enteroaggregative *Escherichia coli* Adherence to Human Intestinal Enteroids. *mBio*. 2018 Feb 20;9(1):e02419-17.
36. Oka T, Katayama K, Hansman GS, Kageyama T, Ogawa S, Wu FT, et al. Detection of human sapovirus by real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. *J Med Virol*. 2006;78(10):1347–53.
37. Polo D, Schaeffer J, Fournet N, Le Saux JC, Parnaudeau S, McLeod C, et al. Digital PCR for Quantifying Norovirus in Oysters Implicated in Outbreaks, France. *Emerg Infect Dis*. 2016 Dec;22(12):2189–91.
38. Le Guyader FS, Parnaudeau S, Schaeffer J, Bosch A, Loisy F, Pommepuy M, et al. Detection and Quantification of Noroviruses in Shellfish. *Appl Environ Microbiol*. 2009 Feb;75(3):618–24.
39. Murakami K, Tenge VR, Karandikar UC, Lin SC, Ramani S, Ettayebi K, et al. Bile acids and ceramide overcome the entry restriction for GII.3 human norovirus replication in human intestinal enteroids. *Proc Natl Acad Sci*. 2020 Jan 21;117(3):1700–10.
40. Chang KO, Sosnovtsev SV, Belliot G, Kim Y, Saif LJ, Green KY. Bile acids are essential for porcine enteric calicivirus replication in association with down-regulation of signal transducer and activator of transcription 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Jun 8;101(23):8733–8.
41. Oka T, Stoltzfus GT, Zhu C, Jung K, Wang Q, Saif LJ. Attempts to grow human noroviruses, a sapovirus, and a bovine norovirus in vitro. *PLoS ONE*. 2018 Feb 13;13(2):e0178157.
42. Cubitt WD, McSwiggan DA, Moore W. Winter vomiting disease caused by calicivirus. *J Clin Pathol*. 1979 Aug;32(8):786–93.
43. Cubitt WD, Barrett ADTY 1984. Propagation of Human Candidate Calicivirus in Cell Culture. *J Gen Virol*. 65(6):1123–6.
44. Flynn WT, Saif LJ. Serial propagation of porcine enteric calicivirus-like virus in primary porcine kidney cell cultures. *J Clin Microbiol*. 1988 Feb;26(2):206–12.

45. Varela MF, Rivadulla E, Lema A, Romalde JL. Human Sapovirus among Outpatients with Acute Gastroenteritis in Spain: A One-Year Study. *Viruses*. 2019 Feb 8;11(2):144.
46. Mann P, Pietsch C, Liebert UG. Genetic Diversity of Sapoviruses among Inpatients in Germany, 2008–2018. *Viruses*. 2019 Aug 7;11(8):726.
47. Costantini V, Morantz EK, Browne H, Ettayebi K, Zeng XL, Atmar RL, et al. Human Norovirus Replication in Human Intestinal Enteroids as Model to Evaluate Virus Inactivation. *Emerg Infect Dis*. 2018 Aug;24(8):1453–64.
48. Ettayebi K, Tenge VR, Cortes-Penfield NW, Crawford SE, Neill FH, Zeng XL, et al. New Insights and Enhanced Human Norovirus Cultivation in Human Intestinal Enteroids. *mSphere*. 2021 Jan 27;6(1):e01136-20.
49. Lin SC, Qu L, Ettayebi K, Crawford SE, Blutt SE, Robertson MJ, et al. Human norovirus exhibits strain-specific sensitivity to host interferon pathways in human intestinal enteroids. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020 Sep 9;
50. Teunis PFM, Moe CL, Liu P, Miller SE, Lindesmith L, Baric RS, et al. Norwalk virus: How infectious is it? *J Med Virol*. 2008;80(8):1468–76.
51. Santiana M, Ghosh S, Ho BA, Rajasekaran V, Du WL, Mutsafi Y, et al. Vesicle-cloaked virus clusters are optimal units for inter-organismal viral transmission. *Cell Host Microbe*. 2018 Aug 8;24(2):208-220.e8.
52. Shivanna V, Kim Y, Chang KO. The crucial role of bile acids in the entry of porcine enteric calicivirus. *Virology*. 2014 May 1;456–457:268–78.
53. Guo M, Hayes J, Cho KO, Parwani AV, Lucas LM, Saif LJ. Comparative pathogenesis of tissue culture-adapted and wild-type Cowden porcine enteric calicivirus (PEC) in gnotobiotic pigs and induction of diarrhea by intravenous inoculation of wild-type PEC. *J Virol*. 2001 Oct;75(19):9239–51.
54. Saikia K, Saharia N, Singh CS, Borah PP, Namsa ND. Association of histo-blood group antigens and predisposition to gastrointestinal diseases. *J Med Virol* [Internet]. [cited 2022 Sep 6];n/a(n/a). Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jmv.28028>
55. Bucardo F, Carlsson B, Nordgren J, Larson G, Blandon P, Vilchez S, et al. Susceptibility of Children to Sapovirus Infections, Nicaragua, 2005–2006. *Emerg Infect Dis*. 2012 Nov;18(11):1875–8.
56. Matussek A, Dienus O, Djeneba O, Simpore J, Nitiema L, Nordgren J. Molecular characterization and genetic susceptibility of sapovirus in children with diarrhea in Burkina Faso. *Infect Genet Evol*. 2015 Jun 1;32:396–400.
57. Olivares AIO, Leitão GAA, Pimenta YC, Cantelli CP, Fumian TM, Fialho AM, et al. Epidemiology of enteric virus infections in children living in the Amazon region. *Int J Infect Dis*. 2021 Jul 1;108:494–502.
58. Tohma K, Kulka M, Coughlan S, Green KY, Parra GI. Genomic Analyses of Human Sapoviruses Detected over a 40-Year Period Reveal Disparate Patterns of Evolution among Genotypes and Genome Regions. *Viruses*. 2020 May 7;12(5).

**Figure 1. Two HuSaV strains replicate in jejunal HIE J2**

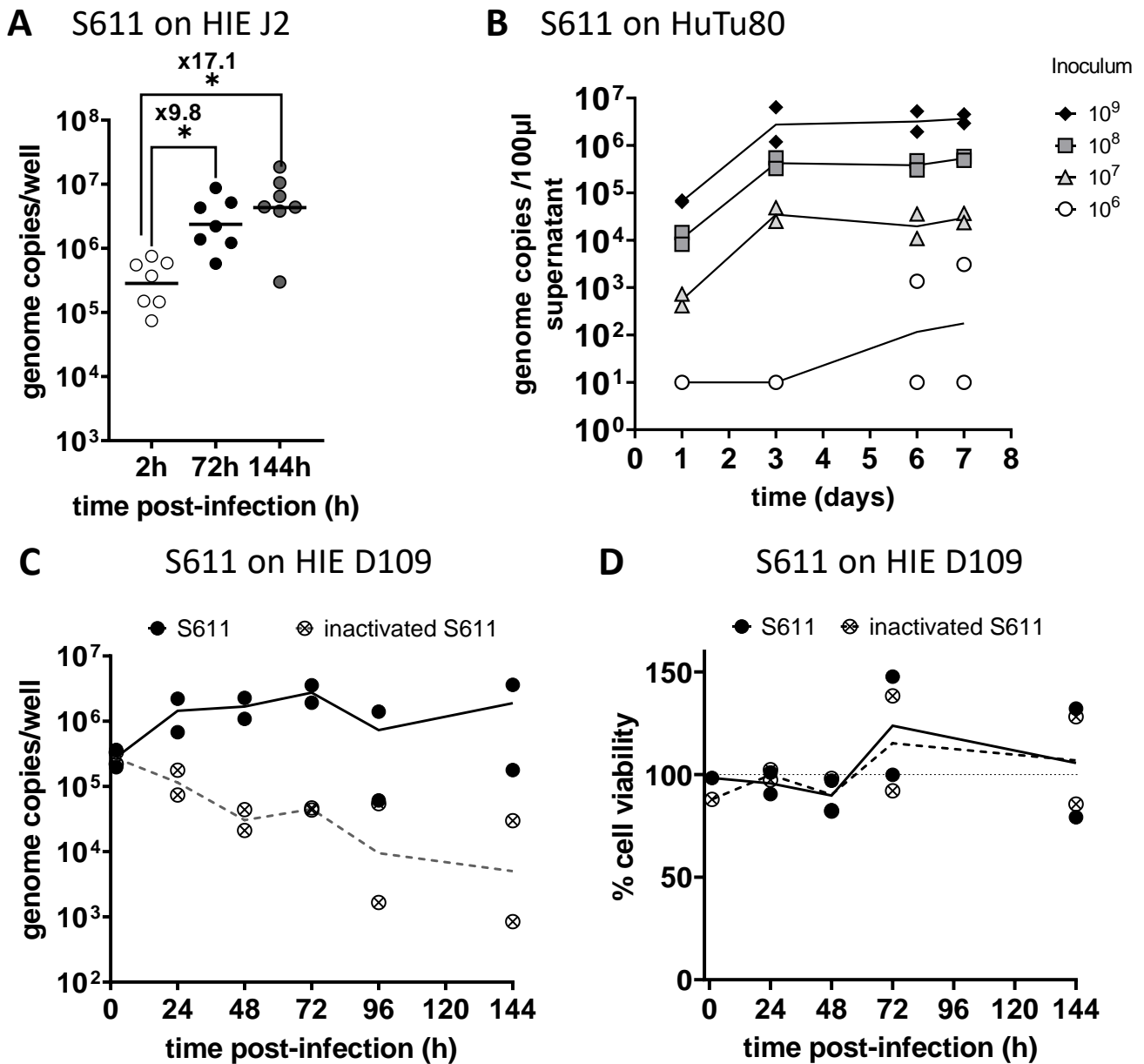


**B** S611 on HIE J2      **C** S513 on HIE J2      **D** HuNoV GII.4 on HIE J2



**Figure 1 . Two human sapovirus strains replicate in jejunal human intestinal enteroids (HIE).** **A.** 5 HuSaV-positive stools filtrates were used to infect differentiated monolayers of HIE J2 cells in presence of 500  $\mu$ M bile acid GCDCA, with inocula of  $1 \cdot 10^5$  to  $1 \cdot 10^8$  HuSaV genome copies per well (horizontal axis). HuSaV genome quantities in each well (vertical axis) were measured by qRT-PCR at 1 or 2h (empty circles) and 72h (full disks) post-infection (pi). Differences between HuSaV titers at 2 and 72hpi were not statistically significant,  $n=2$  to 3 experiments,  $p>0.05$ , Wilcoxon test. **B.** An inoculum of  $1 \cdot 10^8$  gc/well of HuSaV strain S611 was used in repeated experiments to infect differentiated J2 monolayers with 500 $\mu$ M of GCDCA and showed a mean genome fold change of 31.3 ( $n=40$  experiments,  $p< 0.0001$ , Wilcoxon test) **C.** An inoculum of  $1 \cdot 10^7$  gc/well of HuSaV strain S513 was also used to infect differentiated J2 monolayers with 500 $\mu$ M of GCDCA and showed a geometrical mean genome amplification of 7.7 ( $n=9$  experiments,  $p=0,012$ , Wilcoxon test). **D.** In parallel with HuSaV infections, differentiated J2 monolayers were also infected with  $1 \cdot 10^5$  genome copies per well of HuNoV GII.4 TCH11-64 as a control with 500 $\mu$ M of GCDCA and showed efficient replication with a geometric mean fold increase of 4258 ( $n=40$  experiments,  $p< 0.0001$ , Wilcoxon test). **A, B, C, D** : each dot is the mean of three technical replicates for one independent experiment at 2h (empty circles or pink diamonds) and 72h post-infection (plain disks and red diamonds), horizontal lines are the geometrical mean of virus genome copies per well considering all experiments, and the number above indicates the mean fold change in viral genome between the two time points.

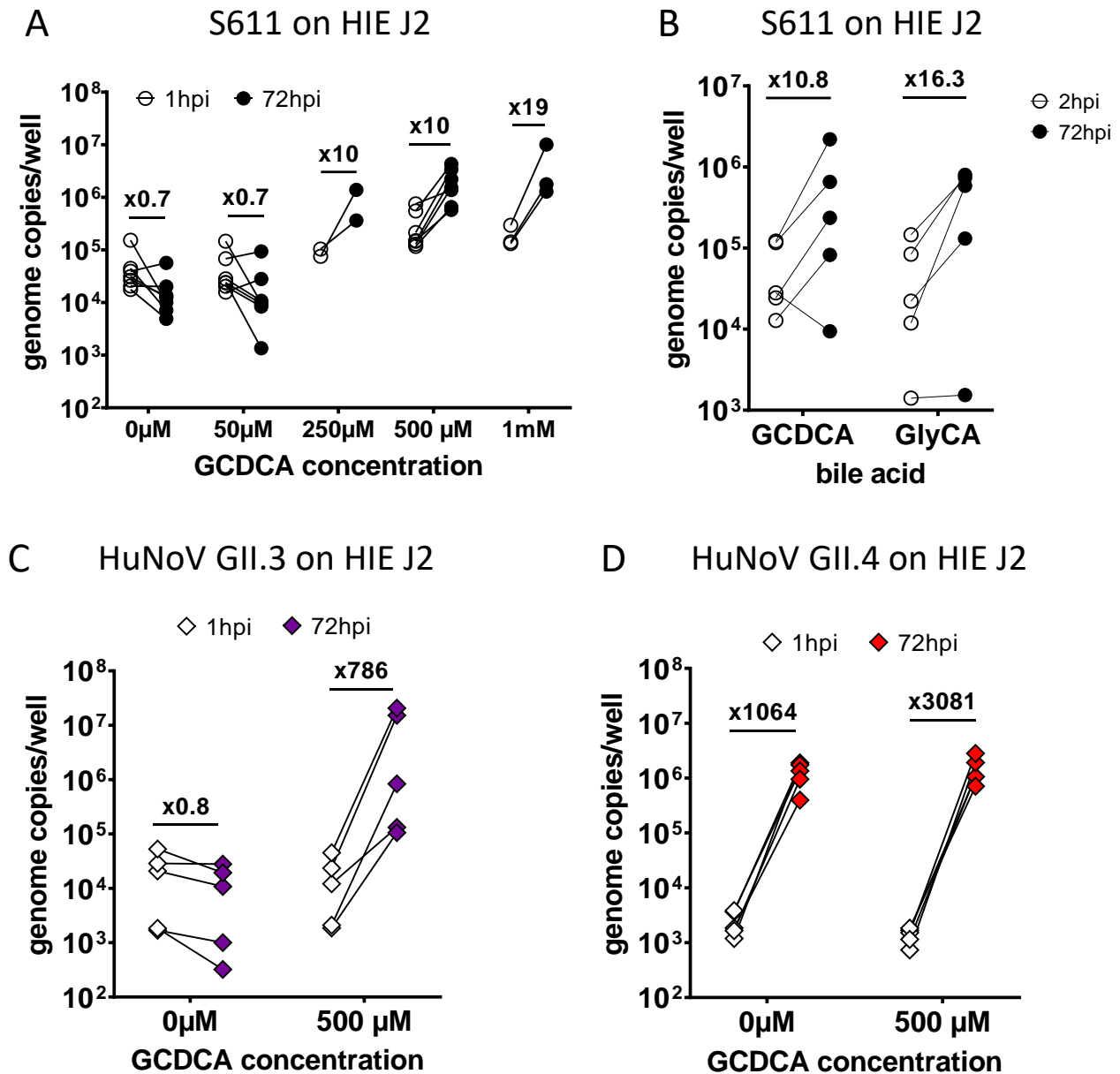
**Figure 2. Kinetics and magnitude of HuSaV S611 replication in HIE**



**Figure 2. Kinetics and magnitude of HuSaV S611 replication in HIE.** **A.** Differentiated J2 monolayers were infected with  $1 \cdot 10^8$  cg/well of HuSaV S611 with  $500 \mu\text{M}$  of GCDCA and the viral genome quantified after 2h, 72h and 144h. Each dots represents the mean of three technical replicates in an experiment ( $n=7$ ). In comparison with 2hpi, viral replication was detected at 72hpi ( $p<0.05$ , Wilcoxon test) and 144hpi ( $p<0.05$ , Wilcoxon test) with geometrical mean fold changes in viral genome of 9.8 and 17.1, respectively. **B.** HuTu80 were infected with S611 at four different concentrations from  $1 \cdot 10^5$  to  $1 \cdot 10^9$  cg/well with  $500 \mu\text{M}$  of GCDCA. Mean viral titers of three technical replicates were measured in the culture supernatants at 1, 3, 6 and 7 days post-infection and are plotted for each experiment ( $n=2$ ), with lines connecting the geometrical means. **C.** Differentiated D109 monolayers were inoculated with  $1 \cdot 10^8$  cg/well native (plain black circles) or heat-inactivated (crossed circles) S611 with  $500 \mu\text{M}$  of GCDCA and the viral genome quantified after 2h, 24h, 48h, 72h, 96h and 144h. The mean of technical replicates is plotted as a circle for each experiment ( $n=2$ ) and geometrical means are connected with a plain (native virus) or a dotted (inactivated virus) line. **D.** The viability of the differentiated D109 monolayers either infected by native (plain black circles) or heat-inactivated (crossed circles) S611 with  $500 \mu\text{M}$  of GCDCA for  $n=2$  experiments in comparison with an uninfected control (100%, dotted line).

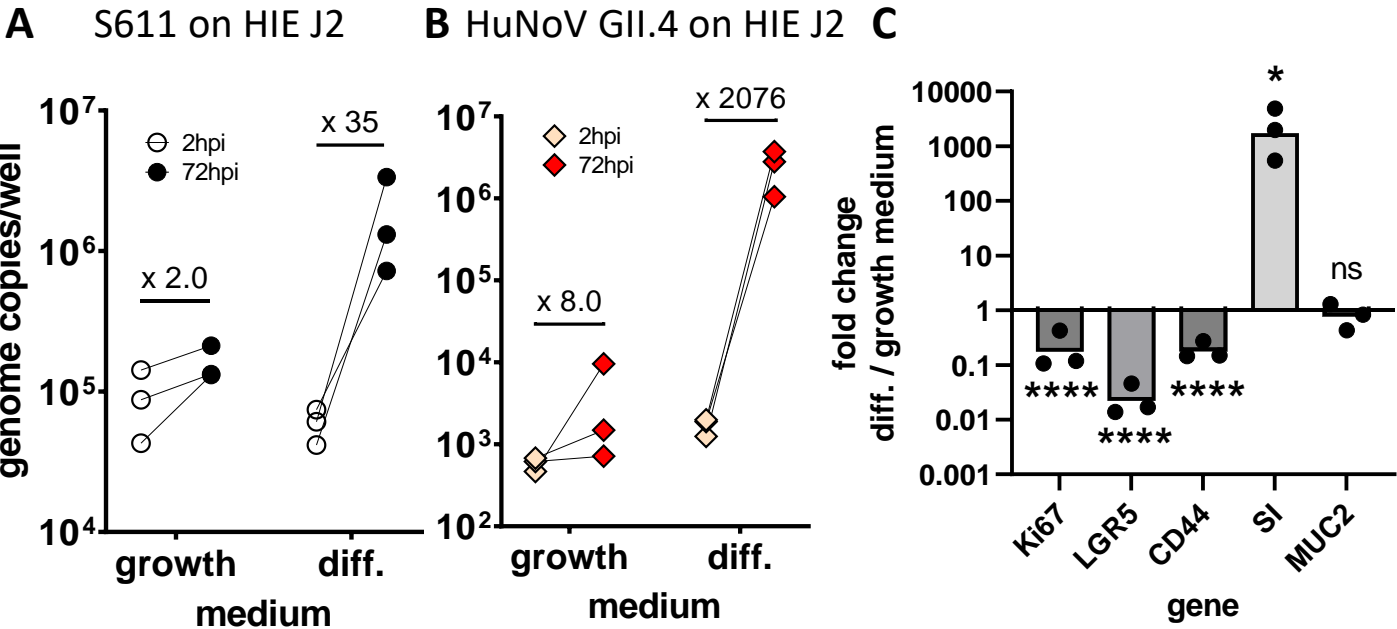


**Figure 3. HuSaV replication in HIE is dependent on bile acids.**



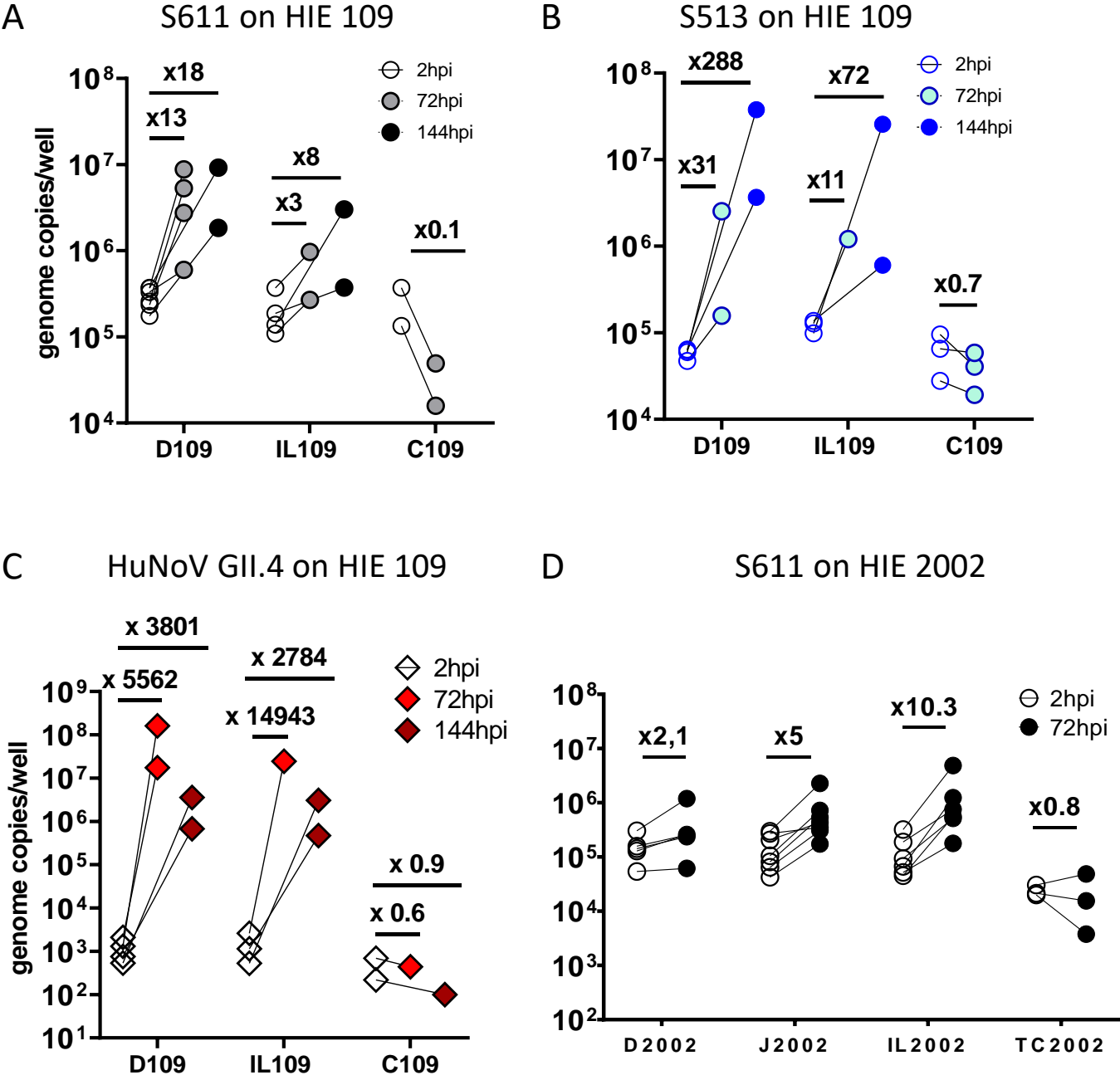
**Figure 3. Bile acids are a necessary co-factor of HuSaV infection in HIE.** **A.** Differentiated J2 monolayers were infected with  $1.10^8$  cg/well of S611 in the presence of the bile acid GCDCA at concentrations ranging from 50 $\mu$ M to 1mM, or in the absence of bile acid. The viral titer was measured and is depicted as the mean of three technical replicates for n=2 to 6 experiments at 1hpi (white circles) and 72hpi (black circles) and the geometrical mean fold change between the two points indicated above. **B.** The bile acid GlyCA (right side) was also used in comparison to GCDCA (left side) with concentrations of 500 $\mu$ M on differentiated J2 monolayers infected with  $1.10^8$  cg/well of S611, n=5 experiments. **C.** and **D.** Experiments in **(A)** were also conducted with  $1.10^6$  cg/well of HuNoV GII.3 (purple) or  $1.10^5$  cg/well of HuNoV GII.4 (red), with GCDCA concentrations of 500 $\mu$ M or without GCDCA.

**Figure 4. HuSaV replicates in differentiated jejunal HIE**



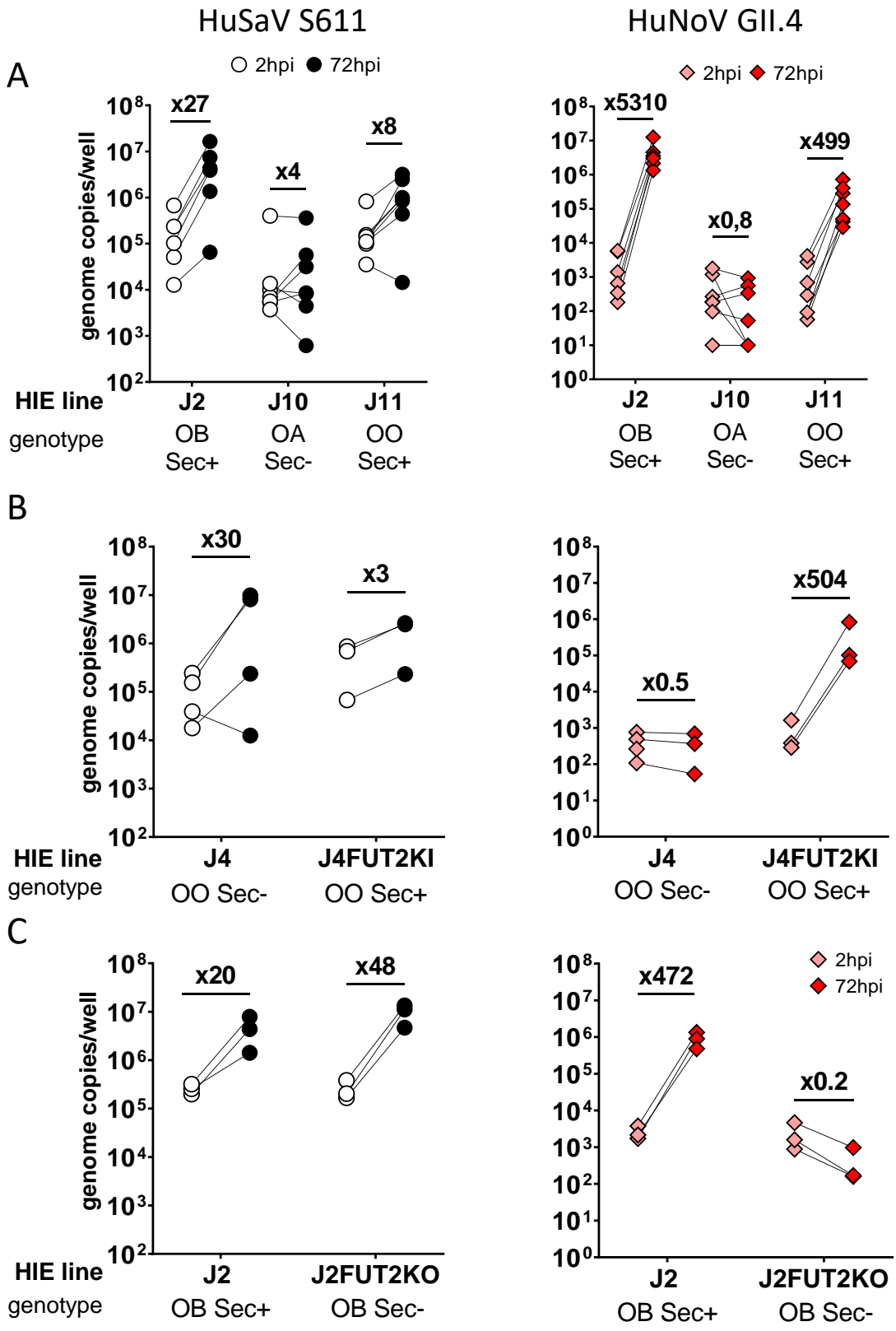
**Figure 4. HuSaV replicate in differentiated jejunal HIE.** Comparison of the mean viral titer per well of S611 HuSaV (A) and GII.4 HuNoV (B) at 2hpi (white bars) and 72hpi (black bars) in J2 monolayers cultured and infected in growth or differentiation (diff.) medium with 500 $\mu$ M of GCDCA, for n=3 experiments, 3 technical replicates per experiment. Geometric mean fold changes between the two time points are indicated above for each condition. C. Fold change in relative expression levels of 5 genes (normalized on GAPDH) between HIE J2 monolayers cultured in differentiation vs growth medium in the experiments presented in A. \* p<0.05, \*\*\*\* p<0.0001, paired t-test.

**Figure 5. HuSaV replicates in cells from different donors and three portions of the small intestine**



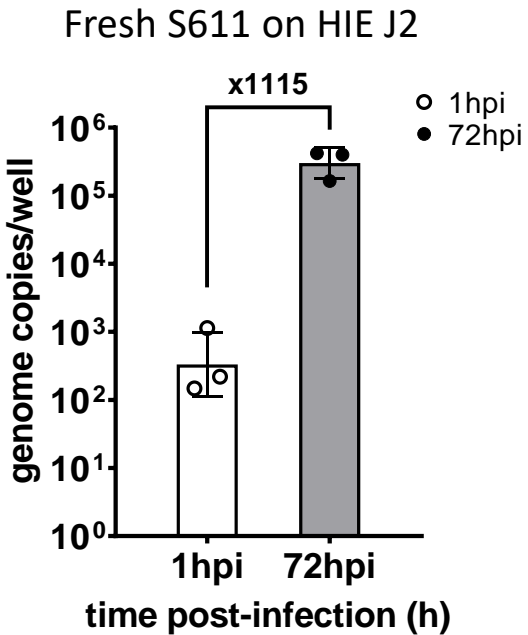
**Figure 5. HuSaV replicates in human cells from the three segments of the small intestine.** Differentiated HIE monolayers from different segments of the small intestine (J for jejunum, D for duodenum, IL for ileum, C for colon and TC for terminal colon) originating from two donors, 109 (A, B, C) and 2002 (D) were infected with  $1 \cdot 10^8$  cg/well of HuSaV S611 (A, D – white, grey, black circles),  $1 \cdot 10^7$  cg/well of HuSaV S513 (B – blue circles) or  $1 \cdot 10^5$  cg/well of HuNoV GII.4 as a control (C – pink and red diamonds) with 500 $\mu$ M of GCDCA. The mean viral titer per well for three technical replicates is depicted as circles for 2h, 72h or 144hpi, for n=2 to 6 experiments. Above each conditions is displayed the corresponding viral genome fold change between the two time points.

**Figure 6. HuSaV replication in HIE is independent of HBGA expression**



**Figure 6. HuSaV replicate in HIE independently of HBGA genotype.** Differentiated monolayers of jejunal HIE from different donors were infected with  $1.10^8$  cg/well of HuSaV S611 (white and black) or  $1.10^5$  cg/well of HuNoV GII.4 (pink and red) with  $500\mu\text{M}$  of GCDCA in each case and the mean viral titer per well measured for three technical replicates and  $n=3$  to  $7$  experiments at 2hpi (white, pink) and 72hpi (black, red). **A.** Three jejunal HIE cells lines, J2, J10, J11 with contrasted HBGA genotype (OB Sec+, Sec- and OO Sec+ respectively). **B.** J4 cells (OO Sec- genotype) and the corresponding knock-in, J4FUT2KI (OO Sec+). **C.** J2 cells (OB Sec+) and the corresponding knock-out, J2FUT2KO (OB Sec-).

**Supplemental figures 1.**



**Supplemental figure 1.** Differentiated HIE J2 monolayers were infected with fresh, non-frozen S611 stool suspension with 500µM of GCDCA, and the mean viral titer in three technical replicates at 1hpi (white bar) and 72hpi (black bar) showed an high fold change over three days (x1115).

## Conclusion de la partie II

Ces travaux ont permis de mettre en évidence la réplication de souches GI.1 et GI.2 de sapovirus humains sur le modèle entéroïde. Ce modèle permet de reproduire physiologiquement différents segments intestinaux et d'obtenir des informations supplémentaires par rapport à l'emploi de lignées cellulaires classiques, généralement dérivées de tissus cancéreux (Takagi et al., 2020).

Le tropisme des sapovirus humains pour les cellules différenciées de l'intestin grêle pourrait être précisé par la détection d'antigènes de sapovirus (comme la capsid VP1) dans des cellules marquées par des anticorps dirigés contre des marqueurs cellulaires (sucrase-isomaltase pour les entérocytes, mucine pour les cellules caliciformes ...) (Ettayebi et al. 2016).

Comme le suggéraient les données épidémiologiques, les sapovirus humains ne semblent pas dépendre des HBGA pour établir une infection, mais l'utilisation de souches différentes de celles utilisées (GI.1 et GI.2) devraient permettre de conclure sur l'ensemble des sapovirus humains, qui sont représentés par quatre génogroupes différents. L'identification des récepteurs viraux pourrait également être menée grâce au modèle entéroïde intestinal. Les acides sialiques sont utilisés par la souche porcine Cowden pour infecter la lignée rénale porcine LLC-PK (Kim et al. 2014). L'utilisation de traitement de type neuraminidase ou de lectines bloquant les acides sialiques sur les cellules dérivées d'entéroïde pourrait permettre d'observer si la réplication des sapovirus humains s'en retrouve impactée ou non.

En conclusion, ces travaux ouvrent la voie à de nombreuses recherches fondamentales sur la réplication des sapovirus humains et leurs interactions avec l'Homme. Ils trouveront aussi des applications pour l'étude de la persistance des sapovirus dans l'environnement et les mécanismes de leur transmission par l'eau ou les aliments comme les huîtres. En effet, le rôle des sapovirus dans les toxi-infections alimentaires liées aux coquillages est peu reconnu. Ceci pourrait être dû à un manque d'investigations concernant ce virus, ou à leur réelle moindre transmission via les aliments. La disponibilité d'un modèle permettant de comparer directement norovirus et sapovirus humains infectieux permettra d'investiguer ces questions.

## IV. Conclusion générale et perspectives

Comme présenté dans ce manuscrit, ma thèse s'est articulée autour de deux axes principaux, qui peuvent sembler un peu éloigné mais qui, à terme, ont pour objectifs de mieux appréhender la qualité sanitaire de l'huître. Le laboratoire Santé, Environnement et Microbiologie travaille depuis de nombreuses années sur cette thématique. Dans ce contexte, ce travail de thèse s'est appuyé sur les données existantes pour répondre à des questions restant à élucider.

Pour cela j'ai développé des outils permettant de travailler à une résolution cellulaire sur *Crassostrea gigas*, une approche complémentaire aux travaux précédents menés sur des animaux entiers ou à l'échelle tissulaire. J'ai donc mis au point une technique permettant d'isoler des cellules provenant des organes présentant un intérêt pour nos recherches. Ce protocole sans traitement enzymatique est utilisable pour marquer les cellules à l'aide de différents anticorps ou lectines, et pourrait être étendu à d'autres applications comme la mise au point de lignées cellulaires de mollusques ou l'étude au niveau cellulaire des contaminations chimiques par exemple. Son application à d'autres mollusques peut également être envisagée. Certains facteurs inhérents à l'organisme étudié peuvent impacter la qualité des résultats : l'alimentation des huîtres représente une potentielle source d'auto-fluorescence qui peut masquer une partie des marquages utilisés, et qui a impacté certaines de nos expérimentations. L'implémentation d'une étape de purification semble souhaitable pour augmenter la clarté et reproductibilité des résultats finaux.

Cet outil méthodologique a permis de conduire une part importante des expérimentations suivantes. L'étude des glycanes de l'huître est un sujet central depuis l'identification de ligands similaires aux HBGA de type A dans ses tissus (Le Guyader et al., 2006; Tian et al., 2006). Mes travaux ont confirmé les hypothèses émises lors de précédents travaux (Maalouf et al., 2011, 2010) : les cellules de trois tissus (glande digestive, branchies et manteau) de *Crassostrea gigas* expriment une molécule similaire à l'antigène A, ce qui a aussi été confirmé par des approches structurales (Auger et al., 2023). Le niveau d'expression cellulaire s'est avéré similaire entre les trois tissus, et peu variable dans le temps. Des travaux précédents, dont ceux de notre laboratoire, ont démontré des variations saisonnières de l'expression de l'HBGA A-like au niveau tissulaire. Les différences observées peuvent être dues aux différentes approches suivies, qui abordent la question à une échelle tissulaire ou au niveau de l'animal entier. Nos mesures au niveau cellulaire devraient être confirmées en tirant profit des améliorations développées au

cours de ma thèse, sur plusieurs cohortes d'animaux et sur une plus longue période. La variabilité inter-individuelle a pu représenter un frein à nos premières expérimentations, mais elle peut être limitée en regroupant les tissus de plusieurs individus pour chaque organe, comme cela est effectué sur des homogénats de tissus de cinq à six huîtres pour des mesures par ELISA (Maalouf et al., 2010; Morozov et al., 2018).

L'une des problématiques principales du projet GOyAVE était d'observer si certaines souches virales rejetées par les eaux usées dans l'environnement sont sélectionnées dans les huîtres en analysant leurs interactions avec les glycanes, et d'identifier les mécanismes associés. L'utilisation de VLP de deux souches (GI.1 et GII.4) avait pour but d'observer de potentielles différences dans leur liaison au niveau des cellules de l'huître, comme identifiées précédemment (Maalouf et al., 2011). Les VLP GII.4 ont ici démontré une interaction relativement stable avec les cellules provenant des trois tissus, mais ces données n'ont pas été acquises au cours d'une année entière pour entrevoir des différences mensuelles. Les résultats pour les VLPs GI.1 sont plus difficiles à interpréter probablement en raison des soucis de reproductivité entre les différents stocks que nous avons rencontrés. Nous avons sélectionné ces deux génotypes (GII.4 et GI.1) car ils sont fréquemment retrouvés dans les huîtres, comme GII.3 ou GII.6 (Chassaing et al., 2020; Ollivier et al., 2022). Un des objectifs était de les produire sous forme de VLP pour évaluer des différences d'interactions avec les cellules isolées, mais des problèmes techniques de construction de ces VLPs n'ont pas permis de valider cette hypothèse. D'autres virus entériques interagissant avec les HBGA, dont les rotavirus, sont également à envisager car ces derniers peuvent également circuler dans les rejets humains et se retrouver dans le littoral (Barbé et al., 2018; Imbert-Marcille et al., 2014; Ramani et al., 2013). Les résultats associés pourraient alors permettre d'éclaircir ce mécanisme de sélection, en observant par exemple une proportion de cellules moins importante capable d'interagir avec certaines souches par rapport à d'autres. Cela permettrait également d'étudier les différences de comportement sur le long terme des souches de génogroupes différents une fois accumulée dans les huîtres (Battistini et al., 2021). Les tentatives de caractérisation des gènes impliqués dans l'expression des facteurs capables de lier les norovirus se sont malheureusement vues limitées par la difficulté d'extraction de l'ARN des cellules triées. Ces travaux seraient un apport extrêmement important, et devraient pouvoir être réalisé grâce aux progrès effectués en parallèle sur le transcriptome de l'huître ces dernières années.

L'approche structurale des HBGA de l'huître par les partenaires de GOyAVE (équipe de Yann Guérardel, Unité de glycobiologie structurale et fonctionnelle, Lille, UMR 8576) a permis de



révéler la présence de N-glycanes de type A dans les trois tissus que j'ai étudiés (Auger et al., 2023) et qui sont très probablement les structures reconnues par les anticorps anti-A. Ces N-glycanes sont exprimées par les cellules, mais d'autres données obtenues au niveau de l'animal entier suggèrent un second mécanisme d'interaction impliqué lors de la bioaccumulation par l'animal entier.

Comprendre pourquoi et comment des norovirus (GI.1 et GII.4) se retrouvent piégés dans des fractions intermédiaires (surnageants) issues de la matrice extra-cellulaire libérée lors de la dissociation mécanique des tissus constituera un point de recherche important dans le futur. L'une des hypothèses serait que les mucines de l'huître, des protéines fortement glycosylées par des O-glycanes, soient responsables de cette interaction avec les norovirus qui intervient en amont dans le processus alimentaire de l'animal. En effet, ces mucines jouent de nombreux rôles physiologiques pour les mollusques : agent protecteur des tissus contre les variations physico-chimiques du milieu ou les agents pathogènes, des fonctions de nettoyage mais également de capture des particules alimentaires. De tels glycanes ont déjà été identifiés chez l'huître *Crassostrea virginica* (Kurz et al., 2013), et la caractérisation en cours du O-glycome de *C. gigas*, nous apportera des informations supplémentaires sur les structures présentes chez cette espèce au cœur de mes travaux (Auger et al., en préparation).

Une question centrale à cette problématique de la contamination des huîtres est la persistance de virus infectieux pour limiter le risque d'infection chez les consommateurs. Si les norovirus constituent l'agent majeur impliqué dans les épidémies liées à la consommation d'huître à l'heure actuelle, les sapovirus font également partie des virus qui peuvent être retrouvés dans les coquillages et causer des épidémies, malgré un manque important de données par rapport aux norovirus (Costantini et al., 2006; Iizuka et al., 2010; Le Guyader et al., 2010; Nakagawa-Okamoto et al., 2009; Ueki et al., 2010). De plus, ces virus ont longtemps été considérés comme non ou difficilement cultivables jusqu'à l'utilisation de la lignée HuTu80 et des entéroïdes intestinaux humains. Cette dernière approche a été utilisée pour diverses souches de norovirus et a permis de nombreuses découvertes primordiales dans l'étude de leurs interactions hôtes-pathogènes, (Ettayebi et al., 2016). Au début de mes travaux de thèse, aucun modèle de culture cellulaire n'existait pour les sapovirus, sauf pour une souche porcine adaptée à la culture (Guo et al., 2001). J'ai donc pu mettre à profit le fait que mon laboratoire dispose du modèle entéroïde, grâce à notre collaboration avec l'équipe de Mary Estes (Baylor College of Medicine, Houston, USA) pour identifier des souches de sapovirus infectieuses parmi les échantillons disponibles au laboratoire. Deux souches (GI.1 et GI.2) parmi les cinq testées se révélèrent

capables de répliquer sur des monocouches de cellules différenciées dérivées d'une lignée entéroïde isolée à partir du jéjunum d'un donneur. Cette découverte fût particulièrement stimulante, et m'a permis de mettre à profit la grande flexibilité du modèle entéroïde pour explorer d'autres caractéristiques du sapovirus humain. Comme l'avaient déjà démontré des travaux sur la souche porcine, puis par la suite sur des lignées cancéreuses humaines, le sapovirus est dépendant de la présence d'acides biliaires pour établir une infection *in vitro* (Shivanna et al., 2014; Takagi et al., 2020). Mes expérimentations démontrent également l'implication de ce co-facteur, certainement en lien avec la physiologie des tissus ciblés par le virus. La question du tropisme a également pu être éclaircie, avec une répllication uniquement possible dans des organoïdes dérivés du jéjunum, du duodénum et de l'iléon, et non dans le colon, probablement dans les entérocytes.

La question des glycanes a également été abordée : comme suggéré par des données épidémiologiques, les souches étudiées n'ont pas démontré de dépendance aux HBGA pour établir une infection dans ce modèle. D'autres données devront malgré tout confirmer cela en étudiant des souches appartenant à des génogroupes différents. La nature des récepteurs du sapovirus humain reste donc à déterminer, et le modèle entéroïde est particulièrement adapté pour cela. La souche porcine de sapovirus étant connue pour interagir notamment avec des acides sialiques, il s'agit d'une première piste qui pourrait être explorée sur les sapovirus humains, par l'impact d'un traitement à la neuraminidase des entéroïdes sur l'infectiosité des souches humaines (Kim et al., 2014).

L'indépendance des sapovirus par rapport aux HBGA offre également des perspectives dans l'étude de leur transmission environnementale, par comparaison aux norovirus. En effet, ces deux virus peuvent être identifiés dans les tissus d'huîtres, mais seul l'un d'eux interagit avec les HBGA. Il pourrait donc s'agir d'un modèle intéressant pour comprendre le rôle biologique des interactions HBGA – virus entériques dans les huîtres, au niveau de la capacité de purification virale de l'huître ou de la persistance des virus infectieux. Dans le futur, l'utilisation du modèle entéroïde pour réaliser des études de compétition sur la capacité des mucines d'huître à inhiber, ou au contraire améliorer le pouvoir infectieux des norovirus ou des sapovirus pourrait alors être envisagée.

Pour cette dernière question, le développement de techniques permettant de capturer les virus infectieux bioaccumulés dans des huîtres est une étape nécessaire. De telles techniques ont déjà été mises au point pour la capture de norovirus murins ou de l'ostreid herpesvirus 1 (Chung et al., 2015; Toldrà et al., 2018). Le principal obstacle qui émerge est la nécessité d'une

concentration virale relativement importante pour établir une infection dans les entéroïdes montrant l'intérêt de poursuivre l'optimisation des méthodes que ce soit la récupération des virions à partir de la matrice coquillage, mais également les niveaux d'amplification virale sur ce modèle de culture cellulaire.

Dans mon travail de thèse je me suis concentré sur deux genres viraux appartenant à la même famille des *Caliciviridae*. *Norovirus* et *Sapovirus* sont connus pour contaminer les coquillages mais si le premier est très étudié, le deuxième l'est moins. La crise sanitaire que nous venons de traverser montre qu'il est important de rester vigilant quant à l'émergence de nouveaux virus. Sur ce domaine, l'apport de la métagénomique appliquée aux échantillons de l'environnement (eaux usées, eau de mer ou huître) permettrait de renforcer les bases de données sur les différents virus que l'on peut trouver dans les huîtres et en particulier les sapovirus, qui sont rarement recherchés. A l'aide des outils que j'ai développés dans ma thèse, il conviendra ensuite d'évaluer les potentialités particulières d'une souche à persister dans l'huître, ou sa capacité à se multiplier sur le modèle entéroïdes, signe de son infectiosité. L'identification du glycome de l'huître et des différences selon les espèces constituera un atout pour interpréter et éventuellement prévenir la transmission de virus lors de la consommation de coquillages. Il s'agit d'un outil à ne pas négliger pour établir une surveillance active sur les souches qui circulent dans la population, comprendre comment ces souches contaminent l'huître. L'huître, ou d'autres coquillage filtreurs, pouvant également être le reflet de la contamination du littoral, ces divers outils contribueront à une meilleure compréhension de l'état écologique de nos zones côtières et à protéger une activité économique importante.

Pour conclure, les travaux présentés ici ont permis de proposer des outils méthodologiques pour approfondir l'étude des interactions entre deux virus entériques, norovirus et sapovirus, et les glycanes de type HBGA exprimés soit par l'huître, soit par le modèle entéroïde humain. Des développements plus larges sont à envisager pour tirer profit de ces nouvelles approches et de les inscrire dans le contexte environnemental, avec la diversité virale qui y est présente. L'utilisation du vaste panel de techniques et d'outils présenté dans ces travaux (tri cellulaire, VLP, cytométrie en flux, culture cellulaire des entéroïdes, bioaccumulations virales ...) m'a permis d'aborder la recherche en virologie de façon stimulante sur le plan personnel, et j'espère pouvoir être amené à continuer de découvrir des approches innovantes par la suite. L'importance des collaborations et des approches multiples sont également des points cruciaux dont je mesure désormais pleinement la portée.

## Bibliographie

- Abente, E.J., Sosnovtsev, S.V., Sandoval-Jaime, C., Parra, G.I., Bok, K., Green, K.Y., 2013. The Feline Calicivirus Leader of the Capsid Protein Is Associated with Cytopathic Effect. *J. Virol.* 87, 3003–3017. <https://doi.org/10.1128/JVI.02480-12>
- Adler, J.L., Zickl, R., 1969. Winter Vomiting Disease. *J. Infect. Dis.* 119, 668–673. <https://doi.org/10.1093/infdis/119.6.668>
- Ahmed, S.M., Lopman, B.A., Levy, K., 2013. A Systematic Review and Meta-Analysis of the Global Seasonality of Norovirus. *PLoS ONE* 8, e75922. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075922>
- Alberto, P.-R., Gabriela, M.-A., Regina, E.-G., Gabriela, M.-C., Dariel, T.-R., Cristina, E.-F., 2020. Seaweed single cell detritus effects on the digestive enzymes activity and microbiota of the oyster *Crassostrea gigas*. *J. Appl. Phycol.* 32, 3481–3493. <https://doi.org/10.1007/s10811-020-02167-4>
- Alfano-Sobsey, E., Sweat, D., Hall, A., Breedlove, F., Rodriguez, R., Greene, S., Pierce, A., Sobsey, M., Davies, M., Ledford, S.L., 2012. Norovirus outbreak associated with undercooked oysters and secondary household transmission. *Epidemiol. Infect.* 140, 276–282. <https://doi.org/10.1017/S0950268811000665>
- Alhatlani, B., Vashist, S., Goodfellow, I., 2015. Functions of the 5' and 3' ends of calicivirus genomes. *Virus Res.* 206, 134–143. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2015.02.002>
- Almand, E.A., Moore, M.D., Jaykus, L.-A., 2019. Characterization of human norovirus binding to gut-associated bacterial ligands. *BMC Res. Notes* 12, 607. <https://doi.org/10.1186/s13104-019-4669-2>
- Almand, E.A., Moore, M.D., Jaykus, L.-A., 2017a. Norovirus Binding to Ligands Beyond Histo-Blood Group Antigens. *Front. Microbiol.* 8, 2549. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02549>
- Almand, E.A., Moore, M.D., Outlaw, J., Jaykus, L.-A., 2017b. Human norovirus binding to select bacteria representative of the human gut microbiota. *PLoS ONE* 12, e0173124. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173124>
- Alsved, M., Fraenkel, C.-J., Bohgard, M., Widell, A., Söderlund-Strand, A., Lanbeck, P., Holmdahl, T., Isaxon, C., Gudmundsson, A., Medstrand, P., Böttiger, B., Löndahl, J., 2020. Sources of Airborne Norovirus in Hospital Outbreaks. *Clin. Infect. Dis.* 70, 2023–2028. <https://doi.org/10.1093/cid/ciz584>
- Alvarado, G., Salmen, W., Ettayebi, K., Hu, L., Sankaran, B., Estes, M.K., Venkataram Prasad, B.V., Crowe, J.E., 2021. Broadly cross-reactive human antibodies that inhibit genogroup I and II noroviruses. *Nat. Commun.* 12, 4320. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-24649-w>
- Amarasiri, M., Sano, D., 2019. Specific Interactions between Human Norovirus and Environmental Matrices: Effects on the Virus Ecology. *Viruses* 11, 224. <https://doi.org/10.3390/v11030224>
- Ando, T., Monroe, S.S., Gentsch, J.R., Jin, Q., Lewis, D.C., Glass, R.I., 1995. Detection and differentiation of antigenically distinct small round-structured viruses (Norwalk-like viruses) by reverse transcription-PCR and southern hybridization. *J. Clin. Microbiol.* 33, 64–71. <https://doi.org/10.1128/jcm.33.1.64-71.1995>
- Anfruns-Estrada, E., Sabaté, S., Razquin, E., Cornejo Sánchez, T., Bartolomé, R., Torner, N., Izquierdo, C., Soldevila, N., Coronas, L., Domínguez, À., Fuentes, C., Pintó, R.M., Bosch, A., Guix, S., 2022. Epidemiological and Genetic Characterization of Norovirus

- Outbreaks That Occurred in Catalonia, Spain, 2017–2019. *Viruses* 14, 488. <https://doi.org/10.3390/v14030488>
- Anfruns-Estrada, E., Sabrià, A., Fuentes, C., Sabaté, S., Razquin, E., Cornejo, T., Bartolomé, R., Torner, N., Izquierdo, C., Soldevila, N., Coronas, L., Dominguez, A., Pintó, R.M., Bosch, A., Guix, S., 2020. Detection of Norovirus in Saliva Samples from Acute Gastroenteritis Cases and Asymptomatic Subjects: Association with Age and Higher Shedding in Stool. *Viruses* 12, 1369. <https://doi.org/10.3390/v12121369>
- Atmar, R.L., Opekun, A.R., Gilger, M.A., Estes, M.K., Crawford, S.E., Neill, F.H., Graham, D.Y., 2008. Norwalk Virus Shedding after Experimental Human Infection. *Emerg. Infect. Dis. J. - CDC Volume* 14. <https://doi.org/10.3201/eid1410.080117>
- Atmar, R.L., Opekun, A.R., Gilger, M.A., Estes, M.K., Crawford, S.E., Neill, F.H., Ramani, S., Hill, H., Ferreira, J., Graham, D.Y., 2014. Determination of the 50% Human Infectious Dose for Norwalk Virus. *J. Infect. Dis.* 209, 1016–1022. <https://doi.org/10.1093/infdis/jit620>
- Auger, A., Yu, S.-Y., Guu, S.-Y., Quémener, A., Euller-Nicolas, G., Ando, H., Desdouits, M., Le Guyader, F.S., Khoo, K.-H., Le Pendu, J., Chirat, F., Guerardel, Y., 2023. Species-Specific N-Glycomes and Methylation Patterns of Oysters *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis* and Their Possible Consequences for the Norovirus–HBGA Interaction. *Mar. Drugs* 21, 342. <https://doi.org/10.3390/md21060342>
- Authority (EFSA), E.F.S., 2019. Analysis of the European baseline survey of norovirus in oysters. *EFSA J.* 17, e05762. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2019.5762>
- Baert, L., Mattison, K., Loisy-Hamon, F., Harlow, J., Martyres, A., Lebeau, B., Stals, A., Van Coillie, E., Herman, L., Uyttendaele, M., 2011. Review: Norovirus prevalence in Belgian, Canadian and French fresh produce: A threat to human health? *Int. J. Food Microbiol.* 151, 261–269. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.09.013>
- Bailey, D., Kaiser, W.J., Hollinshead, M., Moffat, K., Chaudhry, Y., Wileman, T., Sosnovtsev, S.V., Goodfellow, I.G., 2010a. Feline calicivirus p32, p39 and p30 proteins localize to the endoplasmic reticulum to initiate replication complex formation. *J. Gen. Virol.* 91, 739–749. <https://doi.org/10.1099/vir.0.016279-0>
- Bailey, D., Karakasiliotis, I., Vashist, S., Chung, L.M.W., Reese, J., McFadden, N., Benson, A., Yarovinsky, F., Simmonds, P., Goodfellow, I., 2010b. Functional Analysis of RNA Structures Present at the 3' Extremity of the Murine Norovirus Genome: the Variable Polypyrimidine Tract Plays a Role in Viral Virulence. *J. Virol.* 84, 2859–2870. <https://doi.org/10.1128/JVI.02053-09>
- Bányai, K., Estes, M.K., Martella, V., Parashar, U.D., 2018. Viral gastroenteritis. *Lancet Lond. Engl.* 392, 175–186. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31128-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31128-0)
- Barbé, L., Le Moullac-Vaidye, B., Echasserieau, K., Bernardeau, K., Carton, T., Bovin, N., Nordgren, J., Svensson, L., Ruvoën-Clouet, N., Le Pendu, J., 2018. Histo-blood group antigen-binding specificities of human rotaviruses are associated with gastroenteritis but not with in vitro infection. *Sci. Rep.* 8, 12961. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-31005-4>
- Barclay, L., Cannon, J.L., Wikswo, M.E., Phillips, A.R., Browne, H., Montmayeur, A.M., Tatusov, R.L., Burke, R.M., Hall, A.J., Vinjé, J., 2019. Emerging Novel GII.P16 Noroviruses Associated with Multiple Capsid Genotypes. *Viruses* 11, 535. <https://doi.org/10.3390/v11060535>
- Barker, J., Vipond, I.B., Bloomfield, S.F., 2004. Effects of cleaning and disinfection in reducing the spread of Norovirus contamination via environmental surfaces. *J. Hosp. Infect.* 58, 42–49. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2004.04.021>

- Barrera-Vázquez, O.S., Cancio-Lonches, C., Miguel-Rodríguez, C.E., Valdes Pérez, M.M., Gutiérrez-Escolano, A.L., 2019. Survivin Overexpression Has a Negative Effect on Feline Calicivirus Infection. *Viruses* 11, 996. <https://doi.org/10.3390/v11110996>
- Battistini, R., Masotti, C., Listorti, V., Suffredini, E., Maurella, C., Garcia-Vozmediano, A., Costa, E., Iacona, F., Orlandi, M., Ercolini, C., Serracca, L., 2021. Norovirus Persistence in Oysters to Prolonged Commercial Purification. *Pathogens* 10, 944. <https://doi.org/10.3390/pathogens10080944>
- Becker-Dreps, S., Bucardo, F., Vilchez, S., Zambrana, L.E., Liu, L., Weber, D.J., Peña, R., Barclay, L., Vinjé, J., Hudgens, M.G., Nordgren, J., Svensson, L., Morgan, D.R., Espinoza, F., Paniagua, M., 2014. Etiology of Childhood Diarrhea Following Rotavirus Vaccine Introduction: A Prospective, Population-Based Study in Nicaragua. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 33, 1156–1163. <https://doi.org/10.1097/INF.0000000000000427>
- Becker-Dreps, S., González, F., Bucardo, F., 2020. Sapovirus: an emerging cause of childhood diarrhea. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 33, 388–397. <https://doi.org/10.1097/QCO.0000000000000671>
- Beek, J. van, Ambert-Balay, K., Botteldoorn, N., Eden, J.S., Fonager, J., Hewitt, J., Iritani, N., Kroneman, A., Vennema, H., Vinjé, J., White, P.A., Koopmans, M., NoroNet, C. on behalf of, 2013. Indications for worldwide increased norovirus activity associated with emergence of a new variant of genotype II.4, late 2012. *Eurosurveillance* 18, 20345. <https://doi.org/10.2807/es.e18.01.20345-en>
- Belliot, G., Kamel, 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. *J. Clin. Microbiol.* 48, 994–998. <https://doi.org/10.1128/JCM.01888-09>
- Benabbes, L., Ollivier, J., Schaeffer, J., Parnaudeau, S., Rhaissi, H., Nourlil, J., Le Guyader, F.S., 2013. Norovirus and Other Human Enteric Viruses in Moroccan Shellfish. *Food Environ. Virol.* 5, 35–40. <https://doi.org/10.1007/s12560-012-9095-8>
- Bernard, H., Werber, D., Höhle, M., 2014. Estimating the under-reporting of norovirus illness in Germany utilizing enhanced awareness of diarrhoea during a large outbreak of Shiga toxin-producing *E. coli* O104:H4 in 2011 – a time series analysis. *BMC Infect. Dis.* 14, 116. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-14-116>
- Bhar, S., Jones, M.K., 2019. In Vitro Replication of Human Norovirus. *Viruses* 11, 547. <https://doi.org/10.3390/v11060547>
- Bhavanam, S., Freedman, S.B., Lee, B.E., Zhuo, R., Qiu, Y., Chui, L., Xie, J., Ali, S., Vanderkooi, O.G., Pang, X.L., 2020. Differences in Illness Severity among Circulating Norovirus Genotypes in a Large Pediatric Cohort with Acute Gastroenteritis. *Microorganisms* 8, 1873. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8121873>
- Black, D.N., Burroughs, J.N., Harris, T.J., Brown, F., 1978. The structure and replication of calicivirus RNA. *Nature* 274, 614–615. <https://doi.org/10.1038/274614a0>
- Boinet, X., Teissonniere, X., 1929. Fièvre typhoïde et coquillages. *Rev. Trav. Inst. Pêch. Marit.* 2, 113–120.
- Bok, K., Parra, G.I., Mitra, T., Abente, E., Shaver, C.K., Boon, D., Engle, R., Yu, C., Kapikian, A.Z., Sosnovtsev, S.V., Purcell, R.H., Green, K.Y., 2011. Chimpanzees as an animal model for human norovirus infection and vaccine development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 325–330. <https://doi.org/10.1073/pnas.1014577107>
- Boom, R., Sol, C.J., Salimans, M.M., Jansen, C.L., Wertheim-van Dillen, P.M., van der Noordaa, J., 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J. Clin. Microbiol.* 28, 495–503. <https://doi.org/10.1128/jcm.28.3.495-503.1990>

- Borchardt, M.A., Spencer, S.K., Kieke, B.A., Lambertini, E., Loge, F.J., 2012. Viruses in Nondisinfected Drinking Water from Municipal Wells and Community Incidence of Acute Gastrointestinal Illness. *Environ. Health Perspect.* 120, 1272–1279. <https://doi.org/10.1289/ehp.1104499>
- Bosch, A., Abad, F.X., Gajardo, R., Pintó, RosaM., 1994. Should shellfish be purified before public consumption? *The Lancet*, Originally published as Volume 2, Issue 8928 344, 1024–1025. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(94\)91685-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(94)91685-3)
- Brown, J.R., Gilmour, K., Breuer, J., 2016. Norovirus Infections Occur in B-Cell–Deficient Patients. *Clin. Infect. Dis.* 62, 1136–1138. <https://doi.org/10.1093/cid/ciw060>
- Brown, J.R., Roy, S., Tutill, H., Williams, R., Breuer, J., 2017. Super-infections and relapses occur in chronic norovirus infections. *J. Clin. Virol.* 96, 44–48. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2017.09.009>
- Bucardo, F., Carlsson, B., Nordgren, J., Larson, G., Blandon, P., Vilchez, S., Svensson, L., 2012. Susceptibility of Children to Sapovirus Infections, Nicaragua, 2005–2006. *Emerg. Infect. Dis.* 18, 1875–1878. <https://doi.org/10.3201/eid1811.111581>
- Buestel, D., Ropert, M., Prou, J., Gouletquer, P., 2009. History, Status, and Future of Oyster Culture in France. *J. Shellfish Res.* 28, 813–820. <https://doi.org/10.2983/035.028.0410>
- Bull, R.A., Hansman, G.S., Clancy, L.E., Tanaka, M.M., Rawlinson, W.D., White, P.A., 2005. Norovirus Recombination in ORF1/ORF2 Overlap. *Emerg. Infect. Dis.* 11, 1079–1085. <https://doi.org/10.3201/eid1107.041273>
- Burgos, J.S., Ripoll-Gomez, J., Alfaro, J.M., Sastre, I., Valdivieso, F., 2008. Zebrafish as a New Model for Herpes Simplex Virus Type 1 Infection. *Zebrafish* 5, 323–333. <https://doi.org/10.1089/zeb.2008.0552>
- Burroughs, J.N., Brown, F., 1978. Presence of a covalently linked protein on calicivirus RNA. *J. Gen. Virol.* 41, 443–446. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-41-2-443>
- Caddy, S., Breiman, A., le Pendu, J., Goodfellow, I., 2014. Genogroup IV and VI Canine Noroviruses Interact with Histo-Blood Group Antigens. *J. Virol.* 88, 10377–10391. <https://doi.org/10.1128/JVI.01008-14>
- Campillay-Véliz, C.P., Carvajal, J.J., Avellaneda, A.M., Escobar, D., Covián, C., Kalergis, A.M., Lay, M.K., 2020. Human Norovirus Proteins: Implications in the Replicative Cycle, Pathogenesis, and the Host Immune Response. *Front. Immunol.* 11, 961. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00961>
- Campos, C.J.A., Lees, D.N., 2014. Environmental Transmission of Human Noroviruses in Shellfish Waters. *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 3552–3561. <https://doi.org/10.1128/AEM.04188-13>
- Cannon, J.L., Barclay, L., Collins, N.R., Wikswo, M.E., Castro, C.J., Magaña, L.C., Gregoricus, N., Marine, R.L., Chhabra, P., Vinjé, J., 2017. Genetic and Epidemiologic Trends of Norovirus Outbreaks in the United States from 2013 to 2016 Demonstrated Emergence of Novel GII.4 Recombinant Viruses. *J. Clin. Microbiol.* 55, 2208–2221. <https://doi.org/10.1128/JCM.00455-17>
- Cannon, J.L., Bonifacio, J., Bucardo, F., Buesa, J., Bruggink, L., Chan, M.C.-W., Fumian, T.M., Giri, S., Gonzalez, M.D., Hewitt, J., Lin, J.-H., Mans, J., Muñoz, C., Pan, C.-Y., Pang, X.-L., Pietsch, C., Rahman, M., Sakon, N., Selvarangan, R., Browne, H., Barclay, L., Vinjé, J., 2021. Global Trends in Norovirus Genotype Distribution among Children with Acute Gastroenteritis. *Emerg. Infect. Dis.* 27, 1438–1445. <https://doi.org/10.3201/eid2705.204756>
- Cao, S., Lou, Z., Tan, M., Chen, Y., Liu, Y., Zhang, Z., Zhang, X.C., Jiang, X., Li, X., Rao, Z., 2007. Structural basis for the recognition of blood group trisaccharides by norovirus. *J. Virol.* 81, 5949–5957. <https://doi.org/10.1128/JVI.00219-07>

- Carulli, A.J., Samuelson, L.C., Schnell, S., 2014. Unraveling intestinal stem cell behavior with models of crypt dynamics. *Integr. Biol.* 6, 243. <https://doi.org/10.1039/c3ib40163d>
- Chakravarty, S., Hutson, A.M., Estes, M.K., Prasad, B.V.V., 2005. Evolutionary Trace Residues in Noroviruses: Importance in Receptor Binding, Antigenicity, Virion Assembly, and Strain Diversity. *J. Virol.* 79, 554–568. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.1.554-568.2005>
- Chalmers, J.W.T., McMillan, J.H., 1995. An outbreak of viral gastroenteritis associated with adequately prepared oysters. *Epidemiol. Infect.* 115, 163–167. <https://doi.org/10.1017/S0950268800058222>
- Chang, K.-O., Sosnovtsev, S.S., Belliot, G., Wang, Q., Saif, L.J., Green, K.Y., 2005. Reverse Genetics System for Porcine Enteric Calicivirus, a Prototype Sapovirus in the Caliciviridae. *J. Virol.* 79, 1409–1416. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.3.1409-1416.2005>
- Chang, K.-O., Sosnovtsev, S.V., Belliot, G., Kim, Y., Saif, L.J., Green, K.Y., 2004. Bile acids are essential for porcine enteric calicivirus replication in association with down-regulation of signal transducer and activator of transcription 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 8733–8738. <https://doi.org/10.1073/pnas.0401126101>
- Charles, K. j., Shore, J., Sellwood, J., Laverick, M., Hart, A., Pedley, S., 2009. Assessment of the stability of human viruses and coliphage in groundwater by PCR and infectivity methods. *J. Appl. Microbiol.* 106, 1827–1837. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04150.x>
- Chassaing, M., Boudaud, N., Belliot, G., Estienney, M., Majou, D., de Rougemont, A., Gantzer, C., 2020. Interaction between norovirus and Histo-Blood Group Antigens: A key to understanding virus transmission and inactivation through treatments? *Food Microbiol.* 92, 103594. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103594>
- Chaudhry, Y., Nayak, A., Bordeleau, M.-E., Tanaka, J., Pelletier, J., Belsham, G.J., Roberts, L.O., Goodfellow, I.G., 2006. Caliciviruses differ in their functional requirements for eIF4F components. *J. Biol. Chem.* 281, 25315–25325. <https://doi.org/10.1074/jbc.M602230200>
- Cheetham, S., Souza, M., Meulia, T., Grimes, S., Han, M.G., Saif, L.J., 2006. Pathogenesis of a genogroup II human norovirus in gnotobiotic pigs. *J. Virol.* 80, 10372–10381. <https://doi.org/10.1128/JVI.00809-06>
- Chen, R., Neill, J.D., Noel, J.S., Hutson, A.M., Glass, R.I., Estes, M.K., Prasad, B.V.V., 2004. Inter- and Intragenus Structural Variations in Caliciviruses and Their Functional Implications. *J. Virol.* 78, 6469–6479. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.12.6469-6479.2004>
- Cheng, C., He, Y., Xiao, S., Ai, Q., Yu, J., 2020. The association between enteric viruses and necrotizing enterocolitis. *Eur. J. Pediatr.* <https://doi.org/10.1007/s00431-020-03746-w>
- Chhabra, P., de Graaf, M., Parra, G.I., Chan, M.C.-W., Green, K., Martella, V., Wang, Q., White, P.A., Katayama, K., Vennema, H., Koopmans, M.P.G., Vinjé, J., 2019. Updated classification of norovirus genogroups and genotypes. *J. Gen. Virol.* 100, 1393–1406. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001318>
- Chhabra, P., Rouhani, S., Browne, H., Peñataro Yori, P., Siguas Salas, M., Paredes Olortegui, M., Moulton, L.H., Kosek, M.N., Vinjé, J., 2020. Homotypic and Heterotypic Protection and Risk of Reinfection Following Natural Norovirus Infection in a Highly Endemic Setting. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 72, 222–229. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa019>
- Chiang, J.Y.L., 2013. Bile Acid Metabolism and Signaling. *Compr. Physiol.* 3, 1191–1212. <https://doi.org/10.1002/cphy.c120023>



- Chiba, S., Nakata, S., Numata-Kinoshita, K., Honma, S., 2000. Sapporo Virus: History and Recent Findings. *J. Infect. Dis.* 181, S303–S308.
- Cho, E.-H., Soliman, M., Alfajaro, M.M., Kim, J.-Y., Seo, J.-Y., Park, J.-G., Kim, D.-S., Baek, Y.-B., Kang, M.-I., Park, S.-I., Le Pendu, J., Cho, K.-O., 2018. Bovine Nebovirus Interacts with a Wide Spectrum of Histo-Blood Group Antigens. *J. Virol.* 92, e02160-17. <https://doi.org/10.1128/JVI.02160-17>
- Choi, J.-M., Hutson, A.M., Estes, M.K., Prasad, B.V.V., 2008. Atomic resolution structural characterization of recognition of histo-blood group antigens by Norwalk virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 9175–9180. <https://doi.org/10.1073/pnas.0803275105>
- Chung, L., Bailey, D., Leen, E.N., Emmott, E.P., Chaudhry, Y., Roberts, L.O., Curry, S., Locker, N., Goodfellow, I.G., 2014. Norovirus Translation Requires an Interaction between the C Terminus of the Genome-linked Viral Protein VPg and Eukaryotic Translation Initiation Factor 4G \*. *J. Biol. Chem.* 289, 21738–21750. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.550657>
- Chung, S.H., Baek, C., Cong, V.T., Min, J., 2015. The microfluidic chip module for the detection of murine norovirus in oysters using charge switchable micro-bead beating. *Biosens. Bioelectron.* 67, 625–633. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.09.083>
- Cioffi, B., Ianiro, G., Iaccarino, D., D'Apice, F., Ferraro, A., Race, M., Spasiano, D., Esposito, E., Monini, M., Serra, F., Cozza, D., Di Nocera, F., De Maio, L., Amoroso, M.G., De Carlo, E., Fusco, G., 2021. A potential risk assessment tool to monitor pathogens circulation in coastal waters. *Environ. Res.* 200, 111748. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.111748>
- Clarke, I.N., Lambden, P.R., 2000. Organization and Expression of Calicivirus Genes. *J. Infect. Dis.* 181, S309–S316. <https://doi.org/10.1086/315575>
- Colito, D.A., Dorta-Guerra, R., Da Costa Lima, H.S., Pina, C., Gonçalves, D., Valladares, B., Foronda, P., 2022. Epidemiological investigations of diarrhea in children in Praia city, Cape Verde. *Front. Microbiol.* 13, 1059431. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1059431>
- Conley, M., Emmott, E., Orton, R., Taylor, D., Carneiro, D.G., Murata, K., Goodfellow, I.G., Hansman, G.S., Bhella, D., 2017. Vesivirus 2117 capsids more closely resemble sapovirus and lagovirus particles than other known vesivirus structures. *J. Gen. Virol.* 98, 68–76. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000658>
- Conley, M.J., McElwee, M., Azmi, L., Gabrielsen, M., Byron, O., Goodfellow, I.G., Bhella, D., 2019. Calicivirus VP2 forms a portal-like assembly following receptor engagement. *Nature* 565, 377–381. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0852-1>
- Costantini, V., Loisy, F., Joens, L., Le Guyader, F.S., Saif, L.J., 2006. Human and Animal Enteric Caliciviruses in Oysters from Different Coastal Regions of the United States. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 1800–1809. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.3.1800-1809.2006>
- Costantini, V., Morantz, E.K., Browne, H., Ettayebi, K., Zeng, X.-L., Atmar, R.L., Estes, M.K., Vinjé, J., 2018. Human Norovirus Replication in Human Intestinal Enteroids as Model to Evaluate Virus Inactivation. *Emerg. Infect. Dis.* 24, 1453–1464. <https://doi.org/10.3201/eid2408.180126>
- Cotton, B.T., Hyde, J.L., Sarvestani, S.T., Sosnovtsev, S.V., Green, K.Y., White, P.A., Mackenzie, J.M., 2017. The Norovirus NS3 Protein Is a Dynamic Lipid- and Microtubule-Associated Protein Involved in Viral RNA Replication. *J. Virol.* 91, e02138-16. <https://doi.org/10.1128/JVI.02138-16>
- Crawford, S.E., Ramani, S., Blutt, S.E., Estes, M.K., 2021. Organoids to Dissect Gastrointestinal Virus–Host Interactions: What Have We Learned? *Viruses* 13, 999. <https://doi.org/10.3390/v13060999>

- Creutzmacher, R., Maass, T., Ogrissek, P., Wallmann, G., Feldmann, C., Peters, H., Lingemann, M., Taube, S., Peters, T., Mallagaray, A., 2021. NMR Experiments Shed New Light on Glycan Recognition by Human and Murine Norovirus Capsid Proteins. *Viruses* 13, 416. <https://doi.org/10.3390/v13030416>
- Cubitt, W.D., Barrett, A.D.T.Y., 1984. Propagation of Human Candidate Calicivirus in Cell Culture. *J. Gen. Virol.* 65, 1123–1126. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-65-6-1123>
- Cubitt, W.D., Bradley, D., Carter, M., Murphy, F., Fauquet, C., Bishop, D., 1995. Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses: sixth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, Archives of virology. Springer-Verlag, Wien ; New York.
- Cubitt, W.D., McSwiggan, D.A., Moore, W., 1979. Winter vomiting disease caused by calicivirus. *J. Clin. Pathol.* 32, 786–793.
- da Silva, A.K., Le Saux, J.-C., Parnaudeau, S., Pommepuy, M., Elimelech, M., Le Guyader, F.S., 2007. Evaluation of Removal of Noroviruses during Wastewater Treatment, Using Real-Time Reverse Transcription-PCR: Different Behaviors of Genogroups I and II. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 7891–7897. <https://doi.org/10.1128/AEM.01428-07>
- Daniel-Wayman, S., Fahle, G., Palmore, T., Green, K.Y., Prevots, D.R., 2018. Norovirus, astrovirus, and sapovirus among immunocompromised patients at a tertiary care research hospital. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 92, 143–146. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2018.05.017>
- Daughenbaugh, K.F., Fraser, C.S., Hershey, J.W.B., Hardy, M.E., 2003. The genome-linked protein VPg of the Norwalk virus binds eIF3, suggesting its role in translation initiation complex recruitment. *EMBO J.* 22, 2852–2859. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg251>
- Davis, A., Cortez, V., Grodzki, M., Dallas, R., Ferrolino, J., Freiden, P., Maron, G., Hakim, H., Hayden, R.T., Tang, L., Huys, A., Kolawole, A.O., Wobus, C.E., Jones, M.K., Karst, S.M., Schultz-Cherry, S., 2020. Infectious Norovirus Is Chronically Shed by Immunocompromised Pediatric Hosts. *Viruses* 12, 619. <https://doi.org/10.3390/v12060619>
- de Graaf, M., Beek, J. van, Vennema, H., Podkolzin, A.T., Hewitt, J., Bucardo, F., Templeton, K., Mans, J., Nordgren, J., Reuter, G., Lynch, M., Rasmussen, L.D., Iritani, N., Chan, M.C., Martella, V., Ambert-Balay, K., Vinjé, J., White, P.A., Koopmans, M.P., 2015. Emergence of a novel GII.17 norovirus – End of the GII.4 era? *Eurosurveillance* 20, 21178. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES2015.20.26.21178>
- de Graaf, M., Fouchier, R.A.M., 2014. Role of receptor binding specificity in influenza A virus transmission and pathogenesis. *EMBO J.* 33, 823–841. <https://doi.org/10.1002/emboj.201387442>
- de Graaf, M., van Beek, J., Koopmans, M.P.G., 2016. Human norovirus transmission and evolution in a changing world. *Nat. Rev. Microbiol.* 14, 421.
- De Keuckelaere, A., Li, D., Deliens, B., Stals, A., Uyttendaele, M., 2015. Batch testing for noroviruses in frozen raspberries. *Int. J. Food Microbiol.* 192, 43–50. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.09.024>
- de Moraes, M.T.B., Leitão, G.A.A., Olivares, A.I.O., Xavier, M. da P.T.P., Bispo, R. de S., Sharma, S., Leite, J.P.G., Svensson, L., Nordgren, J., 2021. Molecular Epidemiology of Sapovirus in Children Living in the Northwest Amazon Region. *Pathogens* 10, 965. <https://doi.org/10.3390/pathogens10080965>
- de Oliveira-Tozetto, S., Santiso-Bellón, C., Ferrer-Chirivella, J.M., Navarro-Lleó, N., Vila-Vicent, S., Rodríguez-Díaz, J., Buesa, J., 2021. Epidemiological and Genetic

- Characterization of Sapovirus in Patients with Acute Gastroenteritis in Valencia (Spain). *Viruses* 13, 184. <https://doi.org/10.3390/v13020184>
- de Rougemont, A., Ruvoen-Clouet, N., Simon, B., Estienney, M., Elie-Caille, C., Aho, S., Pothier, P., Le Pendu, J., Boireau, W., Belliot, G., 2011. Qualitative and quantitative analysis of the binding of GII.4 norovirus variants onto human blood group antigens. *J. Virol.* 85, 4057–4070. <https://doi.org/10.1128/JVI.02077-10>
- Deng, W., Gibson, K.E., 2017. Interaction of microorganisms within leafy green phyllospheres: Where do human noroviruses fit in? *Int. J. Food Microbiol.* 258, 28–37. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.07.010>
- Desdouits, M., Polo, D., Le Mennec, C., Strubbia, S., Zeng, X.-L., Ettayebi, K., Atmar, R.L., Estes, M.K., Le Guyader, F.S., 2022. Use of Human Intestinal Enteroids to Evaluate Persistence of Infectious Human Norovirus in Seawater. *Emerg. Infect. Dis.* 28, 1475–1479. <https://doi.org/10.3201/eid2807.220219>
- Diez-Valcarce, M., Castro, C.J., Marine, R.L., Halasa, N., Mayta, H., Saito, M., Tsaknaridis, L., Pan, C.-Y., Bucardo, F., Becker-Dreps, S., Lopez, M.R., Magaña, L.C., Ng, T.F.F., Vinjé, J., 2018. Genetic diversity of human sapovirus across the Americas. *J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol.* 104, 65–72. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2018.05.003>
- Djebbi-Simmons, D., Alhejaili, M., Janes, M., King, J., Xu, W., 2020. Survival and inactivation of human norovirus GII.4 Sydney on commonly touched airplane cabin surfaces. *Aimsph 2020 Vol 7 Pages 574-586.* <https://doi.org/10.3934/publichealth.2020046>
- Dolin, R., Blacklow, N.R., DuPont, H., Buscho, R.F., Wyatt, R.G., Kasel, J.A., Hornick, R., Chanock, R.M., 1972. Biological properties of Norwalk agent of acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med. Soc. Exp. Biol. Med. N. Y. N* 140, 578–583. <https://doi.org/10.3181/00379727-140-36508>
- Dolin, R., Blacklow, N.R., DuPont, H., Formal, S., Buscho, R.F., Kasel, J.A., Chames, R.P., Hornick, R., Chanock, R.M., 1971. Transmission of Acute Infectious Nonbacterial Gastroenteritis to Volunteers by Oral Administration of Stool Filtrates. *J. Infect. Dis.* 123, 307–312. <https://doi.org/10.1093/infdis/123.3.307>
- Donaldson, E.F., Lindesmith, L.C., LoBue, A.D., Baric, R.S., 2010. Viral shape-shifting: norovirus evasion of the human immune system. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 231–241. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2296>
- Doré, B., Keaveney, S., Flannery, J., Rajko-Nenow, P., 2010. Management of health risks associated with oysters harvested from a norovirus contaminated area, Ireland, February–March 2010. *Eurosurveillance* 15, 19567. <https://doi.org/10.2807/ese.15.19.19567-en>
- Duan, L., Yang, X., Xie, J., Zhan, W., Zhang, C., Liu, H., Wei, M., Tang, Y., Zhao, H., Luo, M., 2021. Prevalence of GII.4 Sydney Norovirus Strains and Associated Factors of Acute Gastroenteritis in Children: 2019/2020 Season in Guangzhou, China. *Food Environ. Virol.* 13, 357–367. <https://doi.org/10.1007/s12560-021-09482-0>
- Duizer, E., Schwab, K.J., Neill, F.H., Atmar, R.L., Koopmans, M.P.G., Estes, M.K., 2004. Laboratory efforts to cultivate noroviruses. *J. Gen. Virol.* 85, 79–87. <https://doi.org/10.1099/vir.0.19478-0>
- Dycke, J.V., Ny, A., Conceição-Neto, N., Maes, J., Hosmillo, M., Cuvry, A., Goodfellow, I., Nogueira, T.C., Verbeken, E., Matthijnsens, J., Witte, P. de, Neyts, J., Rocha-Pereira, J., 2019. A robust human norovirus replication model in zebrafish larvae. *PLOS Pathog.* 15, e1008009. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008009>

- Ekundayo, T.C., Igere, B.E., Oluwafemi, Y.D., Iwu, C.D., Olaniyi, O.O., 2021. Human norovirus contamination in water sources: A systematic review and meta-analysis. *Environ. Pollut.* 291, 118164. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.118164>
- Espinosa, A.C., Mazari-Hiriart, M., Espinosa, R., Maruri-Avidal, L., Méndez, E., Arias, C.F., 2008. Infectivity and genome persistence of rotavirus and astrovirus in groundwater and surface water. *Water Res.* 42, 2618–2628. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2008.01.018>
- Estienney, M., Tarris, G., Abou-Hamad, N., Rouleau, A., Boireau, W., Chassagnon, R., Ayouni, S., Daval-Frerot, P., Martin, L., Bouyer, F., Le Pendu, J., de Rougemont, A., Belliot, G., 2022. Epidemiological Impact of GII.17 Human Noroviruses Associated With Attachment to Enterocytes. *Front. Microbiol.* 13, 858245. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.858245>
- Ettayebi, K., Crawford, S.E., Murakami, K., Broughman, J.R., Karandikar, U., Tenge, V.R., Neill, F.H., Blutt, S.E., Zeng, X.-L., Qu, L., Kou, B., Opekun, A.R., Burrin, D., Graham, D.Y., Ramani, S., Atmar, R.L., Estes, M.K., 2016. Replication of human noroviruses in stem cell-derived human enteroids. *Science* 353, 1387–1393. <https://doi.org/10.1126/science.aaf5211>
- Ettayebi, K., Tenge, V.R., Cortes-Penfield, N.W., Crawford, S.E., Neill, F.H., Zeng, X.-L., Yu, X., Ayyar, B.V., Burrin, D., Ramani, S., Atmar, R.L., Estes, M.K., 2021. New Insights and Enhanced Human Norovirus Cultivation in Human Intestinal Enteroids. *mSphere* 6, e01136-20. <https://doi.org/10.1128/mSphere.01136-20>
- Euller-Nicolas, G., Menec, C.L., Schaeffer, J., Zeng, X.-L., Ettayebi, K., Atmar, R.L., Guyader, F.S.L., Estes, M.K., Desdouits, M., 2023. Human Sapovirus Replication in Human Intestinal Enteroids. *J. Virol.* <https://doi.org/10.1128/jvi.00383-23>
- Fang, Y., Zhang, Y., Wang, H., Shi, O., Wang, W., Hou, M., Wang, L., Wu, J., Zhao, Y., 2022. Molecular epidemiology of norovirus infections in children with acute gastroenteritis in 2017–2019 in Tianjin, China. *J. Med. Virol.* 94, 616–624. <https://doi.org/10.1002/jmv.27340>
- Farahmand, M., Moghoofei, M., Dorost, A., Shoja, Z., Ghorbani, S., Kiani, S.J., Khales, P., Esteghamati, A., Sayyahfar, S., Jafarzadeh, M., Minaeian, S., Khanaliha, K., Naghdalipour, M., Tavakoli, A., 2022. Global prevalence and genotype distribution of norovirus infection in children with gastroenteritis: A meta-analysis on 6 years of research from 2015 to 2020. *Rev. Med. Virol.* 32, e2237. <https://doi.org/10.1002/rmv.2237>
- Fioretti, J. m., Rocha, M. s., Fumian, T. m., Ginuino, A., da Silva, T. p., de Assis, M. r., Rodrigues, J. de. S., Carvalho-Costa, F. a., Miagostovich, M. p., 2016. Occurrence of human sapoviruses in wastewater and stool samples in Rio De Janeiro, Brazil. *J. Appl. Microbiol.* 121, 855–862. <https://doi.org/10.1111/jam.13205>
- Flynn, W.T., Saif, L.J., 1988. Serial propagation of porcine enteric calicivirus-like virus in primary porcine kidney cell cultures. *J. Clin. Microbiol.* 26, 206–212.
- Foulke-Abel, J., In, J., Kovbasnjuk, O., Zachos, N.C., Ettayebi, K., Blutt, S.E., Hyser, J.M., Zeng, X.-L., Crawford, S.E., Broughman, J.R., Estes, M.K., Donowitz, M., 2014. Human enteroids as an ex-vivo model of host-pathogen interactions in the gastrointestinal tract. *Exp. Biol. Med.* Maywood NJ 239, 1124–1134. <https://doi.org/10.1177/1535370214529398>
- Fritzlar, S., Aktepe, T.E., Chao, Y.-W., Kenney, N.D., McAllaster, M.R., Wilen, C.B., White, P.A., Mackenzie, J.M., 2019. Mouse Norovirus Infection Arrests Host Cell Translation Uncoupled from the Stress Granule-PKR-eIF2 $\alpha$  Axis. *mBio* 10, e00960-19. <https://doi.org/10.1128/mBio.00960-19>

- Gabor, K.A., Goody, M.F., Mowel, W.K., Breitbach, M.E., Gratacap, R.L., Witten, P.E., Kim, C.H., 2014. Influenza A virus infection in zebrafish recapitulates mammalian infection and sensitivity to anti-influenza drug treatment. *Dis. Model. Mech.* 7, 1227–1237. <https://doi.org/10.1242/dmm.014746>
- GBD Diarrhoeal Diseases Collaborators, 2017. Estimates of global, regional, and national morbidity, mortality, and aetiologies of diarrhoeal diseases: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet Infect. Dis.* 17, 909–948. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30276-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30276-1)
- Gephart, J.A., Henriksson, P.J.G., Parker, R.W.R., Shepon, A., Gorospe, K.D., Bergman, K., Eshel, G., Golden, C.D., Halpern, B.S., Hornborg, S., Jonell, M., Metian, M., Mifflin, K., Newton, R., Tyedmers, P., Zhang, W., Ziegler, F., Troell, M., 2021. Environmental performance of blue foods. *Nature* 597, 360–365. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03889-2>
- Gholipour, S., Ghalhari, M.R., Nikaeen, M., Rabbani, D., Pakzad, P., Miranzadeh, M.B., 2022. Occurrence of viruses in sewage sludge: A systematic review. *Sci. Total Environ.* 824, 153886. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.153886>
- Ghosh, S., Kumar, M., Santiana, M., Mishra, A., Zhang, M., Labayo, H., Chibly, A.M., Nakamura, H., Tanaka, T., Henderson, W., Lewis, E., Voss, O., Su, Y., Belkaid, Y., Chiorini, J.A., Hoffman, M.P., Altan-Bonnet, N., 2022. Enteric viruses replicate in salivary glands and infect through saliva. *Nature* 607, 345–350. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04895-8>
- Gill, O.N., Cubitt, W.D., McSwiggan, D.A., Watney, B.M., Bartlett, C.L., 1983. Epidemic of gastroenteritis caused by oysters contaminated with small round structured viruses. *Br. Med. J. Clin. Res. Ed* 287, 1532–1534.
- Glinka, A., Dolde, C., Kirsch, N., Huang, Y.-L., Kazanskaya, O., Ingelfinger, D., Boutros, M., Cruciat, C.-M., Niehrs, C., 2011. LGR4 and LGR5 are R-spondin receptors mediating Wnt/ $\beta$ -catenin and Wnt/PCP signalling. *EMBO Rep.* 12, 1055–1061. <https://doi.org/10.1038/embor.2011.175>
- Goodfellow, I., Chaudhry, Y., Gioldasi, I., Gerondopoulos, A., Natoni, A., Labrie, L., Laliberté, J.-F., Roberts, L., 2005. Calicivirus translation initiation requires an interaction between VPg and eIF4E. *EMBO Rep.* 6, 968–972. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400510>
- Goodfellow, I., Taube, S., 2016. Chapter 3.2 - Calicivirus Replication and Reverse Genetics, in: Svensson, L., Desselberger, U., Greenberg, H.B., Estes, M.K. (Eds.), *Viral Gastroenteritis*. Academic Press, Boston, pp. 355–378. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802241-2.00017-1>
- Graziano, V.R., Walker, F.C., Kennedy, E.A., Wei, J., Ettayebi, K., Strine, M.S., Filler, R.B., Hassan, E., Hsieh, L.L., Kim, A.S., Kolawole, A.O., Wobus, C.E., Lindesmith, L.C., Baric, R.S., Estes, M.K., Orchard, R.C., Baldrige, M.T., Wilen, C.B., 2020. CD300lf is the primary physiologic receptor of murine norovirus but not human norovirus. *PLoS Pathog.* 16, e1008242. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008242>
- Green, K.Y., Ando, T., Balayan, M.S., Berke, T., Clarke, I.N., Estes, M.K., Matson, D.O., Nakata, S., Neill, J.D., Studdert, M.J., Thiel, H.-J., 2000. Taxonomy of the Caliciviruses. *J. Infect. Dis.* 181, S322–S330. <https://doi.org/10.1086/315591>
- Green, K.Y., Kaufman, S.S., Nagata, B.M., Chaimongkol, N., Kim, D.Y., Levenson, E.A., Tin, C.M., Yardley, A.B., Johnson, J.A., Barletta, A.B.F., Khan, K.M., Yazigi, N.A., Subramanian, S., Moturi, S.R., Fishbein, T.M., Moore, I.N., Sosnovtsev, S.V., 2020. Human norovirus targets enteroendocrine epithelial cells in the small intestine. *Nat. Commun.* 11, 2759. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16491-3>

- Green, K.Y., Mory, A., Fogg, 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, 8582–8595. <https://doi.org/10.1128/jvi.76.17.8582-8595.2002>
- Greig, J.D., Lee, M.B., 2009. Enteric outbreaks in long-term care facilities and recommendations for prevention: a review. *Epidemiol. Infect.* 137, 145–155. <https://doi.org/10.1017/S0950268808000757>
- Guillois-Bécel, Y., Couturier, E., Le Saux, J.C., Roque-Afonso, A.M., Le Guyader, F.S., Le Goas, A., Pernès, J., Le Behec, S., Briand, A., Robert, C., Dussaix, E., Pommepuy, M., Vaillant, V., 2009. An oyster-associated hepatitis A outbreak in France in 2007. *Euro Surveill. Bull. Eur. Sur Mal. Transm. Eur. Commun. Dis. Bull.* 14, 19144.
- Guo, M., Hayes, J., Cho, K.O., Parwani, A.V., Lucas, L.M., Saif, L.J., 2001. Comparative pathogenesis of tissue culture-adapted and wild-type Cowden porcine enteric calicivirus (PEC) in gnotobiotic pigs and induction of diarrhea by intravenous inoculation of wild-type PEC. *J. Virol.* 75, 9239–9251. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.19.9239-9251.2001>
- Guo, M., Luo, G., Lu, R., Shi, W., Cheng, H., Lu, Y., Jin, K., Yang, C., Wang, Z., Long, J., Xu, J., Ni, Q., Liu, C., Yu, X., 2017. Distribution of Lewis and Secretor polymorphisms and corresponding CA19-9 antigen expression in a Chinese population. *FEBS Open Bio* 7, 1660–1671. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.12278>
- Gutiérrez-Escolano, A.L., 2014. Host-cell factors involved in the calicivirus replicative cycle. *Future Virol.* 9, 147–160. <https://doi.org/10.2217/fvl.13.125>
- Gyawali, P., KC, S., Beale, D.J., Hewitt, J., 2019. Current and Emerging Technologies for the Detection of Norovirus from Shellfish. *Foods* 8, 187. <https://doi.org/10.3390/foods8060187>
- Haga, K., Ettayebi, K., Tenge, V.R., Karandikar, U.C., Lewis, M.A., Lin, S.-C., Neill, F.H., Ayyar, B.V., Zeng, X.-L., Larson, G., Ramani, S., Atmar, R.L., Estes, M.K., 2020. Genetic Manipulation of Human Intestinal Enteroids Demonstrates the Necessity of a Functional Fucosyltransferase 2 Gene for Secretor-Dependent Human Norovirus Infection. *mBio* 11, e00251-20. <https://doi.org/10.1128/mBio.00251-20>
- Hagbom, M., Istrate, C., Engblom, D., Karlsson, T., Rodriguez-Diaz, J., Buesa, J., Taylor, J.A., Loitto, V.-M., Magnusson, K.-E., Ahlman, H., Lundgren, O., Svensson, L., 2011. Rotavirus Stimulates Release of Serotonin (5-HT) from Human Enterochromaffin Cells and Activates Brain Structures Involved in Nausea and Vomiting. *PLoS Pathog.* 7, e1002115. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002115>
- Hagbom, M., Lin, J., Falkeborn, T., Serrander, L., Albert, J., Nordgren, J., Sharma, S., 2021. Replication in Human Intestinal Enteroids of Infectious Norovirus from Vomit Samples. *Emerg. Infect. Dis.* 27, 2212–2214. <https://doi.org/10.3201/eid2708.210011>
- Halasa, N., Piya, B., Stewart, L.S., Rahman, H., Payne, D.C., Woron, A., Thomas, L., Constantine-Renna, L., Garman, K., McHenry, R., Chappell, J., Spieker, A.J., Fannesbeck, C., Batarseh, E., Hamdan, L., Wikswo, M.E., Parashar, U., Bowen, M.D., Vinjé, J., Hall, A.J., Dunn, J.R., 2020. The Changing Landscape of Pediatric Viral Enteropathogens in the Post-Rotavirus Vaccine Era. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 72, 576–585. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa100>
- Hall, A.J., Eisenbart, V.G., Etingüe, A.L., Gould, L.H., Lopman, B.A., Parashar, U.D., 2012. Epidemiology of Foodborne Norovirus Outbreaks, United States, 2001–2008. *Emerg. Infect. Dis.* 18, 1566–1573. <https://doi.org/10.3201/eid1810.120833>
- Hall, A.J., Glass, R.I., Parashar, U.D., 2016. New insights into the global burden of noroviruses and opportunities for prevention. *Expert Rev. Vaccines* 15, 949–951. <https://doi.org/10.1080/14760584.2016.1178069>

- Han, L., Tan, M., Xia, M., Kitova, E.N., Jiang, X., Klassen, J.S., 2014. Gangliosides are Ligands for Human Noroviruses. *J. Am. Chem. Soc.* 136, 12631–12637. <https://doi.org/10.1021/ja505272n>
- Hansman, G.S., Natori, K., Oka, T., Ogawa, S., Tanaka, K., Nagata, N., Ushijima, H., Takeda, N., Katayama, K., 2005. Cross-reactivity among sapovirus recombinant capsid proteins. *Arch. Virol.* 150, 21–36. <https://doi.org/10.1007/s00705-004-0406-8>
- Hansman, G.S., Oka, T., Sakon, N., Takeda, N., 2007. Antigenic Diversity of Human Sapoviruses. *Emerg. Infect. Dis.* 13, 1519–1525. <https://doi.org/10.3201/eid1310.070402>
- Hansman, G.S., Oka, T., Takeda, N., 2008. Sapovirus-like particles derived from polyprotein. *Virus Res.* 137, 261–265. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2008.07.002>
- Harada, S., Oka, T., Tokuoka, E., Kiyota, N., Nishimura, K., Shimada, Y., Ueno, T., Ikezawa, S., Wakita, T., Wang, Q., Saif, L.J., Katayama, K., 2012. A confirmation of sapovirus re-infection gastroenteritis cases with different genogroups and genetic shifts in the evolving sapovirus genotypes, 2002–2011. *Arch. Virol.* 157, 1999–2003. <https://doi.org/10.1007/s00705-012-1387-7>
- Harada, S., Okada, M., Yahiro, S., Nishimura, K., Matsuo, S., Miyasaka, J., Nakashima, R., Shimada, Y., Ueno, T., Ikezawa, S., Shinozaki, K., Katayama, K., Wakita, T., Takeda, N., Oka, T., 2009. Surveillance of pathogens in outpatients with gastroenteritis and characterization of sapovirus strains between 2002 and 2007 in Kumamoto Prefecture, Japan. *J. Med. Virol.* 81, 1117–1127. <https://doi.org/10.1002/jmv.21454>
- Haramoto, E., Katayama, H., Phanuwat, C., Ohgaki, S., 2008. Quantitative detection of sapoviruses in wastewater and river water in Japan. *Lett. Appl. Microbiol.* 46, 408–413. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2008.02330.x>
- Hardstaff, J.L., Clough, H.E., Lutje, V., McIntyre, K.M., Harris, J.P., Garner, P., O'Brien, S.J., 2018. Foodborne and Food-Handler Norovirus Outbreaks: A Systematic Review. *Foodborne Pathog. Dis.* 15, 589–597. <https://doi.org/10.1089/fpd.2018.2452>
- Hay, B., Scott, P., 1986. Evidence for intracellular absorption of virus by the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *N. Z. J. Mar. Freshw. Res.* 20, 655–659. <https://doi.org/10.1080/00288330.1986.9516185>
- Hedström, C.-E., Lycke, E., 1964. AN EXPERIMENTAL STUDY ON OYSTERS AS VIRUS CARRIERS. *Am. J. Epidemiol.* 79, 134–142. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a120369>
- Heggelund, J.E., Varrot, A., Imbert, A., Kregel, U., 2017. Histo-blood group antigens as mediators of infections. *Curr. Opin. Struct. Biol., Carbohydrates: A feast of structural glycobiology • Sequences and topology: Computational studies of protein-protein interactions* 44, 190–200. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2017.04.001>
- Hemming, M., Räsänen, S., Huhti, L., Paloniemi, M., Salminen, M., Vesikari, T., 2013. Major reduction of rotavirus, but not norovirus, gastroenteritis in children seen in hospital after the introduction of RotaTeq vaccine into the National Immunization Programme in Finland. *Eur. J. Pediatr.* 172, 739–746. <https://doi.org/10.1007/s00431-013-1945-3>
- Hendel, S.K., Kellermann, L., Hausmann, A., Bindslev, N., Jensen, K.B., Nielsen, O.H., 2022. Tuft Cells and Their Role in Intestinal Diseases. *Front. Immunol.* 13, 822867. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.822867>
- Herbert, T.P., Brierley, I., Brown, T.D., 1997. Identification of a protein linked to the genomic and subgenomic mRNAs of feline calicivirus and its role in translation. *J. Gen. Virol.* 78 ( Pt 5), 1033–1040. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-78-5-1033>
- Hergens, M.-P., Norder, J., Alm, E., Askling, H.H., Helgesson, S., Insulander, M., Lagerqvist, N., Svenungsson, B., Tihane, M., Tolfvenstam, T., Follin, P., 2017. Investigation of a food-borne outbreak of gastroenteritis in a school canteen revealed a

- variant of sapovirus genogroup V not detected by standard PCR, Sollentuna, Sweden, 2016. *Eurosurveillance* 22, 30543. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2017.22.22.30543>
- Hernández, B.A., Sandoval-Jaime, C., Sosnovtsev, S.V., Green, K.Y., Gutiérrez-Escolano, A.L., 2016. Nucleolin promotes in vitro translation of feline calicivirus genomic RNA. *Virology* 489, 51–62. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.12.001>
- Hirakata, Y., Arisawa, K., Nishio, O., Nakagomi, O., 2005. Multiprefectural Spread of Gastroenteritis Outbreaks Attributable to a Single Genogroup II Norovirus Strain from a Tourist Restaurant in Nagasaki, Japan. *J. Clin. Microbiol.* 43, 1093–1098. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.3.1093-1098.2005>
- Ho Tran, T.N., Trainor, E., Nakagomi, T., Cunliffe, N.A., Nakagomi, O., 2013. Molecular epidemiology of noroviruses associated with acute sporadic gastroenteritis in children: Global distribution of genogroups, genotypes and GII.4 variants. *J. Clin. Virol.* 56, 269–277. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2012.11.011>
- Hosmillo, M., Chaudhry, Y., Kim, D.-S., Goodfellow, I., Cho, K.-O., 2014. Sapovirus Translation Requires an Interaction between VPg and the Cap Binding Protein eIF4E. *J. Virol.* 88, 12213–12221. <https://doi.org/10.1128/JVI.01650-14>
- Hosmillo, M., Chaudhry, Y., Nayak, K., Sorgeloos, F., Koo, B.-K., Merenda, A., Lillestol, R., Drumright, L., Zilbauer, M., Goodfellow, I., 2020. Norovirus Replication in Human Intestinal Epithelial Cells Is Restricted by the Interferon-Induced JAK/STAT Signaling Pathway and RNA Polymerase II-Mediated Transcriptional Responses. *mBio* 11. <https://doi.org/10.1128/mBio.00215-20>
- Hosmillo, M., Lu, J., McAllaster, M.R., Eaglesham, J.B., Wang, X., Emmott, E., Domingues, P., Chaudhry, Y., Fitzmaurice, T.J., Tung, M.K., Panas, M.D., McInerney, G., Locker, N., Wilen, C.B., Goodfellow, I.G., 2019. Noroviruses subvert the core stress granule component G3BP1 to promote viral VPg-dependent translation. *eLife* 8, e46681. <https://doi.org/10.7554/eLife.46681>
- Huang, P., Farkas, T., Zhong, W., Tan, M., Thornton, S., Morrow, A.L., 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. *J. Virol.* 79, 6714–6722. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.11.6714-6722.2005>
- Huang, Y., Zhou, N., Zhang, S., Yi, Y., Han, Ying, Liu, M., Han, Yue, Shi, N., Yang, L., Wang, Q., Cui, T., Jin, H., 2022. Norovirus detection in wastewater and its correlation with human gastroenteritis: a systematic review and meta-analysis. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 29, 22829–22842. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-18202-x>
- Hugo Johansson, P.J., Bergentoft, K., Larsson, P.A., Magnusson, G., Widell, A., Thorhagen, M., Hedlund, K.-O., 2005. A nosocomial sapovirus-associated outbreak of gastroenteritis in adults. *Scand. J. Infect. Dis.* 37, 200–204. <https://doi.org/10.1080/00365540410020974>
- Hutson, A.M., Atmar, R.L., Marcus, D.M., Estes, M.K., 2003. Norwalk Virus-Like Particle Hemagglutination by Binding to H Histo-Blood Group Antigens. *J. Virol.* 77, 405–415. <https://doi.org/10.1128/JVI.77.1.405-415.2003>
- Iizuka, S., Oka, T., Tabara, K., Omura, T., Katayama, K., Takeda, N., Noda, M., 2010. Detection of sapoviruses and noroviruses in an outbreak of gastroenteritis linked genetically to shellfish. *J. Med. Virol.* 82, 1247–1254. <https://doi.org/10.1002/jmv.21791>
- Imbert-Marcille, B.-M., Barbé, L., Dupé, M., Le Moullac-Vaidye, B., Besse, B., Peltier, C., Ruvoën-Clouet, N., Le Pendu, J., 2014. A FUT2 gene common polymorphism



- determines resistance to rotavirus A of the P[8] genotype. *J. Infect. Dis.* 209, 1227–1230. <https://doi.org/10.1093/infdis/jit655>
- Ito, E., Pu, J., Miura, T., Kazama, S., Nishiyama, M., Ito, H., Konta, Y., Omura, T., Watanabe, T., 2021. Detection of Rotavirus Vaccine Strains in Oysters and Sewage and Their Relationship with the Gastroenteritis Epidemic. *Appl. Environ. Microbiol.* 87, e02547-20. <https://doi.org/10.1128/AEM.02547-20>
- Ito, S., Takeshita, S., Nezu, A., Aihara, Y., Usuku, S., Noguchi, Y., Yokota, S., 2006. Norovirus-associated encephalopathy. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 25, 651–652. <https://doi.org/10.1097/01.inf.0000225789.92512.6d>
- Iwakiri, A., Ganmyo, H., Yamamoto, S., Otao, K., Mikasa, M., Kizoe, S., Katayama, K., Wakita, T., Takeda, N., Oka, T., 2009. Quantitative analysis of fecal sapovirus shedding: identification of nucleotide substitutions in the capsid protein during prolonged excretion. *Arch. Virol.* 154, 689–693. <https://doi.org/10.1007/s00705-009-0358-0>
- Jahun, A.S., Goodfellow, I.G., 2021. Interferon responses to norovirus infections: current and future perspectives. *J. Gen. Virol.* 102, 001660. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001660>
- Jensen, B.H., Jokelainen, P., Nielsen, A.C.Y., Franck, K.T., Holm, D.R., Schønning, K., Petersen, A.M., Kroghfelt, K.A., 2019. Children Attending Day Care Centers are a Year-round Reservoir of Gastrointestinal Viruses. *Sci. Rep.* 9. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40077-9>
- Jiang, X., Graham, D.Y., Wang, K., Estes, M.K., 1990. Norwalk Virus Genome Cloning and Characterization. *Science* 250, 1580–1583. <https://doi.org/10.1126/science.2177224>
- Jiang, X., Wang, M., Graham, D.Y., Estes, M.K., 1992. Expression, self-assembly, and antigenicity of the Norwalk virus capsid protein. *J. Virol.* 66, 6527–6532.
- Jiang, X., Zhong, W., Kaplan, M., Pickering, L.K., Matson, D.O., 1999. Expression and characterization of Sapporo-like human calicivirus capsid proteins in baculovirus. *J. Virol. Methods* 78, 81–91. [https://doi.org/10.1016/S0166-0934\(98\)00169-4](https://doi.org/10.1016/S0166-0934(98)00169-4)
- Jones, M.K., Grau, K.R., Costantini, V., Kolawole, A.O., de Graaf, M., Freiden, P., Graves, C.L., Koopmans, M., Wallet, S.M., Tibbetts, S.A., Schultz-Cherry, S., Wobus, C.E., Vinjé, J., Karst, S.M., 2015. Human norovirus culture in B cells. *Nat. Protoc.* 10, 1939–1947. <https://doi.org/10.1038/nprot.2015.121>
- Jor, E., Myrnel, M., Jonassen, C.M., 2010. SYBR Green based real-time RT-PCR assay for detection and genotype prediction of bovine noroviruses and assessment of clinical significance in Norway. *J. Virol. Methods* 169, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2010.03.028>
- Jung, J., Grant, T., Thomas, D.R., Diehnelt, C.W., Grigorieff, N., Joshua-Tor, L., 2019. High-resolution cryo-EM structures of outbreak strain human norovirus shells reveal size variations. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 116, 12828–12832. <https://doi.org/10.1073/pnas.1903562116>
- Kaas, L., Gourinat, A.-C., Urbès, F., Langlet, J., 2016. A 1-Year Study on the Detection of Human Enteric Viruses in New Caledonia. *Food Environ. Virol.* 8, 46–56. <https://doi.org/10.1007/s12560-015-9224-2>
- Kapikian, A.Z., 2000. The Discovery of the 27-nm Norwalk Virus: An Historic Perspective. *J. Infect. Dis.* 181, S295–S302. <https://doi.org/10.1086/315584>
- Kapikian, A.Z., Wyatt, R.G., Dolin, R., Thornhill, T.S., Kalica, A.R., Chanock, R.M., 1972. Visualization by Immune Electron Microscopy of a 27-nm Particle Associated with Acute Infectious Nonbacterial Gastroenteritis. *J. Virol.* 10, 1075–1081.
- Karandikar, U.C., Crawford, S.E., Ajami, N.J., Murakami, K., Kou, B., Ettayebi, K., Papanicolaou, G.A., Jongwutiwes, U., Perales, M.-A., Shia, J., Mercer, D., Finegold, M.J., Vinjé, J., Atmar, R.L., Estes, M.K., 2016. Detection of human norovirus in

- intestinal biopsies from immunocompromised transplant patients. *J. Gen. Virol.* 97, 2291–2300. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000545>
- Karangwa, C.K., Parra, G.I., Bok, K., Johnson, J.A., Levenson, E.A., Green, K.Y., 2017. Sequential Gastroenteritis Outbreaks in a Single Year Caused by Norovirus Genotypes GII.2 and GII.6 in an Institutional Setting. *Open Forum Infect. Dis.* 4, ofx236. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofx236>
- Karst, S.M., 2010. Pathogenesis of noroviruses, emerging RNA viruses. *Viruses* 2, 748–781. <https://doi.org/10.3390/v2030748>
- Karst, S.M., Wobus, C.E., Goodfellow, I.G., Green, K.Y., Virgin, H.W., 2014. Advances in Norovirus Biology. *Cell Host Microbe* 15, 668–680. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.05.015>
- Kauppinen, A., Pitkänen, T., Al-Hello, H., Maunula, L., Hokajärvi, A.-M., Rimhanen-Finne, R., Miettinen, I.T., 2019. Two Drinking Water Outbreaks Caused by Wastewater Intrusion Including Sapovirus in Finland. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 16, 4376. <https://doi.org/10.3390/ijerph16224376>
- Kawano, G., Oshige, K., Syutou, S., Koteda, Y., Yokoyama, T., Kim, B.-G., Mizuochi, T., Nagai, K., Matsuda, K., Ohbu, K., Matsuishi, T., 2007. Benign infantile convulsions associated with mild gastroenteritis: A retrospective study of 39 cases including virological tests and efficacy of anticonvulsants. *Brain Dev.* 29, 617–622. <https://doi.org/10.1016/j.braindev.2007.03.012>
- Kazama, S., Miura, T., Masago, Y., Konta, Y., Tohma, K., Manaka, T., Liu, X., Nakayama, D., Tanno, T., Saito, M., Oshitani, H., Omura, T., 2017. Environmental Surveillance of Norovirus Genogroups I and II for Sensitive Detection of Epidemic Variants. *Appl. Environ. Microbiol.* 83, e03406-16. <https://doi.org/10.1128/AEM.03406-16>
- Keswick, B.H., Satterwhite, T.K., Johnson, P.C., DuPont, H.L., Secor, S.L., Bitsura, J.A., Gary, G.W., Hoff, J.C., 1985. Inactivation of Norwalk virus in drinking water by chlorine. *Appl. Environ. Microbiol.* 50, 261–264. <https://doi.org/10.1128/aem.50.2.261-264.1985>
- Keum, H., Moon, H., Park, S., Kim, H., Rho, S., Park, B., 2009. Porcine noroviruses and sapoviruses on Korean swine farms. *Arch. Virol.* 154, 1765–1774. <https://doi.org/10.1007/s00705-009-0501-y>
- Khan, R.R., Lawson, A.D., Minnich, L.L., Martin, K., Nasir, A., Emmett, M.K., Welch, C.A., Udall, J.N.J., 2009. Gastrointestinal Norovirus Infection Associated With Exacerbation of Inflammatory Bowel Disease. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 48, 328–333. <https://doi.org/10.1097/MPG.0b013e31818255cc>
- Kilic, T., Koromyslova, A., Hansman, G.S., 2019. Structural Basis for Human Norovirus Capsid Binding to Bile Acids. *J. Virol.* 93, e01581-18. <https://doi.org/10.1128/JVI.01581-18>
- Kim, D.-S., Hosmillo, M., Alfajaro, M.M., Kim, J.-Y., Park, J.-G., Son, K.-Y., Ryu, E.-H., Sorgeloos, F., Kwon, H.-J., Park, S.-J., Lee, W.S., Cho, D., Kwon, J., Choi, J.-S., Kang, M.-I., Goodfellow, I., Cho, K.-O., 2014. Both  $\alpha$ 2,3- and  $\alpha$ 2,6-Linked Sialic Acids on O-Linked Glycoproteins Act as Functional Receptors for Porcine Sapovirus. *PLOS Pathog.* 10, e1004172. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004172>
- Kim, M.S., Koo, E.S., Choi, Y.S., Kim, J.Y., Yoo, C.H., Yoon, H.J., Kim, T.-O., Choi, H.B., Kim, J.H., Choi, J.D., Park, K.-S., Shin, Y., Kim, Y.-M., Ko, G., Jeong, Y.S., 2016. Distribution of Human Norovirus in the Coastal Waters of South Korea. *PLoS ONE* 11, e0163800. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163800>
- Kirby, A.E., Streby, A., Moe, C.L., 2016. Vomiting as a Symptom and Transmission Risk in Norovirus Illness: Evidence from Human Challenge Studies. *PLoS ONE* 11, e0143759. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0143759>

- Kitajima, M., Tohya, Y., Matsubara, K., Haramoto, E., Utagawa, E., Katayama, H., 2010. Chlorine inactivation of human norovirus, murine norovirus and poliovirus in drinking water. *Lett. Appl. Microbiol.* 51, 119–121. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2010.02869.x>
- Kitamoto, N., Oka, T., Katayama, K., Li, T.-C., Takeda, N., Kato, Y., Miyoshi, T., Tanaka, T., 2012. Novel monoclonal antibodies broadly reactive to human recombinant sapovirus-like particles. *Microbiol. Immunol.* 56, 760–770. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2012.00499.x>
- Kittigul, L., Ruppom, K., Che-arsae, M., Pombubpa, K., Thongprachum, A., Hayakawa, S., Ushijima, H., 2019. Occurrence of noroviruses in recycled water and sewage sludge: emergence of recombinant norovirus strains. *J. Appl. Microbiol.* 126, 1290–1301. <https://doi.org/10.1111/jam.14201>
- Kjeldsberg, E., 1977. Small Spherical Viruses in Faeces from Gastroenteritis Patients. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. [B]* 85B, 351–354. <https://doi.org/10.1111/j.1699-0463.1977.tb01988.x>
- Knosp, W.M., Knox, S.M., Hoffman, M.P., 2012. Salivary gland organogenesis. *WIREs Dev. Biol.* 1, 69–82. <https://doi.org/10.1002/wdev.4>
- Kobayashi, S., Fujiwara, N., Yasui, Y., Yamashita, T., Hiramatsu, R., Minagawa, H., 2012. A foodborne outbreak of sapovirus linked to catered box lunches in Japan. *Arch. Virol.* 157, 1995–1997. <https://doi.org/10.1007/s00705-012-1394-8>
- Kocher, J.F., Lindesmith, L.C., Debbink, K., Beall, A., Mallory, M.L., Yount, B.L., Graham, R.L., Huynh, J., Gates, J.E., Donaldson, E.F., Baric, R.S., 2018. Bat Caliciviruses and Human Noroviruses Are Antigenically Similar and Have Overlapping Histo-Blood Group Antigen Binding Profiles. *mBio* 9, e00869-18. <https://doi.org/10.1128/mBio.00869-18>
- Koehler, M., Aravamudhan, P., Guzman-Cardozo, C., Dumitru, A.C., Yang, J., Gargiulo, S., Soumillion, P., Dermody, T.S., Alsteens, D., 2019. Glycan-mediated enhancement of reovirus receptor binding. *Nat. Commun.* 10, 4460. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12411-2>
- Kong, F., Saif, L.J., Wang, Q., 2021. Roles of bile acids in enteric virus replication. *Anim. Dis.* 1, 2. <https://doi.org/10.1186/s44149-021-00003-x>
- Koo, E.S., Kim, M.S., Choi, Y.S., Park, K.-S., Jeong, Y.S., 2017. Occurrence of novel GII.17 and GII.21 norovirus variants in the coastal environment of South Korea in 2015. *PLoS ONE* 12, e0172237. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172237>
- Koromyslova, A., Tripathi, S., Morozov, V., Schrotten, H., Hansman, G.S., 2017. Human norovirus inhibition by a human milk oligosaccharide. *Virology* 508, 81–89. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2017.04.032>
- Koromyslova, A.D., Hansman, G.S., 2017. Nanobodies targeting norovirus capsid reveal functional epitopes and potential mechanisms of neutralization. *PLoS Pathog.* 13, e1006636. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006636>
- Kroneman, A., Vega, E., Vennema, H., Vinjé, J., White, P.A., Hansman, G., Green, K., Martella, V., Katayama, K., Koopmans, M., 2013. Proposal for a unified norovirus nomenclature and genotyping. *Arch. Virol.* 158, 2059–2068. <https://doi.org/10.1007/s00705-013-1708-5>
- Kumthip, K., Khamrin, P., Ushijima, H., Chen, L., Li, S., Maneeakarn, N., 2020. Genetic recombination and diversity of sapovirus in pediatric patients with acute gastroenteritis in Thailand, 2010–2018. *PeerJ* 8, e8520. <https://doi.org/10.7717/peerj.8520>
- Kurz, S., Chunsheng, J., Hykollari, A., Gregorich, D., Giomarelli, B., Vasta, G.R., Wilson, I.B.H., Paschinger, K., 2013. Hemocytes and Plasma of the Eastern Oyster

- (*Crassostrea virginica*) Display a Diverse Repertoire of Sulfated and Blood Group A-modified N-Glycans. *J. Biol. Chem.* 288, 24410.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M113.478933>
- Kuyumcu-Martinez, M., Belliot, G., Sosnovtsev, S.V., Chang, K.-O., Green, K.Y., Lloyd, R.E., 2004. Calicivirus 3C-Like Proteinase Inhibits Cellular Translation by Cleavage of Poly(A)-Binding Protein. *J. Virol.* 78, 8172–8182.  
<https://doi.org/10.1128/JVI.78.15.8172-8182.2004>
- La Rosa, G., Della Libera, S., Iaconelli, M., Proroga, Y.T.R., De Medici, D., Martella, V., Suffredini, E., 2017. Detection of Norovirus GII.17 Kawasaki 2014 in Shellfish, Marine Water and Underwater Sewage Discharges in Italy. *Food Environ. Virol.* 9, 326–333. <https://doi.org/10.1007/s12560-017-9290-8>
- Laconi, A., Cavicchio, L., Tassoni, L., Cunial, G., Milani, A., Ustulin, M., Di Martino, G., Forzan, M., Campalto, M., Monne, I., Beato, M.S., 2020. Identification of two divergent swine Noroviruses detected at the slaughterhouse in North East Italy. *Porc. Health Manag.* 6, 9. <https://doi.org/10.1186/s40813-020-00147-1>
- Landa, E., Javaid, S., Won, J.S., Vigandt, E., Caronia, J., Mir, P., Thet, Z., 2022. Septic Shock Secondary to Severe Gastroenteritis Resulting From Sapovirus Infection. *Cureus* 14. <https://doi.org/10.7759/cureus.24010>
- Lasure, N., Gopalkrishna, V., 2017. Epidemiological profile and genetic diversity of sapoviruses (SaVs) identified in children suffering from acute gastroenteritis in Pune, Maharashtra, Western India, 2007–2011. *Epidemiol. Infect.* 145, 106–114.  
<https://doi.org/10.1017/S0950268816001953>
- Latorre, R., Sternini, C., De Giorgio, R., Greenwood-Van Meerveld, B., 2016. Enteroendocrine Cells: A Review of Their Role In Brain-Gut Communication. *Neurogastroenterol. Motil. Off. J. Eur. Gastrointest. Motil. Soc.* 28, 620–630.  
<https://doi.org/10.1111/nmo.12754>
- Lay, M.K., Atmar, R.L., Guix, S., Bharadwaj, U., He, H., Neill, F.H., Sastry, J.K., Yao, Q., Estes, M.K., 2010. Norwalk Virus Does Not Replicate in Human Macrophages or Dendritic Cells Derived from the Peripheral Blood of Susceptible Humans. *Virology* 406, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2010.07.001>
- Le Guyader, F.S., Atmar, R.L., Le Pendu, J., 2012. Transmission of viruses through shellfish: when specific ligands come into play. *Curr. Opin. Virol., Virus entry/Environmental virology* 2, 103–110. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2011.10.029>
- Le Guyader, F.S., Krol, J., Ambert-Balay, K., Ruvoen-Clouet, N., Desaubliaux, B., Parnaudeau, S., Le Saux, J.-C., Ponge, A., Pothier, P., Atmar, R.L., Le Pendu, J., 2010. Comprehensive Analysis of a Norovirus-Associated Gastroenteritis Outbreak, from the Environment to the Consumer. *J. Clin. Microbiol.* 48, 915–920.  
<https://doi.org/10.1128/JCM.01664-09>
- Le Guyader, F.S., Le Saux, J.-C., Ambert-Balay, K., Krol, J., Serais, O., Parnaudeau, S., Giraudon, H., Delmas, G., Pommepuy, M., Pothier, P., Atmar, R.L., 2008. Aichi Virus, Norovirus, Astrovirus, Enterovirus, and Rotavirus Involved in Clinical Cases from a French Oyster-Related Gastroenteritis Outbreak. *J. Clin. Microbiol.* 46, 4011–4017. <https://doi.org/10.1128/JCM.01044-08>
- Le Guyader, F.S., Loisy, F., Atmar, R.L., Hutson, A.M., Estes, M.K., Ruvoën-Clouet, N., Pommepuy, M., Le Pendu, J., 2006. Norwalk Virus-specific Binding to Oyster Digestive Tissues. *Emerg. Infect. Dis.* 12, 931–936.  
<https://doi.org/10.3201/eid1206.051519>
- Le Guyader, F.S., Parnaudeau, S., Schaeffer, J., Bosch, A., Loisy, F., Pommepuy, M., Atmar, R.L., 2009. Detection and Quantification of Noroviruses in Shellfish. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 618–624. <https://doi.org/10.1128/AEM.01507-08>

- Le Menec, C., Parnaudeau, S., Rumebe, M., Le Saux, J.-C., Piquet, J.-C., Le Guyader, S.F., 2017. Follow-Up of Norovirus Contamination in an Oyster Production Area Linked to Repeated Outbreaks. *Food Environ. Virol.* 9, 54–61. <https://doi.org/10.1007/s12560-016-9260-6>
- Le Pendu, J., Ruvoën-Clouet, N., 2020. Fondness for sugars of enteric viruses confronts them with human glycans genetic diversity. *Hum. Genet.* 139, 903–910. <https://doi.org/10.1007/s00439-019-02090-w>
- Lee, H., Yoon, Y., 2021. Etiological Agents Implicated in Foodborne Illness World Wide. *Food Sci. Anim. Resour.* 41, 1–7. <https://doi.org/10.5851/kosfa.2020.e75>
- Lee, L.E., Cebelinski, E.A., Fuller, C., Keene, W.E., Smith, K., Vinjé, J., Besser, J.M., 2012. Sapovirus Outbreaks in Long-Term Care Facilities, Oregon and Minnesota, USA, 2002–2009. *Emerg. Infect. Dis.* 18, 873–876. <https://doi.org/10.3201/eid1805.111843>
- Lee, S., Liu, H., Wilen, C.B., Sychev, Z.E., Desai, C., Hykes, B.L., Orchard, R.C., McCune, B.T., Kim, K.-W., Nice, T.J., Handley, S.A., Baldrige, M.T., Amarasinghe, G.K., Virgin, H.W., 2019. A secreted viral non-structural protein determines intestinal norovirus pathogenesis. *Cell Host Microbe* 25, 845-857.e5. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.04.005>
- Lee, S., Wilen, C.B., Orvedahl, A., McCune, B.T., Kim, K.-W., Orchard, R.C., Peterson, S.T., Nice, T.J., Baldrige, M.T., Virgin, H.W., 2017. Norovirus Cell Tropism is Determined by Combinatorial Action of a Viral Non-structural Protein and Host Cytokine. *Cell Host Microbe* 22, 449-459.e4. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.08.021>
- Leifels, M., Cheng, D., Sozzi, E., Shoults, D.C., Wuertz, S., Mongkolsuk, S., Sirikanchana, K., 2020. Capsid integrity quantitative PCR to determine virus infectivity in environmental and food applications – A systematic review. *Water Res.* X 11, 100080. <https://doi.org/10.1016/j.wroa.2020.100080>
- Li, D., Breiman, A., le Pendu, J., Uyttendaele, M., 2015. Binding to histo-blood group antigen-expressing bacteria protects human norovirus from acute heat stress. *Front. Microbiol.* 6, 659. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00659>
- Li, L., Shan, T., Wang, C., Côté, C., Kolman, J., Onions, D., Gulland, F.M.D., Delwart, E., 2011. The Fecal Viral Flora of California Sea Lions ▽. *J. Virol.* 85, 9909–9917. <https://doi.org/10.1128/JVI.05026-11>
- Li, T.-C., Kataoka, M., Doan, Y.H., Saito, H., Takagi, H., Muramatsu, M., Oka, T., 2022a. Characterization of a Human Sapovirus Genotype GII.3 Strain Generated by a Reverse Genetics System: VP2 Is a Minor Structural Protein of the Virion. *Viruses* 14, 1649. <https://doi.org/10.3390/v14081649>
- Li, T.-C., Kataoka, M., Doan, Y.H., Saito, H., Takagi, H., Muramatsu, M., Oka, T., 2022b. Characterization of a Human Sapovirus Genotype GII.3 Strain Generated by a Reverse Genetics System: VP2 Is a Minor Structural Protein of the Virion. *Viruses* 14, 1649. <https://doi.org/10.3390/v14081649>
- Li, T.-F., Hosmillo, M., Schwanke, H., Shu, T., Wang, Z., Yin, L., Curry, S., Goodfellow, I.G., Zhou, X., 2018. Human Norovirus NS3 Has RNA Helicase and Chaperoning Activities. *J. Virol.* 92, e01606-17. <https://doi.org/10.1128/JVI.01606-17>
- Liang, Y., Wang, W.B., Zhang, J., Hou, J.W., Tang, F., Zhang, X.F., Du, L.F., Su, J.G., Li, Q.M., 2021. Evolution of the interactions between GII.4 noroviruses and histo-blood group antigens: Insights from experimental and computational studies. *PLOS Pathog.* 17, e1009745. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009745>
- Liao, Q., Wang, X., Wang, D., Zhang, D., 2014. Complete genome sequence of a novel calicivirus from a goose. *Arch. Virol.* 159, 2529–2531. <https://doi.org/10.1007/s00705-014-2083-6>

- Lin, S.-C., Qu, L., Ettayebi, K., Crawford, S.E., Blutt, S.E., Robertson, M.J., Zeng, X.-L., Tenge, V.R., Ayyar, B.V., Karandikar, U.C., Yu, X., Coarfa, C., Atmar, R.L., Ramani, S., Estes, M.K., 2020. Human norovirus exhibits strain-specific sensitivity to host interferon pathways in human intestinal enteroids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* <https://doi.org/10.1073/pnas.2010834117>
- Lindesmith, L.C., Donaldson, E.F., LoBue, A.D., Cannon, J.L., Zheng, D.-P., Vinje, J., Baric, R.S., 2008. Mechanisms of GII.4 Norovirus Persistence in Human Populations. *PLoS Med.* 5, e31. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0050031>
- Lindesmith, L.C., Ferris, M.T., Mullan, C.W., Ferreira, J., Debbink, K., Swanstrom, J., Richardson, C., Goodwin, R.R., Baehner, F., Mendelman, P.M., Bargatze, R.F., Baric, R.S., 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 Med.* 12, e1001807. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001807>
- Lindsay, L., Wolter, J., Coster, I.D., Damme, P.V., Verstraeten, T., 2015. A decade of norovirus disease risk among older adults in upper-middle and high income countries: a systematic review. *BMC Infect. Dis.* 15. <https://doi.org/10.1186/s12879-015-1168-5>
- Linehan, L.G., O'Connor, T.P., Burnell, G., 1999. Seasonal variation in the chemical composition and fatty acid profile of Pacific oysters (*Crassostrea gigas*). *Food Chem.* 64, 211–214. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(98\)00144-7](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(98)00144-7)
- Liu, B.L., Clarke, I.N., Caul, E.O., Lambden, P.R., 1995. Human enteric caliciviruses have a unique genome structure and are distinct from the Norwalk-like viruses. *Arch. Virol.* 140, 1345–1356. <https://doi.org/10.1007/BF01322662>
- Liu, D., Zhang, Z., Liao, N., Zou, S., Tang, H., Tian, P., Young, G.M., Wu, Q., Wang, D., 2020. Culturable bacteria resident on lettuce might contribute to accumulation of human noroviruses. *Int. J. Food Microbiol.* 317, 108492. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108492>
- Liu, P., Wang, X., Lee, J.-C., Teunis, P., Hu, S., Paradise, H.T., Moe, C., 2014. Genetic Susceptibility to Norovirus GII.3 and GII.4 Infections in Chinese Pediatric Diarrheal Children. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 33, e305–e309. <https://doi.org/10.1097/INF.0000000000000443>
- Liu, X., Jahuir, H., Gilman, R.H., Alva, A., Cabrera, L., Okamoto, M., Xu, H., Windle, H.J., Kelleher, D., Varela, M., Verastegui, M., Calderon, M., Sanchez, G., Sarabia, V., Ballard, S.B., Bern, C., Mayta, H., Crabtree, J.E., Cama, V., Saito, M., Oshitani, H., 2016. Etiological Role and Repeated Infections of Sapovirus among Children Aged Less than 2 Years in a Cohort Study in a Peri-urban Community of Peru. *J. Clin. Microbiol.* 54, 1598–1604. <https://doi.org/10.1128/JCM.03133-15>
- Liu, Z., Zhang, M., Shen, Z., Chen, H., Zhang, W., Xu, X., Lai, Z., Sun, W., Zhao, Z., Zhang, J., 2019. The coordinating role of the human norovirus minor capsid protein VP2 is essential to functional change and nuclear localization of the major capsid protein VP1. *Arch. Virol.* 164, 1173–1180. <https://doi.org/10.1007/s00705-019-04192-2>
- Lizasoain, A., Tort, L.F.L., García, M., Gómez, M.M., Leite, J.P.G., Miagostovich, M.P., Cristina, J., Berois, M., Colina, R., Victoria, M., 2015. Sewage surveillance reveals the presence of canine GVII norovirus and canine astrovirus in Uruguay. *Arch. Virol.* 160, 2839–2843. <https://doi.org/10.1007/s00705-015-2571-3>
- Lochridge, V.P., Hardy, M.E., 2003. Snow Mountain virus genome sequence and virus-like particle assembly. *Virus Genes* 26, 71–82. <https://doi.org/10.1023/a:1022334323013>
- Lochridge, V.P., Jutila, K.L., Graff, J.W., Hardy, M.E., 2005. Epitopes in the P2 domain of norovirus VP1 recognized by monoclonal antibodies that block cell interactions. *J. Gen. Virol.* 86, 2799–2806. <https://doi.org/10.1099/vir.0.81134-0>

- Loisy, F., Atmar, R.L., Guillon, P., Le Cann, P., Pommepuy, M., Le Guyader, F.S., 2005. Real-time RT-PCR for norovirus screening in shellfish. *J. Virol. Methods* 123, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2004.08.023>
- Lokmer, A., Mathias Wegner, K., 2015. Hemolymph microbiome of Pacific oysters in response to temperature, temperature stress and infection. *ISME J.* 9, 670–682. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.160>
- Loureiro Tonini, M.A., Pires Gonçalves Barreira, D.M., Bueno de Freitas Santolin, L., Bondi Volpini, L.P., Gagliardi Leite, J.P., Le Moullac-Vaidye, B., Le Pendu, J., Cruz Spano, L., 2020. FUT2, Secretor Status and FUT3 Polymorphisms of Children with Acute Diarrhea Infected with Rotavirus and Norovirus in Brazil. *Viruses* 12, 1084. <https://doi.org/10.3390/v12101084>
- Lowther, J., Gustar, N.E., Hartnell, R.E., Lees, D.N., 2012. Comparison of Norovirus RNA Levels in Outbreak-Related Oysters with Background Environmental Levels. *J. Food Prot.* 75, 389–393. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-11-360>
- Lu, Z., Yokoyama, M., Chen, N., Oka, T., Jung, K., Chang, K.-O., Annamalai, T., Wang, Q., Saif, L.J., 2016. Mechanism of Cell Culture Adaptation of an Enteric Calicivirus, the Porcine Sapovirus Cowden Strain. *J. Virol.* 90, 1345–1358. <https://doi.org/10.1128/JVI.02197-15>
- Lucero, Y., Matson, D.O., Ashkenazi, S., George, S., O’Ryan, M., 2021. Norovirus: Facts and Reflections from Past, Present, and Future. *Viruses* 13, 2399. <https://doi.org/10.3390/v13122399>
- Ludwig-Begall, L.F., Mauroy, A., Thiry, E., 2021. Noroviruses—The State of the Art, Nearly Fifty Years after Their Initial Discovery. *Viruses* 13, 1541. <https://doi.org/10.3390/v13081541>
- Ma, L., Liu, H., Su, L., Zhao, F., Zhou, D., Duan, D., 2018. Histo-blood group antigens in *Crassostrea gigas* and binding profiles with GII.4 Norovirus. *J. Oceanol. Limnol.* 36, 1383–1391. <https://doi.org/10.1007/s00343-018-7024-x>
- Ma, L., Su, L., Liu, H., Zhao, F., Zhou, D., Duan, D., 2017. Norovirus contamination and the glycosphingolipid biosynthesis pathway in Pacific oyster: A transcriptomics study. *Fish Shellfish Immunol.* 66, 26–34. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.04.023>
- Maalouf, H., Schaeffer, J., Parnaudeau, S., Le Pendu, J., Atmar, R.L., Crawford, S.E., Le Guyader, F.S., 2011. Strain-dependent norovirus bioaccumulation in oysters. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 3189–3196. <https://doi.org/10.1128/AEM.03010-10>
- Maalouf, H., Zakhour, M., Le Pendu, J., Le Saux, J.-C., Atmar, R.L., Le Guyader, F.S., 2010. Distribution in tissue and seasonal variation of norovirus genogroup I and II ligands in oysters. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 5621–5630. <https://doi.org/10.1128/AEM.00148-10>
- Macher, B.A., Galili, U., 2008. The Gal $\alpha$ 1,3Gal $\beta$ 1,4GlcNAc-R ( $\alpha$ -Gal) epitope: a carbohydrate of unique evolution and clinical relevance. *Biochim. Biophys. Acta* 1780, 75–88. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2007.11.003>
- Madeley, C.R., Cosgrove, B.P., 1976. Letter: Caliciviruses in man. *Lancet Lond. Engl.* 1, 199–200. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(76\)91309-x](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(76)91309-x)
- Magwalivha, M., Ngandu, J.-P.K., Traore, A.N., Potgieter, N., 2021. Prevalence and Genetic Characterisation of Human Sapovirus from Children with Diarrhoea in the Rural Areas of Vhembe District, South Africa, 2017–2020. *Viruses* 13, 393. <https://doi.org/10.3390/v13030393>
- Magwira, C.A., Steele, D., Seheri, M., 2021. Norovirus diarrhea is significantly associated with higher counts of fecal histo-blood group antigen expressing *Enterobacter cloacae* among black South African infants. *Gut Microbes* 13, 1979876. <https://doi.org/10.1080/19490976.2021.1979876>

- Mahar, J.E., Bok, K., Green, K.Y., Kirkwood, C.D., 2013. The Importance of Intergenic Recombination in Norovirus GII.3 Evolution. *J. Virol.* 87, 3687–3698. <https://doi.org/10.1128/JVI.03056-12>
- Mahe, M.M., Sundaram, N., Watson, C.L., Shroyer, N.F., Helmrath, M.A., 2015. Establishment of Human Epithelial Enteroids and Colonoids from Whole Tissue and Biopsy. *J. Vis. Exp. JoVE* 52483. <https://doi.org/10.3791/52483>
- Makhaola, K., Moyo, S., Kebaabetswe, L.P., 2020. Distribution and Genetic Variability of Sapoviruses in Africa. *Viruses* 12, 490. <https://doi.org/10.3390/v12050490>
- Mallagaray, A., Creutzmacher, R., Dülfer, J., Mayer, P.H.O., Grimm, L.L., Orduña, J.M., Trabjerg, E., Stehle, T., Rand, K.D., Blaum, B.S., Uetrecht, C., Peters, T., 2019. A post-translational modification of human Norovirus capsid protein attenuates glycan binding. *Nat. Commun.* 10, 1320. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09251-5>
- Mancini, P., Bonanno Ferraro, G., Iaconelli, M., Suffredini, E., Valdazo-González, B., Della Libera, S., Divizia, M., La Rosa, G., 2019. Molecular characterization of human Sapovirus in untreated sewage in Italy by amplicon-based Sanger and next-generation sequencing. *J. Appl. Microbiol.* 126, 324–331. <https://doi.org/10.1111/jam.14129>
- Marionneau, S., Ruvoën, N., Le Moullac-Vaidye, B., Clement, M., Cailleau-Thomas, A., Ruiz-Palacois, G., Huang, P., Jiang, X., Le Pendu, J., 2002. Norwalk virus binds to histo-blood group antigens present on gastroduodenal epithelial cells of secretor individuals. *Gastroenterology* 122, 1967–1977. <https://doi.org/10.1053/gast.2002.33661>
- Martella, V., Lorusso, E., Decaro, N., Elia, G., Radogna, A., D’Abramo, M., Desario, C., Cavalli, A., Corrente, M., Camero, M., Germinario, C.A., Bányai, K., Di Martino, B., Marsilio, F., Carmichael, L.E., Buonavoglia, C., 2008. Detection and Molecular Characterization of a Canine Norovirus. *Emerg. Infect. Dis.* 14, 1306–1308. <https://doi.org/10.3201/eid1408.080062>
- Martella, V., Pinto, P., Lorusso, E., Di Martino, B., Wang, Q., Larocca, V., Cavalli, A., Camero, M., Decaro, N., Bányai, K., Saif, L.J., Buonavoglia, C., 2015. Detection and Full-Length Genome Characterization of Novel Canine Vesiviruses. *Emerg. Infect. Dis.* 21, 1433–1436. <https://doi.org/10.3201/eid2108.140900>
- Matthews, R.E., 1979. Third report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Classification and nomenclature of viruses. *Intervirology* 12, 129–296. <https://doi.org/10.1159/000149081>
- Mattioli, M.C., Benedict, K.M., Murphy, J., Kahler, A., Kline, K.E., Longenberger, A., Mitchell, P.K., Watkins, S., Berger, P., Shanks, O.C., Barrett, C.E., Barclay, L., Hall, A.J., Hill, V., Weltman, A., 2021. Identifying septic pollution exposure routes during a waterborne norovirus outbreak - A new application for human-associated microbial source tracking qPCR. *J. Microbiol. Methods* 180, 106091. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2020.106091>
- Mauroy, A., Gillet, L., Mathijs, E., Vanderplassen, A., Thiry, E., 2011. Alternative attachment factors and internalization pathways for GIII.2 bovine noroviruses. *J. Gen. Virol.* 92, 1398–1409. <https://doi.org/10.1099/vir.0.030072-0>
- Mavrouli, M., Mavroulis, S., Lekkas, E., Tsakris, A., 2022. Infectious Diseases Associated with Hydrometeorological Hazards in Europe: Disaster Risk Reduction in the Context of the Climate Crisis and the Ongoing COVID-19 Pandemic. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 19, 10206. <https://doi.org/10.3390/ijerph191610206>
- Mayo, M.A., 2002. A summary of taxonomic changes recently approved by ICTV. *Arch. Virol.* 147, 1655–1656. <https://doi.org/10.1007/s007050200039>
- McCune, B.T., Tang, W., Lu, J., Eaglesham, J.B., Thorne, L., Mayer, A.E., Condiff, E., Nice, T.J., Goodfellow, I., Krezel, A.M., Virgin, H.W., 2017. Noroviruses Co-opt the



- Function of Host Proteins VAPA and VAPB for Replication via a Phenylalanine-Phenylalanine-Acidic-Tract-Motif Mimic in Nonstructural Viral Protein NS1/2. *mBio* 8, e00668-17. <https://doi.org/10.1128/mBio.00668-17>
- McFadden, N., Bailey, D., Carrara, G., Benson, A., Chaudhry, Y., Shortland, A., Heeney, J., Yarovinsky, F., Simmonds, P., Macdonald, A., Goodfellow, I., 2011. Norovirus Regulation of the Innate Immune Response and Apoptosis Occurs via the Product of the Alternative Open Reading Frame 4. *PLoS Pathog.* 7, e1002413. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002413>
- McLeod, C., Hay, B., Grant, C., Greening, G., Day, D., 2009. Localization of norovirus and poliovirus in Pacific oysters. *J. Appl. Microbiol.* 106, 1220–1230. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.04091.x>
- McLeod, C., Polo, D., Le Saux, J.-C., Le Guyader, F.S., 2017. Depuration and Relaying: A Review on Potential Removal of Norovirus from Oysters: Effectiveness of viral depuration... *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 16, 692–706. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12271>
- Meeroff, J.C., Schreiber, D.S., Trier, J.S., Blacklow, N.R., 1980. Abnormal gastric motor function in viral gastroenteritis. *Ann. Intern. Med.* 92, 370–373. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-92-3-370>
- Melnick, J.L., Agol, V.I., Bachrach, H.L., Brown, F., Cooper, P.D., Fiers, W., Gard, S., Gear, J.H., Ghendon, Y., Kasza, L., LaPlaca, M., Mandel, B., McGregor, S., Mohanty, S.B., Plummer, G., Rueckert, R.R., Schaffer, F.L., Tagaya, I., Tyrrell, D.A., Voroshilova, M., Wenner, H.A., 1974. Picornaviridae. *Intervirology* 4, 303–316. <https://doi.org/10.1159/000149863>
- Mikalsen, A.B., Nilsen, P., Frøystad-Saugen, M., Lindmo, K., Eliassen, T.M., Rode, M., Evensen, Ø., 2014. Characterization of a Novel Calicivirus Causing Systemic Infection in Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.): Proposal for a New Genus of Caliciviridae. *PLoS ONE* 9, e107132. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107132>
- Mikounou Louya, V., Nguekeng Tsague, B., Ntoumi, F., Vouvougui, C., Kobawila, S.C., 2019. High prevalence of norovirus and rotavirus co-infection in children with acute gastroenteritis hospitalised in Brazzaville, Republic of Congo. *Trop. Med. Int. Health* TM IH 24, 1427–1433. <https://doi.org/10.1111/tmi.13317>
- Milbrath, M.O., Spicknall, I.H., Zelner, J.L., Moe, C.L., Eisenberg, J.N.S., 2013. Heterogeneity in norovirus shedding duration affects community risk. *Epidemiol. Infect.* 141, 1572–1584. <https://doi.org/10.1017/S0950268813000496>
- Mirabelli, C., Jones, M.K., Young, V.L., Kolawole, A.O., Owusu, I., Shan, M., Abuaita, B., Turula, H., Trevino, J.G., Grigorova, I., Lundy, S.K., Lyssiotis, C.A., Ward, V.K., Karst, S.M., Wobus, C.E., 2022a. Human Norovirus Triggers Primary B Cell Immune Activation In Vitro. *mBio* 13, e00175-22. <https://doi.org/10.1128/mbio.00175-22>
- Mirabelli, C., Santos-Ferreira, N., Gilliland, M.G., Cieza, R.J., Colacino, J.A., Sexton, J.Z., Neyts, J., Taube, S., Rocha-Pereira, J., Wobus, C.E., 2022b. Human Norovirus Efficiently Replicates in Differentiated 3D-Human Intestinal Enteroids. *J. Virol.* 96, e00855-22. <https://doi.org/10.1128/jvi.00855-22>
- Miura, F., Matsuyama, R., Nishiura, H., 2018. Estimating the Asymptomatic Ratio of Norovirus Infection During Foodborne Outbreaks With Laboratory Testing in Japan. *J. Epidemiol.* 28, 382–387. <https://doi.org/10.2188/jea.JE20170040>
- Miura, T., Sano, D., Suenaga, A., Yoshimura, T., Fuzawa, M., Nakagomi, T., Nakagomi, O., Okabe, S., 2013a. Histo-Blood Group Antigen-Like Substances of Human Enteric Bacteria as Specific Adsorbents for Human Noroviruses. *J. Virol.* 87, 9441–9451. <https://doi.org/10.1128/JVI.01060-13>

- Miura, T., Sano, D., Suenaga, A., Yoshimura, T., Fuzawa, M., Nakagomi, T., Nakagomi, O., Okabe, S., 2013b. Histo-Blood Group Antigen-Like Substances of Human Enteric Bacteria as Specific Adsorbents for Human Noroviruses. *J. Virol.* 87, 9441–9451. <https://doi.org/10.1128/JVI.01060-13>
- Miyazaki, N., Song, C., Oka, T., Miki, M., Murakami, K., Iwasaki, K., Katayama, K., Murata, K., 2022. Atomic Structure of the Human Sapovirus Capsid Reveals a Unique Capsid Protein Conformation in Caliciviruses. *J. Virol.* 96, e00298-22. <https://doi.org/10.1128/jvi.00298-22>
- Model, L., Burnweit, C.A., 2016. *Sapovirus* Gastroenteritis in Young Children Presenting as Distal Small Bowel Obstruction: A Report of 2 Cases and Literature Review. *Case Rep. Surg.* 2016, e6302875. <https://doi.org/10.1155/2016/6302875>
- Moore, M.D., Mertens, B.S., Jaykus, L.-A., 2017. Alternative In Vitro Methods for the Determination of Viral Capsid Structural Integrity. *J. Vis. Exp. JoVE* 56444. <https://doi.org/10.3791/56444>
- Mor, S.K., Phelps, N.B.D., Ng, T.F.F., Subramaniam, K., Primus, A., Armien, A.G., McCann, R., Puzach, C., Waltzek, T.B., Goyal, S.M., 2017. Genomic characterization of a novel calicivirus, FHMCV-2012, from baitfish in the USA. *Arch. Virol.* 162, 3619–3627. <https://doi.org/10.1007/s00705-017-3519-6>
- Moreno-Valladares, M., Moncho-Amor, V., Bernal-Simon, I., Agirre-Iturrioz, E., Álvarez-Satta, M., Matheu, A., 2022. Norovirus Intestinal Infection and Lewy Body Disease in an Older Patient with Acute Cognitive Impairment. *Int. J. Mol. Sci.* 23, 8376. <https://doi.org/10.3390/ijms23158376>
- Morozov, V., Hanisch, F.-G., Wegner, K.M., Schrotten, H., 2018. Pandemic GII.4 Sydney and Epidemic GII.17 Kawasaki308 Noroviruses Display Distinct Specificities for Histo-Blood Group Antigens Leading to Different Transmission Vector Dynamics in Pacific Oysters. *Front. Microbiol.* 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02826>
- Morse, D.L., Guzewich, J.J., Hanrahan, J.P., Stricof, R., Shayegani, M., Deibel, R., Grabau, J.C., Nowak, N.A., Herrmann, J.E., Cukor, G., Blacklow, N.R., 1986. Widespread Outbreaks of Clam- and Oyster-Associated Gastroenteritis. *N. Engl. J. Med.* 314, 678–681. <https://doi.org/10.1056/NEJM198603133141103>
- Murakami, K., Tenge, V.R., Karandikar, U.C., Lin, S.-C., Ramani, S., Ettayebi, K., Crawford, S.E., Zeng, X.-L., Neill, F.H., Ayyar, B.V., Katayama, K., Graham, D.Y., Bieberich, E., Atmar, R.L., Estes, M.K., 2020. Bile acids and ceramide overcome the entry restriction for GII.3 human norovirus replication in human intestinal enteroids. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 201910138. <https://doi.org/10.1073/pnas.1910138117>
- Murphy, A.M., Grohmann, G.S., Christopher, P.J., Lopez, W.A., Davey, G.R., Millsom, R.H., 1979. An Australia-Wide Outbreak of Gastroenteritis from Oysters Caused by Norwalk Virus. *Med. J. Aust.* 2, 329–333. <https://doi.org/10.5694/j.1326-5377.1979.tb104133.x>
- Murray, T.Y., Taylor, M.B., 2015. Quantification and molecular characterisation of human sapoviruses in water sources impacted by highly polluted discharged wastewater in South Africa. *J. Water Health* 13, 1055–1059. <https://doi.org/10.2166/wh.2015.255>
- Nagarajan, V., Chen, J.-S., Hsu, G.-J., Chen, H.-P., Chao, H.-C., Huang, S.-W., Tsai, I.-S., Hsu, B.-M., 2022. Surveillance of Adenovirus and Norovirus Contaminants in the Water and Shellfish of Major Oyster Breeding Farms and Fishing Ports in Taiwan. *Pathog. Basel Switz.* 11, 316. <https://doi.org/10.3390/pathogens11030316>
- Nagesha, H.S., Wang, L.F., Hyatt, A.D., 1999. Virus-like particles of calicivirus as epitope carriers. *Arch. Virol.* 144, 2429–2439. <https://doi.org/10.1007/s007050050655>
- Nakagawa-Okamoto, R., Arita-Nishida, T., Toda, S., Kato, H., Iwata, H., Akiyama, M., Nishio, O., Kimura, H., Noda, M., Takeda, N., Oka, T., 2009. Detection of multiple

- sapovirus genotypes and genogroups in oyster-associated outbreaks. *Jpn. J. Infect. Dis.* 62, 63–66. <https://doi.org/10.7883/yoken.JJID.2009.63>
- Nakanishi, K., Tatsumi, M., Kinoshita-Numata, K., Tsugawa, T., Nakata, S., Tsutsumi, H., 2011. Full sequence analysis of the original Sapporo virus. *Microbiol. Immunol.* 55, 657–660. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2011.00358.x>
- Nakata, S., Chiba, S., Terashima, H., Nakao, T., 1985. Prevalence of antibody to human calicivirus in Japan and Southeast Asia determined by radioimmunoassay. *J. Clin. Microbiol.* 22, 519–521. <https://doi.org/10.1128/jcm.22.4.519-521.1985>.
- Nakata, S., Estes, M.K., Chiba, S., 1988. Detection of human calicivirus antigen and antibody by enzyme-linked immunosorbent assays. *J. Clin. Microbiol.* 26, 2001–2005. <https://doi.org/10.1128/jcm.26.10.2001-2005.1988>
- Nakata, S., Honma, S., Numata, K., Kogawa, K., Ukae, S., Adachi, N., Jiang, X., Estes, M.K., Gatheru, Z., Tukei, P.M., Chiba, S., 1998. Prevalence of Human Calicivirus Infections in Kenya as Determined by Enzyme Immunoassays for Three Genogroups of the Virus. *J. Clin. Microbiol.* 36, 3160–3163. <https://doi.org/10.1128/jcm.36.11.3160-3163.1998>
- Nappier, S.P., Graczyk, T.K., Schwab, K.J., 2008. Bioaccumulation, Retention, and Depuration of Enteric Viruses by *Crassostrea virginica* and *Crassostrea ariakensis* Oysters. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 6825–6831. <https://doi.org/10.1128/AEM.01000-08>
- Neill, J.D., Reardon, I.M., Heinrikson, R.L., 1991. Nucleotide sequence and expression of the capsid protein gene of feline calicivirus. *J. Virol.* 65, 5440–5447. <https://doi.org/10.1128/JVI.65.10.5440-5447.1991>.
- Nelson, M.I., Mahfuz, M., Chhabra, P., Haque, R., Seidman, J.C., Hossain, I., McGrath, M., Ahmed, A.M.S., Knobler, S., Vinjé, J., Ahmed, T., 2018. Genetic Diversity of Noroviruses Circulating in a Pediatric Cohort in Bangladesh. *J. Infect. Dis.* 218, 1937–1942. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiy454>
- Netzler, N.E., Enosi Tuipulotu, D., White, P.A., 2019. Norovirus antivirals: Where are we now? *Med. Res. Rev.* 39, 860–886. <https://doi.org/10.1002/med.21545>
- Ng, T.F.F., Marine, R., Wang, C., Simmonds, P., Kapusinszky, B., Bodhidatta, L., Oderinde, B.S., Wommack, K.E., Delwart, E., 2012. High Variety of Known and New RNA and DNA Viruses of Diverse Origins in Untreated Sewage. *J. Virol.* 86, 12161–12175. <https://doi.org/10.1128/JVI.00869-12>
- Nice, T.J., Strong, D.W., McCune, B.T., Pohl, C.S., Virgin, H.W., 2013. A Single-Amino-Acid Change in Murine Norovirus NS1/2 Is Sufficient for Colonic Tropism and Persistence. *J. Virol.* 87, 327–334. <https://doi.org/10.1128/JVI.01864-12>
- Nicholson, R., Robinson, J., Robinson, M., Rowan, E., 2018. From the Waters to the Plate to the Latrine: Fish and Seafood from the Cardo V Sewer, Herculaneum. *J. Marit. Archaeol.* 13, 263–284. <https://doi.org/10.1007/s11457-018-9218-y>
- Nims, R., Plavsic, M., 2013. Inactivation of Caliciviruses. *Pharmaceuticals* 6, 358. <https://doi.org/10.3390/ph6030358>
- Noel, J.S., Liu, B.L., Humphrey, C.D., Rodriguez, E.M., Lambden, P.R., Clarke, I.N., Dwyer, D.M., Ando, T., Glass, R.I., Monroe, S.S., 1997. Parkville virus: a novel genetic variant of human calicivirus in the Sapporo virus clade, associated with an outbreak of gastroenteritis in adults. *J. Med. Virol.* 52, 173–178. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9071\(199706\)52:2<173::AID-JMV10>3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9071(199706)52:2<173::AID-JMV10>3.0.CO;2-M)
- Nordgren, J., Nitiema, L.W., Ouermi, D., Simpoire, J., Svensson, L., 2013. Host Genetic Factors Affect Susceptibility to Norovirus Infections in Burkina Faso. *PLOS ONE* 8, e69557. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069557>

- Nordgren, J., Svensson, L., 2019. Genetic Susceptibility to Human Norovirus Infection: An Update. *Viruses* 11, 226. <https://doi.org/10.3390/v11030226>
- Numata, K., Hardy, M.E., Nakata, S., Chiba, S., Estes, M.K., 1997. Molecular characterization of morphologically typical human calicivirus Sapporo. *Arch. Virol.* 142, 1537–1552. <https://doi.org/10.1007/s007050050178>
- Oka, T., Iritani, N., Okada, M., Ogawa, T., Iizuka, S., Tatsumi, C., Harada, S., Haga, K., Doan, Y.H., 2018. First Complete Genome Sequences of Human Sapovirus Strains Classified as GI.3, GI.4, GI.6, GI.7, and GII.7. *Genome Announc.* 6, e00168-18. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00168-18>
- Oka, T., Katayama, K., Hansman, G.S., Kageyama, T., Ogawa, S., Wu, F.-T., White, P.A., Takeda, N., 2006. Detection of human sapovirus by real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. *J. Med. Virol.* 78, 1347–1353. <https://doi.org/10.1002/jmv.20699>
- Oka, T., Lu, Z., Phan, T., Delwart, E.L., Saif, L.J., Wang, Q., 2016. Genetic Characterization and Classification of Human and Animal Sapoviruses. *PLOS ONE* 11, e0156373. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0156373>
- Oka, T., Miyashita, K., Katayama, K., Wakita, T., Takeda, N., 2009a. Distinct genotype and antigenicity among genogroup II sapoviruses. *Microbiol. Immunol.* 53, 417–420. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2009.00133.x>
- Oka, T., Mori, K., Iritani, N., Harada, S., Ueki, Y., Iizuka, S., Mise, K., Murakami, K., Wakita, T., Katayama, K., 2012. Human sapovirus classification based on complete capsid nucleotide sequences. *Arch. Virol.* 157, 349–352. <https://doi.org/10.1007/s00705-011-1161-2>
- Oka, T., Wang, Q., Katayama, K., Saif, L.J., 2015. Comprehensive Review of Human Sapoviruses. *Clin. Microbiol. Rev.* 28, 32–53. <https://doi.org/10.1128/CMR.00011-14>
- Oka, T., Yamamoto, M., Miyashita, K., Ogawa, S., Katayama, K., Wakita, T., Takeda, N., 2009b. Self-assembly of sapovirus recombinant virus-like particles from polyprotein in mammalian cells. *Microbiol. Immunol.* 53, 49–52. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2008.00086.x>
- Okada, M., Yamashita, Y., Oseto, M., Ogawa, T., Kaiho, I., Shinozaki, K., 2006. Genetic variability in the sapovirus capsid protein. *Virus Genes* 33, 157–161. <https://doi.org/10.1007/s11262-005-0051-7>
- Okitsu, S., Khamrin, P., Thongprachum, A., Hikita, T., Kumthip, K., Pham, N.T.K., Takanashi, S., Hayakawa, S., Maneekarn, N., Ushijima, H., 2021. Diversity of human sapovirus genotypes detected in Japanese pediatric patients with acute gastroenteritis, 2014–2017. *J. Med. Virol.* 93, 4865–4874. <https://doi.org/10.1002/jmv.26934>
- Olarte-Castillo, X.A., Hofer, H., Goller, K.V., Martella, V., Moehlman, P.D., East, M.L., 2016. Divergent Sapovirus Strains and Infection Prevalence in Wild Carnivores in the Serengeti Ecosystem: A Long-Term Study. *PLoS ONE* 11, e0163548. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163548>
- Olivares, A.I.O., Leitão, G.A.A., Pimenta, Y.C., Cantelli, C.P., Fumian, T.M., Fialho, A.M., da Silva e Mouta, S., Delgado, I.F., Nordgren, J., Svensson, L., Miagostovich, M.P., Leite, J.P.G., de Moraes, M.T.B., 2021. Epidemiology of enteric virus infections in children living in the Amazon region. *Int. J. Infect. Dis.* 108, 494–502. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2021.05.060>
- Ollivier, J., Lowther, J., Desdouts, M., Schaeffer, J., Wacrenier, C., Oude Munnink, B.B., Besnard, A., Mota Batista, F., Stapleton, T., Schultz, A.C., Aarestrup, F., Koopmans, M., de Graaf, M., Le Guyader, S., 2022. Application of Next Generation Sequencing on Norovirus-contaminated oyster samples. *EFSA Support. Publ.* 19, 7348E. <https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2022.EN-7348>

- Ondrikova, N., Clough, H.E., Cunliffe, N.A., Iturriza-Gomara, M., Vivancos, R., Harris, J.P., 2021. Understanding norovirus reporting patterns in England: a mixed model approach. *BMC Public Health* 21, 1245. <https://doi.org/10.1186/s12889-021-11317-3>
- Otto, P.H., Clarke, I.N., Lambden, P.R., Salim, O., Reetz, J., Liebler-Tenorio, E.M., 2011. Infection of Calves with Bovine Norovirus GIII.1 Strain Jena Virus: an Experimental Model To Study the Pathogenesis of Norovirus Infection. *J. Virol.* 85, 12013–12021. <https://doi.org/10.1128/JVI.05342-11>
- Overbey, K.N., Hamra, G.B., Nachman, K.E., Rock, C., Schwab, K.J., 2021. Quantitative microbial risk assessment of human norovirus infection in environmental service workers due to healthcare-associated fomites. *J. Hosp. Infect.* 117, 52–64. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2021.08.006>
- Page, N., Groome, M.J., Murray, T., Nadan, S., Netshikweta, R., Keddy, K.H., Poonsamy, B., Moyes, J., Walaza, S., Kahn, K., Kuonza, L., Taylor, M.B., Madhi, S.A., Cohen, C., 2016. Sapovirus prevalence in children less than five years of age hospitalised for diarrhoeal disease in South Africa, 2009–2013. *J. Clin. Virol.* 78, 82–88. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2016.03.013>
- Pales Espinosa, E., Allam, B., Perrigault, M., Ward, E., E. Shumway, S., 2009. Lectins Associated With the Feeding Organs of the Oyster *Crassostrea virginica* Can Mediate Particle Selection [WWW Document]. <https://doi.org/10.1086/BBLv217n2p130>
- Pang, X.L., Lee, B.E., Tyrrell, G.J., Preiksaitis, J.K., 2009. Epidemiology and genotype analysis of sapovirus associated with gastroenteritis outbreaks in Alberta, Canada: 2004–2007. *J. Infect. Dis.* 199, 547–551. <https://doi.org/10.1086/596210>
- Pankovics, P., Kugler, Z., Kátai, A., Reuter, G., 2009. First gastroenteritis outbreak caused by sapovirus (GI2) in Hungary – part of an international epidemic? *Orv. Hetil.* 150, 1223–1229. <https://doi.org/10.1556/oh.2009.28628>
- Papafragkou, E., Hewitt, J., Park, G.W., Greening, G., Vinjé, J., 2013. Challenges of Culturing Human Norovirus in Three-Dimensional Organoid Intestinal Cell Culture Models. *PLoS ONE* 8, e63485. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063485>
- Parra, G.I., Squires, R.B., Karangwa, C.K., Johnson, J.A., Lepore, C.J., Sosnovtsev, S.V., Green, K.Y., 2017. Static and Evolving Norovirus Genotypes: Implications for Epidemiology and Immunity. *PLOS Pathog.* 13, e1006136. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006136>
- 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. <https://doi.org/10.1056/NEJM197707142970204>
- Patel, M.M., Widdowson, M.-A., Glass, R.I., Akazawa, K., Vinjé, J., Parashar, U.D., 2008. Systematic Literature Review of Role of Noroviruses in Sporadic Gastroenteritis. *Emerg. Infect. Dis.* 14, 1224–1231. <https://doi.org/10.3201/eid1408.071114>
- Patin, N.V., Peña-Gonzalez, A., Hatt, J.K., Moe, C., Kirby, A., Konstantinidis, K.T., 2020. The Role of the Gut Microbiome in Resisting Norovirus Infection as Revealed by a Human Challenge Study. *mBio* 11, e02634-20. <https://doi.org/10.1128/mBio.02634-20>
- Payne, D.C., Vinjé, J., Szilagyi, P.G., Edwards, K.M., Staat, M.A., Weinberg, G.A., Hall, C.B., Chappell, J., Bernstein, D.I., Curns, A.T., Wikswo, M., Shirley, S.H., Hall, A.J., Lopman, B., Parashar, U.D., 2013. Norovirus and medically attended gastroenteritis in U.S. children. *N. Engl. J. Med.* 368, 1121–1130. <https://doi.org/10.1056/NEJMsa1206589>
- Pesavento, P.A., Stokol, T., Liu, H., van der List, D.A., Gaffney, P.M., Parker, J.S., 2011. Distribution of the Feline Calicivirus Receptor Junctional Adhesion Molecule A in Feline Tissues. *Vet. Pathol.* 48, 361–368. <https://doi.org/10.1177/0300985810375245>

- Peters, T., Creutzmacher, R., Maass, T., Mallagaray, A., Ogrissek, P., Taube, S., Thiede, L., Utrecht, C., 2022. Norovirus–glycan interactions — how strong are they really? *Biochem. Soc. Trans.* 50, 347–359. <https://doi.org/10.1042/BST20210526>
- Petronella, N., Ronholm, J., Suresh, M., Harlow, J., Mykytczuk, O., Corneau, N., Bidawid, S., Nasheri, N., 2018. Genetic characterization of norovirus GII.4 variants circulating in Canada using a metagenomic technique. *BMC Infect. Dis.* 18, 521. <https://doi.org/10.1186/s12879-018-3419-8>
- Pfister, T., Wimmer, E., 2001. Polypeptide p41 of a Norwalk-Like Virus Is a Nucleic Acid-Independent Nucleoside Triphosphatase. *J. Virol.* 75, 1611–1619. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.4.1611-1619.2001>
- Pietsch, C., Liebert, U.G., 2019. Intrahost viral evolution during chronic sapovirus infections. *J. Clin. Virol.* 113, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2019.02.001>
- Pintó, R.M., Costafreda, M.I., Bosch, A., 2009. Risk Assessment in Shellfish-Borne Outbreaks of Hepatitis A. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 7350–7355. <https://doi.org/10.1128/AEM.01177-09>
- Platts-Mills, J.A., Liu, J., Rogawski, E.T., Kabir, F., Lertsethtakarn, P., Siguas, M., Khan, S.S., Praharaj, I., Murei, A., Nshama, R., Mujaga, B., Havt, A., Maciel, I.A., McMurry, T.L., Operario, D.J., Taniuchi, M., Gratz, J., Stroup, S.E., Roberts, J.H., Kalam, A., Aziz, F., Qureshi, S., Islam, M.O., Sakpaisal, P., Silapong, S., Yori, P.P., Rajendiran, R., Benny, B., McGrath, M., McCormick, B.J.J., Seidman, J.C., Lang, D., Gottlieb, M., Guerrant, R.L., Lima, A.A.M., Leite, J.P., Samie, A., Bessong, P.O., Page, N., Bodhidatta, L., Mason, C., Shrestha, S., Kiwelu, I., Mduma, E.R., Iqbal, N.T., Bhutta, Z.A., Ahmed, T., Haque, R., Kang, G., Kosek, M.N., Houpt, E.R., 2018. Use of quantitative molecular diagnostic methods to assess the aetiology, burden, and clinical characteristics of diarrhoea in children in low-resource settings: a reanalysis of the MAL-ED cohort study. *Lancet Glob. Health* 6, e1309–e1318. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(18\)30349-8](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(18)30349-8)
- Pouillot, R., Van Doren, J.M., Woods, J., Plante, D., Smith, M., Goblick, G., Roberts, C., Locas, A., Hajen, W., Stobo, J., White, J., Holtzman, J., Buenaventura, E., Burkhardt, W., Catford, A., Edwards, R., DePaola, A., Calci, K.R., 2015. Meta-Analysis of the Reduction of Norovirus and Male-Specific Coliphage Concentrations in Wastewater Treatment Plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 4669–4681. <https://doi.org/10.1128/AEM.00509-15>
- Prasad, B.V., Hardy, M.E., Dokland, T., Bella, J., Rossmann, M.G., Estes, M.K., 1999. X-ray crystallographic structure of the Norwalk virus capsid. *Science* 286, 287–290. <https://doi.org/10.1126/science.286.5438.287>
- Prasad, B.V., Hardy, M.E., Jiang, X., Estes, M.K., 1996. Structure of Norwalk virus. *Arch. Virol. Suppl.* 12, 237–242. [https://doi.org/10.1007/978-3-7091-6553-9\\_25](https://doi.org/10.1007/978-3-7091-6553-9_25)
- Pu, J., Kazama, S., Miura, T., Azraini, N.D., Konta, Y., Ito, H., Ueki, Y., Cahyaningrum, E.E., Omura, T., Watanabe, T., 2016. Pyrosequencing Analysis of Norovirus Genogroup II Distribution in Sewage and Oysters: First Detection of GII.17 Kawasaki 2014 in Oysters. *Food Environ. Virol.* 8, 310–312. <https://doi.org/10.1007/s12560-016-9261-5>
- Rajko-Nenow, P., Keaveney, S., Flannery, J., McIntyre, K.M., Doré, W., 2014. Norovirus genotypes implicated in two oyster-related illness outbreaks in Ireland. *Epidemiol. Infect.* 142, 2096–2104. <https://doi.org/10.1017/S0950268813003014>
- Ramani, S., Cortes-Penfield, N.W., Hu, L., Crawford, S.E., Czako, R., Smith, D.F., Kang, G., Ramig, R.F., Le Pendu, J., Prasad, B.V.V., Estes, M.K., 2013. The VP8\* Domain of Neonatal Rotavirus Strain G10P[11] Binds to Type II Precursor Glycans. *J. Virol.* 87, 7255–7264. <https://doi.org/10.1128/JVI.03518-12>

- Ramani, S., Neill, F.H., Opekun, A.R., Gilger, M.A., Graham, D.Y., Estes, M.K., Atmar, R.L., 2015. Mucosal and Cellular Immune Responses to Norwalk Virus. *J. Infect. Dis.* 212, 397–405. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiv053>
- Rasmussen, L.D., Schultz, A.C., Uhrbrand, K., Jensen, T., Fischer, T.K., 2016. Molecular Evidence of Oysters as Vehicle of Norovirus GII.P17-GII.17. *Emerg. Infect. Dis.* 22, 2024–2025. <https://doi.org/10.3201/eid2211.161171>
- Reeder-Myers, L., Braje, T.J., Hofman, C.A., Elliott Smith, E.A., Garland, C.J., Grone, M., Hadden, C.S., Hatch, M., Hunt, T., Kelley, A., LeFebvre, M.J., Lockman, M., McKechnie, I., McNiven, I.J., Newsom, B., Pluckhahn, T., Sanchez, G., Schwadron, M., Smith, K.Y., Smith, T., Spiess, A., Tayac, G., Thompson, V.D., Vollman, T., Weitzel, E.M., Rick, T.C., 2022. Indigenous oyster fisheries persisted for millennia and should inform future management. *Nat. Commun.* 13, 2383. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-29818-z>
- Robel, I., Gebhardt, J., Mesters, J.R., Gorbalenya, A., Coutard, B., Canard, B., Hilgenfeld, R., Rohayem, J., 2008. Functional Characterization of the Cleavage Specificity of the Sapovirus Chymotrypsin-Like Protease. *J. Virol.* 82, 8085–8093. <https://doi.org/10.1128/JVI.00693-08>
- Robilotti, E., Deresinski, S., Pinsky, B.A., 2015. Norovirus. *Clin. Microbiol. Rev.* 28, 134–164. <https://doi.org/10.1128/CMR.00075-14>
- Rocha-Pereira, J., Jochmans, D., Neyts, J., 2015. Prophylactic treatment with the nucleoside analogue 2'-C-methylcytidine completely prevents transmission of norovirus. *J. Antimicrob. Chemother.* 70, 190–197. <https://doi.org/10.1093/jac/dku363>
- Rogawski McQuade, E.T., Liu, J., Kang, G., Kosek, M.N., Lima, A.A.M., Bessong, P.O., Samie, A., Haque, R., Mduma, E.R., Shrestha, S., Leite, J.P., Bodhidatta, L., Iqbal, N., Page, N., Kiwelu, I., Bhutta, Z., Ahmed, T., Houpt, E.R., Platts-Mills, J.A., 2020. Protection From Natural Immunity Against Enteric Infections and Etiology-Specific Diarrhea in a Longitudinal Birth Cohort. *J. Infect. Dis.* 222, 1858–1868. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiaa031>
- Rossouw, E., Brauer, M., Meyer, P., du Plessis, N.M., Avenant, T., Mans, J., 2021. Virus Etiology, Diversity and Clinical Characteristics in South African Children Hospitalised with Gastroenteritis. *Viruses* 13, 215. <https://doi.org/10.3390/v13020215>
- Rouhani, S., Peñataro Yori, P., Paredes Olortegui, M., Lima, A.A., Ahmed, T., Mduma, E.R., George, A., Samie, A., Svensen, E., Lima, I., Mondal, D., Mason, C.J., Kalam, A., Guerrant, R.L., Lang, D., Zaidi, A., Kang, G., Houpt, E., Kosek, M.N., for the Etiology, R.F., and Interactions of Enteric Infections and Malnutrition and the Consequences for Child Health (MAL-ED) Network Investigators, 2022. The Epidemiology of Sapovirus in the Etiology, Risk Factors, and Interactions of Enteric Infection and Malnutrition and the Consequences for Child Health and Development (MAL-ED) Study: Evidence of Protection Following Natural Infection. *Clin. Infect. Dis.* ciac165. <https://doi.org/10.1093/cid/ciac165>
- Rousset, S., Gauthier, M., Huynh, A., Mansuy, J.-M., 2018. Sapovirus-Associated Severe, Prolonged Diarrhoea in an Autologous Stem-Cell Transplant Patient: Case Report and Literature Review. *J. Emerg. Dis. Virol.* 4. <https://doi.org/10.16966/2473-1846.143>
- Royall, E., Doyle, N., Abdul-Wahab, A., Emmott, E., Morley, S.J., Goodfellow, I., Roberts, L.O., Locker, N., 2015. Murine Norovirus 1 (MNV1) Replication Induces Translational Control of the Host by Regulating eIF4E Activity during Infection. *J. Biol. Chem.* 290, 4748–4758. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.602649>
- Rupnik, A., Doré, W., Devilly, L., Fahy, J., Fitzpatrick, A., Schmidt, W., Hunt, K., Butler, F., Keaveney, S., 2021. Evaluation of Norovirus Reduction in Environmentally Contaminated Pacific Oysters During Laboratory Controlled and Commercial

- Depuration. *Food Environ. Virol.* 13, 229–240. <https://doi.org/10.1007/s12560-021-09464-2>
- Rupnik, A., Keaveney, S., Devilly, L., Butler, F., Doré, W., 2018. The Impact of Winter Relocation and Depuration on Norovirus Concentrations in Pacific Oysters Harvested from a Commercial Production Site. *Food Environ. Virol.* 10, 288–296. <https://doi.org/10.1007/s12560-018-9345-5>
- Ruvoën-Clouet, N., Belliot, G., Le Pendu, J., 2013. Noroviruses and histo-blood groups: the impact of common host genetic polymorphisms on virus transmission and evolution. *Rev. Med. Virol.* 23, 355–366. <https://doi.org/10.1002/rmv.1757>
- Ruvoën-Clouet, N., Ganière, J.P., André-Fontaine, G., Blanchard, D., Le Pendu, J., 2000. Binding of rabbit hemorrhagic disease virus to antigens of the ABH histo-blood group family. *J. Virol.* 74, 11950–11954. <https://doi.org/10.1128/jvi.74.24.11950-11954.2000>
- Sadowy, E., Miłner, M., Haenni, A.-L., 2001. Proteins attached to viral genomes are multifunctional, in: *Advances in Virus Research*. Academic Press, pp. 185–262. [https://doi.org/10.1016/S0065-3527\(01\)57004-9](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(01)57004-9)
- Saif, M.A., Bonney, D.K., Bigger, B., Forsythe, L., Williams, N., Page, J., Babiker, Z.O., Guiver, M., Turner, A.J., Hughes, S., Wynn, R.F., 2011. Chronic norovirus infection in pediatric hematopoietic stem cell transplant recipients: A cause of prolonged intestinal failure requiring intensive nutritional support. *Pediatr. Transplant.* 15, 505–509. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3046.2011.01500.x>
- Saito, M., Goel-Apaza, S., Espetia, S., Velasquez, D., Cabrera, L., Loli, S., Crabtree, J.E., Black, R.E., Kosek, M., Checkley, W., Zimic, M., Bern, C., Cama, V., Gilman, R.H., Norovirus Working Group in Peru, 2014. Multiple norovirus infections in a birth cohort in a Peruvian Periurban community. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 58, 483–491. <https://doi.org/10.1093/cid/cit763>
- Sakagami, A., Ueki, Y., Dapat, C., Saito, M., Oshitani, H., 2020. Genetic analysis of sapoviruses detected in outbreaks and sporadic cases of acute gastroenteritis in Miyagi Prefecture, Japan. *J. Clin. Virol.* 132, 104648. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2020.104648>
- Sánchez, G.J., Mayta, H., Pajuelo, M.J., Neira, K., Xiaofang, L., Cabrera, L., Ballard, S.B., Crabtree, J.E., Kelleher, D., Cama, V., Bern, C., Oshitani, H., Gilman, R.H., Saito, M., Sapovirus Working Group, 2018. Epidemiology of Sapovirus Infections in a Birth Cohort in Peru. *Clin. Infect. Dis.* 66, 1858–1863. <https://doi.org/10.1093/cid/cix1103>
- Sander, M., Oxlund, B., Jespersen, A., Krasnik, A., Mortensen, E.L., Westendorp, R.G.J., Rasmussen, L.J., 2015. The challenges of human population ageing. *Age Ageing* 44, 185–187. <https://doi.org/10.1093/ageing/afu189>
- Sano, D., Amarasiri, M., Hata, A., Watanabe, T., Katayama, H., 2016. Risk management of viral infectious diseases in wastewater reclamation and reuse: Review. *Environ. Int.* 91, 220–229. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.03.001>
- Sano, D., Pérez-Sautu, U., Guix, S., Pintó, R.M., Miura, T., Okabe, S., Bosch, A., 2011. Quantification and genotyping of human sapoviruses in the Llobregat river catchment, Spain. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 1111–1114. <https://doi.org/10.1128/AEM.01721-10>
- Santiana, M., Ghosh, S., Ho, B.A., Rajasekaran, V., Du, W.-L., Mutsafi, Y., De Jesús-Díaz, D.A., Sosnovtsev, S.V., Levenson, E.A., Parra, G.I., Takvorian, P.M., Cali, A., Bleck, C., Vlasova, A.N., Saif, L.J., Patton, J.T., Lopalco, P., Corcelli, A., Green, K.Y., Altan-Bonnet, N., 2018. Vesicle-cloaked virus clusters are optimal units for inter-organismal viral transmission. *Cell Host Microbe* 24, 208–220.e8. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.07.006>



- Sato, T., Stange, D.E., Ferrante, M., Vries, R.G.J., Van Es, J.H., Van den Brink, S., Van Houdt, W.J., Pronk, A., Van Gorp, J., Siersema, P.D., Clevers, H., 2011. Long-term expansion of epithelial organoids from human colon, adenoma, adenocarcinoma, and Barrett's epithelium. *Gastroenterology* 141, 1762–1772. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.07.050>
- Saxena, K., Blutt, S.E., Ettayebi, K., Zeng, X.-L., Broughman, J.R., Crawford, S.E., Karandikar, U.C., Sastri, N.P., Conner, M.E., Opekun, A.R., Graham, D.Y., Qureshi, W., Sherman, V., Foulke-Abel, J., In, J., Kovbasnjuk, O., Zochos, N.C., Donowitz, M., Estes, M.K., 2015. Human Intestinal Enteroids: a New Model To Study Human Rotavirus Infection, Host Restriction, and Pathophysiology. *J. Virol.* 90, 43–56. <https://doi.org/10.1128/JVI.01930-15>
- Schwab, K.J., Neill, F.H., Estes, M.K., Metcalf, T.G., Atmar, R.L., 1998. Distribution of Norwalk Virus within Shellfish Following Bioaccumulation and Subsequent Depuration by Detection Using RT-PCR. *J. Food Prot.* 61, 1674–1680. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-61.12.1674>
- Seitz, S.R., Leon, J.S., Schwab, K.J., Lyon, G.M., Dowd, M., McDaniels, M., Abdulhafid, G., Fernandez, M.L., Lindesmith, L.C., Baric, R.S., Moe, C.L., 2011. Norovirus Infectivity in Humans and Persistence in Water  $\nabla$ . *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 6884–6888. <https://doi.org/10.1128/AEM.05806-11>
- Shaffer, M., Huynh, K., Costantini, V., Bibby, K., Vinjé, J., 2022. Viable Norovirus Persistence in Water Microcosms. *Environ. Sci. Technol. Lett.* 9, 851–855. <https://doi.org/10.1021/acs.estlett.2c00553>
- Shamkhali Chenar, S., Deng, Z., 2017. Environmental indicators for human norovirus outbreaks. *Int. J. Environ. Health Res.* 27, 40–51. <https://doi.org/10.1080/09603123.2016.1257705>
- Shanker, S., Choi, J.-M., Sankaran, B., Atmar, R.L., Estes, M.K., Prasad, B.V.V., 2011. Structural Analysis of Histo-Blood Group Antigen Binding Specificity in a Norovirus GII.4 Epidemic Variant: Implications for Epochal Evolution. *J. Virol.* 85, 8635–8645. <https://doi.org/10.1128/JVI.00848-11>
- Sharp, T.M., Crawford, S.E., Ajami, N.J., Neill, F.H., Atmar, R.L., Katayama, K., Utama, B., Estes, M.K., 2012. Secretory pathway antagonism by calicivirus homologues of Norwalk virus nonstructural protein p22 is restricted to noroviruses. *Virology* 456, 181. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-9-181>
- Sharp, T.M., Guix, S., Katayama, K., Crawford, S.E., Estes, M.K., 2010. Inhibition of Cellular Protein Secretion by Norwalk Virus Nonstructural Protein p22 Requires a Mimic of an Endoplasmic Reticulum Export Signal. *PLoS ONE* 5, e13130. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013130>
- Shen, Q., Zhang, W., Yang, S., Yang, Z., Chen, Y., Cui, L., Zhu, J., Hua, X., 2012. Recombinant porcine norovirus identified from piglet with diarrhea. *BMC Vet. Res.* 8, 155. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-8-155>
- Shin, G.-A., Sobsey, M.D., 2008. Inactivation of norovirus by chlorine disinfection of water. *Water Res.* 42, 4562–4568. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2008.08.001>
- Shirato-Horikoshi, H., Ogawa, S., Wakita, T., Takeda, N., Hansman, G.S., 2007. Binding activity of norovirus and sapovirus to histo-blood group antigens. *Arch. Virol.* 152, 457–461. <https://doi.org/10.1007/s00705-006-0883-z>
- Shivanna, V., Kim, Y., Chang, K.-O., 2014. The crucial role of bile acids in the entry of porcine enteric calicivirus. *Virology* 456–457, 268–278. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2014.04.002>
- Siebenga, J.J., Beersma, M.F.C., Vennema, H., van Biezen, P., Hartwig, N.J., Koopmans, M., 2008. High Prevalence of Prolonged Norovirus Shedding and Illness among

- Hospitalized Patients: A Model for In Vivo Molecular Evolution. *J. Infect. Dis.* 198, 994–1001. <https://doi.org/10.1086/591627>
- Silva, A.K. da, Guyader, F.S.L., Saux, J.-C.L., Pommepuy, M., Montgomery, M.A., Elimelech, M., 2008. Norovirus Removal and Particle Association in a Waste Stabilization Pond. *Environ. Sci. Technol.* 42, 9151–9157. <https://doi.org/10.1021/es802787v>
- Sima, L.C., Schaeffer, J., Le Saux, J.-C., Parnaudeau, S., Elimelech, M., Le Guyader, F.S., 2011. Calicivirus Removal in a Membrane Bioreactor Wastewater Treatment Plant. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 5170–5177. <https://doi.org/10.1128/AEM.00583-11>
- Singh, B.K., Leuthold, M.M., Hansman, G.S., 2014. Human Noroviruses' Fondness for Histo-Blood Group Antigens. *J. Virol.* 89, 2024–2040. <https://doi.org/10.1128/JVI.02968-14>
- Smertina, E., Hall, R.N., Urakova, N., Strive, T., Frese, M., 2021. Calicivirus Non-structural Proteins: Potential Functions in Replication and Host Cell Manipulation. *Front. Microbiol.* 12, 712710. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.712710>
- Smertina, E., Urakova, N., Strive, T., Frese, M., 2019. Calicivirus RNA-Dependent RNA Polymerases: Evolution, Structure, Protein Dynamics, and Function. *Front. Microbiol.* 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01280>.
- Smith, A.W., Akers, T.G., Madin, S.H., Vedros, N.A., 1973. San Miguel sea lion virus isolation, preliminary characterization and relationship to vesicular exanthema of swine virus. *Nature* 244, 108–110. <https://doi.org/10.1038/244108a0>
- Smith, H.Q., Smith, T.J., 2019. The Dynamic Capsid Structures of the Noroviruses. *Viruses* 11, 235. <https://doi.org/10.3390/v11030235>
- Someya, Y., Takeda, N., Miyamura, T., 2005. Characterization of the norovirus 3C-like protease. *Virus Res.* 110, 91–97. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2005.02.002>
- Someya, Y., Takeda, N., Miyamura, T., 2002. Identification of Active-Site Amino Acid Residues in the Chiba Virus 3C-Like Protease. *J. Virol.* 76, 5949–5958. <https://doi.org/10.1128/JVI.76.12.5949-5958.2002>
- Song, K., Lin, X., Liu, Y., Ji, F., Zhang, L., Chen, P., Zhao, C., Song, Y., Tao, Z., Xu, A., 2021. Detection of Human Sapoviruses in Sewage in China by Next Generation Sequencing. *Food Environ. Virol.* 13, 270–280. <https://doi.org/10.1007/s12560-021-09469-x>
- Sosnovtsev, S.V., Belliot, G., Chang, K.-O., Onwudiwe, O., Green, K.Y., 2005. Feline Calicivirus VP2 Is Essential for the Production of Infectious Virions. *J. Virol.* 79, 4012–4024. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.7.4012-4024.2005>
- Sosnovtsev, S.V., Belliot, G., Chang, K.-O., Prikhodko, V.G., Thackray, L.B., Wobus, C.E., Karst, S.M., Virgin, H.W., Green, K.Y., 2006. Cleavage Map and Proteolytic Processing of the Murine Norovirus Nonstructural Polyprotein in Infected Cells. *J. Virol.* 80, 7816–7831. <https://doi.org/10.1128/JVI.00532-06>
- Sosnovtsev, S.V., Garfield, M., Green, K.Y., 2002. Processing Map and Essential Cleavage Sites of the Nonstructural Polyprotein Encoded by ORF1 of the Feline Calicivirus Genome. *J. Virol.* 76, 7060–7072. <https://doi.org/10.1128/JVI.76.14.7060-7072.2002>
- Spratt, H.C., Marks, M.I., Gomersall, M., Gill, P., Pai, C.H., 1978. Nosocomial infantile gastroenteritis associated with minirota virus and calicivirus. *J. Pediatr.* 93, 922–926. [https://doi.org/10.1016/S0022-3476\(78\)81212-8](https://doi.org/10.1016/S0022-3476(78)81212-8)
- Stechele, B., Maar, M., Wijsman, J., Van der Zande, D., Degraer, S., Bossier, P., Nevejan, N., 2022. Comparing life history traits and tolerance to changing environments of two oyster species (*Ostrea edulis* and *Crassostrea gigas*) through Dynamic Energy Budget theory. *Conserv. Physiol.* 10, coac034. <https://doi.org/10.1093/conphys/coac034>

- Straub, T.M., Bartholomew, R.A., Valdez, C.O., Valentine, N.B., Dohnalkova, A., Ozanich, R.M., Bruckner-Lea, C.J., Call, D.R., 2011. Human Norovirus Infection of Caco-2 Cells Grown as a 3-Dimensional Tissue Structure. *J. Water Health* 9, 225–240.
- Straub, T.M., Höner zu Bentrup, K., Coghlan, P.O., Dohnalkova, A., Mayer, B.K., Bartholomew, R.A., Valdez, C.O., Bruckner-Lea, C.J., Gerba, C.P., Abbaszadegan, M.A., Nickerson, C.A., 2007. In Vitro Cell Culture Infectivity Assay for Human Noroviruses. *Emerg. Infect. Dis.* 13, 396–403. <https://doi.org/10.3201/eid1303.060549>
- Strive, T., Wright, J., Kovaliski, J., Botti, G., Capucci, L., 2010. The non-pathogenic Australian lagovirus RCV-A1 causes a prolonged infection and elicits partial cross-protection to rabbit haemorrhagic disease virus. *Virology* 398, 125–134. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2009.11.045>
- Strtak, A.C., Perry, J.L., Sharp, M.N., Chang-Graham, A.L., Farkas, T., Hyser, J.M., 2019. Recovirus NS1-2 Has Viroporin Activity That Induces Aberrant Cellular Calcium Signaling To Facilitate Virus Replication. *mSphere* 4, e00506-19. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00506-19>
- Su, L., Ma, L., Liu, H., Zhao, F., Su, Z., Zhou, D., 2018. Presence and Distribution of Histo-Blood Group Antigens in Pacific Oysters and the Effects of Exposure to Noroviruses GI.3 and GII.4 on Their Expression. *J. Food Prot.* 81, 1783–1790. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-18-074>
- Sukhrie, F.H.A., Siebenga, J.J., Beersma, M.F.C., Koopmans, M., 2010. Chronic Sheddors as Reservoir for Nosocomial Transmission of Norovirus. *J. Clin. Microbiol.* 48, 4303–4305. <https://doi.org/10.1128/JCM.01308-10>
- Svraka, S., Vennema, H., Veer, B. van der, Hedlund, K.-O., Thorhagen, M., Siebenga, J., Duizer, E., Koopmans, M., 2010. Epidemiology and Genotype Analysis of Emerging Sapovirus-Associated Infections across Europe. *J. Clin. Microbiol.* 48, 2191–2198. <https://doi.org/10.1128/JCM.02427-09>
- Takagi, H., Oka, T., Shimoike, T., Saito, H., Kobayashi, T., Takahashi, T., Tatsumi, C., Kataoka, M., Wang, Q., Saif, L.J., Noda, M., 2020. Human sapovirus propagation in human cell lines supplemented with bile acids. *Proc. Natl. Acad. Sci.* <https://doi.org/10.1073/pnas.2007310117>
- Takanashi, S., Saif, L.J., Hughes, J.H., Meulia, T., Jung, K., Scheuer, K.A., Wang, Q., 2014. Failure of propagation of human norovirus in intestinal epithelial cells with microvilli grown in three-dimensional cultures. *Arch. Virol.* 159, 257–266. <https://doi.org/10.1007/s00705-013-1806-4>
- Tan, M., Huang, P., Meller, J., Zhong, W., Farkas, T., Jiang, X., 2003. Mutations within the P2 Domain of Norovirus Capsid Affect Binding to Human Histo-Blood Group Antigens: Evidence for a Binding Pocket. *J. Virol.* 77, 12562–12571. <https://doi.org/10.1128/JVI.77.23.12562-12571.2003>
- Tan, M., Xia, M., Chen, Y., Bu, W., Hegde, R.S., Meller, J., Li, X., Jiang, X., 2009. Conservation of Carbohydrate Binding Interfaces — Evidence of Human HBGA Selection in Norovirus Evolution. *PLOS ONE* 4, e5058. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005058>
- Taube, S., Kolawole, A.O., Höhne, M., Wilkinson, J.E., Handley, S.A., Perry, J.W., Thackray, L.B., Akkina, R., Wobus, C.E., 2013. A Mouse Model for Human Norovirus. *mBio* 4, e00450-13. <https://doi.org/10.1128/mBio.00450-13>
- Taube, S., Perry, J.W., Yetming, K., Patel, S.P., Auble, H., Shu, L., Nawar, H.F., Lee, C.H., Connell, T.D., Shayman, J.A., Wobus, C.E., 2009. Ganglioside-linked terminal sialic acid moieties on murine macrophages function as attachment receptors for murine noroviruses. *J. Virol.* 83, 4092–4101. <https://doi.org/10.1128/JVI.02245-08>

- Tenge, V.R., Hu, L., Prasad, B.V.V., Larson, G., Atmar, R.L., Estes, M.K., Ramani, S., 2021. Glycan Recognition in Human Norovirus Infections. *Viruses* 13, 2066. <https://doi.org/10.3390/v13102066>
- Terashima, H., Chiba, S., Sakuma, Y., Kogasaka, R., Nakata, S., Minami, R., Horino, K., Nakao, T., 1983. The polypeptide of a human calicivirus. *Arch. Virol.* 78, 1–7. <https://doi.org/10.1007/BF01310853>
- Teterina, N.L., Pinto, Y., Weaver, J.D., Jensen, K.S., Ehrenfeld, E., 2011. Analysis of Poliovirus Protein 3A Interactions with Viral and Cellular Proteins in Infected Cells ▽. *J. Virol.* 85, 4284–4296. <https://doi.org/10.1128/JVI.02398-10>
- Teunis, P.F.M., Le Guyader, F.S., Liu, P., Ollivier, J., Moe, C.L., 2020. Noroviruses are highly infectious but there is strong variation in host susceptibility and virus pathogenicity. *Epidemics* 32, 100401. <https://doi.org/10.1016/j.epidem.2020.100401>
- Teunis, P.F.M., Sukhrie, F.H.A., Vennema, H., Bogerman, J., Beersma, M.F.C., Koopmans, M.P., 2015. Shedding of norovirus in symptomatic and asymptomatic infections. *Epidemiol. Infect.* 143, 1710–1717. <https://doi.org/10.1017/S095026881400274X>
- Tian, P., Bates, A. h., Jensen, H. m., Mandrell, R. e., 2006. Norovirus binds to blood group A-like antigens in oyster gastrointestinal cells. *Lett. Appl. Microbiol.* 43, 645–651. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2006.02010.x>
- Tian, P., Engelbrektson, A.L., Jiang, X., Zhong, W., Mandrell, R.E., 2007. Norovirus recognizes histo-blood group antigens on gastrointestinal cells of clams, mussels, and oysters: a possible mechanism of bioaccumulation. *J. Food Prot.* 70, 2140–2147. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-70.9.2140>
- Tian, P., Engelbrektson, A.L., Mandrell, R., 2008. Seasonal Tracking of Histo-Blood Group Antigen Expression and Norovirus Binding in Oyster Gastrointestinal Cells. *J. Food Prot.* 71, 1696–1700. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-71.8.1696>
- Tinker, R.J., da Costa, A.C., Tahmasebi, R., Milagres, F.A. de P., dos Santos Morais, V., Pandey, R.P., José-Abrego, A., Brustulin, R., Rodrigues Teles, M. da A., Cunha, M.S., Araújo, E.L.L., Gómez, M.M., Deng, X., Delwart, E., Sabino, E.C., Leal, E., Luchs, A., 2021. Norovirus strains in patients with acute gastroenteritis in rural and low-income urban areas in northern Brazil. *Arch. Virol.* 166, 905–913. <https://doi.org/10.1007/s00705-020-04944-5>
- Tohma, K., Kulka, M., Coughlan, S., Green, K.Y., Parra, G.I., 2020. Genomic Analyses of Human Sapoviruses Detected over a 40-Year Period Reveal Disparate Patterns of Evolution among Genotypes and Genome Regions. *Viruses* 12. <https://doi.org/10.3390/v12050516>
- Tohma, K., Lepore, C.J., Gao, Y., Ford-Siltz, L.A., Parra, G.I., 2019. Population Genomics of GII.4 Noroviruses Reveal Complex Diversification and New Antigenic Sites Involved in the Emergence of Pandemic Strains. *mBio* 10. <https://doi.org/10.1128/mBio.02202-19>
- Tohma, K., Saito, M., Pajuelo, M.J., Mayta, H., Zimic, M., Lepore, C.J., Ford-Siltz, L.A., Gilman, R.H., Parra, G.I., 2021. Viral intra-host evolution in immunocompetent children contributes to human norovirus diversification at the global scale. *Emerg. Microbes Infect.* 10, 1717–1730. <https://doi.org/10.1080/22221751.2021.1967706>
- Toldrà, A., Andree, K.B., Bertomeu, E., Roque, A., Carrasco, N., Gairín, I., Furones, M.D., Campàs, M., 2018. Rapid capture and detection of ostreid herpesvirus-1 from Pacific oyster *Crassostrea gigas* and seawater using magnetic beads. *PLoS ONE* 13, e0205207. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205207>
- Troeger, H., Lodenkemper, C., Schneider, T., Schreier, E., Epple, H.-J., Zeitz, M., Fromm, M., Schulzke, J.-D., 2009. Structural and functional changes of the duodenum in

- human norovirus infection. *Gut* 58, 1070–1077.  
<https://doi.org/10.1136/gut.2008.160150>
- Tse, H., Chan, W.-M., Li, K.S.M., Lau, S.K.P., Woo, P.C.Y., Yuen, K.-Y., 2012. Discovery and Genomic Characterization of a Novel Bat Sapovirus with Unusual Genomic Features and Phylogenetic Position. *PLoS ONE* 7.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034987>
- Tu, H., Gao, L., Shi, S.T., Taylor, D.R., Yang, T., Mircheff, A.K., Wen, Y., Gorbalenya, A.E., Hwang, S.B., Lai, M.M., 1999. Hepatitis C virus RNA polymerase and NS5A complex with a SNARE-like protein. *Virology* 263, 30–41.  
<https://doi.org/10.1006/viro.1999.9893>
- Ueki, Y., Sano, D., Watanabe, T., Akiyama, K., Omura, T., 2005. Norovirus pathway in water environment estimated by genetic analysis of strains from patients of gastroenteritis, sewage, treated wastewater, river water and oysters. *Water Res.* 39, 4271–4280.  
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2005.06.035>
- Ueki, Y., Shoji, M., Okimura, Y., Miyota, Y., Masago, Y., Oka, T., Katayama, K., Takeda, N., Noda, M., Miura, T., Sano, D., Omura, T., 2010. Detection of Sapovirus in oysters. *Microbiol. Immunol.* 54, 483–486. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2010.00239.x>
- Usuku, S., Kumazaki, M., Kitamura, K., Tochikubo, O., Noguchi, Y., 2008. An outbreak of food-borne gastroenteritis due to sapovirus among junior high school students. *Jpn. J. Infect. Dis.* 61, 438–441. <https://doi.org/10.7883/yoken.JJID.2008.438>
- Utsumi, T., Lusida, M.I., Dinana, Z., Wahyuni, R.M., Soegijanto, S., Soetjipto, Athiyyah, A.F., Sudarmo, S.M., Ranuh, R.G., Darma, A., Juniastuti, Yamani, L.N., Doan, Y.H., Shimizu, H., Ishii, K., Matsui, C., Deng, L., Abe, T., Katayama, K., Shoji, I., 2021. Molecular epidemiology and genetic diversity of norovirus infection in children hospitalized with acute gastroenteritis in East Java, Indonesia in 2015–2019. *Infect. Genet. Evol.* 88, 104703. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104703>
- Valcarce, M.D., Kambhampati, A.K., Calderwood, L.E., Hall, A.J., Mirza, S.A., Vinjé, J., 2021. Global distribution of sporadic sapovirus infections: A systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE* 16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0255436>
- van Beek, J., de Graaf, M., Al-Hello, H., Allen, D.J., Ambert-Balay, K., Botteldoorn, N., Brytting, M., Buesa, J., Cabrerizo, M., Chan, M., Cloak, F., Di Bartolo, I., Guix, S., Hewitt, J., Iritani, N., Jin, M., Johne, R., Lederer, I., Mans, J., Martella, V., Maunula, L., McAllister, G., Niendorf, S., Niesters, H.G., Podkolzin, A.T., Poljsak-Prijatelj, M., Rasmussen, L.D., Reuter, G., Tuite, G., Kroneman, A., Vennema, H., Koopmans, M.P.G., 2018. Molecular surveillance of norovirus, 2005–16: an epidemiological analysis of data collected from the NoroNet network. *Lancet Infect. Dis.* 18, 545–553.  
[https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(18\)30059-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30059-8)
- Van Dycke, J., Cuvry, A., Knickmann, J., Ny, A., Rakers, S., Taube, S., de Witte, P., Neyts, J., Rocha-Pereira, J., 2021. Infection of zebrafish larvae with human norovirus and evaluation of the in vivo efficacy of small-molecule inhibitors. *Nat. Protoc.* 16, 1830–1849. <https://doi.org/10.1038/s41596-021-00499-0>
- Varela, M.F., Ouardani, I., Kato, T., Kadoya, S., Aouni, M., Sano, D., Romalde, J.L., 2018. Sapovirus in Wastewater Treatment Plants in Tunisia: Prevalence, Removal, and Genetic Characterization. *Appl. Environ. Microbiol.* 84, e02093-17.  
<https://doi.org/10.1128/AEM.02093-17>
- Varela, M.F., Polo, D., Romalde, J.L., 2016. Prevalence and Genetic Diversity of Human Sapoviruses in Shellfish from Commercial Production Areas in Galicia, Spain. *Appl. Environ. Microbiol.* 82, 1167–1172. <https://doi.org/10.1128/AEM.02578-15>

- Varela, M.F., Rivadulla, E., Lema, A., Romalde, J.L., 2019. Human Sapovirus among Outpatients with Acute Gastroenteritis in Spain: A One-Year Study. *Viruses* 11, 144. <https://doi.org/10.3390/v11020144>
- Vasickova, P., Pavlik, I., Verani, M., Carducci, A., 2010. Issues Concerning Survival of Viruses on Surfaces. *Food Environ. Virol.* 2, 24–34. <https://doi.org/10.1007/s12560-010-9025-6>
- Vielot, N.A., François, R., Huseynova, E., González, F., Reyes, Y., Gutierrez, L., Nordgren, J., Toval-Ruiz, C., Vilchez, S., Vinjé, J., Becker-Dreps, S., Bucardo, F., 2022. Association between breastfeeding, host genetic factors, and calicivirus gastroenteritis in a Nicaraguan birth cohort. *PLoS ONE* 17, e0267689. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0267689>
- Vigot, A., 1904. Huîtres et fièvre typhoïde. H. Delesques.
- Villabruna, N., Izquierdo-Lara, R.W., Schapendonk, C.M.E., de Bruin, E., Chandler, F., Thao, T.T.N., Westerhuis, B.M., van Beek, J., Sigfrid, L., Giaquinto, C., Goossens, H., Bielicki, J.A., Kohns Vasconcelos, M., Fraaij, P.L.A., Koopmans, M.P.G., de Graaf, M., 2022. Profiling of humoral immune responses to norovirus in children across Europe. *Sci. Rep.* 12, 14275. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-18383-6>
- Villabruna, N., Koopmans, M.P.G., de Graaf, M., 2019. Animals as Reservoir for Human Norovirus. *Viruses* 11, 478. <https://doi.org/10.3390/v11050478>
- Villabruna, N., Schapendonk, C., Aron, G.I., Koopmans, M.P.G., de Graaf, M., 2020. Human noroviruses attach to intestinal tissue of a broad range of animal species. *J. Virol.* JVI.01492-20, jvi;JVI.01492-20v1. <https://doi.org/10.1128/JVI.01492-20>
- Vogeler, S., Bean, T.P., Lyons, B.P., Galloway, T.S., 2016. Dynamics of nuclear receptor gene expression during Pacific oyster development. *BMC Dev. Biol.* 16, 33. <https://doi.org/10.1186/s12861-016-0129-6>
- Vongpunsawad, S., Venkataram Prasad, B.V., Estes, M.K., 2013. Norwalk Virus Minor Capsid Protein VP2 Associates within the VP1 Shell Domain. *J. Virol.* 87, 4818–4825. <https://doi.org/10.1128/JVI.03508-12>
- Wang, D., Wu, Q., Kou, X., Yao, L., Zhang, J., 2008. Distribution of norovirus in oyster tissues. *J. Appl. Microbiol.* 105, 1966–1972. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.03970.x>
- Wang, H., Naghavi, M., Allen, C., Barber, R.M., Bhutta, Z.A., Carter, A., Casey, D.C., Charlson, F.J., Chen, A.Z., Coates, M.M., Coggeshall, M., Dandona, L., Dicker, D.J., Erskine, H.E., Ferrari, A.J., Fitzmaurice, C., Foreman, K., Forouzanfar, M.H., Fraser, M.S., Fullman, N., Gething, P.W., Goldberg, E.M., Graetz, N., Haagsma, J.A., Hay, S.I., Huynh, C., Johnson, C.O., Kassebaum, N.J., Kinfu, Y., Kulikoff, X.R., Kutz, M., Kyu, H.H., Larson, H.J., Leung, J., Liang, X., Lim, S.S., Lind, M., Lozano, R., Marquez, N., Mensah, G.A., Mikesell, J., Mokdad, A.H., Mooney, M.D., Nguyen, G., Nsoesie, E., Pigott, D.M., Pinho, C., Roth, G.A., Salomon, J.A., Sandar, L., Silpakit, N., Sligar, A., Sorensen, R.J.D., Stanaway, J., Steiner, C., Teple, S., Thomas, B.A., Troeger, C., VanderZanden, A., Vollset, S.E., Wanga, V., Whiteford, H.A., Wolock, T., Zoeckler, L., Abate, K.H., Abbafati, C., Abbas, K.M., Abd-Allah, F., Abera, S.F., Abreu, D.M.X., Abu-Raddad, L.J., Abyu, G.Y., Achoki, T., Adelekan, A.L., Ademi, Z., Adou, A.K., Adsuar, J.C., Afanvi, K.A., Afshin, A., Agardh, E.E., Agarwal, A., Agrawal, A., Kiadaliri, A.A., Ajala, O.N., Akanda, A.S., Akinyemi, R.O., Akinyemiju, T.F., Akseer, N., Lami, F.H.A., Alabed, S., Al-Aly, Z., Alam, K., Alam, N.K.M., Alasfoor, D., Aldhahri, S.F., Aldridge, R.W., Alegretti, M.A., Aleman, A.V., Alemu, Z.A., Alexander, L.T., Alhabib, S., Ali, R., Alkerwi, A., Alla, F., Allebeck, P., Al-Raddadi, R., Alsharif, U., Altirkawi, K.A., Martin, E.A., Alvis-Guzman, N., Amare, A.T., Amegah, A.K., Ameh, E.A., Amini, H., Ammar, W., Amrock, S.M.,

Andersen, H.H., Anderson, B.O., Anderson, G.M., Antonio, C.A.T., Aregay, A.F., Ärnlov, J., Arsenijevic, V.S.A., Artaman, A., Asayesh, H., Asghar, R.J., Atique, S., Avokpaho, E.F.G.A., Awasthi, A., Azzopardi, P., Bacha, U., Badawi, A., Bahit, M.C., Balakrishnan, K., Banerjee, A., Barac, A., Barker-Collo, S.L., Bärnighausen, T., Barregard, L., Barrero, L.H., Basu, A., Basu, S., Bayou, Y.T., Bazargan-Hejazi, S., Beardsley, J., Bedi, N., Beghi, E., Belay, H.A., Bell, B., Bell, M.L., Bello, A.K., Bennett, D.A., Bensenor, I.M., Berhane, A., Bernabé, E., Betsu, B.D., Beyene, A.S., Bhala, N., Bhalla, A., Biadgilign, S., Bikbov, B., Abdulhak, A.A.B., Biroscak, B.J., Biryukov, S., Bjertness, E., Blore, J.D., Blosser, C.D., Bohensky, M.A., Borschmann, R., Bose, D., Bourne, R.R.A., Brainin, M., Brayne, C.E.G., Brazinova, A., Breitborde, N.J.K., Brenner, H., Brewer, J.D., Brown, A., Brown, J., Brugha, T.S., Buckle, G.C., Butt, Z.A., Calabria, B., Campos-Nonato, I.R., Campuzano, J.C., Carapetis, J.R., Cárdenas, R., Carpenter, D.O., Carrero, J.J., Castañeda-Orjuela, C.A., Rivas, J.C., Catalá-López, F., Cavalleri, F., Cercy, K., Cerda, J., Chen, W., Chew, A., Chiang, P.P.-C., Chibalabala, M., Chibueze, C.E., Chimed-Ochir, O., Chisumpa, V.H., Choi, J.-Y.J., Chowdhury, R., Christensen, H., Christopher, D.J., Ciobanu, L.G., Cirillo, M., Cohen, A.J., Colistro, V., Colomar, M., Colquhoun, S.M., Cooper, C., Cooper, L.T., Cortinovis, M., Cowie, B.C., Crump, J.A., Damsere-Derry, J., Danawi, H., Dandona, R., Daoud, F., Darby, S.C., Dargan, P.I., Neves, J. das, Davey, G., Davis, A.C., Davitoiu, D.V., Castro, E.F. de, Jager, P. de, Leo, D.D., Degenhardt, L., Dellavalle, R.P., Deribe, K., Deribew, A., Dharmaratne, S.D., Dhillon, P.K., Diaz-Torné, C., Ding, E.L., Santos, K.P.B. dos, Dossou, E., Driscoll, T.R., Duan, L., Dubey, M., Duncan, B.B., Ellenbogen, R.G., Ellingsen, C.L., Elyazar, I., Endries, A.Y., Ermakov, S.P., Eshrati, B., Esteghamati, A., Estep, K., Faghmous, I.D.A., Fahimi, S., Faraon, E.J.A., Farid, T.A., Farinha, C.S. e S., Faro, A., Farvid, M.S., Farzadfar, F., Feigin, V.L., Fereshtehnejad, S.-M., Fernandes, J.G., Fernandes, J.C., Fischer, F., Fitchett, J.R.A., Flaxman, A., Foigt, N., Fowkes, F.G.R., Franca, E.B., Franklin, R.C., Friedman, J., Frostad, J., Fürst, T., Futran, N.D., Gall, S.L., Gambashidze, K., Gamkrelidze, A., Ganguly, P., Gankpé, F.G., Gebre, T., Gebrehiwot, T.T., Gebremedhin, A.T., Gebru, A.A., Geleijnse, J.M., Gessner, B.D., Ghoshal, A.G., Gibney, K.B., Gillum, R.F., Gilmour, S., Giref, A.Z., Giroud, M., Gishu, M.D., Giussani, G., Glaser, E., Godwin, W.W., Gomez-Dantes, H., Gona, P., Goodridge, A., Gopalani, S.V., Gosselin, R.A., Gotay, C.C., Goto, A., Gouda, H.N., Greaves, F., Gugnani, H.C., Gupta, Rahul, Gupta, Rajeev, Gupta, V., Gutiérrez, R.A., Hafezi-Nejad, N., Haile, D., Hailu, A.D., Hailu, G.B., Halasa, Y.A., Hamadeh, R.R., Hamidi, S., Hancock, J., Handal, A.J., Hankey, G.J., Hao, Y., Harb, H.L., Harikrishnan, S., Haro, J.M., Havmoeller, R., Heckbert, S.R., Heredia-Pi, I.B., Heydarpour, P., Hilderink, H.B.M., Hoek, H.W., Hogg, R.S., Horino, M., Horita, N., Hosgood, H.D., Hotez, P.J., Hoy, D.G., Hsairi, M., Htet, A.S., Htike, M.M.T., Hu, G., Huang, C., Huang, H., Huiart, L., Husseini, A., Huybrechts, I., Huynh, G., Iburg, K.M., Innos, K., Inoue, M., Iyer, V.J., Jacobs, T.A., Jacobsen, K.H., Jahanmehr, N., Jakovljevic, M.B., James, P., Javanbakht, M., Jayaraman, S.P., Jayatilleke, A.U., Jeemon, P., Jensen, P.N., Jha, V., Jiang, G., Jiang, Y., Jibat, T., Jimenez-Corona, A., Jonas, J.B., Joshi, T.K., Kabir, Z., Kamal, R., Kan, H., Kant, S., Karch, A., Karema, C.K., Karimkhani, C., Karletsos, D., Karthikeyan, G., Kasaeian, A., Katibeh, M., Kaul, A., Kawakami, N., Kayibanda, J.F., Keiyoro, P.N., Kemmer, L., Kemp, A.H., Kengne, A.P., Keren, A., Kereselidze, M., Kesavachandran, C.N., Khader, Y.S., Khalil, I.A., Khan, A.R., Khan, E.A., Khang, Y.-H., Khera, S., Khoja, T.A.M., Kielsing, C., Kim, D., Kim, Y.J., Kissela, B.M., Kisson, N., Knibbs, L.D., Knudsen, A.K., Kokubo, Y., Kolte, D., Kopec, J.A., Kosen, S., Koul, P.A., Koyanagi, A., Krog, N.H., Defo, B.K., Bicer,

B.K., Kudom, A.A., Kuipers, E.J., Kulkarni, V.S., Kumar, G.A., Kwan, G.F., Lal, A., Lal, D.K., Lalloo, R., Lallukka, T., Lam, H., Lam, J.O., Langan, S.M., Lansingh, V.C., Larsson, A., Laryea, D.O., Latif, A.A., Lawrynnowicz, A.E.B., Leigh, J., Levi, M., Li, Y., Lindsay, M.P., Lipshultz, S.E., Liu, P.Y., Liu, S., Liu, Y., Lo, L.-T., Logroscino, G., Lotufo, P.A., Lucas, R.M., Lunevicius, R., Lyons, R.A., Ma, S., Machado, V.M.P., Mackay, M.T., MacLachlan, J.H., Razek, H.M.A.E., Magdy, M., Razek, A.E., Majdan, M., Majeed, A., Malekzadeh, R., Manamo, W.A.A., Mandisarisa, J., Mangalam, S., Mapoma, C.C., Marcenes, W., Margolis, D.J., Martin, G.R., Martinez-Raga, J., Marzan, M.B., Masiye, F., Mason-Jones, A.J., Massano, J., Matzopoulos, R., Mayosi, B.M., McGarvey, S.T., McGrath, J.J., McKee, M., McMahon, B.J., Meaney, P.A., Mehari, A., Mehndiratta, M.M., Mejia-Rodriguez, F., Mekonnen, A.B., Melaku, Y.A., Memiah, P., Memish, Z.A., Mendoza, W., Meretoja, A., Meretoja, T.J., Mhimbira, F.A., Micha, R., Milliar, A., Miller, T.R., Mirarefin, M., Misganaw, A., Mock, C.N., Mohammad, K.A., Mohammadi, A., Mohammed, S., Mohan, V., Mola, G.L.D., Monasta, L., Hernandez, J.C.M., Montero, P., Montico, M., Montine, T.J., Moradi-Lakeh, M., Morawska, L., Morgan, K., Mori, R., Mozaffarian, D., Mueller, U.O., Murthy, G.V.S., Murthy, S., Musa, K.I., Nachega, J.B., Nagel, G., Naidoo, K.S., Naik, N., Naldi, L., Nangia, V., Nash, D., Nejjari, C., Neupane, S., Newton, C.R., Newton, J.N., Ng, M., Ngalesoni, F.N., Ngirabega, J. de D., Nguyen, Q.L., Nisar, M.I., Pete, P.M.N., Nomura, M., Norheim, O.F., Norman, P.E., Norrving, B., Nyakarahuka, L., Ogbo, F.A., Ohkubo, T., Ojelabi, F.A., Olivares, P.R., Olusanya, B.O., Olusanya, J.O., Opio, J.N., Oren, E., Ortiz, A., Osman, M., Ota, E., Ozdemir, R., Pa, M., Pain, A., Pandian, J.D., Pant, P.R., Papachristou, C., Park, E.-K., Park, J.-H., Parry, C.D., Parsaeian, M., Caicedo, A.J.P., Patten, S.B., Patton, G.C., Paul, V.K., Pearce, N., Pedro, J.M., Stokic, L.P., Pereira, D.M., Perico, N., Pesudovs, K., Petzold, M., Phillips, M.R., Piel, F.B., Pillay, J.D., Plass, D., Platts-Mills, J.A., Polinder, S., Pope, C.A., Popova, S., Poulton, R.G., Pourmalek, F., Prabhakaran, D., Qorbani, M., Quame-Amaglo, J., Quistberg, D.A., Rafay, A., Rahimi, K., Rahimi-Movaghar, V., Rahman, M., Rahman, M.H.U., Rahman, S.U., Rai, R.K., Rajavi, Z., Rajsic, S., Raju, M., Rakovac, I., Rana, S.M., Ranabhat, C.L., Rangaswamy, T., Rao, P., Rao, S.R., Refaat, A.H., Rehm, J., Reitsma, M.B., Remuzzi, G., Resnikoff, S., Ribeiro, A.L., Ricci, S., Blancas, M.J.R., Roberts, B., Roca, A., Rojas-Rueda, D., Ronfani, L., Roshandel, G., Rothenbacher, D., Roy, A., Roy, N.K., Ruhago, G.M., Sagar, R., Saha, S., Sahathevan, R., Saleh, M.M., Sanabria, J.R., Sanchez-Niño, M.D., Sanchez-Riera, L., Santos, I.S., Sarmiento-Suarez, R., Sartorius, B., Satpathy, M., Savic, M., Sawhney, M., Schaub, M.P., Schmidt, M.I., Schneider, I.J.C., Schöttker, B., Schutte, A.E., Schwebel, D.C., Seedat, S., Sepanlou, S.G., Servan-Mori, E.E., Shackelford, K.A., Shaddick, G., Shaheen, A., Shahraz, S., Shaikh, M.A., Shakh-Nazarova, M., Sharma, R., She, J., Sheikhabaei, S., Shen, J., Shen, Z., Shepard, D.S., Sheth, K.N., Shetty, B.P., Shi, P., Shibuya, K., Shin, M.-J., Shiri, R., Shiue, I., Shrimme, M.G., Sigfusdottir, I.D., Silberberg, D.H., Silva, D.A.S., Silveira, D.G.A., Silverberg, J.I., Simard, E.P., Singh, A., Singh, G.M., Singh, J.A., Singh, O.P., Singh, P.K., Singh, V., Soneji, S., Søreide, K., Soriano, J.B., Sposato, L.A., Sreeramareddy, C.T., Stathopoulou, V., Stein, D.J., Stein, M.B., Stranges, S., Stroumpoulis, K., Sunguya, B.F., Sur, P., Swaminathan, S., Sykes, B.L., Szoeki, C.E.I., Tabarés-Seisdedos, R., Tabb, K.M., Takahashi, K., Takala, J.S., Talongwa, R.T., Tandon, N., Tavakkoli, M., Taye, B., Taylor, H.R., Ao, B.J.T., Tedla, B.A., Tefera, W.M., Have, M.T., Terkawi, A.S., Tesfay, F.H., Tessema, G.A., Thomson, A.J., Thorne-Lyman, A.L., Thrift, A.G., Thurston, G.D., Tillmann, T., Tirschwell, D.L., Tonelli, M., Topor-Madry, R., Topouzis, F., Towbin, J.A., Traebert, J., Tran, B.X., Truelsen, T., Trujillo, U., Tura,



- A.K., Tuzcu, E.M., Uchendu, U.S., Ukwaja, K.N., Undurraga, E.A., Uthman, O.A., Dingenen, R.V., Donkelaar, A. van, Vasankari, T., Vasconcelos, A.M.N., Venketasubramanian, N., Vidavalur, R., Vijayakumar, L., Villalpando, S., Violante, F.S., Vlassov, V.V., Wagner, J.A., Wagner, G.R., Wallin, M.T., Wang, L., Watkins, D.A., Weichenthal, S., Weiderpass, E., Weintraub, R.G., Werdecker, A., Westerman, R., White, R.A., Wijeratne, T., Wilkinson, J.D., Williams, H.C., Wiysonge, C.S., Woldeyohannes, S.M., Wolfe, C.D.A., Won, S., Wong, J.Q., Woolf, A.D., Xavier, D., Xiao, Q., Xu, G., Yakob, B., Yalew, A.Z., Yan, L.L., Yano, Y., Yaseri, M., Ye, P., Yebyo, H.G., Yip, P., Yirsaw, B.D., Yonemoto, N., Yonga, G., Younis, M.Z., Yu, S., Zaidi, Z., Zaki, M.E.S., Zannad, F., Zavala, D.E., Zeeb, H., Zeleke, B.M., Zhang, H., Zodpey, S., Zonies, D., Zuhlke, L.J., Vos, T., Lopez, A.D., Murray, C.J.L., 2016. Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *The Lancet* 388, 1459–1544. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)31012-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)31012-1)
- Wang, L., Wang, X., Chen, H., Wang, Z., Jia, X., 2022. Oyster arsenic, cadmium, copper, mercury, lead and zinc levels in the northern South China Sea: long-term spatiotemporal distributions, combined effects, and risk assessment to human health. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 29, 12706–12719. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-18150-6>
- Wang, Q., Zhang, Z., Saif, L.J., 2012. Stability of and Attachment to Lettuce by a Culturable Porcine Sapovirus Surrogate for Human Caliciviruses. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 3932–3940. <https://doi.org/10.1128/AEM.06600-11>
- Wang, X., Xu, F., Liu, J., Gao, B., Liu, Y., Zhai, Y., Ma, J., Zhang, K., Baker, T.S., Schulten, K., Zheng, D., Pang, H., Sun, F., 2013. Atomic Model of Rabbit Hemorrhagic Disease Virus by Cryo-Electron Microscopy and Crystallography. *PLOS Pathog.* 9, e1003132. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003132>
- Wawrzakiewicz, J., Smale, C.J., Brown, F., 1968. Biochemical and biophysical characteristics of vesicular exanthema virus and the viral ribonucleic acid. *Arch. Gesamte Virusforsch.* 25, 337–351. <https://doi.org/10.1007/BF01556562>
- Wegener, H., Mallagaray, Á., Schöne, T., Peters, T., Lockhauserbäumer, J., Yan, H., Uetrecht, C., Hansman, G.S., Taube, S., 2017. Human norovirus GII.4(MI001) P dimer binds fucosylated and sialylated carbohydrates. *Glycobiology* 27, 1027–1037. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwx078>
- Weichert, S., Koromyslova, A., Singh, B.K., Hansman, S., Jennewein, S., Schrotten, H., Hansman, G.S., 2016. Structural Basis for Norovirus Inhibition by Human Milk Oligosaccharides. *J. Virol.* 90, 4843–4848. <https://doi.org/10.1128/JVI.03223-15>
- Wobus, C.E., 2018. The Dual Tropism of Noroviruses. *J. Virol.* 92, e01010-17. <https://doi.org/10.1128/JVI.01010-17>
- Wobus, C.E., Karst, S.M., Thackray, L.B., Chang, K.-O., Sosnovtsev, S.V., Belliot, G., Krug, A., Mackenzie, J.M., Green, K.Y., Virgin, H.W., 2004. Replication of Norovirus in Cell Culture Reveals a Tropism for Dendritic Cells and Macrophages. *PLoS Biol.* 2, e432. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020432>
- Wolf, S., Reetz, J., Hoffmann, K., Gründel, A., Schwarz, B.-A., Hänel, I., Otto, P.H., 2012. Discovery and genetic characterization of novel caliciviruses in German and Dutch poultry. *Arch. Virol.* 157, 1499–1507. <https://doi.org/10.1007/s00705-012-1326-7>
- Wolf, S., Reetz, J., Johne, R., Heiberg, A.-C., Petri, S., Kanig, H., Ulrich, R.G., 2013. The simultaneous occurrence of human norovirus and hepatitis E virus in a Norway rat (*Rattus norvegicus*). *Arch. Virol.* 158, 1575–1578. <https://doi.org/10.1007/s00705-013-1646-2>

- Wu, F.-T., Oka, T., Takeda, N., Katayama, K., Hansman, G.S., Muo, C.-H., Liang, S.-Y., Hung, C.-H., Jiang, D.D.-S., Chang, J.H., Yang, J.-Y., Wu, H.-S., Yang, C.-F., 2008. Acute Gastroenteritis Caused by GI/2 Sapovirus, Taiwan, 2007. *Emerg. Infect. Dis.* 14, 1169–1171. <https://doi.org/10.3201/eid1407.071531>
- Xu, Z., Liu, Z., Chen, J., Zou, S., Jin, Y., Zhang, R., Sheng, Y., Liao, N., Hu, B., Cheng, D., 2021. Effect of Direct Viral–Bacterial Interactions on the Removal of Norovirus From Lettuce. *Front. Microbiol.* 12, 731379. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.731379>
- Yang, M., Tong, L., Wang, S., Liu, N., Zhao, F., Sun, Y., Sun, G., Zhou, D., 2022. Gut Microbiota and Transcriptomics Reveal the Effect of Human Norovirus Bioaccumulation on Oysters (*Crassostrea gigas*). *Microbiol. Spectr.* 10, e00161-22. <https://doi.org/10.1128/spectrum.00161-22>
- Yang, Y., Xia, M., Wang, L., Arumugam, S., Wang, Y., Ou, X., Wang, C., Jiang, X., Tan, M., Chen, Y., Li, X., 2019. Structural basis of host ligand specificity change of GII porcine noroviruses from their closely related GII human noroviruses. *Emerg. Microbes Infect.* 8, 1642–1657. <https://doi.org/10.1080/22221751.2019.1686335>
- Yoshida, T., Kasuo, S., Azegami, Y., Uchiyama, Y., Satsumabayashi, K., Shiraishi, T., Katayama, K., Wakita, T., Takeda, N., Oka, T., 2009. Characterization of sapoviruses detected in gastroenteritis outbreaks and identification of asymptomatic adults with high viral load. *J. Clin. Virol.* 45, 67–71. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2009.03.003>
- Younger, A.D., Neish, A., Walker, D.I., Jenkins, K.L., Lowther, J.A., Stapleton, T.A., Alves, M.T., 2020. Strategies to reduce norovirus (NoV) contamination from oysters under depuration conditions. *Food Chem. Toxicol.* 111509. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111509>
- Yu, G., Zhang, D., Guo, F., Tan, M., Jiang, X., Jiang, W., 2013. Cryo-EM Structure of a Novel Calicivirus, Tulane Virus. *PLOS ONE* 8, e59817. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059817>
- Yu, J., Liang, Z., Guo, K., Sun, X., Zhang, Q., Dong, Y., Duan, Z., 2020. Intra-Host Evolution of Norovirus GII.4 in a Chronic Infected Patient With Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Front. Microbiol.* 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00375>
- Yu, L.C., Yang, Y.H., Broadberry, R.E., Chen, Y.H., Chan, Y.S., Lin, M., 1995. Correlation of a missense mutation in the human Secretor alpha 1,2-fucosyltransferase gene with the Lewis(a+b+) phenotype: a potential molecular basis for the weak Secretor allele (Sew). *Biochem. J.* 312, 329–332.
- Yu, Y., Cai, H., Hu, L., Lei, R., Pan, Y., Yan, S., Wang, Y., 2015. Molecular Epidemiology of Oyster-Related Human Noroviruses and Their Global Genetic Diversity and Temporal-Geographical Distribution from 1983 to 2014. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 7615–7624. <https://doi.org/10.1128/AEM.01729-15>
- Zahorsky J., 1929. Hyperemesis hiemis or the winter vomiting disease. *Arch Pediatr* 391–395.
- Zakhour, M., Maalouf, H., Di Bartolo, I., Haugarreau, L., Le Guyader, F.S., Ruvoën-Clouet, N., Le Saux, J.-C., Ruggeri, F.M., Pommepeuy, M., Le Pendu, J., 2010. Bovine Norovirus: Carbohydrate Ligand, Environmental Contamination, and Potential Cross-Species Transmission via Oysters. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 6404–6411. <https://doi.org/10.1128/AEM.00671-10>
- Zakhour, M., Ruvoën-Clouet, N., Charpilienne, A., Langpap, B., Poncet, D., Peters, T., Bovin, N., Pendu, J.L., 2009. The  $\alpha$ Gal Epitope of the Histo-Blood Group Antigen Family Is a Ligand for Bovine Norovirus Newbury2 Expected to Prevent Cross-Species Transmission. *PLoS Pathog.* 5. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000504>
- Zhang, D., Huang, P., Zou, L., Lowary, T.L., Tan, M., Jiang, X., 2014. Tulane Virus Recognizes the A Type 3 and B Histo-Blood Group Antigens. *J. Virol.* 89, 1419–1427. <https://doi.org/10.1128/JVI.02595-14>

- Zheng, D.-P., Ando, T., Fankhauser, R.L., Beard, R.S., Glass, R.I., Monroe, S.S., 2006. Norovirus classification and proposed strain nomenclature. *Virology* 346, 312–323. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2005.11.015>
- Zheng, G., Zhu, Z., Cui, J., Yu, J., 2022. Evolutionary analyses of emerging GII.2[P16] and GII.4 Sydney [P16] noroviruses. *Virus Evol.* 8, veac030. <https://doi.org/10.1093/ve/veac030>
- Zhuo, R., Ding, X., Freedman, S.B., Lee, B.E., Ali, S., Luong, J., Xie, J., Chui, L., Wu, Y., Pang, X., 2021. Molecular Epidemiology of Human Sapovirus among Children with Acute Gastroenteritis in Western Canada. *J. Clin. Microbiol.* 59, e00986-21. <https://doi.org/10.1128/JCM.00986-21>
- Zhuo, R., Parsons, B.D., Lee, B.E., Drews, S.J., Chui, L., Louie, M., Crago, B., Freedman, S.B., Ali, S., Pang, X., 2018. Identification of Enteric Viruses in Oral Swabs from Children with Acute Gastroenteritis. *J. Mol. Diagn.* 20, 56–62. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2017.09.003>
- Zomer, T.P., Jong, B.D., Kühlmann-Berenzon, S., Nyrén, O., Svenungsson, B., Hedlund, K.O., Ancker, C., Wahl, T., Andersson, Y., 2010. A foodborne norovirus outbreak at a manufacturing company. *Epidemiol. Infect.* 138, 501–506. <https://doi.org/10.1017/S0950268809990756>

# Communication par affiches



## Caractérisation des glycanes impliqués dans les interactions entre huître et virus entériques humains.



Gabriel Euler<sup>1</sup>, Audrey Auger<sup>2</sup>, Adrien Breiman<sup>3</sup>, Jennifer Jazat<sup>3</sup>, Béatrice Le Moullac-Vaidye<sup>3</sup>, Frédéric Chirat<sup>2</sup>, Marion Desdouts<sup>1</sup>, Jacques Le Pendu<sup>3</sup>, Yann Guerardel<sup>2</sup>, Soizick Le Guyader<sup>1</sup>.

1. Laboratoire de Microbiologie, LSEM, Ifremer, Nantes, 2. UGSF – UMR 8576 CNRS, Université de Lille, 3. CRCINA, UMR 1232 INSERM- CNRS ERL 6001, Nantes

### Introduction

Excrétion virale des personnes infectées

Glycanes similaires aux HBGA humains

Toxi-infection par consommation de coquillages contaminés

Contamination de l'environnement par le biais des eaux usées

Bio-accumulation de particules virales par *Crassostrea gigas*

Glycane de type HBGA

Contamination par norovirus et rotavirus des mollusques filtreurs

Les norovirus et rotavirus sont les principaux responsables des gastro-entérites virales chez l'Homme.

Chez l'Homme, ces virus interagissent avec les antigènes tissulaires de groupe sanguin (HBGA), des glycanes présents sur l'épithélium intestinal humain. Il a été démontré qu'une molécule similaire est exprimée par les huîtres creuses *Crassostrea gigas* et participe à la bio-accumulation de virus par ces bivalves filtreurs.

### Objectifs

- Caractériser la structure des glycanes exprimés par les huîtres
- Identifier les cellules qui les expriment
- Etudier leur impact sur les interactions huîtres – virus humains

### Matériels et méthodes

Huître creuse *Crassostrea gigas*

- Manteau
- Tissu digestif
- Branchies

Fixation et réalisation de coupes fines

Dissection des différents tissus

Dissociation des tissus pour isoler les cellules

Purification des N-glycannes

Immunohistologie  
Localisation des glycanes  
Interactions tissu – VLP

Cytométrie en flux  
Immunomarquage des HBGA et utilisation de VLP

Spectrométrie de masse  
Composition / structure des glycanes

Production de virus-like particles (VLP) ou particules S60\*-VP8\*

Séquences virales (VP1 de norovirus GI, GII, VP8\* de rotavirus)

### • Dans quel tissu a lieu l'interaction virus – huître ?

Images de microscopie à fluorescence de coupes de tissus digestif d'huître : noyaux marqués au DAPI (bleu) et VLP norovirus GII.4 AF647 (violet)

L'interaction entre VLP de norovirus GII.4 et tissus d'huître creuse est visible au niveau des cellules digestives

### • Quelle est la structure des glycanes de l'huître creuse ?

Spectre de masse des N-glycannes perméthylés issus du manteau de *Crassostrea gigas* libérés par la PNGase F, m/z 2500 à 4000

HBGA type A Lewis b méthylé

Des analogues glycaniques partiellement méthylés des HBGA humains de type A et A Lewis<sup>b</sup> ont été caractérisés dans les 3 tissus d'huître

### • Quelles sont les cellules qui expriment ces glycanes ?

Cellules dissociées de tissus d'huître analysées par cytométrie en flux :

Viabilité des cellules contrôlée par l'utilisation de calcéine-AM  
Les nombreux débris cellulaires sont écartés pour l'immunomarquage

Contrôle 0,3%

Co-marquage 24,3%

Une sous-population de cellules digestives exprime une molécule similaire à l'HBGA de type A et lie des VLP de norovirus GII.4

% de cellules marquées

■ Tissu digestif  
■ Branchies  
■ Manteau

Anticorps anti-HBGA

A (#1) A (#21) B Lewis X Lewis Y H type 2

Les cellules d'huîtres expriment une molécule reconnue par les anticorps anti-HBGA A humains, les autres HBGA ne sont pas reconnus par les anticorps utilisés.

Cette première caractérisation structurale des glycanes d'huître confirme la présence de glycanes de type HBGA A et ALe<sup>b</sup>, et révèle la présence de méthylations dont le rôle reste à explorer. Ces glycanes sont exprimés par les cellules et les tissus d'huîtres capables d'interagir avec les norovirus GII.4. D'autres génotypes de norovirus et rotavirus seront étudiés. L'utilisation de glycanes de synthèse et de VLP mutés sur le site de liaison aux HBGA permettrait de s'assurer que les HBGA méthylés de l'huître sont bien en interaction avec les particules virales. La nature des cellules et les gènes codant pour ces HBGA pourront être identifiés par tri et RNAseq. Enfin, l'utilisation du modèle entéroïde humain pourrait permettre de comprendre l'impact des glycanes sur l'inféctiosité et la persistance des virus bioaccumulés.

ANR n° 19-CE35-0014-01

Gabriel Euler<sup>1</sup>, Audrey Auger<sup>2</sup>, Adrien Breiman<sup>3</sup>, Jennifer Jazat<sup>1</sup>, Béatrice Le Moullac-Vaidy<sup>3</sup>, Frédéric Chirat<sup>2</sup>, Marion Desdouts<sup>1</sup>, Jacques Le Pendu<sup>3</sup>, Yann Guerardel<sup>2</sup>, Soizick Le Guyader<sup>1</sup>.

1. Laboratoire de Microbiologie, LSEM, Ifremer, Nantes, 2. UGSF – UMR 8576 CNRS, Université de Lille, 3. CRCINA, UMR 1232 INSERM- CNRS ERL 6001, Nantes

### Introduction

Excrétion virale des personnes infectées

Glycane similaire aux HBGA humains

Contamination de l'environnement par le biais des eaux usées

Toxi-infection par consommation de coquillage contaminé

Bio-accumulation de particules virales par *Crassostrea gigas*

Glycane de type HBGA

Les norovirus sont les principaux responsables des gastro-entérites virales chez l'Homme et sont excrétés en grande quantité par les personnes infectées, symptomatiques ou non. Chez l'Homme, ces virus interagissent avec les antigènes tissulaires de groupe sanguin (HBGA), des glycanes présents sur l'épithélium intestinal humain. Il a été démontré qu'une molécule similaire est exprimée par les huîtres *C. gigas* et pourrait participer à la bio-accumulation de virus par ces bivalves filtreurs.

### Objectifs

- Caractériser la structure des glycanes exprimés par les huîtres
- Identifier les cellules qui les expriment
- Etudier leur impact sur les interactions huîtres – virus humains

### Matériels et méthodes

Huître creuse *Crassostrea gigas*

- Manteau
- Tissu digestif
- Branchies

Fixation et réalisation de coupes fines

Dissection des différents tissus

Dissociation des tissus pour isoler les cellules

Purification des N-glycanes

Immunohistologie  
Localisation des glycanes  
Interactions tissu – VLP

Cytométrie en flux  
Tri cellulaire  
Immunomarquage des HBGA et utilisation de VLP

Spectrométrie de masse  
Composition / structure des glycanes

Production de virus-like particles (VLP) ou particules S60\*-VP8\*

Séquences virales (VP1 de norovirus GI, GII)

### Dans quel tissu a lieu l'interaction virus – huître ?

Images de microscopie à fluorescence de coupes de tissus digestif d'huître : noyaux marqués au DAPI (bleu) et VLP norovirus (violet)

L'interaction entre VLP de NoV GI.1 et GII.4 avec les tissus d'huître creuse est visible au niveau de la lumière des tubules digestifs et du mucus

GII.4 AF568    GI1.1 AF568    GI1.1 AF647

### Quelle est la structure des glycanes de l'huître creuse ?

Spectre de masse des N-glycanes perméthylés issus du manteau de *Crassostrea gigas*, m/z 2500 à 4000

HBGA type A Lewis b méthylé

Des analogues glycaniques partiellement méthylés des HBGA humains de type A et A Lewis<sup>b</sup> ont été caractérisés dans les 3 tissus d'huître (tissu digestif, branchies et manteau) traités par la PNGase F qui clive les N-glycanes et permet leur analyse par spectrométrie de masse (MALDI-MS et GC-MS)

### Quelles sont les cellules qui expriment ces glycanes ?

Des cellules des 3 tissus expriment des molécules reconnues par les anticorps anti-A

Une sous-population de cellules digestives exprime une molécule similaire à l'HBGA de type A et lie des VLP de norovirus GII.4

Marquage des cellules digestives à l'aide de VLP GII.4 ou GI.1 AF647 puis tri cellulaire des deux fractions

Les cellules interagissant ou non avec les VLP sont triées et seront analysées par RNAseq pour identifier leur type cellulaire. Les gènes codant pour ces HBGA pourront être identifiés

Cette première caractérisation structurale des glycanes d'huître confirme la présence de glycanes de type HBGA A et ALe<sup>b</sup>, et révèle la présence de méthylations dont le rôle reste à explorer. Ces glycanes sont exprimés par les cellules et les tissus d'huîtres capables d'interagir avec les norovirus GII.4 et GI.1. D'autres génotypes de norovirus et rotavirus seront étudiés. L'utilisation de glycanes de synthèse et de VLP mutés sur le site de liaison aux HBGA permettrait de s'assurer que les HBGA méthylés de l'huître sont bien en interaction avec les particules virales. L'analyse par RNAseq des cellules triées va permettre d'identifier les cellules interagissant avec les VLP. Enfin, l'utilisation du modèle entéroïde humain pourrait permettre de comprendre l'impact des glycanes sur l'infectiosité et la persistance des virus bioaccumulés.



Gabriel Euler<sup>1</sup>, Cécile Le Mennec<sup>1</sup>, Julien Schaeffer<sup>1</sup>, Xi-Lei Zeng<sup>2</sup>, Khalil Ettayebi<sup>2</sup>, Robert L. Atmar<sup>2,3</sup>, Françoise S. Le Guyader<sup>1</sup>, Mary K. Estes<sup>2</sup> and Marion Desdouts<sup>1</sup>

1. Laboratoire de Microbiologie, LSEM, Ifremer, Nantes, 2. Department of Molecular Virology and Microbiology, Baylor College of Medicine, Houston, TX 77030, USA  
3. Department of Medicine, Baylor College of Medicine, Houston, TX 77030, USA

## Introduction

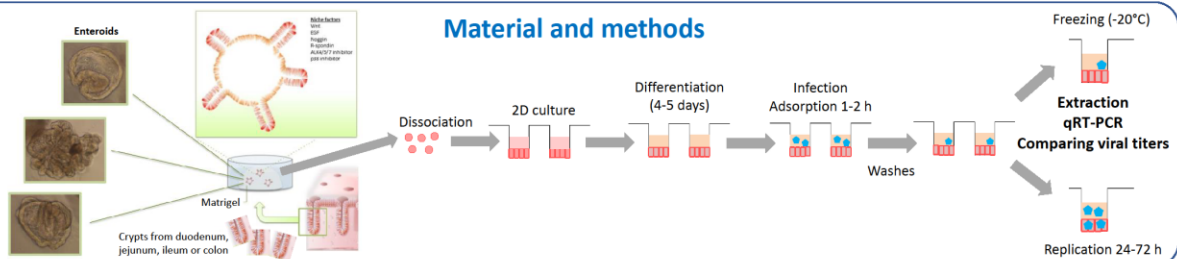
- Sapovirus (SaV) and norovirus (NoV) belong to the *Caliciviridae* family
- Non-envelopped, single-strand RNA (+) virus with 7-8kb genome
- Cause acute gastroenteritis in humans, including foodborne outbreaks
- No cellular model for human SaV until 2020 : not much known ...
- Human intestinal enteroids allow replication of human NoV



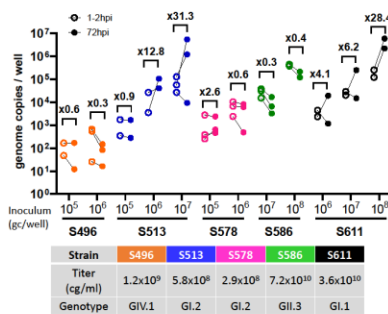
## Objectives

- Use enteroids as a cellular model to study human SaV
- Identify human SaV tropism and required co-factors
- Explore the role of HBGA (ligands of human NoV) in SaV replication

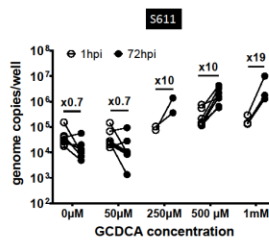
## Material and methods



### • Screening of 5 strains of human SaV

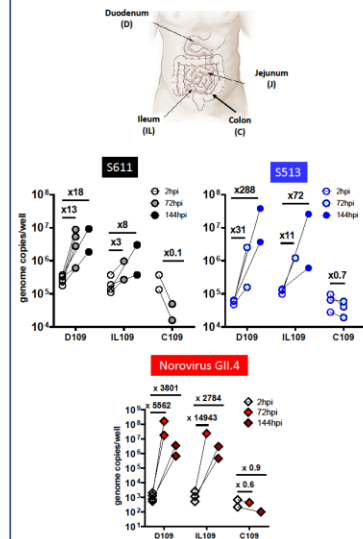


### • Role of bile acids ?

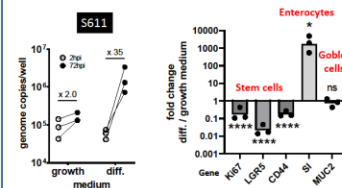


Human sapovirus replication on enteroids requires a bile acid like GCDCA (glycochenodeoxycholic acid)

### • Viral tropism ?



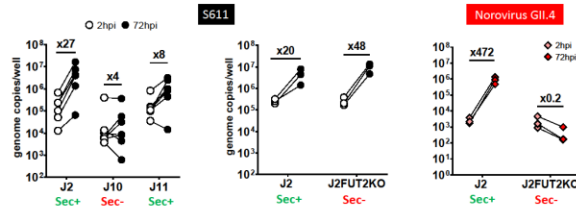
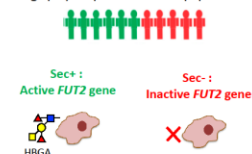
### • Role of cell differentiation ?



Only differentiated cells are infected (enterocytes?)

### • Genetic susceptibility ?

High polymorphism in human population



Replication of sapovirus in HIE is independent of secretor status, while norovirus GI.4 is secretor-dependent

- ✓ Human intestinal enteroid allows to study host-sapovirus interactions and compare with other enteric viruses (norovirus, etc...)
- ✓ Two strains of human sapovirus belonging to genotypes GI.1 and GI.2 replicate in cells from the small intestine (J/D/IL) but not the colon
- ✓ Replication is moderate and requires bile acids and differentiated cells
- ✓ As expected by epidemiological data and VLP studies : human sapovirus infection appears independent of the secretor phenotype
  - More strains to be tested to investigate genotype or strain-dependent phenotypes, identify the viral receptor

# ANNEXE I

	Nom	Motif reconnu	Organisme	Dilution ou concentration utilisée	Fournisseur
<b>Anticorps Primaire</b>	#1	A type 2	Souris	1/50	INSERM (UMR1302)
	#21	A "tout type"	Souris	1/50	INSERM (UMR1302)
	#44	B	Souris	1/50	INSERM (UMR1302)
	7LE	Lewis a	Souris	1µg/mL	VWR Abcam
	2-25LE	Lewis B	Souris	1µg/mL	VWR
	73-30	Lewis X	Souris	1,25µg/mL	TCI Chemicals
	H18A	Lewis Y	Souris	1,25µg/mL	TCI Chemicals
	#53	H type 2	Souris	1/50	INSERM (UMR1302)
	17-206	H type 1	Souris	1µg/mL	Thermofischer
	<b>Lectine</b>	BC2L-C-Nt Biot	H type 1 + Lewis B	<i>B. cenocepacia</i>	1/200
<b>Marqueur Secondaire</b>	Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor™ 647	Anti-souris	Ane	4µg/mL	Biotium
	Cross-Adsorbed Secondary Antibody, CF405M	Anti-souris	Chèvre	10µg/mL	Biotium
	Streptavidine	Biotine		2µg/mL	InVitrogen
<b>VLP</b>	<b>Nom</b>	<b>Souche</b>	<b>Couplage</b>	<b>Dilution ou concentration utilisée</b>	<b>Fournisseur</b>
	GI.1	Norwalk	Alexa Fluor 647	5 à 20µg/mL	Baylor College of Medicine
	GII.4	Dijon 27ABOR	Alexa Fluor 647	5µg/mL	INSERM (UMR1302)

**Titre :** Norovirus, sapovirus et les huîtres : apport du modèle entéroïde intestinal et interactions avec les glycanes

**Mots clés :** norovirus, sapovirus, huître, glycanes, entéroïdes

**Résumé :** Les norovirus et sapovirus sont des virus appartenant à la famille des *Caliciviridae* qui causent respectivement 18% et 3,4% de l'ensemble des cas de gastro-entérites à travers le monde. Les personnes infectées excrètent ces virus qui sont présents en grandes quantités dans les eaux usées. Un assainissement défectueux peut alors conduire à la présence de ces virus dans l'environnement, dont les zones littorales où sont produites les huîtres. Ces mollusques bivalves filtreurs se nourrissent en filtrant l'eau de mer, et peuvent accumuler ces pathogènes dans leurs tissus. Le norovirus est connu pour son association particulière avec les huîtres, notamment *Crassostrea gigas*. En effet, elles expriment des glycanes de type antigène tissulaire de groupe sanguin dans leurs tissus, analogues au récepteur d'attachement des norovirus chez l'Homme. Pour les sapovirus, ces récepteurs ne sont pas connus en l'absence de modèle de réplication *in vitro*.

Durant cette thèse, un protocole a été mis au point pour étudier l'expression de ces glycanes par les cellules d'huître et les interactions entre les norovirus et ces cellules. Il a permis de montrer que ces interactions sont possibles, mais que dans les huîtres, les norovirus seraient majoritairement en interaction stable avec des molécules extracellulaires. Dans un autre axe de cette thèse, nous avons identifié des souches de sapovirus humain capables de répliquer sur des entéroïdes intestinaux humains, qui ont permis d'approfondir les connaissances sur ce virus peu étudié. Son tropisme mais également ses interactions avec les antigènes tissulaires de groupe sanguin des cellules intestinales humaines ont été investigués. Cette thèse a donc développé des outils méthodologiques permettant l'étude des cellules d'huîtres et leurs interactions avec les norovirus, mais également de répliquer les sapovirus sur un modèle cellulaire innovant.

**Title :** Norovirus, sapovirus and oysters : contribution of the human intestinal enteroid model and interactions with glycans

**Keywords :** norovirus, sapovirus, oyster, glycanes, enteroids

**Abstract :** Norovirus and sapovirus are both members of the *Caliciviridae* viral family. They are respectively the cause of 18% and 3.4% of all cases of gastroenteritis worldwide. Infected people shed high amounts of viruses that are carried into wastewaters. Sewage treatment failure can then lead to the fecal contamination of the environment, including coastal areas where oysters are produced. These filter-feeding bivalve molluscs can accumulate these pathogens in their tissues. Norovirus is known for its specific association with the *Crassostrea gigas* species, known to express in its tissues some glycanes similar to the human blood-group antigens that are an attachment factor of norovirus in the human gut. Such attachment factors are not known for sapoviruses, in the absence of an *in vitro* replication model.

During this thesis, a protocol was developed to study the expression of glycanes by oyster cells and their interactions with norovirus. It allowed us to show that these interactions are possible, but that the main ligand of norovirus in oysters is extracellular. In a second axis of this thesis, we were able to identify two strains of human sapovirus replicating *in vitro* in human intestinal enteroids, which allowed us to deepen our knowledge of this virus. Its tropism but also its interactions with human blood-group antigens on human intestinal cells were investigated. This thesis has therefore developed methodological tools allowing the study of oyster cells and their interactions with noroviruses, but also to replicate sapoviruses on an innovative cell model.