



HAL
open science

Rôle des antigènes tissulaires de groupes sanguins humains A, B, H et Lewis dans l'évolution des Norovirus GII.4

Alexis De de Rougemont Rougemont

► **To cite this version:**

Alexis De de Rougemont Rougemont. Rôle des antigènes tissulaires de groupes sanguins humains A, B, H et Lewis dans l'évolution des Norovirus GII.4. Sciences agricoles. Université de Bourgogne, 2011. Français. NNT : 2011DIJOS029 . tel-00739334

HAL Id: tel-00739334

<https://theses.hal.science/tel-00739334>

Submitted on 8 Oct 2012

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE

pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université de Bourgogne

discipline : sciences de la vie

spécialité : virologie

par

Alexis de ROUGEMONT

soutenue publiquement le jeudi 7 avril 2011

à l'UFR de médecine de Dijon

RÔLE DES ANTIGÈNES TISSULAIRES DE GROUPES SANGUINS HUMAINS A, B, H ET LEWIS DANS L'ÉVOLUTION DES NOROVIRUS GII.4

Directeur : Professeur Pierre POTHIER

JURY

M. Pierre LEBON	Professeur des Universités, Université Paris V	Président
M. Jacques LE PENDU	Directeur de Recherche, INSERM U892, Nantes	Rapporteur
M. Bruno LINA	Professeur des Universités, Université Lyon I	Rapporteur
M. Pierre POTHIER	Professeur des Universités, Université de Bourgogne	Directeur
M. Gaël BELLIOU	Docteur, CNR des virus entériques, Dijon	Co-encadrant

***Rôle des antigènes tissulaires
de groupes sanguins humains
A, B, H et Lewis dans l'évolution
des norovirus GI.4***

Dr. Alexis de ROUGEMONT

A ma famille

« *La finesse du monde, c'est estre honneste homme* »
Balthazar de ROUGEMONT, *ca* 1570-1635

Remerciements

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

Mes remerciements s'adressent tout d'abord à mon directeur de thèse et chef de service, monsieur **Pierre POTHIER**, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et confié ces travaux. Je salue aussi sa souplesse et la large marge de liberté qu'il m'a laissée.

Je tiens à exprimer tout particulièrement ma profonde gratitude à mon encadrant, monsieur **Gaël BELLIOU**, qui a notablement contribué à ma découverte de la virologie fondamentale. Je lui suis reconnaissant et redevable de l'accueil, de la patience, de la disponibilité, de l'amitié et de la complicité dont il a su faire preuve.

Je suis très reconnaissant à monsieur **Pierre LEBON** de m'avoir fait l'honneur de présider mon jury de thèse, pour l'intérêt et la bienveillance dont il a toujours fait preuve.

Je suis également très reconnaissant à messieurs **Jacques LE PENDU** et **Bruno LINA** d'avoir accepté le rôle déterminant de rapporteur. Je les remercie vivement pour leur accueil, leur collaboration chaleureuse mais décisive au cours de ces années et leur expertise.

Je remercie également mademoiselle **Marie-Anaïs ESTIENNEY** pour son aide précieuse, son infatigabilité et surtout son enthousiasme, madame **Nathalie RUVOËN-CLOUET** pour son bon accueil et sa précieuse collaboration, messieurs **Wilfrid BOIREAU** et **Benoît SIMON** ainsi que Madame **Céline ELIE-CAILLE** pour leurs expertises de grande qualité, et monsieur **Ludwig-Serge AHO-GLELE** pour sa maîtrise sans faille des tests et modélisations statistiques et sa disponibilité.

Enfin, je remercie tous les membres du **laboratoire de virologie** et du **Centre National de Référence des virus entériques** pour leur collaboration de tous les jours.

Résumé

Les norovirus sont l'une des causes principales de gastroentérite. Depuis 2002, des variants de norovirus GII.4 successifs ont circulé dans la population par cycle de 2-3 ans, ce qui suscite des interrogations quant au rôle de leurs ligands, les antigènes tissulaires de groupes sanguins (HBGA), dans leur évolution. Nous avons analysé l'interaction entre des variants de GII.4 représentatifs et des HBGA, et déterminé le rôle d'acides aminés (aa) clés. Par mutagenèse dirigée, nous avons montré qu'une configuration stricte des aa directement impliqués dans l'accroche est indispensable. La suppression de la thréonine 395, caractéristique des variants après 2002, confère la capacité de se lier à Le_x et $Si-Le_x$, démontrant que les aa en dehors du site de liaison peuvent modifier les propriétés d'attachement. L'analyse de l'accroche de VLP de 6 variants isolés de 1987 à 2007 à des échantillons de salive phénotypés et des HBGA synthétiques montre que tous les variants sont capables de s'attacher à la salive des sécréteurs indépendamment du phénotype ABO et aux oligosaccharides propres au phénotype sécréteur. Deux variants récents ont pu également s'accrocher aux sucres présents dans la salive des non-sécréteurs $Le(+)$. Nos données suggèrent que la capacité de se lier à Le_x et $Si-Le_x$ serait une conséquence de la variation génétique des aa situés à proximité du site de liaison. L'analyse des propriétés d'attachement par résonance plasmonique de surface a montré que seuls les variants après 2002 présentent une affinité forte pour les antigènes A et B, suggérant que l'accélération évolutive des GII.4 pourrait être liée à une affinité accrue des variants pour les HBGA après 2002.

Mots clés : *norovirus, ligand, antigènes tissulaires de groupe sanguin (HBGA), particules virales de synthèse (VLP), mutagenèse, résonance plasmonique de surface.*

Abstract

Noroviruses are one of the leading causes of gastroenteritis worldwide. Since 2002 successive GII.4 variants have circulated in the population before being replaced every 2-3 years, which raises questions about the role of their histo-blood group antigen (HBGAs) receptors in their evolution. We analyzed the interaction between representative GII.4 variants and HBGAs and determined the role of selected amino acids (aa) in the binding profiles. By mutagenesis, we showed that there was a strict structural requirement for the aa directly implicated in HBGA bindings. The ablation of the threonine 395 residue, an epidemiological feature of the post 2002 variants, allowed to gain the capacity to bind to the Lewis x and sialyl-Lewis x antigens, demonstrating that aa residues outside the HBGA binding site can modify the binding properties. The analysis of the attachment of VLPs from 6 variants isolated from 1987 to 2007 to phenotyped saliva samples and synthetic HBGAs shows that all variants could attach to saliva of secretors irrespective of the ABO phenotype and to oligosaccharides characteristic of the secretor phenotype. Interestingly, two recent variants additionally bound to carbohydrates present in the saliva of Lewis-positive non-secretors. Our data suggest that GII.4 binding to Le_x and Si-Le_x antigens might be a by-product of the genetic variation of the aa located in the vicinity of the binding site. Analysis of the binding properties by surface plasmon resonance showed that only post 2002 variants presented a strong affinity for A and B antigens, suggesting that the GII.4 evolution could be related to an increased affinity for HBGAs for the post 2002 variants.

Title: Role of the A, B, H and Lewis histo-blood group antigens in the evolution of GII.4 noroviruses

Keywords: norovirus ; docking ; histo-blood group antigens (HBGA) ; virus-like particule (VLP) ; mutagenesis ; surface plasmon resonance.

Laboratoire d'accueil

Équipe d'Accueil EA562 (LIMA)

Laboratoire Interaction Muqueuse – Agent infectieux

Professeur Alain BONNIN

Université de Bourgogne – UFR de Médecine de Dijon
7, boulevard Jeanne d'Arc – 21078 DIJON Cedex

Équipe « stratégie vaccinale »

Professeur Pierre POTHIER

Laboratoire de Virologie-Sérologie

Centre National de Référence des virus entériques

CHU de Dijon – Plateau Technique de Biologie
2, rue Angélique Ducoudray – BP 37013
21070 DIJON Cedex

Tel : (33) 3.80.29.35.23

Fax : (33) 3.80.29.32.80

Courriel : cnr@chu-dijon.fr



Abréviations

aa	acide(s) aminé(s)	LNFP	lacto-N-fucopentaose
AcNPV	baculovirus <i>Autographa californica</i> nucléopolyhédrovirus	Man	mannose
ADN	acide désoxyribonucléique	MCS	site multiple de clonage (<i>multiple cloning site</i>)
AFM	microscopie de force atomique (<i>atomic force microscopy</i>)	MNV	norovirus murin (<i>murine norovirus</i>)
ARN	acide ribonucléique	MST	arbre minimum couvrant (<i>minimum spanning tree</i>)
BET	bromure d'éthidium	ORF	cadre de lecture ouverte (<i>open reading frame</i>)
BSA	albumine de sérum bovin (<i>bovine serum albumine</i>)	PAA	polyacrylamide
CNR	Centre National de Référence	pb	paire de base
CsCl	chlorure de césium	PBS	tampon phosphate salin (<i>phosphate buffer saline</i>)
DO	densité optique	PCR	réaction en chaîne de polymérase (<i>polymerase chain reaction</i>)
EIA	test immunoenzymatique (<i>enzyme immuno-assay</i>)	RHDV	virus de la maladie hémorragique lapine (<i>rabbit hemorrhagic disease virus</i>)
Fuc	fucose	rpm	rotation par minute
FUT2	α -1,2-fucosyl-transférase	RT-PCR	transcriptase inverse - PCR (<i>reverse transcriptase - PCR</i>)
FUT3	α -1,3-fucosyl-transférase	RU	unité de résonance (<i>resonance unit</i>)
GII.4	norovirus génogroupe II génotype 4	Sf9	lignée cellulaire de <i>Spodoptera frugiperda</i>
GalNAc	N-acétylgalactosamine	Si-Le	sialyl-Lewis
GEA	gastroentérite aiguë	SPR	résonance plasmonique de surface (<i>surface plasmon resonance</i>)
GlcNAc	N-acétylglucosamine	SVF	sérum de veau foetal
HBGA	antigène tissulaire de groupes sanguins (<i>histo-blood group antigens</i>)	VLP	particule(s) virale(s) de synthèse (<i>virus-like particule</i>)
Hi5	lignée cellulaire BTI-TN5B1-4 de <i>Trichoplusia Ni</i>		
HSA	albumine de sérum humain (<i>human serum albumine</i>)		
Le	groupe sanguin Lewis		
ICT	test immunochromatographique (<i>immunochromatographic test</i>)		

TABLE DES MATIÈRES

Avant propos	13
Introduction	15
<i>Première partie</i>	
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	18
A. <i>Norovirus</i> : définition et caractéristiques virologiques	20
1. Historique	21
2. Classification et génotypes	22
3. Structure virale	23
4. Propriétés antigéniques	29
5. Culture et norovirus murin	30
6. Propriétés physicochimiques des norovirus	30
B. Infections à norovirus humains et diagnostic biologique	31
1. Pathogenèse et défense de l'hôte	31
2. Manifestations cliniques	33
3. Modes de Transmission	34
4. Contrôle et prévention	35
5. Diagnostic des norovirus humains	36
C. Épidémiologie des norovirus	39
1. Prévalence et incidence	39
2. Les norovirus dans l'environnement	40
3. Caractéristiques épidémiologiques	41
4. Épidémiologie moléculaire	43
D. Les « récepteurs » des norovirus	47
1. La découverte des ligands cellulaires des norovirus	47
2. Biochimie des glycanes	48
3. Déterminants génétiques de la résistance de l'hôte	51
4. Structure du site de liaison aux HBGA	53
5. Profils de reconnaissance des HBGA par les norovirus	55

Deuxième partie

MATÉRIELS & MÉTHODES **59**

A. Production de particules virales de synthèse de norovirus GII.4 **61**

1. Analyse phylogénétique des variants GII.4 61
2. Clonage des souches sélectionnées 62
3. Le système baculovirus-cellules d'insecte 71
4. Mutagenèse dirigée du site de liaison aux HBGA 78

B. Outils et méthodes de mesure qualitatives et quantitatives des interactions virus-récepteurs **82**

1. Production d'anticorps monoclonaux spécifiques des GII.4 82
2. Les antigènes tissulaires de groupes sanguins 86
3. Techniques immunoenzymatiques (ELISA) 90
4. Mesures par résonance plasmonique de surface (SPR) 92
5. Analyses statistiques 96

Troisième partie

RÉSULTATS **97**

A. Production et évaluation des réactifs **98**

1. Étude phylogénique des variants GII.4 98
2. Les particules virales de synthèse de norovirus GII.4 99
3. Les anticorps monoclonaux spécifiques des norovirus GII.4 102
4. Évaluation de l'interaction VLP-sucre en ELISA et SPR 104

B. Profils d'interaction **106**

1. Mutagenèse dirigée du site de liaison aux HBGA 106
2. Profils d'interaction des variants de norovirus GII.4 111
3. Affinité relative des variants pour les antigènes A, B et H 117
4. Analyse des interactions VLP-sucre par SPR 119

Quatrième partie

DISCUSSION **121**

CONCLUSION *et perspectives* **129**

Publications connexes **136**

A de Rougemont, N Ruvoën-Clouet, B Simon, M Estienney, C Elie-Caille, S Aho, P Pothier, J Le Pendu, W. Boireau, G Belliot*. Qualitative and quantitative analysis of the binding of the GII.4 norovirus variants onto human blood group antigens. *J Virol*, 2011 ; 85(9) : xxxx-xx. **137**

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES **151**

Liste des tableaux

Tableau 1.	<i>Inventaire des protéines non structurales codées par l'ORF1</i>	25
Tableau 2.	<i>Résumé des profils d'attache des particules de synthèse d'un panel de VLP norovirus GI et GII sur des oligosaccharides synthétiques et des salives représentant les antigènes A, B, H (O), Lewis (Le^a, Le^b, Le^x et Le^y) et le phénotype non sécréteur</i>	57
Tableau 3.	<i>Liste des souches de norovirus GII.4 utilisés dans cette étude</i>	62
Tableau 4.	<i>Mélange réactionnel type pour une amplification par RT-PCR en une étape</i>	64
Tableau 5.	<i>Cycles d'amplification de la polymérase et de la capsid de norovirus par RT-PCR</i>	64
Tableau 6.	<i>Mélange réactionnel type pour une réaction de séquençage d'ORF2 de norovirus GII.4</i>	65
Tableau 7.	<i>Cycle de PCR pour la réaction de séquençage des ORF2 des norovirus GII.4</i>	65
Tableau 8.	<i>Liste des amorces de séquençage des souches GII.4 et de plasmides de clones positifs</i>	65
Tableau 9.	<i>Milieu réactionnel pour l'amplification de l'ORF2 avec le kit TITAN</i>	65
Tableau 10.	<i>Cycles d'amplification des ORF2 complets des norovirus GII.4 par RT-PCR</i>	65
Tableau 11.	<i>Mélange réactionnel pour une ligation dans le vecteur de transfert pGEM</i>	68
Tableau 12.	<i>Recette du milieu SOC</i>	68
Tableau 13.	<i>Recette du milieu LB-Agar à 1,5%</i>	69
Tableau 14.	<i>Milieu réactionnel pour le screening des clones par PCR conventionnelle</i>	69
Tableau 15.	<i>Cycle de PCR pour l'amplification des ORF2 complets des norovirus GII.4</i>	69
Tableau 16.	<i>Milieu réactionnel pour la PCR de mutagenèse dirigée sur pVL-E1057</i>	79
Tableau 17.	<i>Cycles de la réaction de mutagenèse dirigée sur pVL-E1057 par PCR</i>	80
Tableau 18.	<i>Amorces forward utilisées lors des mutagenèses dirigées du pVL-E1057</i>	80
Tableau 19.	<i>Protocole d'immunisation des souris Balb/C</i>	83
Tableau 20.	<i>Milieus de culture pour hybridome</i>	83
Tableau 21.	<i>Tampon carbonate-bicarbonate</i>	85
Tableau 22.	<i>Anticorps monoclonaux utilisés pour le typage des salives</i>	88
Tableau 23.	<i>Amorces utilisées pour la détermination du caractère sécréteur/non-sécréteur</i>	88
Tableau 24.	<i>Amorces utilisées pour l'amplification des exons 6 et 7 du gène ABO</i>	88
Tableau 25.	<i>Liste succincte des glycoconjugués PAA de l'étude</i>	89
Tableau 26.	<i>Caractéristiques des principaux glycoconjugués de synthèse de l'étude</i>	90

Tableau 27.	<i>Composition du tampon HBS à pH 7,4</i>	95
Tableau 28.	<i>Dimensions estimées des VLP par microscopie de force atomique (AFM)</i>	101
Tableau 29.	<i>Isotypage des préparations d'anticorps obtenus par immunisation de souris avec des VLP Hunter</i>	104
Tableau 30.	<i>Résultats en ELISA des interactions du variant Hunter et des mutants avec les sucres PAA</i>	107
Tableau 31.	<i>Résultats en ELISA des interactions du variant Hunter et des mutants avec les sucres HSA</i>	107
Tableau 32.	<i>Résumé des propriétés d'interaction des variants de norovirus GII.4 avec les HBGA</i>	123

Liste des figures

Figure 1.	<i>Arbre phylogénétique de la famille Caliciviridae et de ses cinq genres basé sur la séquence de la polymérase, d'après Simmonds et coll.</i>	21
Figure 2.	<i>Photo de norovirus vus en microscopie électronique</i>	22
Figure 3.	<i>Classification et distribution des norovirus basées sur les séquences des capsides, d'après Zheng et coll.</i>	23
Figure 4.	<i>Schéma de la structure génomique de norovirus avec ses 3 cadres de lectures ouverts (ORF) et les différentes régions codantes</i>	24
Figure 5.	<i>Structure et assemblage de la protéine de capside VP1</i>	26
Figure 6.	<i>Vues externes par cryomicroscopie électronique de norovirus GGI et GGII montrant les différences de structure</i>	27
Figure 7.	<i>Modèle d'infection par norovirus en fonction du caractère sécréteur ou non-sécréteur (présence du gène FUT2 fonctionnel ou pas, respectivement), d'après Lindesmith et coll.</i>	33
Figure 8.	<i>Évolution des épidémies à norovirus GII.4 en France entre 2000 et 2010 montrant l'émergence, la prédominance et le remplacement successif des différents variants.</i>	44
Figure 9.	<i>Analyse phylogénétique par inférences bayésiennes (A) et Neighbour Joining (B) des séquences en acides aminés de l'ORF2 entier de 92 norovirus GII.4 représentatifs des différents variants épidémiques isolés de 1987 à aujourd'hui.</i>	45
Figure 10.	<i>Structure biochimique des antigènes ABH des groupes sanguins basés sur différentes chaînes de saccharides présents sur les tissus humains</i>	51
Figure 11.	<i>Schéma de la biosynthèse des antigènes de groupes sanguins et de l'action des fucosyltransférases FUT2 et FUT3 déterminant les caractères sécréteur et non-sécréteur.</i>	52
Figure 12.	<i>Analyse évolutionnaire des profils de mutation de souches GII.4 de 1987 à 2005</i>	54
Figure 13.	<i>Structures cristallographiques des sites de liaisons des HBGA des souches Norwalk (GI.1) et VA387 (GII.4)</i>	54
Figure 14.	<i>Synthèse des interactions de la souche Norwalk avec ses récepteurs glycanne, les HBGA, en relation avec le phénotype sécréteur et la présence ou non de la maladie.</i>	56
Figure 15.	<i>Schéma de la stratégie de clonage pour la production de particules virales de synthèse (VLP) de norovirus GII.4</i>	63
Figure 16.	<i>Schéma du vecteur de transfert pGEM®-T easy.</i>	67
Figure 17.	<i>Structure du vecteur plasmidique pVL1392 avec son promoteur de la polyhédrine et son site de clonage multiple (MCS)</i>	71

Figure 18.	<i>Image de nucléopolyhédrovirus (NPV) en microscopie électronique</i>	71
Figure 19.	<i>Synthèse de la transfection de pVL1392-ORF2 dans baculovirus et des productions d'inoculum dans Sf9 et de VLP dans Hi5.</i>	72
Figure 20.	<i>Schématisation de la préparation et du résultat attendu du gradient de chlorure de césium (CsCl)</i>	76
Figure 21.	<i>Schématisation de la préparation et du résultat attendu du gradient discontinu de sucrose</i>	77
Figure 22.	<i>Localisation dans l'ORF2 des acides aminés mutés</i>	79
Figure 23.	<i>Schématisation du principe physique de résonance plasmonique de surface</i>	92
Figure 24.	<i>Graphique montrant les signaux obtenus pour une interaction simple L-R (1:1 cinétique du premier ordre)</i>	93
Figure 25.	<i>Schématisation de la surface en or de la puce rendue fonctionnelle à l'aide d'une monocouche auto-assemblée (SAM) de MUOH/MHA permettant la fixation des BSA conjuguées aux sucres A, B et H</i>	94
Figure 26.	<i>Arbre minimum couvrant (MST) des variants de norovirus GII.4 pandémiques depuis 1987</i>	99
Figure 27.	<i>Analyse par électrophorèse sur gel de polyacrylamide avec SDS (SDS-PAGE) des VLP des variants GII.4 et des VLP Hunter mutées obtenues par mutagenèse dirigée</i>	100
Figure 28.	<i>Image de VLP purifiées du variant Hunter (E1057) obtenue par microscopie de force atomique</i>	101
Figure 29.	<i>Graphique montrant pour chaque préparation de VLP la répartition des 30 mesures effectuées par AFM et ayant permis de déterminer leur taille moyenne</i>	102
Figure 30.	<i>Image de VLP purifiées sur gradient de chlorure de césium du variant Hunter (E1057) obtenue par microscopie électronique après coloration négative</i>	102
Figure 31.	<i>Caractérisation des anticorps monoclonaux par Western blot à l'aide des VLP de norovirus GV, GI.1 et GII.4</i>	103
Figure 32.	<i>Test ELISA comparatif de détection des VLP de norovirus GII.4 attachées aux sucres A, B et H à l'aide des anticorps monoclonaux 5B9 (conformationnel) et 8C12 (séquentiel)</i>	103
Figure 33.	<i>Sensorgramme montrant les interactions des VLP de la souche E1057 (Hunter) avec le glycoconjugué H type 1 immobilisé sur la puce avant et après traitement avec 10 mM de periodate de sodium</i>	105
Figure 34.	<i>Comparaison des résultats des interactions des VLP mutées ΔT395 et Y444F avec le type sauvage Hunter en ELISA</i>	108
Figure 35.	<i>Exploration comparée des résultats en ELISA des variations d'affinité des VLP Hunter et des VLP mutées ΔT395 et Y444F pour les glycoconjugués LNFPI, A-tri et B-tri</i>	110
Figure 36.	<i>Sensorgramme de l'interaction des VLP ΔT395, Hunter et US95/96 avec les glycoconjugués A, B et H</i>	111
Figure 37.	<i>Analyses des interactions des six variants de norovirus GII.4 avec les salives</i>	113
Figure 38.	<i>Analyses des interactions des six variants de norovirus GII.4 avec les glycoconjugués de synthèse</i>	114
Figure 39.	<i>Tests d'accroche en ELISA de différentes dilutions de VLP sur l'héparane sulfate, la chondroïtine sulfate et l'acide hyaluronique</i>	116
Figure 40.	<i>Analyses des interactions du nouveau variant Apeldoorn avec les salives phénotypées</i>	116
Figure 41.	<i>Affinités relatives des VLP de variants de norovirus GII.4 vis-à-vis de sucres LNFPI (H type 1 pentasaccharide), A et B conjugués à la BSA en ELISA et par résonance plasmonique de surface (SPR)</i>	118

- Figure 42.** *Étude cinétique de différentes concentrations de dimères de protéines VP1 permettant le calcul de la constante de dissociation KD.* **120**
- Figure 43.** *Extrapolation du modèle d'infection par norovirus en fonction du caractère sécréteur ou non-sécréteur (présence des gènes FUT2/FUT3 fonctionnels ou pas), d'après Lindesmith et coll., exposant l'avantage infectieux des variants Den Haag et Osaka par rapport aux autres variants de norovirus GII.4* **124**
- Figure 44.** *Analyse chronologique des profils de mutations des variants de norovirus GII.4 de 1987 à 2008 d'après les positions retenues par Lindesmith et coll. et mettant en évidence la stricte conservation des acides aminés impliqués dans la poche réceptrice, les positions hypervariables et le « recyclage » des acides aminés* **126**
- Figure 45.** *Schématisation des interrelations entre les différents groupes d'acide aminé basée sur leur caractéristique moléculaire et structurale* **125**
- Figure 46.** *Arbre minimum couvrant (MST) des variants de norovirus GII.4 pandémiques depuis 1987 et leurs profils liaison aux HBGA* **128**

Avant-propos

Depuis deux décennies, les norovirus génogroupe II génotype 4 (GII.4) sont prédominants dans le monde et de nouveaux sous-groupes ou variants distincts apparaissent successivement dans la population par cycle de 2 ou 3 ans (Siebenga *et coll.*, 2007 ; Lindesmith *et coll.*, 2008). Jusqu'à l'an 2000, les variants pandémiques ont été représentés successivement par les souches Bristol puis US95/96 (Bok *et coll.*, 2009). Avec l'apparition du variant Farmington Hills, se caractérisant par l'insertion d'un acide aminé supplémentaire dans la région hypervariable de la protéine de capsid (Dingle, 2004), une accélération du rythme d'évolution et d'émergence de souches GI.4 a été observée au cours des dix dernières années. Cette caractéristique persistera chez tous les variants ultérieurs successifs (Belliot *et coll.*, 2010), que la circulation soit mondiale ou locale.

Certains auteurs ont suggéré qu'un spectre plus large du profil d'accroche aux antigènes tissulaires de groupes sanguins (HBGA) et une évolution plus rapide pourraient expliquer la prédominance des norovirus GI.4 vis-à-vis des autres génogroupes (Tan et Jiang, 2005b). Cependant, les mécanismes expliquant l'émergence successive et de courte durée de variants GI.4 restent inconnus, une des hypothèses étant que le glissement génétique de la capsid pourrait conférer aux GI.4 le moyen d'échapper aux système immunitaire et de moduler leurs capacités d'accroche (Donaldson *et coll.*, 2008).

Après une revue bibliographique portant sur les norovirus GI.4 et les antigènes tissulaires de groupes sanguins, nous présenterons nos travaux de thèse portant sur l'évolution des récepteurs des norovirus GI.4 et leurs capacités à interagir avec les antigènes tissulaires de groupes sanguins (HBGA), et plus particulièrement, A, B, H et Lewis chez l'homme.

Nous avons effectué une analyse qualitative des capacités d'accroche de particules virales de synthèse (VLP), dérivées de six variants GI.4 épidémiques ayant circulé au cours des vingt

dernières années et du dernier variant en circulation, basée sur des expérimentations d'accroche de VLP sur des salives phénotypées et un large panel de sucres synthétiques. En outre, en utilisant des VLP modifiées, nous avons évalué l'importance biologique de la thréonine insérée en position 395 qui caractérise les nouveaux variants, et des acides aminés constitutifs de la poche servant à la reconnaissance des HBGA. Enfin, nous avons analysé l'affinité relative des VLP des six variants pour les antigènes A, B et H par résonance plasmonique de surface (SPR).

Pour conclure, nous aborderons plus largement les perspectives sur lesquelles peuvent déboucher nos travaux et les enjeux en santé publique que pose l'épidémiologie des norovirus GII.4.

Introduction

Les maladies diarrhéiques constituent une des principales causes de mortalité chez l'enfant de moins de cinq ans toutes étiologies confondues, et représentent chaque année près de 1,4 milliards d'épisodes et 1,6 à 2,5 millions de décès, majoritairement dans les pays en voie de développement (Kosek *et coll.*, 2003 ; Parashar *et coll.*, 2003 ; Bryce *et coll.*, 2005). Dans les pays tempérés, ces infections surviennent dans un contexte épidémique et saisonnier. Elles s'observent surtout pendant l'hiver.

Les gastroentérites virales représentent l'un des premiers motifs de consultation en médecine et principalement en pédiatrie. Dans les pays développés, la prise en charge précoce et adaptée a permis de réduire la gravité de ces infections qui représentent cependant un coût économique important (Fischer *et coll.*, 2004).

Mis à part les pathologies systémiques non infectieuses, les agents étiologiques des gastroentérites peuvent être de multiples origines tels que :

- des bactéries : *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter*, *E. coli*, *Yersinia* et *Vibrio cholerae*,
- des parasites : *Giardia*, *Cryptosporidium*, amibes...,
- et des virus qui constituent l'étiologie la plus fréquente notamment dans les pays développés où ils sont responsables de plus de 80% des cas rapportés. Mais leur importance relative varie selon la saison, l'âge, le contexte épidémiologique et le niveau sanitaire des populations.

Les gastroentérites virales surviennent souvent chez les enfants de moins de 3 ans. Il s'agit normalement d'infections de courte durée caractérisées par des troubles digestifs aigus (diarrhée, douleurs abdominales, vomissements), accompagnés de signes généraux habituellement discrets.

Les virus responsables de gastroentérites sont essentiellement :

- les rotavirus (*Reoviridae*) qui sont la première cause de diarrhée aiguë du nourrisson et de l'enfant de moins de 5 ans. Ils provoquent souvent des épidémies hivernales extensives également responsables d'infections communautaires et nosocomiales dans les services de pédiatrie,
- et les norovirus (*Caliciviridae*) qui sont le plus souvent responsables de diarrhée chez l'adulte et provoquent notamment des épidémies d'origine alimentaire ou hydrique.

Si les rotavirus sont plus fréquemment retrouvés chez l'enfant de moins de 5 ans, les norovirus sont aujourd'hui reconnus comme l'agent majeur des gastroentérites à partir de 5 ans. Considérés d'abord comme l'agent majeur des cas groupés de gastroentérites alimentaires ou hydriques, les progrès réalisés dans leur diagnostic par des techniques moléculaires montrent aujourd'hui leur importance dans d'autres contextes épidémiques et dans les cas de gastroentérites sporadiques chez l'adulte et l'enfant.

Dans une moindre fréquence, d'autres virus peuvent être à l'origine de gastroentérites chez l'homme, il s'agit :

- des astrovirus qui sont responsables de gastroentérites chez l'enfant, les personnes âgées et les immunodéprimés,
- des adénovirus entériques types 40 et 41 qui sont responsables de gastroentérites mais sans caractère saisonnier,
- enfin des sapovirus, des virus Aichi, des coronavirus, à l'origine de gastroentérites secondaires à une contamination hydrique, ou encore des *Picobirnavirus* chez l'immunodéprimé.

D'une manière générale, ces virus se multiplient dans les entérocytes de l'intestin grêle. Leur transmission se fait surtout par voie féco-orale et la contamination peut être soit directe, de personne à personne, soit indirecte par l'intermédiaire d'eau ou d'aliments contaminés.

Divers systèmes de surveillance ont été mis en place afin d'étudier l'épidémiologie des gastroentérites virales et bactériennes. En France, les gastroentérites sont recensées par les médecins appartenant au réseau « Sentinelle ». Leur déclaration n'est pas obligatoire.

Les Délégations Territoriales des Agences Régionales de Santé (ARS) devraient être alertées lorsque surviennent en collectivité des cas groupés de gastroentérites afin d'entreprendre une enquête épidémiologique et virologique pour en déterminer l'origine et caractériser l'agent pathogène impliqué. L'enquête épidémiologique est conduite par l'Institut national de Veille

Sanitaire (InVS) et leurs Cellules d'Intervention Régionale en Épidémiologie (CIRE). Les investigations virologiques sont faites par les Centres Nationaux de Référence (CNR).

Le CNR des virus entériques (Laboratoire de Virologie-Sérologie, CHU de Dijon) caractérise les virus impliqués dans les épidémies de gastroentérite, notamment les rotavirus et les norovirus, et collecte différentes informations d'épidémiologie moléculaire. Le Laboratoire National de Référence pour la Microbiologie des Coquillages (IFREMER, Nantes) collecte les informations liées à la consommation des coquillages et conduit des études d'épidémiologie moléculaire pour détecter et caractériser les virus polluant l'environnement marin. De même, l'Union Européenne finance des réseaux de laboratoires pour la surveillance des rotavirus et des norovirus en particulier. Enfin, très récemment, un réseau de surveillance mondiale des gastroentérites virales, Noronet, s'est mis en place et regroupe des laboratoires d'Amérique du Nord, d'Europe, d'Asie et d'Océanie.

Première Partie

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

A. <i>Norovirus</i> : définition et caractéristiques virologiques	20
1. Historique	21
2. Classification et génotypes	22
3. Structure virale	23
3.1 Les protéines non structurales	24
3.2 Les protéines structurales	26
3.1.1 <i>La protéine de capsid VP1</i>	26
3.1.2 <i>La protéine VP2</i>	28
3.3 Réplication	28
4. Propriétés antigéniques	29
4.1 Les antigènes	29
4.2 Production de particules virales de synthèse	29
5. Culture et norovirus murin	30
6. Propriétés physicochimiques	30
B. Infections à norovirus humains et diagnostic biologique	31
1. Pathogenèse et défense de l'hôte	31
2. Manifestations cliniques	33
3. Modes de Transmission	34
4. Contrôle et prévention	35
5. Diagnostic des norovirus humains	36
5.1 Détection du génome	36
5.2 Détection des antigènes	37
5.3 Analyses sérologiques	37
C. Épidémiologie des norovirus	39
1. Prévalence et incidence	39
2. Les norovirus dans l'environnement	40
3. Caractéristiques épidémiologiques	41
3.1 Les gastroentérites sporadiques	41
3.2 Les gastroentérites épidémiques	41
3.2.1 <i>Les épidémies dans les collectivités</i>	42

3.2.2 <i>Les toxi-infections alimentaires collectives</i>	42
4. Épidémiologie moléculaire	43
4.1 Les norovirus GII.4	43
4.2 Les norovirus recombinants	45
D. Les ligands des norovirus	47
<hr/>	
1. La découverte des ligands cellulaires des norovirus	47
2. Biochimie des glycanes	48
2.1 Les glycoconjugués	48
2.2 Les glycosyltransférases	49
2.3 Les antigènes tissulaires de groupes sanguins ABH	50
3. Déterminants génétiques de la résistance de l'hôte	51
4. Structure du site de liaison aux HBGA	53
5. Profils de reconnaissance des HBGA par les norovirus	55
5.1 Reconnaissance en fonction du génotype	55
5.2 Le cas particulier des norovirus GII.4	55

A. NOROVIRUS : DÉFINITION ET CARACTÉRISTIQUES VIROLOGIQUES

Norovirus est l'un des cinq genres connus de la famille *Caliciviridae* (Green, 2007) avec les genres *Lagovirus* (lapins, lièvres (Ohlinger et coll., 1990 ; Parra et Prieto, 1990 ; Meyers et coll., 1991)), *Sapovirus* (humains, porcs, visons (Chiba et coll., 1979)), *Vesivirus* (lions de mer, autres animaux marins, porcs, chats, chiens, poissons, bétail et primates (Smith et coll., 1973)). Le genre *Nebovirus* a été récemment proposé comme cinquième membre des *Caliciviridae* (Figure 1) (Simmonds et coll., 2008). Composé d'un seul cluster, il infecterait uniquement les bovins (Smiley et coll., 2002 ; Oliver et coll., 2006). Un autre candidat pour un nouveau genre de la famille *Caliciviridae* a été proposé et correspond à un virus détecté chez le macaque Rhésus (Farkas et coll., 2008).

Les calicivirus animaux ont été associés à tout un éventail de syndromes cliniques, incluant des stomatites, des infections des voies aériennes supérieures et des maladies systémiques s'accompagnant de syndromes hémorragiques sévères. Les norovirus peuvent être également détectés chez diverses espèces porcines, bovines, ovines, murines, félines et canines (Sugieda et Nakajima, 2002 ; Karst et coll., 2003 ; Wang et coll., 2005 ; Hsu et coll., 2007 ; Martella et coll., 2007 ; Oliver et coll., 2007 ; Martella et coll., 2008).

Chez l'homme, les norovirus sont responsables de gastroentérites aiguës, d'infections entériques modérés ou asymptomatiques, tandis que chez l'animal, ils sont plus souvent responsables d'infections pauci- ou asymptomatiques. Chez la souris *STAT1^{-/-}* présentant une immunodéficiences due à une anomalie du système immunitaire inné (absence de réponse par interféron), le norovirus murin est responsable d'encéphalites, vascularites, pneumonies et hépatites, démontrant le large tropisme tissulaire de ces virus (Karst et coll., 2003).

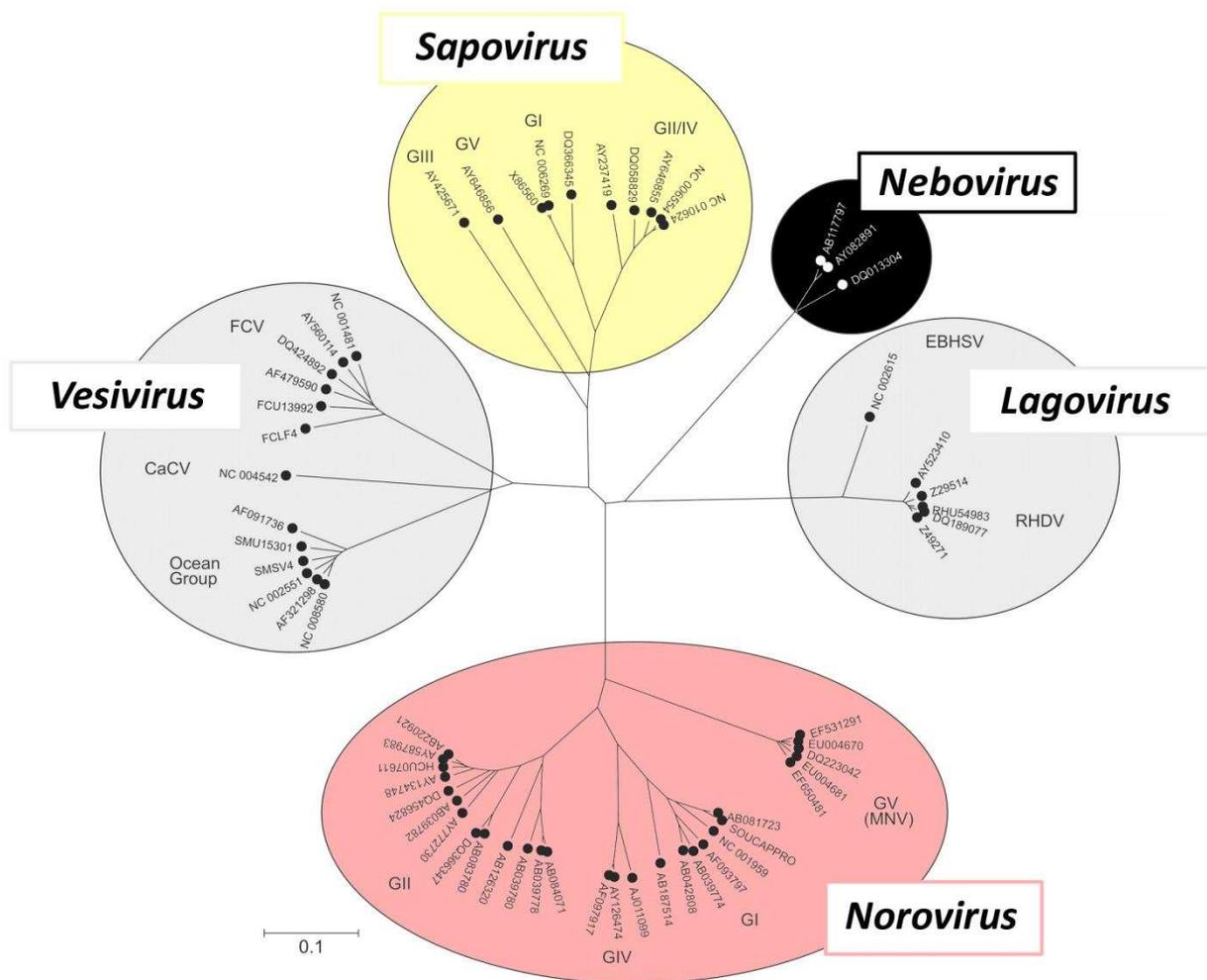


Figure 1. Arbre phylogénétique de la famille Caliciviridae et de ses cinq genres basé sur la séquence de la polymérase, d'après Simmonds et coll. (Simmonds et coll., 2008)

1. Historique

En 1968, une épidémie de gastroentérites mêlant diarrhées et vomissements se déclara chez des élèves et des enseignants d'une école primaire à Norwalk dans l'Ohio, États-Unis. L'étiologie infectieuse de cette infection décrite sous le nom de *hyperemesis hiemis* ou *winter vomiting disease* est alors encore inconnue (Zahorsky, 1929). Après de nombreuses tentatives infructueuses pour identifier l'agent pathogène de cette forme particulière de gastroentérite, Kapikian et coll. décrivent finalement pour la première fois en 1972 des particules virales qu'ils retrouvent dans des échantillons de selles de volontaires expérimentalement infectés par un extrait purifié de selles d'un patient infecté lors de cette épidémie dans la ville de Norwalk (Kapikian, 2000).

A l'aide de techniques d'immuno-électro-microscopie, de petites particules non enveloppées et d'un diamètre de 27 nm ressemblant à des picornavirus ou des parvovirus ont pu être détectées (Figure 2). D'abord dénommés « Agents de Norwalk » en référence à la ville de leur

première identification grâce à la biologie moléculaire, ils sont aujourd'hui regroupés dans le genre *Norovirus* et classés dans la famille des *Caliciviridae*. Ce sont les premiers virus de gastroentérite identifiés chez l'homme.

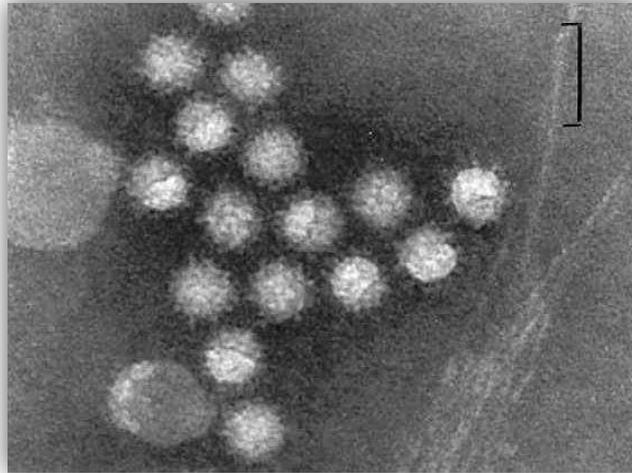


Figure 2. Photo de norovirus vus en microscopie électronique
(Pr A. BOSH, Département de microbiologie, Université de Barcelone, Espagne)

L'absence d'un système de culture cellulaire continue à gêner considérablement la recherche sur les norovirus humains (Duizer *et coll.*, 2004). Cependant, le clonage et le séquençage de la souche prototype, le virus de Norwalk, en 1990 (Jiang *et coll.*, 1990) ont permis le développement d'outils moléculaire indispensables à l'étude des norovirus.

2. Classification et génotypes

Les norovirus présentent une grande diversité génétique et antigénique (Hansman *et coll.*, 2004 ; Zheng *et coll.*, 2006). On distingue cinq génogroupes subdivisés en plusieurs génotypes (Ando *et coll.*, 2000 ; Vinje *et coll.*, 2004 ; Zheng *et coll.*, 2006) (Figure 3). Seuls les génogroupes I, II et IV sont impliqués dans les infections humaines. Les génogroupes I et II, comprenant respectivement 8 (GI.1 à GI.8) et 19 (GII.1 à GII.19) génotypes de norovirus humains (Zheng *et coll.*, 2006), sont les plus importants dans les épidémies (Gallimore *et coll.*, 2004a ; Bon *et coll.*, 2005).

Les norovirus du génogroupe I (GI) qui comptent actuellement 8 génotypes n'ont été isolés jusqu'ici que chez l'homme ou dans l'environnement. Le prototype est le virus de Norwalk ou GI.1. Les norovirus du génogroupe II (GII) regroupent quant à eux 19 génotypes détectés essentiellement chez l'homme, excepté pour trois d'entre eux retrouvés chez le porc (GII.11, GII.18, GII.19), ainsi qu'un génotype recombinant, les norovirus GIIB, dont la capsid se

rapporte le plus des GII.3 parfois des GII.4 (Jiang *et coll.*, 1999a ; Buesa *et coll.*, 2002 ; Ambert-Balay *et coll.*, 2005). Du point de vue épidémiologique, les GII.4 sont très largement prédominants et représentent près de 80 à 90% des infections à norovirus chez l'homme. Les norovirus du génogroupe III (GIII) infectent exclusivement les bovins ; ils regroupent 2 génotypes (Zheng *et coll.*, 2006). Les norovirus du génogroupe IV (GIV), représentés par l'unique génotype GIV.1 Alphanon, sont pathogènes pour le lion et le chien mais également l'homme chez qui ils provoquent des diarrhées (Vinje *et Koopmans*, 2000 ; Martella *et coll.*, 2007 ; Martella *et coll.*, 2008). Enfin, les norovirus du génogroupe V (GV) sont d'origine murine (Karst *et coll.*, 2003), constituant un sérotype unique, le MNV-1 ou GV.1 (Zheng *et coll.*, 2006 ; Thackray *et coll.*, 2007).

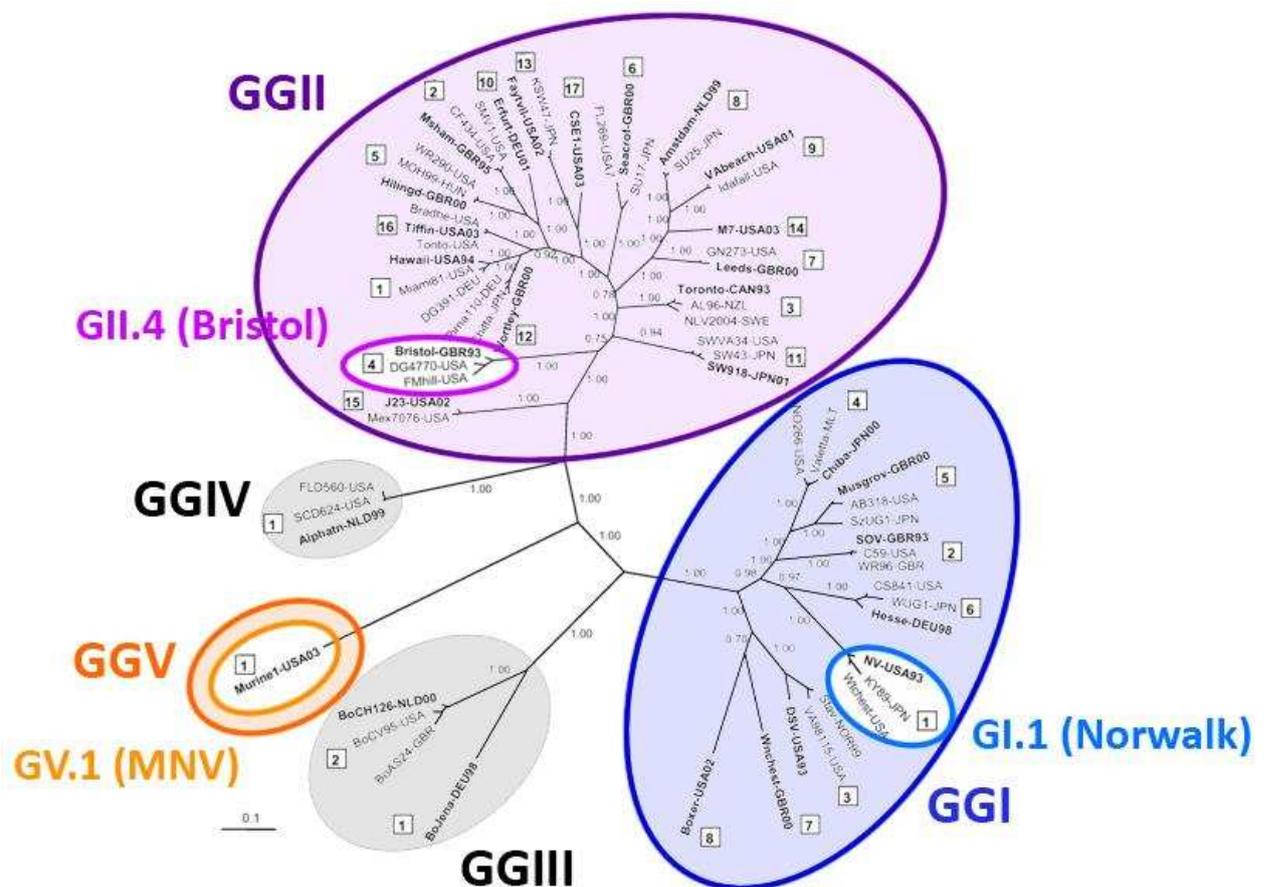


Figure 3. Classification et distribution des norovirus basées sur les séquences des capsides, d'après Zheng *et coll.* (Zheng *et coll.*, 2006)

3. Structure virale

Comme tous les membres de la famille *Caliciviridae*, les norovirus possèdent une protéine virale associée à un ARN génomique et une capside icosaédrique non enveloppée de 27 à 40 nm de diamètre.

L'ARN génomique du norovirus est un ARN simple brin de polarité positive, protégé par une protéine jouant le rôle de coiffe, la protéine VPg, à l'extrémité 5', et polyadénylé à l'extrémité 3' (Figure 4). Cette molécule d'ARN d'environ 7.500 bases se comporte donc de par sa structure et sa composition comme un ARN messager, directement traduisible par la machinerie cellulaire.

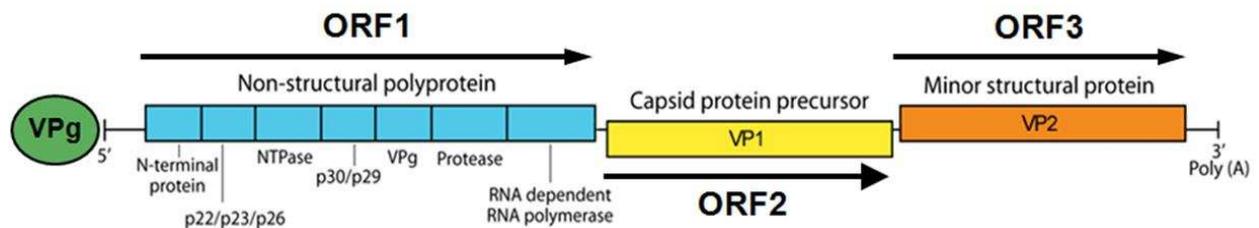


Figure 4 : Schéma de la structure génomique de norovirus avec ses 3 cadres de lectures ouverts (ORF) et les différentes régions codantes

Le génome est organisé en 3 cadres de lecture ouverts (ORF ou *open reading frame*) bordés en 5' et 3' d'une région non codante, respectivement de 4 et 50 bases (Jiang *et coll.*, 1993 ; Lambden *et coll.*, 1993). L'ORF1 code pour une grande polyprotéine précurseur de 200 kDa qui fournira par protéolyse les protéines non structurales (Liu *et coll.*, 1996) ; l'ORF2 code pour la protéine majeure de capsid VP1 d'environ 60 kDa ; et l'ORF3 code pour une protéine mineure structurale, VP2, dont la fonction reste encore inconnue et dont la taille peut varier d'un génotype à l'autre (Seah *et coll.*, 1999).

Trois protéines sont présentes dans les virions matures de norovirus : les protéines VP1, VP2 et VPg (Schaffer *et coll.*, 1980 ; Sosnovtsev *et Green*, 2000). Les autres protéines non structurales sont utilisées pour la réplication du virus dans la cellule hôte.

3.1 Les protéines non structurales

Le premier cadre de lecture est le plus long et représente environ 5.100 nucléotides de long. L'ORF1 code une polyprotéine de 200 kDa qui permet d'obtenir par protéolyse les protéines non structurales. Ce précurseur n'a jamais été observé probablement du fait du caractère rapide et co-translationnel du processus protéolytique (Liu *et coll.*, 1996 ; Sosnovtseva *et coll.*, 1999). Le clivage protéolytique s'effectue sur six sites chez norovirus dont un à lieu au niveau de l'extrémité N-terminal de la polyprotéine (Liu *et coll.*, 1996 ; Liu *et coll.*, 1999 ; Seah *et coll.*, 2003 ; Sosnovtsev *et coll.*, 2006). Le clivage est médié par une protéinase virale « 3C-like » (Pro) selon la terminologie adoptée pour les *Picornaviridae* et dont le site actif est une cystéine (Boniotti *et coll.*, 1994).

Cette polyprotéine se divise donc en plusieurs domaines, NS1 à NS7. Chacun de ces domaines correspond à des enzymes virales différentes dont la ou les fonctions sont essentielles à la réplication virale. La maturation de la polyprotéine est séquentielle selon un processus auto-protéolytique et génère de manière stœchiométrique sept protéines dont la plupart sont encore peu ou pas caractérisées (difficulté de synthèse, solubilité faible de la protéine, perte de la fonction biologique). Les plus importantes, NS5, NS6 et NS7, correspondent respectivement à la protéine de coiffe VPg, la protéinase viral et l'ARN-polymérase-ARN-dépendante (Hardy, 2005). Ces protéines possèdent des analogies de séquences et de propriétés chimiques avec des protéines présentes chez les picornavirus, et notamment le poliovirus (Neill, 1990). Les caractéristiques et les fonctions des protéines non structurales des norovirus sont citées ci-après (Tableau 1).

Il est intéressant de noter que la protéine VPg qui est liée de manière covalente à l'ARN génomique et subgénomique dans les cellules infectées (Herbert *et coll.*, 1997 ; Dunham *et coll.*, 1998) joue un rôle essentielle dans la réplication du virus.

Tableau 1. Inventaire des protéines non structurales codées par l'ORF1

Dénomination		Équivalent poliovirus	PM KDa	Position sur le génome de MD145 ^a	Fonction(s) – Propriété(s)
Ancienne	Nouvelle				
N-term	NS1/2	2AB	37	5-995	Inconnue - interaction avec l'appareil de Golgi (Fernandez-Vega <i>et coll.</i> , 2004)
NTPase	NS3	2C	40	996-2093	Inconnue - fonction NTPase (Pfister <i>et Wimmer</i> , 2001)
P20-p24	NS4	3A	20.2	2094-2630	Inconnue - interaction probable avec l'appareil de Golgi
VPg	NS5	3B-VPg	15.8	2631-3029	Coiffe de l'ARN génomique - Agent recruteur des facteurs traductionnels de la cellule hôte - Intervient dans la réplication (Daughenbaugh <i>et coll.</i> , 2003 ; Belliot <i>et coll.</i> , 2008b)
Pro	NS6	3C ^{pro}	19.3	3030-3572	Protéinase - maturation des protéines virales - clivage des protéines cellulaires - intervient dans les phénomènes de <i>shut off</i> (Liu <i>et coll.</i> , 1996 ; Belliot <i>et coll.</i> , 2003 ; Kuyumcu-Martinez <i>et coll.</i> , 2004)
Pol	NS7	3D ^{pol}	57	3573-5102	Polymérase – et nucléotidylation de la protéine VPg (Belliot <i>et coll.</i> , 2005)

^a souche de GII.4 référencée dans GenBank sous le numéro AY032605

3.2 Les protéines structurales

3.2.1 La protéine de capsid VP1

La protéine VP1 a été la première dont la structure atomique a été déterminée par cristallographie et cryomicroscopie (Prasad *et coll.*, 1999). Elle constitue la protéine structurale majeure du virus et est présente en 180 copies par virions sous forme de dimères (Prasad *et coll.*, 1996). Elle joue un rôle critique dans la détermination du phénotype antigénique et dans les interactions du virus avec les cellules hôtes. Cette protéine de 58 à 60 kDa selon le génogroupe ne subit aucune modification post-traductionnelle (Figure 5).

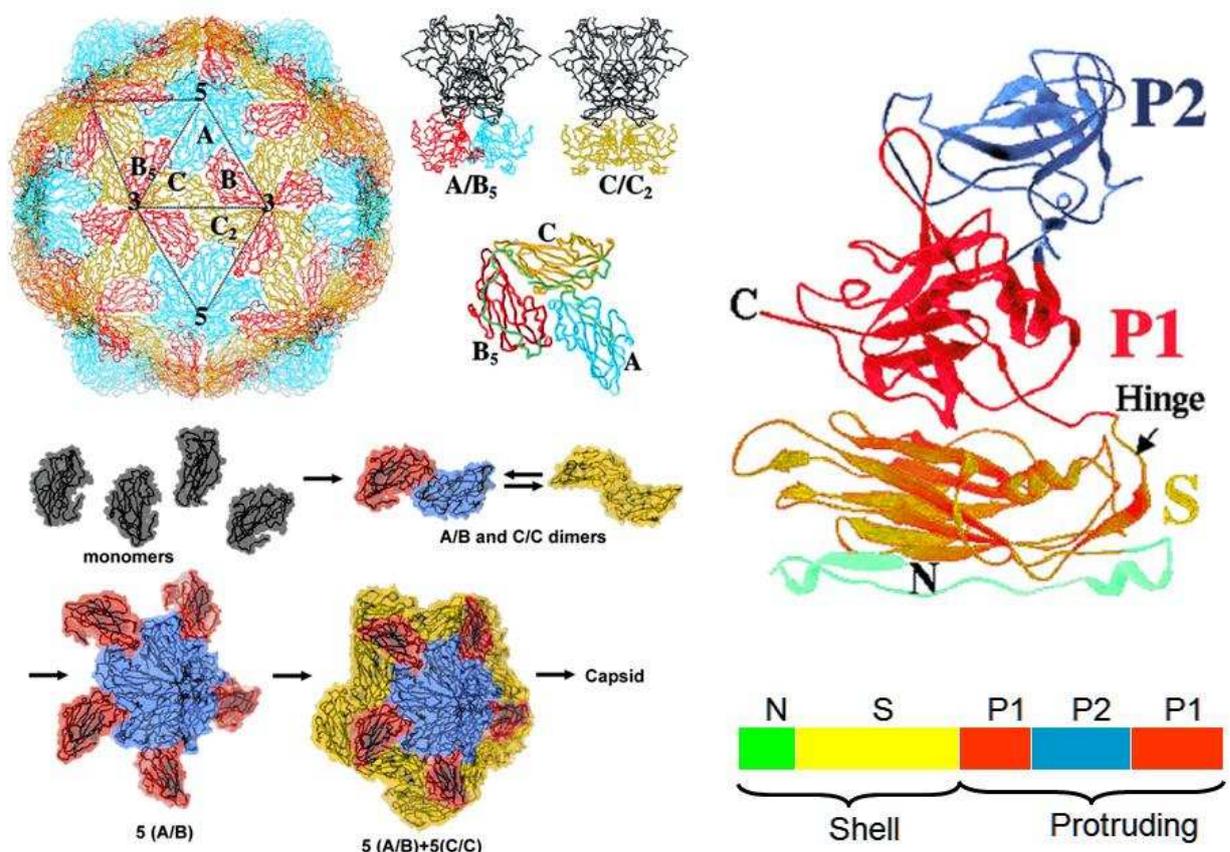


Figure 5. Structure et assemblage de la protéine de capsid VP1

Les virions ont une structure icosaédrique de symétrie T=3. La capsid se compose de 180 protéines VP1 s'organisant en 90 dimères de protéines VP1 tête-bêche formant chacun une arche à la surface de la capsid (Prasad *et coll.*, 1994 ; Prasad *et coll.*, 1999 ; Prasad *et coll.*, 2001 ; Chen *et coll.*, 2004). L'assemblage de la protéine de capsid VP1 ne requiert pas la présence de l'ARN génomique (Jiang *et coll.*, 1992) ni celle de la protéine mineure de capsid VP2 dans la formation du virion (Figure 6).

D'un point de vue structural, la protéine VP1 possède plusieurs domaines (exemple du GI.1) :

- le domaine N (résidus d'aa 10 à 49) qui constitue la partie N-terminal et se situe sur la face interne de la capsid,
- le domaine S (résidus d'aa 50 à 225) qui est essentiel à la formation de la capsid et correspond à la région la plus conservée de VP1,
- le domaine P (résidus d'aa 226 à 520) qui correspond au domaine variable de la capsid. Dans le dimère, les domaines P forment une arche et constituent la partie externe de la capsid. Il est lui-même divisé en deux sous-domaines (*Prasad et coll., 1999 ; Chen et coll., 2004 ; Chen et coll., 2006*) :
 - le sous-domaine P1 (résidus d'aa 226 à 278 et 406 à 520) qui est plutôt conservé,
 - et le sous-domaine P2 (résidus d'aa 279 à 405), le plus externe, qui correspond à la région hypervariable de la capsid (*Nilsson et coll., 2003 ; Chakravarty et coll., 2005*). Très immunogène, il contient les acides aminés permettant l'attachement du virus à son ligand glycosidique (*Prasad et coll., 1999 ; Cao et coll., 2007*). Les modifications structurales consécutives à des mutations dans cette zone ont une possible incidence sur l'antigénicité du virus (*Lochridge et coll., 2005*) et ses interactions à son récepteur cellulaire (*Tan et coll., 2003*).

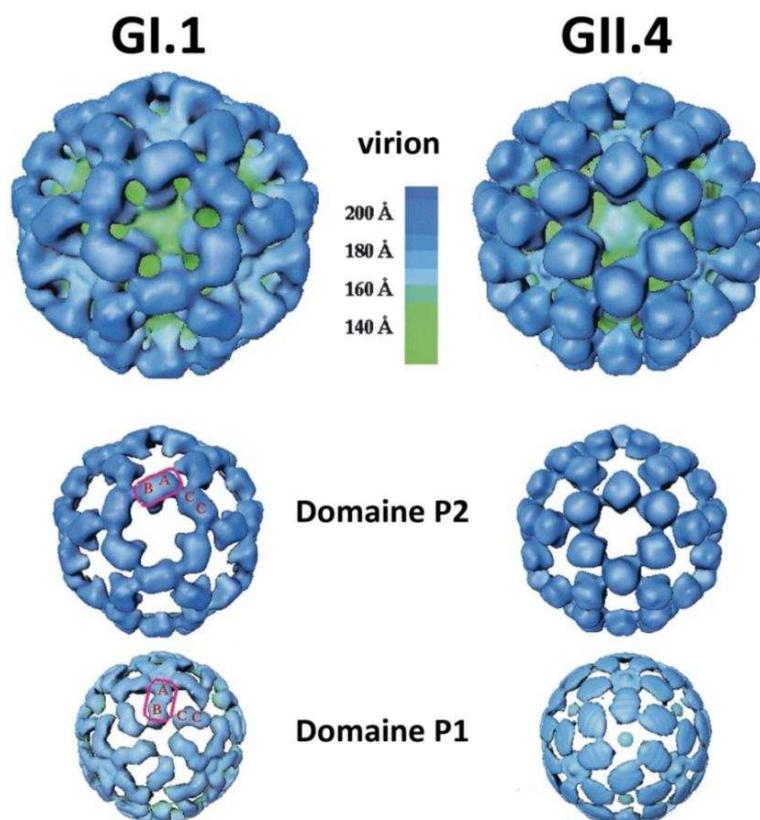


Figure 6. Vues externes par cryomicroscopie électronique de norovirus GGI et GGII montrant les différences de structure (*Prasad et coll., 1994 ; Chen et coll., 2004*).

3.2.2 La protéine VP2

La protéine structurale VP2 est une protéine très basique et a un poids moléculaire d'environ 20 à 29 kDa. Seules une ou deux copies seraient présentes dans la particule virale où sa fonction reste inconnue (Glass *et coll.*, 2000a ; Sosnovtsev et Green, 2000 ; Glass *et coll.*, 2003). Elle présente une grande hétérogénéité dans sa séquence primaire et le nombre d'acides aminés qui la compose est très variable selon le génogroupe. Cette protéine n'a pas d'équivalent dans les autres familles virales. Les premiers travaux sur cette protéine ont montré qu'elle permettrait d'accroître la stabilité de la capside (Bertolotti-Ciarlet *et coll.*, 2003 ; Glass *et coll.*, 2003 ; Kaiser *et coll.*, 2006).

Des expériences de mutagenèse ont également montré que la protéine VP2 était essentielle pour le bon déroulement du cycle viral. En effet, sa suppression n'entraîne pas l'arrêt de la réplication de l'ARN viral dans la cellule hôte mais aucune particule virale infectieuse n'est obtenue sans une protéine VP2 intacte (Sosnovtsev *et coll.*, 2005). Sosnovtsev *et coll.* ont démontré que la partie 3' de la séquence codant VP2 était aussi essentielle à la réplication du FCV (Sosnovtsev *et coll.*, 2005). Ces observations ont été confirmées par la mise en évidence d'une structure CRE (*Cis Replication Element*) (Belliot *et coll.*, 2008b). Sosnovtsev *et coll.* ont également montré que la réplication du FCV pouvait être rétablie en complétant avec une protéine VP2 exogène, démontrant que cette protéine peut aussi fonctionner en *trans* (Sosnovtsev *et coll.*, 2005).

3.3 Réplication

La stratégie de réplication des calicivirus partage de nombreux éléments avec les autres virus à ARN de polarité positive. La première étape correspond à l'interaction du virion avec la cellule hôte à l'aide d'un ligand spécifique, notamment un glycanne (Kreutz *et coll.*, 1994 ; Maeda *et coll.*, 2002 ; Marionneau *et coll.*, 2002 ; Tamura *et coll.*, 2004). Une fois la particule internalisée, l'ARN génomique est relargué dans le cytoplasme. L'initiation de la réplication de l'ARN est probablement médiée par l'interaction du complexe génome-protéine VPg avec la machinerie cellulaire (Gutierrez-Escolano *et coll.*, 2000 ; Daughenbaugh *et coll.*, 2003 ; Goodfellow *et coll.*, 2005).

La traduction de l'ORF1 permet la production de la polyprotéine qui est alors découpée par la protéase virale (Pro) (Sosnovtsev *et coll.*, 2002). L'initiation de la synthèse du brin anti-sens débute alors à l'extrémité 3' du brin sens dans le complexe de réplication (Green *et coll.*, 2002b ; Gutierrez-Escolano *et coll.*, 2003). Le brin néoformé sert à son tour de matrice pour la

production d'un brin d'ARN génomique et un brin d'ARN subgénomique (Neill et Mengeling, 1988). Le nombre important de brins d'ARN subgénomique formés sert alors à la synthèse des protéines structurales, VP1 et VP2 (Neill et Mengeling, 1988 ; Herbert *et coll.*, 1996). La régulation de la synthèse de VP2 qui représente environ 20% de la production de VP1, indispensable à la production de virion infectieux (Sosnovtsev *et coll.*, 2005), ferait intervenir des mécanismes d'arrêt et de réinitiation dans lesquels les séquences terminales de la région codant VP1 contiennent un signal pour la traduction de VP2 (Meyers, 2003). En ce qui concerne les dernières étapes de la réplication, ni la maturation ni la libération des virions n'ont encore été élucidées.

4. Propriétés antigéniques

4.1 Les antigènes

Les antigènes des norovirus correspondent aux différents épitopes présents sur la protéine majeure de capsid VP1. La culture n'étant pas disponible pour les norovirus infectant l'homme, l'élaboration d'une technique de sérotypage par neutralisation est donc impossible.

4.2 Production de particules virales de synthèse

En l'absence de système de culture, la pérennisation des souches de norovirus est impossible. En revanche, des particules virales (VLP) ou des particules P (particules constituées de 12-24 dimères de domaine P et ayant les mêmes propriétés que les VLP (Tan et Jiang, 2005a)), peuvent être produites grâce à des techniques de biologie moléculaire sur des supports tels que des baculovirus, des bactéries, des levures ou encore des plantes transgéniques (Ball *et coll.*, 1996 ; Estes *et coll.*, 1997 ; Tacket *et coll.*, 2000 ; Xia *et coll.*, 2007).

Les dimères capsidiaux de protéine VP1 ont en particulier la capacité de s'auto-assembler pour former des particules non infectieuses ou pseudo-particules recombinantes (Jiang *et coll.*, 1992). Leur structure est en tous points similaires aux particules qui sont excrétées durant l'infection et possèdent les mêmes propriétés antigéniques et biochimiques (Green, 2007). Ces capsides de synthèse peuvent être isolées par des techniques classiques de concentration et de purification sur gradient de sucrose ou de chlorure de césium par ultracentrifugation.

Ces protéines recombinantes ont permis la production d'anticorps monoclonaux spécifiques des norovirus et l'établissement des réactifs immunologiques pour leur détection (Hardy *et*

coll., 1996 ; Jiang *et coll.*, 2000), l'étude des interactions des norovirus avec leur(s) ligand(s) (Marionneau *et coll.*, 2002), ainsi que des études structurales sur la capsid (Venkataram Prasad *et coll.*, 2000). Enfin, elles constituent le meilleur candidat pour un vaccin contre les norovirus humains.

5. Culture et norovirus murins

Il n'existe actuellement aucun système de culture cellulaire pour les norovirus responsables de gastroentérites chez l'homme, c'est-à-dire pour les norovirus GI et GII. Les nombreuses tentatives de mise en culture des norovirus au cours des trois dernières décennies ont été vouées à l'échec (Duizer *et coll.*, 2004).

Seul un membre du genre *Norovirus*, le norovirus murin ou MNV peut se multiplier efficacement sur culture cellulaire (Karst *et coll.*, 2003 ; Wobus *et coll.*, 2004). En 2003, le MNV-1 a été le premier membre du génogroupe V à être découvert grâce à une lignée de souris sévèrement immunocompromises et déficientes pour la réponse immunitaire innée et adaptative (Karst *et coll.*, 2003). Ces souris STAT1^{-/-} ont été obtenues par *knockout* génétique du gène *STAT-1* et présentent un défaut de réponse par interféron (INF). Le MNV se multiplie en culture sans condition particulière sur des lignées primaires de macrophages ou de cellules dendritiques mais c'est sur des cellules immortalisées, dérivées de macrophages murins, les cellules RAW264.7 que l'on obtient les meilleurs résultats. Il perd néanmoins rapidement sa pathogénicité chez la souris après 3 passages en culture. L'analyse des séquences génomiques a montré que cette atténuation du pouvoir pathogène était due à deux mutations ponctuelles secondaires à la pression de sélection, l'une dans NS4, limitant la réplication, et l'autre dans VP1, affectant l'accroche au récepteur, son affinité ou sa spécificité (Bailey *et coll.*, 2008).

6. Propriétés physicochimiques

Les norovirus possèdent une densité de flottaison qui varie de 1,33 à 1,41 g/cm³ (ou g/ml) dans le chlorure de césium (CsCl) (Kapikian *et coll.*, 1973), et les particules de synthèses une densité de flottaison de 1,31-1,32 g/cm³ (Belliot *et coll.*, 2001). Ils conservent leur pouvoir infectieux après exposition à pH 2,7 pendant 3 heures à température ambiante, après traitement avec 20% d'éther à 4°C pendant 18 heures ou après 30 minutes d'incubation à 60°C (Dolin *et coll.*, 1972). Les norovirus sont également résistants à l'inactivation après chloration des eaux de boisson (Keswick *et coll.*, 1985).

B. INFECTIONS À NOROVIRUS HUMAINS ET DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE

1. Pathogenèse et défense de l'hôte

Les norovirus humains pénètrent essentiellement dans l'hôte par ingestion ou plus exceptionnellement par aérosolisation de vomissures (Caul, 1994). Leurs propriétés physico-chimiques leur permettent de résister à l'acidité gastrique et de pénétrer dans l'intestin.

Bien que le site de réplication ne soit pas bien établi, différentes études tendent à montrer que le site infectieux se situerait au niveau du jéjunum. Des biopsies de la muqueuse intestinale permettent de montrer la présence de lésions histopathologiques correspondant à des lésions villositaires atrophiées avec une hypertrophie des cryptes intestinales, une infiltration par des cellules mononucléées et la présence de vacuoles cellulaires intracytoplasmiques sans pour autant porter atteinte à l'intégrité cellulaire (Agus *et coll.*, 1973 ; Schreiber *et coll.*, 1973). Cette atrophie villositaire a cependant pour conséquence l'apparition d'une malabsorption transitoire avec altération du système enzymatique de la bordure en brosse des entérocytes qui est à l'origine de la diarrhée (Agus *et coll.*, 1973 ; Schreiber *et coll.*, 1973). Les muqueuses gastriques et coliques ne présentent quant à elles aucune lésion.

Après réplication, les virus néoformés sont excrétés dans la lumière intestinale puis éliminés avec les selles. Ces nouveaux virions peuvent être détectés par PCR avant l'apparition des premiers signes et jusqu'à plusieurs jours voire des semaines après la guérison, tout particulièrement chez le nourrisson (Okhuysen *et coll.*, 1995 ; Gaulin *et coll.*, 1999 ; Rockx *et coll.*, 2002 ; Murata *et coll.*, 2007 ; Kirkwood et Streitberg, 2008) mais aussi chez les personnes âgées (Lee *et coll.*, 2007). La persistance d'une excrétion virale au-delà de la période stricte de

la maladie symptomatique pose le problème du contrôle des épidémies consécutives à la manipulation des aliments lors de leur préparation (Reid *et coll.*, 1988 ; Parashar *et coll.*, 1998). Par ailleurs, une excrétion prolongée, parfois pendant plusieurs années, est fréquemment observée chez les patients immunocompromis (Siebenga *et coll.*, 2008).

La réponse immunitaire vis-à-vis des norovirus est de courte durée (jusqu'à 14 semaines). Elle est homotypique, c'est-à-dire que l'immunité acquise pour un génogroupe/génotype particulier ne permet pas d'avoir une protection efficace vis-à-vis d'un autre génogroupe/génotype (Wyatt *et coll.*, 1974), le sujet étant donc exposé à une nouvelle infection. En outre, il est fort possible que la grande diversité génétique qu'offrent les norovirus se traduise par une importante diversité antigénique de telle sorte que l'infection par un génotype ne confère pas d'immunité pour un autre génotype ou vis-à-vis de variants d'un même génotype (Siebenga *et coll.*, 2007 ; Lindesmith *et coll.*, 2008).

Il a été observé que les taux sériques d'anticorps ne sont en réalité pas corrélés avec la résistance à l'infection et, plus récemment, une étude a montré qu'au niveau local le développement d'une réponse rapide par des IgA sécrétoires par la muqueuse pouvait conférer une protection vis-à-vis de l'infection (Lindesmith *et coll.*, 2003). La réponse immunitaire de type cellulaire fait intervenir quant à elle une augmentation d'interféron gamma (IFN γ) et d'interleukine 2 (IL-2) en l'absence de production d'IL-4, d'IL-6 et d'IL10, ce qui suggère que la voie Th1 est privilégiée (Tacket *et coll.*, 2003 ; Lindesmith *et coll.*, 2005).

Diverses études ont suggéré que d'autres facteurs non immunologiques, notamment d'ordre génétique, devaient jouer un rôle dans la protection et/ou la résistance à l'infection par norovirus (Parrino *et coll.*, 1977). Quelques études d'infection de volontaires sains ou portant sur des cas d'épidémies ont en effet montré que près de 45% des adultes contractaient la maladie avec une bonne réponse immunologique, mais que, curieusement, 55% des volontaires n'étaient jamais infectés. (Parrino *et coll.*, 1977 ; Kaplan *et coll.*, 1982 ; Johnson *et coll.*, 1990 ; Lindesmith *et coll.*, 2003). En outre, seule la moitié des sujets infectés présentaient une symptomatologie. Parmi les mécanismes de résistance, l'implication des antigènes tissulaires de groupes sanguins et de leurs enzymes, les fucosyltransférases (FUT) et plus particulièrement l' α -1,2-fucosyl-transférase (FUT2), que nous aborderons plus loin, a été explorée (Figure 7).

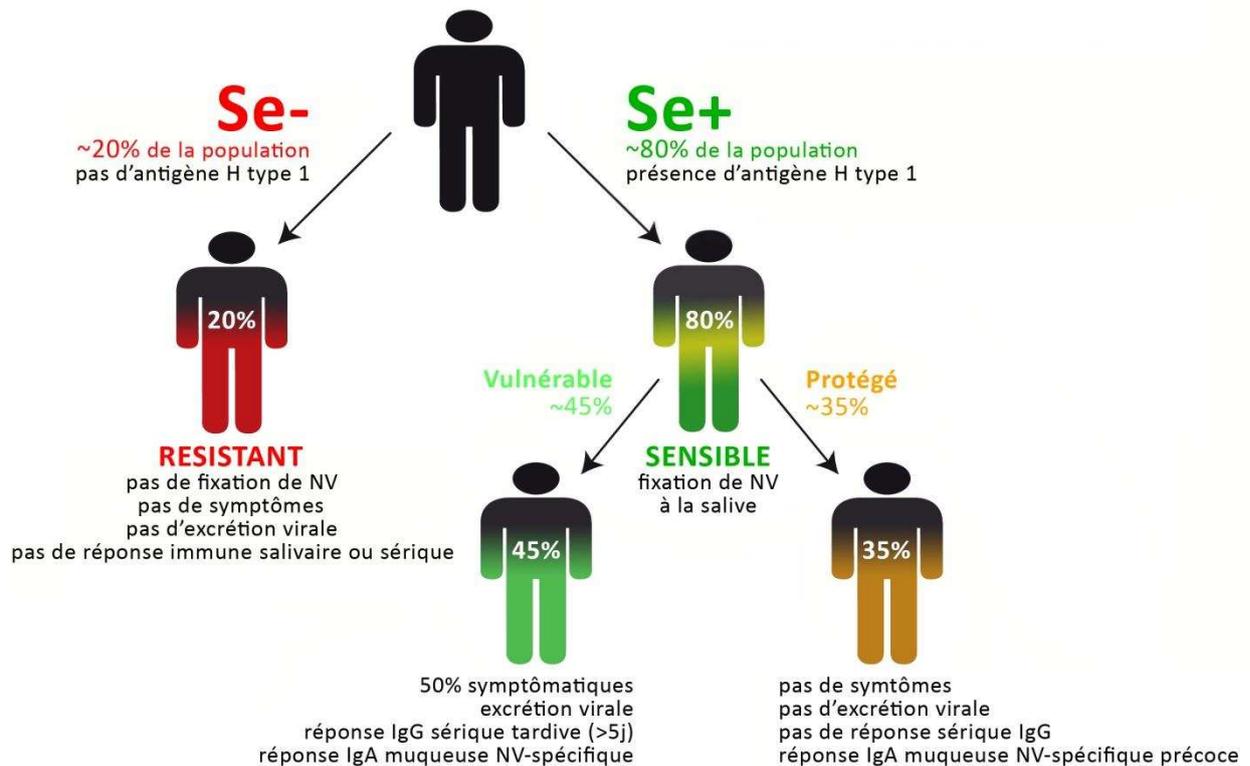


Figure 7. Modèle d'infection par norovirus en fonction du caractère sécréteur ou non-sécréteur (présence du gène FUT2 fonctionnel ou pas, respectivement), d'après Lindesmith et coll. (Lindesmith et coll., 2003). Les pourcentages des individus non-sécréteurs Se-, des sécréteurs Se+ infectés et protégés sont probablement influencés par l'âge, l'ethnie et les antécédents d'exposition.

2. Manifestations cliniques

Les gastroentérites à norovirus sont généralement bénignes chez les enfants et les adultes en bonne santé, ne causant que très rarement des déshydratations sévères nécessitant une hospitalisation. Dans les pays moins avancés sur le plan médico-social, la sévérité des gastroentérites à norovirus hospitalisées est comparable à celle des rotavirus et pourrait témoigner d'un retard de prise en charge (Sdiri-Loulizi et coll., 2008). Les infections à norovirus sont en revanche à surveiller chez les immunodéprimés où elles peuvent devenir chroniques et chez les personnes âgées où elles sont généralement plus graves et plus fréquentes, pouvant s'accompagner d'une déshydratation déstabilisant leur état précaire et entraînant une hospitalisation voire le décès. La surmortalité liée à ces gastroentérites se situerait entre 0,8 et 2,8% (Lopman et coll., 2003a). La durée généralement constatée de la période symptomatique de l'infection est habituellement de 12 à 48 heures.

Après contamination, l'incubation est assez courte, entre 4 et 77 heures, mais on constate en générale une moyenne de 24 à 48 heures avant l'apparition des symptômes entéritiques (Kaplan et coll., 1982). Les principales caractéristiques cliniques de l'infection par le norovirus

sont regroupées autour d'une symptomatologie gastroentéritique incluant nausées, vomissements, douleurs abdominales, diarrhée et fièvre modérée. Des maux de tête et de gorge, des myalgies et une perte de l'appétit ont également été signalés (Wyatt *et coll.*, 1974 ; Kaplan *et coll.*, 1982).

Les accès diarrhéiques sont souvent liquidiens sans présence de mucus, de sang ou encore de leucocytes. Les vomissements semblent quant à eux plus fréquents chez l'enfant que chez l'adulte et pourraient être, comme les nausées, le reflet de troubles moteurs gastro-intestinaux dont le mécanisme n'a pas encore été mis en évidence (Meeroff *et coll.*, 1980).

3. Modes de Transmission

Le mode féco-oral est la principale voie de transmission du virus, soit de façon directe, soit par la contamination de surfaces de l'environnement (poignées de porte, mobilier et objets divers) qui joue un rôle de relais dans la transmission du virus lors d'une épidémie (Glass *et coll.*, 2000b ; Fankhauser *et coll.*, 2002). Par ailleurs les aérosols formés lors des vomissements peuvent représenter un mode de transmission opportuniste qui accélérera encore la propagation du virus dans les collectivités confinées comme les maisons de retraite, les services hospitaliers, les hôtels, les bateaux de croisière et les crèches (Caul, 1995). Les norovirus étant probablement stables dans l'environnement, la contamination de surfaces par des individus infectés facilite la dissémination du virus.

Plusieurs facteurs contribuent à l'impact considérable des infections à norovirus, en particulier lors d'épidémies :

- la résistance du virus aux pH acides ou basiques, à la chaleur, aux concentrations habituelles de chlore favorisent leur persistance dans l'environnement,
- une dose infectieuse faible peut entraîner la maladie (10 unités PCR seraient suffisantes dans le cas du virus Norwalk) (Teunis *et coll.*, 2008),
- et la présence de porteurs asymptomatiques et l'excrétion du virus durant la phase post-symptomatique qui peut durer plusieurs semaines (Tu *et coll.*, 2008).

La transmission alimentaire ou hydrique des infections à norovirus est bien connue et les coquillages ont été souvent incriminés, en particulier les huîtres. Mais de nombreux aliments contaminés ont également été mis en cause : salades, sandwichs, fruits et légumes frais ou congelés, pâtisseries, etc. Ces aliments sont souillés soit par l'intermédiaire du milieu hydrique contaminé (lavage de denrées, irrigation de végétaux consommés crus ou élevage de

coquillages), soit lors de leur manipulation par des personnes infectées et peuvent être responsables d'épidémies touchant plusieurs milliers de personnes. Les exemples en sont donnés par les vagues d'épidémies européennes et américaines consécutives à la commercialisation de framboises contaminées (Ponka *et coll.*, 1999a ; Ponka *et coll.*, 1999b) ou encore aux États-Unis par la contamination du glaçage servant à la confection de gâteaux par un pâtissier (Kuritsky *et coll.*, 1984). Ce mode de transmission, faisant intervenir une personne infectée, symptomatique ou non, ayant manipulé un aliment, serait en fait responsable jusqu'à 67% des épidémies d'origine alimentaire (Mead *et coll.*, 1999 ; Koopmans et Duizer, 2004).

Toutefois, bien que la transmission de personne à personne soit le plus souvent incriminée dans les épidémies, elle peut être secondaire à une origine alimentaire ou hydrique. Le plus souvent celle-ci ne peut être retrouvée, l'introduction du virus dans la collectivité se faisant par une personne infectée symptomatique ou non mais excrétrice du virus.

Il n'existe aujourd'hui aucune preuve de transmission de l'animal à l'homme même si certaines souches présentent des similitudes génétiques, notamment chez le porc (Wang *et coll.*, 2005 ; Mattison *et coll.*, 2007).

4. Contrôle et prévention

Les actions de prévention des infections à norovirus doivent cibler les différents niveaux de la contamination. La protection des zones de production alimentaire ou hydrique (parcs à huîtres, les eaux d'irrigation ou de distribution) repose sur les contrôles en amont, les stations de traitement des eaux usées ou l'interdiction de rejet sauvage. Le contrôle des zones sensibles par les techniques moléculaires facilite la surveillance et accélère les alertes sanitaires. En aval, le respect des règles d'hygiène est indispensable pour éviter la contamination des aliments lors de leur préparation et pour limiter la diffusion du virus de personne à personne. Les surfaces de travail doivent être désinfectées à l'eau de javel. Tout employé malade doit être exclu de son travail jusqu'à 48 à 72 heures après la fin des symptômes.

La prévention repose sur un respect permanent des règles d'hygiène et des précautions dites de contact (Siegel *et coll.*, 2007) avec un lavage soigneux des mains avec de l'eau et un savon antiseptique ou avec des solutions hydroalcooliques choisies pour leur efficacité (Belliot *et coll.*, 2008a). Dès les premiers cas de gastroentérites, ces mesures doivent être renforcées (strict lavage des mains, port d'un sarrau, de masque en cas de vomissements) et être associées à une décontamination des surfaces et de l'environnement à l'aide d'un désinfectant reconnu

virucide pour les norovirus tel que l'hypochlorite de sodium (eau de Javel) (Barker *et coll.*, 2004).

La mise au point d'un vaccin efficace se heurte actuellement à différentes caractéristiques des norovirus humains que sont leur forte variabilité génétique et antigénique, notamment chez les GII.4, leur propension à générer une immunité homotypique à court terme et l'impossibilité actuelle de trouver un système de culture approprié (Estes *et coll.*, 2000). Différentes approches ont été investiguées sans grand succès en se basant sur l'utilisation de particules ou domaines P exprimés sur baculovirus, bactéries, levures ou encore plantes transgéniques (Ball *et coll.*, 1996 ; Estes *et coll.*, 1997 ; Tacket *et coll.*, 2000 ; Xia *et coll.*, 2007). Toutefois, sur un plan strictement économique et commercial, le bien fondé d'un tel vaccin n'est pas évident.

5. Diagnostic des norovirus humains

Compte-tenu d'un intérêt croissant et une meilleure connaissance de l'épidémiologie des norovirus, les tests diagnostics des infections à norovirus est actuellement en plein développement mais reste encore assez confidentiel, notamment en France. Il s'agit de techniques directes.

Bien qu'historiquement la microscopie électronique ait été la technique de choix, en l'absence de réactifs adéquats, pour la découverte de nombreux virus entériques dont les calicivirus et les rotavirus, cette technique par son manque de sensibilité, l'équipement et l'expertise qu'elle requiert, a été peu à peu remplacée par les techniques de biologie moléculaire (RT-PCR et RT-PCR en temps réel) plus simples d'utilisation. Depuis quelques années, on observe également le développement de techniques immunoenzymatiques qui toutefois manquent encore de fiabilité et de sensibilité.

5.1 Détection du génome

Les techniques d'amplification (RT-PCR et RT-PCR en temps réel) sont des méthodes aujourd'hui largement utilisées pour la détection de nombreux virus dans différents types de prélèvements (selles, vomissures, aliments ou encore l'eau). Elles sont devenues les outils standards de détection et de suivi épidémiologique des norovirus. L'hétérogénéité du génome des norovirus humains ne permet pas la détection des GI et des GII avec un seul jeu d'amorces : amorces et sondes ont généralement comme cible la partie la plus conservée de la polymérase (domaine YGDD) (Kageyama *et coll.*, 2003).

Pour détecter la totalité des génotypes connus, ces techniques utilisent plusieurs couples d'amorces ciblant une région conservée de l'ORF1 codant la polymérase (Ando *et coll.*, 1995 ; Vinje et Koopmans, 1996 ; Jiang *et coll.*, 1999b ; Fankhauser *et coll.*, 2002). D'autres amorces ont été développées pour amplifier les régions de l'ORF2 codant la protéine de capsid VP1 (Le Guyader *et coll.*, 1996 ; Kojima *et coll.*, 2002 ; Vennema *et coll.*, 2002 ; Vinje *et coll.*, 2004 ; Siebenga *et coll.*, 2009). L'hybridation ou le séquençage du produit amplifié permet le génotypage du virus. D'une manière générale, l'amplification de la partie la plus conservée de la polymérase permet la détection du virus et d'établir un typage préliminaire par séquençage. L'amplification de la région située à l'extrémité N-terminale de l'ORF2 permet un typage précis des norovirus (Mattison *et coll.*, 2009). Il existe également des PCR permettant l'amplification de la jonction entre les ORF 1 et 2 et donc de caractériser notamment les norovirus recombinants de type GIIb (Jiang *et coll.*, 1999a ; Buesa *et coll.*, 2002 ; Ambert-Balay *et coll.*, 2005). Enfin, des RT-PCR ont été mises au point pour la détection dans l'environnement, l'eau et la nourriture (Beller *et coll.*, 1997 ; Schwab *et coll.*, 1998 ; Le Guyader *et coll.*, 2004).

Plus récentes, les techniques de RT-PCR quantitative, c'est-à-dire en temps réel, sont de plus en plus utilisées car elles sont plus rapides et peuvent permettre éventuellement de déterminer la charge virale dans les prélèvements (Kageyama *et coll.*, 2003 ; Richards *et coll.*, 2004). Le choix des amorces pour ce type de technique est plus délicat que pour une PCR conventionnelle.

5.2 Détection des antigènes

Depuis quelques années, des trousse de détection des antigènes de norovirus sont disponibles dans le commerce. Ces trousse commerciales sont proposées sous forme d'ELISA ou de tests rapides immunochromatographique (ICT). L'amélioration constatée des dernières trousse commercialisées permet aujourd'hui de les inclure dans une stratégie de diagnostic des épidémies bien que les résultats varient d'un génotype à l'autre. Leur seuil de sensibilité ne dépasse néanmoins que rarement les 50%, ce qui reste encore peu satisfaisant (Gray *et coll.*, 2007) et contraint à tester plusieurs échantillons (au minimum 4 voire 6) pour établir un diagnostic fiable (Duizer *et coll.*, 2007).

5.3 Analyses sérologiques

Les analyses sérologiques visant à détecter des IgG ou des IgM dans le sérum ou des IgA directement dans les selles sont relativement peu fiables et ne reflètent pas nécessairement

l'état infectieux, la réponse immunitaire IgG conséquemment à l'infection par norovirus n'étant généralement pas spécifique de type (Belliot *et coll.*, 2001). Bien qu'il ait été suggéré que les réponses IgM ou IgA soient plus spécifique de type (Gray *et coll.*, 1994), ces techniques diagnostiques n'ont jamais pas été développées, l'obstacle majeur étant qu'il n'existe pas d'antigène de groupe qui soit commun pour tous les norovirus humains.

C. ÉPIDÉMIOLOGIE DES NOROVIRUS

Les infections à norovirus sont responsables chaque année de près de 200.000 décès chez les enfants de moins de 5 ans dans les pays en voie de développement et près de 900.000 consultations et 64.000 hospitalisations dans les pays à hauts revenus (Patel *et coll.*, 2009).

Les infections par le norovirus humain sont plus populairement connues sous les termes de *grippe intestinale* et de *winter vomiting disease* chez les anglo-saxons car ils sont basés sur l'observation de la saisonnalité hivernale des épidémies des gastroentérites : de novembre à mars pour l'hémisphère Nord. Ce caractère saisonnier semble cependant plus émoussé dans les pays de l'hémisphère Sud, peut-être compte-tenu de l'absence de réseaux de surveillance toujours bien structurés (Tu *et coll.*, 2007 ; Siebenga *et coll.*, 2009).

1. Prévalence et incidence

Les norovirus touchent aussi bien les individus des pays développés que ceux en voie de développement. Les analyses sérologiques utilisant des VLP recombinantes de norovirus GI et GII ont permis de démontrer que la prévalence des anticorps est mieux corrélée avec l'âge dans les pays développés qu'en voie de développement (Jiang *et coll.*, 2000). La prévalence des anticorps dirigés contre les norovirus GII apparaît être par ailleurs plus élevée que celle des norovirus GI, ce qui reflète bien la prédominance des souches GII (Cubitt *et coll.*, 1987 ; O'Ryan *et coll.*, 1998 ; Smit *et coll.*, 1999 ; Jiang *et coll.*, 2000).

Peu de données sur l'incidence des gastroentérites à norovirus sont actuellement disponibles. Néanmoins, il a été évalué que près de 18% des cas communautaires de gastroentérites au cours d'une saison hivernale et au moins 5% des cas vus par un médecin sont associés à une infection par norovirus (Koopmans *et coll.*, 2000). Aux États-Unis, les norovirus sont

responsables de 93% des gastroentérites d'origine alimentaire ce qui représenteraient près de 26 millions de cas chaque année (Mead *et coll.*, 1999 ; Fankhauser *et coll.*, 2002) ; il en est probablement de même en Europe (Koopmans *et coll.*, 2003 ; Lopman *et coll.*, 2003b).

La transmission de ces virus par l'eau ou les aliments contaminés étant bien établie, la transmission de personne à personne apparaît cependant être le mode principal de diffusion du virus, soient environ 70 à 90% des cas (Greig *et Lee*, 2008 ; Kroneman *et coll.*, 2008a). Les norovirus sont ainsi responsables de la majorité des gastroentérites sporadiques ou épidémiques survenant dans diverses collectivités : hôtels, maisons de retraite, écoles et autres institutions (Lopman *et coll.*, 2003a).

2. Les norovirus dans l'environnement

Les norovirus partagent avec les autres calicivirus diverses caractéristiques qui leur permettent de persister dans l'environnement dont une excrétion prolongée persistant après la résolution clinique ou en l'absence de toute symptomatologie, leur stabilité dans l'environnement ou encore une importante diversité de souches (Caul, 1994 ; Rockx *et coll.*, 2002 ; Rzesutka *et Cook*, 2004 ; Green, 2007 ; Atmar *et coll.*, 2008 ; Koopmans, 2008 ; Teunis *et coll.*, 2008). En l'absence de système de culture pour les norovirus humains, leur stabilité et leur survie dans l'environnement et notamment sur les denrées alimentaires sont estimées à partir des données disponibles pour d'autres calicivirus, notamment le calicivirus félin (FCV) et le norovirus murin (MNV) (Cannon *et coll.*, 2006 ; Kingsley *et coll.*, 2007 ; Baert *et coll.*, 2008 ; Hewitt *et coll.*, 2009).

A l'origine de bon nombre d'épidémies d'origine hydrique (Myint *et coll.*, 1994 ; Parshionikar *et coll.*, 2003 ; Maunula *et coll.*, 2005), les norovirus sont présents dans les eaux usées épurées et non traitées (Lodder *et coll.*, 1999 ; Loisy *et coll.*, 2000 ; da Silva *et coll.*, 2007 ; Iwai *et coll.*, 2009). Ils sont résistants aux étapes de traitement des eaux (Laverick *et coll.*, 2004 ; Ueki *et coll.*, 2005 ; van den Berg *et coll.*, 2005 ; Myrmel *et coll.*, 2006), en particulier à la chloration, l'abattement étant inférieur à 1 log au cours des traitements secondaires (Carter, 2005 ; Lodder *et de Roda Husman*, 2005). De plus, ils ont été retrouvés dans les eaux souterraines (Parshionikar *et coll.*, 2003) et de surface (Aw *et coll.*, 2009).

L'une des principales sources d'infections d'origine alimentaire est constituée par les mollusques bivalves tels que les huîtres, les moules ou les palourdes qui, par filtration, accumulent un bon nombre de microorganismes dont les virus entériques (Nappier *et coll.*, 2008). Les norovirus sont concentrés dans les tissus des glandes digestives (Wang *et coll.*, 2008 ;

McLeod *et coll.*, 2009) où leur persistance, pendant des semaines, serait facilitée par la présence de motifs antigéniques similaires aux HBGA humains (Le Guyader *et coll.*, 2006).

Plus de la moitié des épidémies d'origines hydriques et alimentaires seraient dues aux norovirus du génogroupe I (Kageyama *et coll.*, 2004 ; Maunula *et coll.*, 2005 ; Blanton *et coll.*, 2006 ; Le Guyader *et coll.*, 2006) car ils seraient plus résistants aux étapes de traitement des eaux usées que les norovirus du génogroupe II (da Silva *et coll.*, 2007) pour lesquels, en revanche, la persistance dans l'environnement pourrait être favorisée par le froid (Lee et Kim, 2008).

3. Caractéristiques épidémiologiques

Il faut distinguer deux contextes épidémiologiques : les gastroentérites sporadiques d'une part, et les gastroentérites épidémiques d'origine alimentaire (toxi-infections alimentaires collectives ou TIAC), ou hydrique d'autre part.

3.1 Les gastroentérites sporadiques

L'importance des norovirus dans les gastroentérites sporadiques hivernales observées en médecine générale est encore peu documentée mais on considère qu'en moyenne 12 % des cas sporadiques seraient dus à norovirus (Patel *et coll.*, 2009). Néanmoins, les techniques moléculaires de diagnostic montrent que les norovirus sont la principale cause des gastroentérites ambulatoires chez l'adolescent et l'adulte (Chikhi-Brachet *et coll.*, 2002) et la deuxième cause d'hospitalisation chez les enfants de moins de 5 ans après les rotavirus. Certains auteurs ont signalé également une implication similaire de ces deux virus dans les gastroentérites du jeune enfant avec parfois un impact clinique comparable (Colomba *et coll.*, 2007 ; Iturriza Gomara *et coll.*, 2008 ; Sdiri-Loulizi *et coll.*, 2008 ; Reimerink *et coll.*, 2009).

3.2 Les gastroentérites épidémiques

Les gastroentérites d'origine alimentaire ou hydrique sont dues le plus souvent aux norovirus. Ces épidémies sont « explosives » avec un taux d'attaque élevé pouvant varier de 17 à 100% en fonction du génotype (Vinje et Koopmans, 1996 ; Torner *et coll.*, 2008). Notons que le taux d'attaque des norovirus GII.4 semble cependant être plus faible que pour les autres génotypes (Noda *et coll.*, 2008).

Récemment, il a été estimé que chaque cas primaire pouvait être à l'origine de 4 à 14 nouveaux cas secondaires (Heijne *et coll.*, 2009). Pour chaque épidémie, l'enquête permet de retrouver la source de contamination que l'analyse virologique n'arrive pas toujours à confirmer. En revanche, l'analyse virologique des selles est le plus souvent positive et met en évidence une très grande diversité de génotypes de norovirus impliqués. Enfin, ces épidémies surviennent généralement tout au long de l'année sans caractère saisonnier.

3.2.1 Les épidémies dans les collectivités

A l'opposé, les épidémies de gastroentérites touchant les établissements de soins et d'hébergement sont principalement hivernales (Green *et coll.*, 2002a ; Bon *et coll.*, 2005). Tout aussi brutales, ces épidémies ont les caractéristiques épidémiologiques d'une transmission de personne à personne. Sur un plan virologique, elles se distinguent des précédentes par le génotype du norovirus en cause, qui est presque exclusivement le génogroupe II et principalement les norovirus GII.4 en Europe et dans le reste du monde (Green *et coll.*, 2002a ; Gallimore *et coll.*, 2004a ; Bon *et coll.*, 2005 ; Kroneman *et coll.*, 2008b). Dans les hôpitaux, des infections nosocomiales à norovirus ont été également observées, il s'agit principalement de norovirus GII.4 (Traore *et coll.*, 2000 ; Johnston *et coll.*, 2007 ; Johansen *et coll.*, 2008).

Les norovirus ont été également documentés comme un important pourvoyeur de gastroentérites chez les militaires (McCarthy *et coll.*, 2000) pouvant atteindre jusqu'à 10% d'incidence derrière les infections à *E. Coli* (17%) (Bourgeois *et coll.*, 1993). De manière similaire, les norovirus sont régulièrement responsables d'épidémies de gastroentérite à grande échelle sur les navires de croisières touristiques mais également militaires (Herwaldt *et coll.*, 1994 ; Khan *et coll.*, 1994 ; Sharp *et coll.*, 1995 ; Corwin *et coll.*, 1999 ; Oyofa *et coll.*, 1999 ; Bohnker et Thornton, 2003 ; Gallimore *et coll.*, 2003 ; Verhoef *et coll.*, 2008).

3.2.2 Les toxi-infections alimentaires collectives

Les risques de gastroentérites à norovirus d'origine alimentaire ne sont pas négligeables et sont de plus en plus pris en considération. Ces gastroentérites ne sont pas nécessairement hivernales et elles sont souvent sporadiques. On estime ainsi que, sur les 23 millions de cas annuels de gastroentérite à norovirus au États-Unis, 40% sont dues aux infections d'origine alimentaire (Mead *et coll.*, 1999). Les épidémies d'origine alimentaire sont souvent associées à la consommation d'aliments le plus souvent contaminés lors de leur préparation ou par des

eaux souillées. Les norovirus incriminés ne sont pas nécessairement de type GII.4 mais un éventail de norovirus aussi bien GI que GII ([Le Guyader et coll., 2000](#)).

4. Épidémiologie moléculaire

Les norovirus humains se répartissent entre deux génogroupes, les GGI avec 8 génotypes et les GII avec 19 génotypes (voir plus haut). Outre cette diversité génétique et antigénique, les norovirus possèdent un potentiel évolutif important. Les différentes études d'épidémiologie moléculaire ont mis en avant la prédominance du génogroupe II dans près de 75 à 100 % des cas sporadiques ([Patel et coll., 2009](#)), avec l'implication du génotype GII.4 dans près de 60 à 80% des cas selon les pays. Les norovirus GII.3 semblent quant à eux surtout associés aux gastroentérites aiguës chez l'enfant, alors que les norovirus GGI sont le plus souvent impliqués dans les épidémies dues à la contamination de l'eau ou des aliments.

4.1 Les norovirus GII.4

L'amélioration constante des réseaux de surveillance des virus entériques, en particulier aux États-Unis et en Europe, a permis de faire une analyse fine sur le plan phylogénétique des souches de norovirus incriminés dans les épidémies de gastroentérites. Ces travaux ont surtout concernés les norovirus GII, notamment GII.4 et GIIb. Cette analyse a permis de démontrer que les norovirus GII.4 subissent une dérive génétique avec l'apparition de nouveaux variants par cycles de 2 ou 3 ans ([Siebenga et coll., 2007](#) ; [Lindesmith et coll., 2008](#)). Il ressort également de cette évolution génétique un accroissement de la virulence ou l'acquisition d'autres propriétés ayant pour conséquence un potentiel de diffusion plus important. Régulièrement, des vagues épidémiques de gastroentérites liées à l'émergence d'une nouvelle souche de norovirus GII.4 sont observées dans le monde ([Figure 8](#)). D'une manière globale, les homologues de séquences au sein du génotype GII.4 varient, en nucléotides, de 88,4 à 96,1%, et, en acides aminés, 92,1 à 97,7% ([Kamel et coll., 2009](#)).

La première souche de norovirus GII.4 qui fut découverte est issue du variant Bristol ([Green et coll., 1994](#)). Mais, la première épidémie décrite et analysée sur le plan virologique s'est déroulée durant les années 1995-96, les souches de norovirus isolées aux États-Unis comme en Australie étaient un variant dénommé US95/96 et dérivant de Bristol ([Dingle et coll., 1995](#) ; [White et coll., 2002](#)). Suite à son émergence en 2002, le variant Farmington Hills a été responsable de la recrudescence d'épidémies de gastroentérites dans toute l'Europe telle que

rapportée par le réseau européen de surveillance (Lopman *et coll.*, 2004). Cette même souche a été également caractérisée aux États-Unis durant la même période où une vague épidémique était constatée avec plus de 80% des cas rapportés (Widdowson *et coll.*, 2004). Ce variant présentait, de plus, la particularité d'avoir un acide aminé supplémentaire, inséré dans le domaine P2 de la capsid (Dingle, 2004).

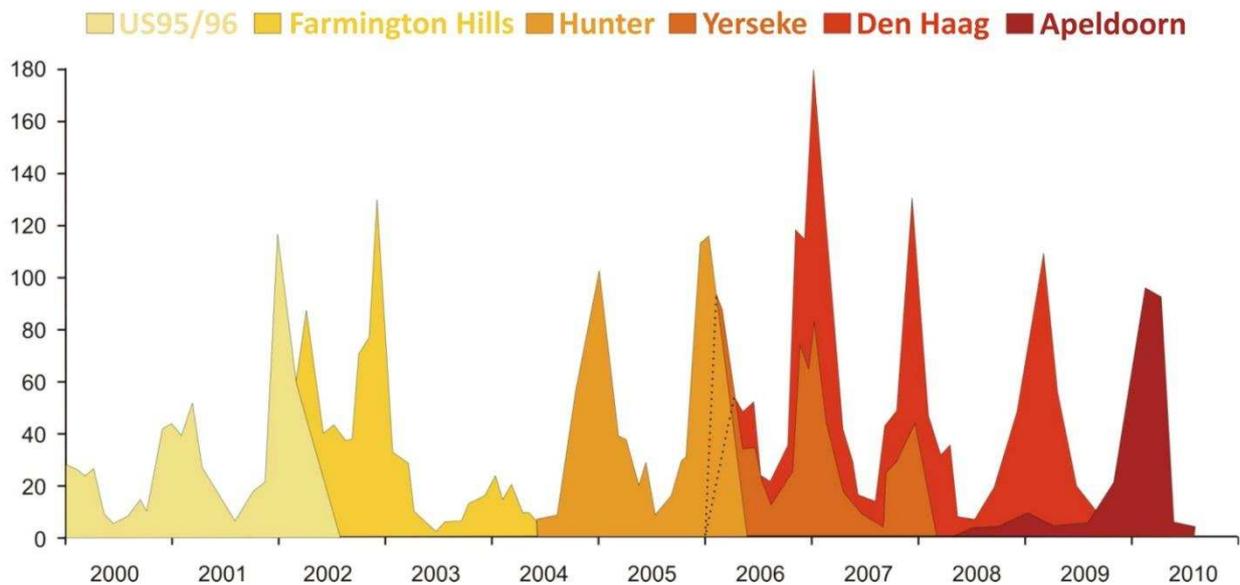
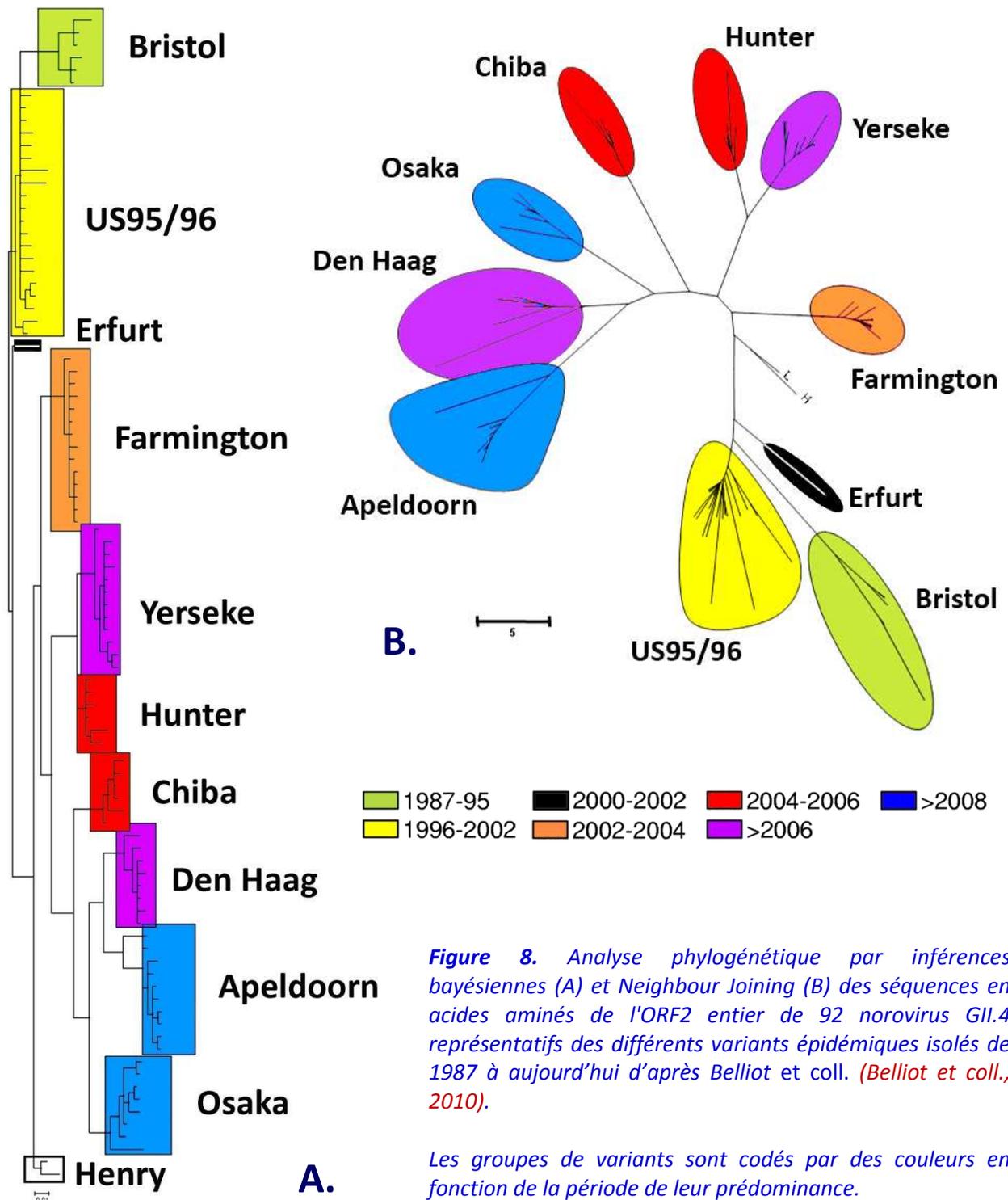


Figure 9. Évolution des épidémies à norovirus GII.4 en France entre 2000 et 2010 montrant l'émergence, la prédominance et le remplacement successif des différents variants.

Ce même phénomène d'émergence a été observé par la suite et, à chaque fois, une souche de génotype GII.4, présentant des caractéristiques génétiques nouvelles, était impliquée. Ainsi, plus récemment en 2004, sont apparus de manière concomitante les variants Hunter et Chiba (Bull *et coll.*, 2006) puis au printemps 2006 les variants Den Haag et Yerseke (Koopmans *et coll.*, 2006). L'analyse phylogénétique a permis notamment de montrer que le variant Den Haag provenait par glissement génétique du variant Farmington Hills, et Yerseke de Hunter (Kamel *et coll.*, 2009) (Figure 9).

Il apparaît donc que les souches appartenant au génotype GII.4 ont un potentiel évolutif nettement supérieur aux autres norovirus. Ce potentiel évolutif semble être lié à la capsid virale impliquée dans l'antigénicité et la fixation aux ligands cellulaires (Kitamoto *et coll.*, 2002 ; Marionneau *et coll.*, 2002). Cet aspect sera exploré dans le chapitre suivant et dans l'exposé de nos travaux.



4.2 Les norovirus recombinants

Des phénomènes de recombinaison entre souches présentant une polymérase et une capsidie dérivées de souches parentes différentes ont été décrits (Jiang *et coll.*, 1999a). L'un de ces virus recombinants, le variant GIIb, a été isolé pour la première fois au cours d'une épidémie d'origine hydrique dans le sud de la France en août 2000 (Ambert-Balay *et coll.*, 2005). Celui-ci a

représenté jusqu'à 26% des souches caractérisées en Europe et reste une des souches fréquemment retrouvées dans les épidémies et les cas sporadiques de gastroentérites. Ces GIIb sont le produit de la recombinaison d'un ORF1 spécifique d'origine inconnue, associé à l'ORF2 d'un génotype déjà identifié, le plus souvent GII.3 ou GII.4 (Jiang *et coll.*, 1999a ; Buesa *et coll.*, 2002 ; Ambert-Balay *et coll.*, 2005). Les norovirus de génotype GIIb initialement détectés en Europe (Lindell *et coll.*, 2005 ; Ramirez *et coll.*, 2006), ont rapidement diffusés en Asie et dans le monde entier (Thornton *et coll.*, 2005 ; Phan *et coll.*, 2006). D'autres virus recombinants ont été identifiés suggérant que ce phénomène n'est pas rare (Bull *et coll.*, 2007).

Enfin, de nombreuses infections mixtes ont été également documentées. Ces infections mixtes sont probablement sources de fréquentes recombinaisons entre norovirus (Bull *et coll.*, 2005 ; Etherington *et coll.*, 2005 ; Rohayem *et coll.*, 2005). Elles sont caractéristiques des épidémies liées à une contamination des réseaux d'eau ou impliquant la consommation de coquillages contaminés (Costantini *et coll.*, 2006 ; Le Guyader *et coll.*, 2008).

D. LES LIGANDS DES NOROVIRUS

L'étape initiale de l'infection par un virus implique nécessairement l'attachement du virion à la cellule hôte permettant alors son internalisation et sa réplication. Dans le cas des norovirus, l'infection passe par leur fixation sur des glycanes appartenant aux antigènes tissulaires de groupes sanguins humains (HBGA) dont la synthèse dépend du polymorphisme combiné aux loci *ABO*, *FUT2* et *FUT3* et présents sur les cellules du tractus digestif (Marionneau *et coll.*, 2002).

1. La découverte des ligands cellulaires des norovirus

La découverte des ligands cellulaires des norovirus s'est faite grâce à l'étude des lagovirus de la famille *Caliciviridae* au cours de laquelle il a été démontré que le virus de la maladie hémorragique du lapin (RHDV) pouvait s'accrocher à l'antigène H de type 2 présent sur les cellules épithéliales (Ruvoen-Clouet *et coll.*, 2000). Par analogie, il a été ensuite montré que des VLP du virus de Norwalk (norovirus GI.1) pouvaient agglutiner des érythrocytes humains exprimant l'antigène H (Hutson *et coll.*, 2002). Ensuite, une étude de infection expérimentale a montré qu'il existait un lien direct entre la présence des HBGA dans l'intestin des individus sécréteurs et l'infection par les norovirus (Lindesmith *et coll.*, 2003). Par la suite, de nombreuses études se sont intéressées à démontrer des interactions spécifiques de souche entre les norovirus et les HBGA à l'aide VLP de divers géotypes ou de particules P (Harrington *et coll.*, 2002 ; Huang *et coll.*, 2003 ; Tan *et coll.*, 2004 ; Huang *et coll.*, 2005 ; Donaldson *et coll.*, 2008 ; Shirato *et coll.*, 2008).

De plus, ces antigènes étant naturellement présents sur la lignée immortelle des cellules intestinales Caco-2, l'analyse en microscopie confocale de VLP incubées sur ces cellules a permis de montrer que les VLP se fixaient non seulement sur les cellules mais qu'elles étaient

aussi internalisées par la cellule. Cette observation importante est la démonstration que l'accroche des norovirus aux cellules épithéliales se fait par le biais d'un récepteur dont la partie glucidique est composée d'un HBGA, notamment l'antigène H (Marionneau *et coll.*, 2002).

Il est intéressant de noter qu'une équipe japonaise a montré que les norovirus étaient capables de se fixer à d'autres glycanes que les HBGA. En effet, différentes souches de norovirus, principalement celles du génogroupe II, sont capables de se fixer à l'héparane sulfate. L'héparane sulfate est un polysaccharide linéaire composant certains protéoglycanes présents à la surface de la plupart des cellules (Tamura *et coll.*, 2004). Cependant, aucune suite n'a jamais été donnée à ces résultats.

2. Biochimie des glycanes

2.1 Les glycoconjugués

Les glycoconjugués sont des molécules comportant des chaînes de sucres fixées de manière covalente qui, grâce à l'action de glycosyltransférases sur des précurseurs lipidiques ou protéiques, seront par glycosylation à l'origine des glycolipides ou des glycoprotéines et des protéoglycanes, respectivement. Ces molécules sont présentes au niveau du glycocalyx, du cytosol et du noyau ainsi que dans les compartiments intracellulaires (Hart *et coll.*, 1989) où elles jouent souvent des rôles clefs dans certains processus biologiques tels que la prolifération et la différenciation cellulaire, la communication intercellulaire, les interactions entre les cellules hôtes et les pathogènes, etc.

Chez les mammifères, les glycolipides sont exclusivement des glycosphingolipides, c'est-à-dire qu'ils possèdent une extrémité glycanique et une extrémité céramide (Holgersson *et coll.*, 1992), et sont répartis en six familles : les gangliosides, les isogangliosides, les globosides, les isoglobosides, les lactosides et les isolactosides.

Les glycoprotéines sont, en fonction de la liaison entre le corps protéique et le sucre, subdivisés en deux groupes : les glycanes N-liés, les plus répandus, et les O-liés. Les glycanes N-liés ont pour caractéristique commune d'avoir au moins une asparagine dont la fonction amine est couplée à un polysaccharide par une liaison amine et présente au sein de séquences peptidiques consensus spécifiques. Leur synthèse commence dans le réticulum endoplasmique et se finalise dans l'appareil de Golgi au cours de laquelle un cœur pentasaccharidique trimannosylé ($\text{Man}_3\text{-GlcNAc}_2$) sera ajouté sur l'asparagine via une liaison β 1-N, des

monosaccharides pouvant par la suite être successivement ajoutés sur ce socle commun. Trois types de N-glycannes peuvent être distingués en fonction de ces sucres additionnels : le type oligomannosidique, par adjonction exclusive de résidus mannoses, le type complexe ou N-acétyllactosaminique, permettant par l'action des quatre glycosyltransférases de former des structures ramifiées à 2, 3 ou 4 antennes plus ou moins complexes, et le type hybride, combinaison des deux types précédents. Les glycannes O-liés sont quant à eux présents sur certaines glycoprotéines cellulaires et tout particulièrement sur les mucines sécrétées ainsi que sur les immunoglobulines sécrétoires A et D. Ils résultent de glycosylations exclusivement post-traductionnelles qui consistent en la fixation de glycanne sur la fonction hydroxyle d'une sérine ou d'une thréonine. Le premier résidu peut être un fucose (Fuc), une N-acétylglucosamine (GlcNAc), un mannose (Man) ou une N-acétylgalactosamine (GalNAc) (Peter-Katalinic, 2005). Pour les mucines, les O-glycannes peuvent être présents sous différentes formes : monosaccharidique (antigène Tn), disaccharidique (antigène Si-Tn et Si-T), et complexe comportant 8 cœurs distincts (Yamashita *et coll.*, 1995 ; Hounsell *et coll.*, 1996).

2.2 Les glycosyltransférases

Les glycosyltransférases, dont plus de 250 sont connues chez l'homme, permettent de catalyser la synthèse des chaînes glucidiques sur les glycolipides et les glycoprotéines. Ces enzymes possèdent des spécificités de substrats strictes et assurent le transfert d'un monosaccharide porté par un glycosylnucléotide vers un substrat accepteur. Ces enzymes sont regroupées en familles sur la base de leur substrat et en fonction de la nature de la liaison créée.

Les glycosyltransférases ont des propriétés différentes en fonction de leur localisation cellulaire et sont présentes notamment dans le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi. Elles possèdent un ou plusieurs domaines transmembranaires (Oriol *et coll.*, 2002). Les glycosyltransférases du Golgi sont des protéines de type II et possèdent un domaine N-terminal intracellulaire le plus souvent court, un seul domaine d'ancrage membranaire, une tige flexible et un domaine C-terminal comportant deux sous-domaines catalytiques. Enfin, elles possèdent un site de clivage protéolytique au niveau de leur tige permettant le relargage de ces enzymes dans la salive, le plasma ou encore le lait maternel.

Bien qu'à l'intérieur d'une même famille de glycosyltransférases les séquences peptidiques soient très conservées dans le monde animal, des variations importantes du profil d'expression des glycannes intra- et inter-espèces peuvent être observées. Ces variations sont la

conséquence de variations dans l'environnement extracellulaire mais également de régulations post-transcriptionnelles et de la nature des voies de synthèse dépendantes de réactions enzymatiques multiséquentielles et compétitives.

Face à un nombre croissant de découvertes de nouvelles glycosyltransférases, des classifications ont été successivement proposées. La dernière classification en date est la Classification CAZy (Carbohydrate Active enZymes) (Coutinho *et coll.*, 2003) et comporte pas moins de 91 familles identifiées, notées GT1 à GT91. Nous verrons plus loin que la synthèse des antigènes tissulaires de groupes sanguins ABH (HBGA) fait intervenir, entre autres, deux glycosyltransférases les α -1,2-fucosyl-transférase (FUT2) et α -1,3-fucosyl-transférase (FUT3), appartenant respectivement aux familles GT11 et GT10, ainsi que les enzymes codées par les allèles A et B du gène *ABO* qui appartiennent à la famille GT6.

2.3 Les antigènes tissulaires de groupes sanguins ABH

Les HBGA sont des sucres complexes composant, entre autres, les antigènes A, B, H et Lewis présents éventuellement sous forme sialylée. Chez l'homme, ils sont présents dans de nombreux organes et tissus, notamment sur les érythrocytes, mais également dans la salive, le lait et sur les cellules épithéliales des muqueuses, et en particulier sur les cellules du tractus intestinal (Marionneau *et coll.*, 2001). Les connaissances actuelles de ces sucres tendent à montrer que leur présence dans les fluides corporels tels que le lait maternel leur permet de jouer un rôle de ligands leurres pour bon nombre de bactéries et virus pathogènes (Jiang *et coll.*, 2004 ; Newburg *et coll.*, 2004 ; Morrow *et coll.*, 2005).

Les HBGA sont des sucres complexes présents aux extrémités externes des N- et O-glycannes ou glycolipides (Ravn *et Dabelsteen*, 2000 ; Le Pendu, 2004). Chez l'Homme, la biosynthèse débute avec un précurseur H disaccharidique qui peut être classé en 4 types majeurs : le type 1 (Gal β 1,3GlcNac β 1), le type 2 (Gal β 1,4GlcNac β 1), le type 3 (Gal β 1,3GalNac α 1) et le type 4 (Gal β 1,3GalNac β 1). Deux autres types mineurs ont été décrits : le type 5 (Gal β 1,3Gal β 1) qui est un produit de la chimie organique et donc absent chez l'homme, et le type 6 (Gal β 1,4Glc β 1) a été mis en évidence sur les cellules intestinales et rénales. Des monosaccharides (Fuc, Gal, GalNAc) sont ensuite ajoutés successivement au précurseur et le type de liaison dépend d'une glycosyltransférase spécifique. Par exemple : l'enzyme FUT3 est responsable de l'ajout de résidus fucoses aux précurseurs type 1 et 2 en α 1,3 ou α 1,4 aboutissant à la synthèse des trisaccharides Lewis a (Le^a) ou Lewis x (Le^x). De même, l'enzyme FUT 2 permet par l'adjonction

d'un fucose en $\alpha 1,2$ d'obtenir les antigènes dits sécréteurs chez lesquels l'action de la FUT3 permet d'obtenir les tétrasaccharides Lewis b (Le^b) et Lewis y (Le^y), respectivement. Enfin, par l'action des glycosyltransférases A et B qui catalysent l'addition d'une N-acétylgalactosamine ou d'un galactose en $\alpha 1,3$, on obtient respectivement les tétrasaccharides A et B (Figure 10). La répartition de ces enzymes est fonction du tissu. Les phénotypes sont alors dépendant de l'action combinée des divers loci *ABO*, *FUT2* et *FUT3*, notamment.

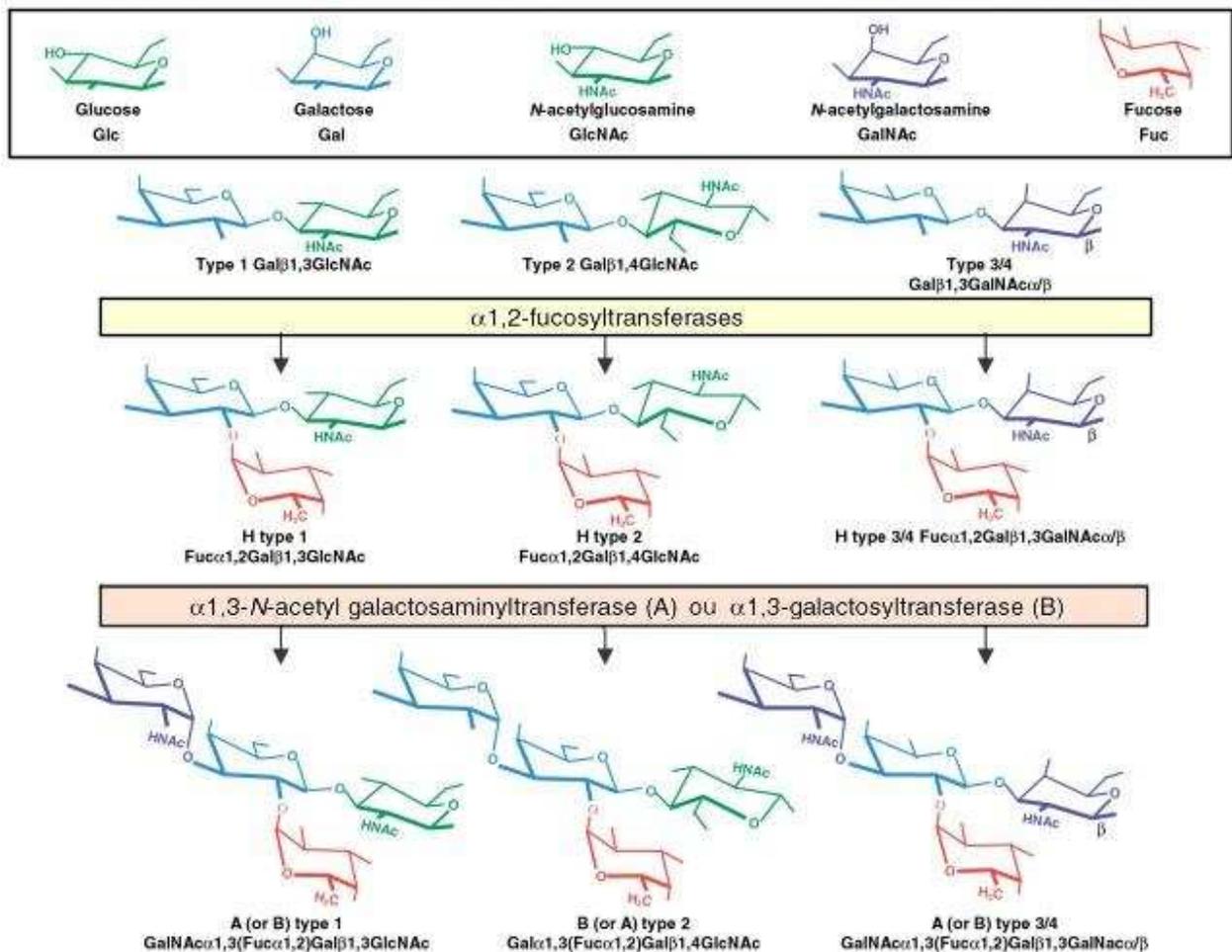


Figure 10. Structure biochimique des antigènes ABH des groupes sanguins basés sur différentes chaînes de saccharides présents sur les tissus humains. Les différentes chaînes de saccharide des types 1 à 4 peuvent être liées à des protéines ou à des lipides, ou sont parfois limités aux glycoprotéines ou aux glycolipides. Certaines chaînes peuvent être également présentes dans les liquides organiques et les sécrétions.

3. Déterminants génétiques de la résistance de l'hôte

Chez 20 % de la population caucasienne, des mutations ponctuelles du gène *FUT2* entraînent l'absence d'enzyme fonctionnelle et donc de l'expression des antigènes A, B, H et indirectement Le^b et Le^y dans le tractus digestif (Kelly *et coll.*, 1995 ; Oriol *et coll.*, 2000). Cette mutation, la mutation G428A dans plus de 95% des cas, définit le phénotype non-sécréteur

(non-sec) chez qui les antigènes Le^a et Le^x peuvent être détectés dans la salive et l'intestin à condition que les gènes *FUT3* et/ou *FUT5* soient fonctionnels (Figure 11). Ainsi, l'infection par certaines souches de norovirus n'est en principe possible que si le gène *FUT2* est fonctionnel (Marionneau *et coll.*, 2002 ; Thorven *et coll.*, 2005). Enfin, la détermination du phénotype de la salive permet de savoir si les antigènes sont présents ou non à la surface des cellules intestinales (Marionneau *et coll.*, 2002).

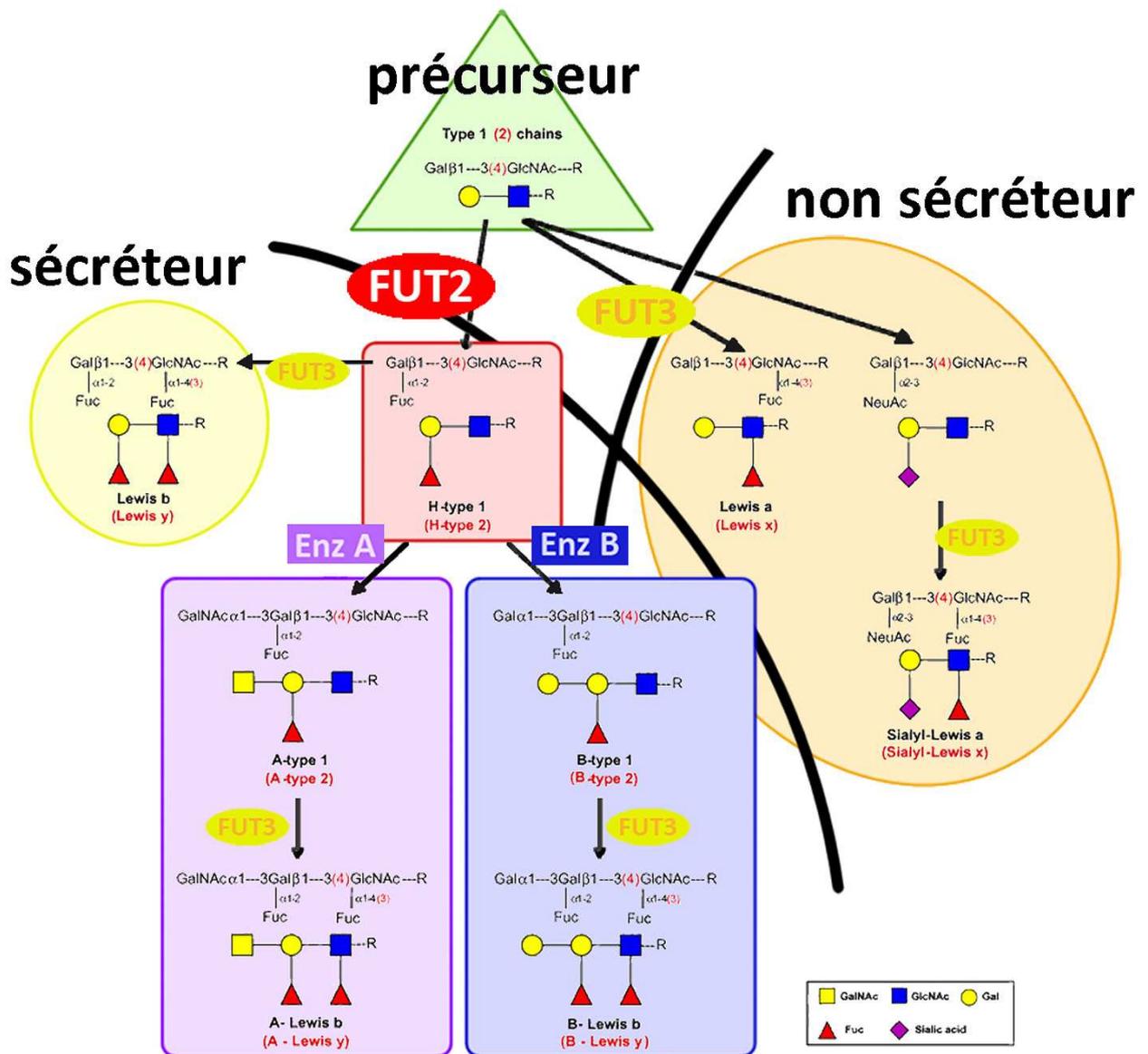


Figure 11. Schéma de la biosynthèse des antigènes de groupes sanguins et de l'action des fucosyltransférases *FUT2* et *FUT3* déterminant les caractères sécréteur et non-sécréteur

L'ensemble des données démontre qu'il existe une différence de sensibilité aux norovirus des individus en fonction de leur statut génétique, en particulier pour le gène *FUT2*. Inversement, la diversité génétique des norovirus peut être liée à la variabilité génétique de l'hôte donnant pour les souches de norovirus différents profils de fixation sur les HBGA (Ruvoën-Clouet et Le Pendu, 2004).

4. Structure du site de liaison aux HBGA

L'analyse structurale par cristallographie de l'interaction de domaines P avec notamment des trisaccharides A et B a mis en évidence l'existence pour GI.1 (Norwalk) d'une poche réceptrice localisée sur un seul monomère de capsid alors que pour GII.4 (Farmington) celle-ci se situe à l'interface de deux monomères (Cao *et coll.*, 2007 ; Bu *et coll.*, 2008 ; Choi *et coll.*, 2008). Il est néanmoins possible que l'interaction entre les HBGA et certains norovirus soit plus complexe en faisant intervenir plusieurs sites (Huang *et coll.*, 2005). Ainsi, les mutations au niveau de cette zone P2 peuvent modifier sensiblement le spectre d'hôte du virus ou du moins modifier l'efficacité de la fixation aux récepteurs (Tan *et coll.*, 2009) et par conséquent, les étapes suivantes de la pénétration virale. La pression immunitaire, à cause de la localisation des sites antigéniques sur la zone P2, peut également participer et orienter la variabilité en termes de spécificité des norovirus aux HBGA.

Différentes approches ont localisé le ou les sites présomptifs de fixation aux antigènes tissulaires des groupes sanguins dans la zone P2 de la capsid (Tan *et coll.*, 2003 ; Chakravarty *et coll.*, 2005 ; Huang *et coll.*, 2005 ; Lochridge *et coll.*, 2005). Pour les norovirus GI.1 (Norwalk), l'interaction avec le site présomptif ferait intervenir différents acides aminés d'une poche hydrophobe en fonction de l'HBGA. Pour les trisaccharides A (A-tri), 6 aa interviennent (Ser380, Pro378, Ser377, Asp327, His329 et Trp375) (Bu *et coll.*, 2008 ; Choi *et coll.*, 2008) alors qu'un pentasaccharide H (H type 1) fait intervenir 7 aa (Pro378, Ser377, Asp327, His329, Asp344, Gln342 et Trp375) (Choi *et coll.*, 2008) complétés par 3 autres aa (Ser338, Ala430 et Tyr431). Ces acides aminés sont conservés au sein du génogroupe I (Tan *et coll.*, 2009).

Pour les GII.4 (Farmington), la poche hydrophobe est formée de 7 aa (Ser343, Thr344, Arg345, Asp374, Ser441, Gly442 et Tyr443) (Cao *et coll.*, 2008). Ceux-ci sont conservés au sein des norovirus GII.4 (Figure 12) (Cao *et coll.*, 2007 ; Choi *et coll.*, 2008 ; Lindesmith *et coll.*, 2008 ; Tan *et coll.*, 2009).

Quatre autres acides aminés additionnels (Ala346, Lys348, Cys440, Asp391) ont été par la suite identifiés près du site de liaison par mutagenèse dirigée et leur présence serait cruciale dans la reconnaissance de l'HBGA (Tan *et coll.*, 2008b ; Tan *et coll.*, 2009). Il est intéressant de noter que 3 aa (Cys440, S441 et G442) sont apportés par le sous-domaine P1 d'un autre monomère pour former le site de liaison. Enfin, aucun de ces acides aminés n'est partagé par la poche réceptrice présente sur le virus Norwalk (Figure 13).

5. Profils de reconnaissance des HBGA par les norovirus

5.1 Reconnaissance en fonction du génotype

Les profils d'affinité spécifique des norovirus pour les HBGA ont été initialement analysés grâce à des techniques *in vitro* utilisant des VLP et des échantillons de salives. Les salives, bien que faciles à obtenir, posent le problème de la présence d'un mélange de différents HBGA et de sucres inconnus dont les quantités varient d'un individu à l'autre, obligeant ainsi à utiliser de grands panels d'échantillons représentatifs. En complément aux salives, l'utilisation de sucres de synthèse conjugués à l'albumine permet d'étudier à la fois la spécificité et l'affinité d'une souche donnée pour un HBGA donné. Enfin, des techniques d'hémagglutination ou d'inhibition de l'hémagglutination ont été développées mais requièrent une source de sang frais phénotypé (Hutson *et coll.*, 2003).

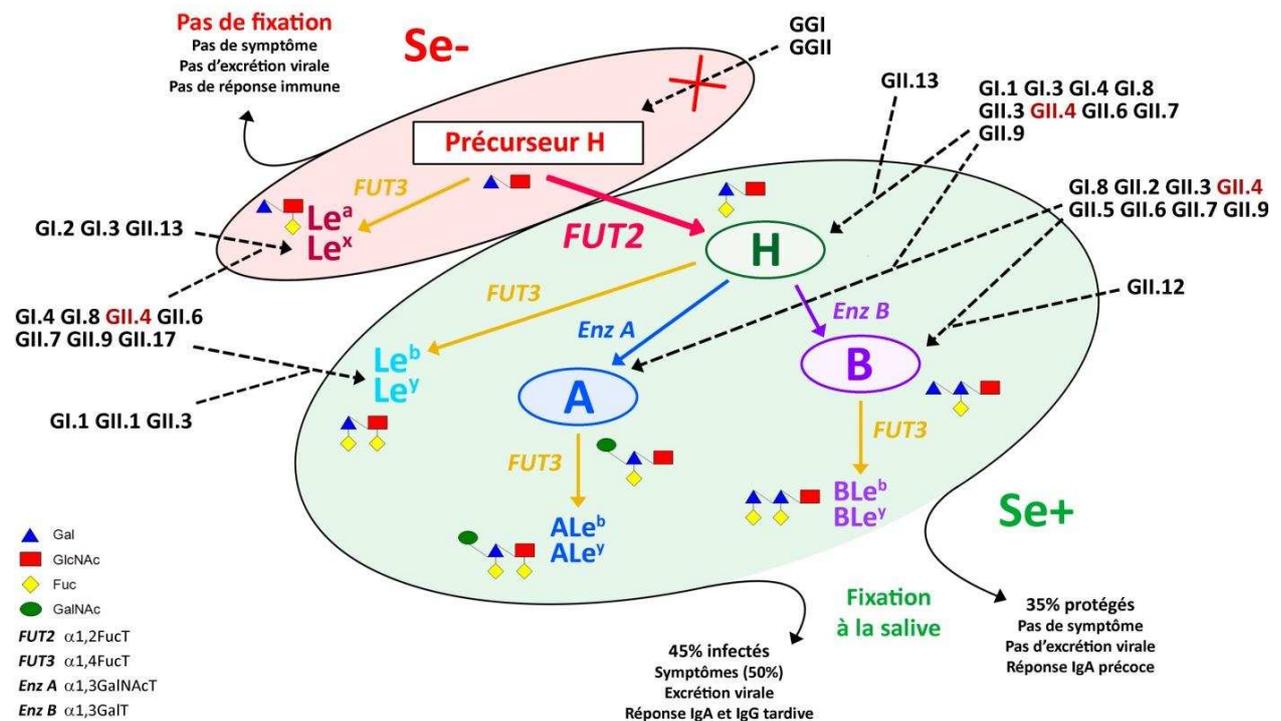
Diverses études ont été menées sur différents génotypes parmi les deux génogroupes affectant l'homme, c'est-à-dire GI et GII (Harrington *et coll.*, 2002 ; Huang *et coll.*, 2003 ; Tan *et coll.*, 2004 ; Huang *et coll.*, 2005 ; Thorven *et coll.*, 2005 ; Donaldson *et coll.*, 2008 ; Lindesmith *et coll.*, 2008 ; Shirato *et coll.*, 2008 ; Cannon *et coll.*, 2009). Ces études ont ainsi montré que les différentes souches de norovirus ne reconnaissent pas les mêmes motifs glycaniques, ce qui explique les variations individuelles observées lors des expérimentations ou lors des épidémies (Figure 14). L'accroche aux antigènes ABH est donc non seulement fonction du phénotype sécréteur/non-sécréteur ou ABO mais également du génogroupe des norovirus (Tableau 2) (Le Pendu *et coll.*, 2006 ; Tan et Jiang, 2010).

5.2 Le cas particulier des norovirus GII.4

Les travaux effectués par Lindesmith *et coll.* ont permis de démontrer que chaque variant de norovirus GII.4, en particulier les plus récents, présentait des profils atypiques aux antigènes des groupes sanguins. Dans la même étude, l'analyse des sérums de volontaires a révélé que l'apparition d'un nouveau variant s'accompagnait d'une modification des déterminants antigéniques (Lindesmith *et coll.*, 2008). La plupart des GII.4 reconnaissent les antigènes « sécréteurs », c'est-à-dire H, A, B, Le^b et Le^y alors que d'autres en sont incapables ou s'accrochent très faiblement. Par ailleurs, un petit nombre ont la capacité de fixer Si-Le^x (Rydell *et coll.*, 2009). Ce type de variation de spécificité en fonction de la souche suggère qu'il s'agit d'une interaction typique protéine-glycane telle celle observée chez les lectines. Ainsi, un

changement subtil dans la capsid virale par des mutations ponctuelles aléatoires peut significativement modifier la capacité de reconnaissance des HBGA (Tan *et coll.*, 2008b ; Tan *et coll.*, 2009).

Figure 14. Synthèse des interactions de la souche Norwalk avec ses récepteurs glycaniques, les HBGA, en relation avec le phénotype sécréteur et la présence ou non de la maladie.



Les interactions entre les virus et les HBGA sont indiqués par des flèches discontinues. Les motifs glucidiques constituant chaque HBGA sont représentés symboliquement. Les enzymes permettant la synthèse des HBGA sont indiqués en bleu. La population se divise en deux groupes, les non sécréteurs (20% de la population) et les sécréteurs, ces derniers affichant les HBGA nécessaires à la fixation des norovirus sur la muqueuse intestinale. Pour la souche Norwalk comme pour la majorité des souches, les individus non sécréteurs ne pouvant fixer les norovirus ne contractent pas de gastroentérites et la réponse immunitaire est absente. Le groupe des sécréteurs se divise en deux sous groupes. Pour 45 % de la population totale, les patients développent la maladie, excrètent le virus et présentent une élévation tardive des IgA et IgG spécifiques. Pour l'autre groupe soit 35 % de la population, les personnes sont asymptomatiques, n'excrètent pas de virus et ont, en revanche, une réponse IgA précoce.

Cependant, il ne faut pas oublier que ces tests d'interaction ont été effectués *in vitro* et qu'un manque de sensibilité d'une technique de détection peut ne pas permettre la mise en évidence d'une interaction de faible affinité mais suffisante pour l'infection *in vivo*. De plus, des variations d'un laboratoire à un autre peuvent être observées en fonction de la qualité des réactifs, du séquençage des souches clonées, et de la technique choisie qui doivent être impérativement standardisés.

Tableau 2. Résumé des profils d'attache d'un panel de VLP norovirus GI et GII sur des oligosaccharides synthétiques et des salives représentant les antigènes A, B, H, Lewis (Le^a, Le^b, Le^x et Le^y) et le phénotype non sécréteur d'après (Hansman et coll., 2010) (Huang et coll., 2003 ; Huang et coll., 2005 ; Donaldson et coll., 2008 ; Lindesmith et coll., 2008 ; Shirato et coll., 2008).

			Oligosaccharides de synthèse								Salives phénotypées ¹					
Souches	Génotype	Année	H1	H2	H3	A	B	Le ^a	Le ^b	Le ^x	Le ^y	O	A	B	N	
Génogroupe I	Norwalk ^{2,3,4}	GI.1	1968	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	
	Aichi124 ⁶	GI.1	1989	+	+	+	+	-	+	nt	nt	+	+	-	nt	
	West Chester ²	GI.1	2001	-	nt	+	-	-	-	-	-	nt	nt	nt	nt	
	Funabashi258 ⁶	GI.2	1996	+	-	+	+	+	-	nt	nt	+	+	-	nt	
	SoV ²	GI.2	1999	-	nt	+	-	-	+	-	-	nt	nt	nt	nt	
	Desert Shield ²	GI.3	1999	-	nt	-	+	nt	+	-	-	-	-	-	-	
	Kashiwa645 ⁶	GI.3	1999	-	+	-	+	-	+	-	nt	nt	+	+	-	nt
	VA115 ^{3,4}	GI.3	1997	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Chiba407 ⁵	GI.4	1987	-	-	-	+	-	+	+	nt	nt	+	+	-	nt
	Chiba ²	GI.4	2000	-	nt	-	-	-	+	-	-	-	nt	nt	nt	nt
	Boxer ⁴	GI.8	2002	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+
	WUG1 ⁶	GI.8	2000	-	-	-	+	+	+	+	nt	nt	+	+	+	nt
Génogroupe II	Hawaï virus ^{2,4,6}	GII.1	1971	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	
	Noda485 ⁶	GII.1	2000	-	-	-	-	-	-	nt	nt	-	-	-	nt	
	Weisbaden ²	GII.1	2001	-	nt	-	-	-	-	-	-	nt	nt	nt	nt	
	SMV ²	GII.2	1976	-	-	+	-	+	-	-	nt	nt	-	-	+	-
	Buds ^{2,4}	GII.2	2002	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-
	Ina ²	GII.2	2002	-	nt	-	-	-	-	-	-	-	nt	nt	nt	nt
	MxV ^{3,4}	GII.3	1998	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-
	Toronto virus ²	GII.3	1999	-	nt	+	+	-	-	-	-	-	nt	nt	nt	nt
	Kashiwa336 ⁶	GII.3	2000	-	-	+	-	-	-	-	nt	nt	-	+	+	nt
	Mutsudo18 ⁶	GII.3	2000	-	-	+	-	-	-	-	nt	nt	-	+	+	nt
	PiV ⁴	GII.3	2003	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-
	GII.4-1987 ^{2,5}	GII.4	1987	-	nt	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-
	GII.4-1987 ^{2,5}	GII.4	1997	-	nt	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-
	Narita104 ⁶	GII.4	1997	+	+	+	+	+	-	+	nt	nt	+	+	+	-
	VA387 ^{3,4}	GII.4	1998	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-
	M7 ²	GII.4	1999	-	nt	-	-	-	-	-	-	-	nt	nt	nt	nt
	GII.4-2002a ^{2,5}	GII.4	2002	-	nt	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+
	GII.4-2002 ^{2,5}	GII.4	2004	-	nt	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-
	GII.4-2004 ^{2,5}	GII.4	2004	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	GII.4-2005 ^{2,5}	GII.4	2005	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	GII.4-2006 ²	GII.4	2006	-	nt	+	+	+	-	-	-	-	nt	nt	nt	nt
	MOH ^{3,4}	GII.5	1999	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-
	Ichikawa754 ⁶	GII.5	1998	-	-	-	+	+	-	-	nt	nt	-	+	+	nt
	Ueno7k ⁶	GII.6	1994	-	+	+	-	+	+	+	nt	nt	+	+	+	nt
	Sanbu445 ⁶	GII.6	2000	-	-	+	-	-	-	-	nt	nt	+	+	+	nt
	Osaka 10-25 ⁶	GII.7	1999	-	-	+	-	+	+	+	nt	nt	+	+	+	nt
	VA207 ^{3,4}	GII.9	1997	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	Chitta/Aichi76 ⁶	GII.12	1996	-	-	-	-	-	-	-	nt	nt	-	-	+	nt
	OIF ⁴	GII.13	2003	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+
	Kashiwa47 ⁶	GII.14	1997	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nt

(+) : interaction ; (-) : pas d'interaction ; nt : interaction non testée.

¹ O, A et B correspondent aux groupes sanguins des donneurs « sécréteurs » et N indique les donneurs « non-sécréteurs » ; ² Donaldson et coll., 2008 ; ³ Huang et coll., 2003 ; ⁴ Huang et coll., 2005 ; ⁵ Lindesmith et coll., 2008 ; ⁶ Shirato et coll., 2008.

Dans la deuxième partie nous aborderons l'élaboration des réactifs et les stratégies adoptées afin de mettre en évidence les interactions et les profils spécifiques d'accroche des VLP de variants de norovirus GII.4 avec les HBGA synthétiques ou les salives, l'importance structurale de la poche réceptrice des norovirus ainsi que les méthodes de détection et de mesures quantitatives et qualitatives de ces interactions.

Deuxième Partie

MATÉRIELS & MÉTHODES

A. Production de particules virales de synthèse de norovirus GII.4	61
1. Analyse phylogénétique des variants GII.4	61
1.1 Arbre minimum couvrant et <i>Neighbour Joining</i>	61
1.2 Sélection de souches d'intérêt	62
2. Clonage des souches sélectionnées	62
2.1 Stratégie de clonage	62
2.2 Préparation des échantillons et extraction de l'ARN viral	63
2.3 Typage des souches	64
2.4 Amplification des ORF2 entiers	66
2.5 Clonage des ORF2 des souches sélectionnées	66
2.5.1 Préparation des inserts	66
2.5.2 Clonage dans le vecteur de transfert pGEM [®] -T easy	67
2.6 Transfert dans le vecteur plasmidique pVL1392	70
3. Le système baculovirus-cellules d'insecte	71
3.1 Les baculovirus	71
3.2 Culture des lignées de cellules d'insecte	73
3.3 Co-transfections avec baculovirus	73
3.4 Plages de lyse et criblage des clones recombinants	74
3.5 Expression des protéines VP1 recombinantes	75
3.6 Purification des particules virales de synthèse	75
3.7 Contrôle par microscopie de force atomique	77
4. Mutagenèse dirigée du site de liaison aux HBGA	78
B. Outils et méthodes de mesure qualitatives et quantitatives des interactions virus-récepteurs	82
1. Production d'anticorps monoclonaux spécifiques des GII.4	82
1.1 Immunisation et préparation des cellules myélomateuses	82
1.2 Fusions cellulaires	84
1.3 Recherche d'hybridomes spécifiques par technique ELISA	84
1.4 Clonage des hybridomes spécifiques	85
1.5 Caractérisation des anticorps monoclonaux produits	86
1.6 Production des anticorps monoclonaux en ascite	86

2. Les antigènes tissulaires de groupes sanguins	86
2.1 Salives phénotypées	87
2.1.1 Préparation et typage des salives	87
2.1.2 Génotypage de gène FUT2	88
2.1.3 Hémagglutination et génotypage du gène ABO	88
2.2 Oligosaccharides de synthèse	89
2.2.1 Sucres conjugués au polyacrylamide	89
2.2.2 Sucres conjugués à de l'albumine	89
3. Techniques immunoenzymatiques (ELISA)	90
3.1 Interaction des VLP avec les salives	90
3.2 Test au periodate de sodium sur les salives	91
3.3 Interaction des VLP avec les oligosaccharides de synthèse	91
4. Mesure par résonance plasmonique de surface	92
4.1 Principe technique	92
4.2 Applications	93
4.3 Analyse de l'interaction des VLP sur des sucres synthétiques	94
5. Analyses statistiques	96

A. PRODUCTION DE PARTICULES VIRALES DE SYNTHÈSE DE NOROVIRUS GII.4

1. Analyse phylogénétique des variants GII.4

1.1 Arbres minimum couvrant et *Neighbour Joining*

Les arbres minimum couvrants (MST) permettent l'étude de souches qui ont peu évolué entre elles en calculant le nombre de variations pour chaque paire de séquence. Un MST est l'arbre permettant de relier toutes les séquences entre elles sans faire de boucle pour un nombre total de variations minimum. Le MST permet d'étudier l'expansion clonale de souches ayant peu évoluées d'un point de vue génétique sur un courte période de temps. Afin que le MST soit le plus représentatif possible de cette expansion, la liste des souches analysées doit être le plus exhaustive possible.

Ainsi, pour étudier les relations des souches de GII.4 en elles, un MST des séquences en acides aminés de l'ORF2 a été construit en utilisant le logiciel Bionumerics® (Applied Maths BVBA®, Sint-Martens-Latem, Belgique). Le MST a été calculé sur la base de 496 séquences d'acides aminés d'ORF2 de norovirus GII.4 disponibles dans Genbank ou faisant partie de la bibliothèque du laboratoire. Chaque variant à l'intérieur du génotype GII.4 a été défini comme un groupe de souches ayant au maximum pas plus de 6 variations entre elles. Cet arbre nous servira par la suite pour corrélérer les variants avec les résultats des interactions avec les HBGA.

Enfin, cet arbre a été validé par sa construction, à l'aide du logiciel MEGA4 (<http://www.megasoftware.net>) (Tamura *et coll.*, 2007), d'un arbre plus conventionnel en mode *neighbour joining* à partir de 95 isolats représentatifs des différents variants individualisés par le MST.

1.2 Sélection de souches d'intérêt

Six variants de norovirus GII.4 ont été sélectionnés pour leur représentativité vis-à-vis des différents variants successifs et ayant circulé ces deux dernières décennies (de 1987 à 2007). Les souches utilisées pour cette étude sont des souches épidémiques et cliniques qui ont été isolées à partir de patients infectés (Tableau 3) :

- aux États-Unis : il s'agit de la souche MD145, représentant le variant Bristol (Kapikian *et coll.*, 1972 ; Green *et coll.*, 2002a), pour laquelle le vecteur de transfert pVL-MD145 ainsi que le baculovirus nous ont été gracieusement donnés par le Dr. Kim GREEN du Laboratoire des Maladies Infectieuses (*Caliciviruses Section*) du National Institute for Allergy and Infectious Diseases, NIAID (Bethesda, MD, USA).
- en France : ce sont les souches Dijon171, E1057, E3436 représentant respectivement les variants US95/96, Hunter et Apeldoorn (Belliot *et coll.*, 2010). Le vecteur pVL-Dijon171 et le baculovirus recombinant sont issus de travaux antérieurs menés au sein du laboratoire (Nicollier-Jamot *et coll.*, 2003).
- en Égypte : ce sont les souches Cairo7, Cairo1 et Cairo4, représentant respectivement les variants Yerseke, Den Haag et Osaka (Kamel *et coll.*, 2009).

Tableau 3 : Liste des souches de norovirus GII.4 utilisés dans cette étude

Souches	Références Genbank	Origine (année)	Variants ^a
MD145	AY032605	Maison de convalescence (1987)	Bristol
Dijon171	AF472623	Communautaire (1996)	US95/96 (1996)
E1057^c	EU876890	Maison de retraite (2005)	Hunter (2004)
Cairo7^c	EU876887	Hôpital pédiatrique (2006)	Yerseke (2006a)
Cairo1^c	EU876892	Hôpital pédiatrique (2006)	Den Haag (2006b)
Cairo4^c	EU876884	Hôpital pédiatrique (2006)	Osaka (2007)
E3436^c	GQ246794	Maison de retraite (2008)	Apeldoorn (2008)

^a Terminologie proposée par Zheng *et coll.* (Zheng *et coll.*, 2010). ^b Terminologie alternative proposée par Zheng *et coll.* (Siebenga *et coll.*, 2009). ^c Baculovirus recombinants produits au cours de cette étude.

NB : la souche Farmington Hills n'étant pas disponible dans notre bibliothèque, elle n'a donc pas été analysée au cours de l'étude.

2. Clonage des souches sélectionnées

2.1 Stratégie de clonage

La stratégie adoptée pour cloner la capsid des souches de norovirus GII.4 sélectionnées requiert, après typage et une première amplification de la séquence complète de l'ORF2 par RT-

PCR, l'utilisation successive de deux vecteurs plasmidiques : le vecteur pGEM et le vecteur pVL (Figure 15). Le vecteur pGEM permet le criblage facile et rapide par un test blanc-bleu des colonies possédant l'insert. Le vecteur pVL sert quant à lui au transfert de l'insert dans le génome d'un baculovirus afin de pouvoir produire des particules virales recombinantes (VLP) dans un système baculovirus-cellules d'insecte.

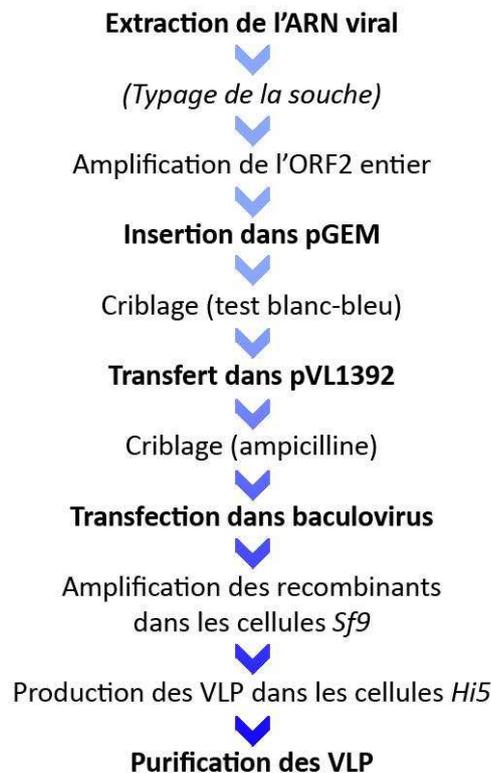


Figure 15. Schéma de la stratégie de clonage pour la production de particules virales de synthèse (VLP) de norovirus GII.4.

2.2 Préparation des échantillons et extraction de l'ARN viral

Les souches sélectionnées E1057, Cairo1, Cairo4, Cairo7 étant issues de la bibliothèque du laboratoire, l'extraction a donc eu lieu sur des selles conservées congelées à -80°C. Ces souches ont été caractérisées et clonées dans pGEM au cours de travaux précédents (Nicollier-Jamot *et coll.*, 2003 ; Kamel *et coll.*, 2009). La souche E3436 également issue de la bibliothèque du laboratoire a donc été clonée dans pGEM selon le même procédé décrit dans ce chapitre. Pour chaque souches, 500 à 1000 µl de suspension de selles à 10 % dans du tampon PBS (phosphate buffer saline) à pH 7,4 ont été prélevés afin d'en extraire le génome viral.

L'extraction a été effectuée à l'aide de la plateforme automatisée Easy MAG Nuclisens® (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France), en suivant les recommandations du fabricant, dont le protocole opératoire est basé sur les méthodes d'extraction des acides nucléiques par le

thiocyanate de guanidine (Chomczynski et Sacchi, 1987) et de purification sur silice (Boom et coll., 1990). L'ARN extrait a été élué dans un volume final de 25 à 50 µℓ et utilisé pour le séquençage et le clonage. Avant la phase d'amplification, les ARN ont été préalablement chauffés à 65°C pendant 5 min puis refroidis dans la glace avant amplification.

2.3 Typage des souches

Sans typage préalable, les souches de l'étude n'auraient pas pu être sélectionnées. Nous rappellerons ici brièvement les étapes permettant l'identification des souches de norovirus GII.4. Les RT-PCR d'amplification ont été effectuées à l'aide du kit One-Step RT-PCR de la société Qiagen (Hilden, Allemagne), les phases de rétrotranscription et d'amplification par PCR s'effectuant en une étape dans le même tube à partir de 3 µℓ d'ARN (Tableau 4).

Tableau 4. Mélange réactionnel type pour une amplification par RT-PCR en une étape

Réactifs	Volumes
Eau	qsp 50 µℓ
Tampon 5X	10 µℓ
dNTP (10mM)	2 µℓ
Amorce sens ou <i>forward</i> (10 µM)	2 µℓ
Amorce anti-sens ou <i>reverse</i> (10 µM)	2 µℓ
RNASine (5U/µℓ)	1 µℓ
Enzymes (Transcriptase inverse + <i>Taq</i> polymérase)	2 µℓ
ARN	3 µℓ
Volume final	50 µℓ

Le jeu d'amorces JV12/JV13 a été utilisé pour amplifier une partie du domaine correspondant à la polymérase virale (Vinje et Koopmans, 1996). La région codant la polymérase étant peu informative pour la détermination du génogroupe des norovirus, une partie conservée de l'ORF2 a été amplifiée avec le jeu d'amorces G2SKF/G2SKR spécifique des norovirus du génogroupe II (Kojima et coll., 2002). Les cycles de RT-PCR sont indiqués ci-après (Tableau 5).

Tableau 5. Cycles d'amplification de la polymérase et de la capsid de norovirus par RT-PCR

Étapes	RT	Activation ^a	Amplification	Élongation
Paramètres <i>Polymérase</i>	50°C, 30 min	95°C, 15 min	94°C, 30 sec 37°C, 1 min 72°C, 1 min	72°C, 10 min
Paramètres <i>Capsid</i>	50°C, 30 min	95°C, 15 min	95°C, 30 sec 50°C, 30 sec 72°C, 1 min	72°C, 5 min
Cycles	1	1	40	1

^a Activation de la polymérase

Les produits de PCR ont été purifiés à l'aide du kit d'extraction QIAquick Gel de la société Qiagen (Hilden, Allemagne) puis séquencés pour les besoins du typage à l'aide du kit de réaction de séquence ABI Prism Big dye[®] Terminator cycle sequencing ready reaction v1.1 (Applied Biosystems, France) (Tableaux 6 et 7) et d'un séquenceur automatique ABI PRISM[®] 3100 de chez Applied Biosystems (Perkin-Elmer, Foster City, CA, USA) en utilisant les amorces mentionnées dans le Tableau 8.

Tableau 6. Mélange réactionnel type pour une réaction de séquençage d'ORF2 de norovirus GII.4

Réactifs	Volumes
Eau	qsp 20 µℓ
Tampon 5X	5 µℓ
Amorce (0,8 µM)	4 µℓ
ADN	eq. 200 ng de 1 Kb
Volume final	20 µℓ

Tableau 7. Cycle de PCR pour la réaction de séquençage des ORF2 des norovirus GII.4.

Étapes	Dénaturation	Amplification
Paramètres	96°C, 1 min	96°C, 10 sec 50°C, 5 sec 60°C, 4 min
Cycles	1	25

Tableau 8. Liste des amorces de séquençage des souches GII.4 et de plasmides de clones positifs d'après Kamel et coll. (Kamel et coll., 2009).

Amorces	Séquences	Polarité	Emplacement des amorces ^a	ORF amplifié
FW1^b	5'-GCGATCGCAATCTGGCTCCAG-3'	sens	5055-5076	fin ORF1
FW1-1	5'-CCCCTGGATTAGAAATAATTTTGTAC-3	sens	5231-5256	ORF2
RT1-1	5'-ATCAGGGCCCAAGGGCGCGCTCC-3'	anti-sens	5314-5336	ORF2
FW2	5'-CTGAAGGCTTGAGCCCCAGCCAG-3'	sens	5473-5495	ORF2
RT1	5'-GAGGTTCCAGTTGCCTAACATC-3'	anti-sens	5523-5544	ORF2
FW3	5'-GATTCCCCATTCTTTGGAAAAG-3'	sens	5806-5827	ORF2
RT2	5'-GTCGTGCACCTGCCATTTTGTGGTTG-3'	anti-sens	5862-5887	ORF2
FW3-1	5'-CAATTATGACCCAACAGAAG-3'	sens	6011-6030	ORF2
RT3-1	5'-CCAGTGCTCACTGTAGCTTTGTG-3'	anti-sens	6123-6145	ORF2
FW4	5'-CCAAAACACGAAATTCACCCCAG-3'	sens	6218-6240	ORF2
RT3	5'-AGGTGYACATTATGACCAGTTC-3'	anti-sens	6313-6334	ORF2
FW4-1	5'-AGCGGGTATCCCAACATGAA-3'	sens	6405-6424	ORF2
RT4-1	5'-CCTGTRTCTGGATTACAAATC-3'	anti-sens	6508-6529	ORF2
FW5	5'-TGATTTGGTTATCCCCCAATGG-3'	sens	6596-6619	ORF2
RT4	5'-CGCCCCGTCCATTTCCCATGG-3'	anti-sens	6667-6688	ORF2
RT5^b	5'-CTGTTATTTTCAAAYTCAACTTTTG-3'	anti-sens	6795-6819	début ORF3

^a Positions données pour le génome de la souche MD145

^b Amorces utilisées pour le clonage de l'ORF2.

Les génotypes ont été ensuite déterminés par alignement à l'aide du logiciel CodonCode Aligner® version 3.04 (CodonCode Corp, Dedham, MA, USA) avec des séquences de norovirus de référence disponibles dans Genbank.

2.4 Amplification des ORF2 entiers

L'ORF2 faisant 1623 bases de long, le kit TITAN® de la société Roche Moléculaire (Manheim, Allemagne) a été utilisé, les phases de rétro-transcription et d'amplification se faisant dans le même tube. Les ORF2 de souches E1057, Cairo1, Cairo4 et Cairo7 et E3436 ont été amplifiés par RT-PCR à l'aide de 3 µℓ d'ARN et 10 µM de chacune des amorces FW1/RT5 (Tableau 8) dans un volume finale de 50 µℓ. Le milieu réactionnel et les cycles de la PCR sont indiqués ci-après (Tableaux 8, 9 et 10).

Tableau 9. Milieu réactionnel pour l'amplification de l'ORF2 avec le kit TITAN

Réactifs	Volumes
Eau	qsp 50 µℓ
Tampon 5X	10 µℓ
dNTP (10 mM)	4 µℓ
DTT (100 mM)	2,5 µℓ
Amorce sens ou <i>forward</i> (10 µM)	2 µℓ
Amorce anti-sens ou <i>reverse</i> (10 µM)	2 µℓ
RNAsine (5 U/µℓ)	1 µℓ
Enzymes	1 µℓ
ARN	3 µℓ
Volume final	50 µℓ

Tableau 10. Cycles d'amplification des ORF2 complets des norovirus GII.4 par RT-PCR

Étapes	RT	Amplification		Élongation
Paramètres	50°C, 60 min	94°C, 30 sec 50°C, 30 sec 68°C, 2 min 40 sec	94°C, 30 sec 55°C, 30 sec 68°C, 2 min 40 sec + (5 sec/cycle)	68°C, 10 min
Cycles	1	10	40	1

2.5 Clonage des ORF2 des souches sélectionnées

2.5.1 Préparation des inserts

Les produits d'amplification par PCR des souches E1057, Cairo1, Cairo4, Cairo7 et E3436 ont été purifiés après migration par électrophorèse sur gel d'agarose avec le kit d'extraction Qiaquick Gel de la société Qiagen (Hilden, Allemagne). La purification des fragments se faisant sur

colonne en silice, l'ADN a été ensuite élué avec 50 μl de tampon EB (10mM Tris à pH 8.4), dont 10 μl seront congelés en guise de *backup*. L'ADN des 40 μl restants a été précipité avec 2 volumes d'éthanol pur et 10% d'acétate de sodium à pH 5.2 pendant au moins 2 heures à -20°C . Après une première centrifugation à 12.500 rpm pendant 15 min, le culot a été repris dans 150 μl d'éthanol à 70% pour dessaler l'ADN. Après une seconde centrifugation à 12.500 rpm pendant 5 min, les traces d'éthanol dans le culot ont été éliminées à l'aide d'un concentrateur SpeedVac® (Thermo Scientific, St-Herblain, France) pendant 5 à 10 min à température ambiante. Le culot a été ensuite resuspendu dans 10 μl d'eau distillée stérile pendant 10 min au Thermomixer® (Eppendorf, Le Pecq, France) à température ambiante avant quantification par électrophorèse sur gel d'agarose à 1% dans du TAE en présence de bromure d'éthidium (BET).

2.5.2 Clonage dans le vecteur de transfert pGEM®-T Easy

Le clonage a été effectué dans le vecteur de transfert pGEM®-T Easy (Promega, Charbonnières-les-Bains, France) (Figure 16). Ce vecteur de transfert possède deux gènes :

- un gène de résistance à l'ampicilline (*Amp^r*) qui permet de sélectionner spécifiquement les cellules compétentes transformées et présentant le plasmide dans son cytoplasme,
- un gène de l'opéron lactose, le gène de la β -galactosidase (*lacZ*), qui permet le criblage rapide des colonies possédant l'insert cloné à l'aide du test blanc-bleu en présence d'IPTG, inducteur fort de l'opéron lactose et non dégradabile, et d'X-Gal, substrat de l'enzyme donnant une couleur bleue lorsqu'il est dégradé.

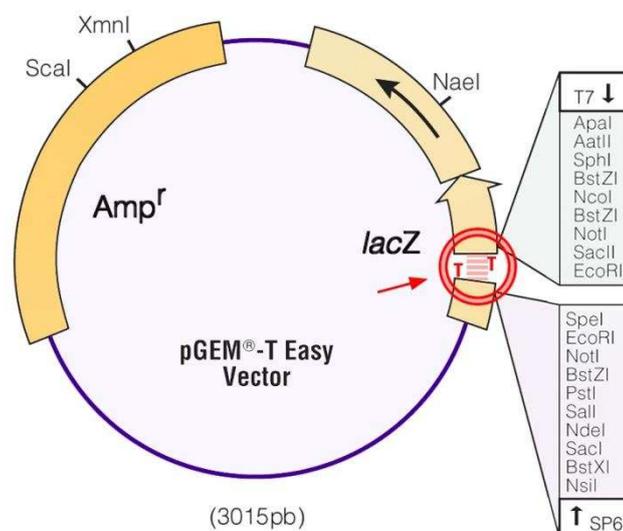


Figure 16. Schéma du vecteur de transfert pGEM®-T easy.

Le vecteur de transfert pGEM[®] se présente sous la forme d'un double brin d'ADN linéaire où le gène *lacZ* est interrompu par deux thymidines terminales constituant les deux extrémités 3' du plasmide linéarisé. Ces thymidines permettent l'insertion grâce à l'action d'une ligase de l'insert que l'on souhaite cloner dans le vecteur. Enfin, pGEM[®] possède un site de clonage multiple (MCS) comportant de nombreux sites de restrictions en amont et en aval du site d'insertion.

La première étape correspond à la ligation de l'insert dans le vecteur de transfert. Dans un volume de 10 µℓ, 50 ng de vecteur de transfert pGEM ont été incubés toute la nuit à 4°C avec 80 ng d'ADN d'ORF2, dans le rapport d'1 molécule de vecteur pour 3 à 6 molécules d'insert, et en présence de ligase (Tableau 11).

Tableau 11. Mélange réactionnel pour une ligation dans le vecteur de transfert pGEM

Réactifs	Volumes
Tampon de ligation 2X	5 µℓ
Insert ADN	x µℓ
Eau	qsp 10 µℓ
Plasmide pGEM	1 µℓ
Ligase	1 µℓ
Volume final	10 µℓ

Après récupération du produit de ligation, 2 µℓ ont été utilisés pour la transformation de 30 µℓ de bactéries JM109 rendus chimiquement compétentes et mis dans la glace pendant 30 min. Afin de rendre perméable la membrane des bactéries, le mélange a été plongé pendant 45 sec dans un bain-marie à 42°C puis remis immédiatement dans la glace afin de créer un choc thermique. Ensuite, 500 µℓ de milieu SOC stérile (Tableau 12) ont été ajoutés à la réaction avant incubation à 37°C pendant 90 min sous agitation continue à 100 rpm dans un incubateur-agitateur Minitron[®] (Infors HT, Bottmingen, Suisse).

Tableau 12. Composition du milieu SOC

Réactifs	Masses/Volumes
NaCl	0,5 g
Bacto-tryptone	20 g
Extrait de levure	5 g
KCl (1 M)	2,5 mℓ
Eau	qsp 1 ℓ
Volume final ^a	1 litre

^a Ajuster le pH à 7,0-7,5 avec de la soude (NaOH) puis autoclaver ; ajouter 20 mℓ de glucose 1M avant utilisation

Après transformation, les bactéries ont été ensemencées sur boîte de Pétri sur un milieu Luria-Bertani (milieu LB à 1,5% d'agarose (Tableau 13)) contenant 100 µg/ml d'ampicilline et auquel de l'IPTG (100 mM) et du X-Gal (50 mg/ml) ont été ajoutés pour effectuer un test blanc-bleu, puis incubées à 37°C toute la nuit. Les colonies blanches, qui contiennent l'insert, ont été ensuite prélevées puis vérifiées par PCR en utilisant les amorces FW2/RT2 spécifiques de l'ORF2 des norovirus GII.4 (Tableaux 14 et 15) et migration par électrophorèse sur gel d'agarose à 2% dans du TBE contenant 2 µl de BET.

Tableau 13. Composition du milieu LB-Agar à 1,5%

Réactifs	Masses/Volumes
NaCl	10 g
Bacto-tryptone	10 g
Extrait de levure	5 g
Agarose	15 g
Eau	qsp 1 l
Volume final ^a	1 litre

^a Ajuster le pH à 7,0-7,5 avec de la soude (NaOH) puis autoclaver

Tableau 14. Milieu réactionnel pour le screening des clones par PCR conventionnelle

Réactifs	Volumes
Eau	14,5 µl
dNTP (10 mM)	0,4 µl
Amorce sens ou <i>forward</i> (10 µM)	2 µl
Amorce anti-sens ou <i>reverse</i> (10 µM)	2 µl
<i>Taq</i> polymérase	0,1 µl
Tampon 10X	2,5 µl
MgCl ₂	1,5 µl
Bactéries en suspension	2 µl
Volume final	25 µl

Tableau 15. Cycle de PCR pour l'amplification des ORF2 complets des norovirus GII.4

Étapes	Dénaturation	Amplification	Élongation
Paramètres	94°C, 3 min	94°C, 30 sec 40°C, 30 sec 72°C, 50 sec	72°C, 5 min
Cycles	1	25	1

Les clones positifs ont été ensuite digérés par *EcoRI* pendant 2 h à 37°C et contrôlés par migration sur gel d'agarose à 1% dans du TAE pour vérifier la présence de l'insert et sa taille à l'aide de l'échelle de masse moléculaire Marker X de chez Roche Diagnostic (Mannheim,

Allemagne). Pour chaque clone positif confirmé, une quantité suffisante d'ADN plasmidique a été produite en culture à partir de 5 ml de bouillon d'incubation. L'ADN a été ensuite extrait par la méthode des mini-préparations (Birnboim et Doly, 1979) et utilisé pour le contrôle du clonage par séquençage.

2.6 Transfert dans le vecteur plasmidique pVL1392

Afin de faciliter le transfert de l'insert cloné dans le vecteur plasmidique et de contourner les problèmes liés à des digestions enzymatiques incomplètes, nous avons opté pour un sous-clonage dans le vecteur de transfert pGEM selon des modalités similaires à celles décrites précédemment. En effet, seule l'amorce sens FW1 a été modifiée en 5' afin d'y ajouter un site de restriction *Bgl*II (AGA⁺TCT) : 5'-GAAGATCTATGAAGATGGCGTCTGAATGACGC-3', alors que l'amorce RT5 n'a pas été altérée, un site de restriction *Not*I (GGG⁺CCC) étant déjà présent en 3' dans pGEM. Les nouveaux clones pGEM obtenus ont été ensuite digérés en présence *Bgl*II et *Not*I (Roche Diagnostics, Mannheim, Allemagne) afin de récupérer l'insert avant transfert dans le vecteur plasmidique pVL1392.

Une fois les sites de restriction ajoutés dans un nouveau vecteur de transfert, les inserts d'ORF2 complet des souches E1057, Cairo1, Cairo4 et Cairo7 ont été ensuite insérés dans le vecteur plasmidique à l'aide du kit BaculoGold™ pVL1392 Baculovirus Transfert Vector (BD Biosciences Pharmingen). Ce vecteur plasmidique de 9639 pb possède un locus du gène de la polyhédrine avec son promoteur et un site de clonage multiple (MCS) comportant de nombreux sites de restrictions (Figure 17).

Le pVL1392 possède en amont et en aval du MCS des séquences homologues à celles du baculovirus permettant une recombinaison intracellulaire du plasmide avec le génome linéarisé de baculovirus. De plus, le plasmide possède une cassette de résistance à l'ampicilline permettant le criblage des clones positifs après transformation dans les cellules JM109.

La technique est similaire à celle déjà utilisée pour le clonage dans pGEM. Les sites de restriction (*Bgl*II et *Not*I) qui ont été ajoutés lors du sous-clonage ont ainsi permis de positionner l'insert idéalement le plus proche possible du promoteur de la polyhédrine au niveau du site MCS et dans le bon sens, c.-à-d. de 5'→3'. Après la « miniprep », les clones pVL-ORF2 obtenus ont été contrôlés pour leur pureté et quantifiés par spectrophotométrie avant transfection des cellules *Sf*9.

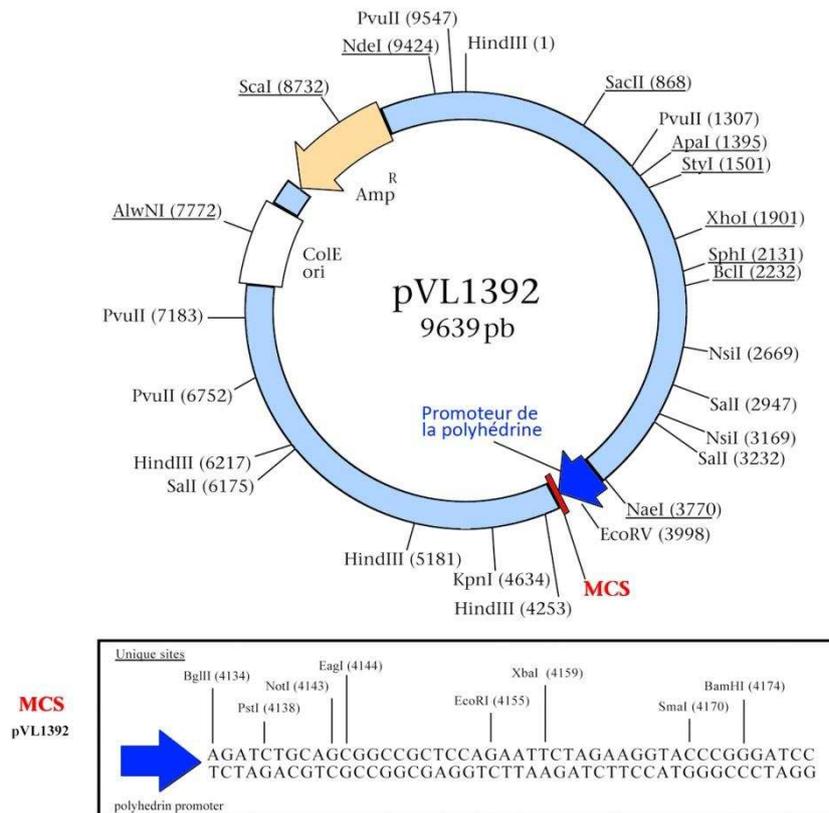


Figure 17. Structure du vecteur plasmidique pVL1392 avec son promoteur de la polyhédrine et son site de clonage multiple (MCS)

3. Le système baculovirus-cellules d'insecte

3.1 Les baculovirus

Les baculovirus forment une famille de virus dont l'aspect ressemble à un bâtonnet (*baculum* en latin), les *Baculoviridae*. Ils se caractérisent par deux sous-familles : les *Eubaculovirinae* comprenant les deux genres *Nucleopolyhedrovirus* (NPV) et les *Granulovirus* (GV), et les *Nudibaculoviridae*. Ces virus peuvent infecter majoritairement des espèces d'insectes ainsi que des crustacés mais pas les mammifères ou les vertébrés. Leur génome est constitué d'un ADN bicaténaire circulaire dont la taille est comprise entre 80 et 180 kpb (Figure 18).

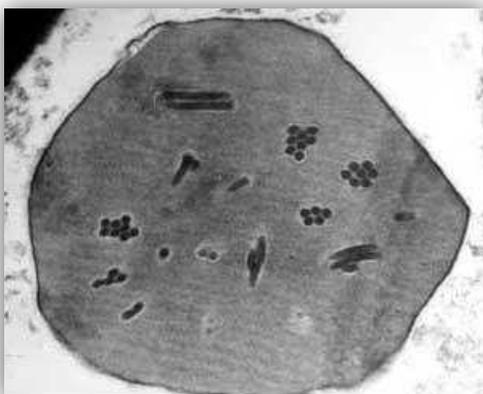


Figure 18. Photographie de nucléopolyhédrovirus (NPV) en microscopie électronique

Les baculovirus sont utilisés en biotechnologie pour la production de protéines recombinantes depuis 1983 (Smith *et coll.*, 1983). L'ADNc de la protéine d'intérêt est intégré au génome du virus en lieu et place du gène codant pour la polyhédrine, une protéine de matrice externe formant une gangue lui permettant de résister aux ultraviolets, en le plaçant sous son promoteur fort, *polh* (Figure 19).

Les deux lignées cellulaires couramment utilisées seules ou en tandem pour la production de protéines recombinantes par infection par le baculovirus sont les cellules *Sf9* et *Hi5*. La lignée cellulaire d'insecte *Sf9* est issue du légionnaire d'automne, le *Spodoptera frugiperda*, ravageur du maïs, du coton et du riz. La lignée cellulaire d'insecte *Hi5* ou BTI-TN5B1-4 est issue d'une chenille dévoreuse de choux, le *Trichoplusia Ni*.

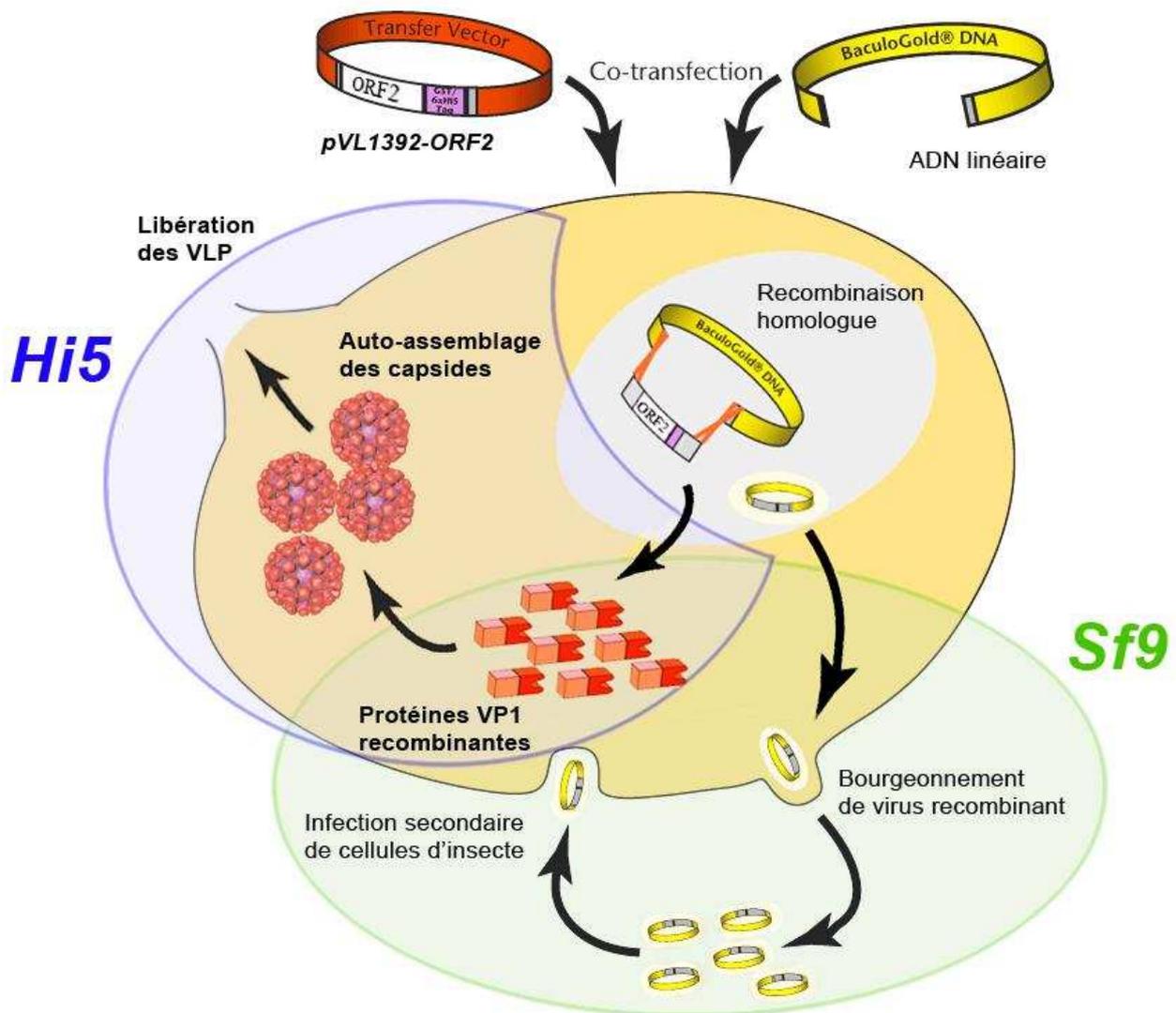


Figure 19. Synthèse de la transfection de pVL1392-ORF2 dans baculovirus et des productions d'inoculum dans Sf9 et de VLP dans Hi5.

L'intérêt de ce système (BEVS pour *Baculovirus Expression Vector System*) est qu'il permet d'obtenir après production et purification, une protéine recombinante fonctionnelle comportant des modifications post traductionnelles avancées. C'est Jiang *et coll.* (Jiang *et coll.*, 1992) qui ont produit pour la première fois des particules virales de synthèse (VLP) de norovirus à l'aide du baculovirus *Autographa californica*. Ce système permet en effet, outre la production de la protéine de capsid VP1 de norovirus, son auto-assemblage pour former la capsid entière du norovirus ou particules virales de synthèse (VLP).

A noter que d'autres promoteurs, tel que p10, et d'autres lignées cellulaires, par exemple la lignée cellulaire Sf21, peuvent être utilisés.

3.2 Culture des lignées de cellules d'insecte

Afin d'obtenir une production optimale de capsides de synthèse entières de norovirus, deux types cellulaires sont utilisés en tandem : les cellules d'insectes *Sf9* et les cellules d'insecte *Hi5*.

Les cellules d'insectes *Sf9* proviennent de BD Biosciences Pharmingen. Pour arriver à confluence, environ 4-5 jours à 27°C sont nécessaires. Les *Sf9* sont entretenues avec l'aide d'un milieu spécifique, le TNMFH[®] (BD Biosciences Pharmingen) en présence de sérum de veau foetal (SVF), dont le poids moléculaire est d'environ 67 KDa, et d'albumine. Or les VLP, une fois assemblées, ont un poids moléculaire assez proche, d'environ 60 KDa, ce qui va gêner la purification des particules virales néoformées. La présence en grande quantité d'albumine dans le milieu et la culture lente de ces cellules leur font préférer la lignée cellulaire *Hi5* pour la production de VLP. Les cellules *Sf9* sont réservées à la production de baculovirus recombinants pour laquelle elles sont performantes.

Les cellules d'insecte *Hi5* proviennent de la société Invitrogen. Leur culture est plus rapide, environ 2-3 jours à 27°C sont nécessaires pour arriver à confluence. Leur milieu de culture, ExpressFive™ (Invitrogen), étant dépourvu de SVF et la culture plus rapide, la production et la purification des VLP sont donc facilitées sur cette lignée cellulaire.

3.3 Co-transfections avec baculovirus

Les co-transfections des ADN des ORF2 clonés dans le vecteur pVL1392 des souches E1057, Cairo1, Cairo4, Cairo7 et E3436 ont été effectuées en suivant le protocole du fabricant à l'aide du kit de transfection BaculoGold™ (BD Biosciences Pharmingen) dans lequel le génome du baculovirus sauvage *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus (AcNPV) est présent sous

forme linéaire dépourvu du gène codant la polyhédrine et non infectieux. La circularisation du génome de baculovirus lors de l'intégration de l'insert par recombinaison permet au baculovirus de recouvrer son pouvoir infectieux.

Des plaques 6 puits ont été préparées avec 2 mL de culture de cellules *Sf9* à la concentration de 500.000 cellules pour 1 mL de TMNFH, soit 10^6 cellules *Sf9*. Une fois les cellules fixées au support de plaques, le milieu cellulaire a été retiré puis remplacé par 500 µL de tampon A (milieu de Grace avec 10% de SVF) issu du kit de transfection. Dans un tube stérile, 3 µL d'ADN linéarisé d'AcNPV ont été mélangés avec 3 à 3,5 µg de pVL-ORF2 pendant 10 minutes avant d'ajouter 500 µL de tampon B (25 mM de HEPES, pH 7,1, 125 mM de CaCl_2 , 140 mM NaCl). Les mélanges pVL-baculovirus ont été ensuite déposés délicatement, goutte à goutte, sur les cellules *Sf9* baignant dans le tampon A et placés pendant 4 heures à 27°C. Après l'incubation, le milieu est remplacé par du TMNFH et les plaques 6 puits remises à 27°C pendant 6 jours.

3.4 Plages de lyse et criblage des clones recombinants

Après 6 jours d'incubation à 27°C, les baculovirus recombinants sont récupérés afin d'être isolés et titrés à l'aide de la méthode des plages de lyse. Cette méthode permet à la fois d'isolés chaque clone de baculovirus recombinant produit lors de la transfection mais également de pouvoir sélectionner les clones qui ont un titre infectieux élevé.

Des dilutions en cascade de facteur 10 (de 10^{-1} à 10^{-6}) avec du TMNFH ont été réalisées puis inoculées à des cellules *Sf9* à raison de 1.10^6 cellules par puits dans 2 mL de TMNFH. Après une incubation d'1 heure à 27°C, l'inoculum a été remplacé par 2 mL de milieu TMNFH à 0,5% d'agarose avant d'être placé 6 jours à 27°C.

Au sixième jour, le tapis cellulaire de chaque puits a été coloré avec du rouge neutre (ou rouge de toluylène). Le rouge neutre est un colorant vital qui est endocyté par les cellules vivantes sous forme de vacuoles de pH acide et de couleur rouge. Les cellules *Sf9* détruites par le baculovirus, ne fixant donc pas le colorant, laissent alors une zone claire, ou plage, dans le tapis cellulaire, témoin de la lyse cellulaire. Les puits ont été recouverts avec 1 mL de TMNFH à 0,5% d'agarose et 1% de rouge neutre, puis les plaques ont été remises à 27°C pendant 24 heures. Les plages de lyses à la dilution 10^{-6} ont été ensuite prélevées individuellement puis placées chacune dans un tube contenant 500 µL de TMNFH avant d'être mises à 4°C toute la nuit. Le lendemain, 1, 10 et 100 µL de chaque clone ont été inoculés dans 3 puits contenant chacun 10^6 cellules *Sf9* et 2 mL de TMNFH et incubés pendant 6 jours à 27°C.

Enfin, à l'issue de la réamplification, chaque puits a été testé en ELISA avec le kit de détection norovirus Ridascreen® (RBiopharm, Lyon, France) afin de détecter les clones de baculovirus possédant l'insert et exprimant la protéine VP1, et de sélectionner un clone potentiellement plus performant pour un ORF2 donné.

3.5 Expression des protéines VP1 recombinantes

Une fois sélectionnés, les clones sont réamplifiés afin de produire suffisamment d'inoculum pour la production des VLP. Dans une flasque Greiner à filtre de 75 cm² CellStar® 658175 (Greiner Bio-one, Courtaboeuf, France), 10 millions de cellules *Sf9* ont été infectées avec seulement 100 µl d'inoculum (MOI<0,2), afin d'éviter une réversion de la recombinaison, et placées à l'incubateur à 27°C pour 6 jours. Cette réamplification a été utilisée pour produire 100 à 200 ml d'inoculum sur cellules *Sf9*.

Le stock d'inoculum une fois réalisée, les baculovirus recombinants ont été utilisés pour infecter des cellules *Hi5*, plus performantes pour la production des VLP et ne requérant pas de SVF. Des cellules *Hi5* ont été implantées dans des flasques à filtre de 175 cm² CellStar® 660160 (Greiner Bio-one, Courtaboeuf, France) à raison de 20 millions de cellules par flasque dans 10 ml de milieu ExpressFive™, puis infectées avec 4-5 ml d'inoculum (MOI≈5). Après une incubation de 3 heures à 27°C, l'inoculum a été retiré et remplacé par 20 ml d'ExpressFive™ puis les flasques ont été replacées à l'incubateur à 27°C pour 6 jours.

3.6 Purification des particules virales de synthèse

Au sixième jour, les flasques contenant des débris de cellules *Hi5* lysées, des baculovirus recombinants et des VLP ont été regroupées et centrifugées dans une ultracentrifugeuse basse vitesse Super T-21 (Sorvall). Afin d'éliminer les membranes cellulaires, les lysats ont été centrifugés à 6.000 x *g* à 4°C pendant 30 minutes avec un rotor SL-250T (Sorvall). Les surnageants ont été ensuite centrifugés à 14.000 x *g* à 4°C pendant 30 minutes avec un rotor SL-50T (Sorvall) pour sédimenter le baculovirus recombinant.

La purification des particules virales de synthèse a comporté par la suite plusieurs phases d'ultracentrifugation sur une ultracentrifugeuse Optima™ LX-80 (Beckman). Le surnageant a été centrifugé à l'aide d'un rotor SW32 Ti (Beckman) à 30.000 rpm (environ 150.000 x *g*) pendant 2 heures à 4°C sur un coussin de sucrose à 30% dans du tampon TNC (50 mM Tris-HCl (pH 7,4), 0,15 M NaCl, 10 mM CaCl₂). Les culots ont ensuite été repris dans 200 à 500 µl de tampon TNC

avec de la leupeptine à 0,5 µg/ml (Leupeptine trifluoroacétate, Réf. L-2023, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA) et placés à 4°C toute la nuit.

Les culots resuspendus ont été traités au fréon et centrifugés à 10.000 rpm à 5°C pendant 10 minutes dans une centrifugeuse Eppendorf 5417R afin d'éliminer la fraction lipidique restante. Une fois traités, les culots ont été centrifugés à l'aide d'un rotor SW60 Ti (Beckman) à 45.000 rpm (environ 225.000 x g) pendant 18 heures à 10°C sur un gradient isopycnique de chlorure de césium (CsCl) dissous dans du tampon TNC et dont l'indice de réfraction initiale était de 1,363, correspondant à la densité de flottaison des VLP de norovirus dans le CsCl (Bruner et Vinograd, 1965 ; Belliot *et coll.*, 2001) (Figure 20).

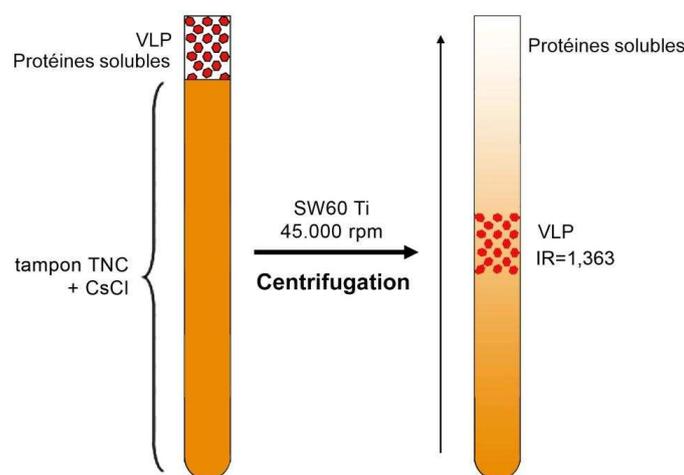


Figure 20. Schématisation de la préparation et du résultat attendu du gradient de chlorure de césium (CsCl)

Les fractions de VLP ont ensuite été diluées dans 50 volumes de tampon TNC puis désalinisées par ultracentrifugation sur coussin de sucrose à 30% avec un rotor SW32 Ti selon les mêmes modalités que décrites précédemment puis les culots ont été resuspendu dans du TNC-leupeptine et placés à 4°C toute la nuit.

Dans l'éventualité où les VLP produites étaient instables, se traduisant par une perte importante de particules complètes lors du gradient de CsCl, ce dernier a été remplacé par un gradient discontinu de sucrose avec un pourcentage décroissant de sucrose allant de 60 % (au fond du tube) à 10 % (en haut du tube) (Belliot *et coll.*, 2001). Les culots ont été ainsi centrifugés sur un rotor SW41 (Beckman) à 35.000 rpm pendant 20 heures à 5°C (Figure 21).

Les VLP purifiées ont été ensuite quantifiées par spectrophotométrie à l'aide du kit de dosage colorimétrique BSA Protein Assay (Pierce, IL, USA) selon la méthode de Buiret (complexage des groupe azoté des protéines avec le cuprate en présence de l'acide bicinchoninique). Pour éviter

les phénomènes de précipitation, les concentrations des VLP ont été ramenées à 1 mg/ml de protéine. Les VLP ont été mises en aliquotes par fraction de 10 µl puis conservées à +4°C pour de courtes périodes ou congelées à -40°C après un *flash freeze* dans de l'azote liquide pour de longues durées de stockage.

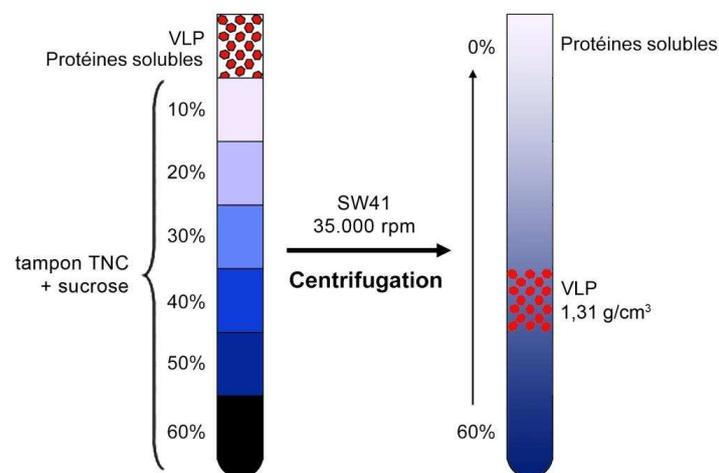


Figure 21. Schématisation de la préparation et du résultat attendu du gradient discontinu de sucrose

Jusqu'à 4 µg de VLP de chaque variant ont été déposés et contrôlés en SDS-PAGE sur gel de polyacrylamide avec gradient de 4 à 12% de Bis-Tris (NuPAGE® Novex, Réf. #NP0322BOX, Invitrogen, France). Les protéines ont été révélées par coloration au bleu de Coomassie.

3.7 Contrôle par microscopie de force atomique

La dimension et la qualité des VLP ont été contrôlées par microscopie électronique après coloration négative et par microscopie de force atomique (AFM) sur lame de mica avec un Nanoscope III (Veeco, Santa Barbara, CA). Les analyses d'AFM ont été effectuées par Céline ELIE-CAILLE dans le cadre d'une collaboration avec l'Institut FEMTO-ST de Besançon.

L'AFM est une technique de microscopie à sonde locale qui sert à visualiser la topographie de la surface d'un échantillon jusqu'à une résolution de l'ordre de l'atome. Le principe se base sur les interactions entre l'échantillon et une pointe montée sur un microlevier. La pointe balaie la surface à caractériser, et l'on agit sur sa hauteur selon un paramètre de rétroaction. Un ordinateur enregistre cette hauteur et peut ainsi reconstituer une image de la surface. Il existe plusieurs modes d'utilisation de l'AFM que l'on peut regrouper en 2 catégories : le mode contact (ou statique) et les modes dynamiques qui sont la modulation d'amplitude (ou contact intermittent) et la modulation de fréquence :

- le mode contact consiste à utiliser les forces répulsives : la force appliquée au levier est telle que la pointe est en contact permanent avec la surface pour la balayer, elle est donc repoussée du fait du principe de Pauli, et le levier est dévié. La rétroaction s'effectue sur la mesure de la direction de la déviation,
- le mode modulation d'amplitude dit « *tapping* » consiste à faire vibrer le levier à sa fréquence propre de résonance avec une certaine amplitude. Quand la pointe interagit avec la surface, l'amplitude décroît parce que la fréquence de résonance change. La rétroaction se fait alors sur l'amplitude d'oscillation du levier,
- enfin, le mode modulation de fréquence permet de séparer directement l'effet des forces conservatives et dissipatives. La rétroaction s'effectue sur la déviation de la fréquence de résonance.

Pour la génération d'image des VLP par AFM, les différents échantillons de VLP ont été utilisés à la concentration de 1 mg/mL. Environ 25 µL de VLP ont été adsorbés pendant 30 min sur une surface de mica fraîchement clivée puis la surface est lavée trois fois avec du tampon HBS afin d'éliminer les VLP non adsorbées. L'acquisition des images a été opérée en modes contact (CM) et *tapping* (TM) à l'aide de microleviers en nitrure de silicium (NP-S, Bruker Nano) présentant des constantes d'élasticité de 0,32 N/m ou de 0,58 N/m et des fréquences de résonance s'étendant de 8,5 à 9,5 kHz. Pour les paramètres de contrôle, les valeurs typiques des réglages étaient situées entre 0,5 à 1,5 V, selon les dimensions de la surface à balayer et l'amplitude d'oscillation en mode *tapping*. L'amplitude d'oscillation était généralement maintenue à 5-10 nm au-dessus de la surface.

4. Mutagenèse dirigée du site de liaison aux HBGA

Afin d'étudier les acides aminés formant la poche hydrophobe décrite par Cao *et coll.* (Cao *et coll.*, 2007), nous avons effectué une mutagenèse dirigée du vecteur de transfert de l'ORF2 de la souche E1057, variant Hunter, (Tableau 3), à l'aide du kit QuickChange™ site-directed mutagenesis (Stratagene). La mutagenèse a consisté en des substitutions et des délétions des résidus d'acide aminés relativement conservés (S343, T344/R345, D373, S442, G443 and Y444) impliqués dans la liaison avec l'α-fucose des HBGA (Figures 12 et 13). Les substitutions visaient à supprimer, si possible, uniquement le groupement hydroxyle interagissant avec le sucre sans modifier la structure tridimensionnelle, facteur potentiel d'instabilité pour la capsid. De même, le résidu de thréonine en position 395 (T395), caractéristique des variants circulant après 2002, a été supprimé pour produire le recombinant ΔT395 (Figure 22).

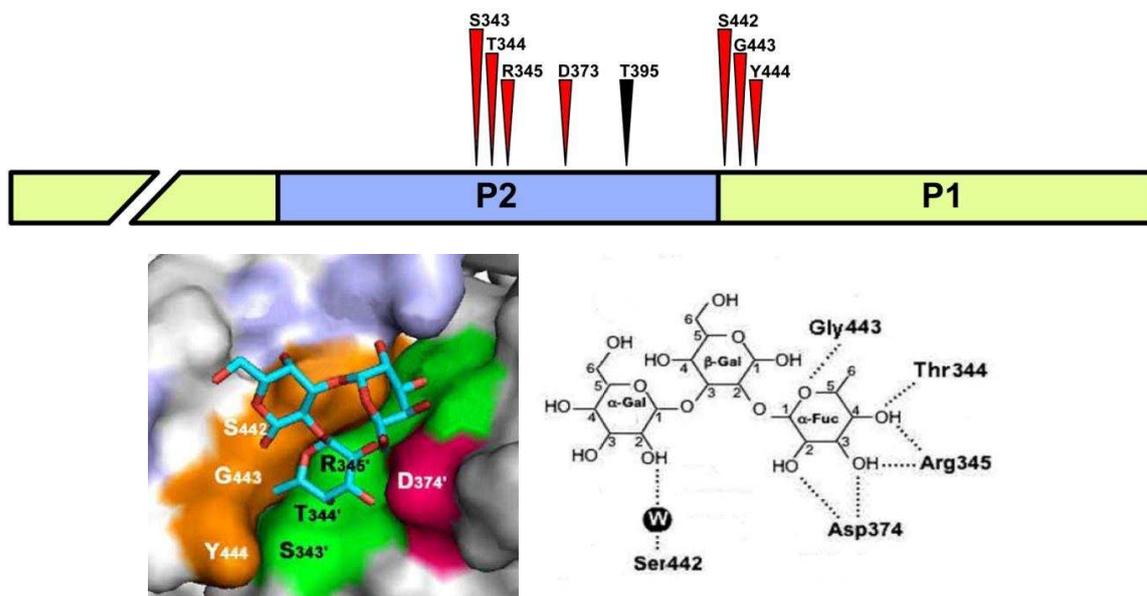


Figure 22. Localisation sur l'ORF2 des aa mutés d'après (Cao et coll., 2007 ; Tan et coll., 2008b)

La première étape de la mutagenèse dirigée consiste en une PCR standard utilisant, non pas une *Taq* polymérase, mais une ADN-polymérase *Pfu* de haute fidélité (Tableaux 16 et 17) et des amorces complémentaires spécifiques de la région cible. Ces amorces sont des oligonucléotides d'environ 25 à 33 bases recouvrant le site de mutation et comportant, pour les substitutions, un échange de 1-2 bases nucléotidiques dans le codon cible, et pour les délétions, une absence de ce codon, les uns et les autres étant flanqués de séquences non modifiées permettant un appariement spécifique avec la séquence de l'ORF2 dans le plasmide (Tableau 18). Après la PCR de mutagenèse, le produit d'amplification est incubé 1 h à 37°C avec 10 U d'enzyme de restriction *DpnI* afin de digérer l'ADN parent ne comportant pas la mutation. Après digestion, le produit de PCR est contrôlé sur gel d'agarose en électrophorèse.

Tableau 16. Milieu réactionnel pour la PCR de mutagenèse dirigée sur pVL-E1057

Réactifs	Volumes
Eau	qsp 51 µℓ
dNTP (10mM)	1 µℓ
Amorce sens ou <i>forward</i> (125 ng/µℓ)	1 µℓ
Amorce anti-sens ou <i>reverse</i> (125 ng/µℓ)	1 µℓ
<i>Pfu</i> polymérase haute fidélité	1 µℓ
Tampon 10X	5 µℓ
Quick solution	3 µℓ
pVL-E1057	1 µℓ
Volume final	51 µℓ

Tableau 17. Cycles de la réaction de mutagenèse dirigée sur pVL-E1057 par PCR

Étapes	Initialisation	Amplification	Élongation
Paramètres	95°C, 1 min	95°C, 50 sec 60°C, 50 sec 68°C, 13 min	68°C, 7 min
Cycles	1	18	1

Tableau 18 : Amorces forward utilisées lors des mutagenèses dirigées du pVL-E1057

Mutations	Séquences nucléotidiques ^a
S343A ΔS343	5'-GGAGGGATGGC <u>GCG</u> ACCCGTGGTCAC-3' 5'-GGAGGGATGGC(<u>TCG</u>)ACCCGTGGTCAC-3'
T344A-R345Q Δ(T344/R345)	5'-GGAGGGATGGCTCG <u>GCCC</u> AAAGGTCACAAAGCCAC-3' 5'-GGAGGGATGGCTCG(<u>ACCCGT</u>)GGTCACAAAGCCAC-3'
D373N ΔD373	5'-CTGATACAAGCAAT <u>A</u> ACTTTGAAACTGGCC-3' 5'-CTGATACAAGCAAT(<u>GAC</u>)TTTGAAGACTGGCC-3'
ΔT395	5'-CAGGATGGTAGTACC(<u>ACC</u>)CACCAAATGAACCC-3'
S442A ΔS442	5'-CTATGCCCGGCTGC <u>GCC</u> GGGTATCCCAACATG-3' 5'-CTATGCCCGGCTGC(<u>AGC</u>)GGGTATCCCAACATG-3'
G443A ΔG443	5'-GCCCGGATGCAGCG <u>C</u> GATCCCAACTG-3' 5'-GCCCGGATGCAGC(<u>GGG</u>)TATCCCAACTG-3'
Y444F ΔY444	5'-GGATGCAGCGGG <u>T</u> TCCCAACATGAATTT-3' 5'-GGATGCAGCGGG(<u>TAT</u>)CCCAACATGAATTT-3'

^a Les codons substitués sont soulignés et les bases modifiées en orange. Les codons supprimés sont indiqués entre parenthèse et en orange.

Les plasmides mutés sont ensuite utilisés pour transformer des cellules XL1-blue fournies dans le kit de mutagenèse : 1 µl du produit de digestion ont été prélevés pour servir à la transformation de 50 µl de bactérie XL1-blue en présence de 2 µl de 2-mercapto-éthanol et mis dans la glace pendant 30 min. Afin de rendre perméable la membrane des bactéries, le mélange a été plongé pendant 45 sec dans un bain-marie à 42°C puis remis immédiatement dans la glace afin de créer un choc thermique. Ensuite, 500 µl de milieu SOC stérile (en remplacement du milieu NZY⁺) ont été ajoutés à la réaction avant d'incuber le tout à 37°C pendant 90 min sous agitation continue à 250 rpm dans un incubateur-agitateur Minitron® (Infors HT, Bottmingen, Suisse).

Après transformation, les bactéries ont étéensemencées sur boîte de Pétri sur un milieu Luria-Bertani (milieu LB à 1,5% d'agarose) contenant 100 µg/ml d'ampicilline puis incubées à 37°C toute la nuit comme décrit plus haut. Les colonies ont été ensuite prélevées puis réensemencées dans 5 ml de milieu LB stérile et incubées à 37°C pendant 16 heures sous

agitation à 250 rpm. Après « miniprep », l'ADN plasmidique a été précipité à l'éthanol comme décrit plus haut avant d'être quantifié.

Les inserts d'ORF2 des plasmides obtenus par mutagenèse ont été entièrement séquencés et les séquences éditées avec le logiciel CodonCode® Aligner, comme décrits plus haut, afin de déterminer si les mutations désirées étaient effectivement présentes dans les séquences d'OR2 mais également de contrôler l'absence de mutations dans d'autres régions de l'insert et qui pourraient potentiellement influencer sur les résultats des profils d'interaction.

Enfin, les plasmides d'ORF2 muté ont été utilisés pour effectuer des co-transfections avec le baculovirus AcNPV dans des cellules *Sf9* et produire des VLP de mutant selon le protocole décrit plus haut.

B. OUTILS ET MÉTHODES DE MESURE QUALITATIVES ET QUANTITATIVES DES INTERACTIONS VIRUS-RÉCEPTEURS

1. Production d'anticorps monoclonaux spécifiques des GII.4

Outils indispensable pour l'évaluation des interactions entre les particules virales de synthèse (VLP) et les antigènes tissulaires de groupes sanguins (HBGA), les anticorps monoclonaux facilitent la sélection des clones de baculovirus recombinants efficaces et permettent l'élaboration de techniques ELISA pour l'établissement des profils d'accroche des norovirus GII.4 sur les salives et les glycanes de synthèse. Pour obtenir cet anticorps monoclonal, nous avons eu recours à la technique d'hybridation cellulaire qui consiste à fusionner une cellule immortelle de plasmocytome murin avec un lymphocyte B provenant de la rate d'une souris immunisée avec des VLP de norovirus GII.4 (Kohler et Milstein, 1975). La production d'anticorps monoclonaux a été effectuée par Marie-Anaïs ESTIENNEY au laboratoire.

1.1 Immunisation et préparation des cellules myélomateuses

Des souris femelles Balb/C âgées de 6 à 8 semaines ont été immunisées à l'aide de 4 injections intrapéritonéales à 15 jours d'intervalle dont une de *boost*, 3 jours avant prélèvement de la rate (Tableau 19).

Pour la fusion cellulaire avec les lymphocytes spléniques immunisés, des cellules myéloïdes Sp2/0-Ag14 (CRL-1581™, ATCC ; (Shulman *et coll.*, 1978)) ont été décongelées 6 jours avant la fusion et cultivées en flasques à bouchon ventilé CellStar® (Réf. 658175 et 661175, Greiner Bio-one, Courtaboeuf, France) dans un milieu de culture RPMI 1640 à 37°C et 5 % de CO₂. L'absence de mycoplasmes dans les cultures a été contrôlée avant la fusion par PCR.

Tableau 19. Protocole d'immunisation des souris Balb/C

Injections	Réactifs	Masses/Volumes
1^{ère} / 2^{ème} (100 µℓ)	CpG oligodésoxynucléotides ^a VLP purifiées Adjuvant de Freund incomplet ^b PBS stérile	50 µg 15 µg 50 µℓ qsp 100 µℓ
3^{ème} (100 µℓ)	VLP purifiées Adjuvant de Freund incomplet ^b PBS stérile	15 µg 50 µℓ qsp 100 µℓ
4^{ème} (boost) (100 µℓ)	VLP purifiées PBS stérile	30 µg qsp 100 µℓ

^a CpG-ODN OliGold® 1826, Eurogenetec, Sereing, Belgique ; ^b Réf. F5506, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA.

La veille de la fusion, les cellules Sp2/0-Ag14 ont été centrifugées pendant 10 min à 900 x g puis le culot a été repris dans 10 mℓ de milieu de culture de base (Tableau 20) avant comptage à la cellule Malassez après dilution au 1/20^{ème} dans du tampon PBS avec 0,1 % de bleu Tryptan. La concentration des cellules a été ajustée à 2.10⁵ cellules par mℓ.

Des macrophages de 2 souris Balb/C femelles ont été également récoltés par ponction de la cavité intra-péritonéale avec 4 mℓ de milieu de culture complet (Tableau 20). Le liquide de ponction a été récolté sans aspiration excessive après injection de 7 mℓ de RPMI puis a été examiné au microscope afin de déceler la présence ou non d'une contamination bactérienne ou parasitaire due à la perforation intestinale. Après l'ajout de 100 mℓ de milieu de culture complet, 100 µℓ ont été déposés dans chacun des puits de 10 plaques de microtitration de 96 puits Nunclon™ Microwell® (Réf. 167008, Nunc, Thermo Scientific, Saint-Herblain, France), puis celles-ci ont été incubées à 37°C et 5 % de CO₂.

Tableau 20. Milieux de culture pour hybridome

Milieux	Réactifs	Volumes
Culture	Base	
	RPMI 1640 ^a	500 mℓ
	Glucose (20 M)	6 mℓ
	Pyruvate de sodium (100 mM) ^b	6 mℓ
	L-glutamine (200 mM) ^c	qsp 100 µℓ
	Penicilline/streptomycine ^d	6 mℓ
	Complet	
Milieu de base	500 mℓ	
SVF 20% (décomplémenté) ^e	125 mℓ	

^a Réf. CM1RPM00-0, Eurobio SA, Paris, France ; ^b Réf. S8636, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA ; ^c Réf. G7513, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA ; ^d Réf. P0781, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA ; ^e Réf. 51810, Biowest, Paris, France.

1.2 Fusions cellulaires

Préalablement à la fusion cellulaire, les sérums des souris ont été testés par ELISA sur des VLP de norovirus GII.4 et de baculovirus sauvage afin de vérifier que l'immunisation avait permis d'obtenir des anticorps dirigés contre les VLP.

Trois jours après la dernière immunisation, les souris ont été sacrifiées et leur rate a été prélevée et broyée dans un Potter contenant environ 5 mℓ de milieu de culture de base froid. Les cellules spléniques ont été remises en suspension par pipetage et transférées dans un tube de 50 mℓ Falcon® (Réf. 352073, BD Biosciences) à travers une gaze stérile afin d'éliminer les débris de la capsule de la rate (tissu conjonctif). Les cellules ont été centrifugées à 900 x g pendant 10 min puis le culot a été remis en suspension dans 10 mℓ de milieu de culture de base avant comptage (en général, environ 10⁸ cellules lymphocytaires).

Les cellules spléniques et les cellules myélomateuses ont été mélangées dans un rapport de 5 pour 1, puis centrifugées à 700 x g pendant 10 min. Sur le culot cellulaire, 1 mℓ de PEG 1500 stérile (Réf. 10783641001, Roche diagnostics, Mannheim, Allemagne), pré-incubé à 37°C, a été déposé goutte à goutte (environ 90 sec) puis le tout a été lentement dilué avec 10 mℓ de milieu de culture de base avant d'être centrifugé à 150 x g pendant 10 min.

Les cellules ont été remises en suspension dans 120 mℓ de milieu de culture complet associé à 10 % d'hybridokine (Réf. UP826430, Uptima, Interchim, Paris, France) et du milieu sélectif HAT 2X (hypoxanthine 5 mM, aminoptérine 20 μM, thymidine 0,8 mM ; Réf. 21060-17, Gibco, Invitrogen, France), puis distribuées à raison de 100 μℓ par puits sur les 10 plaques de titration 96 puits contenant les 100 μℓ de macrophages.

Les hybridomes ont été cultivées durant 2 semaines dans du milieu de culture complet comportant du HAT 1X additionné de 5 % d'hybridokine, puis dans du milieu sans hybridokine et enfin dans du milieu de culture complet uniquement.

1.3 Recherche d'hybridomes spécifiques par technique ELISA

Trois semaines après la fusion, les surnageants des puits dans lesquels les hybridomes se sont bien développés ont été prélevés puis testés en parallèle par ELISA sur des lysats cellulaires de baculovirus recombinant (présence de VLP) et de baculovirus sauvage (absence de VLP). En effet, les VLP purifiées utilisées pour l'immunisation sont pures à plus de 90 % mais il existe toujours une fraction résiduelle de baculovirus recombinant très immunogène.

La technique ELISA utilise un *coating* de lysat cellulaire dilué au 1/10^{ème} dans du tampon carbonate-bicarbonate à pH 9,6 sur des barrettes 8/16 puits Nunc-Immuno™ MaxiSorp (Réf. 469949/469914, Nunc, Thermo Scientific, St-Herblain, France) (Tableau 21).

Tableau 21. *Tampon carbonate-bicarbonate*

Réactifs	Volumes
Carbonate de sodium (0,2 M) ^a	8 mℓ
Bicarbonate de sodium (0,2 M) ^b	17 mℓ
Eau	qsp 100 mℓ

^a Prolabo™ Analar Normapur, Réf. 27771.290, VWR International, West Chester, PA, USA ; ^b Réf. 106329, Merck KGaA, Darmstadt, Allemagne.

Les barrettes ont été incubées toute une nuit à 4°C puis lavées 5 fois avec du tampon PBS additionné de Tween 20 à 0,05%. Les puits ont été ensuite saturés (blocage des sites spécifiques) avec 200 µℓ de PBS-lait écrémé à 4% et incubés 2 heures à 37°C avant d'être de nouveau lavés avec du PBS-Tween. Dans chaque puits, 50 µℓ de surnageant d'hybridomes ont été déposés non dilués et incubés pendant 1 heure à 37°C avant d'être de nouveau lavés avec du PBS-Tween. Puis, 100 µℓ d'anticorps anti-IgG de souris couplés à la peroxydase (Réf. PI 2066, Vector/ABCYS, Paris, France) dilués au 1/5000^{ème} dans du PBS-lait à 4% ont été ajoutés dans chaque puits et incubés à 37°C pendant 30 min. Après un nouveau lavage au PBS-Tween, 100 µℓ de substrat, le 3,3',5,5'-tétraméthyl-benzidine ou TMB (KPL/Eurobio, Courtaboeuf, France), ont été ajoutés dans chaque puits et incubés 10 min à 25°C et à l'obscurité. Enfin, la réaction a été stoppée par 50 µℓ d'acide chlorhydrique (HCl) et les densités optiques (DO) ont été lues au spectrophotomètre à la longueur d'onde de 450 nm.

1.4 Clonage des hybridomes spécifiques

Les hybridomes spécifiques de norovirus ont été clonés à raison de 10 cellules par puits sur une plaque de 96 puits à fonds coniques Microwell™ U96 (Réf. 163320, Nunc, Thermo Scientific, St-Herblain, France). Après une à deux semaines d'incubation à 37°C et 5 % de CO₂, tous les puits contenant un hybridome ont été testés de nouveau en ELISA comme décrit plus haut. L'hybridome le plus positif a été de nouveau cloné à 1 cellule par puits puis testés de nouveau après une première amplification. Une fois que tous les hybridomes clonés ont été testés positifs en ELISA, l'anticorps a été considéré comme monoclonal.

Les puits donnant le meilleur résultat en ELISA ont été amplifiés par repiquage sur boîte de culture multiple Nunclon™ 24 puits (Réf. 142475, Nunc, Thermo Scientific, St-Herblain, France)

puis sur boîte de culture multiple Nunclon™ 6 puits (Réf. 140675, Nunc, Thermo Scientific, St-Herblain, France). Enfin, l'hybridome a été amplifié dans des flasques à bouchon ventilé CellStar® (Réf. 690175, 658175 et 661175, Greiner Bio-one, Courtaboeuf, France).

1.5 Caractérisation des anticorps monoclonaux produits

Les anticorps monoclonaux provenant des surnageant de culture ont été caractérisés par ELISA et Western blot afin de déterminer leur performance et le type d'épitope qu'ils reconnaissent (séquentiel ou conformationnel). Les anticorps obtenus ont été testés sur des VLP de virus de Norwalk (GI.1), dont le plasmide de transfert pVL a été gracieusement fourni par Kim GREEN du NIAID, des VLP de variant GII.4 Hunter (souche E1057) et une souche de norovirus murin MNV-1 (GV) gracieusement fournie par Herbert W. VIRGIN et mise en culture sur cellules RAW264.7 au laboratoire. Le typage des anticorps a été effectué auprès de Marc BOSSUS de bioMeyrieux.

1.6 Production des anticorps monoclonaux en ascite

La production d'anticorps monoclonaux par le biais de liquide d'ascite chez les souris Balb/C femelles a nécessité un amorçage intrapéritonéal par injection de pristane au moins 6 jours avant l'injection des hybridomes. Le volume maximum injecté en intrapéritonéal était de 0,2 mL par animal précédé au moins 10 min avant par l'injection en sous-cutané de buprénorphine (0,05 à 0,1 mg/kg) pour son action antalgique.

Chaque souris a reçu, par injection intrapéritonéale, 10^7 cellules d'hybridomes dans 1 mL de milieu de culture de base et a été pesée quotidiennement à partir du 7^{ème} jour post-inoculation afin de que le poids de l'animal n'excède pas 150 % de son poids initial. Les prélèvements du liquide d'ascite ont été effectués dans le cadre d'une procédure unique terminale : les souris ont été euthanasiées puis l'abdomen a été ponctionné à l'aiguille et le liquide d'ascite a été recueilli dans un tube de 15 mL Falcon® (Réf. 352095, BD Biosciences) puis centrifugé à 3.000 rpm et conservé à 4°C.

2. Les antigènes tissulaires de groupes sanguins

Deux sources de HBGA ont été explorées : la salive qui est un mélange complexe de sucres susceptibles de servir de ligand aux norovirus et des oligosaccharides de synthèse qui permettent d'étudier des structures glucidiques simples indépendamment des autres. La

confrontation des données obtenues doivent permettre de tirer des conclusions quant aux profils d'interaction de chaque variant de norovirus GII.4.

2.1 Salives phénotypées

Le panel de salives phénotypées est issu d'une collaboration avec l'équipe INSERM de Jacques LE PENDU à Nantes qui a collecté, après consentement éclairé chez des individus sains, 46 salives et écouvillonnages de cellules buccales, lors d'une précédente étude (Marionneau *et coll.*, 2005). Ces prélèvements avaient été approuvés par le Comité de Protection des Personnes (CPP) Ouest IV de Nantes (anciennement Comité Consultatif de Protection des Personnes dans la Recherche Biomédicale - CCPPRB) sous le numéro BRD02/2-P. Chaque salive a été typée et le phénotype sécréteur/non-sécréteur a été confirmé par génotypage du gène *FUT2*. Le protocole est rappelé ici pour mémoire.

2.1.1 Préparation et typage des salives

Les échantillons de salive ont été bouillis immédiatement après leur collecte dans du tampon PBS pendant 10 minutes et centrifugés pendant 5 minutes à 13.000 x *g*. Les surnageants ont été récupérés et conservés à -20°C jusqu'à leur utilisation.

Les échantillons de salives ont été typés par ELISA pour détecter la présence des antigènes de groupe sanguin A, B, H et Lewis comme décrit précédemment (Marionneau *et coll.*, 2005). Des plaques de titration de 96 puits Nunclon™ Microwell® (Réf. 167008, Nunc, Thermo Scientific, Saint-Herblain, France) ont été *coatées* avec les salives bouillies diluées au 1/400^{ème} dans 100 mmol/ℓ de tampon carbonate-bicarbonate à pH 9,6 puis incubées toute la nuit à 37°C en atmosphère humide. Les plaques ont été ensuite lavées 5 fois avec du tampon PBS (Dulbecco's PBS, Réf. P0750, Biowest, Paris, France) additionné de Tween 20 à 0,05% (Polysorbate 20, Réf. P5927, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA) avant d'être saturées avec du PBS-lait écrémé à 5% (Régilait en poudre) et incubées 1 heure à 37°C avant d'être de nouveau lavées avec du PBS-Tween. Dans chaque puits, des anticorps monoclonaux anti-HBGA dilués dans du PBS-lait écrémé à 5% ont été déposés et incubés 2 heures à 37°C (Tableau 22). Après un nouveau lavage avec du PBS-Tween, des immunoglobulines anti-souris conjuguées à la phosphatase alcaline diluées dans du PBS-lait écrémé à 5% ont été ajoutées et incubées pendant 1 heure à 37°C. Après un dernier lavage au PBS-Tween, la réaction a été révélée par du *para*-nitrophénylphosphate (pNPP, Réf. N76953, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA) et les densités optiques (DO) ont été lues au spectrophotomètre à la longueur d'onde de 405 nm.

Tableau 22. Anticorps monoclonaux utilisés pour le typage des salives d'après *Marionneau et coll., 2005.*

Anticorps monoclonaux	Antigènes cibles (et réactions croisées)
3-3A	A types 1 à 4, A-di types 1 et 2
2-25LE	Le ^b (\pm Le ^a)
7LE	Le ^a
19-OLE	H type 2 (\pm Le ^x)
ED3	tous B
BG4	H type 1
LM137/276	H type 1 et 3 (\pm Le ^b)

2.1.2 Génotypage du gène *FUT2*

L'ADN génomique a été extrait à partir des écouvillonnages de cellules épithéliales buccales au moyen du mini kit QIAamp® ADN (Qiagen, Hilden, Allemagne), selon les instructions du fabricant. Pour chaque prélèvement, un fragment du gène *FUT2* a été amplifié par PCR à l'aide des amorces présentées dans le [tableau 23](#). Les fragments amplifiés ont été digérés par l'enzyme *Avall*, dont le site de restriction est supprimé par la mutation G428A, caractéristique du phénotype non-sécréteur et présente dans 19,5% de la population Française.

Tableau 23. Amorces utilisées pour la détermination du caractère sécréteur/non-sécréteur d'après *Marionneau et coll., 2005.*

Amorces	Polarité
5'-GAGGAATACCGCCACATCCCGGGGGAGTAC-3'	sens (<i>forward</i>)
5'-ATGGACCCCTACAAAGGTGCCCGGCCGCT-3'	anti-sens (<i>reverse</i>)

2.1.3 Hémagglutination et génotypage du gène *ABO*

Pour chacun des écouvillonnages de cellules épithéliales buccales, la détermination phénotypique du groupe sanguin A, B ou O a été effectuée par hémagglutination. La discrimination des sous-groupes A1 et A2 parmi les échantillons de sécréteur du groupe A a été effectuée par amplification et séquençage à la recherche de délétions dans les exons 6 (group O) et 7 (groupe A) du gène *ABO* à l'aide des amorces indiquées dans le [tableau 24](#).

Tableau 24. Amorces utilisées pour l'amplification des exons 6 et 7 du gène *ABO*^a d'après *Marionneau et coll., 2005.*

Amorces	Polarités
Exon 6	
5'-CCGTTGGAGTCGCATTTGCCTCTGGTTGG-3'	sens (<i>forward</i>)
5'-CAGCAGAAGCCACCATCCCTGGGTGAGACG-3'	anti-sens (<i>reverse</i>)
Exon 7	
5'-CCGAGGACTCGCTCAGGACAGGGCAGGAG-3'	sens (<i>forward</i>)
5'-TGGGGACGGGGCCTAGGCTTCAGTTACTACA-3'	anti-sens (<i>reverse</i>)

2.2 Oligosaccharides de synthèse

Deux types d'oligosaccharides de synthèse sont disponibles et sont conjugués soit à du polyacrylamide (PAA) soit à de l'albumine humaine (HSA) ou bovine (BSA). Les glycoconjugués PAA sont utilisés en ELISA à 4°C alors que les glycoconjugués HSA/BSA le sont à 37°C.

2.2.1 Sucres conjugués au polyacrylamide

Les sucres conjugués au polyacrylamide (PAA) ont été fournis par l'équipe de Jacques Le Pendu de l'INSERM de Nantes et sont listés dans le [tableau 25](#). Au total, 22 sucres-PAA ont été testés en ELISA à 4°C.

Tableau 25. Liste succincte des glycoconjugués PAA de l'étude

Oligosaccharides de synthèse	Oligosaccharides de synthèse
H type 1 (LNFP)	Lewis a
H type 2	Sialyl-Lewis a
H type 3	Lewis b
H disaccharide	Lewis d
A type 2	Lewis x
A type 2 β	α -Gal-Lewis x
A disaccharide	3'-O-Su-Lewis x
A trisaccharide	Sialyl-Lewis x
B type 2	6(GlcNAc)-O-Su-Sialyl-Lewis x
B disaccharide	Sialyl-Lewis x pentaose
B trisaccharides	Lewis y

2.2.2 Sucres conjugués à l'albumine

Les sucres conjugués à l'albumine de sérum humain (HSA) et de sérum bovin (BSA) ont été achetés auprès de la société Isosep AB (Uppsala, Suède) et des laboratoires Dextra (Reading, Royaume-Uni) et comportaient en moyenne entre 17 et 20 résidus de sucres par protéine, respectivement ([Tableau 26](#)). Au total, 16 sucres-HSA/BSA ont été testés en ELISA à 37°C sur les VLP Hunter mutants, et 15 sur les VLP de variants GII.4.

Enfin, trois trisaccharides conjugués à l'albumine ont été utilisés pour les mesures d'affinité en résonance plasmonique de surface (SPR) : LNFP I, A-tri et B-tri.

Tableau 26. Caractéristiques des principaux glycoconjugués HSA/BSA de l'étude

Oligosaccharides de synthèse	Épitopes	Porteur ^a	Nombre de résidus de sucre par porteur ^b
Lacto-N-fucopentaose I *	H type 1	HSA	25
"	"	BSA	20
2'-fucosyllactosamine *	H type 2	HSA	19
A	A	HSA	N/D
A-hexasaccharide	A-hexa	HSA	N/D
A-heptasaccharide *	A-hepta	HSA	18
A-trisaccharide *	A-tri	HSA	19
"	"	BSA	19
N-acétylgalactosamine	A (terminal)	HSA	N/D
B	B	HSA	19
B-trisaccharide *	B-tri	HSA	N/D
"	"	BSA	21
Lacto-N-difucohexaose I *	Le ^b	HSA	8.5
Lacto-N-fucopentaose III *	Le ^x	HSA	12
tri- Lacto-N-fucopentaose III	tri- Le ^x	HSA	N/D
Lewis y-tetrasaccharide *	Le ^y	HSA	15
Lacto-N-fucopentaose II *	Le ^a	HSA	23
Sialyl-Lewis x-hexaose *	Si-Le ^x	HSA	13
Sialyl(mono), monofucosyllacto-N-tetraose *	Si-Le ^a	HSA	12
Sialyl-lacto-N-fucopentaose ^c *	Si-LNF	HSA	19
Sialyl-lacto-N-tétraose ^c *	Si-LNT	HSA	N/D
Lacto-N-tétraose ^c *	LNT	HSA	N/D
Sialyl-Lacto-N-néotétraose ^c *	Si-LNnT	HSA	N/D

^a HSA : albumine de sérum humain, BSA : albumine de sérum bovin.

^b Les liens entre HSA/BSA et oligosaccharides sont l'acétyl-phényl-énédiamine et un espaceur de 6 atomes, respectivement.

^c Si-LNF, Si-LNT et LNT possèdent un motif de précurseur de type 1 et Si-LNnT possède un motif de précurseur de type 2.

*Glycoconjugués HSA utilisés pour les tests avec les variants de norovirus GII.4

N/D : non disponible.

3. Techniques immunoenzymatiques (ELISA)

3.1 Interaction des VLP avec les salives

Les profils d'interaction des VLP avec les salives phénotypées ont été explorés à l'aide d'une technique ELISA adaptée de celle proposée précédemment par l'équipe de Jacques LE PENDU (Marionneau *et coll.*, 2002).

Des plaques de titration Nunc de 96 puits ont été *coatées* avec les salives bouillies diluées au 1/1000^{ème} dans du tampon carbonate-bicarbonate à pH 9,6 puis incubées toute la nuit à 37°C en atmosphère humide. Les plaques ont été ensuite lavées 5 fois avec du tampon PBS

additionné de Tween 20 à 0,05% et les puits ont été saturés avec 200 μl de PBS-BSA à 3% avant d'être incubés 30 min à 37°C. Après un lavage avec du PBS-Tween, 500 ng de VLP purifiées ont été déposés dans chaque puits et incubés pendant 1 heure à 37°C avant d'être de nouveau lavés avec du PBS-Tween. Puis, 100 μl d'anticorps monoclonal anti-GII.4 ont été incubés pendant 1 heure à température ambiante. Après un nouveau lavage, 100 μl d'anticorps anti-immunoglobuline de souris couplés à de la peroxydase et dilués au 1/5000^{ème} dans du PBS-lait à 4% ont été ajoutés dans chaque puits et incubés à 37°C pendant 30 min. Après un nouveau lavage au PBS-Tween, 100 μl de TMB ont été ajoutés dans chaque puits et incubés 15 min à 25°C et à l'obscurité. Enfin, la réaction a été stoppée par 50 μl d'HCl et les densités optiques (DO) ont été lues au spectrophotomètre à la longueur d'onde de 450 nm. Le seuil de positivité a été fixé arbitrairement à une DO de 0,2.

3.2 Test au periodate de sodium sur les salives

Le méta-periodate de sodium (NaIO_4) a, entre autres, la capacité d'ouvrir les cycles des saccharides au niveau des diols vicinaux et de laisser deux groupements aldéhydes au lieu des groupements hydroxyles utiles aux liaisons avec d'autres sucres ou des acides aminés.

Afin de démontrer le caractère conditionnel de la présence des groupements hydroxyles des sucres de salive impliqués dans l'interaction avec les VLP, un panel d'échantillon de salive d'individus sécréteurs et non-sécréteurs a été traité avec du periodate de sodium. Les plaques ont été préparées comme précédemment, excepté que 100 μl de NaIO_4 à 10 mM dilués dans de l'ithanoate de sodium (CH_3COONa) à pH 5,0 ont été ajoutés dans chaque puits après lavage au PBS et incubés pendant 30 min à température ambiante avant l'adjonction des VLP en s'inspirant de travaux publiés précédemment (*Zakhour et coll., 2009*).

3.3 Interaction des VLP avec les oligosaccharides de synthèse

Pour les oligosaccharides de synthèse, les ELISA ont été effectués selon le même protocole que pour les salives à l'exception que chaque puits a été *coaté* avec 1 μg de glycoconjugués, les conditions de température ont variées en fonction du type de conjugué, 4°C pour les conjugués PAA et 37°C pour les conjugués BSA/HSA et la durée d'incubation des VLP était de 4 heures.

4. Mesures par résonance plasmonique de surface (SPR)

4.1 Principe technique

La résonance plasmonique de surface est une méthode de mesure de la liaison d'un analyte en solution sur un ligand immobilisé de manière covalente ou non à la surface d'une fine couche métallique. Cette technique est basée sur une variation de l'indice de réfraction à l'interface quand l'analyte se fixe au ligand (Schuck, 1997) (Figure 23).

La technique emploie un prisme de verre recouvert d'une très mince surface métallique (argent ou or) sur laquelle se déplacent des ondes oscillantes de densité surfacique de charge, appelées plasmons de surface. Ces plasmons (non radiatif) sont excités par la lumière à la surface du métal. Lorsqu'on s'éloigne de cette surface, l'amplitude du champ électromagnétique $I(z)$ décroît exponentiellement en fonction de la longueur d'onde de la lumière incidente. L'onde n'est alors sensible à la variation d'indice que sur une épaisseur de 200 nm.

Les plasmons ne peuvent en fait être excités que sous certains angles d'illumination, c'est-à-dire lorsque le vecteur d'onde de la lumière incidente à la surface coïncide avec celui des plasmons de surface. En transférant de l'énergie aux plasmons, l'intensité de la lumière réfléchie va décroître. Il se forme ainsi un minimum de réflectivité lorsque l'on fait varier l'angle d'incidence θ (la baisse d'intensité de la lumière réfléchie est alors fonction de cet angle). Celui-ci dépend très fortement de l'indice de réfraction de la surface (n_{surface}), dans l'épaisseur du champ évanescent proche de la surface. Le changement de la composition (adsorption ou désorption, fixation ou relargage) se traduit par un changement d'indice et donc une modification de l'angle de résonance.

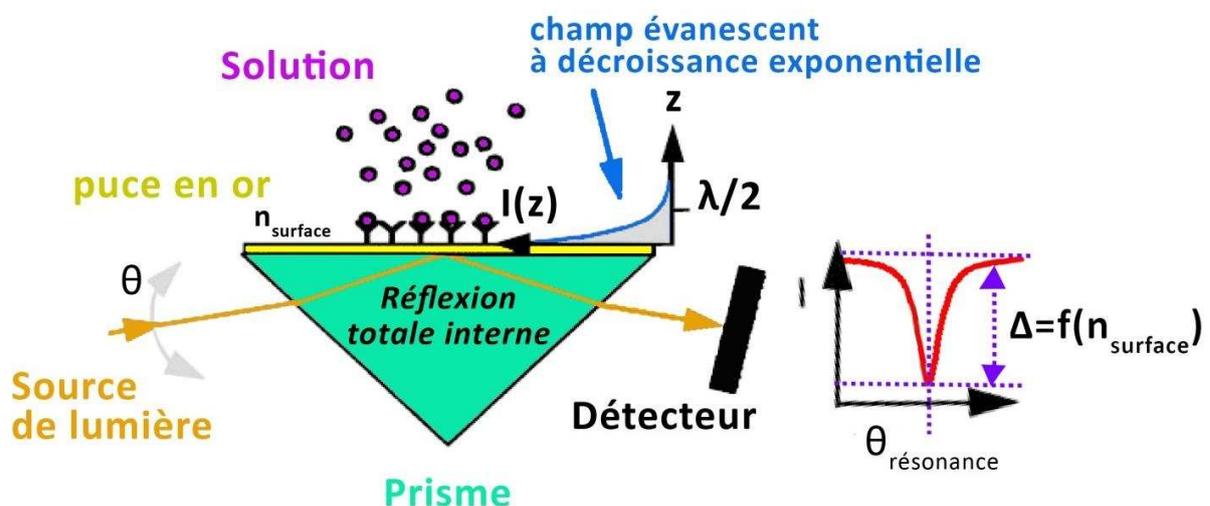


Figure 23. Schématisation du principe biophysique de résonance plasmonique de surface d'après Schuck, 1997.

Des considérations théoriques montrent que l'angle θ est proportionnel à la concentration de macromolécules en surface jusqu'à une concentration surfacique élevée de $50 \text{ ng}\cdot\text{mm}^{-2}$ (Stenberg *et coll.*, 1991). Les appareils commerciaux permettent d'injecter directement l'analyte sur le ligand immobilisé sur la puce : on peut alors suivre, en temps réel et sans marquage préalable des biomolécules, la cinétique d'interaction (association/dissociation).

4.2 Applications

La résonance plasmonique de surface (SPR) est employée afin de détecter optiquement des variations d'indice corrélées à des variations de masse sur une surface métallique comme l'or. Ce principe est utilisé dans une *sensor chip* ou puce de détection sur laquelle un récepteur, dans notre cas des oligosaccharides de synthèse, est immobilisé (de façon covalente ou non). Le second partenaire, ici des VLP, est injecté en un flux continu de tampon à la surface de la puce. La formation de complexes ligands-récepteurs (ici VLP-sucre) à la surface du biodétecteur est mesurée et visualisée en temps réel en unité de résonance (RU). A l'arrêt de l'injection des VLP, il y a retour au tampon initial et dissociation du complexe : cette phase de dissociation peut être enregistrée. Les cycles d'association, de dissociation, et de régénération sont répétés en utilisant différentes concentrations du même ligand et peuvent être visualisés sur des courbes graphiques appelées sensorgrammes (Figure 24).

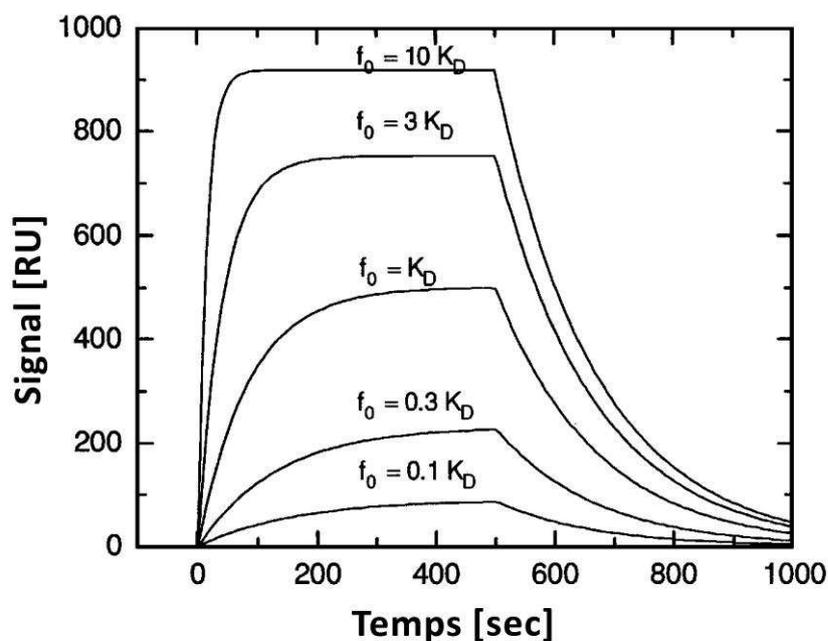


Figure 24. Graphique montrant les signaux obtenus pour une interaction simple L-R (1:1 cinétique du premier ordre)

Superposition des signaux obtenus pour différentes concentrations de ligand. Phase d'association de 0-500 sec, suivi d'une phase de dissociation de 500-1000 sec. D'après Schuck, 1997.

4.3 Analyse de l'interaction de VLP sur des sucres synthétiques

Les interactions des VLP purifiées avec les trisaccharides LNFPI, A et B conjugués à la BSA (Tableau 26) ont été analysées par résonance plasmonique de surface (SPR) à 25°C à l'aide d'un automate Biacore® 2000 (Biacore AB®, General Electric Healthcare, Upsala, Suède). Les biopuces plaquées or ont été fabriquées et testées au sein de l'Institut FEMTO-ST à Besançon par Wilfrid BOIREAU et Benoît SIMON (Boireau *et coll.*, 2009).

Les surfaces d'or des puces sont rendues fonctionnelles chimiquement à l'aide d'un mélange à 1 mM de 11-mercaptop-1-undecanol (11-MUOH) (Réf. #674249, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA) et d'acide 16-mercaptop-hexadécanoïque (16-MHA) (Réf. #448303, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA) dans l'éthanol absolu avec un rapport de 97 moles de 11-MUOH pour 3 moles de 16-MHA.

Après rinçage des puces à l'éthanol et à l'eau ultra pure, elles sont montées sur leurs supports et placées dans un Biacore® 2000 (Biacore AB®, GE Healthcare). Les groupes carboxyle sont ensuite activés par un mélange de 240 nM de EDC-HCl (1-éthyl-3-[3-diméthyllaminopropyl]carbodiimide hydrochloride) et de 50 nM de NHS (N-hydroxysulfosuccinimide) (Amine Coupling kit, Biacore AB®, GE Healthcare, Uppsala, Suède). Les puces sont alors prêtes pour la phase d'immobilisation (Figure 25).

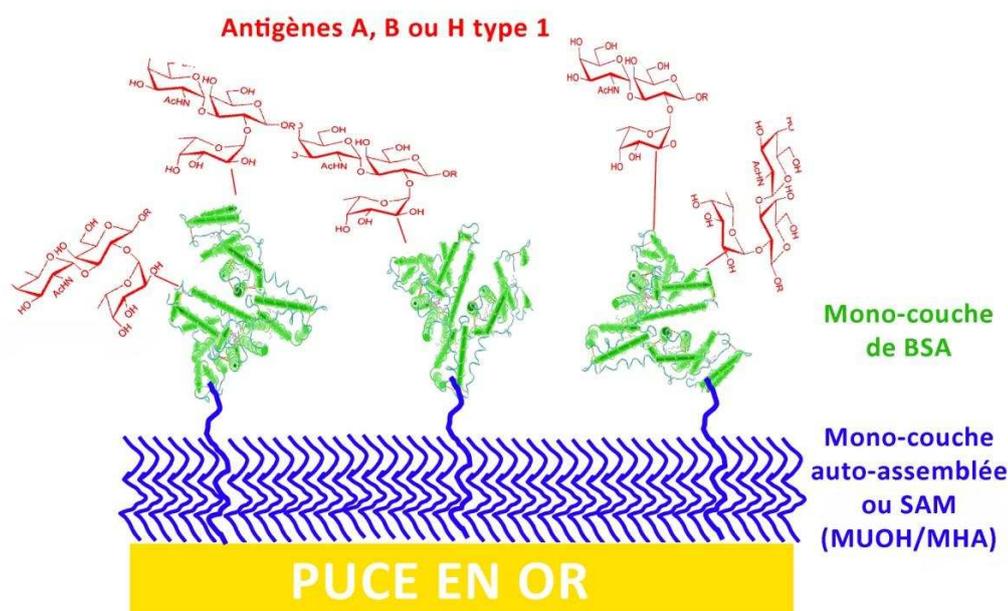


Figure 25. Schématisation de la surface en or de la puce rendue fonctionnelle à l'aide d'une monocouche auto-assemblée (SAM) de MUOH/MHA permettant la fixation des BSA conjuguées aux sucres A, B et H

Les trois glycoconjugués ont été fixés de manière covalente sur trois pistes séparées sur la même puce, permettant ainsi l'analyse simultanée des interactions d'une même préparation de VLP purifiées avec les trois sucres synthétiques. Pour chaque glycoconjugué, 300 à 370 RU ont été fixées à la surface de la puce, ce qui correspond à concentration surfacique de 86 à 92,5 fmole/mm². Les VLP ont été diluées dans un tampon HBS (Biacore AB®, GE Healthcare) et injectées pendant 120 s à la vitesse de 10 µl/min et une concentration de 2 ng/µl (Tableau 27).

Tableau 27. Composition du tampon HBS à pH 7,4

Réactifs	Concentrations
HEPES	0,01 mol/l
NaCl	0,15 mol/l
EDTA	3 mmol/l
Surfactant P20	0,005 %

Après l'arrêt de l'injection, la dissociation VLP-sucres a été observée pendant 120 s. La puce a été ensuite recyclée par injection de 5 µl d'un tampon glycine à 10 mM à pH 2,5 avant un nouveau cycle d'analyse avec une nouvelle préparation de VLP, puis stockée à 4°C en atmosphère humide.

La conception des puces et l'analyse des interactions entre VLP et glycanes par SPR ont été effectuées en collaboration avec l'équipe de Wilfrid BOIREAU de l'Institut FEMTO-ST à Besançon. En tout, trois puces en or ont été fabriquées : une puce portant les glycanes A, B, Le^x et Si-Le^x conjugués à la BSA, une puce portant les glycanes LNFP I (H type 1), LNFP II (Le^a) et LNFP III (Le^x) conjugués à la BSA, et, pour vérifier la spécificité d'interaction sucres-VLP en SPR, une puce a été traitée par injection de 200 µl de periodate de sodium à 10 mM. Les VLP testées, c.-à-d. les six variants et le recombinant ΔT395, provenaient des mêmes lots que ceux utilisés pour les ELISA et conservées à -40°C.

Enfin, les expériences préliminaires d'accroche par ELISA des VLP Hunter ont montré que l'accroche était aussi spécifique avec du tampon HBS (spécifique du SPR) qu'avec du tampon PBS. De plus, nous avons constaté que le tampon HBS générait moins de bruit de fond que le tampon PBS. Par conséquent, le tampon HBS a été choisi pour effectuer les analyses en SPR. Les analyses préliminaires avec les VLP Hunter et Osaka ont fait suggérer que l'augmentation de la réponse de SPR était dépendante de la concentration.

5. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel STATA® v11.0 (Stata Corp LP, College Station, TX, USA) auprès de Ludwig-Serge AHO-GLÉLÉ (Service d'épidémiologie et hygiène hospitalières, CHU de Dijon). Pour les tests sur les salives, le test de Kruskal-Wallis a été employé pour déterminer si l'attache des VLP aux échantillons de salive était différente pour chaque variant, les VLP US95/96 étant utilisées comme référence standard. Le test d'ANOVA a été utilisé pour la comparaison des données appariées des salives de non-sécréteurs. Pour étudier l'affinité des VLP pour antigènes A, B et H, des polynômes fractionnaires ont été utilisés pour modéliser l'interaction VLP-ligand par régression linéaire. Le même modèle statistique a été employé pour déterminer si les changements observés dans les profils d'interaction des VLP Y444F et Δ T395 vis-à-vis des antigènes ABO étaient statistiquement significatifs comparativement avec les VLP Hunter sauvage.

Troisième Partie

RÉSULTATS

A. Production et évaluation des réactifs	98
1. Étude phylogénique des variants GII.4	98
2. Les particules virales de synthèse de norovirus GII.4	99
3. Les anticorps monoclonaux spécifiques des norovirus GII.4	102
4. Évaluation de l'interaction VLP-sucre en ELISA et SPR	104
B. Profils d'interaction et implications	106
1. Mutagenèse dirigée du site de liaison aux HBGA	106
1.1 Résultats généraux	106
1.2 La VLP mutante Hunter Y444F	107
1.3 Rôle de l'acide aminé T395 nouvellement inséré dans la capsid	108
1.4 Affinité relative des mutants Hunter Y444F et Δ T395 pour les antigènes A, B et H	109
2. Profils d'interaction des variants de norovirus GII.4	111
2.1 Tests d'accroche sur les salives	111
2.2 Tests d'accroche sur les glycoconjugués de synthèse	112
2.2.1 Les glycoconjugués à l'albumine	112
2.2.2 Les globosides, gangliosides, chondroïtine sulfate et héparane sulfate	115
2.3 Le nouveau variant Apeldoorn	116
3. Affinité relative des variants pour les antigènes A, B et H	117
4. Analyse des interactions VLP-sucre par SPR	119

A. PRODUCTION ET ÉVALUATION DES RÉACTIFS

1. Études phylogéniques des variants GII.4

Pour déterminer le nombre minimal de changements d'acide aminé entre les variants, un arbre minimum couvrant (MST) a été construit sur la base des séquences complètes en acide aminé de l'ORF2 de 496 souches issues des variants Bristol, US95/96, Farmington, Hunter, Chiba, Yerseke, Den Haag, Apeldoorn et Osaka (Figure 25). Le MST a été élaboré à partir de 872 changements d'acide aminé. Les lignages et variants mis en évidence dans le MST de cette étude correspondent à ceux qui ont été décrits précédemment à l'aide d'arbres de type *neighbour joining* ou d'inférences bayésiennes (Belliot *et coll.*, 2010).

Les résultats du MST montrent que les variants Den Haag et Yerseke sont directement liés aux anciens variants Hunter et Farmington, respectivement, comme précédemment décrit (Siebenga *et coll.*, 2007), et que les variants Hunter, Farmington Hills et Chiba sont proches des variants US95/96. Le variant Den Haag serait, quant à lui, génétiquement très proche du variant Farmington Hills. Le grand nombre d'isolats issus du variant Den Haag ($n=219$) montrent également qu'il existe une diversité clonale à l'intérieur de ce groupe, ce qui a été à l'origine de l'émergence des variants Apeldoorn et Osaka.

Dans une précédente étude, nous avons observé que le variant Osaka pouvait être à égale distance des variants US95/96 et Chiba ($n=23$) (Kamel *et coll.*, 2009). Cette modification de la topologie de l'arbre pourrait s'expliquer par la présence d'un plus faible nombre de séquences de souches Osaka incluses pour la construction du MST lors de la précédente étude et par l'indisponibilité, à l'époque, de séquences correspondant au variant Apeldoorn (Figure 26).

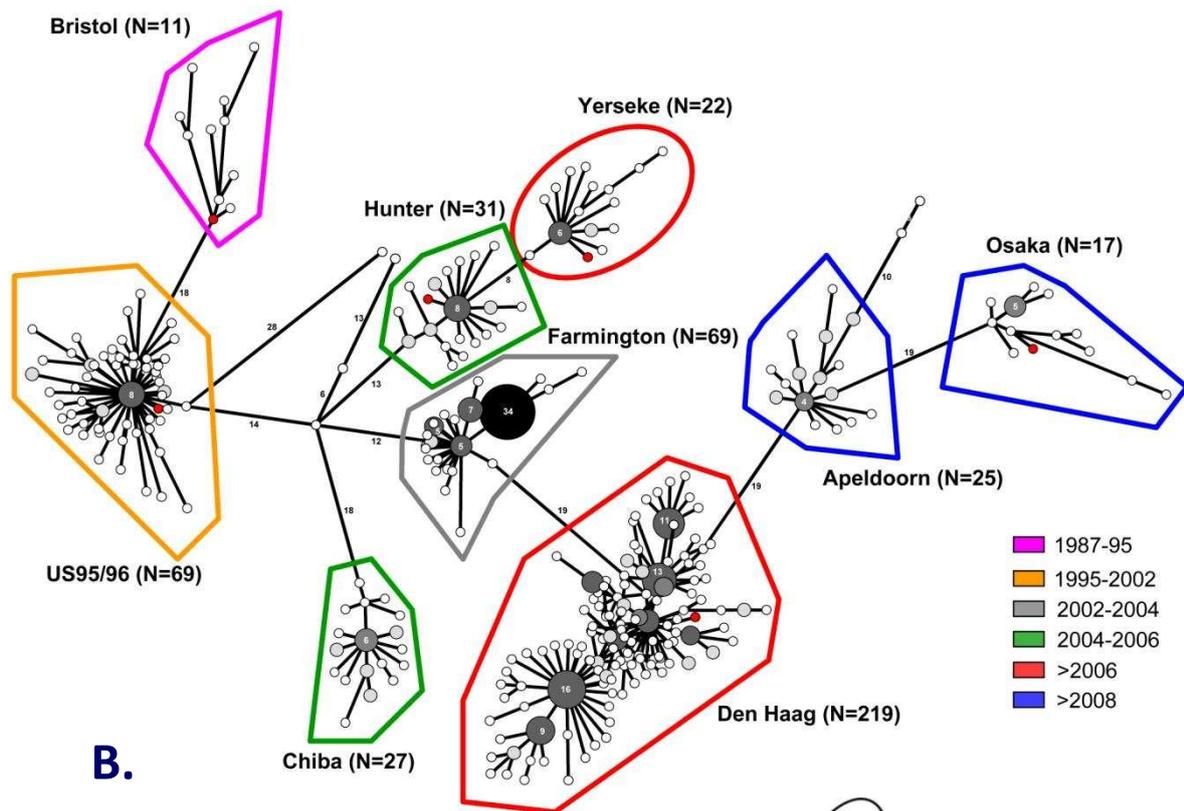
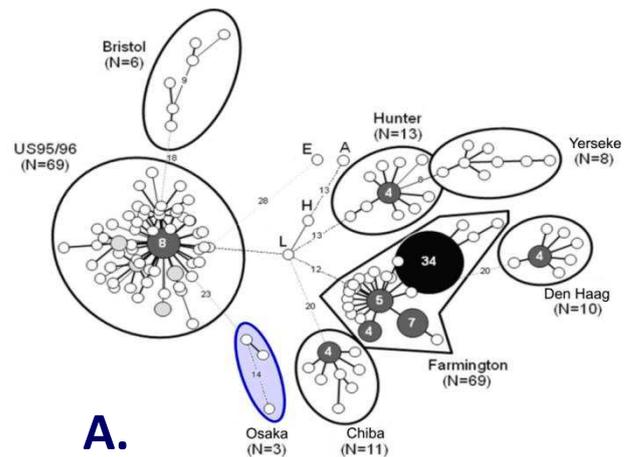


Figure 26. Arbres minimum couvrant (MST) des variants de norovirus GII.4 pandémiques depuis 1987. (A) arbre issu de notre précédente étude (Kamel et coll., 2009), (B) nouvel arbre issu des présents travaux de phylogénie corrigeant l'embranchement du variant Osaka.

Le nombre de séquences pour chaque groupe est indiqué entre parenthèses. Les séquences homologues sont représentées par des cercles dont la taille et la teinte varie en fonction du nombre de séquences.



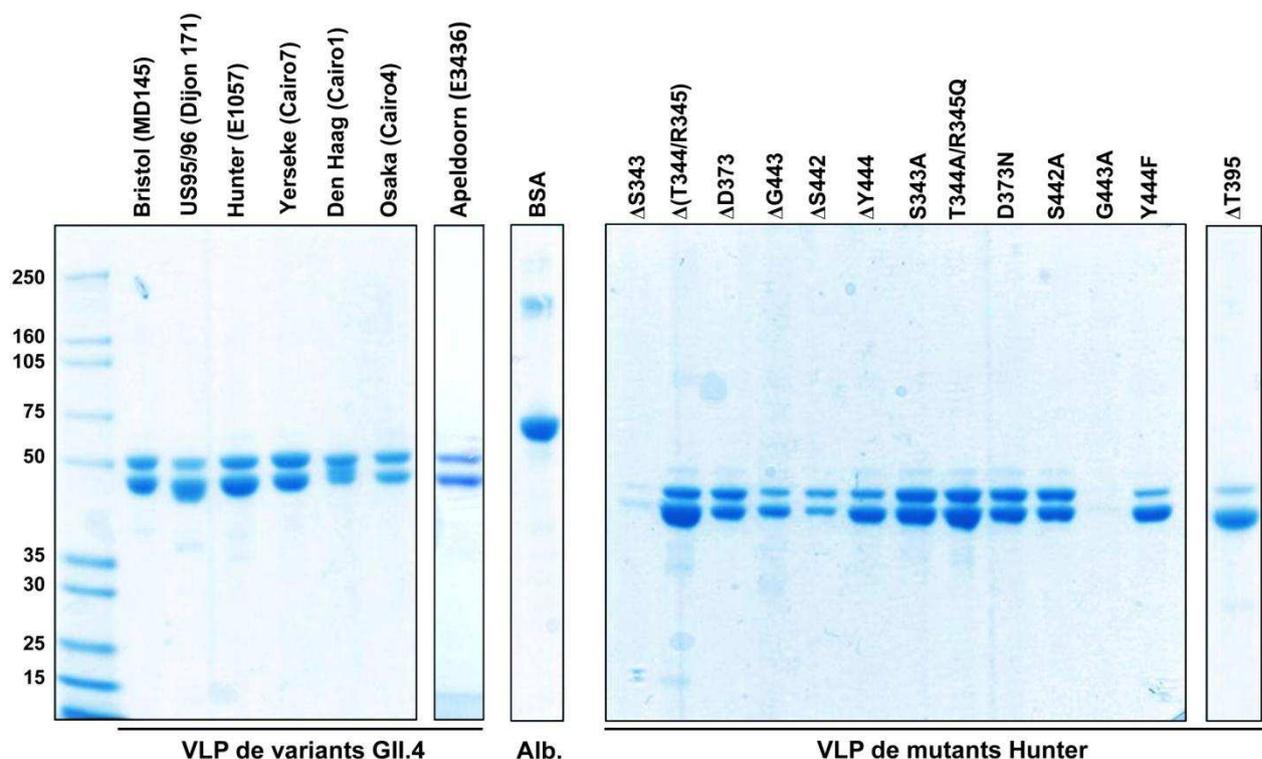
2. Les particules virales de synthèse de norovirus GII.4

Pour toutes les constructions, les VLP recombinantes ont été purifiées à partir de 400 à 600 mℓ de milieu cellulaire, correspondant à $4 \cdot 10^8$ et $6 \cdot 10^8$ cellules infectées, respectivement, pour 1 à 10 mg de VLP, en fonction du baculovirus recombinant. Après 6 jours d'incubation, les débris cellulaires ont été éliminés par centrifugation à basse vitesse et les VLP excrétées ont été concentrées par ultracentrifugation. Les VLP ont été purifiées par centrifugation isopycnique sur gradient de CsCl, produisant une bande distincte de densité de flottaison de $1,31 \text{ g/cm}^3$, ou sur gradient discontinu de sucrose pour les variants mutants Y444F et $\Delta T395$, produisant une bande à l'interface des fractions 30 et 40% de sucrose, avant d'être reprises dans un tampon TNC-leupeptine.

L'analyse des protéines en gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) a montré que les VLP avaient plus de 90% de pureté. Les fractions enrichies en VLP sont composées de la protéine VP1 de 57 kDa et de sa version clivée de 54 kDa précédemment décrite (Belliot *et coll.*, 2001) (Figure 27). L'origine norovirus du doublet a été confirmée par Western blot à l'aide d'un sérum spécifique de la souche MD145 (Bristol), fourni gracieusement par l'équipe de Kim GREEN du NIAID.

Le faible rendement observé pour les VLP des mutants Δ S343 et G443A suggèrent que les mutations de ces acides aminés rendent probablement les VLP recombinantes instables. A l'inverse, les mutations S343A et Δ G443 n'ont pas été délétères pour la formation des particules de synthèse.

Figure 27. Analyse par électrophorèse sur gel de polyacrylamide avec SDS (SDS-PAGE) des VLP des variants GII.4 et des VLP Hunter mutées obtenues par mutagenèse dirigée.



La dénomination des souches est indiquée entre parenthèse pour chaque variant.

Pour les VLP mutées obtenues par mutagenèse dirigée et issues du variant Hunter (souche E1057), chaque acide aminé muté est indiqué en regard de la ligne et leur position se réfère à la séquence d'acides aminés de l'ORF2 de la souche Hunter E1057 (numéro d'acquisition Genbank : EU876890).

De 2 à 4 mg de chaque solution de VLP purifiées ont été déposés sur le gel de polyacrylamide (Invitrogen). Deux microgrammes d'albumine de sérum de bœuf (Pierce) ont été ajoutés comme contrôle pour l'estimation des protéines. Les protéines ont été visualisées par coloration en bleu de Coomassie (Pierce).

Enfin, la première ligne contient les marqueurs de poids moléculaire des protéines dont les valeurs exprimées en kDa sont indiquées à gauche du gel.

Afin de contrôler l'intégrité du matériel purifié, la taille des VLP correspondant aux six variants (soit Bristol, US95-96, Hunter, Yerseke, Den Haag et Osaka) a été estimée à partir de 30 mesures chacune par microscopie de force atomique (AFM) (Figure 28). La majorité des préparations de VLP présentaient des particules de structure globulaire dont le diamètre moyen s'échelonnait de 30 à 38 nm (Tableau 28) et correspondant à des VLP complètes, également appelées VP₁₈₀ (Shoemaker *et coll.*, 2010) (Figure 29).

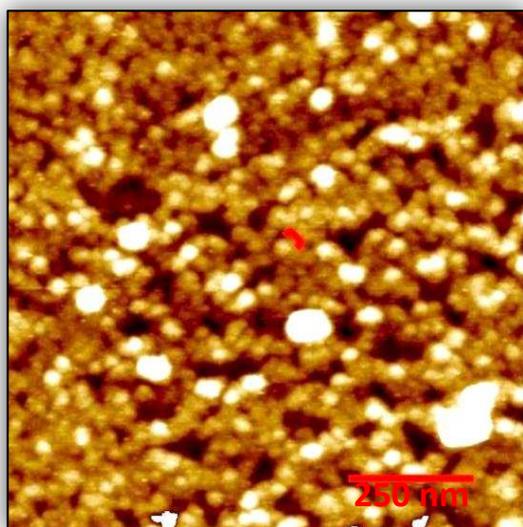


Figure 28. Image de VLP purifiées du variant Hunter (E1057) obtenue par microscopie de force atomique par Céline ELIE-CAILLE de l'Institut FEMTO-ST de Besançon.

Les VLP ont été adsorbées sur du mica fraîchement clivé en présence du tampon HBS utilisé pour les analyses de résonance plasmonique de surface (SPR). Les agrégats sont matérialisés en blanc. Le diamètre moyen des VLP a été estimé à partir de 30 mesures (l' accolade rouge objective une VLP). La barre d'échelle matérialise une taille de 250 nm.

Tableau 28. Dimensions estimées des VLP par microscopie de force atomique (AFM)

Dénomination des VLP des variants (souches)	Tailles estimées
Bristol (MD145)	21,3 ±4,7 nm
US95/96 (Dijon171)	37,2 ±3,7 nm
Hunter (E1057)	29,6 ±3,2 nm
Yerseke (Cairo7)	ND
Den Haag (Cairo1)	37,6 ±4,8 nm
Osaka (Cario4)	36,8 ±6,2 nm
Apeldoorn (E3436)	NR

ND : non déterminée ; NR : non réalisée.

Pour la souche Bristol (MD145), les VLP étaient plus petites en taille avec un diamètre moyen de 21,3 ±4,7 nm, ce qui suggère la présence de particules de sous-unités composées de 60 monomères (appelée aussi VP₆₀) au lieu des 180 monomère habituels (Belliot *et coll.*, 2001 ; Shoemaker *et coll.*, 2010).

Il est à noter que les VLP Yerseke n'ont pu être adsorbées sur la tranche de mica en présence du tampon HBS lors des tests en AFM. La concentration en sel pourrait avoir été trop élevée et ainsi avoir empêché l'adsorption des protéines sur le mica, comme cela a déjà été décrit (Czajkowsky et Shao, 2003).

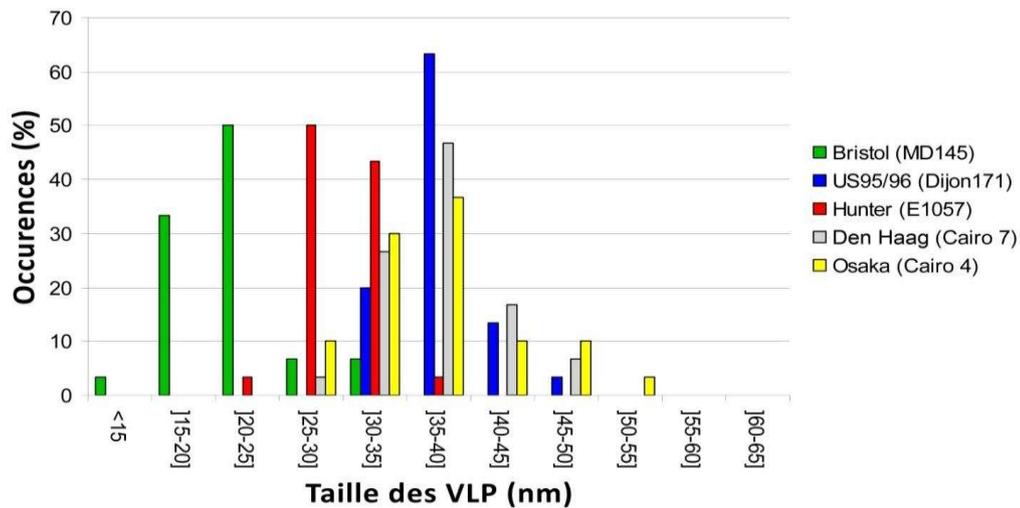
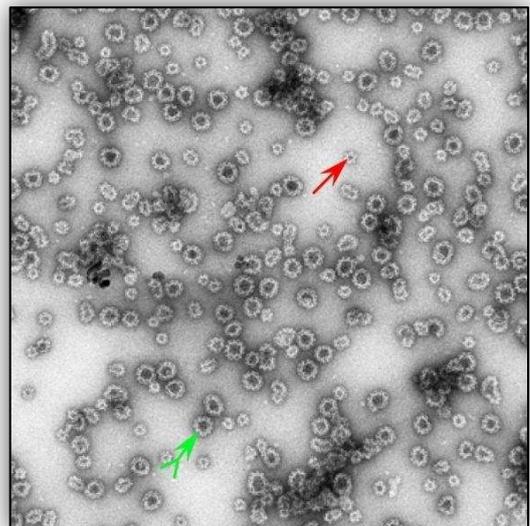


Figure 29. Graphique montrant pour chaque préparation de VLP la répartition des 30 mesures effectuées par AFM et ayant permis de déterminer leur taille moyenne.

L'observation par microscopie électronique des VLP Hunter (E1057) purifiées sur gradient de CsCl a permis de montrer que la préparation était essentiellement composée de particules entières et vides de 35 nm de diamètre (Figure 30).

Figure 30. Image de VLP purifiées sur gradient de chlorure de césium du variant Hunter (E1057) obtenue par microscopie électronique après coloration négative.



La flèche verte avec queue indique une particule entière et la flèche rouge une sous-unité.

(Avec l'aimable participation de Michel HENRI-LEPAULT, CNRS, Gif-sur-Yvette)

3. Les anticorps monoclonaux spécifiques des norovirus GII.4

La culture d'hybridomes a permis d'isoler 5 clones sécrétant des anticorps monoclonaux dirigés contre les VLP Hunter (souche E1057) : les anticorps 1A4, 2D8, 4G12, 5B9 et 8C12. La performance de ces anticorps a été évaluée par ELISA puis par Western blot.

Les ELISA ont permis de montrer que les anticorps monoclonaux produits reconnaissent aussi bien les épitopes conformationnels de VLP non dénaturées que les épitopes séquentiels de VLP dénaturées.

Le western blot a montré, quant à lui, que les VLP dénaturées de norovirus GI.1 et GII.4, et du norovirus murin GV.1 étaient reconnus par les anticorps 1A4, 2D8 et 8C12 mais pas par les anticorps 4G12 et 5B9 (Figure 31).

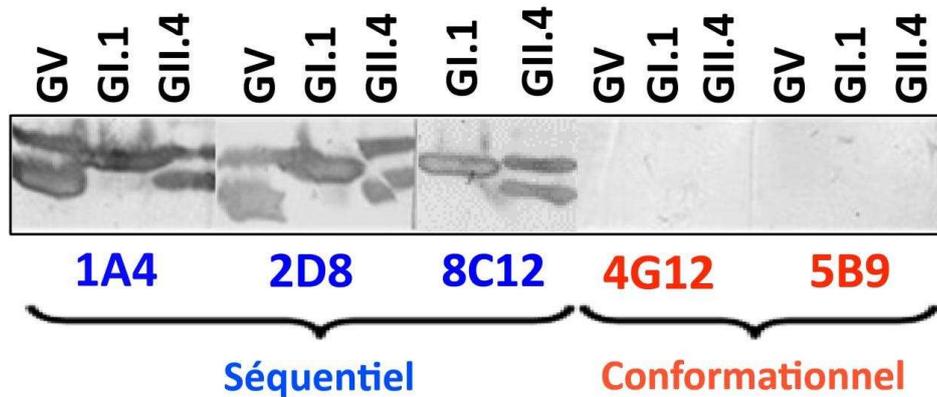


Figure 31. Caractérisation des anticorps monoclonaux par Western blot à l'aide des VLP de norovirus GV, GI.1 et GII.4.

En revanche, l'attachement des VLP sur les glycoconjugués n'a pu être détecté en ELISA qu'à l'aide des anticorps 4G12 et 5B9. En effet, aucun signal n'a été observé avec des anticorps 1A4, 2D8 et 8C12 (Figure 32). Nous pouvons donc en déduire que 4G12 et 5B9 sont des anticorps conformationnels, et que 1A4, 2D8 et 8C12 sont des anticorps séquentiels.

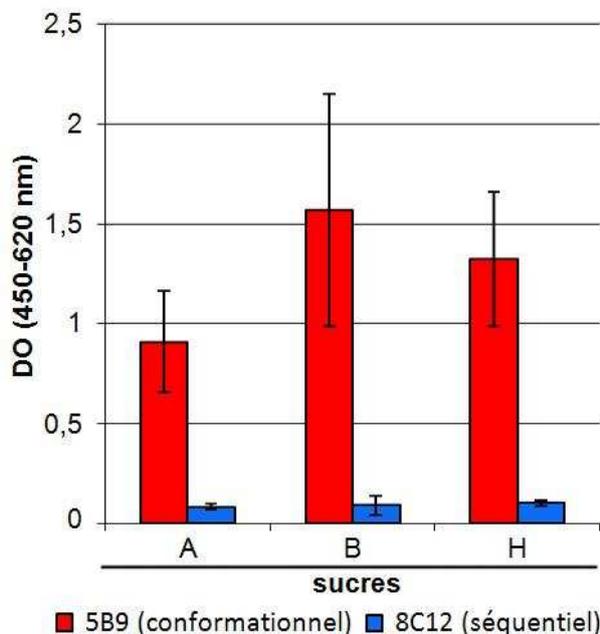


Figure 32. Test ELISA comparatif de détection des VLP de norovirus GII.4 attachées aux sucres A, B et H à l'aide des anticorps monoclonaux 5B9 (conformationnel) et 8C12 (séquentiel).

Le typage des préparations d'anticorps monoclonaux 1A4, 2D8, 4G12 et 5B9 avant purification a montré que les préparations étaient composées de mélanges d'isotypes : IgA et IgG pour la préparation 2D8, IgM et IgG pour les préparations 1A4, 4G12 et 5B9 (Tableau 29).

Tableau 29. Isotypage des anticorps obtenus par immunisation de souris avec des VLP Hunter

Isotype	Préparation d'anticorps			
	1A4	2D8	4G12	5B9
Anti-Ig de souris	2,925	2,367	2,232	4,301
Anti-IgM	2,304	0,087	3,264	2,001
Anti-IgA	1,858	3,293	0,078	0,082
Anti-IgG1	2,112	1,208	0,076	0,836
Anti-IgG2a	0,221	0,249	0,605	3,905
Anti-IgG2b	0,291	0,281	0,075	0,201
Anti-IgG3	0,133	0,114	0,076	0,105
Anti-Kappa	2,248	2,861	1,445	3,297
Anti-Lambda	0,128	0,141	0,077	0,107

La préparation 1A4 comportait une IgM et une IgG1 provenant probablement du même clone consécutivement à un changement de classe (*switch*). La préparation 2D8 comportait une IgA spécifique qui a pu être purifiée mais n'a pas été utilisée pour les techniques ELISA. La préparation 5B9 est apparue la plus performante dans la reconnaissance *in vitro* des VLP de norovirus GII.4, avec une sensibilité de 83 % et une spécificité de 100 %, et était la seule qui comportait un anticorps de type IgG2a spécifique et purifiable. L'anticorps monoclonal IgG2a 5B9 purifié par Marc BOSSUS de bioMeyrieux a été utilisé par la suite pour effectuer les tests ELISA d'interaction des VLP avec les HBGA.

4. Évaluation de l'interaction VLP-sucre en ELISA et SPR

La liaison des VLP aux sucres a été évaluée en ELISA en traitant les salives au periodate de sodium avant incubation des VLP, comme décrit plus haut. Toute interaction a ainsi été entièrement abolie, ce qui confirme que les VLP se fixent bien aux sucres présents dans les salives et plus spécifiquement aux O-glycannes.

De la même manière, la liaison entre la VLP et les sucres a été évaluée en SPR avant et après incubation du glycoconjugué H type 1, fixé à la surface d'une puce en or, avec 10 mM de periodate de sodium (Figure 33). Le sensorgramme montre que lorsque la puce est incubée au préalable avec du periodate de sodium, les VLP ne se fixe plus du tout sur la puce et il n'y a donc plus de signal de SPR.

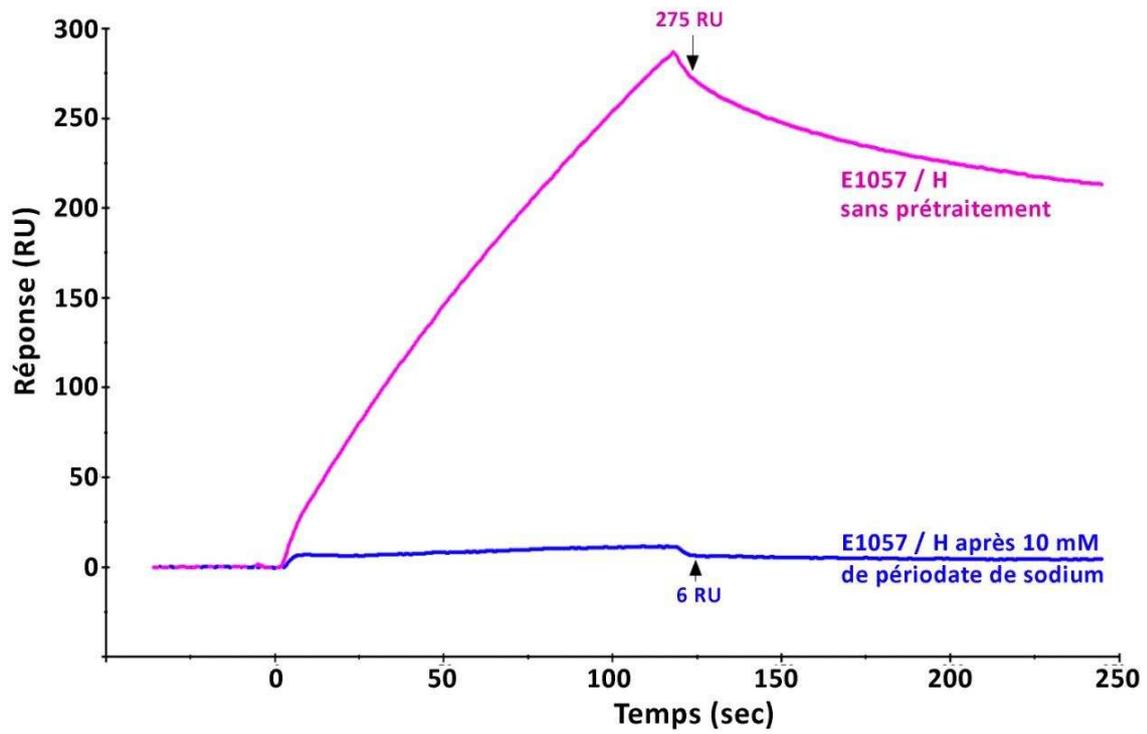


Figure 33. Sensorgramme montrant les interactions des VLP de la souche E1057 (Hunter) avec le glycoconjugué H type 1 immobilisé sur la puce avant et après traitement avec 10 mM de périodate de sodium

B. PROFILS D'INTERACTION

1. Mutagenèse dirigée du site de liaison aux HBGA

1.1 Résultats généraux

Les études précédentes ont permis de déterminer par cristallographie les acides aminés participant à l'attachement des HBGA au niveau du domaine P1/P2 de VP1. Il s'agit de résidus conservés au sein des norovirus GII.4, y compris des variants Apeldoorn et Osaka récemment décrits, les acides aminés S343, T344, R345, D374, S441, G442 et Y443 de la souche VA387 (variant US95/96), et qui interagissent directement avec les sucres des HBGA (Figures 12, 13 et 22). Bien qu'il ait été démontré que les domaines P produits en culture bactériennes fixent de manière quasi similaire les HBGA que les VLP entières (Cao *et coll.*, 2007 ; Tan *et coll.*, 2008a), nous avons préféré les VLP obtenues par mutagenèse dirigée car la délétion ou la substitution d'acide aminé est susceptible de déstabiliser la structure de la VLP entière et donc de modifier l'interaction avec les antigènes. Par ailleurs, il a été démontré que les complexes VLP-HBGA étaient généralement plus stables que les interactions observées entre dimères de domaine P et HBGA (Cao *et coll.*, 2007).

Nous avons tout d'abord procédé à la suppression de chacun des acides aminés isolément. La majeure partie des VLP mutées ont pu être récupérées après purification (Figure 26), à l'exception des mutants Δ S343 et G443A, suggérant que les protéines VP1 ainsi modifiées ont conservé leur capacité d'assemblage. Comme nous l'avons vu plus haut, les fractions de VLP purifiées étaient composées de deux fractions de protéine VP1 comme pour les VLP épidémiques (Figure 30). La délétion de chacun des acides aminés cibles a supprimé tout accroche avec les HBGA associés au PAA (Tableau 30) ou à la HSA (Tableau 31), à l'exception des VLP mutantes D373N et Y444F pour lesquelles nous observons une modulation de

l'attachement. Nos résultats ont permis de confirmer que chacun de ces résidus identifiés était impliqué dans l'attachement.

Tableau 30. Résultats en ELISA des interactions du variant Hunter et des mutants avec les sucres PAA

	Hunter	Mutants Hunter									
	E1057	S443A	ΔS443	D373N	ΔD373	ΔS442	G443A	ΔG443	Y444F	ΔY444	ΔT395
Salive A	+++	0	0	0	0	0	0	0	+++	0	+++
Salive de non-sécréteur	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H type 1 (LNFP I)	+++	0	0	+	0	0	0	0	+++	0	+
H type 2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+
H type 3	+++	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+++
H di	+++	0	0	++	0	0	0	0	+	0	+++
A type 2β	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A type 2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A disaccharide	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A trisaccharide	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B type 2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B disaccharide	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B trisaccharide	+++	0	0	0	0	0	0	0	++	0	+
Lewis a	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Sialyl-Lewis a	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Lewis b	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Lewis d	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Lewis x	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
α-Gal-Lewis x	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3' O-Su-Lewis x	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Sialyl-Lewis x	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6(GlcNAc)-O-Su-Sialyl-Lewis x	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Sialyl-Lewis x (pentaose)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Lewis y	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+++

Tableau 31. Résultats en ELISA des interactions du variant Hunter et des mutants avec les sucres HSA

	Hunter	Mutants Hunter									
	E1057	S443A	ΔS443	D373N	ΔD373	ΔS442	G443A	ΔG443	Y444F	ΔY444	ΔT395
LNFP I	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H type 1	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H type 2	+	0	0	0	0	0	0	0	+	0	0
A	+	0	0	0	0	0	0	0	+	0	+
A trisaccharide	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A hexasaccharide	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A heptasaccharide	0	0	0	0	0	0	0	0	+	0	+
N-acetyl-galactosamine	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B trisaccharide	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(Lewis x) LNFP III	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tri-Lewis x	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	++
Sialyl-Lewis a	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Lewis a (LNFP II)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Lewis b	+++	0	0	+	0	0	0	0	+++	0	+++
Lewis y	+++	0	0	++	0	0	0	0	++	0	+++

Les $DO < 0,2$ sont rendues égales à 0 ; (++) en vert $0,2 < DO < 0,5$; (+) en jaune $0,5 < DO < 1$; en rose $DO > 1$.

1.2 La VLP mutante Hunter Y444F

Nous avons ensuite procédé à la substitution par mutagenèse dirigée de chacun de ces résidus d'acides aminés qui ont été remplacés par des acides aminés homologues (Tableau 18). Ces substitutions, à l'exception de la mutation Y444F (et dans une moindre mesure la mutation

D373N), ont complètement supprimé l'attachement aux HBGA. Une étude précédente a montré que le cycle aromatique du résidu de tyrosine interagissait avec l' α -fucose de l'antigène H grâce à des liaisons de type van der Waals (Cao *et coll.*, 2007). Ainsi des interactions entre les VLP Y444F et les antigènes Le^b, Le^y, B-tri, H type 1, A-tri, A-hexa et A-hepta conjugués à la HSA ont pu être observées (Figure 34). Pour les autres antigènes (sucres présents dans le colostrum ou spécifiques des non-sécréteurs), l'accroche était absente ou résiduelle, c'est-à-dire < 0,2 en DO 450 nm.

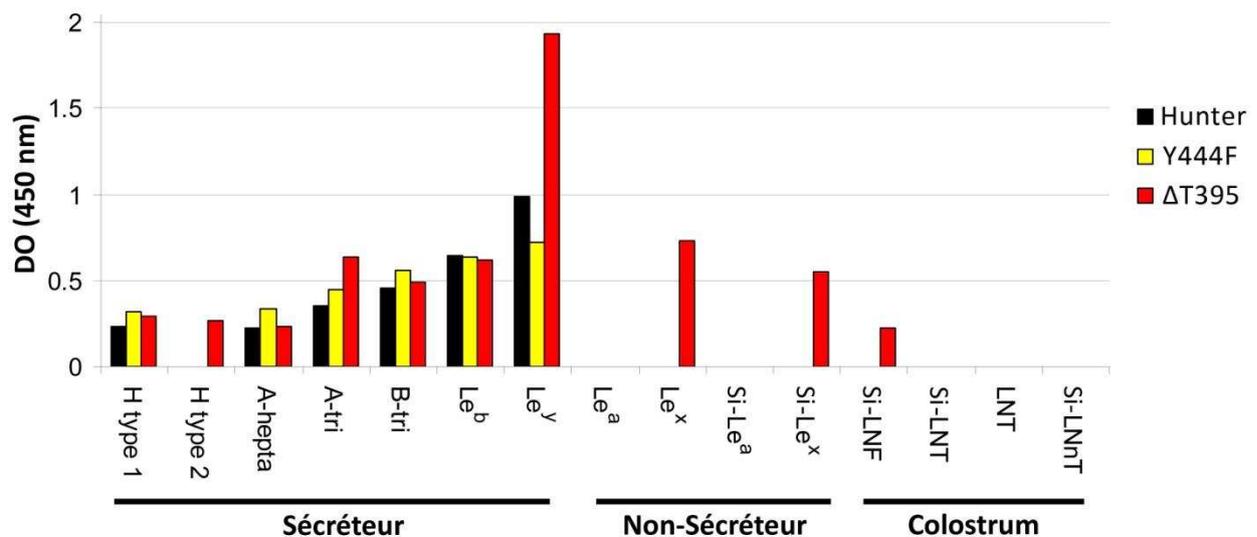


Figure 34. Comparaison des résultats des interactions des VLP mutées Δ T395 et Y444F avec le type sauvage Hunter en ELISA. Les VLP ont été testées en duplicata avec un panel de HBGA conjugués à de la HSA.

En somme, notre analyse confirme l'importance des acides aminés formant le site de liaison des HBGA chez les norovirus GII.4 telle que cela avait été précédemment démontré par *alanine scanning* de domaines P d'autres souches (Tan *et coll.*, 2008b). Par ailleurs, nos données ont montré clairement que le remplacement de la tyrosine en position 444 par une phénylalanine n'altérerait pas la reconnaissance de l'épitope H type 1. Ceci montre que le groupement hydroxyle de la tyrosine a une faible implication dans l'accroche de ce motif glycanique, même si cette légère modification structurale a été suffisante pour modifier le profil d'attachement de la souche Hunter.

1.3 Rôle de l'acide aminé T395 nouvellement inséré dans la capsid

Depuis 2002, les nouvelles souches de norovirus GII.4 sont caractérisées par l'insertion d'un acide aminé à la position 395 dans le domaine P2 hypervariable de la protéine de capsid VP1 (Dingle, 2004). Cet acide aminé supplémentaire, généralement un résidu thréonine, est

conservé chez les norovirus GII.4 depuis l'émergence du variant Farmington. Notre objectif a été de déterminer si cette thréonine surnuméraire possédait un rôle biologique dans l'attachement des VLP aux HBGA. Des VLP Hunter dont la T395 a été supprimée par mutagenèse dirigée ont été préparées sur gradient de sucrose, compte-tenu de la fragilité relative que nous avons observée pour cette construction en gradient de CsCl. Les VLP Δ T395 mutées ont été alors testées avec le panel de glycoconjugués HSA. Le profil d'attachement des VLP Δ T395 mutées était semblable à celui observé pour les VLP Hunter sauvage, excepté la reconnaissance de l'antigène Le^y qui était bien meilleure que pour les VLP du type sauvage (Figure 34).

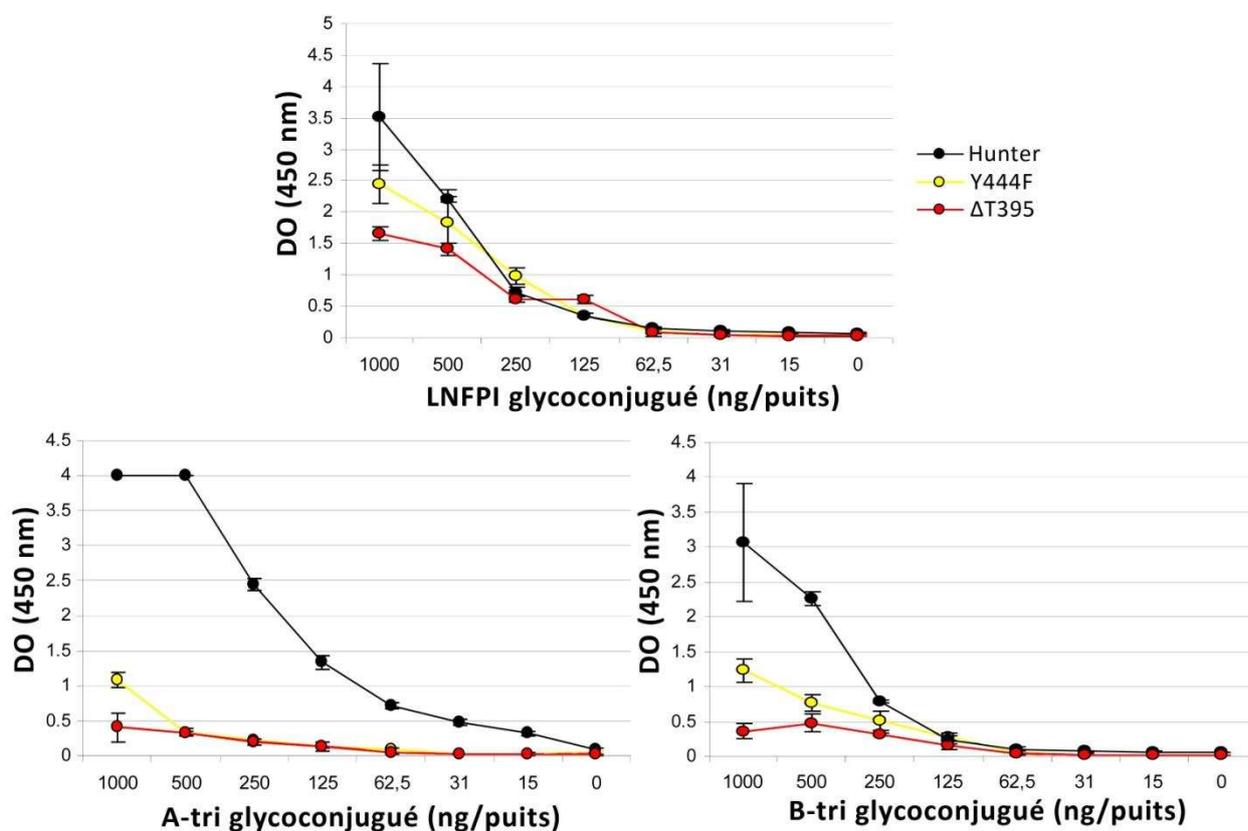
A l'inverse, nous avons observé que les VLP Δ T395 pouvaient également se lier aux HBGA H type 2, Le^x et Si-Le^x (Tableau 31). Enfin, les tests sur les glycoconjugués au PAA ont montré une nette accroche des VLP sur les HBGA Le^b et Le^y ainsi que Le^x (Tableau 30).

1.4 Affinité relative des mutants Hunter Y444F et Δ T395 pour les antigènes A, B et H

Afin de déterminer d'éventuelles modifications d'affinité pour les antigènes A, B et H, les VLP Hunter et les VLP mutées Δ T395 et Y444F ont été testées en ELISA sur une série de dilution de facteur 2 des sucres LNFPI, A-tri et B-tri conjugués à la BSA (Figure 35). Les VLP Hunter ont été utilisées comme standard pour l'analyse statistique comparative basée sur un modèle polynômial fractionnaire. Étant donné que le nombre de sucres par molécule de BSA était similaire pour les trois glycoconjugués (Tableau 24), les profils d'interaction des VLP avec les HBGA ont pu être comparés. L'attachement des VLP mutées Y444F sur les glycoconjugués A et B était nettement inférieur à celui observé pour les VLP Hunter ($p=0,001$ pour l'antigène A). Pour l'antigène B, cette observation n'était pas significative avec les VLP Y444F ($p=0,057$). Pour l'antigène H, bien que l'attachement apparaissait inférieur avec les VLP Y444F, les différences n'étaient pas significatives ($p=0,28$).

L'accroche des VLP Δ T395 aux glycoconjugués A et B était nettement inférieure à celle observée pour les VLP Hunter sauvage et était statistiquement significative ($p=0,001$ pour l'antigène A et $p=0,003$ pour l'antigène B), mais ce n'était pas le cas pour les interactions avec l'antigène H ($p=0,08$).

Figure 35. Exploration comparée des résultats en ELISA des variations d'affinité des VLP Hunter et des VLP mutées $\Delta T395$ et Y444F pour les glycoconjugués LNFPI, A-tri et B-tri.



Les glycoconjugués ont été dilués en série de facteur 2 de 1000 à 15 ng par puits dans du tampon carbonate/bicarbonate à pH 9,6. Chaque test a été effectué en triplicata. La moyenne des résultats et leur déviation standard sont matérialisées sur le graphique. Les valeurs ont été obtenues par mesure d'absorbance à 450 nm.

De plus, l'analyse de l'interaction des VLP $\Delta T395$ avec les sucres A, B, H en SPR a montré que la suppression de cette thréonine avait un effet délétère sur la capacité du mutant Hunter à fixer les antigènes A et B, et était responsable d'une forte diminution de l'accroche à l'antigène H (Figure 36). La T395 jouerait donc un rôle dans l'interaction avec les HBGA. Nous avons constaté également par SPR que les VLP $\Delta T395$ présentaient une affinité relative similaire à celle observée pour les VLP US95/96 qui ne possèdent justement pas cette insertion de thréonine en position 395 (Figure 36).

En résumé, nos données suggèrent que la délétion de la thréonine insérée à la position 395 entraînerait des changements qualitatifs (liaison aux antigènes Le^x et $Si-Le^x$) et quantitatifs dans le profil d'accroche aux HBGA (diminution de l'accroche aux antigènes A et B). Par conséquent, ceci indiquerait que la modification d'acides aminés qui ne sont pas directement impliqués dans l'attache des HBGA pourrait moduler l'accroche du récepteur du norovirus à son ligand glucidique.

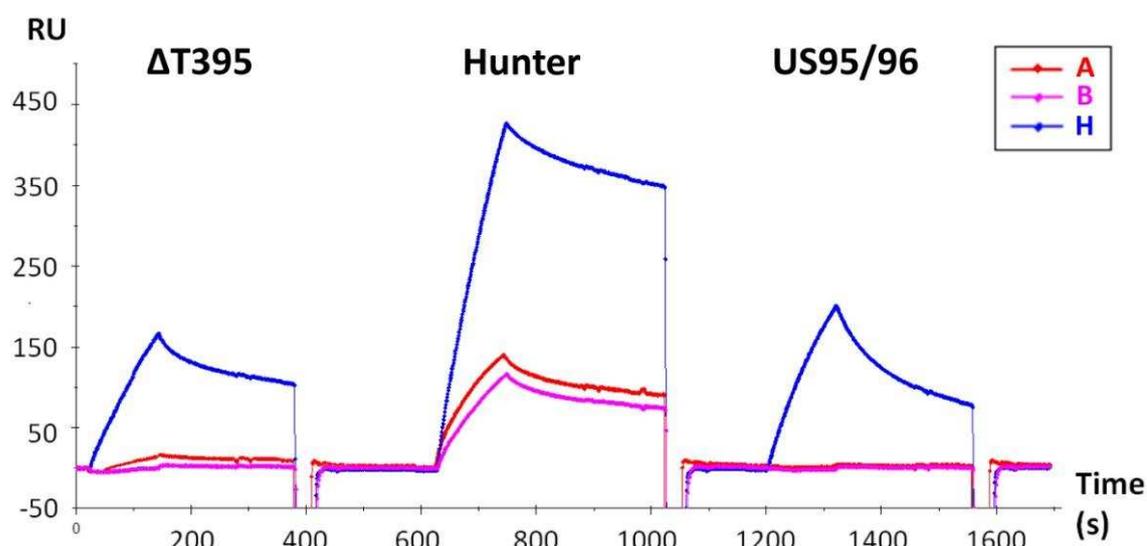


Figure 36. Sensorgramme de l'interaction des VLP $\Delta T395$, Hunter et US95/96 avec les glycoconjugués A, B et H.

2. Profils d'interaction des variants de norovirus GII.4

2.1 Tests d'accroche sur les salives

L'analyse de mutation a montré que certains acides aminés pourraient être responsables de la suppression de l'accroche des VLP aux HBGA et/ou de la modification du profil d'attachement. Nous avons ensuite étendu l'étude à un panel de six variants GII.4 qui ont été tout d'abord testés sur des salives phénotypées provenant d'individus sécréteur ($n=34$) et non sécréteur ($n=12$) représentatifs des groupes sanguins ABO et des antigènes Lewis (Figure 37).

Nous avons observé une accroche des six variants aux échantillons de salive ABO, indépendamment de la présence ou non des antigènes Lewis. Cependant, l'amplitude des interactions a varié de manière significative en fonction de la nature des VLP et de l'antigène présent dans la salive ($p=0,00001$; ANOVA bidirectionnelle).

Pour les VLP Bristol, US95/96, Hunter et Yerseke, aucune accroche n'a été observée avec les salives de non-sécréteur, alors qu'elle était forte pour les VLP Den Haag et Osaka (résultats matérialisés en rouge sur la Figure 37). Pour ces derniers, l'attache était corrélée à la présence des antigènes Lewis ($p=0,0001$; Kruskal-Wallis). L'accroche aux salives Lewis-positives de non-sécréteur était sensiblement plus élevée pour les VLP Den Haag que les VLP Osaka ($p=0,0104$; Kruskal-Wallis). Cette observation suggère que les VLP des variants Den Haag et Osaka sont capables de se lier aux salives des non-sécréteurs via les antigènes synthétisés par l'enzyme

FUT3. Par conséquent, ces variants pourraient également s'accrocher sur les cellules intestinales d'individus non-sécréteurs.

La liaison des VLP Den Haag et Osaka aux salives des non-sécréteurs a pu être abolie après traitement au periodate de sodium comme décrit plus haut, confirmant que ce sont des glycanes qui sont impliqués dans l'attache des VLP aux sucres présents dans la salive.

2.2 Tests d'accroche sur les glycoconjugués de synthèse

Pour déterminer avec précision quels antigènes seraient susceptible d'être reconnus par les VLP de norovirus GII.4, des tests d'accroche des VLP des six variants GII.4 ont été effectués en ELISA avec 15 glycoconjugués HSA et des antigènes synthétiques FUT2-dépendant conjugués à la BSA et au PAA ([Tableau 26 et Figure 38](#)).

2.2.1 Les glycoconjugués à l'albumine

Toutes les VLP des variants se sont accrochées à l'antigène H type 1 conjugué à la BSA mais pas à l'antigène H type 2. Une faible accroche aux A hepta- et trisaccharides conjugués à la BSA a été observée pour les VLP Hunter, Yerseke, Den Haag et Osaka. En revanche, aucune interaction n'a été observée pour les VLP Bristol, et les VLP US95/96 n'ont fixé que le glycoconjugué A-heptasaccharide. Nos données suggèrent donc que la position du sucre sur le conjugué est cruciale dans l'efficacité de la liaison avec les VLP. Des interactions entre le glycoconjugué B-trisaccharide et les VLP Hunter, Yerseke, Den Haag et Osaka ont été observées mais aucune avec les VLP Bristol et US95/96. Ainsi, les constatations d'un attachement plus fort des VLP des six variants à l'antigène H type 1 et de la mauvaise fixation des VLP Bristol et US95/96 aux antigènes A et B ont été confirmées secondairement à l'aide de sucres conjugués à la BSA ([cf. les chapitres dédiés aux résultats d'affinité et de SPR](#)).

En revanche, de fortes interactions ont été observées entre les VLP des six variants et les antigènes Le^b et Le^y, tous deux présents chez les sécréteurs, alors qu'aucune liaison n'a été observée pour l'antigène Le^a présents en quantités importantes chez les non-sécréteurs. Par contre, pour l'antigène Le^x, nous avons pu observer que les VLP US95/96, Den Haag et Osaka pouvaient se fixer efficacement à l'antigène Le^x.

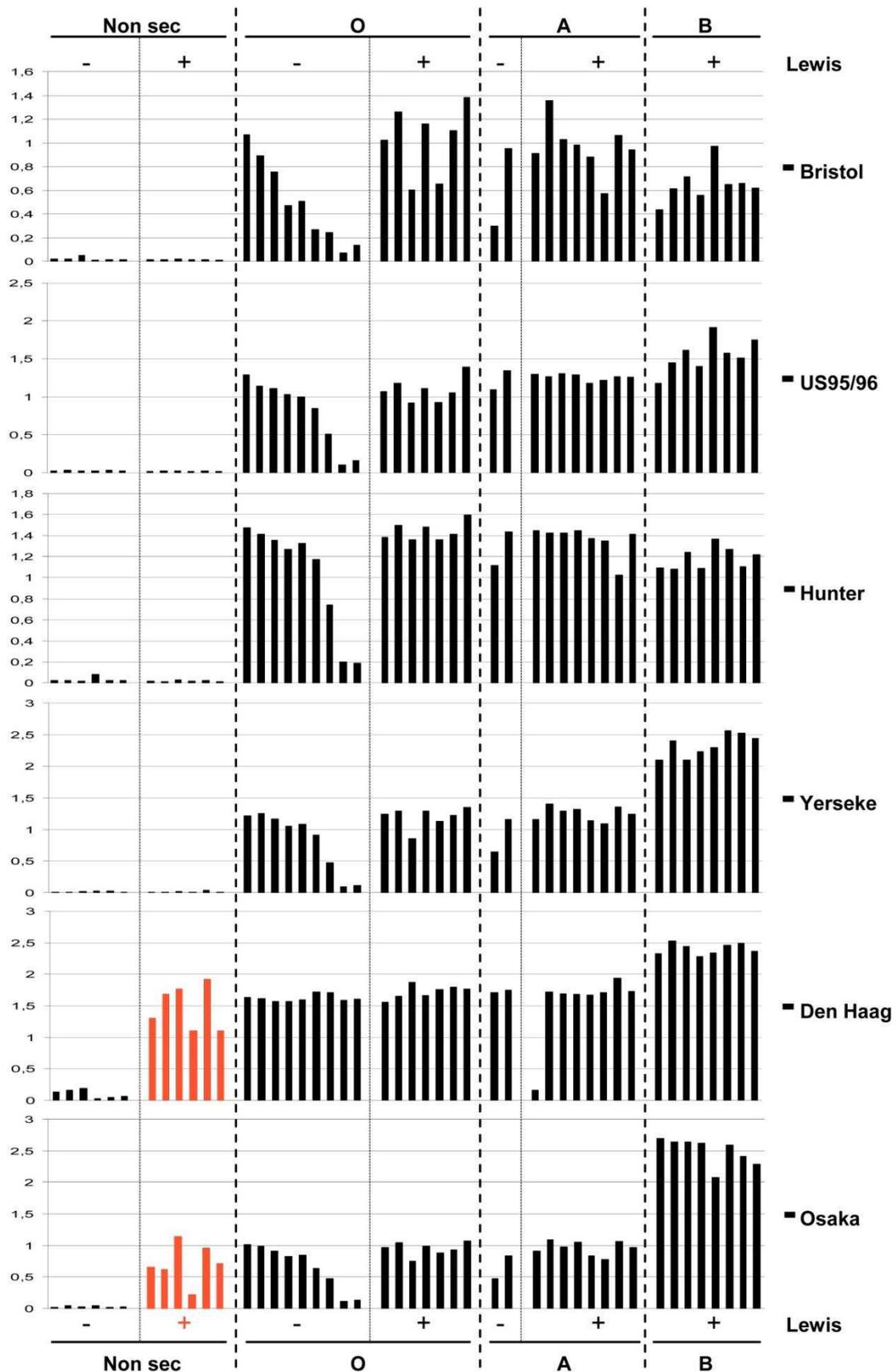


Figure 37. Analyses des interactions des six variants de norovirus GII.4 avec les salives.

Les VLP ont été testées sur 46 échantillons de salive dilués 1000 fois provenant d'individus présentant un phénotype non-sécréteur (non sec ; n=12) ou sécréteur (sec ; n=34). La présence des antigènes ABO et Le^a été recherchée selon des modalités déjà décrites (Marionneau et coll., 2005). Tous les tests ont été effectués en duplicata pour chacun des échantillons.

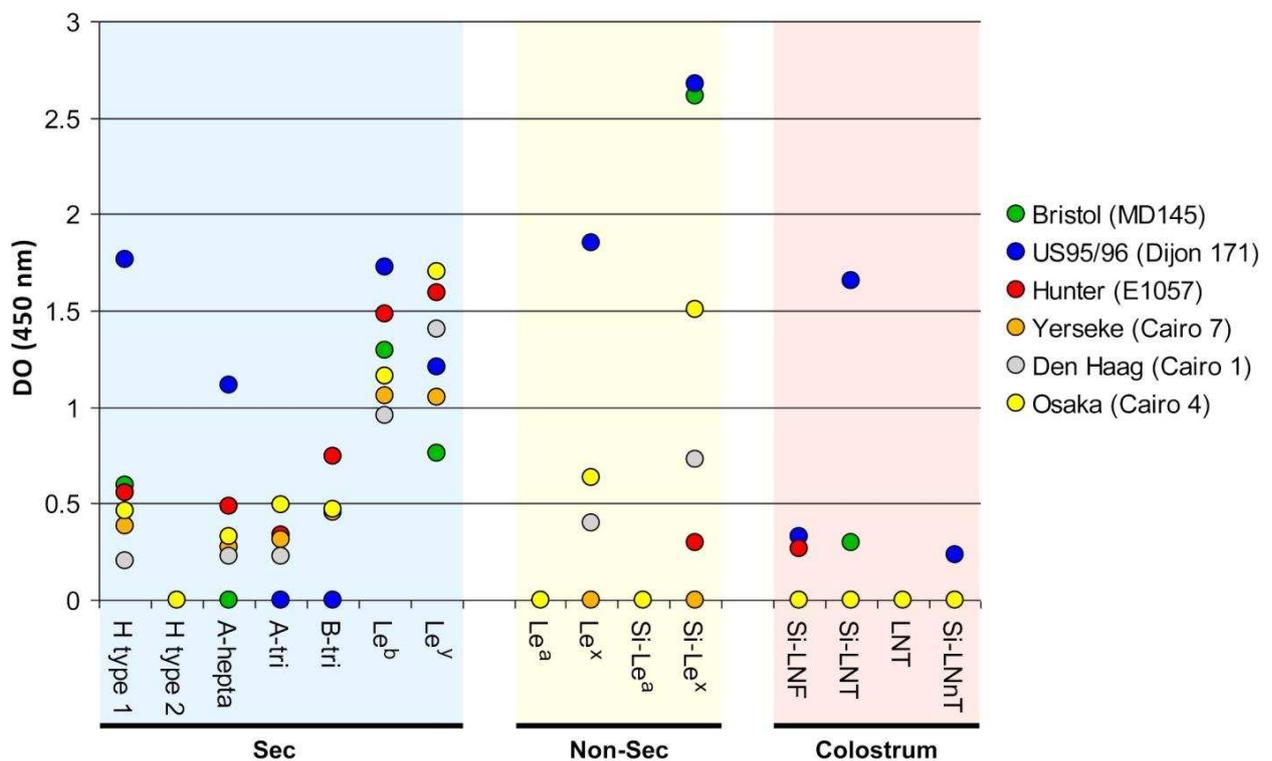


Figure 38. Analyses des interactions des six variants de norovirus GII.4 avec les glycoconjugués de synthèse. Les tests ont été effectués en duplicata pour chacun des glycoconjugués HSA (Tableau 24).

Récemment, une étude a rapporté que les VLP US95/96 étaient capables de se lier à l'antigène Si-Le^x (Rydell *et coll.*, 2009). Cependant, la signification biologique de cette liaison reste encore inconnue d'autant plus que cet antigène est absent du tractus digestif chez les individus en bonne santé (Murata *et coll.*, 1992 ; Kobayashi *et coll.*, 1993 ; Carneiro *et coll.*, 1994). Nous avons investigué la capacité de fixation des VLP des six variants sur les glycoconjugués sialylés, Si-Le^x et Si-Le^a, ce dernier étant présent sur les plaques de Peyer des individus sains (Giannasca *et coll.*, 1999). L'antigène Si-Le^x était très nettement reconnu par les VLP Bristol et US95/96 et moins bien par les VLP Osaka, Den Haag et Hunter.

Ces résultats indiquent que la fixation à des composants sialylés est liée au variant. D'autre part, nos données ne montrent pas de relation avec la capacité des VLP Den Haag et Osaka à se fixer sur les salives Lewis-positive des non-sécréteurs. Ceci suggère donc que l'accroche aux composants salivaires FUT3-dépendants des non-sécréteurs nécessite la reconnaissance de motifs plus complexes que ceux représentés par les glycoconjugués testés. Par conséquent, nous ne pouvons pas exclure la possibilité que l'antigène Le^a soit impliqué dans la fixation à la salive des non-sécréteurs d'autant que l'accroche au sucre synthétique Le^a restait négative.

Le lacto-N-tétraose (LNT), le sialyl-lacto-N-tétraose (Si-LNT), le lacto-N-néotétraose (LNnT) ainsi que le lacto-N-fucopentaose type I (LNFP I possédant un déterminante de l'antigène H) sont des oligosaccharides libres que l'on retrouve dans le lait maternel humain où ils joueraient le rôle de leurre pour les récepteurs bactériens (Newburg, 2009). Le LNT, le Si-LNT et le sialyl-lacto-N-fucose (Si-LNF) possèdent un motif disaccharidique similaire au précurseur de type 1 ($\text{Gal}\beta 1,3\text{GlcNac}\beta$), et le LNnT au précurseur de type 2 ($\text{Gal}\beta 1,4\text{GlcNac}\beta$). L'accroche des VLP Hunter étaient faibles sur le glycoconjugué Si-LNF alors que l'accroche des VLP Bristol était faible sur le glycoconjugué Si-LNT. Les VLP US95/96 se sont accrochées sur le Si-LNF et le LNnT, et de manière plus importante sur le Si-LNT. Ces données suggèrent que les précurseurs de types 1 et 2 sont, à l'exception d'US95/96, mal reconnus par la majeure partie des norovirus GII.4. Le rôle de la partie acide sialique dans l'accroche des VLP reste à déterminer.

En somme, nos données ont montré que les variants GII.4 pouvaient accrocher efficacement les antigènes présents chez les sécréteurs, c'est-à-dire les antigènes A, B, H, Le^b et Le^y , et que la reconnaissance des antigènes Le^x et Si-Le^x était dépendante d'une souche donnée indépendamment des profils d'accroche de la salive. Néanmoins, d'autres facteurs susceptibles de moduler les interactions VLP-sucres sont à prendre en compte dont notamment le positionnement ou la présentation des sucres sur les supports d'analyse et les températures pouvant jouer un rôle sur la disponibilité des antigènes pour l'accroche.

2.2.2 Les globosides, gangliosides, héparane sulfate, chondroïtine sulfate et acide hyaluronique

Taube *et coll.* ont montré récemment que les gangliosides sialylés pouvaient jouer le rôle de ligand pour les norovirus murins (MNV) (Taube *et coll.*, 2009). Cependant, dans notre étude, aucune accroche des VLP des variants GII.4 n'a été observée avec des sphingolipides (globosides) ou des pentasaccharides GM1 (gangliosides contenant un seul résidu acide sialique). Ces données préliminaires suggèrent que le récepteur de norovirus humain pourrait être quelque peu différent du récepteur de MNV.

L'étude en ELISA de la capacité d'accroche des VLP à l'héparane sulfate, à la chondroïtine sulfate et à l'acide hyaluronique (Figure 39) a montré que seule l'héparane sulfate est captée par les VLP. La signification de cette interaction reste néanmoins limitée car la fixation aux héparanes est en général peu spécifique.

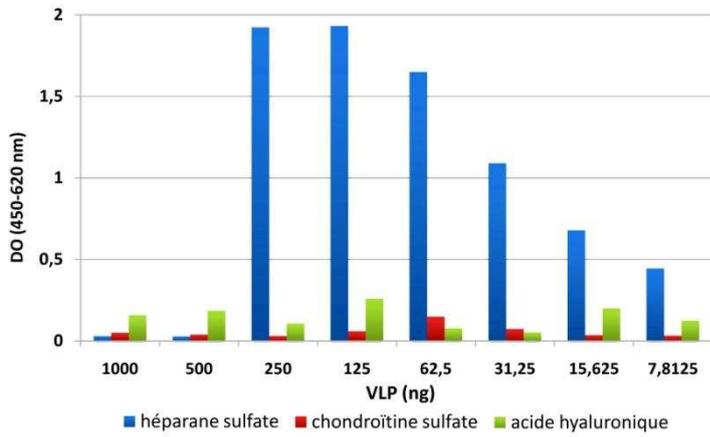


Figure 39. Tests d'accroche en ELISA de différentes dilutions de VLP sur l'héparane sulfate et la chondroïtine sulfate et l'acide hyaluronique.

2.3 Le nouveau variant Apeldoorn

Le variant Apeldoorn, appelé aussi 2008, est l'actuel variant en circulation et a définitivement remplacé le variant Den Haag sur le plan épidémiologique et clinique. Nous avons donc cloné ce nouveau variant afin de déterminer s'il possède les mêmes propriétés de liaison aux non sécréteurs Lewis-positifs que les deux variants Den Haag et Osaka. Les tests ELISA effectués avec les VLP d'Apeldoorn sur le même panel de salive montrent au contraire que le nouveau variant ne fixe pas les non-sécréteurs et fixe peu les salives provenant des sécréteurs Lewis-négatifs (Figure 40). Le variant Apeldoorn n'a donc pas conservé les propriétés particulières caractérisant les variants Den Haag et Osaka.

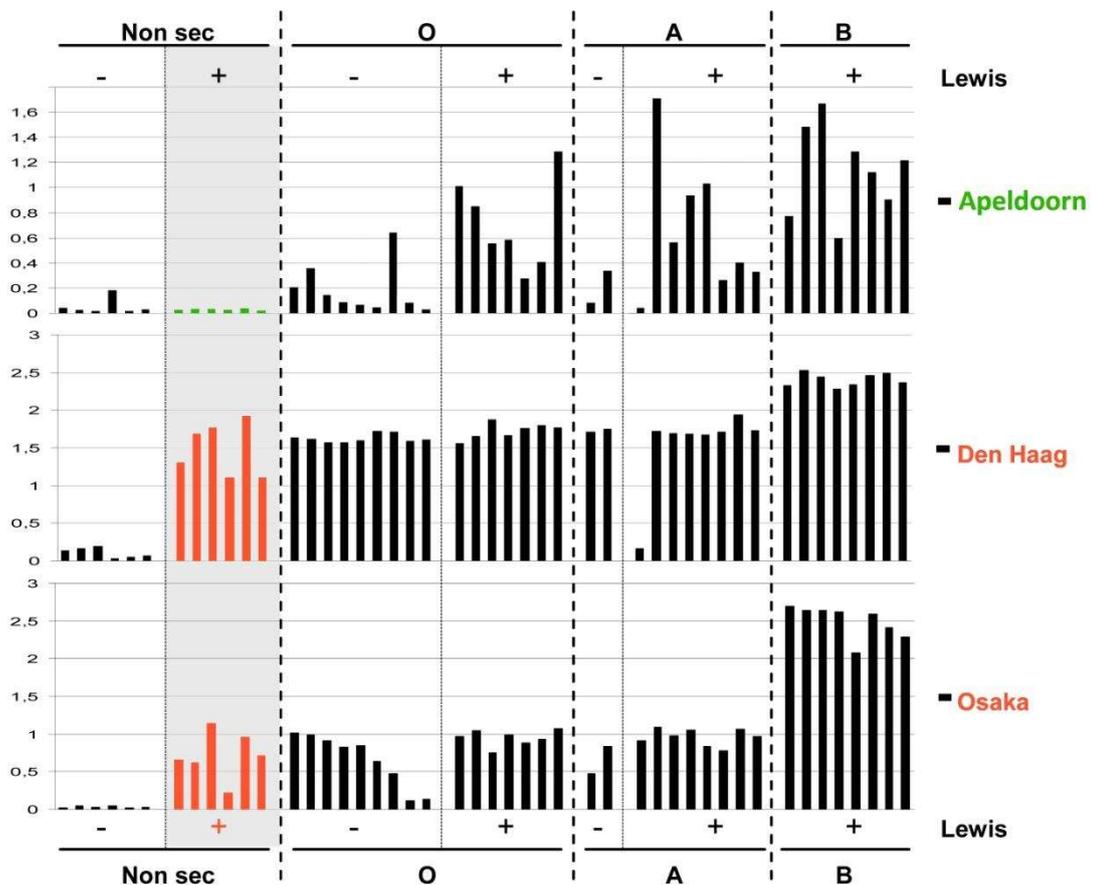


Figure 40. Analyses des interactions du nouveau variant Apeldoorn avec les salives phénotypées.

3. Affinité relative des variants pour les antigènes A, B et H

L'accroche des VLP aux antigènes de groupe sanguin ABO a été étudiée selon deux méthodes, par une technique immunoenzymatique (EIA) et par résonance plasmonique de surface (SPR), afin de déterminer si l'affinité des VLP pour les glycanes était variant-dépendant. Les résultats précédemment obtenus, et exposés plus haut, ont montré que l'accroche des VLP sur des sucres synthétiques était plus faible que sur les salives. (Figure 41).

Pour ces nouvelles expériences, nous avons utilisé des trisaccharides comportant les antigènes A ou B conjugués à la BSA par l'intermédiaire d'espaces de 6 atomes. Les expériences préliminaires ont montré que les accroches étaient meilleures et plus adaptées aux techniques de SPR lorsqu'on employait ces glycoconjugués. Pour les EIA, des dilutions sérielles de facteur 2 des glycoconjugués A, B et H couplés à la BSA ont été fixées sur des plaques ELISA suivant des dilutions de 1000 ng à 15 ng par analyse. Puis, 500 ng de VLP ont été incubés comme décrit plus haut. Afin de permettre la comparaison entre glycoconjugués, une même préparation de VLP a été utilisée tout au long du test avec les trois antigènes. Les tests ont été effectués en triplicata.

Pour les expériences d'attachement menées en ELISA, des polynômes fractionnaires ont permis de modéliser l'interaction entre les VLP et des dilutions sérielles des glycoconjugués A, B et H à l'aide d'une régression linéaire. Les courbes obtenues pour les VLP Hunter ont été choisies pour référence. Globalement, 95,0 %, 77,6 % et 79,7 % des données obtenues correspondent au modèle pour les antigènes H, A et B, respectivement.

Toutes les VLP des variants GII.4 se sont liées aux glycoconjugués BSA-antigène H en suivant des courbes de dilution similaires avec une limite de détection de 62,5 ng de glycoconjugués par puits. Aucune différence statistique n'a été observée lors de la comparaison de chaque type de VLP avec pour standard le variant Hunter ($p > 0,05$).

Les VLP Hunter et Osaka avaient l'affinité la plus élevée pour l'antigène A, suivies des VLP Den Haag avec une limite de détection en-dessous de 15 ng de glycoconjugués par puits. Aucune différence statistique n'a été trouvée pour ces trois variants. En revanche, le taux de détection était inférieur pour les VLP Yerseke, US95/96 et Bristol. La moindre affinité de ces variants pour l'antigène A, en comparaison avec les VLP Hunter, était statistiquement significative ($p \leq 0,001$).

Pour l'antigène B, toutes les VLP, excepté US95/96 et Bristol, avaient une affinité de liaison équivalente ($p \geq 0,05$). Pour les VLP des variants US95/96 et Bristol, les DO étaient nettement inférieures suggérant une affinité faible pour l'antigène B. La différence était statistiquement significative ($p = 0,03$).

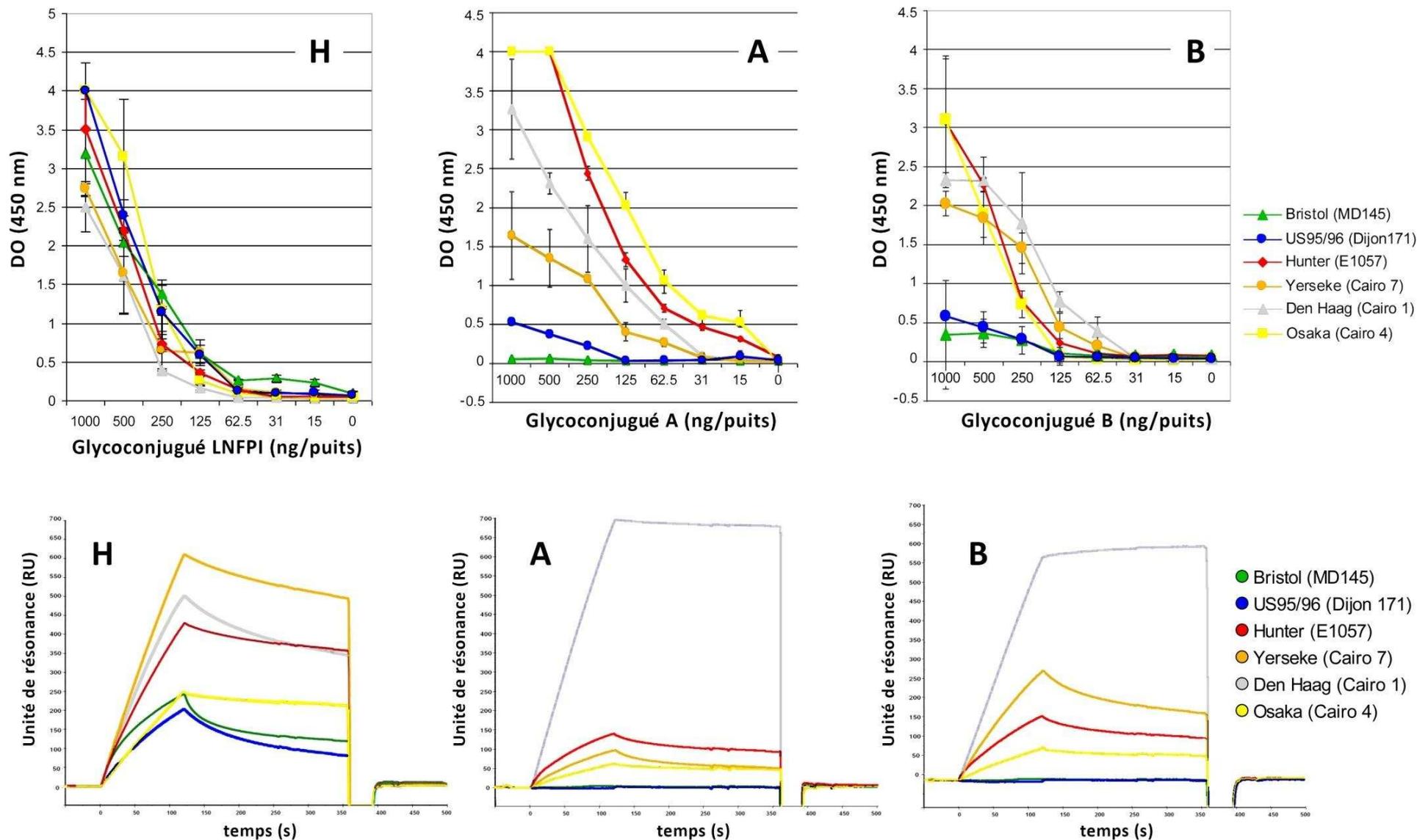


Figure 41. Affinités relatives des VLP de variants de norovirus GII.4 vis-à-vis de sucres LNFPI (H type 1 pentasaccharide), A et B conjugués à la BSA en ELISA et par résonance plasmonique de surface (SPR). Chaque mesure a été effectuée en triplicata.

4. Analyse des interactions VLP-sucre par SPR

Étant donné que les signaux SPR sont proportionnels à l'indice de réfraction sur la surface de la puce, nous avons empiriquement estimé la couverture de la puce par les glycoconjugués à la BSA comme décrit précédemment avec une unité pour 1000 réponses, ce qui correspond à 1 ng/mm² de protéine (Stenberg *et coll.*, 1991). Des quantités équivalentes de glycoconjugués ont été fixées sur les puces pour permettre la comparaison des signaux.

Puisque l'intensité des signaux est amplifiée par la grande masse des VLP, les constantes d'association et de dissociation (K_a et K_d) n'ont pas pu être calculées avec précision puisqu'une VLP possède à elle seule 180 sites potentiels de réceptions (deux par dimères) et seuls quelques uns interviennent lors de l'interaction. De plus, il était difficile d'établir le nombre de molécules de HBGA participant à l'interaction. Cependant, une affinité d'accroche relative a été estimée, basée sur l'examen visuel des courbes d'interaction telle qu'elle a été proposée plus tôt (Nam *et coll.*, 2006).

L'observation des sensorgrammes a permis de déterminer pour chacun des trois antigènes une affinité croissante dans l'ordre suivant (Figure 41) :

- pour le glycoconjugué de l'antigène H :

Yerseke > (Den Haag = Hunter) > Osaka > (Bristol = US95/96)

- pour le glycoconjugué de l'antigène A :

Den Haag >> Hunter > (Yerseke = Osaka)

- pour le glycoconjugué de l'antigène B :

Den Haag >> Yerseke > Hunter > Osaka

Aucune interaction n'a été observée pour les VLP US95/96 et Bristol, suggérant qu'aucun des deux variants ne présente une affinité pour les antigènes A et B suffisante pour être détectée, bien qu'une faible accroche a été constatée par ELISA.

En ce qui concerne les courbes de dissociation, nous avons observé que les VLP Den Haag et Osaka ont présenté une stabilité plus importante pour les trois glycoconjugués, et cela quelque

soit la concentration des VLP lors de l'injection. En revanche, les VLP US95/96 et Bristol ont présenté leur plus faible interaction avec l'antigène H.

Enfin nous avons effectué une estimation plus précise de la constante de dissociation K_d a été effectuée en utilisant différentes concentrations de dimères de protéines VP1 exprimés en culture bactérienne et gracieusement fournis par l'équipe de Jacques LE PENDU (Figure 42). En effet, chaque dimère ne possédant, à la différence des VLP, que deux sites de liaison aux HBGA, le dimère se comporte comme une protéine en solution dont il devient plus aisé de calculer sa constante de dissociation. Pour la protéine VP1, le K_d est de $4,1 \cdot 10^{-8}$ M.

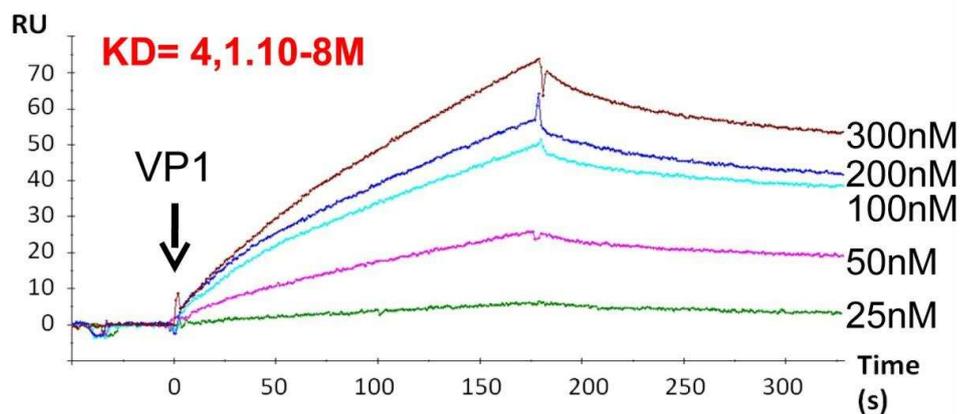


Figure 42. Étude cinétique de différentes concentrations de dimères de protéines VP1 permettant le calcul de la constante de dissociation K_d .

Quatrième Partie

DISCUSSION

L'étude phylogénétique des norovirus provenant d'épidémies de gastroentérites a permis de mettre en évidence une évolution séquentielle des norovirus GII.4 au cours des deux dernières décennies, les confortant comme souches prédominantes dans le monde. Or, depuis l'apparition des variants Farmington Hills en 2002, les réseaux de surveillance ont observé un rythme croissant de la dérive génétique des GII.4 avec l'émergence de nouveaux variants tous les 2 ou 3 ans. L'analyse approfondie de l'accroche des norovirus de plusieurs génogroupes a permis la caractérisation de 8 profils d'interaction, qui peuvent être classés dans les groupes accrochant les antigènes ABO et Lewis. Les norovirus GII.4 présentent le spectre d'interaction le plus large puisqu'ils peuvent s'attacher efficacement à la salive des individus sécrétant des antigènes ABO (environ 80% de la population caucasienne) (Tan et Jiang, 2010).

La signification biologique et les mécanismes d'émergence rapide de nouveaux variants au cours de la dernière décennie restent à élucider, nous avons analysé 6 variants représentatifs des norovirus GII.4 afin de déterminer si les observations épidémiologiques sont corrélées avec des propriétés biologiques spécifiques lors de l'interaction des particules de synthèse de norovirus GII.4 avec leurs récepteurs, les HBGA. Les données sont résumées dans le [Tableau 32](#).

Nous avons tout d'abord effectué une analyse qualitative des variants en évaluant leur profil d'attachement sur des salives phénotypées et un large panel de glycoconjugués synthétiques. Certaines équipes ont suggéré que l'émergence de nouveaux variants serait pilotée par l'immunité collective (*herd immunity*) et s'accompagnerait de nouvelles propriétés d'interaction (Donaldson et coll., 2008 ; Cannon et coll., 2009).

Tableau 32. Résumé des propriétés d'interaction des variants de norovirus GII.4 avec les HBGA

	Salives ^a		Glycoconjugués synthétiques ^b								
	non sec		sec				non sec				
	Le+	Le-	H	A	B	Le ^b	Le ^y	Le ^a	Le ^x	Si-Le ^a	Si-Le ^x
Bristol	neg	neg	227	3	2	+++	++	-	-	-	++++
US95/96	neg	neg	191	1	1	++++	+++	-	++++	-	++++
Hunter	neg	neg	425	134	114	+++	++++	-	-	-	+
Yerseke	neg	neg	606	88	195	+++	+++	-	-	-	-
Den Haag	pos	neg	490	694	407	++	+++	-	+	-	++
Osaka	pos	neg	243	59	54	+++	++++	-	++	-	++++

^a Tests ELISA ; Pos : positif ; neg : négatif. ^b Les résultats pour les antigènes A, B et H sont indiqués en RU (SPR). Les résultats indiqués par des signes + et - correspondent aux DO des tests ELISA : + (DO<0,5), ++ (0,5<DO<1), +++ (1<DO<1,5), ++++ (DO>1,5).

Au premier abord, nos données ont clairement démontré que l'apparition de nouveaux variants n'était pas corrélée avec l'apparition ou l'élargissement de profils de liaison. En effet, les variants que nous avons analysés étaient capables de se lier aux antigènes de synthèse A, B, H type 1 (mais pas H type 2), Le^b et Le^y, qui sont tous présents chez le phénotype sécréteur. Ces données ont permis de confirmer les expériences préliminaires menées sur les salives en montrant que les six variants pouvaient se lier à la salive des sécréteurs, indépendamment du phénotype ABO, et que l'intensité de l'accroche des VLP était dépendante du variant.

Cependant, les variations que nous avons observées au cours des tests sur les salives entre les variants pour un antigène donné, A, B ou H, pourraient s'expliquer par le degré d'expression des HBGA dans la salive. En effet, pour les échantillons de salive de phénotype A et B, le déterminant antigénique H pourraient, dans une certaine proportion, être démasqué (c.-à-d. par défaut de déterminants antigéniques A ou B sur certaines chaînes de glycannes) et avoir permis l'accroche des récepteurs spécifiques du déterminant H. Par ailleurs, des études complémentaires seront nécessaires pour déterminer s'il existe une association synergique entre les antigènes Lewis et ABO pouvant expliquer en partie les différences observées dans les interactions.

Parmi 12 échantillons de salive provenant d'individus non-sécréteurs, nous avons démontré que, pour les 6 échantillons Lewis-positifs, les VLP Den Haag et Osaka s'accrochaient fortement. Nos données renforcent l'assertion selon laquelle ces variants pourraient potentiellement infecter tous les sécréteurs et une partie de la population des non-sécréteurs. Seuls les

individus non-sécréteurs Lewis-négatifs ne seraient donc pas reconnus par ces deux récents variants. Dans la population générale, les individus ayant ce phénotype ne représentent que 1 à 3 % des cas (Mourant, 1983), alors que les non-sécréteurs Lewis-positifs en représentent près de 20 %. De cette manière, les souches Den Haag et Osaka auraient acquis une capacité accrue de circulation dans le monde. En effet, si l'on se base sur leur nouvelle capacité de reconnaissance des composés Lewis (FUT3 dépendant) chez les non-sécréteurs, ces deux variants pourraient potentiellement infecter plus de 95 % de la population (Figure 43).

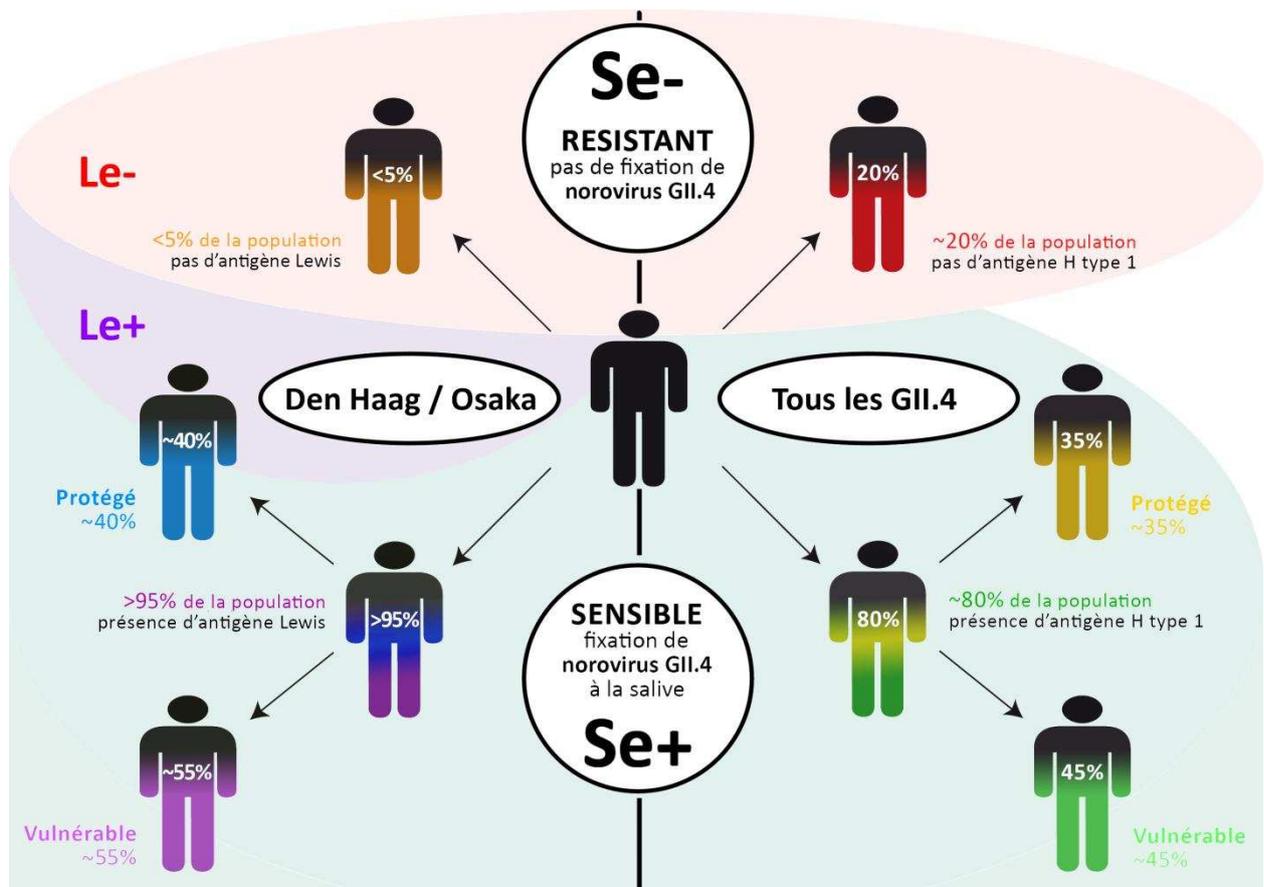


Figure 43. Extrapolation du modèle d'infection par Norwalk (GI.1) en fonction du caractère sécréteur ou non-sécréteur (présence des gènes FUT2/FUT3 fonctionnels ou pas), d'après Lindesmith et coll., exposant l'avantage infectieux des variants Den Haag et Osaka par rapport aux autres variants de norovirus GI.4.

Ainsi, en supposant que la proportion des sujets vulnérables et des sujets protégés par une réponse IgA précoce est identique entre les deux populations sécréteur et non-sécréteur, il est possible d'estimer, par extrapolation des résultats obtenus par l'équipe de Lindesmith avec le virus de Norwalk (GI.1) (Lindesmith et coll., 2003), qu'environ 55% de la population serait donc vulnérable à une infection par ces deux souches contre 45% pour les autres norovirus GI.4. De plus, compte-tenu de la plus grande affinité du variant Den Haag pour les antigènes A, B et H, ce variant constitue une sorte de « supervariant » capable d'infecter de plus large population

avec une plus grande affinité. Cependant, les tests sur sucres synthétiques n'ont pas permis d'identifier quel motif glucidique précis est reconnu par ces deux souches chez les individus non-sécréteurs Lewis-positifs, suggérant l'implication d'éléments structuraux plus complexes, comme des sucres branchés ou des fucosylations internes, dont l'exploration sera à envisager ultérieurement.

L'alignement de séquences des variants GII.4 (CHDC, Bristol, US95/96, Farmington, Hunter, Yerseke, Chiba, Den Haag, Osaka et Apeldoorn) a montré que les acides aminés directement impliqués dans le site récepteur des HBGA sont tous conservés (Belliot *et coll.*, 2010) (Figure 44). Cet alignement, basé sur les travaux de Lindesmith *et coll.* (Lindesmith *et coll.*, 2008), montre que la majorité des mutations d'acide aminé observées dans les domaines S, P1 et P2 s'effectue au sein d'un même groupe (ex : les aliphatiques, les aromatiques, les aa chargés négativement ou positivement (Figure 45)) et qu'il existe souvent pour une même position un « recyclage » des aa (c.-à-d. réapparition d'un aa utilisé antérieurement) au fil de l'évolution phylogénique des souches.

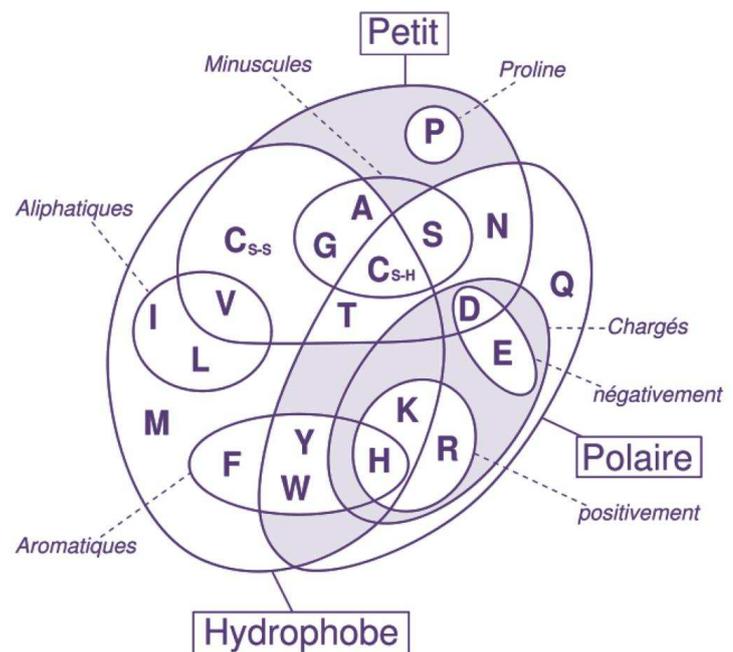


Figure 45. Schématisation des interrelations entre les différents groupes d'acide aminé basée sur leurs caractéristiques moléculaire et structurale

L'importance de la stabilité des acides aminés impliqués dans l'interaction avec les sucres a été confirmée par notre analyse basée sur la mutagenèse dirigée des acides aminés de la poche réceptrice qui interagit avec l' α -fucose présent sur les sucres caractérisant des antigènes A, B et H. La délétion ou la mutation de ces résidus ont totalement aboli l'accroche des VLP aux HBGA synthétiques et aux échantillons de salive.

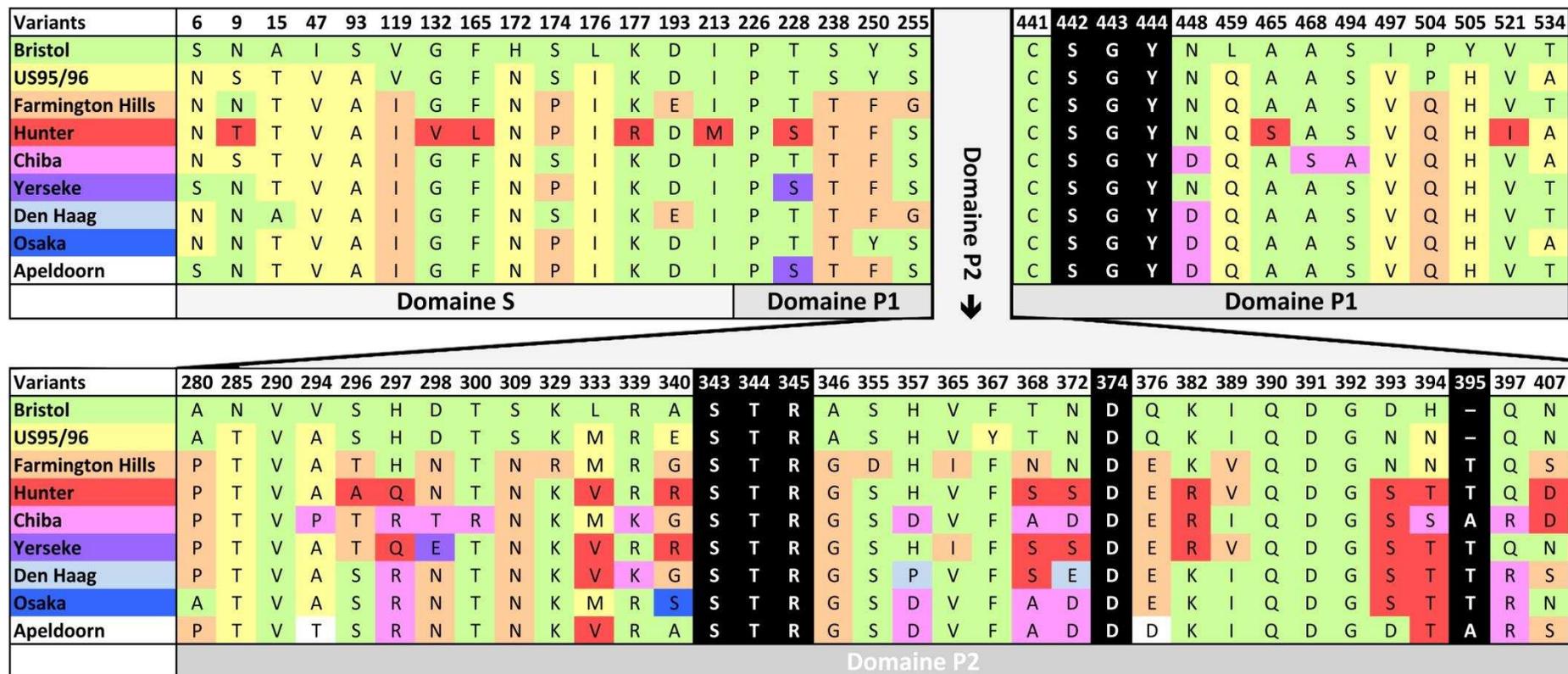


Figure 44. Analyse chronologique des profils de mutations des variants de norovirus GII.4 de 1987 à 2008 d'après les positions retenues par Lindesmith et coll. (Lindesmith et coll., 2008) et mettant en évidence la stricte conservation des acides aminés impliqués dans la poche réceptrice (en noir), les points de mutation et le « recyclage » des acides aminés. Chaque nouvelle mutation introduite dans la séquence porte la couleur de la souche chez laquelle elle a été observée la première fois.

A l'inverse, comme illustré par les profils d'interaction des VLP Δ T395, les acides aminés qui sont en dehors du site récepteur varieraient sous l'influence d'une dérive génétique et du système immunitaire, et pourraient avoir comme conséquence l'émergence de nouveaux variants possédant de nouvelles propriétés telles que la capacité de se lier aux antigènes Le^x et Si-Le^x. L'insertion de la T395 semble en effet entraver la reconnaissance de ces motifs glucidiques puisque sa délétion par mutagenèse dirigée chez la souche Hunter permet la restauration de la capacité d'accroche aux antigènes Le^x et Si-Le^x. Or, la capacité d'accroche à Si-Le^x est abolie ou diminuée chez les variants postérieurs à 2002. La signification biologique de la reconnaissance de ces antigènes reste à déterminer. D'autres études de mutagenèse dirigée seront nécessaires pour vérifier quels sont les résidus d'acides aminés susceptibles d'influencer ces interactions et quel avantage biologique cela pourrait procurer au virion.

Néanmoins, nos données indiquent que la dérive génétique observée chez les variants de norovirus GII.4 ne serait pas dû exclusivement à l'influence de la pression immunitaire. Dans la littérature, les interactions des VLP avec les sucres sont généralement étudiées au travers de techniques ELISA. Or, bien que ces interactions n'aient pas été stœchiométriques, leur analyse par résonance plasmonique de surface a été d'un apport indéniable dans l'étude de l'accroche et de la dissociation des complexes VLP-HBGA. En outre, la pente et les valeurs mesurées en RU permettent de supposer que l'affinité pour un glycoconjugué donné est dépendant à la fois de l'HBGA et du variant.

En somme, nos données suggèrent que les anciens variants GII.4 (c.-à-d. Bristol et US95/96) pourraient uniquement se lier fortement à l'antigène H alors que les nouveaux variants GII.4 auraient également une forte affinité pour les antigènes A et B, le variant Den Haag ayant l'affinité la plus élevée pour les antigènes A, B et H (Figure 46). Nous pouvons supposer qu'il existe une relation entre la forte affinité du variant Den Haag vis-à-vis des antigènes A, B et H et la prédominance épidémiologique de ces variants sur les variants Yerseke qui ont circulé à la même période (Belliot *et coll.*, 2010).

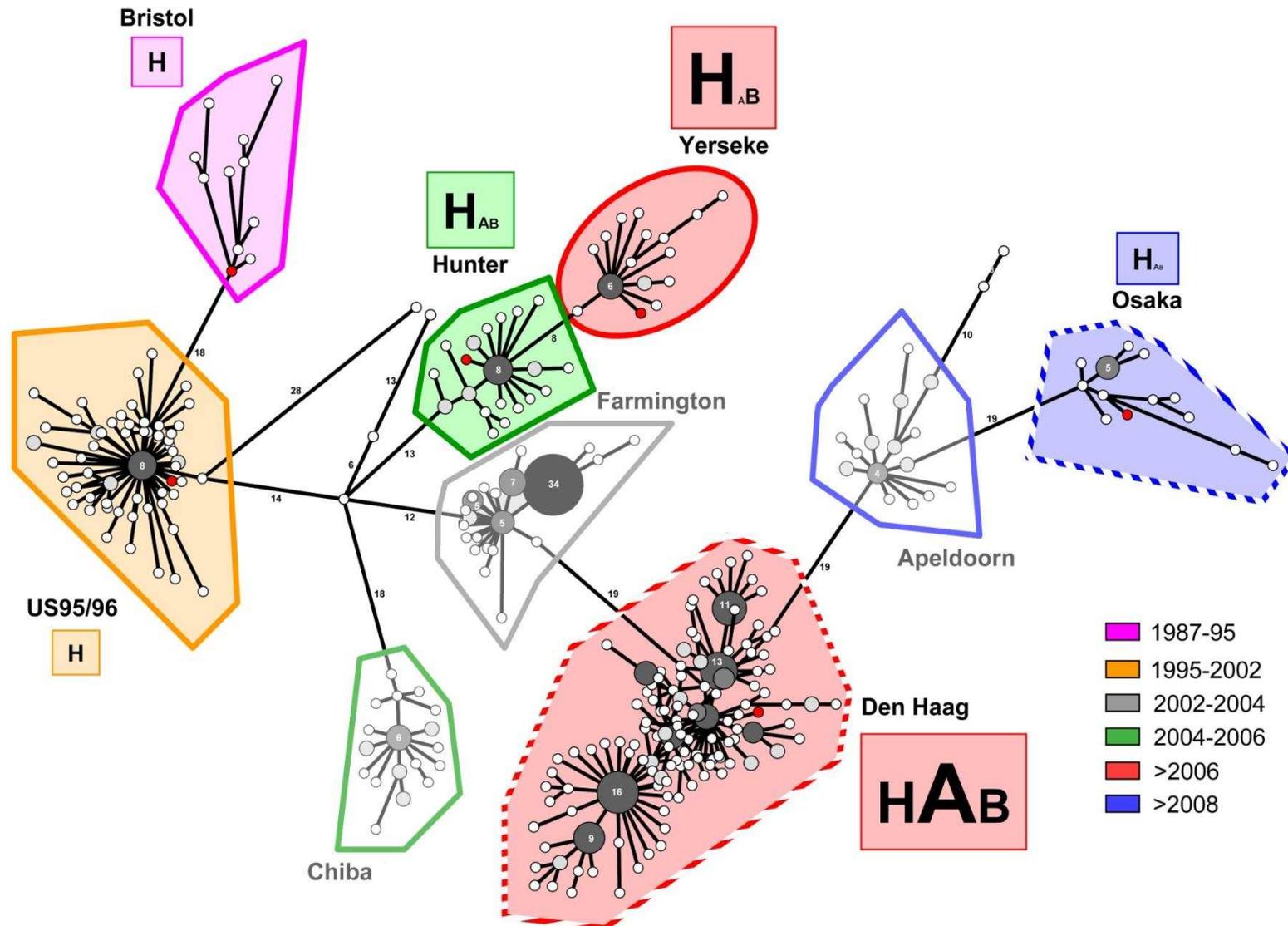


Figure 46. Arbre minimum couvrant (MST) des variants de norovirus GII.4 pandémiques depuis 1987 et leurs profils liaison aux HBGA. Les profils de liaison aux HBGA des sécréteurs et non-sécréteurs sont représentés pour les antigènes A, B et H, par des lettres dont la taille est proportionnelle au nombre de RU obtenues lors de l'analyse de SPR (Figure 34). Les hachures matérialisent les variants capables de fixer les non-sécréteurs.

Conclusion *et perspectives*

Cette étude est la première à mettre en évidence l'existence d'un accroissement d'affinité des variants prédominants de norovirus GII.4 pour les HBGA des sécréteurs en fonction du temps. Nos données ont démontré que l'évolution des norovirus GII.4 a eu pour conséquence une augmentation de l'affinité pour les antigènes A, B et H, ce qui est plus flagrant pour les souches les plus prospères. Nos données soulignent donc la pertinence de la détermination de l'affinité des norovirus vis-à-vis des HBGA afin de pouvoir évaluer si certains variants GII.4 émergents seront plus à même de devenir mondialement prédominants.

L'association d'une affinité élevée vis-à-vis des antigènes A, B et H, propres aux sécréteurs, à une aptitude à reconnaître les non-sécréteurs Lewis-positifs a élargi le spectre d'hôte à la quasi totalité de la population et certainement été un facteur ayant contribué à la domination des souches Den Haag dès leur émergence en 2006. Cependant, depuis fin 2008, ce variant a été remplacé par le variant Apeldoorn, et aux vues des premiers résultats d'analyse d'accroche avec des salives de non-sécréteurs, l'évolution du spectre de liaison aux HBGA vers les antigènes Le^x et Le^a observé précédemment semble n'avoir été que transitoire. En effet, ce nouveau variant ne possède pas la capacité de se lier aux salives des non-sécréteurs Lewis-positifs comme le variant Den Haag (Figure 40), ce qui n'a pour autant pas été une condition limitante à sa diffusion mondiale. Nos données suggèrent donc que la capacité à se lier à ces antigènes FUT3-dépendant est très probablement une conséquence de la pression immunitaire et d'une dérive génétique aléatoire.

Comme nous l'avons montrée, la capacité des GII.4 de se lier aux antigènes de groupes sanguins ne constituerait donc pas une condition nécessaire à l'évolution des GII.4 mais en serait plutôt une conséquence. L'association de certains facteurs influençant le *fitness* ont en effet été suggérés dans l'évolution des norovirus et tout particulièrement celle des GII.4 (Bull et coll., 2010) et expliquerait la prédominance des GII.4 sur les autres norovirus comme les GII.b/GII.3, deuxième génotype de norovirus en terme d'incidence. Un taux de mutation accru dans la capsid (1,7 fois plus que les GII.b/GII.3 et GII.7), en particulier dans le sous-domaine protrusif P2, associé à une réplication plus efficace confèrerait aux GII.4 un plus grand potentiel de glissement antigénique, et par conséquent, une meilleure adaptation à la réponse immunitaire de l'hôte. En effet, l'ARN polymérase des GII.4 produirait *in vitro* 5 à 36 fois plus d'erreurs que les GII.b/GII.3 et générerait une diversité plus importante de souches susceptibles d'émerger (Bull et coll., 2010). L'augmentation de l'incidence du virus serait alors facilitée par l'accroissement de l'affinité vis-à-vis des HBGA, permettant ainsi une large diffusion des souches grâce à l'élargissement de son spectre d'hôte. En somme, lorsqu'une population a acquis une immunité dite collective vis-à-vis d'une souche, les virus possédant un taux de réplication élevé mais peu fidèle, comme les GII.4, peuvent modifier plus rapidement leurs déterminants antigéniques et donc s'adapter à de nouvelles conditions. Au contraire, ceux qui ont des changements antigéniques peu fréquents et une polymérase plus fiable, comme les GII.b/GII.3, diffusent plus difficilement et sont donc le plus souvent associés à des cas sporadiques.

Quelque soit la future évolution des norovirus GII.4, le spectre d'hôte ne pourra de toute manière guère encore s'élargir, voire au mieux se stabiliser au fil du remplacement des variants, puisqu'il recouvre déjà plus de 95 % de la population. Nous pouvons tout au plus supposer que la pression immunitaire mènera à l'émergence de nouvelles souches qui échapperont un temps au système immunitaire mais ne posséderont qu'accessoirement la capacité supplémentaire d'infecter une plus large population d'hôtes. Aujourd'hui, il est difficile de prévoir si le spectre d'hôtes potentiels de ces futurs variants sera limité ou non à la population des sécréteurs. L'exploration systématique des aptitudes à interagir avec les antigènes présents chez les non-sécréteurs pourrait alors contribuer à la prédiction du pouvoir pathogène des nouveaux variants émergents de norovirus GII.4 dans la population. Des tests d'affinité seront nécessaires afin d'observer si les futurs nouveaux variants, à défaut d'avoir un spectre d'accroche élargi, auront une forte affinité pour les antigènes A, B et H, et/ou auront acquis la capacité de se lier à de nouveaux glycanes pour lesquels les variants précédents n'avaient pas ou peu d'affinité.

Infections à norovirus et pathologies lourdes

Chaque année, des centaines de milliers d'épisodes de gastroentérites d'origine virale surviennent en France et n'épargnent aucune couche de la population. Cependant, l'histoire de la maladie et les manifestations cliniques diffèrent en fonction de catégorie de sujets infectés :

- les sujets en bonne santé pour qui, d'une manière générale, l'impact clinique est limité,
- les enfants de moins de 5 ans chez qui la déshydratation peut survenir très rapidement et engager le pronostic vital,
- les personnes âgées, surtout celles du 4^{ème} âge, qui sont particulièrement vulnérables,
- et les sujets atteints de pathologies lourdes ou débilitantes (cancer, immunodépression, maladie inflammatoire chronique, etc.). Paradoxalement peu documentées, ces gastroentérites virales sont susceptibles d'aggraver considérablement l'état clinique de patients déjà très fragiles et être à l'origine de leur décès ou de leur maintien en centre hospitalier. C'est le cas notamment des infections chroniques à norovirus chez des malades immunodéprimés.

Le projet que nous proposons découle de nos travaux de thèse et consistera en l'étude des infections à norovirus dans le cadre de pathologies lourdes. Ces travaux feront aussi bien appel à l'étude *in situ* de l'attachement des norovirus humains qu'à l'étude de leur génome dans un contexte clinique.

1^{er} volet : Profils d'interaction des norovirus sur les cellules intestinales saines et pathologiques

Bien que la bonne aptitude des norovirus GII.4 à se lier aux HBGA présents dans la salive semble constituer un avantage certain sur les autres génotypes de norovirus pour infecter l'hôte, cela ne constitue pas nécessairement un reflet fidèle des interactions *in situ* et *in vivo* entre le virus et les différents types cellulaires constituant le tissu intestinal chez l'homme. En effet, il existe des variations importantes du profil d'expression des glycanes qui va changer dynamiquement en réponse à de faibles variations de l'environnement extracellulaire, mais également consécutivement aux régulations post-transcriptionnelles liées à la stabilité des ARN messagers codant les enzymes et l'efficacité de leur traduction. Ces variations sont également liées à la nature même des voies de synthèse des glycanes qui est dépendante de réactions enzymatiques multiséquentielles et compétitives. De plus, les glycanes jouent un rôle non négligeable dans la signalisation intercellulaire. Ainsi, la variation de l'environnement extracellulaire consécutif à une pathologie lourde (cancer, immunodépression acquise ou

iatrogénique, maladies inflammatoires chroniques, diabète, etc.) pourrait modifier la susceptibilité du patient vis-à-vis des infections à norovirus par dérégulation de l'expression des HBGA.

L'expression des glycanes, et notamment des HBGA, arborés à la surface des membranes cellulaires de l'épithélium intestinal varieraient en fonction de divers facteurs tels que le type cellulaire présent dans l'intestin (entérocytes, cellules caliciformes, cellules M, etc.), l'âge (enfant, adultes, personnes âgées), l'état de santé (cancers intestinaux, maladies inflammatoires chroniques, immunodépression, etc.) ou encore la prise de produits pharmaceutiques (Ravn et Dabelsteen, 2000 ; Le Pendu *et coll.*, 2001). Nous savons par exemple que le Si-Le^x n'est normalement pas exprimé dans le tube digestif d'un sujet sain mais par des cellules intestinales néoplasiques (marqueur CSLEX-1) (Murata *et coll.*, 1992 ; Kobayashi *et coll.*, 1993 ; Carneiro *et coll.*, 1994). De même, le Si-Le^a, présent sur les cellules M, peut être exprimé par certaines tumeurs intestinales (marqueur tumoral CA19-9) (Giannasca *et coll.*, 1999).

Deux hypothèses pourront être explorées chez les sujets sains et les patients atteints de pathologies chroniques : la variation d'expression des antigènes A, B, H et Lewis et/ou l'expression d'autres HBGA pourrait être responsable d'une modification des profils d'accroche des norovirus différents de ceux constatés sur les salives :

- a) cette modulation d'expression pourrait alors être responsable d'un accroissement de la sensibilité du tissu intestinal aux infections à norovirus, en arborant ou surexprimant des antigènes glycaniques possiblement inhabituels à la surface des cellules intestinales,*
- b) à l'inverse, l'absence de ces HBGA au niveau des cellules intestinales pourraient être source de protection vis-à-vis de l'infection chez les patients fragilisés qui se manifesterait par l'absence de symptomatologie et d'excrétion virale dans les selles.*

Afin de pouvoir explorer ces hypothèses, nous avons à notre disposition une large bibliothèque regroupant des tissus intestinaux normaux et pathologiques conservés au sein du Centre de Ressources Biologiques (CRB) Ferdinand CABANNE de Dijon. Les analyses seront menées en collaboration avec le laboratoire d'anatomopathologie du CHU de Dijon.

L'approche analytique s'effectuera en plusieurs étapes en comparant tissus sains et tissus pathologiques en fonction de critères d'âge, de groupes sanguins, du type de pathologie explorée, etc. :

- i)* au préalable, nous procéderons à la localisation et l'évaluation de l'expression des HBGA (antigènes A, B, H, Lewis, et notamment Le^x et si-Le^x) sur des coupes anatomopathologiques saines et pathologiques à l'aide d'anticorps monoclonaux dirigés contre les HBGA et disponibles sur le marché. La cartographie sera réalisée à l'aide de techniques immunohistochimiques utilisant un anticorps couplé à la peroxydase et dirigé contre l'anticorps de capture ;
- ii)* nous explorerons ensuite sur les tissus que nous aurons catégorisés la capacité d'attachement des VLP de nos sept variants de norovirus GII.4 ainsi que d'autres génotypes (GI.1, GI.2, GI.3 et GII.3 entre autres) produits au sein du laboratoire à l'aide de techniques d'immunoenzymatique utilisant notamment nos anticorps ;
- iii)* nous établirons des profils d'interaction des différentes VLP en fonction de la nature du tissu et son état sain ou pathologique, et que nous comparerons aux résultats obtenus précédemment sur les salives ;
- iv)* nous tenterons enfin d'identifier et de caractériser les types cellulaires impliqués dans l'accroche des VLP. Cette étape pourrait constituer un enjeu de taille. En effet, comme nous l'avons abordé précédemment, il n'existe actuellement pas de cultures cellulaires permettant une pérennisation des souches de norovirus humains malgré les nombreuses tentatives entreprises jusqu'ici par différentes équipes. Ce débouché pourrait permettre la mise en évidence de tissus permissifs pour la réplication des norovirus humains ouvrant *de facto* la voie à une exploration approfondie des norovirus humains demeurée jusqu'ici impossible.

2^{ème} volet : Suivi virologique des infections à norovirus chez l'immunodéprimé

Les patients immunodéprimés souffrant d'une gastroentérite à norovirus ont la particularité de présenter une excrétion virale au long cours pendant des semaines voire plusieurs mois avec des épisodes itératifs de diarrhée sévère, parfois à l'origine du décès (Gallimore *et coll.*, 2004b ; Mattner *et coll.*, 2006 ; Murata *et coll.*, 2007 ; Siebenga *et coll.*, 2008 ; Sukhrie *et coll.*, 2010 ; Wingfield *et coll.*, 2010). Grâce à des techniques de PCR en temps réel quantifiant l'excrétion des norovirus dans les selles, il a été possible de montrer que la charge virale dans les fèces n'était pas corrélée avec le degré d'immunodépression, mais que, en revanche, une immunodépression ou un âge inférieur à 10 ans avait une influence sur la durée de l'excrétion (Ludwig *et coll.*, 2008 ; Henke-Gendo *et coll.*, 2009). L'immunodépression serait donc le principal facteur clinique de persistance du virus chez le patient.

Comme nous l'avons vu plus tôt, la polymérase des norovirus GII.4 génèrent de nombreuses erreurs (Bull et coll., 2010). Ainsi, la réplication intense du virus dans les cellules intestinales pourrait être à l'origine d'une diversification génétique et antigénique de souche et participer à la pérennisation de l'infection ou être source de nouvelles infections (Siebenga et coll., 2010). Le suivi virologique présente donc un intérêt crucial dans la prise en charge de ces patients, dans l'élaboration de nouveaux traitements basés sur l'administration d'immunoglobulines spécifiques et dans la prévention des transmissions des gastro-entérites nosocomiales à norovirus.

Deux interrogations pourront être explorées chez ces patients particulièrement fragiles :

- a) existe-il une dérive antigénique d'une même souche de norovirus au cours de l'infection chronique à norovirus chez l'immunodéprimé ? Permet-elle la persistance de l'infection chez le patient grâce à la sélection de nouvelles mutations et quelles peuvent en être les conséquences pour le patient et pour les risques de transmission nosocomiale ?*
- b) les anticorps monoclonaux dirigés contre les norovirus sont-ils bloquant ? Est-ce que l'administration de ces anticorps peut constituer une option thérapeutique ?*

Afin de pouvoir répondre à ces questions, nous travaillerons en partenariat avec les services d'hématologie, de greffés (hépatologie/néphrologie) et de cancérologie digestive au sein du CHU de Dijon et du Centre de Cancérologie GF LECLERC.

- i) au préalable, nous prélèverons un échantillon de salive de chacun des patients hospitalisés et infectés chroniques par le norovirus qui seront inclus dans l'étude et nous effectuerons un typage pour déterminer quel est le statut sécréteur/non-sécréteur et quels sont les HBGA exprimés. Nous effectuerons également un génotypage pour déterminer le groupe sanguin et rechercher des mutations sur le gène *FUT2*.*
- ii) nous effectuerons un suivi virologique des diarrhées chez ces patients en prélevant des échantillons de selles ou de vomissures lors de chaque épisode diarrhéique ou des épisodes de vomissements pouvant être imputés aux norovirus. Nous quantifierons par PCR en temps réel la charge virale dans les prélèvements puis nous procéderons au séquençage complet du génome viral. Pour un même patient, nous ferons une analyse approfondie et comparative de tous les clones séquencés afin de déterminer la présence de mutations susceptibles d'être impliquées dans la chronicisation de l'infection et/ou*

mettant en évidence une vitesse plus importante des dérives génétique et/ou antigénique, et éventuellement un changement de profil d'attache aux HBGA.

iii) nous effectuerons des tests de blocage d'attachement de VLP de norovirus sur les salives à l'aide de nos anticorps monoclonaux afin de déterminer si l'utilisation d'anticorps spécifiques peut constituer la base d'un traitement chez ces patients.

L'ensemble du projet devrait permettre d'améliorer nos connaissances sur les interactions des norovirus avec des hôtes fragilisés et potentiellement aider à la prise en charge clinique et thérapeutique de ces patients.

Publications connexes

Publication internationale

A de Rougemont, N Ruvoën-Clouet, B Simon, M Estienney, C Elie-Caille, S Aho, P Pothier, J Le Pendu, W. Boireau, G Belliot*. Qualitative and quantitative analysis of the binding of the GI.4 norovirus variants onto human blood group antigens. *J Virol*, 2011; 85(9): xxxx-xx.

Publications nationales

T Lecarpentier, A Benezit, A Marostica, JF Brasme, C Vallet, M Chalumeau, P Lebon, K Ambert-Balay, **A de Rougemont**, P Pothier, D Gendrel*. Epidémies parisiennes de gastroentérites à norovirus. *Archives de Pédiatrie*, 2010 ; 17 (11): 1522-6.

A de Rougemont, K Ambert-Balay, G Belliot, P Pothier*. Actualités sur les norovirus. *Med Sci*, 2010 ; 26(1):73-8.

A de Rougemont, K Ambert-Balay, G Belliot, SL Aho Glele, P Pothier*. Actualité des gastroentérites virales en établissement de soins et d'hébergement. *HygièneS*, 2008 ; XVI(6): 451-6.

Communications internationales

A de Rougemont, N Ruvoën-Clouet, B Simon, M Estienney, C Elie-Caille, S Aho, P Pothier, J Le Pendu*, W. Boireau, G Belliot*. Qualitative and quantitative analysis of the binding of the GI.4 norovirus variants onto human blood group antigens. *4th International Conference on caliciviruses, Santa Cruz (Chile), October 2010. Présentation orale.*

B Simon, **A de Rougemont**, C Elie-Caille, A Rouleau, P Pothier, G Belliot, W Boireau*. On-chip screening of noroviruses using histo-blood group antigens surfaces. *11th World Congress on Biosensors, Glasgow (United Kingdom), May 2010. Affiche.*

Communications nationales

A de Rougemont, N Ruvoën-Clouet, B Simon, M Estienney, C Elie-Caille, S Aho, P Pothier, J Le Pendu*, W. Boireau, G Belliot*. **Analyse qualitative et quantitative de l'interaction entre des variants successifs de norovirus GI.4 et les antigènes tissulaires de groupe sanguin humains A, B, H et Lewis.** *30^{ème} Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse (RICAI), Paris, décembre 2010. Présentation orale.*

B Simon, **A de Rougemont**, C Elie-Caille, A Rouleau, P Pothier, G Belliot, W Boireau*. On-chip screening of noroviruses using histo-blood group antigens surfaces. *1^{ère} Rencontres Françaises Biacore & MicroCal, Paris, juillet 2010. Affiche commentée.*

Qualitative and Quantitative Analysis of the Binding of GII.4 Norovirus Variants onto Human Blood Group Antigens[∇]

A. de Rougemont,¹ N. Ruvoen-Clouet,^{2,5} B. Simon,³ M. Estienney,¹ C. Elie-Caille,³ S. Aho,⁴ P. Pothier,¹ J. Le Pendu,² W. Boireau,³ and G. Belliot^{1*}

National Reference Center for Enteric Viruses, Public Hospital, Dijon, France¹; INSERM, U892, University of Nantes, Nantes, France²; FEMTO-ST Institute, University of Franche-Comté, Besançon, France³; Epidemiology and Infection Control Unit, Public Hospital of Dijon, Dijon, France⁴; and Nantes-Atlantic National College of Veterinary Medicine, Food Science and Engineering, Nantes, France⁵

Received 30 September 2010/Accepted 10 February 2011

Noroviruses (NoVs) are one of the leading causes of gastroenteritis in children and adults. For the last 2 decades, genogroup II genotype 4 (GII.4) NoVs have been circulating worldwide. GII.4 NoVs can be divided into variants, and since 2002 they have circulated in the population before being replaced every 2 or 3 years, which raises questions about the role of their histo-blood group antigen (HBGA) ligands in their evolution. To shed light on these questions, we performed an analysis of the interaction between representative GII.4 variants and HBGAs, and we determined the role of selected amino acids in the binding profiles. By mutagenesis, we showed that there was a strict structural requirement for the amino acids, directly implicated in interactions with HBGAs. However, the ablation of the threonine residue at position 395 (Δ T395), an epidemiological feature of the post-2002 variants, was not deleterious to the binding of the virus-like particle (VLP) to the H antigen, while binding to A and B antigens was severely hampered. Nevertheless, the Δ T395 VLPs gained the capacity to bind to the Lewis x and sialyl-Lewis x antigens in comparison with the wild-type VLP, demonstrating that amino acid residues outside the HBGA binding site can modify the binding properties of NoVs. We also analyzed the attachment of baculovirus-expressed VLPs from six variants (Bristol, US95/96, Hunter, Yerseke, Den Haag, and Osaka) that were isolated from 1987 to 2007 to phenotyped saliva samples and synthetic HBGAs. We showed that the six variants could all attach to saliva of secretors irrespective of the ABO phenotype and to oligosaccharides characteristic of the secretor phenotype. Interestingly, Den Haag and Osaka variants additionally bound to carbohydrates present in the saliva of Lewis-positive nonsecretors. The carbohydrate binding profile and the genetic and mutagenesis analysis suggested that GII.4 binding to Lewis x and sialyl-Lewis x antigens might be a by-product of the genetic variation of the amino acids located in the vicinity of the binding site. Analysis of the binding properties for the six variants by surface plasmon resonance showed that only post-2002 variants (i.e., Hunter, Yerseke, Den Haag, and Osaka) presented strong binding to A and B antigens, suggesting that the GII.4 evolution could be related to an increased affinity for HBGAs for the post-2002 variants. The combination of increased affinity for ABH antigens and of a newly acquired ability to recognize glycans from Lewis-positive nonsecretors could have contributed to the epidemiological importance of strains such as the Den Haag GII.4 subtype.

Noroviruses (NoVs) constitute one of the five genera of the *Caliciviridae*. They are divided into five genogroups (GI to GV) (14), and human NoVs belong to genogroups I, II, and IV. Genogroups I and II are divided into 8 (GI.1 to GI.8) and 17 (GII.1 to GII.17, excluding GII.11) genotypes, respectively (51). Norovirus outbreaks have been reported worldwide, in people of all ages, and in all ethnic groups. With the improvement in the molecular tools used for the detection of NoVs, laboratory networks set up in Europe and North America showed that genogroup II NoVs belonging to genotype 4 (GII.4) are by far the most predominant NoV genotype. The phylogenetic analysis of the circulating GII.4 isolates for the

last 20 years showed that the GII.4 genogroup can be divided into distinct subgroups or variants. Moreover, several authors noticed that the evolutionary rate of the GII.4 strains has accelerated during the last 10 years, and the occurrence of new variants has increased since the appearance of the Farmington variants in 2002. The main feature of these variants is an additional amino acid residue inserted after residue 394, which is located in the hypervariable region of VP1 (12). Epidemiological data and a molecular survey of the NoVs circulating throughout the world showed that until now the insertion, a threonine for most of the variants, was conserved among the GII.4 NoVs (2). Before 2000, the US95/96 variants, which succeeded the Bristol variants and the archival CHDC-like strains (where CHDC refers to Children's Hospital National Medical Center, Washington, DC), were the first NoVs to be classified as pandemic (5). The US95/96 variants were then replaced by the Farmington variants. Since the emergence of the Farmington strain, new variants have been detected worldwide (i.e., Hunter, Yerseke, Den Haag, and, most recently,

* Corresponding author. Mailing address: Centre National de Référence des Virus Entériques, Plateau Technique de Biologie, CHU Dijon, 2 rue Angélique Ducoudray, BP37013, 21070 Dijon Cedex, France. Phone: 33 3 80 29 31 71. Fax: 33 3 80 29 36 04. E-mail: gael.belliot@u-bourgogne.fr.

[∇] Published ahead of print on 23 February 2011.

Apeldoorn) or locally (i.e., Chiba and Osaka), and some of these became predominant for a period of 2 to 3 years before being replaced by a new predominant variant.

The virion is nonenveloped, and the 34-nm capsid is composed of 180 monomeric protein units, comprising VP1 (also called VP1₁₈₀), which are organized into 90 dimers. Each VP1 protein can be divided into three domains: N, S, and P. N and S domains are internal and contribute to the architecture of the viral particle; they also interact with viral genomic RNA (35). The external P domain is subdivided into two domains, P1 and P2. In the absence of cell culture for human NoVs, the baculovirus-expressed VP1 protein and the bacterially expressed P domain, which can form virus-like particles (VLP) and P particles, respectively (19, 48), have provided useful molecular tools for the study of the attachment of the NoV to human blood group antigen (HBGA) ligands (A, B, H, and Lewis antigen) (16, 25, 28, 44, 45), which are present in body fluids (e.g., saliva) and epithelial cells, like those in the epithelial tract (27). The structural analysis by X-ray crystallography of the P particles from the GI.1 Norwalk strain and GII.4 VA387 strains bound to A and B trisaccharides revealed the presence of two symmetrical binding pockets located at the interface between the two monomers that compose the dimer unit of the capsid for GII NoV, while for GI NoV each binding pocket lies entirely on the monomer (8, 10). Other mutagenesis studies, which were based upon the results of the structural analysis, confirmed the importance of the amino acid residues implicated in the carbohydrate binding site or its surrounding on ligand recognition (49). Using saliva binding assays, GI and GII human NoVs could be divided into five ABH-related (saliva from secretor individuals) and three Lewis-related (saliva from nonsecretor individuals) binding profiles, as reviewed previously (49).

Human challenge studies showed there was a direct link between the presence of HBGAs in the gut of secretor individuals and the NoV infection (18, 24). Histological studies of human intestine biopsy specimens clearly showed binding of Norwalk virus VLPs to H antigen expressed at the surface of epithelial cells. Additionally, transfection experiments showed that the binding of VLPs was dependent of an active *FUT2* gene, which encodes the α 1,2-fucosyltransferase in the small intestine and defines the secretor status (28). For 20% of the Caucasian population defined as nonsecretors, the presence of a nonsense mutation in the *FUT2* gene (G428A) completely abrogates expression of *FUT2*-dependent HBGAs (i.e., A, B, H, Lewis b, and Lewis y antigens) (22). Of note, for nonsecretor individuals, Lewis a and x antigens might be detected in saliva or intestinal cells, provided that the *FUT3* and/or *FUT5* gene is functional.

It has been suggested that a broader binding profile to HBGAs and a higher evolution rate might explain why GII.4 NoVs now predominate over NoVs from other genogroups (6, 46). However, little is known about the mechanisms that cause GII.4 variants to circulate for a couple of years before disappearing from the community. It has been hypothesized that genetic drift of the capsid allows GII.4 NoVs to escape herd immunity and modulates their binding capabilities (13).

We performed a qualitative analysis of the binding capabilities of the VLPs derived from six GII.4 variants that were present over a 20-year period. The analysis was based on bind-

TABLE 1. List of the GII.4 isolates used in this study

Isolate name (n)	GenBank accession no.	Setting (year)	Variant ^a
MD145 (15)	AY032605	Nursing home (1987)	Bristol
Dijon171 (34)	AF472623	Community (1996)	US95/96 (1996)
E1057 (20)	EU876890	Retirement home (2005)	Hunter (2004)
Cairo7 (20)	EU876887	Children's hospital (2006)	Yerseke (2006a)
Cairo1 (20)	EU876892	Children's hospital (2006)	Den Haag (2006b)
Cairo4 (20)	EU876884	Children's hospital (2006)	Osaka (2007)

^a Recombinant VLPs were named after the corresponding variants following previously proposed terminology (52). The alternative nomenclature is indicated in parentheses (40).

ing experiments on phenotyped saliva and a panel of synthetic carbohydrates. The study includes the analysis of amino acid residues from the binding pocket that contribute to the recognition of HBGAs. In addition, using modified VLPs, we evaluated the biological importance of the newly inserted threonine residue, which is a key epidemiological and genetic feature of the new GII.4 NoVs. Finally, we analyzed the quantitative aspect of the attachment of the panel of VLPs to A, B, and H antigens using surface plasmon resonance (SPR) technology.

MATERIALS AND METHODS

NoV isolates. The NoV strains used for this study were isolated from patients suffering from gastroenteritis in France (i.e., Dijon171 and E1057 strains were US95/96 and Hunter GII.4 variants, respectively), Egypt (i.e., Cairo7, Cairo1, and Cairo4 isolates belonged to the Yerseke, Den Haag, and Osaka GII.4 variants, respectively), and the United States (i.e., the MD145 strain was representative of the Bristol variant), as documented previously (15, 20, 21, 34) (Table 1).

Cloning strategy and recombinant baculovirus. The primers used during the study were obtained from Eurogentec (Seraing, Belgium). Primers FW2, RT2, and RT5 have been described previously (20). For the Hunter variant and the Egyptian isolates, the cloning of the complete open reading frame 2 (ORF2) into the plasmid pGEM-T Easy has been documented previously (20). The ORF2 fragment was amplified using ORF2 pGEM-based constructs as the template with the forward primer 5'-GAAGATCTATGAAGATGGCGTCGAATGACG C-3', containing a *Bgl*II restriction site at the 5' end (underlined), and the reverse primer RT5 corresponding to the 5' end of ORF3, described previously (20). The amplified fragment was gel purified and cloned into pGEM-T Easy vector prior to digestion with *Bgl*II and *Not*I restriction enzymes. The insert with an engineered *Bgl*II site was then gel purified and ligated into transfer vector pVL1392 (Pharmingen). The ligation mixture was used to transform JM109 competent cells (Promega). Positive clones were screened by PCR with primers FW2 and RT2 that were located in the conserved part of ORF2 (20). For the selected positive clones, the nucleotide sequence of the entire ORF2 was determined for the detection of any inadvertent mutation.

The recombinant baculovirus was obtained by cotransfection of the pVL transfer vector and the linearized baculovirus genome into Sf9 cells following the manufacturer's recommendations (Pharmingen). The recombinant baculovirus was plaque purified, and baculovirus clones expressing large amounts of VLPs were selected by using an immunoassay from RD-Biopharm (Saint-Didier au Mont d'Or, France). Titers of the recombinant baculovirus seeds were determined by plaque assay, and a high-titer viral stock was produced by infecting Sf9 cells at a low multiplicity of infection ([MOI] i.e., below 0.2).

The Dijon171 recombinant baculovirus has been documented previously (34). The MD145 baculovirus was a kind gift of Kim Green (NIAID, NIH, Bethesda, MD). Here, the recombinant VLPs of the GII.4 NoVs will be named after the variants to which the isolates belong (Table 1).

Mutagenesis of the Hunter transfer vector. The transfer vector corresponding to ORF2 of the Hunter variant (E1057 isolate) was used as the template for site-directed mutagenesis. Site-directed mutagenesis of the Hunter construct was performed with a QuikChange mutagenesis kit (Stratagene) to replace (mutagenized Hunter VLPs: S343A, T344A R345Q, D373N, S442A, G443A, and Y444F) and delete [mutagenized Hunter VLPs: Δ S343, Δ (T344A R345Q),

ΔD373, ΔS442, ΔG443, and ΔY444] the amino acid residues that are involved in the binding of the α-fucose ring of the HBGAs (Fig. 1A). The threonine residue at position 395 corresponding to the inserted amino acid of the post-2002 GII.4 isolates was also deleted to produce the recombinant ΔT395-Hunter baculovirus. The ORF2-mutagenized pVL constructs used in this study and the primers used for the mutagenesis are summarized in Table 2. Presence of the mutation was confirmed by sequencing of the complete ORF2 before production of the recombinant baculovirus as described above.

Production and purification of the virus-like particles. The VLPs were produced by infecting High-Five cells (Invitrogen) at a high MOI in serum-free Express Five medium (Invitrogen). The VLPs were concentrated and purified from the cell medium at the sixth day postinfection as described previously (3). The purified VLPs were resuspended overnight at 4°C in TNC buffer (10 mM Tris, 140 mM NaCl, 10 mM CaCl₂, pH 7.4) containing 20 μg/ml leupeptin (Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France). The purified VLPs were quantified using a bicinchoninic acid protein assay kit from Pierce (Perbio Science, Bezons, France), diluted to 1 mg/ml to prevent precipitation, and stored at 4°C or divided into aliquots in 10-μl vials and stored at -40°C for short- or long-term storage, respectively (Fig. 1B). Up to 4 μg of protein mixture was resolved by SDS-PAGE in a 4 to 12% Bis-Tris polyacrylamide (PAA) gel (Invitrogen). Proteins were visualized by staining with Coomassie blue (Pierce).

Saliva typing for carbohydrates and genotyping for the secretor phenotype. Forty-six samples of saliva and swabs of buccal epithelial cells were collected from healthy individuals. The study was approved by the Nantes University Hospital Review Board (study number BRD02/2-P), and informed consent was obtained from all the donors. The saliva samples were typed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the presence of A, B, and O blood group antigens and Lewis antigens as described previously (26). Genetic material was extracted from swab samples; *FUT2* genotyping (e.g., secretor status) was performed by PCR as described previously (26). ABO phenotyping was performed by classical hemagglutination and confirmed by ELISA on saliva samples from secretor individuals.

Binding assay of the VLPs on saliva. For the saliva analysis, an ELISA was performed as described previously except that 1,000-fold dilutions of saliva and 500 ng of purified VLPs per assay were used (28). Additionally, the GII.4-bound VLPs were detected by a GII.4-specific in-house monoclonal antibody incubated for 1 h at room temperature. Peroxidase-conjugated anti-mouse antibodies (Vector/ABCYS, Paris, France) were incubated for 30 min at 37°C. Peroxidase activity was detected with 3,3',5,5'-tetramethyl benzidine (KPL/Eurobio, Courtaboeuf, France). The reaction was stopped after an 8-min incubation at room temperature with 2N HCl prior to reading the absorbance at 450 nm. The background was arbitrarily fixed at an optical density (OD) of 0.2 and was subtracted from each OD value.

A panel of saliva samples from secretor and nonsecretor individuals was treated with 10 mM NaIO₄. The ELISA plates were first coated with 1,000-fold dilutions of saliva boiled in carbonate/bicarbonate buffer, pH 9.6, and left overnight at 37°C. After the plates were washed three times with phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.4, 100 μl of 10 mM NaIO₄ diluted in 50 mM CH₃COONa, pH 5, was added to each well and incubated for 30 min at room temperature. The wells were washed three times with PBS, and the ELISA was continued as described above.

Binding assay of the VLPs on synthetic carbohydrates. The human serum albumin (HSA)- and bovine serum albumin (BSA)-conjugated carbohydrates were purchased from Isosep AB (Uppsala, Sweden) and Dextra laboratories (Reading, United Kingdom), respectively. The HSA and BSA carbohydrates were provided with an average of 17 and 20 carbohydrate moieties per protein, respectively (Table 3). The glycoconjugates that were used during the study are listed in Table 3. The ELISA was performed as described previously. Briefly, glycoconjugates were diluted in pH 9.6 carbonate/bicarbonate buffer at a concentration of 1 μg/well (unless otherwise indicated), coated onto Immulon Maxi-Sorp plates (Nunc), and left overnight at 37°C. The plates were washed three times with PBS-0.05% Tween prior to incubating 500 ng/well of purified VLPs at 37°C (i.e., HSA or BSA glycoconjugates) for 4 h. The method used to detect the bound VLPs by the monoclonal antibody was similar to that described above.

Analysis of the VLP binding on carbohydrates by SPR. The binding of purified VLPs to lacto-*N*-fucopentaose I (LNFP-I) and to A and B trisaccharides conjugated to BSA (Dextra Laboratories) (Table 3) was analyzed by surface plasmon resonance at 25°C with a Biacore 2000 instrument (GE Healthcare). The home-made gold chips for SPR were designed and fabricated as described previously (4). The chemical functionalization was obtained by using a mixture of 11-mercapto-1-undecanol (11-MUOH) and 16-mercapto-1-hexadecanoic acid (16-MHA) (Sigma-Aldrich). The mixture of 11-MUOH-16-MHA (97/3, by mole) at 1 mM in absolute ethanol was sonicated for 10 min using an Elma sonicator

(power, 90W; frequency, 50/60 Hz). The chip was rinsed with ultrapure water. Then, the carboxyl groups were activated using *N*-hydroxysuccinimide (NHS) at 50 mM and *N*-ethyl-*N'*-(3-dimethyl aminopropyl)-carbodiimide hydrochloride (EDC) at 240 mM (Amine Coupling Kit; Biacore AB, Uppsala, Sweden) directly with the help of the Biacore's fluidic cartridge at 2 μl/min for 14 min. This procedure prepares the chips for the immobilization step. In this way, covalent immobilization of the three glycoconjugates was obtained in three separate lanes on the same chip, allowing the simultaneous analysis of the same VLP preparation on three different synthetic carbohydrates, with the fourth line being reserved as a control surface. For each glycoconjugate, 300 to 370 resonance units (RU) corresponding to 86 to 92.5 fmole/mm² were linked on the sensor chip. VLPs were diluted in running HBS buffer (0.01 M HEPES, 0.15 M NaCl, 3 mM EDTA, and 0.005% surfactant P20 at pH 7.4) provided by the company and were injected for 120 s at a flow rate of 10 μl/min and a concentration of 2 ng/μl. The injection was stopped, and the dissociation was observed in running buffer for 120 s. The chip was recycled by the injection of 5 μl at 10 μl/min of 10 mM Gly solution at pH 2.5 prior to new analysis. The experimental chips were stored in a humid atmosphere at 4°C after use.

AFM. For atomic force microscopy (AFM) imaging of the VLPs, the different samples were used at around 1 mg/ml. Twenty-five microliters of the sample was adsorbed on freshly cleaved mica for 30 min and washed three times with HBS buffer to remove nonadsorbed VLPs. The AFM experiment was carried out with a Nanoscope III instrument from Veeco (Santa Barbara, CA). Imaging was performed in contact and oscillating contact modes (TappingMode) using NP-S (for nitride probe, sharpened) oxide-sharpened silicon nitride probes (Veeco) with spring constants of 0.32 N/m or 0.58 N/m and resonance frequencies ranging from 8.5 to 9.5 kHz. For the feedback controls, typical values of set points for imaging were between 0.5 and 1.5 V, depending on the scan size and drive amplitude in the oscillating contact mode. The oscillation amplitude was generally maintained at 5 to 10 nm away from the surface. For each variant, the mean diameter of the VLP was determined from the diameter of 30 globular VLPs.

MST of the ORF2 amino acid sequences. To study evolution between strains, a minimum spanning tree (MST) was constructed using the default setting from the Bionumerics package (Applied Maths BVBA, Sint-Martens-Latem, Belgium) as described previously (20). The MST was based upon 496 complete available ORF2 amino acid sequences of the GII.4 from GenBank corresponding to Bristol, US95/96, Farmington, Hunter, Chiba, Yerseke, Den Haag, Apeldoorn, and Osaka variants.

Statistical analysis. The statistical analyses were performed with StataCorp statistical software (StataCorp LP, College Station, TX). For the saliva testing, a Kruskal-Wallis test was used to determine whether VLP binding to typed saliva samples was different for each variant, and US95/96 VLP was used as the standard for comparison. An analysis of variance (ANOVA) test was used for paired comparison of nonsecretor saliva. To study the relative affinity of the VLPs for the A, B, and H antigens, fractional polynomials were used to model the VLP-ligand interaction by linear regression. The same statistical model was also used to determine whether the changes observed in the binding profile of the Y444F and ΔT395 VLPs for the ABO antigens were statistically significant compared with binding of the wild-type (wt) Hunter VLPs.

RESULTS

Production and purification of the virus-like particles. The VLPs were purified from 4×10^8 to 6×10^8 infected cells and yielded 1 to 10 mg of purified VLPs, depending on the recombinant baculovirus. The purified VLPs yielded a distinct band with a buoyant density of 1.31 g/ml in cesium chloride. The Y444F and T395 Hunter mutants were rather fragile in the cesium chloride gradient, and a discontinuous sucrose gradient was preferred for the purification step, as described previously (3). Following centrifugation, a wide band was observed at the interface between the 30 and 40% sucrose fractions. The protein analysis in polyacrylamide gel showed that VLPs were purified to greater than 90% homogeneity. The purified VLP fraction was composed of the VP1 protein at 57 kDa and a cleaved version at 54 kDa, as described previously (3) (Fig. 1B). The NoV origin of the doublet was confirmed by Western blotting using polyclonal serum raised against MD145 antigen (provided by Kim Green) (data not shown). The poor yield

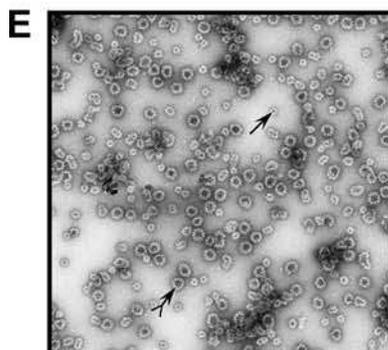
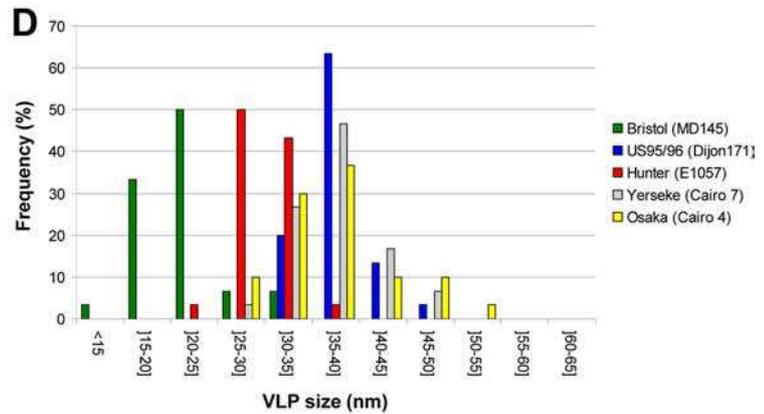
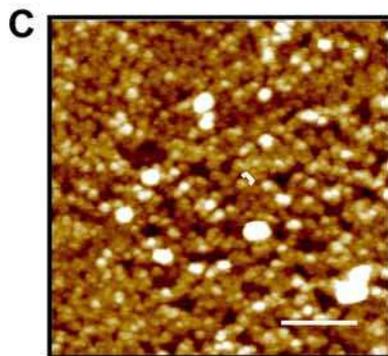
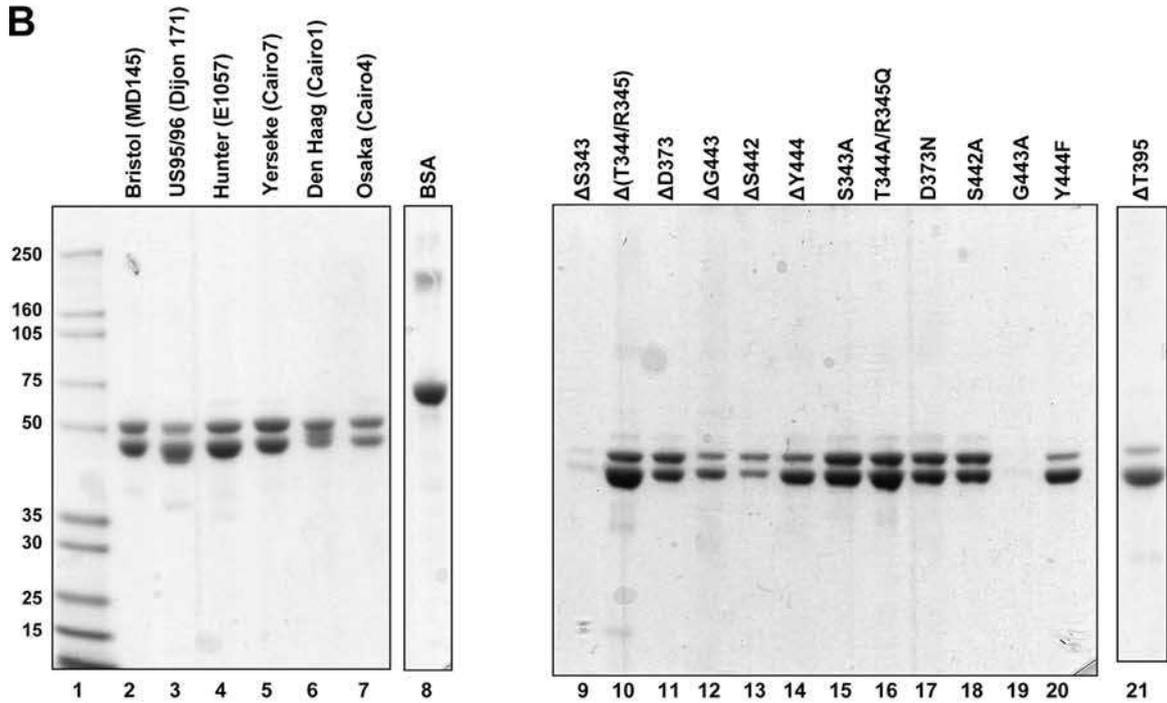
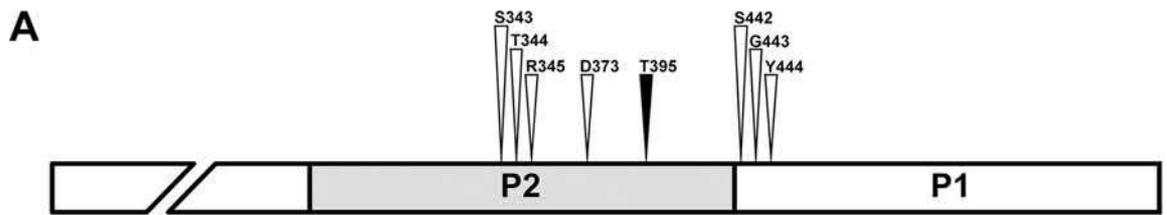


TABLE 2. Oligonucleotides used for the site-directed mutagenesis of the E1057 pVL vector (Hunter variant)

Mutation	Oligonucleotide sequence ^a
S343A	5'-GAGGATGCGCGACCCGTGTCCAC-3'
ΔS343	5'-GAGGATGC(TCG)ACCCGTGTCCAC-3'
T344A R345Q	5'-GAGGATGCTCGCCCAAGTCACAAAAGCCAC-3'
Δ(T344 R345)	5'-GAGGATGCTCG(ACCCGT)GTACAAAAGCCAC-3'
D373N	5'-CTGATACAAGCAATAACTTTGAAACTGCC-3'
ΔD373	5'-CTGATACAAGCAAT(GAC)TTTGAAGTCC-3'
ΔT395	5'-CAGATGTAGTACC(ACC)CACAAAATGAACCC-3'
S442A	5'-CTATGCCCGCTGCGCGGTATCCCAACATG-3'
ΔS442	5'-CTATGCCCGCTGC(AGC)GGTATCCCAACATG-3'
G443A	5'-GCCCGATGCAGCGGTATCCCAACTG-3'
ΔG443	5'-GCCCGATGCAGC(GG)TATCCCAACTG-3'
Y444F	5'-GATGCAGCGGTTTCCCAACATGAATTT-3'
ΔY444	5'-GATGCAGCGG(TAT)CCCAACATGAATTT-3'

^a Modified codons are underlined. Deleted codons are indicated in parentheses.

observed for the ΔS343 and G443A mutagenized VLPs suggests that the mutations of these amino acid residues made the recombinant VLPs unstable. Interestingly, unlike ΔS343, the S343A mutation was not detrimental to VLP production. In contrast, G443A hampered VLP production, whereas the deletion of G443 did not.

To control the integrity of the purified material, the size of each VLP was analyzed by AFM (Fig. 1C). The majority of the VLP preparations presented a globular particle with an average diameter ranging between 30 and 38 nm (US95/96, 37.2 ± 3.7 nm; Hunter, 29.6 ± 3.2 nm; Den Haag, 37.6 ± 4.8 nm; Osaka, 36.8 ± 6.2 nm) and corresponded to complete VLP (also called VP1₁₈₀) as described previously (Fig. 1D) (37). For the Bristol isolate, the VLPs were smaller, with diameters averaging 21.3 ± 4.7 nm, which suggests that they might have been subunit particles and might have been composed of 60 monomers (also called VP1₆₀) (3, 37). The observation by electron microscopy of the cesium chloride-purified VLPs from the Hunter variant showed that the preparation was essentially composed of full and empty particles of 35 nm in diameter (Fig. 1E). Of note, the Yerseke VLPs did not adsorb on the mica surface using HBS buffer. Because we used low-concentration protein solutions for the AFM experiments, the salt concentration might have been too high and may have inhibited protein adsorption onto the mica, as described previously (11).

Mutagenesis of the amino acids participating in the HBGA binding site. In previous studies, the amino acid residues participating in the attachment of the HBGA to the P1/P2 domains were characterized by crystallography, which showed that S343, T344, R345, D374, S441, G442, and Y443 residues of the GII.4 VA387 NoV strain (US95/96 variant) interacted

TABLE 3. Neoglycoconjugates used for the study

Carbohydrate moiety	Epitope	Carrier	Avg no. of sugar residues per carrier ^a
Lacto- <i>N</i> -fucopentaose I	H type 1	HSA BSA	25 20
2'-Fucosyllactosamine	H type 2	HSA	19
A heptasaccharide	A heptasaccharide	HSA	18
A trisaccharide	A trisaccharide	HSA BSA	19 19
B trisaccharide	B trisaccharide	HSA BSA	19 21
Lacto- <i>N</i> -difucohexaose I	Lewis b	HSA	8.5
Lacto- <i>N</i> -fucopentaose III	Lewis x	HSA	12
Lewis y-tetrasaccharide	Lewis y	HSA	15
Lacto- <i>N</i> -fucopentaose II	Lewis a	HSA	23
Sialyl-Lewis x-hexaose	Si-Lewis x	HSA	13
Sialyl(mono), monofucosyllacto- <i>N</i> -tetraose	Si-Lewis a	HSA	12
Sialyl-lacto- <i>N</i> -fucopentaose	Si-LNF ^b	HSA	19
Sialyl-lacto- <i>N</i> -tetraose	Si-LNT ^b	HSA	N/A
Lacto- <i>N</i> -tetraose c	LNT ^b	HSA	N/A
Lacto- <i>N</i> -neotetraose c	Si-LNnT ^c	HSA	N/A

^a HSA and BSA linkers were acetyl phenylenediamine and six-atom spacer, respectively. N/A: not applicable.

^b Possesses type 1 precursor motif.

^c Possesses type 2 precursor motif.

directly with the carbohydrate antigens (Fig. 1A). Of note, these residues are conserved for all the GII.4 variants, including the recently described Osaka and Apeldoorn variants (data not shown). Even though it has been demonstrated that a bacterially expressed P domain had a blood group antigen binding profile similar to that of the entire VLP (43), we used mutagenized VLPs to study the HBGA binding site because deletions or modifications of these residues might also be detrimental to the structure of the entire VLP and to their binding to some antigens. Moreover, it has been reported that VLP-HBGA complexes are usually more stable than the interaction between the P domain dimer and HBGA (8). We first deleted each amino acid and showed that most of the VLPs could be recovered after isopycnic centrifugation into a cesium chloride gradient, suggesting that modified VP1 protein could still assemble into VLPs. Nevertheless, the deletion of any residue completely abolished binding to the HBGA associated with either HSA or polyacrylamide (PAA) (data not shown). Our results confirmed that each residue was involved in the attachment of a wide spectrum of carbohydrates. We also performed site-directed mutagenesis of each of these amino acid residues, which were replaced by homologous amino acids (Table 2). All but the Y444F mutation completely abolished attachment of the HBGA glycoconjugates. A previous study showed that the aromatic ring of the Tyr residue interacted with the α-fucose

FIG. 1. Characterization of the purified VLPs of the GII.4 variants. (A) Drawing to scale of the amino acid residues (S343, T344, R345, D373, S442, G443, and Y444) from the α-fucose binding site (white arrowhead) (8, 49) and the inserted threonine residue, T395 (black arrowhead). The NH₂ terminus of the P1 domain is truncated. (B) SDS-PAGE analysis of the VLPs from the GII.4 variants (lanes 2 to 7) and the mutagenized Hunter VLPs (lanes 9 through 21). The name of the NoV strain is indicated in parentheses for each variant. The mutagenized VLPs originated from the Hunter variant (strain E1057), and the location of the amino acid residues is based upon the ORF2 amino acid sequence of the E1057 strain (GenBank accession number EU876890). Two micrograms of bovine serum albumin (Pierce) was added as a control for the protein estimation (lane 8). Lane 1 contains the protein molecular size markers that are indicated on the right side of the gel. (C) Atomic force microscopy imaging of the Hunter purified VLPs. The aggregates are shown in white. One of the VLPs is indicated by a bracket. Scale bar, 250 nm. (D) Size distribution of the VLPs as determined from atomic force microscopy imaging. The variant VLPs are color coded according to the legend on the right side of the graph. (E) Electron micrograph of the CsCl-purified Hunter VLPs after negative staining. Complete and subunit VLPs are indicated by arrows with and without a tail, respectively.

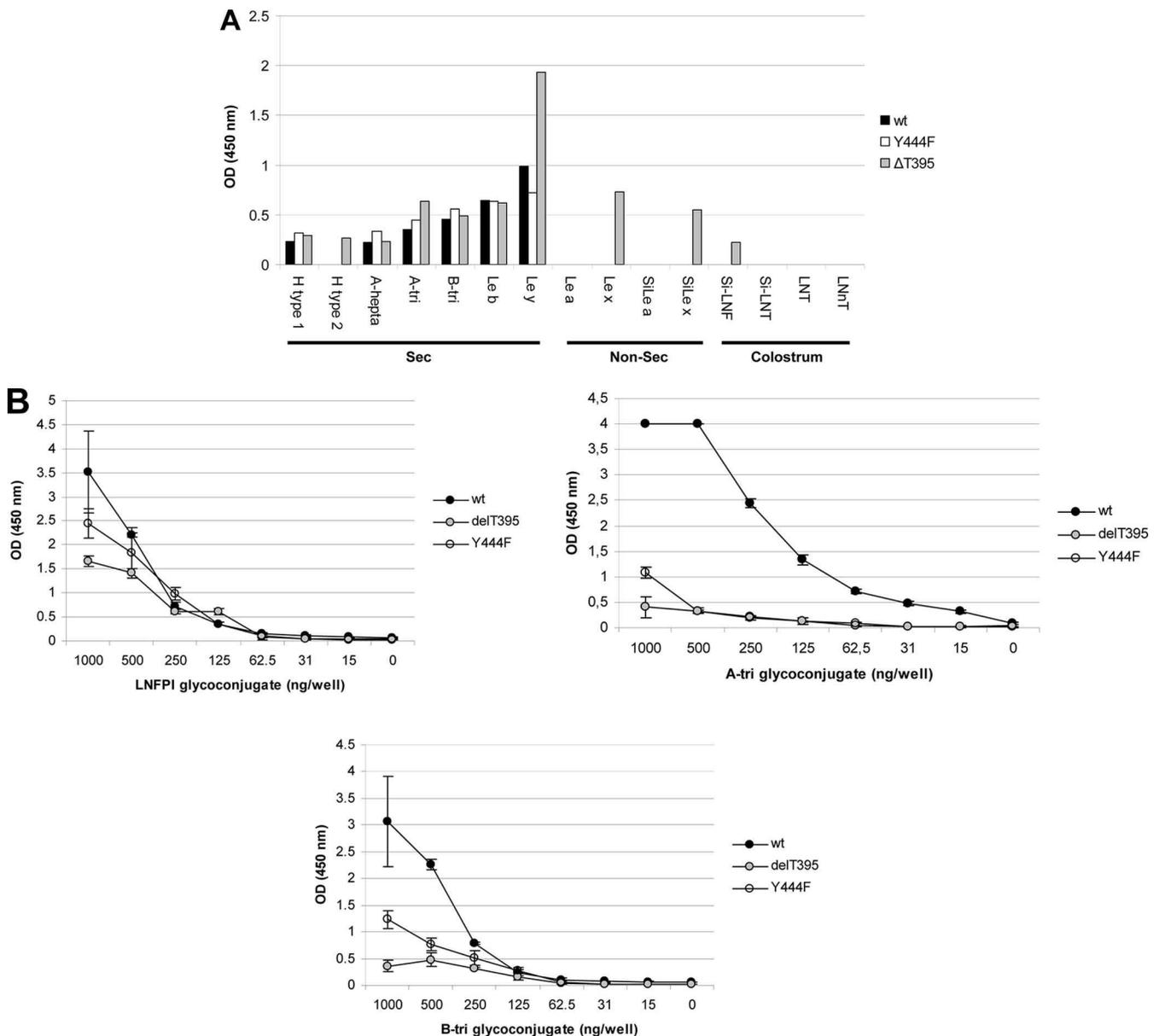


FIG. 2. Comparison of the binding of the mutagenized VLPs Y444F and Δ T395 with the wt Hunter VLPs. (A) The VLPs were tested in duplicate on a panel of HSA glycoconjugates, and the mean values are plotted on the graph. Ordinate and abscissa indicate the optical density at 450 nm (OD_{450}) and the nature of the glycoconjugate, respectively. The legend is at the right of the graph. (B) Relative binding of the Y444F, Δ T395, and wt Hunter VLPs for the LNFPI-I (H type 1 pentasaccharide) and A and B BSA conjugates. LNFPI-I and A and B trisaccharide conjugates were diluted 2-fold in carbonate/bicarbonate buffer, pH 9.6, from 10^3 to 0.15 μ g per well. The amount of coated neoglycoconjugate is indicated in nanograms per well (abscissa). For each variant and neoglycoconjugate, the mean results of triplicate binding experiments and standard deviations are shown (vertical bars). Binding values are given by the absorbance at 450 nm (ordinate). The glycoconjugate used for each assay is indicated on the graph (abscissa). A-tri, A trisaccharide; B-tri, B trisaccharide; Le, Lewis; Sec, secretor; Non-sec, nonsecretor.

ring of the H antigen through van der Waals interactions (8). Using HSA glycoconjugates, binding of the Y444F VLPs was observed for Lewis b and y antigens and for glycoconjugates carrying the B trisaccharides, H type 1, and A tri-, hexa-, and heptasaccharides (Fig. 2A). For the other antigens, binding was absent or residual (i.e., OD_{450} [OD₄₅₀] of <0.25). To determine whether the binding to A, B, and H blood group antigens was modified, wt and mutagenized Hunter VLPs were tested on serially diluted A trisaccharides, B trisaccharides,

and LNFPI-I-BSA glycoconjugates (Fig. 2B). The Hunter VLP was used as the standard for comparison for the statistical analysis using a fractional polynomial model. Given the similar numbers of carbohydrates that were attached to the BSA, it was possible to compare the VLPs' attachment patterns (Table 3). Binding of the mutagenized VLPs to A and B glycoconjugates was markedly lower than that observed for the wt Hunter VLPs ($P = 0.001$ for the A antigen). For the B antigen, the lower binding was not significant for Y444F VLPs ($P = 0.057$).

For the H antigen, although the binding we observed was slightly lower for the mutant VLPs, the difference was not significant ($P = 0.28$). In conclusion, our analysis confirms the importance of amino acids from the GII.4 binding site previously deduced from alanine mutagenesis of P domains from other strains. Moreover, our data clearly showed that replacing the tyrosine at position 444 by a phenylalanine did not alter recognition of the H type 1 epitope, confirming the lack of involvement of the tyrosine hydroxyl group in binding to this motif, although this mild structural modification was sufficient to modify the attachment profile of the Hunter isolate.

Role of the threonine residue at position 395. Since 2002, the new GII.4 NoV strains have been characterized by conserved mutations in their capsids and the insertion of one amino acid at position 395 in the hypervariable P2 domain of the capsid proteins (12). This additional amino acid, which is mostly a threonine residue, has been conserved for all the GII.4 strains ever since the emergence of the Farmington variants. Our goal was to determine whether the additional threonine residue had a biological function in the attachment to carbohydrates. The threonine residue was deleted from the Hunter VLPs. The purified VLPs were screened using the panel of HSA-linked glycans. The attachment profile of the mutated VLPs was similar to that observed for the wt Hunter VLPs except that recognition of the Lewis y antigen was significantly higher than for the wt VLPs (Fig. 2A). In addition, we observed that, unlike wt Hunter VLPs, $\Delta T395$ VLPs could attach to the H type 2, Lewis x, and sialyl-Lewis x motifs. Of note, the $\Delta T395$ VLPs were also assayed with PAA glycoconjugates, where a marked binding of the VLPs was also observed for Lewis b and y and also to Lewis x-PAA conjugate (data not shown).

The binding of $\Delta T395$ mutant VLPs to A and B glycoconjugates was markedly lower than that observed for the wt Hunter VLPs ($P = 0.001$ and $P = 0.003$ for the A and B antigens, respectively) but not for the H antigen ($P = 0.08$). Overall, our data suggest that deletion of the inserted threonine at position 395 induced qualitative (binding to Lewis x and sialyl-Lewis x antigens) and quantitative (decrease of binding to A and B epitopes) changes in the binding profile to HBGAs. Thus, deletion of the threonine residue suggests that the mutagenesis of amino acids that are not directly involved in the HBGA binding site can modify the attachment of NoVs to these carbohydrate ligands, as previously predicted by modeling the Farmington capsid (25).

Binding profile of the GII.4 variants. (i) Saliva binding assays. The mutational analysis showed that certain amino acids might trigger the suppression of VLP attachment to HBGAs and/or the modification of the binding profile. We then extended our investigation to a panel of six GII.4 variants that were first tested on phenotyped saliva from secretor ($n = 34$) and nonsecretor ($n = 12$) individuals representative of the ABO and Lewis phenotypes (Fig. 3). We observed binding of the six variants to the ABO saliva samples, irrespective of the presence of the Lewis antigens. However, the magnitude of the binding significantly varied according to the nature of the VLPs and the antigen present in the saliva ($P = 0.00001$, two-way ANOVA). For Bristol, US95/96, Hunter, and Yerseke, no binding was observed for nonsecretor saliva. Conversely, we observed strong binding to nonsecretor saliva for Den Haag

and Osaka variants. For the latter, the binding correlated with the presence of Lewis antigens ($P = 0.0001$, Kruskal-Wallis). The binding to Lewis-positive nonsecretor saliva was significantly higher for Den Haag than for Osaka ($P = 0.0104$, Kruskal-Wallis). This observation indicates that Den Haag and Osaka GII.4 variants are able to bind nonsecretor saliva through antigens synthesized by the FUT3 enzyme. Of note, the binding to nonsecretor saliva of the Den Haag and Osaka VLPs was abolished after sodium periodate treatment, showing the involvement of carbohydrates (data not shown).

(ii) Synthetic glycoconjugate binding assays. To determine precisely which antigens might be recognized by the NoV GII.4 VLPs, binding assays with the GII.4 variants were performed by ELISA using 15 HSA glycoconjugates (Table 3 and Fig. 4). Binding to H type 1 was observed for all the variants using HSA glycoconjugates. Inversely, we observed no binding to H type 2. For the A antigen, we used hepta- and trisaccharides conjugated to BSA. Weak binding was observed for the Hunter, Yerseke, Den Haag, and Osaka variants, using A tri- or heptasaccharide conjugates. No binding was observed for the Bristol variant, and US95/96 VLPs bound only to the heptasaccharide conjugate. Our data suggest that the position of the ligand on the carrier is essential for the efficient binding of VLPs. Binding of the Hunter, Yerseke, Den Haag, and Osaka VLPs to the B trisaccharide was observed, while there was no attachment of the Bristol and US95/96 variants. The fact that all variants efficiently bound to the H type 1 antigen and additionally that Bristol and US95/96 variants bound poorly to A and B trisaccharides was later confirmed by using trisaccharides linked to BSA (Fig. 5). For the Lewis-related carbohydrates, we observed efficient binding of the variants to Lewis b and Lewis y antigens, which can be found in the secretor population. Inversely, no binding was observed to the Lewis a antigen, which is found in large amounts in Lewis-positive nonsecretor individuals. The data for Lewis x antigen were different from those for Lewis a antigen. We observed that US95/96, Den Haag, and Osaka VLPs could efficiently bind the Lewis x antigen. It has recently been reported that sialyl-Lewis x antigen could attach the US95/96 variant (36). Despite the fact that the biological meaning of this finding remains unknown and the fact that sialyl-Lewis antigens are usually absent from the gut of healthy individuals (9, 23, 31), we further investigated the binding of the GII.4 variant on sialylated neoglycoconjugates (i.e., sialyl-Lewis x and sialyl-Lewis a). The sialyl-Lewis x antigen was strongly recognized by the Bristol and US95/96 VLPs and less well by the Osaka, Den Haag, and Hunter VLPs. These results indicate that the binding to sialylated structures is variant dependent, but they do not show a relationship with the ability of the Den Haag and Osaka VLPs to bind to Lewis-positive, nonsecretor saliva, suggesting that binding to salivary FUT3-dependent structures of nonsecretors requires recognition of more complex motifs than those represented by the neoglycoconjugates that were tested. Thus, we cannot exclude the possibility that the Lewis a antigen is involved in binding to nonsecretor saliva because binding to synthetic Lewis a carbohydrate was negative.

It was recently shown that ganglioside-linked sialic acid might act as a murine norovirus (MNV) docking molecule (50). However, in our study, no binding of the GII.4 variants was observed using synthetic sphingolipid (globoside) and the

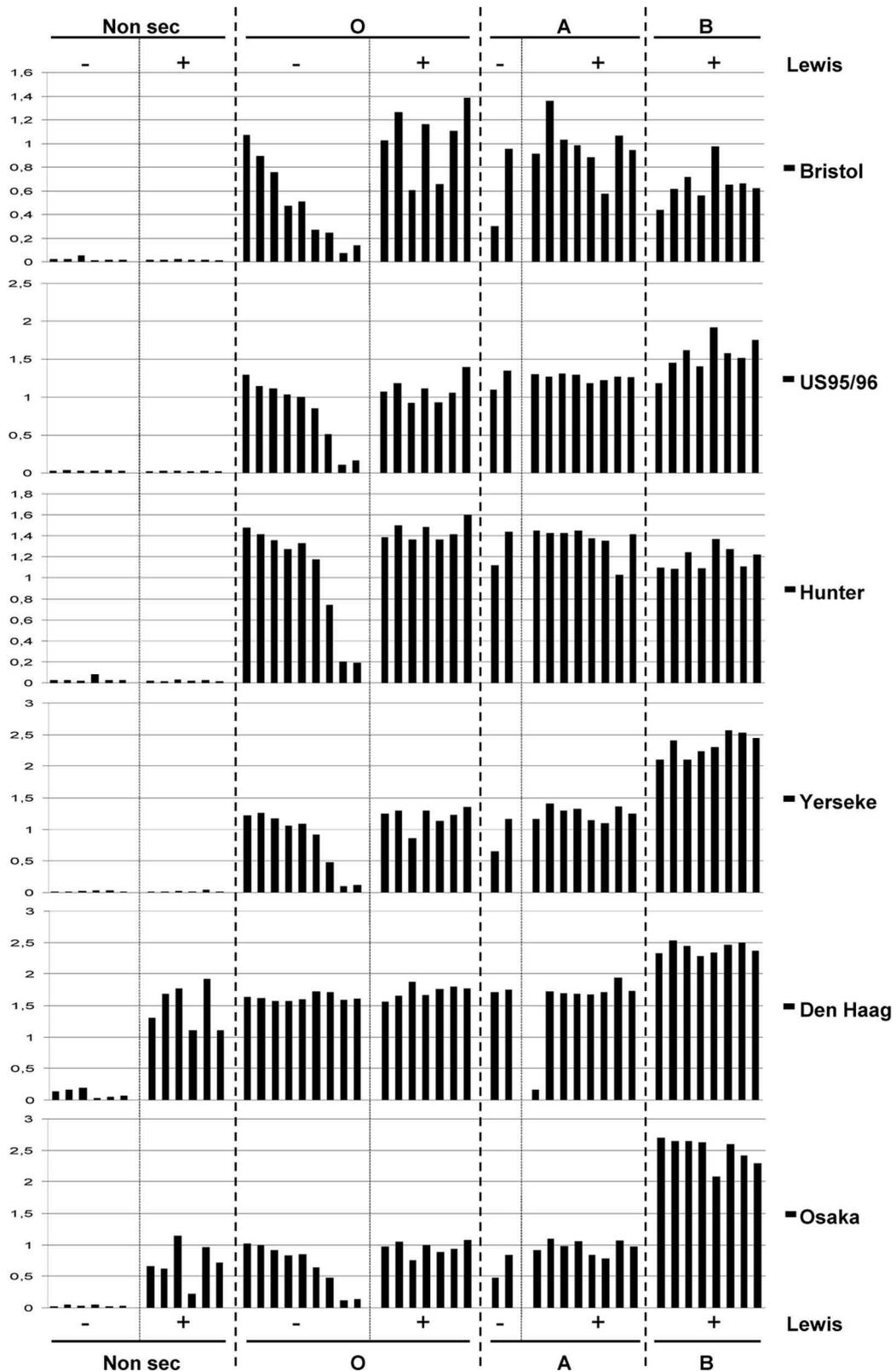


FIG. 3. Saliva binding assays of the GII.4 variants. The binding experiments were performed in duplicate for each sample, and the mean values are given on the graph (OD₄₅₀; ordinate). The Lewis status is indicated on the abscissa by minus (absence of Lewis antigen) and plus (presence of Lewis antigen) signs. The nonsecretor (non sec) and HBGAs are also indicated on the abscissa and are separated by dashed lines. The type of VLP is indicated on the right side of the graph.

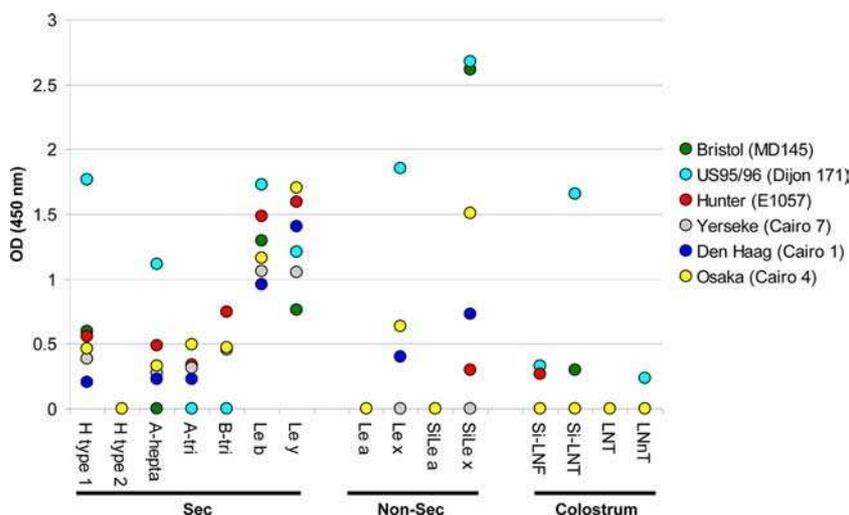


FIG. 4. Binding of the GII.4 variant VLPs to a panel of neoglycoconjugates. The binding experiments were performed in duplicate for each HSA glycoconjugate, and the mean values are plotted on the graph. Ordinate and abscissa indicate the OD at 450 nm and the nature and the origin of the oligosaccharide moiety, respectively. Details about the neoglycoconjugates are shown in Table 3. Variants are identified by the legend at right, with the name of the isolate in parentheses.

GM1 pentasaccharide (ganglioside containing one sialic acid residue) (data not shown). This preliminary data suggest that the receptor of human NoVs might be somewhat different from the MNV receptor. Lacto-*N*-tetraose (LNT), sialyl-lacto-*N*-tetraose (Si-LNT), and sialyl-lacto-*N*-neotetraose (Si-LNnT) as well as lacto-*N*-fucopentaose type I (LNFP-I; presenting the H determinant) are free oligosaccharides that are found in human milk and may function as decoy receptors of human bacterial pathogens (33). Lacto-*N*-tetraose, Si-LNT, and sialyl-lacto-*N*-fucopentaose (Si-LNF) present a disaccharide motif, which is similar to type 1 precursor (Galβ1-3GlcNAcβ). The Si-LNnT possesses a disaccharide motif, which is similar to type 2 precursor (Galβ1-4GlcNAcβ). Weak binding was observed for Hunter and Bristol VLPs on Si-LNF and Si-LNT glycoconjugates, respectively. US95/96 VLPs could attach Si-LNF, Si-LNT, and Si-LNnT; strong binding was observed for Si-LNT. These data suggest that type 1 and 2 precursor antigens are poorly recognized by most of the GII.4 NoVs (except for the US95/96 variants). The role of the sialic acid moiety in the binding of VLPs remains to be determined.

In summary, our data showed that all the GII.4 variants could attach secretor-related antigens (i.e., A, B, H, Lewis b, and Lewis y antigens). We also observed that Lewis x and sialyl-Lewis x antigens could be recognized in a strain-dependent manner unrelated to the saliva binding patterns.

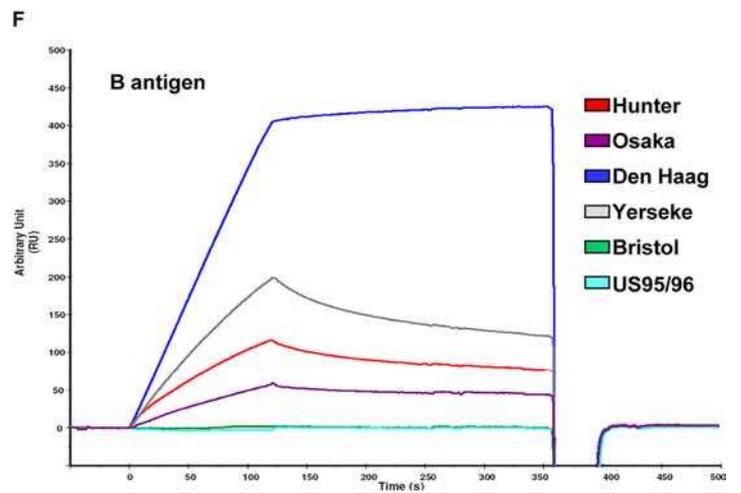
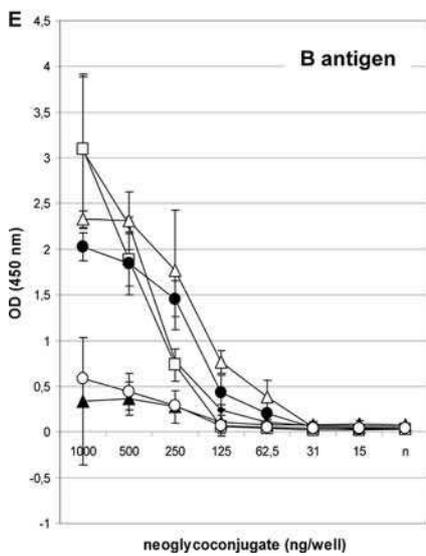
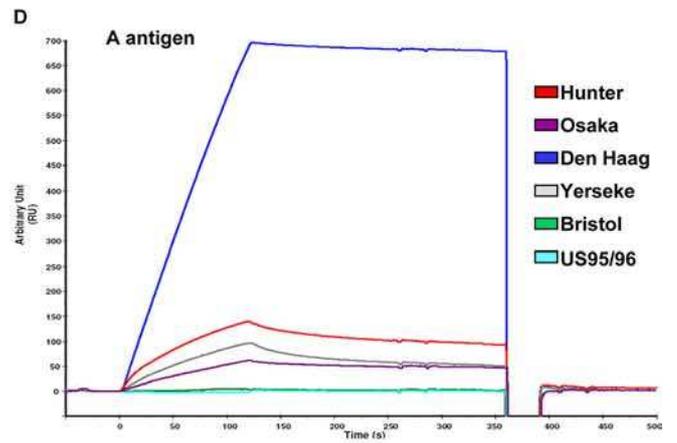
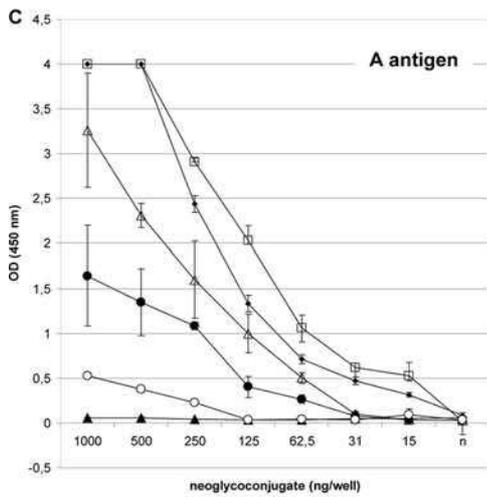
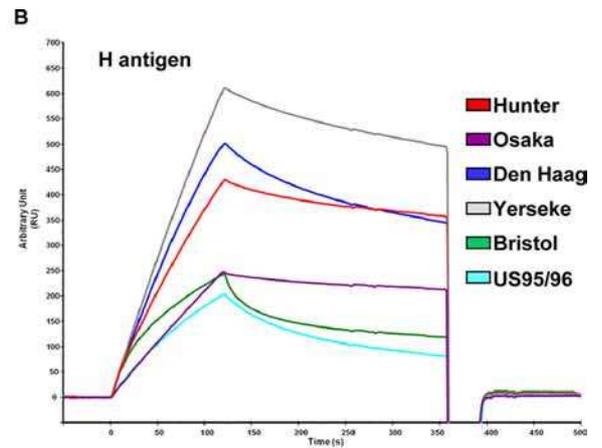
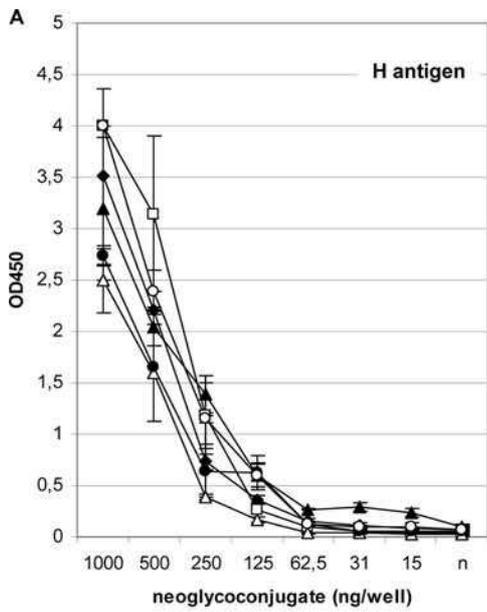
Relative affinity of GII.4 norovirus variants for A, B, and H blood group antigens. Two methods were used to determine whether the relative affinity to glycans was variant dependent. We analyzed VLP binding to ABO blood group antigens by enzyme immunoassay (EIA) and SPR. Our previous experiment showed that VLP binding to synthetic carbohydrates was lower than that to saliva. Because binding to A and B HSA glycoconjugates was somewhat lower than that observed for H type 1, Lewis b, and Lewis y synthetic antigens (Fig. 4), we used trisaccharidic A and B antigens linked to a six-atom spacer and BSA to study the relative affinity of the GII.4 variants. Preliminary experiments showed that binding was more efficient and suitable for SPR analysis using these glycoconjugates (data not shown). To avoid any discrepancy between glycoconjugates, the same VLP preparation was used throughout the experi-

TABLE 4. Summary of the binding properties of the GII.4 variants

Isolate	Binding on nonsecretor saliva by antigen ^a		Neoglycoconjugate binding by source and antigen ^b												
	Le ⁺	Le ⁻	Secretor						Nonsecretor				Colostrum		
			H (RU)	A (RU)	B (RU)	Lewis b	Lewis y	Lewis a	Lewis x	Si-Lewis a	Si-Lewis x	Si-LNF	Si-LNT	LNT	Si-LNnT
Bristol	-	-	227	3	2	+++	++	-	-	-	++++	+	+	-	-
US95/96	-	-	191	1	1	++++	++++	-	++++	-	++++	+	++++	-	+
Hunter	-	-	425	134	114	+++	++++	-	-	-	+	+	-	-	-
Yerseke	-	-	606	88	195	+++	+++	-	-	-	-	-	-	-	-
Den Haag	+	-	490	694	407	++	+++	-	+	-	++	-	-	-	-
Osaka	+	-	243	59	54	+++	++++	-	++	-	+++	-	-	-	-

^a VLP binding assay by ELISA. Le⁺, Lewis antigen positive; Le⁻, Lewis antigen negative.

^b VLP binding to ABO antigens was determined by SPR analysis. The results from ELISAs using neoglycoconjugates are indicated as follows: +, OD < 0.5; ++, 0.5 < OD < 1; +++, 1 < OD < 1.5; +++++, OD > 1.5.



ment using the three antigens, and the binding assays were performed in triplicate.

Overall, 95%, 77.6%, and 79.7% of the data fit the model for the H, A, and B antigens, respectively, using fractional polynomials. All of the GII.4 variants bound to the H antigen BSA glycoconjugates with similar dilution curves, and the detection limit was 62.5 ng/well of glycoconjugate. No statistical difference was observed with a P value above 0.05 for each type of VLP and the Hunter VLP used as the standard for comparison (Fig. 5A). Hunter and Osaka VLPs showed the highest binding for A antigen, followed by the Den Haag VLP, with a detection limit below 15 ng/well of glycoconjugate (Fig. 5C). No statistical difference was observed for the three variants. Conversely, the detection rate was lower for Yerseke, US95/96, and Bristol VLPs. The affinity of these three GII.4 variants for A antigen was statistically significantly lower than that of the Hunter VLP ($P \leq 0.001$). For B antigen, all but US95/96 and Bristol VLPs showed similar binding affinities ($P \geq 0.05$) (Fig. 5E). For US95/96 and Bristol variants, the signals were markedly lower, suggesting a lower relative affinity for B antigen. The difference was statistically significant ($P = 0.03$).

Surface plasmon resonance analysis. Because the SPR signal is proportional to the refractive index at the surface of the chip (in the first 150 nm from the surface), we empirically estimated the coverage of the chip by the BSA glycoconjugates, as described previously, with 1,000 response units, which corresponded to 1 ng/mm² of protein (41). For relevant comparison between glycoconjugates, equivalent amounts of glycoconjugates were coated on the chip. Seeing that the signal of the VLP-glycoconjugate interaction is mostly proportional to the mass of the VLP and that the signal intensity of the interaction is magnified by the large mass of the VLP, the dissociation constants (K_{on} and K_{off}) could not be accurately calculated since one VLP possesses 180 putative binding sites. Additionally, it was unclear how many HBGA molecules participated in the interaction. However, a relative binding affinity, based upon visual examination of the binding curves as reported previously, was estimated (32). Preliminary binding experiments by ELISA using Hunter VLPs and PBS and SPR-specific HBS buffer clearly showed that VLP binding with HBS buffer was as specific as that observed with PBS buffer (data not shown). Therefore, the HBS buffer was used for the SPR experiments. Preliminary assays using Hunter and Osaka VLPs suggested a concentration-dependent increase in the SPR response. Following treatment of the chip with NaIO₄, no binding was observed, indicating that the carbohydrate moiety of the glycoconjugate was involved in the VLP binding (data not shown). The sensorgram showed an increasing relative affinity for the H glycoconjugate in the following order: Yerseke > Den Haag = Hunter > Osaka > Bristol and US95/96 variants (Fig. 5B). The sensorgram showed an increasing relative affinity for the A and B glycoconjugates in the following order: Den

Haag \gg Hunter > Yerseke = Osaka and Den Haag \gg Yerseke > Hunter > Osaka (Fig. 5D and F, respectively). It is worth mentioning that no attachment was observed for US95/96 and Bristol variants, suggesting that neither of these two variants had detectable affinity for A and B carbohydrates although weak binding was detected by ELISA. For the dissociation curve, we observed that Den Haag and Osaka VLPs presented a marked stability for the three glycoconjugates, regardless of the VLP concentration during the injection. In contrast, the US95/96 and Bristol variants presented the lowest interaction with H antigen.

Minimum spanning tree of the ORF2 amino acid sequences.

To determine the minimum number of amino acid changes between strains, an MST was constructed based upon the 496 complete amino acid sequences of ORF2 available in the GenBank (Fig. 6). The MST was built with 872 amino acid changes. The lineages and variants found for the MST of this study matched those observed for neighbor-joining and Bayesian trees as described previously (2). The MST suggested that Yerseke and Den Haag variants might be directly related to the former Hunter and Farmington variants, respectively, as previously described (39). The tree showed that Hunter, Farmington, and Chiba variants might all be related to the US95/96 variants via the Lanzhou isolate. The Den Haag variants are directly related to the Farmington variants. The large number of Den Haag isolates ($n = 219$) revealed the clonal diversification within this group, which resulted in the emergence of the Apeldoorn and Osaka variants. In our previous study, the data suggested that Osaka variants might be equally distant from the US95/96 and the Chiba variants ($n = 23$) (20). This change in the tree topology might be explained by the lower number of Osaka sequences included for the construction of the MST from the earlier study and the absence, at the time, of sequences corresponding to the Apeldoorn variant.

DISCUSSION

The genetic survey of NoVs from outbreaks of gastroenteritis showed the epochal evolution of GII.4 NoVs over the last 2 decades to become the predominant strain (25, 39). However, since 2002 and the spread of the Farmington variants, laboratory networks have observed an increasing pace in the genetic drift, with the emergence of new GII.4 variants every 2 or 3 years (40). Thorough analysis of the attachment of NoVs belonging to several genotypes allowed the characterization of eight binding profiles (16, 17), which can be classified into the ABO and Lewis binding groups. GII.4 NoVs present the widest binding spectrum since they can attach efficiently to saliva from secretor ABO individuals (80% of the Caucasian population), as reviewed previously (47).

Because the biological meaning and the mechanisms by which new GII.4 variants have emerged every 2 or 3 years for

FIG. 5. Relative binding affinity of the GII.4 NoV variants for the LNFP-I (H type 1 pentasaccharide) and A and B BSA conjugates by ELISA (A, C, and E) and SPR (B, D, and F). The H antigen (A and B), A antigen (C and D), and B antigen (E and F) BSA conjugates used for the ELISA and SPR analysis originated from the same stock. The neoglycoconjugates are indicated above each graph. The ELISA binding assay was similar to that described for the Hunter mutated VLPs (Fig. 2B). For each variant and neoglycoconjugate, mean results of triplicate binding experiments and standard deviations are shown (vertical bars). Binding values are given by the absorbance at 450 nm (ordinate). For the SPR binding assay, the same VLP and neoglycoconjugate preparations were used as for the ELISA. The response (ordinate) is given in resonance units (RU). The sensorgrams are color coded as indicated on the graphs.

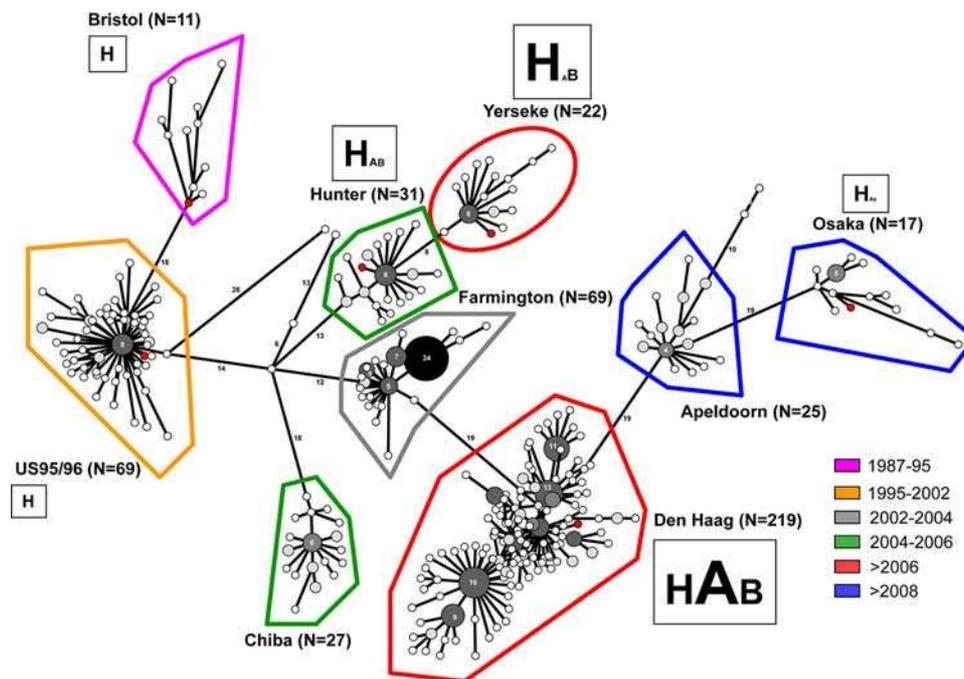


FIG. 6. MST of the GII.4 variants. The number of sequences for each group of variants is indicated in parentheses. Identical sequences are represented by gray-shaded circles, which are scaled according to member count. The white and light gray circles represent one and two sequences, respectively. For dark gray and black circles, the number of identical sequences is indicated inside each circle. The six GII.4 isolates, which were analyzed during the study, are indicated by red circles. Each group of variants is color coded according to the date of circulation, as described previously (2). For the six variants that were analyzed, the binding profile to secretor and nonsecretor HBGAs is summarized in Table 4. For the A, B, and H antigens, the size of the letter is scaled according to the numbers of RU that were determined during the SPR analysis in the experiment shown in Fig. 5.

the last decade are still unclear, we performed an analysis of six representative GII.4 variants to determine whether epidemiological observations correlated with specific biological properties during the attachment of GII.4 NoV particles to HBGA ligands. We first performed a qualitative analysis of the variants by evaluating their attachment profiles on phenotyped saliva and a large panel of synthetic glycoconjugates. It has been hypothesized that the occurrence of new variants was driven by herd immunity and was accompanied by new binding properties (7, 13). At first glance, our data clearly showed that the occurrence of new variants did not correlate with new and expanded binding profiles. Indeed, the variants that we analyzed could bind A, B, H type 1 (and not H type 2), Lewis b, and Lewis y synthetic antigens, which are all representative of the secretor phenotype. These data are consistent with those obtained on saliva, which showed that the six variants could bind secretor saliva regardless of the ABO phenotype, given that the level of binding of the VLPs was variant dependent. Nevertheless, the variations that we observed for the saliva binding assays between variants for a given antigen (i.e., A, B, and H antigen) might be explained by the expression level of the HBGAs in the saliva. Indeed, it has been shown that NoV binding was dependent on ligand density (26). Further studies will also be required to determine whether there is a synergistic association between Lewis and ABH antigens, which might explain differences in the binding. For nonsecretor individuals, we tested 12 saliva samples, and for six of these, which were Lewis positive, we demonstrated strong binding with Den

Haag and Osaka VLPs. Our data supported the hypothesis that these variants might potentially infect all secretors and a major part of nonsecretors. Only Lewis-negative nonsecretor individuals would not be recognized by these two recent strains. In all major human populations, individuals with this phenotype represent 1 to 3% of the population (30) while Lewis-positive nonsecretors represent almost 20% of the population. Thus, the Den Haag and Osaka strains would have acquired an increased ability to circulate worldwide. Based on their newly acquired recognition of Lewis-related structures (FUT3-dependent) in nonsecretors, they might potentially infect over 95% of the population. Binding experiments using synthetic carbohydrates failed to detect which precise carbohydrate motif is recognized by these two strains in Lewis-positive nonsecretors, suggesting that more complex structural features are involved (e.g., branched structures or internal fucosylation), requiring further study. The sequence alignment of the GII.4 variants (CHDC, Bristol, US95/96, Farmington, Hunter, Yerseke, Chiba, Den Haag, Osaka, and Apeldoorn) showed that amino acids directly involved in the HBGA binding sites are all conserved (data not shown) (2). This observation was further supported by our mutagenesis analysis of the amino acid residues of the binding pocket that interact with the α -fucose ring, which is part of the A, B, and H oligosaccharides (8). The deletion or mutation of these residues totally abolished binding to the synthetic HBGAs and saliva samples. Conversely, as exemplified by the Δ T395 Hunter VLPs, amino acids that are outside the binding sites might vary under the influence of the

genetic drift and the immune system. It has recently been shown that T395 is under positive selection (38). This amino acid is part of a triad involved in monoclonal antibody recognition, and other studies predicted that it should be involved in HBGA binding specificity (1, 25). Our data suggest that T395 is indeed involved in binding specificity. The deletion of a T395 insertion for the post-2002 Hunter strain allowed binding to Lewis x and sialyl-Lewis x antigens while no binding was observed for wt Hunter VLPs. Additionally, binding to sialyl-Lewis x was lowered or abrogated for the post-2002 variants. However, the biological relevance of the recognition of Lewis x and/or sialyl-Lewis x remains to be determined. Further mutagenesis studies will be required to verify which amino acid residues might influence the attachment of these antigens by the virion and to determine its biological relevance.

It is noteworthy that the genetic shifts observed for the GII.4 variants might not be entirely driven by immune pressure. In the literature, the attachment of VLPs to carbohydrates is mostly analyzed by using ELISA techniques. Despite the fact that the VLP-ligand interaction was not stoichiometric, SPR technology has been a valuable tool to study the attachment of VLPs to and their dissociation from carbohydrates. The short incubation time of the VLPs in the presence of ligands (2 min) and the constant flow of buffer during the binding assay put the attachment of VLPs to HBGAs under more stringent conditions in SPR than in ELISA, where the incubation time is longer (2 h). Additionally, the slope and RU suggested that the relative affinity to a given glycoconjugate was HBGA and variant dependent. Our data indicated that “old” GII.4 variants (i.e., Bristol and US95/96) bound strongly only to antigen H while new GII.4 variants additionally exhibited strong binding to A and B antigens, with the Den Haag variant showing the highest relative affinity for A, B, and H antigens (Fig. 6). We might hypothesize that there is a relationship between the higher binding of the Den Haag variants to ABH antigens and the epidemiological predominance of these variants over the Yerseke variants which circulated at the same period (2). This is the first report to show that binding to secretor antigens might be chronologically based, with the most recent and predominant variants showing the highest relative affinity for HBGAs.

It should be acknowledged that our data were mainly obtained from *in vitro* experiments. Future studies should be undertaken to determine the binding pattern of GII.4 variants on intestinal tissues from secretor and nonsecretor individuals. In the event of Den Haag-related gastroenteritis cases, the analysis should include the determination of the secretor status to verify whether nonsecretor individuals can indeed be infected by GII.4 NoVs. Other factors should also be taken into account. For example, heparan sulfate molecules might play a role in NoV binding, as suggested previously (42). It has also been suggested that increased pathogenicity for GII.4 NoV might be related to an augmented activity of the viral polymerase (6).

In summary, as illustrated by the deletion of T395, changes in amino acids that are not directly involved in HBGA attachment might contribute to the creation/establishment of new binding profiles as predicted previously (25). The binding capability to secretor and nonsecretor populations might have contributed to the success of strains belonging to the Den

Haag variant. However, the future evolution of these strains is difficult to predict since they can hardly expand their host range, which already represents over 95% of the population. One might hypothesize that the immune pressure would lead to the disappearance of the Den Haag variants to the benefit of new emerging strains, which will evade the immune system. Presently, it is difficult to predict whether the host range of emerging variants would be restricted to the secretor population. Additionally, our data highlighted the fact that the evolution of GII.4 resulted in an increase in the relative affinity to A, B, and H antigens, which was most evident in the most successful strains. The combination of a high relative affinity for ABH antigens expressed in secretors and the ability to recognize the majority of the nonsecretor population may have contributed to the dominance of Den Haag strains since their appearance in 2006. The routine analysis of binding to nonsecretor saliva might contribute to predicting the pathogenicity of emerging GII.4 variants in the population. In addition, our data suggest that it would be pertinent to determine NoV relative affinity toward HBGAs to determine whether certain emerging GII.4 NoV variants will become predominant worldwide.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the National Reference Center for Enteric Viruses and the Public Hospital of Dijon (France). The biochip part of the project was financially supported by a fellowship in the Proteomic Platform program from the University of Franche-Comté and was conducted with the help of the Clinical and Innovation Proteomic Platform and the technologic platform MIMENTO (Besançon, France).

The 162 GII.4 NoV sequences from the study of Motomura et al. were kindly provided by Hironori Sato (29). We thank Kim Y. Green for sending recombinant MD145 baculovirus and Jean Lepeault for the electron micrograph. We thank Katia Ambert-Balay and Philip Bastable for technical and editorial assistance.

We declare that we have no conflicts of interest with regard to carrying out the study and writing the manuscript.

REFERENCES

- Allen, D. J., et al. 2009. Characterisation of a GII-4 norovirus variant-specific surface-exposed site involved in antibody binding. *Virology*. **6**:150.
- Belliot, G., A. H. Kamel, M. Estienney, K. Ambert-Balay, and P. Pothier. 2010. Evidence of emergence of new GII.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.
- Belliot, G., et al. 2001. Characterization of capsid genes, expressed in the baculovirus system, of three new genetically distinct strains of “Norwalk-like viruses.” *J. Clin. Microbiol.* **39**:4288–4295.
- Boireau, W., A. Rouleau, G. Lucchi, and P. Ducoroy. 2009. Revisited BIA-MS combination: entire “on-a-chip” processing leading to the proteins identification at low femtomole to sub-femtomole levels. *Biosens. Bioelectron.* **24**:1121–1127.
- Bok, K., et al. 2009. Evolutionary dynamics of GII.4 noroviruses over a 34-year period. *J. Virol.* **83**:11890–11901.
- Bull, R. A., J. S. Eden, W. D. Rawlinson, and P. A. White. 2010. Rapid evolution of pandemic noroviruses of the GII.4 lineage. *PLoS Pathog.* **6**:e1000831.
- Cannon, J. L., et al. 2009. Herd immunity to GII.4 noroviruses is supported by outbreak patient sera. *J. Virol.* **83**:5363–5374.
- Cao, S., et al. 2007. Structural basis for the recognition of blood group trisaccharides by norovirus. *J. Virol.* **81**:5949–5957.
- Carneiro, F., M. Amado, L. David, H. Clausen, and M. Sobrinho-Simoes. 1994. Glycosylation features of gastric carcinoma initiation and progression. A review with emphasis on simple mucin-type carbohydrates and histo-blood group antigens of the Lewis system. *Eur. J. Cancer Prev.* **3**(Suppl. 2):39–46.
- Choi, J. M., A. M. Hutson, M. K. Estes, and B. V. Prasad. 2008. Atomic resolution structural characterization of recognition of histo-blood group antigens by Norwalk virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**:9175–9180.
- Czajkowsky, D. M., and Z. Shao. 2003. Inhibition of protein adsorption to muscovite mica by monovalent cations. *J. Microsc.* **211**:1–7.

12. **Dingle, K. E.** 2004. Mutation in a Lordsdale norovirus epidemic strain as a potential indicator of transmission routes. *J. Clin. Microbiol.* **42**:3950–3957.
13. **Donaldson, E. F., L. C. Lindesmith, A. D. Lobue, and R. S. Baric.** 2008. Norovirus pathogenesis: mechanisms of persistence and immune evasion in human populations. *Immunol. Rev.* **225**:190–211.
14. **Green, K. Y.** 2007. *Caliciviridae: the noroviruses*, p. 949–980. In D. M. Knipe et al. (ed.), *Fields virology*, 5 ed., vol. 1. Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia, PA.
15. **Green, K. Y., et al.** 2002. A predominant role for Norwalk-like viruses as agents of epidemic gastroenteritis in Maryland nursing homes for the elderly. *J. Infect. Dis.* **185**:133–146.
16. **Huang, P., et al.** 2003. Noroviruses bind to human ABO, Lewis, and secretor histo-blood group antigens: identification of 4 distinct strain-specific patterns. *J. Infect. Dis.* **188**:19–31.
17. **Huang, P., et al.** 2005. Norovirus and histo-blood group antigens: demonstration of a wide spectrum of strain specificities and classification of two major binding groups among multiple binding patterns. *J. Virol.* **79**:6714–6722.
18. **Hutson, A. M., F. Airaud, J. LePendou, M. K. Estes, and R. L. Atmar.** 2005. Norwalk virus infection associates with secretor status genotyped from sera. *J. Med. Virol.* **77**:116–120.
19. **Jiang, X., M. Wang, D. Y. Graham, and M. K. Estes.** 1992. Expression, self-assembly, and antigenicity of the Norwalk virus capsid protein. *J. Virol.* **66**:6527–6532.
20. **Kamel, A. H., et al.** 2009. Predominance and circulation of enteric viruses in the region of Greater Cairo, Egypt. *J. Clin. Microbiol.* **47**:1037–1045.
21. **Kapikian, A. Z., et al.** 1972. Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *J. Virol.* **10**:1075–1081.
22. **Kelly, R. J., S. Rouquier, D. Giorgi, G. G. Lennon, and J. B. Lowe.** 1995. Sequence and expression of a candidate for the human secretor blood group alpha(1,2)fucosyltransferase gene (FUT2). Homozygosity for an enzyme-inactivating nonsense mutation commonly correlates with the non-secretor phenotype. *J. Biol. Chem.* **270**:4640–4649.
23. **Kobayashi, K., et al.** 1993. Lewis blood group-related antigen expression in normal gastric epithelium, intestinal metaplasia, gastric adenoma, and gastric carcinoma. *Am. J. Gastroenterol.* **88**:919–924.
24. **Lindesmith, L., et al.** 2003. Human susceptibility and resistance to Norwalk virus infection. *Nat. Med.* **9**:548–553.
25. **Lindesmith, L. C., et al.** 2008. Mechanisms of GII.4 norovirus persistence in human populations. *PLoS Med.* **5**:e31.
26. **Marionneau, S., F. Airaud, N. V. Bovin, J. Le Pendu, and N. Ruvoen-Clouet.** 2005. Influence of the combined ABO, FUT2, and FUT3 polymorphism on susceptibility to Norwalk virus attachment. *J. Infect. Dis.* **192**:1071–1077.
27. **Marionneau, S., et al.** 2001. ABH and Lewis histo-blood group antigens, a model for the meaning of oligosaccharide diversity in the face of a changing world. *Biochimie* **83**:565–573.
28. **Marionneau, S., et al.** 2002. Norwalk virus binds to histo-blood group antigens present on gastroduodenal epithelial cells of secretor individuals. *Gastroenterology* **122**:1967–1977.
29. **Motomura, K., et al.** 2010. Divergent evolution of norovirus GII/4 by genome recombination from May 2006 to February 2009 in Japan. *J. Virol.* **84**:8085–8097.
30. **Mourant, A.** 1983. *Blood relations: blood groups and anthropology*, 2nd ed. Oxford University Press, Oxford, England.
31. **Murata, K., et al.** 1992. Expression of blood group-related antigens, ABH, Lewis(a), Lewis(b), Lewis(x), Lewis(y), CA19-9, and CSLEX1 in early cancer, intestinal metaplasia, and uninvolved mucosa of the stomach. *Am. J. Clin. Pathol.* **98**:67–75.
32. **Nam, H. J., et al.** 2006. Identification of the sialic acid structures recognized by minute virus of mice and the role of binding affinity in virulence adaptation. *J. Biol. Chem.* **281**:25670–25677.
33. **Newburg, D. S.** 2009. Neonatal protection by an innate immune system of human milk consisting of oligosaccharides and glycans. *J. Anim. Sci.* **87**:26–34.
34. **Nicollier-Jamot, B., V. Pico, P. Pothier, and E. Kohli.** 2003. Molecular cloning, expression, self-assembly, antigenicity, and seroepidemiology of a genogroup II norovirus isolated in France. *J. Clin. Microbiol.* **41**:3901–3904.
35. **Prasad, B. V., et al.** 1999. X-ray crystallographic structure of the Norwalk virus capsid. *Science* **286**:287–290.
36. **Rydell, G. E., et al.** 2009. Human noroviruses recognize sialyl Lewis x neoglycoprotein. *Glycobiology* **19**:309–320.
37. **Shoemaker, G. K., et al.** 2010. Norwalk virus assembly and stability monitored by mass spectrometry. *Mol. Cell. Proteomics* **9**:1742–1751.
38. **Siebenga, J. J., et al.** 2010. Phylogenetic reconstruction reveals norovirus GII.4 epidemic expansions and their molecular determinants. *PLoS Pathog.* **6**:e1000884.
39. **Siebenga, J. J., et al.** 2007. Epochal evolution of GII.4 norovirus capsid proteins from 1995 to 2006. *J. Virol.* **81**:9932–9941.
40. **Siebenga, J. J., et al.** 2009. Norovirus illness is a global problem: emergence and spread of norovirus GII.4 variants, 2001–2007. *J. Infect. Dis.* **200**:802–812.
41. **Stenberg, E., B. Persson, H. Roos, and C. Urbaniczky.** 1991. Quantitative determination of surface concentration of protein with surface plasmon resonance using radiolabeled proteins. *J. Colloid Interface Sci.* **143**:513–526.
42. **Tamura, M., K. Natori, M. Kobayashi, T. Miyamura, and N. Takeda.** 2004. Genogroup II noroviruses efficiently bind to heparan sulfate proteoglycan associated with the cellular membrane. *J. Virol.* **78**:3817–3826.
43. **Tan, M., et al.** 2008. Noroviral P particle: structure, function and applications in virus-host interaction. *Virology* **382**:115–123.
44. **Tan, M., R. S. Hegde, and X. Jiang.** 2004. The P domain of norovirus capsid protein forms dimer and binds to histo-blood group antigen receptors. *J. Virol.* **78**:6233–6242.
45. **Tan, M., et al.** 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.
46. **Tan, M., and X. Jiang.** 2005. Norovirus and its histo-blood group antigen receptors: an answer to a historical puzzle. *Trends Microbiol.* **13**:285–293.
47. **Tan, M., and X. Jiang.** 2010. Norovirus gastroenteritis, carbohydrate receptors, and animal models. *PLoS Pathog.* **6**:e1000983.
48. **Tan, M., and X. Jiang.** 2005. The P domain of norovirus capsid protein forms a subviral particle that binds to histo-blood group antigen receptors. *J. Virol.* **79**:14017–14030.
49. **Tan, M., et al.** 2008. Elucidation of strain-specific interaction of a GII-4 norovirus with HBGA receptors by site-directed mutagenesis study. *Virology* **379**:324–334.
50. **Taube, S., et al.** 2009. Ganglioside-linked terminal sialic acid moieties on murine macrophages function as attachment receptors for murine noroviruses. *J. Virol.* **83**:4092–4101.
51. **Zheng, D. P., et al.** 2006. Norovirus classification and proposed strain nomenclature. *Virology* **346**:312–323.
52. **Zheng, D. P., M. A. Widdowson, R. I. Glass, and J. Vinje.** 2010. Molecular epidemiology of genogroup II-genotype 4 noroviruses in the United States between 1994 and 2006. *J. Clin. Microbiol.* **48**:168–177.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

- Agus, SG, R Dolin, RG Wyatt, AJ Tousimis and RS Northrup. Acute infectious nonbacterial gastroenteritis: intestinal histopathology. Histologic and enzymatic alterations during illness produced by the Norwalk agent in man. *Ann Intern Med*, **1973** ; 79(1): 18-25.
- Ambert-Balay, K, F Bon, F Le Guyader, P Pothier and E Kohli. Characterization of new recombinant noroviruses. *J Clin Microbiol*, **2005** ; 43(10): 5179-86.
- Ando, T, SS Monroe, JR Gentsch, Q Jin, DC Lewis and RI Glass. Detection and differentiation of antigenically distinct small round-structured viruses (Norwalk-like viruses) by reverse transcription-PCR and southern hybridization. *J Clin Microbiol*, **1995** ; 33(1): 64-71.
- Ando, T, JS Noel and RL Fankhauser. Genetic classification of "Norwalk-like viruses. *J Infect Dis*, **2000** ; 181 Suppl 2: S336-48.
- Atmar, RL, AR Opekun, MA Gilger, MK Estes, SE Crawford, FH Neill and DY Graham. Norwalk virus shedding after experimental human infection. *Emerg Infect Dis*, **2008** ; 14(10): 1553-7.
- Aw, TG, KY Gin, LL Ean Oon, EX Chen and CH Woo. Prevalence and genotypes of human noroviruses in tropical urban surface waters and clinical samples in Singapore. *Appl Environ Microbiol*, **2009** ; 75(15): 4984-92.

B

- Baert, L, M Uyttendaele, M Vermeersch, E Van Coillie and J Debevere. Survival and transfer of murine norovirus 1, a surrogate for human noroviruses, during the production process of deep-frozen onions and spinach. *J Food Prot*, **2008** ; 71(8): 1590-7.
- Bailey, D, LB Thackray and IG Goodfellow. A single amino acid substitution in the murine norovirus capsid protein is sufficient for attenuation in vivo. *J Virol*, **2008**.
- Ball, JM, MK Estes, ME Hardy, ME Conner, AR Opekun and DY Graham. Recombinant Norwalk virus-like particles as an oral vaccine. *Arch Virol Suppl*, **1996** ; 12: 243-9.
- Barker, J, IB Vipond and SF Bloomfield. Effects of cleaning and disinfection in reducing the spread of Norovirus contamination via environmental surfaces. *J Hosp Infect*, **2004** ; 58(1): 42-9.
- Beller, M, A Ellis, SH Lee, MA Drebot, SA Jenkerson, E Funk, MD Sobsey, OD Simmons, 3rd, SS Monroe, T Ando, J Noel, M Petric, JP Middaugh and JS Spika. Outbreak of viral gastroenteritis due to a contaminated well. International consequences. *Jama*, **1997** ; 278(7): 563-8.
- Belliot, G, JS Noel, JF Li, Y Seto, CD Humphrey, T Ando, RI Glass and SS Monroe. Characterization of capsid genes, expressed in the baculovirus system, of three new genetically distinct strains of "Norwalk-like viruses". *J Clin Microbiol*, **2001** ; 39(12): 4288-95.
- Belliot, G, SV Sosnovtsev, T Mitra, C Hammer, M Garfield and KY Green. In vitro proteolytic processing of the MD145 norovirus ORF1 nonstructural polyprotein yields stable precursors and products similar to those detected in calicivirus-infected cells. *J Virol*, **2003** ; 77(20): 10957-74.

- Belliot, G, SV Sosnovtsev, KO Chang, V Babu, U Uche, JJ Arnold, CE Cameron and KY Green. Norovirus proteinase-polymerase and polymerase are both active forms of RNA-dependent RNA polymerase. *J Virol*, **2005** ; 79(4): 2393-403.
- Belliot, G, A Lavaux, D Souihel, D Agnello and P Pothier. Use of murine norovirus as a surrogate to evaluate resistance of human norovirus to disinfectants. *Appl Environ Microbiol*, **2008a** ; 74(10): 3315-8.
- Belliot, G, SV Sosnovtsev, KO Chang, P McPhie and KY Green. Nucleotidylylation of the VPg protein of a human norovirus by its proteinase-polymerase precursor protein. *Virology*, **2008b** ; 374(1): 33-49.
- Belliot, G, AH Kamel, M Estienney, K Ambert-Balay and P Pothier. 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*, **2010** ; 48(3): 994-8.
- Bertolotti-Ciarlet, A, SE Crawford, AM Hutson and MK Estes. The 3' end of Norwalk virus mRNA contains determinants that regulate the expression and stability of the viral capsid protein VP1: a novel function for the VP2 protein. *J Virol*, **2003** ; 77(21): 11603-15.
- Birnboim, HC and J Doly. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*, **1979** ; 7(6): 1513-23.
- Blanton, LH, SM Adams, RS Beard, G Wei, SN Bulens, MA Widdowson, RI Glass and SS Monroe. Molecular and Epidemiologic Trends of Caliciviruses Associated with Outbreaks of Acute Gastroenteritis in the United States, 2000-2004. *J Infect Dis*, **2006** ; 193(3): 413-421.
- Bohnker, BK and S Thornton. Explosive outbreaks of gastroenteritis in the shipboard environment attributed to Norovirus. *Mil Med*, **2003** ; 168(5): iv.
- Boireau, W, A Rouleau, G Lucchi and P Ducoroy. Revisited BIA-MS combination: entire "on-a-chip" processing leading to the proteins identification at low femtomole to sub-femtomole levels. *Biosens Bioelectron*, **2009** ; 24(5): 1121-7.
- Bok, K, EJ Abente, M Realpe-Quintero, T Mitra, SV Sosnovtsev, AZ Kapikian and KY Green. Evolutionary dynamics of GII.4 noroviruses over a 34-year period. *J Virol*, **2009** ; 83(22): 11890-901.
- Bon, F, K Ambert-Balay, H Giraudon, J Kaplon, S Le Guyader, M Pommepuy, A Gallay, V Vaillant, H de Valk, R Chikhi-Brachet, A Flahaut, P Pothier and E Kohli. Molecular epidemiology of caliciviruses detected in sporadic and outbreak cases of gastroenteritis in France from December 1998 to February 2004. *J Clin Microbiol*, **2005** ; 43(9): 4659-64.
- Boniotti, B, C Wirblich, M Sibilia, G Meyers, HJ Thiel and C Rossi. Identification and characterization of a 3C-like protease from rabbit hemorrhagic disease virus, a calicivirus. *J Virol*, **1994** ; 68(10): 6487-95.
- Boom, R, CJ Sol, MM Salimans, CL Jansen, PM Wertheim-van Dillen and J van der Noordaa. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol*, **1990** ; 28(3): 495-503.
- Bourgeois, AL, CH Gardiner, SA Thornton, RA Batchelor, DH Burr, J Escamilla, P Echeverria, NR Blacklow, JE Herrmann and KC Hyams. Etiology of acute diarrhea among United States military personnel deployed to South America and west Africa. *Am J Trop Med Hyg*, **1993** ; 48(2): 243-8.

- Bruner, R and J Vinograd. The evaluation of standard sedimentation coefficients of sodium RNA and sodium DNA from sedimentation velocity data in concentrated NaCl and CsCl solutions. *Biochim Biophys Acta*, **1965** ; 108(1): 18-29.
- Bryce, J, C Boschi-Pinto, K Shibuya and RE Black. WHO estimates of the causes of death in children. *Lancet*, **2005** ; 365(9465): 1147-52.
- Bu, W, A Mamedova, M Tan, M Xia, X Jiang and RS Hegde. Structural basis for the receptor binding specificity of Norwalk virus. *J Virol*, **2008** ; 82(11): 5340-7.
- Buesa, J, B Collado, P Lopez-Andujar, R Abu-Mallouh, J Rodriguez Diaz, A Garcia Diaz, J Prat, S Guix, T Llovet, G Prats and A Bosch. Molecular epidemiology of caliciviruses causing outbreaks and sporadic cases of acute gastroenteritis in Spain. *J Clin Microbiol*, **2002** ; 40(8): 2854-9.
- Bull, RA, GS Hansman, LE Clancy, MM Tanaka, WD Rawlinson and PA White. Norovirus recombination in ORF1/ORF2 overlap. *Emerg Infect Dis*, **2005** ; 11(7): 1079-85.
- Bull, RA, ET Tu, CJ Mclver, WD Rawlinson and PA White. Emergence of a new norovirus genotype II.4 variant associated with global outbreaks of gastroenteritis. *J Clin Microbiol*, **2006** ; 44(2): 327-33.
- Bull, RA, MM Tanaka and PA White. Norovirus recombination. *J Gen Virol*, **2007** ; 88(Pt 12): 3347-59.
- Bull, RA, J-S Eden, WD Rawlinson and PA White. Rapid Evolution of Pandemic Noroviruses of the GII.4 Lineage. *PLoS Pathog*, **2010** ; 6(3).

C

- Cannon, JL, E Papafragkou, GW Park, J Osborne, LA Jaykus and J Vinje. Surrogates for the study of norovirus stability and inactivation in the environment: aA comparison of murine norovirus and feline calicivirus. *J Food Prot*, **2006** ; 69(11): 2761-5.
- Cannon, JL, LC Lindesmith, EF Donaldson, L Saxe, RS Baric and J Vinje. Herd immunity to GII.4 noroviruses is supported by outbreak patient sera. *J Virol*, **2009** ; 83(11): 5363-74.
- Cao, D, N Santos, RW Jones, M Tatsumi, JR Gentsch and Y Hoshino. The VP7 genes of two G9 rotaviruses isolated in 1980 from diarrheal stool samples collected in Washington, DC, are unique molecularly and serotypically. *J Virol*, **2008** ; 82(8): 4175-9.
- Cao, S, Z Lou, M Tan, Y Chen, Y Liu, Z Zhang, XC Zhang, X Jiang, X Li and Z Rao. Structural basis for the recognition of blood group trisaccharides by norovirus. *J Virol*, **2007** ; 81(11): 5949-57.
- Carneiro, F, M Amado, L David, H Clausen and M Sobrinho-Simoes. Glycosylation features of gastric carcinoma initiation and progression. A review with emphasis on simple mucin-type carbohydrates and histo-blood group antigens of the Lewis system. *Eur J Cancer Prev*, **1994** ; 3 Suppl 2: 39-46.
- Carter, MJ. Enterically infecting viruses: pathogenicity, transmission and significance for food and waterborne infection. *J Appl Microbiol*, **2005** ; 98(6): 1354-80.
- Caul, EO. Small round structured viruses: airborne transmission and hospital control. *Lancet*, **1994** ; 343(8908): 1240-2.
- Caul, EO. Hyperemesis hiemis--a sick hazard. *J Hosp Infect*, **1995** ; 30 Suppl: 498-502.

- Chakravarty, S, AM Hutson, MK Estes and BV Prasad. Evolutionary trace residues in noroviruses: importance in receptor binding, antigenicity, virion assembly, and strain diversity. *J Virol*, **2005** ; 79(1): 554-68.
- Chen, R, JD Neill, JS Noel, AM Hutson, RI Glass, MK Estes and BV Prasad. Inter- and intragenus structural variations in caliciviruses and their functional implications. *J Virol*, **2004** ; 78(12): 6469-79.
- Chen, R, JD Neill, MK Estes and BV Prasad. X-ray structure of a native calicivirus: structural insights into antigenic diversity and host specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **2006** ; 103(21): 8048-53.
- Chiba, S, Y Sakuma, R Kogasaka, M Akihara, K Horino, T Nakao and S Fukui. An outbreak of gastroenteritis associated with calicivirus in an infant home. *J Med Virol*, **1979** ; 4(4): 249-54.
- Chikhi-Brachet, R, F Bon, L Toubiana, P Pothier, JC Nicolas, A Flahault and E Kohli. Virus diversity in a winter epidemic of acute diarrhea in France. *J Clin Microbiol*, **2002** ; 40(11): 4266-72.
- Choi, JM, AM Hutson, MK Estes and BV Prasad. Atomic resolution structural characterization of recognition of histo-blood group antigens by Norwalk virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **2008** ; 105(27): 9175-80.
- Chomczynski, P and N Sacchi. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, **1987** ; 162(1): 156-9.
- Colomba, C, L Saporito, GM Giammanco, S De Grazia, S Ramirez, S Arista and L Titone. Norovirus and gastroenteritis in hospitalized children, Italy. *Emerg Infect Dis*, **2007** ; 13(9): 1389-91.
- Corwin, AL, R Soderquist, M Edwards, A White, J Beecham, P Mills, RP Larasati, D Subekti, T Ansari, J Burans and B Oyofu. Shipboard impact of a probable Norwalk virus outbreak from coastal Japan. *Am J Trop Med Hyg*, **1999** ; 61(6): 898-903.
- Costantini, V, F Loisy, L Joens, FS Le Guyader and LJ Saif. Human and animal enteric caliciviruses in oysters from different coastal regions of the United States. *Appl Environ Microbiol*, **2006** ; 72(3): 1800-9.
- Coutinho, PM, E Deleury, GJ Davies and B Henrissat. An evolving hierarchical family classification for glycosyltransferases. *J Mol Biol*, **2003** ; 328(2): 307-17.
- Cubitt, WD, NR Blacklow, JE Herrmann, NA Nowak, S Nakata and S Chiba. Antigenic relationships between human caliciviruses and Norwalk virus. *J Infect Dis*, **1987** ; 156(5): 806-14.
- Czajkowsky, DM and Z Shao. Inhibition of protein adsorption to muscovite mica by monovalent cations. *J Microsc*, **2003** ; 211(Pt 1): 1-7.

D

-
- da Silva, AK, JC Le Saux, S Parnaudeau, M Pommepeuy, M Elimelech and FS Le Guyader. Evaluation of removal of noroviruses during wastewater treatment, using real-time reverse transcription-PCR: different behaviors of genogroups I and II. *Appl Environ Microbiol*, **2007** ; 73(24): 7891-7.

- Daughenbaugh, KF, CS Fraser, JW Hershey and ME Hardy. The genome-linked protein VPg of the Norwalk virus binds eIF3, suggesting its role in translation initiation complex recruitment. *Embo J*, **2003** ; 22(11): 2852-9.
- Dingle, KE, PR Lambden, EO Caul and IN Clarke. Human enteric Caliciviridae: the complete genome sequence and expression of virus-like particles from a genetic group II small round structured virus. *J Gen Virol*, **1995** ; 76 (Pt 9): 2349-55.
- Dingle, KE. Mutation in a Lordsdale norovirus epidemic strain as a potential indicator of transmission routes. *J Clin Microbiol*, **2004** ; 42(9): 3950-7.
- Dolin, R, NR Blacklow, H DuPont, RF Buscho, RG Wyatt, JA Kasel, R Hornick and RM Chanock. Biological properties of Norwalk agent of acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *Proc Soc Exp Biol Med*, **1972** ; 140(2): 578-83.
- Donaldson, EF, LC Lindesmith, AD Lobue and RS Baric. Norovirus pathogenesis: mechanisms of persistence and immune evasion in human populations. *Immunol Rev*, **2008** ; 225: 190-211.
- Duizer, E, KJ Schwab, FH Neill, RL Atmar, MP Koopmans and MK Estes. Laboratory efforts to cultivate noroviruses. *J Gen Virol*, **2004** ; 85(Pt 1): 79-87.
- Duizer, E, A Pielaat, H Vennema, A Kroneman and M Koopmans. Probabilities in norovirus outbreak diagnosis. *J Clin Virol*, **2007** ; 40(1): 38-42.
- Dunham, DM, X Jiang, T Berke, AW Smith and DO Matson. Genomic mapping of a calicivirus VPg. *Arch Virol*, **1998** ; 143(12): 2421-30.

E

- Estes, MK, JM Ball, SE Crawford, C O'Neal, AA Opekun, DY Graham and ME Conner. Virus-like particle vaccines for mucosal immunization. *Adv Exp Med Biol*, **1997** ; 412: 387-95.
- Estes, MK, JM Ball, RA Guerrero, AR Opekun, MA Gilger, SS Pacheco and DY Graham. Norwalk virus vaccines: challenges and progress. *J Infect Dis*, **2000** ; 181 Suppl 2: S367-73.
- Etherington, GJ, J Dicks and IN Roberts. High throughput sequence analysis reveals hitherto unreported recombination in the genus Norovirus. *Virology*, **2005**.

F

- Fankhauser, RL, SS Monroe, JS Noel, CD Humphrey, JS Bresee, UD Parashar, T Ando and RI Glass. Epidemiologic and molecular trends of "Norwalk-like viruses" associated with outbreaks of gastroenteritis in the United States. *J Infect Dis*, **2002** ; 186(1): 1-7.
- Farkas, T, K Sestak, C Wei and X Jiang. Characterization of a rhesus monkey calicivirus representing a new genus of Caliciviridae. *J Virol*, **2008** ; 82(11): 5408-16.
- Fernandez-Vega, V, SV Sosnovtsev, G Belliot, AD King, T Mitra, A Gorbalenya and KY Green. Norwalk virus N-terminal nonstructural protein is associated with disassembly of the Golgi complex in transfected cells. *J Virol*, **2004** ; 78(9): 4827-37.
- Fischer, TK, JS Bresee and RI Glass. Rotavirus vaccines and the prevention of hospital-acquired diarrhea in children. *Vaccine*, **2004** ; 22 Suppl 1: S49-54.

G

- Gallimore, CI, AF Richards and JJ Gray. Molecular diversity of noroviruses associated with outbreaks on cruise ships: comparison with strains circulating within the UK. *Commun Dis Public Health*, **2003** ; 6(4): 285-93.
- Gallimore, CI, J Green, D Lewis, AF Richards, BA Lopman, AD Hale, R Eglin, JJ Gray and DW Brown. Diversity of noroviruses cocirculating in the north of England from 1998 to 2001. *J Clin Microbiol*, **2004a** ; 42(4): 1396-401.
- Gallimore, CI, D Lewis, C Taylor, A Cant, A Gennery and JJ Gray. Chronic excretion of a norovirus in a child with cartilage hair hypoplasia (CHH). *J Clin Virol*, **2004b** ; 30(2): 196-204.
- Gaulin, C, M Frigon, D Poirier and C Fournier. Transmission of calicivirus by a foodhandler in the pre-symptomatic phase of illness. *Epidemiol Infect*, **1999** ; 123(3): 475-8.
- Giannasca, PJ, KT Giannasca, AM Leichtner and MR Neutra. Human intestinal M cells display the sialyl Lewis A antigen. *Infect Immun*, **1999** ; 67(2): 946-53.
- Glass, PJ, LJ White, JM Ball, I Leparc-Goffart, ME Hardy and MK Estes. Norwalk virus open reading frame 3 encodes a minor structural protein. *J Virol*, **2000a** ; 74(14): 6581-91.
- Glass, PJ, CQ Zeng and MK Estes. Two nonoverlapping domains on the Norwalk virus open reading frame 3 (ORF3) protein are involved in the formation of the phosphorylated 35K protein and in ORF3-capsid protein interactions. *J Virol*, **2003** ; 77(6): 3569-77.
- Glass, RI, J Noel, T Ando, R Fankhauser, G Belliot, A Mounts, UD Parashar, JS Bresee and SS Monroe. The epidemiology of enteric caliciviruses from humans: a reassessment using new diagnostics. *J Infect Dis*, **2000b** ; 181 Suppl 2: S254-61.
- Goodfellow, I, Y Chaudhry, I Gioldasi, A Gerondopoulos, A Natoni, L Labrie, JF Laliberte and L Roberts. Calicivirus translation initiation requires an interaction between VPg and eIF 4 E. *EMBO Rep*, **2005** ; 6(10): 968-72.
- Gray, JJ, C Cunliffe, J Ball, DY Graham, U Desselberger and MK Estes. Detection of immunoglobulin M (IgM), IgA, and IgG Norwalk virus-specific antibodies by indirect enzyme-linked immunosorbent assay with baculovirus-expressed Norwalk virus capsid antigen in adult volunteers challenged with Norwalk virus. *J Clin Microbiol*, **1994** ; 32(12): 3059-63.
- Gray, JJ, E Kohli, FM Ruggeri, H Vennema, A Sanchez-Fauquier, E Schreier, CI Gallimore, M Iturriza-Gomara, H Giraudon, P Pothier, I Di Bartolo, N Inglese, E de Bruin, B van der Veer, S Moreno, V Montero, MC de Llano, M Hohne and SM Diedrich. European multicenter evaluation of commercial enzyme immunoassays for detecting norovirus antigen in fecal samples. *Clin Vaccine Immunol*, **2007** ; 14(10): 1349-55.
- Green, KY, G Belliot, JL Taylor, J Valdesuso, JF Lew, AZ Kapikian and FY Lin. A predominant role for Norwalk-like viruses as agents of epidemic gastroenteritis in Maryland nursing homes for the elderly. *J Infect Dis*, **2002a** ; 185(2): 133-46.
- Green, KY, A Mory, MH Fogg, A Weisberg, G Belliot, M Wagner, T Mitra, E Ehrenfeld, CE Cameron and SV Sosnovtsev. Isolation of enzymatically active replication complexes from feline calicivirus-infected cells. *J Virol*, **2002b** ; 76(17): 8582-95.
- Green, KY (2007). *Caliciviridae: The Noroviruses*. Fields Virology. D. M. Knipe, Howley, P.M. Philadelphia, PA, Lippincott, Williams & Wilkins. **1**: 949-980.

- Green, SM, KE Dingle, PR Lambden, EO Caul, CR Ashley and IN Clarke. Human enteric Caliciviridae: a new prevalent small round-structured virus group defined by RNA-dependent RNA polymerase and capsid diversity. *J Gen Virol*, **1994** ; 75 (Pt 8): 1883-8.
- Greig, JD and MB Lee. Enteric outbreaks in long-term care facilities and recommendations for prevention: a review. *Epidemiol Infect*, **2008**: 1-11.
- Gutierrez-Escolano, AL, ZU Brito, RM del Angel and X Jiang. Interaction of cellular proteins with the 5' end of Norwalk virus genomic RNA. *J Virol*, **2000** ; 74(18): 8558-62.
- Gutierrez-Escolano, AL, M Vazquez-Ochoa, J Escobar-Herrera and J Hernandez-Acosta. La, PTB, and PAB proteins bind to the 3' untranslated region of Norwalk virus genomic RNA. *Biochem Biophys Res Commun*, **2003** ; 311(3): 759-66.

H

- Hansman, G, X Jiang and KY Green. Caliciviruses: molecular and cellular virology. **2010**, Caister.
- Hansman, GS, K Katayama, N Maneekarn, S Peerakome, P Khamrin, S Tonusin, S Okitsu, O Nishio, N Takeda and H Ushijima. Genetic diversity of norovirus and sapovirus in hospitalized infants with sporadic cases of acute gastroenteritis in Chiang Mai, Thailand. *J Clin Microbiol*, **2004** ; 42(3): 1305-7.
- Hardy, ME, TN Tanaka, N Kitamoto, LJ White, JM Ball, X Jiang and MK Estes. Antigenic mapping of the recombinant Norwalk virus capsid protein using monoclonal antibodies. *Virology*, **1996** ; 217(1): 252-61.
- Hardy, ME. Norovirus protein structure and function. *FEMS Microbiol Lett*, **2005**.
- Harrington, PR, L Lindesmith, B Yount, CL Moe and RS Baric. Binding of Norwalk virus-like particles to ABH histo-blood group antigens is blocked by antisera from infected human volunteers or experimentally vaccinated mice. *J Virol*, **2002** ; 76(23): 12335-43.
- Hart, GW, RS Haltiwanger, GD Holt and WG Kelly. Glycosylation in the nucleus and cytoplasm. *Annu Rev Biochem*, **1989** ; 58: 841-74.
- Heijne, JC, P Teunis, G Morroy, C Wijkmans, S Oostveen, E Duizer, M Kretzschmar and J Wallinga. Enhanced hygiene measures and norovirus transmission during an outbreak. *Emerg Infect Dis*, **2009** ; 15(1): 24-30.
- Henke-Gendo, C, G Harste, B Juergens-Saathoff, F Mattner, H Deppe and A Heim. New real-time PCR detects prolonged norovirus excretion in highly immunosuppressed patients and children. *J Clin Microbiol*, **2009** ; 47(9): 2855-62.
- Herbert, TP, I Brierley and TD Brown. Detection of the ORF3 polypeptide of feline calicivirus in infected cells and evidence for its expression from a single, functionally bicistronic, subgenomic mRNA. *J Gen Virol*, **1996** ; 77 (Pt 1): 123-7.
- Herbert, TP, I Brierley and TD Brown. Identification of a protein linked to the genomic and subgenomic mRNAs of feline calicivirus and its role in translation. *J Gen Virol*, **1997** ; 78 (Pt 5): 1033-40.
- Herwaldt, BL, JF Lew, CL Moe, DC Lewis, CD Humphrey, SS Monroe, EW Pon and RI Glass. Characterization of a variant strain of Norwalk virus from a food-borne outbreak of gastroenteritis on a cruise ship in Hawaii. *J Clin Microbiol*, **1994** ; 32(4): 861-6.

Hewitt, J, M Rivera-Aban and GE Greening. Evaluation of murine norovirus as a surrogate for human norovirus and hepatitis A virus in heat inactivation studies. *J Appl Microbiol*, **2009** ; 107(1): 65-71.

Holgersson, J, ME Breimer and BE Samuelsson. Basic biochemistry of cell surface carbohydrates and aspects of the tissue distribution of histo-blood group ABH and related glycosphingolipids. *APMIS Suppl*, **1992** ; 27: 18-27.

Hounsell, EF, MJ Davies and DV Renouf. O-linked protein glycosylation structure and function. *Glycoconj J*, **1996** ; 13(1): 19-26.

Hsu, CC, LK Riley and RS Livingston. Molecular characterization of three novel murine noroviruses. *Virus Genes*, **2007** ; 34(2): 147-55.

Huang, P, T Farkas, S Marionneau, W Zhong, N Ruvoen-Clouet, AL Morrow, M Altaye, LK Pickering, DS Newburg, J LePendou and X Jiang. Noroviruses bind to human ABO, Lewis, and secretor histo-blood group antigens: identification of 4 distinct strain-specific patterns. *J Infect Dis*, **2003** ; 188(1): 19-31.

Huang, P, T Farkas, W Zhong, M Tan, S Thornton, AL Morrow and X Jiang. 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** ; 79(11): 6714-22.

Hutson, AM, RL Atmar, DY Graham and MK Estes. Norwalk virus infection and disease is associated with ABO histo-blood group type. *J Infect Dis*, **2002** ; 185(9): 1335-7.

Hutson, AM, RL Atmar, DM Marcus and MK Estes. Norwalk virus-like particle hemagglutination by binding to h histo-blood group antigens. *J Virol*, **2003** ; 77(1): 405-15.

I

Iturriza Gomara, M, R Simpson, AM Perault, C Redpath, P Lorgelly, D Joshi, M Mugford, CA Hughes, J Dalrymple, U Desselberger and J Gray. Structured surveillance of infantile gastroenteritis in East Anglia, UK: incidence of infection with common viral gastroenteric pathogens. *Epidemiol Infect*, **2008** ; 136(1): 23-33.

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

J

Jiang, X, DY Graham, KN Wang and MK Estes. Norwalk virus genome cloning and characterization. *Science*, **1990** ; 250(4987): 1580-3.

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

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

- Jiang, X, C Espul, WM Zhong, H Cuello and DO Matson. Characterization of a novel human calicivirus that may be a naturally occurring recombinant. *Arch Virol*, **1999a** ; 144(12): 2377-87.
- Jiang, X, PW Huang, WM Zhong, T Farkas, DW Cubitt and DO Matson. Design and evaluation of a primer pair that detects both Norwalk- and Sapporo-like caliciviruses by RT-PCR. *J Virol Methods*, **1999b** ; 83(1-2): 145-54.
- Jiang, X, N Wilton, WM Zhong, T Farkas, PW Huang, E Barrett, M Guerrero, G Ruiz-Palacios, KY Green, J Green, AD Hale, MK Estes, LK Pickering and DO Matson. Diagnosis of human caliciviruses by use of enzyme immunoassays. *J Infect Dis*, **2000** ; 181 Suppl 2: S349-59.
- Jiang, X, P Huang, W Zhong, M Tan, T Farkas, AL Morrow, DS Newburg, GM Ruiz-Palacios and LK Pickering. Human milk contains elements that block binding of noroviruses to human histo-blood group antigens in saliva. *J Infect Dis*, **2004** ; 190(10): 1850-9.
- Johansen, K, K Mannerqvist, A Allard, Y Andersson, LG Burman, L Dillner, KO Hedlund, K Jonsson, U Kumlin, T Leitner, M Lysen, M Thorhagen, A Tiveljung-Lindell, C Wahlstrom, B Zwegyberg-Wirgart and A Widell. Norovirus strains belonging to the GII.4 genotype dominate as a cause of nosocomial outbreaks of viral gastroenteritis in Sweden 1997-2005 Arrival of new variants is associated with large nation-wide epidemics. *J Clin Virol*, **2008** ; 42(2): 129-34.
- Johnson, PC, JJ Mathewson, HL DuPont and HB Greenberg. Multiple-challenge study of host susceptibility to Norwalk gastroenteritis in US adults. *J Infect Dis*, **1990** ; 161(1): 18-21.
- Johnston, CP, H Qiu, JR Ticehurst, C Dickson, P Rosenbaum, P Lawson, AB Stokes, CJ Lowenstein, M Kaminsky, SE Cosgrove, KY Green and TM Perl. Outbreak management and implications of a nosocomial norovirus outbreak. *Clin Infect Dis*, **2007** ; 45(5): 534-40.

K

- Kageyama, T, S Kojima, M Shinohara, K Uchida, S Fukushi, FB Hoshino, N Takeda and K Katayama. Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR. *J Clin Microbiol*, **2003** ; 41(4): 1548-57.
- Kageyama, T, M Shinohara, K Uchida, S Fukushi, FB Hoshino, S Kojima, R Takai, T Oka, N Takeda and K Katayama. Coexistence of multiple genotypes, including newly identified genotypes, in outbreaks of gastroenteritis due to Norovirus in Japan. *J Clin Microbiol*, **2004** ; 42(7): 2988-95.
- Kaiser, WJ, Y Chaudhry, SV Sosnovtsev and IG Goodfellow. Analysis of protein-protein interactions in the feline calicivirus replication complex. *J Gen Virol*, **2006** ; 87(Pt 2): 363-8.
- Kamel, AH, MA Ali, HG El-Nady, A de Rougemont, P Pothier and G Belliot. Predominance and circulation of enteric viruses in the region of Greater Cairo, Egypt. *J Clin Microbiol*, **2009** ; 47(4): 1037-45.
- Kapikian, AZ, RG Wyatt, R Dolin, TS Thornhill, AR Kalica and RM Chanock. Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *J Virol*, **1972** ; 10(5): 1075-81.
- Kapikian, AZ, JL Gerin, RG Wyatt, TS Thornhill and RM Chanock. Density in cesium chloride of the 27 nm "8FIIa" particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis:

- determination by ultra-centrifugation and immune electron microscopy. *Proc Soc Exp Biol Med*, **1973** ; 142(3): 874-7.
- Kapikian, AZ. The discovery of the 27-nm Norwalk virus: an historic perspective. *J Infect Dis*, **2000** ; 181 Suppl 2: S295-302.
- Kaplan, JE, GW Gary, RC Baron, N Singh, LB Schonberger, R Feldman and HB Greenberg. Epidemiology of Norwalk gastroenteritis and the role of Norwalk virus in outbreaks of acute nonbacterial gastroenteritis. *Ann Intern Med*, **1982** ; 96(6 Pt 1): 756-61.
- Karst, SM, CE Wobus, M Lay, J Davidson and HWt Virgin. STAT1-dependent innate immunity to a Norwalk-like virus. *Science*, **2003** ; 299(5612): 1575-8.
- Kelly, RJ, S Rouquier, D Giorgi, GG Lennon and JB Lowe. Sequence and expression of a candidate for the human Secretor blood group alpha(1,2)fucosyltransferase gene (FUT2). Homozygosity for an enzyme-inactivating nonsense mutation commonly correlates with the non-secretor phenotype. *J Biol Chem*, **1995** ; 270(9): 4640-9.
- Keswick, BH, TK Satterwhite, PC Johnson, HL DuPont, SL Secor, JA Bitsura, GW Gary and JC Hoff. Inactivation of Norwalk virus in drinking water by chlorine. *Appl Environ Microbiol*, **1985** ; 50(2): 261-4.
- Khan, AS, CL Moe, RI Glass, SS Monroe, MK Estes, LE Chapman, X Jiang, C Humphrey, E Pon, JK Iskander and et al. Norwalk virus-associated gastroenteritis traced to ice consumption aboard a cruise ship in Hawaii: comparison and application of molecular method-based assays. *J Clin Microbiol*, **1994** ; 32(2): 318-22.
- Kingsley, DH, DR Holliman, KR Calci, H Chen and GJ Flick. Inactivation of a norovirus by high-pressure processing. *Appl Environ Microbiol*, **2007** ; 73(2): 581-5.
- Kirkwood, CD and R Streitberg. Calicivirus shedding in children after recovery from diarrhoeal disease. *J Clin Virol*, **2008** ; 43(3): 346-8.
- Kitamoto, N, T Tanaka, K Natori, N Takeda, S Nakata, X Jiang and MK Estes. Cross-reactivity among several recombinant calicivirus virus-like particles (VLPs) with monoclonal antibodies obtained from mice immunized orally with one type of VLP. *J Clin Microbiol*, **2002** ; 40(7): 2459-65.
- Kobayashi, K, J Sakamoto, T Kito, Y Yamamura, T Koshikawa, M Fujita, T Watanabe and H Nakazato. Lewis blood group-related antigen expression in normal gastric epithelium, intestinal metaplasia, gastric adenoma, and gastric carcinoma. *Am J Gastroenterol*, **1993** ; 88(6): 919-24.
- Kohler, G and C Milstein. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, **1975** ; 256(5517): 495-7.
- Kojima, S, T Kageyama, S Fukushi, FB Hoshino, M Shinohara, K Uchida, K Natori, N Takeda and K Katayama. Genogroup-specific PCR primers for detection of Norwalk-like viruses. *J Virol Methods*, **2002** ; 100(1-2): 107-14.
- Koopmans, M, J Vinj inverted question marke, M de Wit, I Leenen, W van der Poel and Y van Duynhoven. Molecular epidemiology of human enteric caliciviruses in The Netherlands. *J Infect Dis*, **2000** ; 181 Suppl 2: S262-9.
- Koopmans, M, H Vennema, H Heersma, E van Strien, Y van Duynhoven, D Brown, M Reacher and B Lopman. Early identification of common-source foodborne virus outbreaks in Europe. *Emerg Infect Dis*, **2003** ; 9(9): 1136-42.

- Koopmans, M and E Duizer. Foodborne viruses: an emerging problem. *Int J Food Microbiol*, **2004** ; 90(1): 23-41.
- Koopmans, M, J Harris, L Verhoef, E Depoortere, J Takkinen and D Coulombier. European investigation into recent norovirus outbreaks on cruise ships: update. *Euro Surveill*, **2006** ; 11(7): E060706 5.
- Koopmans, M. Progress in understanding norovirus epidemiology. *Curr Opin Infect Dis*, **2008** ; 21(5): 544-52.
- Kosek, M, C Bern and RL Guerrant. The global burden of diarrhoeal disease, as estimated from studies published between 1992 and 2000. *Bull World Health Organ*, **2003** ; 81(3): 197-204.
- Kreutz, LC, BS Seal and WL Mengeling. Early interaction of feline calicivirus with cells in culture. *Arch Virol*, **1994** ; 136(1-2): 19-34.
- Kroneman, A, J Harris, H Vennema, E Duizer, Y van Duynhoven, J Gray, M Iturriza, B Bottiger, G Falkenhorst, C Johnsen, CH von Bonsdorff, L Maunula, M Kuusi, P Pothier, A Gallay, E Schreier, J Koch, G Szucs, G Reuter, K Krisztalovics, M Lynch, P McKeown, B Foley, S Coughlan, FM Ruggeri, I Di Bartolo, K Vainio, E Isakbaeva, M Poljsak-Prijatelj, AH Grom, A Bosch, J Buesa, AS Fauquier, G Hernandez-Pezzi, KO Hedlund and M Koopmans. Data quality of 5 years of central norovirus outbreak reporting in the European Network for food-borne viruses. *J Public Health (Oxf)*, **2008a** ; 30(1): 82-90.
- Kroneman, A, L Verhoef, J Harris, H Vennema, E Duizer, Y van Duynhoven, J Gray, M Iturriza, B Bottiger, G Falkenhorst, C Johnsen, CH von Bonsdorff, L Maunula, M Kuusi, P Pothier, A Gallay, E Schreier, M Hohne, J Koch, G Szucs, G Reuter, K Krisztalovics, M Lynch, P McKeown, B Foley, S Coughlan, FM Ruggeri, I Di Bartolo, K Vainio, E Isakbaeva, M Poljsak-Prijatelj, AH Grom, JZ Mijovski, A Bosch, J Buesa, AS Fauquier, G Hernandez-Pezzi, KO Hedlund and M Koopmans. Analysis of integrated virological and epidemiological reports of norovirus outbreaks collected within the foodborne viruses in Europe Network from 1 July 2001 to 30 June 2006. *J Clin Microbiol*, **2008b** ; 46(9): 2959-65.
- Kuritsky, JN, MT Osterholm, HB Greenberg, JA Korlath, JR Godes, CW Hedberg, JC Forfang, AZ Kapikian, JC McCullough and KE White. Norwalk gastroenteritis: a community outbreak associated with bakery product consumption. *Ann Intern Med*, **1984** ; 100(4): 519-21.
- Kuyumcu-Martinez, M, G Belliot, SV Sosnovtsev, KO Chang, KY Green and RE Lloyd. Calicivirus 3C-like proteinase inhibits cellular translation by cleavage of poly(A)-binding protein. *J Virol*, **2004** ; 78(15): 8172-82.

L

-
- Lambden, PR, EO Caul, CR Ashley and IN Clarke. Sequence and genome organization of a human small round-structured (Norwalk-like) virus. *Science*, **1993** ; 259(5094): 516-9.
- Laverick, MA, AP Wyn-Jones and MJ Carter. Quantitative RT-PCR for the enumeration of noroviruses (Norwalk-like viruses) in water and sewage. *Lett Appl Microbiol*, **2004** ; 39(2): 127-36.
- Le Guyader, F, MK Estes, ME Hardy, FH Neill, J Green, DW Brown and RL Atmar. Evaluation of a degenerate primer for the PCR detection of human caliciviruses. *Arch Virol*, **1996** ; 141(11): 2225-35.

- Le Guyader, F, L Haugarreau, L Miossec, E Dubois and M Pommepuy. Three-year study to assess human enteric viruses in shellfish. *Appl Environ Microbiol*, **2000** ; 66(8): 3241-8.
- Le Guyader, FS, C Mittelholzer, L Haugarreau, KO Hedlund, R Alsterlund, M Pommepuy and L Svensson. Detection of noroviruses in raspberries associated with a gastroenteritis outbreak. *Int J Food Microbiol*, **2004** ; 97(2): 179-86.
- Le Guyader, FS, F Bon, D DeMedici, S Parnaudeau, A Bertone, S Crudeli, A Doyle, M Zidane, E Suffredini, E Kohli, F Maddalo, M Monini, A Gallay, M Pommepuy, P Pothier and FM Ruggeri. Detection of multiple noroviruses associated with an international gastroenteritis outbreak linked to oyster consumption. *J Clin Microbiol*, **2006** ; 44(11): 3878-82.
- Le Guyader, FS, JC Le Saux, K Ambert-Balay, J Krol, O Serais, S Parnaudeau, H Giraudon, G Delmas, M Pommepuy, P Pothier and RL Atmar. Aichi virus, norovirus, astrovirus, enterovirus, and rotavirus involved in clinical cases from a French oyster-related gastroenteritis outbreak. *J Clin Microbiol*, **2008** ; 46(12): 4011-7.
- Le Pendu, J, S Marionneau, A Cailleau-Thomas, J Rocher, B Le Moullac-Vaidye and M Clement. ABH and Lewis histo-blood group antigens in cancer. *Apmis*, **2001** ; 109(1): 9-31.
- Le Pendu, J. Histo-blood group antigen and human milk oligosaccharides: genetic polymorphism and risk of infectious diseases. *Adv Exp Med Biol*, **2004** ; 554: 135-43.
- Le Pendu, J, N Ruvoen-Clouet, E Kindberg and L Svensson. Mendelian resistance to human norovirus infections. *Semin Immunol*, **2006** ; 18(6): 375-86.
- Lee, C and SJ Kim. The genetic diversity of human noroviruses detected in river water in Korea. *Water Res*, **2008** ; 42(17): 4477-84.
- Lee, N, MC Chan, B Wong, KW Choi, W Sin, G Lui, PK Chan, RW Lai, CS Cockram, JJ Sung and WK Leung. Fecal viral concentration and diarrhea in norovirus gastroenteritis. *Emerg Infect Dis*, **2007** ; 13(9): 1399-401.
- Lindell, AT, L Grillner, L Svensson and BZ Wirgart. Molecular epidemiology of norovirus infections in Stockholm, Sweden, during the years 2000 to 2003: association of the GGIIb genetic cluster with infection in children. *J Clin Microbiol*, **2005** ; 43(3): 1086-92.
- Lindesmith, L, C Moe, S Marionneau, N Ruvoen, X Jiang, L Lindblad, P Stewart, J LePendu and R Baric. Human susceptibility and resistance to Norwalk virus infection. *Nat Med*, **2003** ; 9(5): 548-53.
- Lindesmith, L, C Moe, J Lependu, JA Frelinger, J Treanor and RS Baric. Cellular and humoral immunity following Snow Mountain virus challenge. *J Virol*, **2005** ; 79(5): 2900-9.
- Lindesmith, LC, EF Donaldson, AD Lobue, JL Cannon, DP Zheng, J Vinje and RS Baric. Mechanisms of GII.4 norovirus persistence in human populations. *PLoS Med*, **2008** ; 5(2): e31.
- Liu, B, IN Clarke and PR Lambden. Polyprotein processing in Southampton virus: identification of 3C-like protease cleavage sites by in vitro mutagenesis. *J Virol*, **1996** ; 70(4): 2605-10.
- Liu, BL, PR Lambden, H Gunther, P Otto, M Elschner and IN Clarke. Molecular characterization of a bovine enteric calicivirus: relationship to the Norwalk-like viruses. *J Virol*, **1999** ; 73(1): 819-25.

- Lochridge, VP, KL Jutila, JW Graff and ME Hardy. Epitopes in the P2 domain of norovirus VP1 recognized by monoclonal antibodies that block cell interactions. *J Gen Virol*, **2005** ; 86(Pt 10): 2799-806.
- Lodder, WJ, J Vinje, R van De Heide, AM de Roda Husman, EJ Leenen and MP Koopmans. Molecular detection of Norwalk-like caliciviruses in sewage. *Appl Environ Microbiol*, **1999** ; 65(12): 5624-7.
- Lodder, WJ and AM de Roda Husman. Presence of noroviruses and other enteric viruses in sewage and surface waters in The Netherlands. *Appl Environ Microbiol*, **2005** ; 71(3): 1453-61.
- Loisy, F, P Le Cann, M Pommepuy and F Le Guyader. An improved method for the detection of Norwalk-like caliciviruses in environmental samples. *Lett Appl Microbiol*, **2000** ; 31(6): 411-5.
- Lopman, B, H Vennema, E Kohli, P Pothier, A Sanchez, A Negredo, J Buesa, E Schreier, M Reacher, D Brown, J Gray, M Iturriza, C Gallimore, B Bottiger, KO Hedlund, M Torven, CH von Bonsdorff, L Maunula, M Poljsak-Prijatelj, J Zimsek, G Reuter, G Szucs, B Melegh, L Svennson, Y van Duynhoven and M Koopmans. Increase in viral gastroenteritis outbreaks in Europe and epidemic spread of new norovirus variant. *Lancet*, **2004** ; 363(9410): 682-8.
- Lopman, BA, GK Adak, MH Reacher and DW Brown. Two epidemiologic patterns of norovirus outbreaks: surveillance in England and Wales, 1992-2000. *Emerg Infect Dis*, **2003a** ; 9(1): 71-7.
- Lopman, BA, MH Reacher, Y Van Duynhoven, FX Hanon, D Brown and M Koopmans. Viral gastroenteritis outbreaks in Europe, 1995-2000. *Emerg Infect Dis*, **2003b** ; 9(1): 90-6.
- Ludwig, A, O Adams, HJ Laws, H Schrotten and T Tenenbaum. Quantitative detection of norovirus excretion in pediatric patients with cancer and prolonged gastroenteritis and shedding of norovirus. *J Med Virol*, **2008** ; 80(8): 1461-7.

M

- Maeda, Y, Y Tohya, Y Matsuura, M Mochizuki and T Sugimura. Early interaction of canine calicivirus with cells is the major determinant for its cell tropism in vitro. *Vet Microbiol*, **2002** ; 87(4): 291-300.
- Marionneau, S, A Cailleau-Thomas, J Rocher, B Le Moullac-Vaidye, N Ruvoen, M Clement and J Le Pendu. ABH and Lewis histo-blood group antigens, a model for the meaning of oligosaccharide diversity in the face of a changing world. *Biochimie*, **2001** ; 83(7): 565-73.
- Marionneau, S, N Ruvoen, B Le Moullac-Vaidye, M Clement, A Cailleau-Thomas, G Ruiz-Palacois, P Huang, X Jiang and J Le Pendu. Norwalk virus binds to histo-blood group antigens present on gastroduodenal epithelial cells of secretor individuals. *Gastroenterology*, **2002** ; 122(7): 1967-77.
- Marionneau, S, F Airaud, NV Bovin, J Le Pendu and N Ruvoen-Clouet. Influence of the combined ABO, FUT2, and FUT3 polymorphism on susceptibility to Norwalk virus attachment. *J Infect Dis*, **2005** ; 192(6): 1071-7.

- Martella, V, M Campolo, E Lorusso, P Cavicchio, M Camero, AL Bellacicco, N Decaro, G Elia, G Greco, M Corrente, C Desario, S Arista, K Banyai, M Koopmans and C Buonavoglia. Norovirus in captive lion cub (*Panthera leo*). *Emerg Infect Dis*, **2007** ; 13(7): 1071-3.
- Martella, V, E Lorusso, N Decaro, G Elia, A Radogna, M D'Abramo, C Desario, A Cavalli, M Corrente, M Camero, CA Germinario, K Banyai, B Di Martino, F Marsilio, LE Carmichael and C Buonavoglia. Detection and molecular characterization of a canine norovirus. *Emerg Infect Dis*, **2008** ; 14(8): 1306-8.
- Mattison, K, A Shukla, A Cook, F Pollari, R Friendship, D Kelton, S Bidawid and JM Farber. Human noroviruses in swine and cattle. *Emerg Infect Dis*, **2007** ; 13(8): 1184-8.
- Mattison, K, E Grudeski, B Auk, H Charest, SJ Drews, A Fritzingler, N Gregoricus, S Hayward, A Houde, BE Lee, XL Pang, J Wong, TF Booth and J Vinje. A Multi-center Comparison of Two Norovirus ORF2-based Genotyping Protocols. *J Clin Microbiol*, **2009**.
- Mattner, F, D Sohr, A Heim, P Gastmeier, H Vennema and M Koopmans. Risk groups for clinical complications of norovirus infections: an outbreak investigation. *Clin Microbiol Infect*, **2006** ; 12(1): 69-74.
- Maunula, L, IT Miettinen and CH von Bonsdorff. Norovirus outbreaks from drinking water. *Emerg Infect Dis*, **2005** ; 11(11): 1716-21.
- McCarthy, M, MK Estes and KC Hyams. Norwalk-like virus infection in military forces: epidemic potential, sporadic disease, and the future direction of prevention and control efforts. *J Infect Dis*, **2000** ; 181 Suppl 2: S387-91.
- McLeod, C, B Hay, C Grant, G Greening and D Day. Localization of norovirus and poliovirus in Pacific oysters. *J Appl Microbiol*, **2009** ; 106(4): 1220-30.
- Mead, PS, L Slutsker, V Dietz, LF McCaig, JS Bresee, C Shapiro, PM Griffin and RV Tauxe. Food-related illness and death in the United States. *Emerg Infect Dis*, **1999** ; 5(5): 607-25.
- Meeroff, JC, DS Schreiber, JS Trier and NR Blacklow. Abnormal gastric motor function in viral gastroenteritis. *Ann Intern Med*, **1980** ; 92(3): 370-3.
- Meyers, G, C Wirblich and HJ Thiel. Rabbit hemorrhagic disease virus--molecular cloning and nucleotide sequencing of a calicivirus genome. *Virology*, **1991** ; 184(2): 664-76.
- Meyers, G. Translation of the minor capsid protein of a calicivirus is initiated by a novel termination-dependent reinitiation mechanism. *J Biol Chem*, **2003** ; 278(36): 34051-60.
- Morrow, AL, GM Ruiz-Palacios, X Jiang and DS Newburg. Human-milk glycans that inhibit pathogen binding protect breast-feeding infants against infectious diarrhea. *J Nutr*, **2005** ; 135(5): 1304-7.
- Mourant, A. Blood relations: blood groups and anthropology. **1983** ; Oxford, O. U. Press (ed.).
- Murata, K, H Egami, Y Shibata, K Sakamoto, A Misumi and M Ogawa. Expression of blood group-related antigens, ABH, Lewis(a), Lewis(b), Lewis(x), Lewis(y), CA19-9, and CSLEX1 in early cancer, intestinal metaplasia, and uninvolved mucosa of the stomach. *Am J Clin Pathol*, **1992** ; 98(1): 67-75.
- Murata, T, N Katsushima, K Mizuta, Y Muraki, S Hongo and Y Matsuzaki. Prolonged norovirus shedding in infants ≤ 6 months of age with gastroenteritis. *Pediatr Infect Dis J*, **2007** ; 26(1): 46-9.
- Myint, S, R Manley and D Cubitt. Viruses in bathing waters. *Lancet*, **1994** ; 343(8913): 1640-1.

Myrmel, M, EM Berg, B Grinde and E Rimstad. Enteric viruses in inlet and outlet samples from sewage treatment plants. *J Water Health*, **2006** ; 4(2): 197-209.

N

Nam, HJ, B Gurda-Whitaker, WY Gan, S Ilaria, R McKenna, P Mehta, RA Alvarez and M Agbandje-McKenna. Identification of the sialic acid structures recognized by minute virus of mice and the role of binding affinity in virulence adaptation. *J Biol Chem*, **2006** ; 281(35): 25670-7.

Nappier, SP, TK Graczyk and KJ Schwab. Bioaccumulation, retention, and depuration of enteric viruses by *Crassostrea virginica* and *Crassostrea ariakensis* oysters. *Appl Environ Microbiol*, **2008** ; 74(22): 6825-31.

Neill, JD and WL Mengeling. Further characterization of the virus-specific RNAs in feline calicivirus infected cells. *Virus Res*, **1988** ; 11(1): 59-72.

Neill, JD. Nucleotide sequence of a region of the feline calicivirus genome which encodes picornavirus-like RNA-dependent RNA polymerase, cysteine protease and 2C polypeptides. *Virus Res*, **1990** ; 17(3): 145-60.

Newburg, DS, GM Ruiz-Palacios, M Altaye, P Chaturvedi, J Meinen-Derr, L Guerrero Mde and AL Morrow. Innate protection conferred by fucosylated oligosaccharides of human milk against diarrhea in breastfed infants. *Glycobiology*, **2004** ; 14(3): 253-63.

Newburg, DS. Neonatal protection by an innate immune system of human milk consisting of oligosaccharides and glycans. *J Anim Sci*, **2009** ; 87(13 Suppl): 26-34.

Nicollier-Jamot, B, V Pico, P Pothier and E Kohli. Molecular cloning, expression, self-assembly, antigenicity, and seroepidemiology of a genogroup II norovirus isolated in France. *J Clin Microbiol*, **2003** ; 41(8): 3901-4.

Nilsson, M, KO Hedlund, M Thorhagen, G Larson, K Johansen, A Ekspong and L Svensson. Evolution of human calicivirus RNA in vivo: accumulation of mutations in the protruding P2 domain of the capsid leads to structural changes and possibly a new phenotype. *J Virol*, **2003** ; 77(24): 13117-24.

Noda, M, S Fukuda and O Nishio. Statistical analysis of attack rate in norovirus foodborne outbreaks. *Int J Food Microbiol*, **2008** ; 122(1-2): 216-20.

O

O'Ryan, ML, PA Vial, N Mamani, X Jiang, MK Estes, C Ferrecio, H Lakkis and DO Matson. Seroprevalence of Norwalk virus and Mexico virus in Chilean individuals: assessment of independent risk factors for antibody acquisition. *Clin Infect Dis*, **1998** ; 27(4): 789-95.

Ohlinger, VF, B Haas, G Meyers, F Weiland and HJ Thiel. Identification and characterization of the virus causing rabbit hemorrhagic disease. *J Virol*, **1990** ; 64(7): 3331-6.

Okhuysen, PC, X Jiang, L Ye, PC Johnson and MK Estes. Viral shedding and fecal IgA response after Norwalk virus infection. *J Infect Dis*, **1995** ; 171(3): 566-9.

Oliver, SL, E Asobayire, AM Dastjerdi and JC Bridger. Genomic characterization of the unclassified bovine enteric virus Newbury agent-1 (Newbury1) endorses a new genus in the family Caliciviridae. *Virology*, **2006** ; 350(1): 240-50.

- Oliver, SL, E Asobayire, A Charpilienne, J Cohen and JC Bridger. Complete genomic characterization and antigenic relatedness of genogroup III, genotype 2 bovine noroviruses. *Arch Virol*, **2007** ; 152(2): 257-72.
- Oriol, R, JJ Candelier and R Mollicone. Molecular genetics of H. *Vox Sang*, **2000** ; 78 Suppl 2: 105-8.
- Oriol, R, I Martinez-Duncker, I Chantret, R Mollicone and P Codogno. Common origin and evolution of glycosyltransferases using Dol-P-monosaccharides as donor substrate. *Mol Biol Evol*, **2002** ; 19(9): 1451-63.
- Oyoyo, BA, R Soderquist, M Lesmana, D Subekti, P Tjaniadi, DJ Fryauff, AL Corwin, E Richie and C Lebron. Norwalk-like virus and bacterial pathogens associated with cases of gastroenteritis onboard a US Navy ship. *Am J Trop Med Hyg*, **1999** ; 61(6): 904-8.

P

- Parashar, UD, L Dow, RL Fankhauser, CD Humphrey, J Miller, T Ando, KS Williams, CR Eddy, JS Noel, T Ingram, JS Bresee, SS Monroe and RI Glass. An outbreak of viral gastroenteritis associated with consumption of sandwiches: implications for the control of transmission by food handlers. *Epidemiol Infect*, **1998** ; 121(3): 615-21.
- Parashar, UD, EG Hummelman, JS Bresee, MA Miller and RI Glass. Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. *Emerg Infect Dis*, **2003** ; 9(5): 565-72.
- Parra, F and M Prieto. Purification and characterization of a calicivirus as the causative agent of a lethal hemorrhagic disease in rabbits. *J Virol*, **1990** ; 64(8): 4013-5.
- Parrino, TA, DS Schreiber, JS Trier, AZ Kapikian and NR Blacklow. Clinical immunity in acute gastroenteritis caused by Norwalk agent. *N Engl J Med*, **1977** ; 297(2): 86-9.
- Parshionikar, SU, S Willian-True, GS Fout, DE Robbins, SA Seys, JD Cassady and R Harris. Waterborne outbreak of gastroenteritis associated with a norovirus. *Appl Environ Microbiol*, **2003** ; 69(9): 5263-8.
- Patel, MM, AJ Hall, J Vinje and UD Parashar. Noroviruses: a comprehensive review. *J Clin Virol*, **2009** ; 44(1): 1-8.
- Peter-Katalinic, J. Methods in enzymology: O-glycosylation of proteins. *Methods Enzymol*, **2005** ; 405: 139-71.
- Pfister, T and E Wimmer. Polypeptide p41 of a Norwalk-like virus is a nucleic acid-independent nucleoside triphosphatase. *J Virol*, **2001** ; 75(4): 1611-9.
- Phan, TG, T Kuroiwa, K Kaneshi, Y Ueda, S Nakaya, S Nishimura, A Yamamoto, K Sugita, T Nishimura, F Yagyu, S Okitsu, WE Muller, N Maneeekarn and H Ushijima. Changing distribution of norovirus genotypes and genetic analysis of recombinant GIIb among infants and children with diarrhea in Japan. *J Med Virol*, **2006** ; 78(7): 971-8.
- Ponka, A, L Maunula, CH Von Bonsdorff and O Lytikainen. Outbreak of calicivirus gastroenteritis associated with eating frozen raspberries. *Euro Surveill*, **1999a** ; 4(6): 66-69.
- Ponka, A, L Maunula, CH von Bonsdorff and O Lytikainen. An outbreak of calicivirus associated with consumption of frozen raspberries. *Epidemiol Infect*, **1999b** ; 123(3): 469-74.

- Prasad, BV, R Rothnagel, X Jiang and MK Estes. Three-dimensional structure of baculovirus-expressed Norwalk virus capsids. *J Virol*, **1994** ; 68(8): 5117-25.
- Prasad, BV, ME Hardy, X Jiang and MK Estes. Structure of Norwalk virus. *Arch Virol Suppl*, **1996** ; 12: 237-42.
- Prasad, BV, ME Hardy, T Dokland, J Bella, MG Rossmann and MK Estes. X-ray crystallographic structure of the Norwalk virus capsid. *Science*, **1999** ; 286(5438): 287-90.
- Prasad, BV, S Crawford, JA Lawton, J Pesavento, M Hardy and MK Estes. Structural studies on gastroenteritis viruses. *Novartis Found Symp*, **2001** ; 238: 26-37 ; discussion 37-46.

R

- Ramirez, S, S De Grazia, GM Giammanco, M Milici, C Colomba, FM Ruggeri, V Martella and S Arista. Detection of the norovirus variants GGII.4 hunter and GGIIb/hilversum in Italian children with gastroenteritis. *J Med Virol*, **2006** ; 78(12): 1656-62.
- Ravn, V and E Dabelsteen. Tissue distribution of histo-blood group antigens. *APMIS*, **2000** ; 108(1): 1-28.
- Reid, JA, EO Caul, DG White and SR Palmer. Role of infected food handler in hotel outbreak of Norwalk-like viral gastroenteritis: implications for control. *Lancet*, **1988** ; 2(8606): 321-3.
- Reimerink, J, F Stelma, B Rockx, D Brouwer, E Stobberingh, R van Ree, E Dompeling, M Mommers, C Thijs and M Koopmans. Early-life rotavirus and norovirus infections in relation to development of atopic manifestation in infants. *Clin Exp Allergy*, **2009** ; 39(2): 254-60.
- Richards, GP, MA Watson and DH Kingsley. A SYBR green, real-time RT-PCR method to detect and quantitate Norwalk virus in stools. *J Virol Methods*, **2004** ; 116(1): 63-70.
- Rockx, B, M De Wit, H Vennema, J Vinje, E De Bruin, Y Van Duynhoven and M Koopmans. Natural history of human calicivirus infection: a prospective cohort study. *Clin Infect Dis*, **2002** ; 35(3): 246-53.
- Rohayem, J, J Munch and A Rethwilm. Evidence of recombination in the norovirus capsid gene. *J Virol*, **2005** ; 79(8): 4977-90.
- Ruvoen-Clouet, N, JP Ganiere, G Andre-Fontaine, D Blanchard and J Le Pendu. Binding of rabbit hemorrhagic disease virus to antigens of the ABH histo-blood group family. *J Virol*, **2000** ; 74(24): 11950-4.
- Ruvoën-Clouet, N and J Le Pendu. Fixation des norovirus sur des glycanes : conséquences biologiques et perspectives prophylactiques. *Virol*, **2004** ; 8: 425-34.
- Rydell, GE, J Nilsson, J Rodriguez-Diaz, N Ruvoen-Clouet, L Svensson, J Le Pendu and G Larson. Human noroviruses recognize sialyl Lewis x neoglycoprotein. *Glycobiology*, **2009** ; 19(3): 309-20.
- Rzesutka, A and N Cook. Survival of human enteric viruses in the environment and food. *FEMS Microbiol Rev*, **2004** ; 28(4): 441-53.

S

- Schaffer, FL, DW Ehresmann, MK Fretz and MI Soergel. A protein, VPg, covalently linked to 36S calicivirus RNA. *J Gen Virol*, **1980** ; 47(1): 215-20.
- Schreiber, DS, NR Blacklow and JS Trier. The mucosal lesion of the proximal small intestine in acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *N Engl J Med*, **1973** ; 288(25): 1318-23.
- Schuck, P. Use of surface plasmon resonance to probe the equilibrium and dynamic aspects of interactions between biological macromolecules. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, **1997** ; 26: 541-66.
- Schwab, KJ, FH Neill, MK Estes, TG Metcalf and RL Atmar. Distribution of Norwalk virus within shellfish following bioaccumulation and subsequent depuration by detection using RT-PCR. *J Food Prot*, **1998** ; 61(12): 1674-80.
- Sdiri-Loulizi, K, H Gharbi-Khelifi, A de Rougemont, S Chouchane, N Sakly, K Ambert-Balay, M Hassine, MN Guediche, M Aouni and P Pothier. Acute infantile gastroenteritis associated with human enteric viruses in Tunisia. *J Clin Microbiol*, **2008** ; 46(4): 1349-55.
- Seah, EL, IC Gunesekere, JA Marshall and PJ Wright. Variation in ORF3 of genogroup 2 Norwalk-like viruses. *Arch Virol*, **1999** ; 144(5): 1007-14.
- Seah, EL, JA Marshall and PJ Wright. Trans activity of the norovirus Camberwell proteinase and cleavage of the N-terminal protein encoded by ORF1. *J Virol*, **2003** ; 77(12): 7150-5.
- Sharp, TW, KC Hyams, D Watts, AF Trofa, GJ Martin, AZ Kapikian, KY Green, X Jiang, MK Estes, M Waack and et al. Epidemiology of Norwalk virus during an outbreak of acute gastroenteritis aboard a US aircraft carrier. *J Med Virol*, **1995** ; 45(1): 61-7.
- Shirato, H, S Ogawa, H Ito, T Sato, A Kameyama, H Narimatsu, Z Xiaofan, T Miyamura, T Wakita, K Ishii and N Takeda. Noroviruses distinguish between type 1 and type 2 histo-blood group antigens for binding. *J Virol*, **2008** ; 82(21): 10756-67.
- Shoemaker, GK, E van Duijn, SE Crawford, C Uetrecht, M Baclayon, WH Roos, GJ Wuite, MK Estes, BV Prasad and AJ Heck. Norwalk virus assembly and stability monitored by mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics*, **2010** ; 9(8): 1742-51.
- Shulman, M, CD Wilde and G Kohler. A better cell line for making hybridomas secreting specific antibodies. *Nature*, **1978** ; 276(5685): 269-70.
- Siebenga, JJ, H Vennema, B Renckens, E de Bruin, B van der Veer, RJ Siezen and M Koopmans. Epochal evolution of GGII.4 norovirus capsid proteins from 1995 to 2006. *J Virol*, **2007** ; 81(18): 9932-41.
- Siebenga, JJ, MF Beersma, H Vennema, P van Biezen, NJ Hartwig and M Koopmans. High prevalence of prolonged norovirus shedding and illness among hospitalized patients: a model for in vivo molecular evolution. *J Infect Dis*, **2008** ; 198(7): 994-1001.
- Siebenga, JJ, H Vennema, DP Zheng, J Vinje, BE Lee, XL Pang, EC Ho, W Lim, A Choudekar, S Broor, T Halperin, NB Rasool, J Hewitt, GE Greening, M Jin, ZJ Duan, Y Lucero, M O'Ryan, M Hoehne, E Schreier, RM Ratcliff, PA White, N Iritani, G Reuter and M Koopmans. Norovirus illness is a global problem: emergence and spread of norovirus GII.4 variants, 2001-2007. *J Infect Dis*, **2009** ; 200(5): 802-12.

- Siebenga, JJ, P Lemey, SL Kosakovsky Pond, A Rambaut, H Vennema and M Koopmans. Phylodynamic reconstruction reveals norovirus GII.4 epidemic expansions and their molecular determinants. *PLoS Pathog*, **2010** ; 6(5): e1000884.
- Siegel, JD, E Rhinehart, M Jackson and L Chiarello. 2007 Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Health Care Settings. *Am J Infect Control*, **2007** ; 35(10 Suppl 2): S65-164.
- Simmonds, P, I Karakasiliotis, D Bailey, Y Chaudhry, DJ Evans and IG Goodfellow. Bioinformatic and functional analysis of RNA secondary structure elements among different genera of human and animal caliciviruses. *Nucleic Acids Res*, **2008** ; 36(8): 2530-46.
- Smiley, JR, KO Chang, J Hayes, J Vinje and LJ Saif. Characterization of an enteropathogenic bovine calicivirus representing a potentially new calicivirus genus. *J Virol*, **2002** ; 76(20): 10089-98.
- Smit, TK, P Bos, I Peenze, X Jiang, MK Estes and AD Steele. Seroepidemiological study of genogroup I and II calicivirus infections in South and southern Africa. *J Med Virol*, **1999** ; 59(2): 227-31.
- Smith, AW, TG Akers, SH Madin and NA Vedros. San Miguel sea lion virus isolation, preliminary characterization and relationship to vesicular exanthema of swine virus. *Nature*, **1973** ; 244(5411): 108-10.
- Smith, GE, MJ Fraser and MD Summers. Molecular Engineering of the Autographa californica Nuclear Polyhedrosis Virus Genome: Deletion Mutations Within the Polyhedrin Gene. *J Virol*, **1983** ; 46(2): 584-93.
- Sosnovtsev, SV and KY Green. Identification and genomic mapping of the ORF3 and VPg proteins in feline calicivirus virions. *Virology*, **2000** ; 277(1): 193-203.
- Sosnovtsev, SV, M Garfield and KY Green. Processing map and essential cleavage sites of the nonstructural polyprotein encoded by ORF1 of the feline calicivirus genome. *J Virol*, **2002** ; 76(14): 7060-72.
- Sosnovtsev, SV, G Belliot, KO Chang, O Onwudiwe and KY Green. Feline calicivirus VP2 is essential for the production of infectious virions. *J Virol*, **2005** ; 79(7): 4012-24.
- Sosnovtsev, SV, G Belliot, KO Chang, VG Prikhodko, LB Thackray, CE Wobus, SM Karst, HW Virgin and KY Green. Cleavage map and proteolytic processing of the murine norovirus nonstructural polyprotein in infected cells. *J Virol*, **2006** ; 80(16): 7816-31.
- Sosnovtseva, SA, SV Sosnovtsev and KY Green. Mapping of the feline calicivirus proteinase responsible for autocatalytic processing of the nonstructural polyprotein and identification of a stable proteinase-polymerase precursor protein. *J Virol*, **1999** ; 73(8): 6626-33.
- Stenberg, E, B Persson, H Roos and C Urbaniczky. Quantitative determination of surface concentration of protein with surface plasmon resonance using radiolabeled proteins. *J. Colloid Interface Sci.* , **1991** ; 143(2): 513-526.
- Sugieda, M and S Nakajima. Viruses detected in the caecum contents of healthy pigs representing a new genetic cluster in genogroup II of the genus "Norwalk-like viruses". *Virus Res*, **2002** ; 87(2): 165-72.
- Sukhrie, FH, JJ Siebenga, MF Beersma and M Koopmans. Chronic shedders as reservoir for nosocomial transmission of norovirus. *J Clin Microbiol*, **2010** ; 48(11): 4303-5.

T

- Tacket, CO, HS Mason, G Losonsky, MK Estes, MM Levine and CJ Arntzen. Human immune responses to a novel norwalk virus vaccine delivered in transgenic potatoes. *J Infect Dis*, **2000** ; 182(1): 302-5.
- Tacket, CO, MB Sztein, GA Losonsky, SS Wasserman and MK Estes. Humoral, mucosal, and cellular immune responses to oral Norwalk virus-like particles in volunteers. *Clin Immunol*, **2003** ; 108(3): 241-7.
- Tamura, K, J Dudley, M Nei and S Kumar. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol*, **2007** ; 24(8): 1596-9.
- Tamura, M, K Natori, M Kobayashi, T Miyamura and N Takeda. Genogroup II noroviruses efficiently bind to heparan sulfate proteoglycan associated with the cellular membrane. *J Virol*, **2004** ; 78(8): 3817-26.
- Tan, M, P Huang, J Meller, W Zhong, T Farkas and X Jiang. Mutations within the P2 domain of norovirus capsid affect binding to human histo-blood group antigens: evidence for a binding pocket. *J Virol*, **2003** ; 77(23): 12562-71.
- Tan, M, RS Hegde and X Jiang. The P domain of norovirus capsid protein forms dimer and binds to histo-blood group antigen receptors. *J Virol*, **2004** ; 78(12): 6233-42.
- Tan, M and X Jiang. The p domain of norovirus capsid protein forms a subviral particle that binds to histo-blood group antigen receptors. *J Virol*, **2005a** ; 79(22): 14017-30.
- Tan, M and X Jiang. Norovirus and its histo-blood group antigen receptors: an answer to a historical puzzle. *Trends Microbiol*, **2005b** ; 13(6): 285-93.
- Tan, M, P Fang, T Chachiyo, M Xia, P Huang, Z Fang, W Jiang and X Jiang. Noroviral P particle: structure, function and applications in virus-host interaction. *Virology*, **2008a** ; 382(1): 115-23.
- Tan, M, M Xia, S Cao, P Huang, T Farkas, J Meller, RS Hegde, X Li, Z Rao and X Jiang. Elucidation of strain-specific interaction of a GII-4 norovirus with HBGA receptors by site-directed mutagenesis study. *Virology*, **2008b** ; 379(2): 324-34.
- Tan, M, M Xia, Y Chen, W Bu, RS Hegde, J Meller, X Li and X Jiang. Conservation of carbohydrate binding interfaces: evidence of human HBGA selection in norovirus evolution. *PLoS One*, **2009** ; 4(4): e5058.
- Tan, M and X Jiang. Norovirus gastroenteritis, carbohydrate receptors, and animal models. *PLoS Pathog*, **2010** ; 6(8).
- Taube, S, JW Perry, K Yetming, SP Patel, H Auble, L Shu, HF Nawar, CH Lee, TD Connell, JA Shayman and CE Wobus. Ganglioside-linked terminal sialic acid moieties on murine macrophages function as attachment receptors for murine noroviruses. *J Virol*, **2009** ; 83(9): 4092-101.
- Teunis, PF, CL Moe, P Liu, SE Miller, L Lindesmith, RS Baric, J Le Pendu and RL Calderon. Norwalk virus: how infectious is it? *J Med Virol*, **2008** ; 80(8): 1468-76.
- Thackray, LB, CE Wobus, KA Chachu, B Liu, ER Alegre, KS Henderson, ST Kelley and HWt Virgin. Murine noroviruses comprising a single genogroup exhibit biological diversity despite limited sequence divergence. *J Virol*, **2007** ; 81(19): 10460-73.

- Thornton, SA, SS Sherman, T Farkas, W Zhong, P Torres and X Jiang. Gastroenteritis in US Marines during Operation Iraqi Freedom. *Clin Infect Dis*, **2005** ; 40(4): 519-25.
- Thorven, M, A Grahn, KO Hedlund, H Johansson, C Wahlfrid, G Larson and L Svensson. A homozygous nonsense mutation (428G-->A) in the human secretor (FUT2) gene provides resistance to symptomatic norovirus (GGII) infections. *J Virol*, **2005** ; 79(24): 15351-5.
- Torner, N, A Dominguez, L Ruiz, A Martinez, R Bartolome, J Buesa, MD Ferrer and G Catalan. Viral Gastroenteritis Study. Acute gastroenteritis outbreaks in Catalonia, Spain: norovirus versus Salmonella. *Scand J Gastroenterol*, **2008** ; 43(5): 567-73.
- Traore, O, G Belliot, C Mollat, H Piloquet, C Chamoux, H Laveran, SS Monroe and S Billaudel. RT-PCR identification and typing of astroviruses and Norwalk-like viruses in hospitalized patients with gastroenteritis: evidence of nosocomial infections. *J Clin Virol*, **2000** ; 17(3): 151-8.
- Tu, ET, T Nguyen, P Lee, RA Bull, J Musto, G Hansman, PA White, WD Rawlinson and CJ McIver. Norovirus GII.4 strains and outbreaks, Australia. *Emerg Infect Dis*, **2007** ; 13(7): 1128-30.
- Tu, ET, RA Bull, MJ Kim, CJ McIver, L Heron, WD Rawlinson and PA White. Norovirus excretion in an aged-care setting. *J Clin Microbiol*, **2008** ; 46(6): 2119-21.

U

- Ueki, Y, D Sano, T Watanabe, K Akiyama and T Omura. Norovirus pathway in water environment estimated by genetic analysis of strains from patients of gastroenteritis, sewage, treated wastewater, river water and oysters. *Water Res*, **2005** ; 39(18): 4271-80.

V

- van den Berg, H, W Lodder, W van der Poel, H Vennema and AM de Roda Husman. Genetic diversity of noroviruses in raw and treated sewage water. *Res Microbiol*, **2005** ; 156(4): 532-40.
- Venkataram Prasad, BV, ME Hardy and MK Estes. Structural studies of recombinant Norwalk capsids. *J Infect Dis*, **2000** ; 181 Suppl 2: S317-21.
- Vennema, H, E de Bruin and M Koopmans. Rational optimization of generic primers used for Norwalk-like virus detection by reverse transcriptase polymerase chain reaction. *J Clin Virol*, **2002** ; 25(2): 233-5.
- Verhoef, L, E Depoortere, I Boxman, E Duizer, Y van Duynhoven, J Harris, C Johnsen, A Kroneman, S Le Guyader, W Lim, L Maunula, H Meldal, R Ratcliff, G Reuter, E Schreier, J Siebenga, K Vainio, C Varela, H Vennema and M Koopmans. Emergence of new norovirus variants on spring cruise ships and prediction of winter epidemics. *Emerg Infect Dis*, **2008** ; 14(2): 238-43.
- Vinje, J and MP Koopmans. Molecular detection and epidemiology of small round-structured viruses in outbreaks of gastroenteritis in the Netherlands. *J Infect Dis*, **1996** ; 174(3): 610-5.

Vinje, J and MP Koopmans. Simultaneous detection and genotyping of "Norwalk-like viruses" by oligonucleotide array in a reverse line blot hybridization format. *J Clin Microbiol*, **2000** ; 38(7): 2595-601.

Vinje, J, RA Hamidjaja and MD Sobsey. Development and application of a capsid VP1 (region D) based reverse transcription PCR assay for genotyping of genogroup I and II noroviruses. *J Virol Methods*, **2004** ; 116(2): 109-17.

W

Wang, D, Q Wu, X Kou, L Yao and J Zhang. Distribution of norovirus in oyster tissues. *J Appl Microbiol*, **2008** ; 105(6): 1966-72.

Wang, QH, MG Han, S Cheetham, M Souza, JA Funk and LJ Saif. Porcine noroviruses related to human noroviruses. *Emerg Infect Dis*, **2005** ; 11(12): 1874-81.

White, PA, GS Hansman, A Li, J Dable, M Isaacs, M Ferson, CJ McIver and WD Rawlinson. Norwalk-like virus 95/96-US strain is a major cause of gastroenteritis outbreaks in Australia. *J Med Virol*, **2002** ; 68(1): 113-8.

Widdowson, MA, EH Cramer, L Hadley, JS Bresee, RS Beard, SN Bulens, M Charles, W Chege, E Isakbaeva, JG Wright, E Mintz, D Forney, J Massey, RI Glass and SS Monroe. Outbreaks of acute gastroenteritis on cruise ships and on land: identification of a predominant circulating strain of norovirus--United States, 2002. *J Infect Dis*, **2004** ; 190(1): 27-36.

Wingfield, T, CI Gallimore, J Xerry, JJ Gray, P Klapper, M Guiver and TJ Blanchard. Chronic norovirus infection in an HIV-positive patient with persistent diarrhoea: a novel cause. *J Clin Virol*, **2010** ; 49(3): 219-22.

Wobus, CE, SM Karst, LB Thackray, KO Chang, SV Sosnovtsev, G Belliot, A Krug, JM Mackenzie, KY Green and HW Virgin. Replication of Norovirus in cell culture reveals a tropism for dendritic cells and macrophages. *PLoS Biol*, **2004** ; 2(12): e432.

Wyatt, RG, R Dolin, NR Blacklow, HL DuPont, RF Buscho, TS Thornhill, AZ Kapikian and RM Chanock. Comparison of three agents of acute infectious nonbacterial gastroenteritis by cross-challenge in volunteers. *J Infect Dis*, **1974** ; 129(6): 709-14.

X

Xia, M, T Farkas and X Jiang. Norovirus capsid protein expressed in yeast forms virus-like particles and stimulates systemic and mucosal immunity in mice following an oral administration of raw yeast extracts. *J Med Virol*, **2007** ; 79(1): 74-83.

Y

Yamashita, Y, YS Chung, R Horie, R Kannagi and M Sowa. Alterations in gastric mucin with malignant transformation: novel pathway for mucin synthesis. *J Natl Cancer Inst*, **1995** ; 87(6): 441-6.

Z

- Zahorsky, J. Hyperemesis hiemis or the winter vomiting disease. *Arch Pediatr*, **1929** ; 46: 391-395.
- Zakhour, M, N Ruvoen-Clouet, A Charpilienne, B Langpap, D Poncet, T Peters, N Bovin and J Le Pendu. The alphaGal epitope of the histo-blood group antigen family is a ligand for bovine norovirus Newbury2 expected to prevent cross-species transmission. *PLoS Pathog*, **2009** ; 5(7): e1000504.
- Zheng, DP, T Ando, RL Fankhauser, RS Beard, RI Glass and SS Monroe. Norovirus classification and proposed strain nomenclature. *Virology*, **2006** ; 346(2): 312-23.
- Zheng, DP, MA Widdowson, RI Glass and J Vinje. Molecular epidemiology of genogroup II-genotype 4 noroviruses in the United States between 1994 and 2006. *J Clin Microbiol*, **2010** ; 48(1): 168-77.