



HAL
open science

Interactions Norovirus-Hôte au cours de Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin

Georges Tarris

► **To cite this version:**

Georges Tarris. Interactions Norovirus-Hôte au cours de Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université Bourgogne Franche-Comté, 2021. Français. NNT : 2021UBFCI011 . tel-03619571

HAL Id: tel-03619571

<https://theses.hal.science/tel-03619571>

Submitted on 25 Mar 2022

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.



THESE DE DOCTORAT DE L'ETABLISSEMENT UNIVERSITE BOURGOGNE FRANCHE-COMTE

Préparée à :
UMR 1098 - RHG - Interaction hôte-greffon-tumeur et ingénierie cellulaire et génique
UMR PAM A02.102 « Procédés Alimentaires et Microbiologiques »

Ecole doctorale n°554, Environnement-Santé (ED-ES)

Spécialité : Médecine, biochimie, biologie cellulaire et moléculaire, physiologie et nutrition

Par

Monsieur TARRIS Georges

Interactions Norovirus-Hôte au cours de Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin

Thèse présentée et soutenue publiquement à l'U.F.R. des Sciences de Santé de Dijon le 28/10/2021

Composition du Jury :

M.	de ROUGEMONT Alexis	PU-PH – Université de Bourgogne-Franche Comté	Président
M.	TERRIS Benoit	PU-PH – Université Paris Descartes	Rapporteur
M ^{me}	SCHVOERER Evelyne	PU-PH – Université de Lorraine	Rapporteur
M.	GAUCHOTTE Guillaume	PU-PH – Université de Lorraine	Examineur
M.	MARTIN Laurent	PU-PH – Université de Bourgogne-Franche Comté	Directeur de thèse
M.	BELLIOT Gaël	Ingénieur de recherche – Université de Bourgogne-Franche Comté	Directeur de thèse

*« Si tu sais que tu ne sais pas, alors tu sauras.
Si tu ne sais pas que tu ne sais pas, alors tu ne sauras jamais.
Et si tu sais, alors fais le savoir ! »*

Proverbe malien.

Remerciements

A mes encadrants :

À **Monsieur le Docteur Gaël BELLLOT**, merci pour cette belle aventure humaine et intellectuelle durant toutes ces années. Le chemin a été parsemé d'embûches, mais vous avez toujours été là pour m'aider et me soutenir quoi qu'il arrive.

À **Monsieur le Professeur Laurent MARTIN**, merci de m'avoir élevé au rang de Pathologiste, de faire de moi le médecin accompli que je suis aujourd'hui, de m'avoir soutenu et formé pendant toutes ces années, et de me donner la possibilité de vous rejoindre dans les rangs de l'Université.

A mon jury de thèse

Au **président de jury de ma thèse d'université, Monsieur le Professeur Alexis de ROUGEMONT**, merci pour votre soutien dans mon long parcours, et votre accueil dans le laboratoire de Virologie-Sérologie. À **Madame le Professeur Evelyne SCHVOERER**, que je remercie également d'être rapportrice de ma thèse, virologue dans un centre d'excellence sur les MICI. À **Monsieur le Professeur Benoît TERRIS**, que je remercie d'être rapporteur de ma thèse, avec qui j'ai le souhait de collaborer sur la thématique de la pathologie gastro-intestinale dans l'avenir. À **Monsieur le Professeur Guillaume GAUCHOTTE**, que je remercie d'être examinateur et avec qui je souhaite développer l'enseignement pédagogique de l'Anatomie Pathologique dans la région Grand Est.

Aux membres de l'Université qui m'ont apporté leur aide et leur confiance

À **Monsieur le Professeur Patrick CALLIER** et le **Dr. Davide CALLEGARIN**, **Monsieur le Professeur Bernard BONNOTTE**, **Monsieur le Professeur SAMSON** et **Monsieur le Professeur AUDIA**, **Monsieur le Docteur Mathieu LEGENDRE** et **Monsieur le Professeur Jean-Michel REBIBOU**, **Monsieur le Professeur Olivier BOUCHOT**, **Monsieur le Professeur Didier CARNET**, **Madame le Professeur Anaïs CARNET**, **Madame le Docteur Stéphanie LEMAIRE**.

Aux personnes qui m'ont aidé dans mes projets de recherche

À **Madame Marie-Anaïs ESTIENNEY**, qui m'a aidé et soutenu pendant tout ce temps. Merci infiniment Marie pour tout ce que tu as fait pour moi. Je te souhaite le meilleur. **Madame Magalie DARNIAUX**, **Madame Cécile PITOSET**, **Monsieur Philippe DAVAL**, **Madame le Docteur Catherine MANOHA**, **Madame le Docteur Christelle AUVRAY**, **Monsieur le Docteur Jean-Baptiste BOUR**, **Monsieur le Docteur Davide AGNELLO**, merci à vous tous de m'avoir accueilli comme l'un des vôtres, **Lucie THERY**, **Jérôme KAPLON**, **Madame le Docteur Haingo ANDRIANIINA**, **Madame Anne-Cécile LARIOTTE**, merci à toi d'avoir été là pour moi, **Madame Carole TRIGO**, **Madame Karine SÉ**, **Madame Claire BOILLIN**, **Monsieur Damien AUBIGNAT**, **Madame Sophie LEGRAND**, **Madame Amandine MALLE**, **Madame Cindy PHILIPPOT**, **Madame Stéphanie LONGEARRET**, **Madame Lyse-Marie DUBOIS**, **Monsieur le Docteur Serge AHO**.

A ma famille

À **mon père, Monsieur le Docteur Jean-Louis Sami TARRIS** qui n'est plus là, mais qui sera toujours là dans mon cœur.

À **ma mère, Marie-France Ahlam TARRIS-MAKSOU**, merci d'avoir été là pour moi durant toute ma vie. Je t'aime Maman.

À **ma sœur, Stéphanie TARRIS**, merci d'être ma sœur et d'avoir été là pour moi pour la vie. Je t'aime Stef.

À **mes oncles et tantes, mes amis, et cousins, mes deux grands-pères et grands-mères et à toute ma grande famille**.

A mes amis en France et dans le monde entier qui se reconnaîtront.



Titre : Interactions Norovirus-Hôte au cours de Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin

Mots clés : MICI, Colite, HBGA, FUT2, Norovirus, Sécréteur

Résumé : Les Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin (MICI) touchent plus de 200.000 patients en France, et comprennent la maladie de Crohn (MC) qui affecte tout l'appareil digestif, et la rectocolite hémorragique (RCH), qui touche uniquement le côlon et le rectum. L'étiologie de ces affections impliquerait des facteurs génétiques, immunologiques et microbiologiques, le rôle des virus restant à élucider. Parmi ceux-ci, les norovirus humains sont la principale cause de gastro-entérites virales. L'attachement des norovirus à la paroi intestinale s'effectue par le biais des antigènes tissulaires de groupe sanguin (ABH(O) et Lewis). L'expression de ces antigènes varie en fonction du tissu et de l'état physiologique ou pathologique. Chez la personne saine, l'expression de ces antigènes se fait exclusivement dans l'intestin grêle et dans une moindre mesure, dans le côlon proximal. L'objectif de la thèse a été de déterminer l'expression de ces antigènes et les profils d'accroche des VLP sur des tissus inflammatoires de 24 patients souffrant de MC et de RCH lors de poussées inflammatoires et de tissus sains et inflammatoires de 17 patients non-sécréteurs (1 patient souffrant de MC et 16 patients sains). Nous avons donc cherché à démontrer l'expression des HBGA selon le phénotype « sécréteur » (expression ABH(O), Le^b, Le^y) ou « non sécréteur » (expression Le^a, Le^x), de patients sains et atteints de MICI, et à définir le rôle de ces antigènes dans l'accroche des norovirus en utilisant des particules virales de synthèse (VLP) dérivées de norovirus humains. Les expériences d'accroche de VLP GII.4 (génotype prédominant dans le monde), réalisées sur des tissus provenant de pièces opératoires de MICI, prouvent la reconnaissance des VLP sur les tissus inflammatoires du grêle (MC) et du colon (MC et RCH).

Sur ces muqueuses inflammatoires colique et rectale des patients sécréteurs et non-sécréteurs, nous avons observé une surexpression des antigènes Le^a et Le^x sur les muqueuses régénératives, que ce soit sous leur forme sialylée (sLe^a et sLe^x) ou non-sialylée. Nous avons ainsi démontré que l'accroche spécifique des VLP sur ces muqueuses inflammatoires se faisait par le biais de l'antigène Le^a et dans une moindre mesure Le^x et cela en l'absence des antigènes ABH(O), pas ou peu exprimées par les zones régénératives. Chez les individus non-sécréteurs sains de l'étude, nous avons également observé la suppression de l'attachement des VLP par des anticorps monoclonaux spécifiques de l'antigène Le^a démontrant encore une fois son implication dans l'attachement des norovirus humains, sur la muqueuse intestinale saine de ces sujets. Nous avons enfin observé que l'accroche des norovirus variait également en fonction des tissus étudiés et du génotype de norovirus (GII.4, GII.3 et GII.17 dans le cadre de l'étude), chez les sujets sécréteurs ou non-sécréteurs. A l'aune de nos travaux, les zones inflammatoires régénératives ont donc la capacité d'interagir spécifiquement avec les norovirus par le biais principalement de Le^a. Il en découle probablement des perturbations du système immunitaire induites par l'accroche du norovirus. Ces mécanismes inflammatoires provoqués par l'attachement du norovirus et probablement d'autres virus entériques donnent un nouvel éclairage sur les infections virales chez les patients MICI. Ces mécanismes restent cependant à élucider d'un point de vue physiopathologique. D'autres travaux seront également nécessaires pour évaluer l'incidence des infections à norovirus et plus généralement des virus entériques chez ces patients.



Title : Norovirus-Host Interactions in the course of Inflammatory Bowel Disease

Keywords : IBD, Colitis, HBGA, FUT2, Norovirus, Secretor

Abstract : Inflammatory bowel disease (IBD) affects around 200,000 people in France. This group of conditions includes Crohn's disease (CD), which involves the entire digestive tract, and ulcerative colitis (UC), which involves only the colon and rectum. It is known that immunological, genetic and microbiological factors are at play in IBD, but the role of viruses remains only partially explored. Among viral etiologies, human noroviruses (huNoV) are the main cause of acute viral gastroenteritis worldwide. Norovirus binds to intestinal cells through histo-blood group antigens (HBGA), including ABO and Lewis antigens. The expression of HBGA is dependent upon tissue type and the underlying physiopathological states. In healthy subjects, HBGA are almost exclusively expressed in the small intestine and proximal colon. This thesis aimed to determine HBGA expression and norovirus binding profiles using virus-like particles (VLP) in the inflammatory tissues of 24 patients suffering from IBD flares and 14 non-secretor patients (1 patient suffering from CD and 13 healthy patients). Our goal was to determine HBGA expression in secretors (expressing ABO, Lewis b and Lewis y) and non-secretors (expressing Lewis a and Lewis x), and in healthy patients and patients diagnosed with IBD; and to define the role of HBGA in norovirus binding using huNoV VLP.

Binding assays using GII.4 VLP (worldwide predominant genotype) showed VLP binding in the inflamed mucosae of the small intestine, colon, and rectum. Inflammatory mucosae expressed Lewis a and Lewis x antigens in sialylated and non-sialylated forms. Competition experiments revealed that GII.4 VLP binding was due mainly to Lewis a and partially to Lewis x antigens in the absence of ABO antigen expression, which are poorly expressed in regenerative mucosae. In healthy non-secretors, we also showed the abolition of VLP binding when monoclonal antibodies directed against Lewis a antigen were used, demonstrating its implication in norovirus binding in the duodenum of healthy non-secretors. Finally, VLP binding was tissue-specific and genotype-dependent (GII.4, GII.3, GII.17 in our study). In conclusion, inflammatory and regenerative mucosae have the ability to interact with huNoV through the Lewis a antigen. However, the inflammatory mechanisms underlying norovirus attachment in regenerative mucosa remain unexplored. Further studies will be required to understand the mechanisms of inflammation possibly triggered by norovirus infections, and an evaluation of the incidence of norovirus infections and other enteric viruses in IBD is warranted.

Table des abréviations

A : Antigène A
AAL : Aleuria Aurantia Lectin
ABH(O) : Groupes sanguins ABO
AFAQAP : Association Française de Qualité en Anatomie Pathologique
ALe^y : Antigène A-Lewis y
ARN : Acide ribonucléique
B : Antigène B
Blotto-PBS 4% : Lait écrémé à 4°C dilué dans du PBS à 4%
BSA : albumine de sérum bovin (Bovine Serum Albumin)
CaCl₂ : Chlorure de calcium
CD4 : Cluster de différenciation 4
CD8 : Cluster de différenciation 8
CGHAS : Colonic Global Histologic Disease Activity Score
CHU : Centre Hospitalier Universitaire
CMV : Cytomégalovirus
CNRvge : Centre National de Référence des virus des gastro-entérites
CPP : Comité de Protection des Personnes
CSP : Cholangite sclérosante primitive
DAB : 3'-3'-diaminobenzidine
DO : Densité optique
DO450 : Densité optique mesurée à 450 nm
EFS : Etablissement Français du Sang
EIEC : *Escherichia Coli* Entéro-Invasif
ELISA : Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
Fuc : Fucose
Gal : Galactose
GlcNAc : N-acétylgalactosamine
GTP-GDP: guanine triphosphate – diphosphate
GWAS : Etude d'association pangénomique (Genome Wide Association Study)
H₁ : Antigène H de type 1
H₂ : Antigène H de type 2
H₃ : antigène H de type 3
hAdv : Adénovirus
hAstV : Astrovirus
HBGA : Antigènes tissulaires de groupe sanguin (Histo-Blood Group Antigen)
HES : Hématoxyline éosine safran
hEV : Entérovirus
HIO : organoïdes intestinaux humains (Human Intestinal Organoids)
HPA : Helix Pomatia Agglutinin
HRP : Peroxydase de raifort (Horseradish Peroxidase)
IFN- γ : Interféron gamma
IFN α : Interféron alpha
IFN β : Interféron beta
IFN λ : Interféron lambda
IgA : immunoglobuline A
IgG : immunoglobuline G
IGHAS : Ileal Global Histologic Disease Activity Score
IgM : immunoglobuline M
IL-1 : Interleukine 1
IL-10 : Interleukine 10
IL-17 : Interleukine 17
IL-1 β : Interleukine 1 beta
IL-25 : Interleukine 25
IL-6 : Interleukine 6
kDa : kilodaltons
Le^a : Lewis a
Le^b : Lewis b
Le^x : Lewis x
Le^y : Lewis y
LTL : Lotus Tetragonolobus Lectin

MC : Maladie de Crohn
MICI : Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin
ML : Muqueuse lésionnelle
MNV : Norovirus murin (Murine Norovirus)
MQ : Muqueuse quiescente
NaCl : Chlorure de sodium
NaIO₄ : Périodate de sodium
NHS : sérum normal de cheval (Normal Horse Serum)
nm : nanomètre
NoV : Norovirus
NS : Protéine non-structurale
NTP : nucléoside triphosphate
ORF : cadre de lecture ouverte (open reading frame)
PBS : Tampon salin phosphaté (Phosphate Buffered Saline)
PCR : réaction de polymérisation en chaîne (Polymerase Chain Reaction)
PRR : Pattern Recognition Receptor
RCH : Rectocolite hémorragique
RdRp : ARN polymérase ARN-dépendante
RT : Transcription inverse
RVA : Rotavirus
SaV : Sapovirus
se/se : Non sécréteur
Se/se : Sécréteur hétérozygote
Se/Se : Sécréteur homozygote
sLe^a : Sialyl-Lewis a
sLe^x : Sialyl-Lewis x
ssLe^a : antigène Lewis a disialylé
T : antigène T
Th1 : T-helper 1
Th2 : T-helper 2
TLR : Toll-like receptor
TMB : Tétraméthyl-benzidine
Tn : Antigène Tn
TNF- α : Facteur de nécrose tumorale alpha (Tumor Necrosis Factor alpha)
UEA-I : Ulex Europaeus Agglutinin – I
VLP : Particule virale de synthèse (Virus-Like Particle)
VP : Protéine de capsid
VPg : Protéine du génome viral

Table des matières

PREFACE	12
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	13
I. NOROVIRUS : CARACTERISTIQUES VIROLOGIQUES	14
A. STRUCTURE VIRALE ET ORGANISATION DU GENOME	14
1. Structure virale et organisation du génome viral	14
2. Protéine de capsid majeure VP1	15
3. Protéine de capsid mineure VP2	16
4. Protéines non-structurales de réplication	16
B. DETECTION DES NOROVIRUS HUMAINS	17
C. CLASSIFICATION PHYLOGENETIQUE DES NOROVIRUS HUMAINS	18
D. ÉPIDÉMIOLOGIE DES NOROVIRUS HUMAINS	20
F. MISE EN CULTURE DU NOROVIRUS HUMAIN	22
1. Culture du norovirus sur lignées cellulaires	22
2. Culture du norovirus sur organoïdes humains	23
3. Réplication du norovirus sur poisson-zèbre	24
II. LES RECEPTEURS DES NOROVIRUS : LES ANTIGENES TISSULAIRES DE GROUPE SANGUIN (HBGA)	26
A. SYNTHÈSE DES ANTIGÈNES DE GROUPE SANGUIN CHEZ L'HOMME	26
B. PROFILS D'ACCROCHE DES NOROVIRUS HUMAINS AUX HBGA	27
C. EXPRESSION TISSULAIRE DES HBGA CHEZ L'HOMME	29
III. NOROVIRUS ET MALADIES INFLAMMATOIRES CHRONIQUES DE L'INTESTIN	31
A. LES MALADIES INFLAMMATOIRES CHRONIQUES DE L'INTESTIN	31
1. Épidémiologie des MICI	31
2. Manifestations cliniques des MICI	31
3. Évaluation histopathologique des MICI	32
4. Étiopathogénie des MICI	35
B. RELATIONS AVÉRÉES ENTRE VIRUS ENTERIQUES ET MICI	36
1. Épidémiologie des norovirus dans les MICI	36
2. Interactions virus-tissus et expression HBGA au cours des MICI	40
3. Interactions norovirus-bactéries au cours des MICI	42
4. Virus entériques et voies de signalisation au décours des MICI	43
5. Modèles expérimentaux de MICI et virus entériques	45
6. Virus entériques et thérapies utilisées au cours des MICI	46
IV. OBJECTIFS	47
MATÉRIELS ET MÉTHODES	48
I. OUTILS EXPERIMENTAUX	49
A. PRODUCTION DE PARTICULES VIRALES DE SYNTHÈSE (VLP)	49
B. PRODUCTION DE LA A1,2-FUCOSIDASE	50
II. MISES AU POINT ET EXPERIMENTATIONS	51
A. PRISE EN CHARGE DES ÉCHANTILLONS DE TISSUS HUMAINS	51
1. Origine des échantillons	51
2. Prise en charge macroscopique des prélèvements	51
3. Traitements et prise en charge des échantillons tissulaires	52
4. Évaluation des signes d'activité des MICI	52
B. SÉLECTION DES PATIENTS ET DES ÉCHANTILLONS	53
1. Tissus « sains » contrôles	53
2. Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin (MICI)	53
3. Sujets non-sécréteurs	54
C. GENOTYPAGE DU GÈNE <i>FUT2</i>	54
1. Extraction ADN	54
2. Séquençage du gène <i>FUT2</i>	54
D. PRE-TRAITEMENT DE COUPES HISTOLOGIQUES	55
E. INCUBATION ET DÉTECTION DES PARTICULES VIRALES SUR COUPES HISTOLOGIQUES	56

H.	EXPERIENCES DE COMPETITION ET D'INHIBITION ANTIGENIQUE SUR COUPES HISTOLOGIQUES	57
1.	Macrodissection des blocs tissulaires	57
2.	Pré-traitements chimiques	57
3.	Pré-traitements enzymatiques	58
4.	Inhibition par utilisation de lectines spécifiques	58
5.	Inhibition par anticorps monoclonaux spécifiques	59
I.	TESTS SALIVAIRES	59
J.	NUMERISATION ET COLLECTE DES DONNEES	60
RESULTATS		61
I.EXPRESSION DES HBGA ET ACCROCHE DES VIRUS ENTERIQUES DANS LES MALADIES INFLAMMATOIRES CHRONIQUES DE L'INTESTIN		62
A.	DESCRIPTION DE LA COHORTE	62
1.	Maladie de Crohn	62
2.	Rectocolite hémorragique	63
B.	GENOTYPAGE DU GENE <i>FUT2</i> DES PATIENTS	63
C.	ATTACHEMENT DES VLP SUR TISSUS SAINS	65
D.	EXPERIENCES D'ACCROCHE VLP ET DETECTION DES HBGA DANS LES MICI	66
1.	Maladie de Crohn	66
2.	Rectocolite hémorragique	70
E.	CARACTERISATION DES RECEPTEURS DES NOROVIRUS GII.4 EN CONDITIONS INFLAMMATOIRES	72
1.	Rôle des antigènes ABH(O) dans l'accroche VLP GII.4 sur muqueuse régénérative	73
2.	Rôle des motifs sialiques dans l'accroche VLP GII.4 sur muqueuse régénérative	74
3.	Rôle des motifs Lewis dans l'accroche des VLP GII.4 sur muqueuse régénérative	75
4.	Expériences d'accroche des VLP GII.4 et GII.17	77
F.	COMMENTAIRE SUR L'INTERACTION DES NOROVIRUS HUMAINS SUR LES MUQUEUSES INFLAMMATOIRES AU COURS DES MICI	78
II.EXPRESSION DES HBGA ET ACCROCHE DES VIRUS ENTERIQUES CHEZ LES SUJETS NON-SECRETEURS		81
A.	EXPERIENCES SUR SALIVES DE SUJETS NON-SECRETEURS	81
1.	Expériences d'accroche des VLP GII.4, GII.3 et GII.17	81
2.	Rôle des antigènes Lewis dans l'accroche des VLP sur salives de patients non-sécréteurs	82
B.	DEPISTAGE DES SUJETS NON-SECRETEURS POUR LES ANALYSES HISTOLOGIQUES	83
C.	EXPERIENCES D'ACCROCHE ET DETECTION DES HBGA SUR DUODENUMS SAINS DE SUJETS NON-SECRETEURS	84
1.	Expériences d'accroche VLP et expression HBGA du duodénum sain de sujets non-sécréteurs	84
2.	Caractérisation des récepteurs des VLP du duodénum sain de sujets non-sécréteurs	86
D.	RECONNAISSANCE DES VLP ET DETECTION DES HBGA CHEZ UN SUJET NON-SECRETEUR SOUFFRANT DE RCH	88
1.	Accroche VLP et détection HBGA en zones de MQ	88
2.	Accroche VLP et détection HBGA en zones de ML	90
E.	COMMENTAIRE SUR LES INTERACTIONS DES NOROVIRUS HUMAINS SUR LES TISSUS INTESTINAUX DE SUJETS NON-SECRETEURS	93
CONCLUSIONS		97
ANNEXES		101
ANNEXE 1: "SPECIFIC NOROVIRUS INTERACTION WITH LEWIS X AND LEWIS A ON HUMAN INTESTINAL INFLAMMATORY MUCOSA DURING REFRACTORY INFLAMMATORY BOWEL DISEASE"		102
ANNEXE 2: "ENTERIC VIRUSES AND INFLAMMATORY BOWEL DISEASE"		117
ANNEXE 3 : TABLEAUX DES PROTOCOLES D'UTILISATION SUR AUTOMATE DAKO OMNIS®		131
ANNEXE 4 : AUTORISATIONS LEGALES		133
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES		136

Liste des tableaux

TABLEAU 1. TABLEAU RECAPITULATIF DES PROPRIETES DES PROTEINES NON-STRUCTURALES DES NOROVIRUS.	17
TABLEAU 2. EXPRESSION DES HBGA DANS LE TRACTUS DIGESTIF.	29
TABLEAU 3. ETUDES EPIDEMIOLOGIQUES CONCERNANT LES VIRUS ENTERIQUES ET LES PUSSEES INFLAMMATOIRES DE MALADIES INFLAMMATOIRES CHRONIQUES DE L'INTESTIN.	39
TABLEAU 4. AMORCES UTILISEES POUR LES PCR D'AMPLIFICATION AFIN DE REALISER LE GENOTYPAGE FUT2.	55
TABLEAU 5. CYCLE D'AMPLIFICATION DE L'ADN DE FUT2 A L'AIDE DE LA KOD HOT START DNA POLYMERASE.	55
TABLEAU 6. LISTE DES ECHANTILLONS ISSUS DES PATIENTS ATTEINTS DE MALADIE DE CROHN.	62
TABLEAU 7. LISTE DES ECHANTILLONS ISSUS DES PATIENTS ATTEINTS DE RECTOCOLITE HEMORRAGIQUE.	63
TABLEAU 8. DESCRIPTION DES PATIENTS NON-SECRETEURS.	83
TABLEAU 9. PROTOCOLE DE DESHYDRATATION ET D'INCLUSION EN PARAFFINE DES TISSUS PREALABLEMENT FIXES DANS LE FORMOL TAMPONNE A 4%, DANS L'AUTOMATE TISSUE-TEK VIP®.	131
TABLEAU 10. PROTOCOLE DE COLORATION STANDARD PAR HEMATOXYLINE EOSINE SAFRAN (HES) DES LAMES BLANCHES SUR L'AUTOMATE TISSUE-TEK PRISMA®.	131
TABLEAU 11. PROGRAMME DE DEPARAFFINAGE « LONG » DE L'AUTOMATE TISSUE-TEK PRISMA®.	132

Liste des figures

FIGURE 1. PHOTOGRAPHIE EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE DU NOROVIRUS OU "VIRUS DE NORWALK".....	14
FIGURE 2. ORGANISATION DU GENOME ET STRUCTURE DES NOROVIRUS.....	15
FIGURE 3. CLASSIFICATION PHYLOGENETIQUE DES NOROVIRUS.....	19
FIGURE 4. ANALYSE HISTOLOGIQUE DE BIOPSIES INTESTINALES AVANT ET APRES INOCULATION DE NOROVIRUS GI.1.....	21
FIGURE 5. PHOTOGRAPHIES DES DIFFERENTES ETAPES DE DEVELOPPEMENT DES ORGANOIDES INTESTINAUX HUMAINS (HUMAN INTESTINAL ORGANOID – HIO).....	24
FIGURE 6. VOIES DE SYNTHESE DES ANTIGENES TISSULAIRES DE GROUPE SANGUIN (HISTO-BLOOD GROUP ANTIGENS OU HBGA) DERIVANT DES PRECURSEURS DE TYPE 1 ET 2.....	26
FIGURE 7. PROFILS D’ATTACHEMENT DES NOROVIRUS DE GENOTYPE I (GI) ET II (GII) EN FONCTION DES PHENOTYPES SECRETEURS (SE+) ET NON-SECRETEUR (SE-).....	28
FIGURE 8. SCORE DE GEBOES MODIFIE.....	33
FIGURE 9. SCORE HISTOLOGIQUE DE NANCY.....	34
FIGURE 10. RESUME DES MECANISMES POTENTIELS SOUS-TENDANT LES INTERACTIONS DES VIRUS ENTERIQUES DANS LE CONTEXTE DES MICI.....	42
FIGURE 11. IMAGES H.E. REPRESENTATIVES DES ENTEROÏDES GENERES DE DONNEURS SAINS ET DE PATIENTS SOUFFRANT DE MALADIE DE CROHN.....	45
FIGURE 12. EXTRAITS DE SEQUENCES SANGER SUR LE LOGICIEL CODONCODE ALIGNER®, CENTREES SUR LA POSITION 428 DU GENE FUT2.....	64
FIGURE 13. DEMONSTRATION DE LA SPECIFICITE D’ACCROCHE DES VLP DANS DES ECHANTILLONS DUODENAUX SAINS D’UN PATIENT DE GROUPE SANGUIN A AYANT SUBI UNE DUODENOPANCREATECTOMIE CEPHALIQUE.....	65
FIGURE 14. DEMONSTRATION DE LA SPECIFICITE DE L’ACCROCHE DES VLP SUR UNE BIOPSIE DE DUODENUM SAIN D’UN PATIENT SOUFFRANT DE RCH (PATIENT 22).....	66
FIGURE 15. DETECTION DE L’ANTIGENE Ki67 DANS LES ECHANTILLONS DE MC.....	67
FIGURE 16. IMMUNODETECTION DES ECHANTILLONS DE MC D’ILEON (PATIENT 5), DE COLON PROXIMAL (PATIENT 9), DE COLON TRANSVERSE (PATIENT 12) ET DE COLON DISTAL (PATIENT 15) AVEC MQ.....	68
FIGURE 17. IMMUNODETECTION DES ECHANTILLONS DE MC D’ILEON (PATIENT 6), COLON TRANSVERSE (PATIENT 13) ET DE COLON DISTAL (PATIENT 15) AVEC ML.....	69
FIGURE 18. DETECTION DE L’ANTIGENE Ki67 DANS LES ECHANTILLONS DE RCH.....	70
FIGURE 19. IMMUNODETECTION DES ECHANTILLONS DE RCH DE COLON (PATIENT 19) ET RECTUM (PATIENT 23) DE MQ, ET DE SIGMOÏDE (PATIENT 22) ET RECTUM (PATIENT 24) AVEC ML.....	71
FIGURE 20. ATTACHEMENT DE LA VLP AD373 SUR COUPE HISTOLOGIQUE DE ML DE SIGMOÏDE (PATIENT 22).....	73
FIGURE 21. EXPERIENCES D’INHIBITION D’ACCROCHE DES VLP GII.4 SUR COUPES HISTOLOGIQUES DE ML DE SIGMOÏDE (PATIENT 22).....	73
FIGURE 22. IMMUNODETECTION SUR COUPES HISTOLOGIQUES DE ML DE COLON TRANSVERSE DE MC (PATIENT 13) ET DE SIGMOÏDE DE RCH (PATIENT 22).....	74
FIGURE 23. EXPERIENCES D’INHIBITION D’ACCROCHE DES VLP GII.4 SUR COUPES HISTOLOGIQUES DE ML DE COLON TRANSVERSE DE MC (PATIENT 13) ET DE SIGMOÏDE DE RCH (PATIENT 22).....	75
FIGURE 24. EXPERIENCES D’INHIBITION D’ACCROCHE DES VLP GII.4 SUR COUPES HISTOLOGIQUES EN ML DE RCH (PATIENT 22).....	76
FIGURE 25. EXPERIENCES D’INHIBITION D’ACCROCHE DES VLP GII.4 DANS LES ML DE COLON TRANSVERSE DE MC (PATIENT 13) ET DE SIGMOÏDE DE RCH (PATIENT 22).....	77
FIGURE 26. ACCROCHE DES VLP GII.3 ET GII.17 SUR DUODENUM SAIN (TEMOIN) ET ML DE SIGMOÏDE DE RCH (PATIENT 22).....	77
FIGURE 27. HISTOGRAMME ET TABLEAU DETAILLE DES DO A 450 NM DE DETECTION ELISA DES VLP GII.4 (VARIANT OSAKA 2007), GII.3 (SOUCHE SW4) ET GII.17 (SOUCHE KAWASAKI 308) SUR LES ECHANTILLONS DE SALIVE DES 34 PATIENTS NON-SECRETEURS.....	81
FIGURE 28. COMPETITION DES VLP GII.4 SUR LES 4 SALIVES DE NON-SECRETEURS DE LA COHORTE TUNISIENNE.....	82
FIGURE 29. INTERACTION DES VLP GII.4 (VARIANT OSAKA 2007), VLP GII.3 (SOUCHE SW4), VLP GII.17 (VARIANT KAWASAKI 308) SUR COUPES HISTOLOGIQUES DE DUODENUM SAIN DES 13 SUJETS NON-SECRETEURS.....	85
FIGURE 30. DETECTION IMMUNOHISTOCHIMIQUE DES ANTIGENES Le ^A , Le ^X , Le ^B , Le ^Y SUR COUPES HISTOLOGIQUES DE DUODENUM SAIN DES 13 SUJETS NON-SECRETEURS.....	85
FIGURE 31. COMPETITIONS D’ACCROCHE DES VLP SUR COUPES HISTOLOGIQUES DE DUODENUM SAIN DES ECHANTILLONS CORRESPONDANT AUX PATIENTS 3NS, 11NS ET 12NS.....	87
FIGURE 32. INTERACTIONS DES VLP GII.4 (VARIANT OSAKA 2007), VLP GII.3 (SOUCHE SW4), VLP GII.17 (VARIANT KAWASAKI 308) SUR COUPES HISTOLOGIQUES EN ZONES DE MQ D’ILEON, COLON PROXIMAL, COLON DISTAL ET APPENDICE DU PATIENT 14NS.....	89
FIGURE 33. DETECTION IMMUNOHISTOCHIMIQUE DES ANTIGENES B, sLe ^A , sLe ^X , Le ^A , Le ^X , Le ^B , Le ^Y SUR COUPES HISTOLOGIQUES EN ZONES DE MQ D’ILEON, COLON PROXIMAL, COLON DISTAL ET APPENDICE DU PATIENT 14NS.....	90
FIGURE 34. INTERACTION DES VLP GII.4, VLP GII.3, VLP GII.17 SUR COUPES HISTOLOGIQUES EN ZONES DE ML DE COLON PROXIMAL ET DISTAL DU PATIENT 14NS.....	91
FIGURE 35. DETECTION IMMUNOHISTOCHIMIQUE DES ANTIGENES B, sLe ^A , sLe ^X , Le ^A , Le ^X , Le ^B , Le ^Y SUR COUPES HISTOLOGIQUES EN ZONES DE ML DE COLON PROXIMAL ET DISTAL DU PATIENT 14NS.....	92
FIGURE 36. COMPETITION SUR COUPES HISTOLOGIQUES EN ZONES DE ML DE COLON DISTAL DU PATIENT 14NS.....	93

PREFACE

Les travaux de cette thèse abordent l'étude des interactions des virus entériques avec les épithéliums digestifs humains sains et malades, principalement par l'étude des ligands responsables de leur accroche et de leur rôle potentiel au cours des pathologies. Ces travaux sont le fruit d'une collaboration entre le Service de Pathologie et le Centre National de Référence des virus des gastro-entérites (CNRvge), au CHU de Dijon. L'Anatomie Pathologique a permis de répondre à des questions peu explorées par la Microbiologie fondamentale, par l'étude de la distribution tissulaire des antigènes tissulaires de groupe sanguin (Histo-blood group antigens - HBGA), récepteurs naturels des virus entériques, dont l'expression est liée à la différenciation et l'origine embryologique tissulaire, le fond génétique (notamment les gènes *FUT2* et *FUT3*), et potentiellement altérée par les lésions inflammatoires qui caractérisent les Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin (MICI). Des perturbations des profils d'expression des HBGA, acquises au cours de processus inflammatoires ou innés du fait d'un terrain génétique particulier, pourraient expliquer les différences d'accroche des virus entériques sur les muqueuses du tube digestif. Ces perturbations d'accroche pourraient alors potentiellement altérer le pouvoir infectieux des virus entériques et la physiologie des cellules infectées.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I. NOROVIRUS : CARACTERISTIQUES VIROLOGIQUES	14
A. STRUCTURE VIRALE ET ORGANISATION DU GENOME	14
1. Structure virale et organisation du génome viral	14
2. Protéine de capsid majeure VP1	15
3. Protéine de capsid mineure VP2	16
4. Protéines non-structurales de réplication.....	16
B. DETECTION DES NOROVIRUS HUMAINS	17
C. CLASSIFICATION PHYLOGENETIQUE DES NOROVIRUS HUMAINS.....	18
D. EPIDÉMIOLOGIE DES NOROVIRUS HUMAINS	20
F. MISE EN CULTURE DU NOROVIRUS HUMAIN.....	22
1. Culture du norovirus sur lignées cellulaires	22
2. Culture du norovirus sur organoïdes humains	23
3. Réplication du norovirus sur poisson-zèbre	24
II. LES RECEPTEURS DES NOROVIRUS : LES ANTIGENES TISSULAIRES DE GROUPE SANGUIN (HBGA).....	26
A. SYNTHÈSE DES ANTIGÈNES DE GROUPE SANGUIN CHEZ L'HOMME	26
B. PROFILS D'ACCROCHE DES NOROVIRUS HUMAINS AUX HBGA	27
C. EXPRESSION TISSULAIRE DES HBGA CHEZ L'HOMME.....	29
III. NOROVIRUS ET MALADIES INFLAMMATOIRES CHRONIQUES DE L'INTESTIN	31
A. LES MALADIES INFLAMMATOIRES CHRONIQUES DE L'INTESTIN.....	31
1. Épidémiologie des MICI.....	31
2. Manifestations cliniques des MICI.....	31
3. Évaluation histopathologique des MICI	32
4. Étiopathogénie des MICI	35
B. RELATIONS AVÉRÉES ENTRE VIRUS ENTERIQUES ET MICI	36
1. Épidémiologie des norovirus dans les MICI	36
2. Interactions virus-tissus et expression HBGA au cours des MICI.....	40
3. Interactions norovirus-bactéries au cours des MICI	42
4. Virus entériques et voies de signalisation au décours des MICI	43
5. Modèles expérimentaux de MICI et virus entériques	45
6. Virus entériques et thérapies utilisées au cours des MICI	46
IV. OBJECTIFS.....	47

I. NOROVIRUS : CARACTERISTIQUES VIROLOGIQUES

Les norovirus et rotavirus sont les principaux agents étiologiques de gastro-entérites virales. Les sapovirus, adénovirus entériques, astrovirus, aichivirus, torovirus, coronavirus, et picobirnavirus sont moins fréquemment impliqués (Wilhelmi et al., 2003).

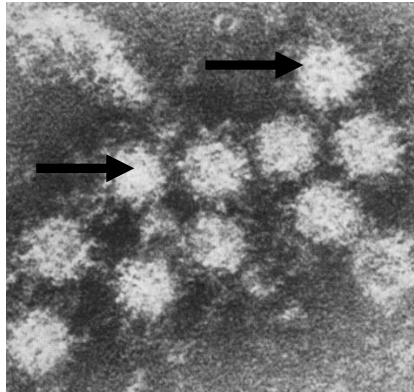


Figure 1. Photographie en microscopie électronique du norovirus ou "virus de Norwalk". Les particules virales sont indiquées par des flèches (D'après Kapikian et al., 1972).

Les norovirus ont été identifiés pour la première fois à la suite d'une épidémie de gastroentérite aiguë, dans la ville de Norwalk (Ohio, Etats-Unis), par Albert Kapikian en 1972 (**Figure 1**) (Kapikian et al., 1972).

A. Structure virale et organisation du génome

1. Structure virale et organisation du génome viral

Les norovirus appartiennent à la famille des *Caliciviridae* qui comprennent également les sapovirus, les lagovirus, les vésivirus et les nébovirus. Les norovirus sont des virus ARN, formés d'une capsid virale non-enveloppée de 40 nm, formée de 90 dimères de la protéine VP1 (**Figure 2**). La surface du virus comporte des dépressions, semblable à des calices, d'où l'origine du nom latin « *Caliciviridae* ».

L'ARN viral du norovirus est un ARN simple brin, de polarité positive, de 7,6 kilobases (**Figure 2**) (Jiang et al., 1993). L'ARN viral du Norovirus est accroché à une protéine du génome viral (VPg) à l'extrémité 5', et possède une queue polyadénylée à l'extrémité 3' (Thorne et Goodfellow, 2014). Le génome viral s'organise en 3 cadres de lecture ouverts (ORF), les ORF1, 2 et 3. Le cadre de lecture ORF2 code pour VP1, et ORF3 code pour VP2. ORF1 code pour une polyprotéine qui sera ultérieurement hydrolysée par une protéase virale « 3C-like » en protéines non-structurales NS1/2 à NS7 (Sosnovtsev et al., 2006; Takahashi et al., 2013).

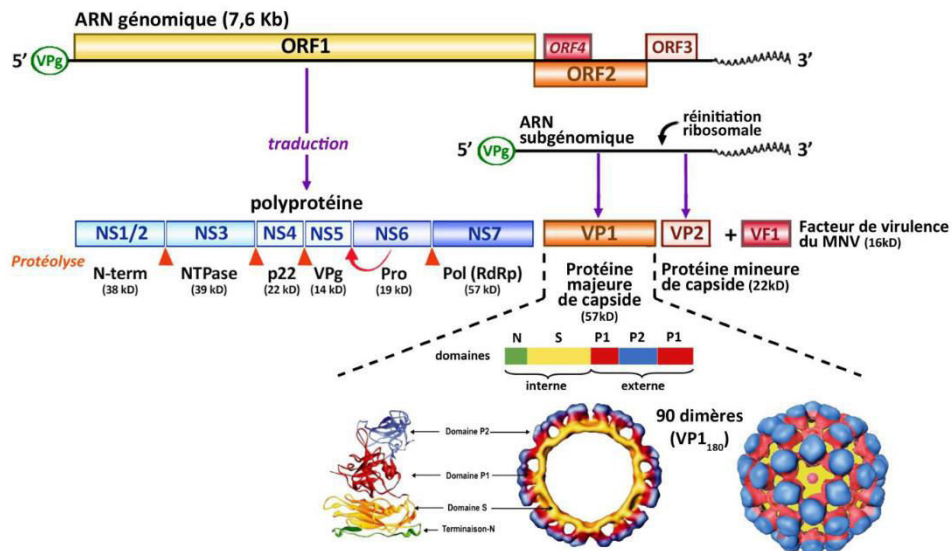


Figure 2. Organisation du génome et structure des norovirus. (D'après de Rougemont et Belliot, 2016).

2. Protéine de capside majeure VP1

La protéine VP1 est la protéine de capside majeure des norovirus humains. D'un poids moléculaire d'environ 58 kilodaltons (kDa), elle comprend 3 domaines : N-terminal, « shell » (S), et « protruding » (P), et possède la capacité de s'autoassembler en une particule virale dans des systèmes d'expression comme le baculovirus ou la levure (**Figure 2**) (Jiang et al., 1993). En se basant sur la séquence en acides aminés du virus de Norwalk, le domaine S s'étend de l'extrémité N-terminale de la protéine jusqu'à l'acide aminé 218, se conformant à la structure icosaédrique du virus, et possédant un assemblage Proline-Proline-Glycine relativement conservé au sein des différentes souches de Norovirus, correspondant à la zone charnière ou « hinge » (H) (Prasad et al., 1999). Le domaine S est relativement conservé au sein des génotypes d'un même génogroupe, permettant ainsi l'identification moléculaire des génogroupes de Norovirus humains (Prasad et al., 1999). Le domaine S est déterminant dans la taille et la stabilité de la capside virale du fait des ponts moléculaires qu'elle génère entre les dimères de protéines VP1 (Bertolotti-Ciarlet et al., 2002). Quant au domaine P de la protéine VP1 de la souche GI.1, il s'étend de l'acide aminé 225 à l'extrémité C-terminale de la protéine, faisant protrusion vers l'extérieur de la capside virale, d'où son nom de domaine « protruding » (Prasad et al., 1999). Le domaine P permet l'accroche des norovirus aux antigènes tissulaires de groupe sanguin (HBGA), et joue donc un rôle crucial dans les interactions virus-récepteur cellulaire (Tan et al., 2004). Le domaine P est divisé en 2 sous-domaines P1 et P2 (Prasad et al., 1999). Le sous-domaine P1 est formé par les acides aminés 226 à 278 et 406 à 520 du domaine P (Prasad et al., 1999). Le sous-domaine P2 est formé des acides aminés 278 à 406 du

domaine P, inséré au sein du domaine P1 (Prasad et al., 1999). Le domaine P2 constitue le domaine le plus variable du domaine P, constituant une extension du domaine S vers la partie externe de la capsid virale (Vongpunsawad et al., 2013). Ces variations de constitution des acides aminés du sous-domaine P2 expliquent la diversité antigénique et géotypique des norovirus humains, du fait de leur importante exposition à la surface de la capsid virale (Allen et al., 2008).

3. Protéine de capsid mineure VP2

La protéine VP2, d'un poids moléculaire de 29 kDa, est située à l'intérieur de la capsid virale. La protéine VP2 interagirait avec la protéine VP1 via l'acide aminé 52 au niveau du domaine S, correspondant à une isoleucine conservée entre les différentes souches de norovirus humains (Vongpunsawad et al., 2013). La protéine VP2 favoriserait la stabilité et l'homogénéité de la taille des particules virales de norovirus humains, ayant un rôle dans l'assemblage de la capsid virale (Bertolotti-Ciarlet et al., 2002). La protéine VP2 jouerait également un rôle de protéine auxiliaire de VP1, lui permettant une réplication plus efficace en interagissant avec celle-ci, et au sein du noyau des cellules infectées par le biais de mécanismes épigénétiques encore mal compris (Liu et al., 2019). La protéine VP2 pourrait également avoir un rôle dans la régulation de l'ARN polymérase ARN-dépendante (RdRp) et la réplication de l'ARN (Fernandez-Vega et al., 2004).

4. Protéines non-structurales de réplication

La protéine NS1/2, ou p48, localisée à l'extrémité N-terminale de la polyprotéine, aurait un rôle clé dans la formation de complexes Golgiens de réplication, et pourrait interférer dans de nombreuses voies de signalisation cellulaire impliquant la protéine p53 et les voies PI3K-Akt et Jak-STAT (Fernandez-Vega et al., 2004; Lateef et al., 2017). La NTPase, ou protéine NS3, possède une capacité d'hydrolyse des nucléosides triphosphates (NTP) utiles pour plusieurs fonctions de réplication virale dont la participation à la synthèse de nouveaux brins d'ARN par la protéine NS7, ainsi qu'à la formation de complexes de réplication Golgiens, du fait de sa capacité de formation de vésicules, observées sur des cellules dérivées de mélanomes humains (Pfister and Wimmer, 2001; Yen et al., 2018). Quant à la protéine NS4, encore dénommée p20/p24, elle jouerait un rôle dans la stabilisation des membranes des complexes de réplication viraux par désassemblage Golgien, via l'inhibition de la sécrétion protéique Golgienne et l'inhibition de la protéine COPII, impliquée dans le bourgeonnement membranaire (Doerflinger et al., 2017; Roth and Karst, 2016; Sharp et al., 2010). La protéase virale, ou protéine NS6, de type « 3CL-like » similaire aux picornavirus, permet le clivage de la polyprotéine en protéines

virales non structurales (Belliot et al., 2003; Hardy et al., 2002). La protéase existe sous forme d'un précurseur intracellulaire, appelé ProPol (complexe protéique NS6 et NS7), possédant une importante activité enzymatique de clivage protéique et de polymérisation permettant la réplication virale (May et al., 2013). La protéine NS7 est une polymérase de type RdRp permettant de synthétiser les brins ARN nécessaires à la réplication virale, agissant de manière synchrone avec la protéine NS6 au sein du complexe ProPol (Belliot et al., 2003, 2005). La protéine VPg correspond à la protéine NS5. Elle joue le rôle de coiffe à l'extrémité 5' de l'ARN viral. Elle est nécessaire à la réplication et à la traduction de l'ARN viral (Belliot et al., 2008; Medvedev et al., 2017) (**Tableau 1**).

Dénomination ancienne	Dénomination nouvelle	Fonction(s) – Propriété(s)
N-term	NS1/2	Formation des complexes Golgiens Interférence p53 – PI3K/Akt-JAK/STAT Interactions avec NS3, NS4 et ProPol
NTPase	NS3	Fonction NTPase Formation de vésicules Participation à la réplication
P20-p24	NS4	Stabilisation des complexes membranaires de réplication dans le Golgi
VPg	NS5	Coiffe de l'ARN viral. Initiation de la réplication
Pro	NS6	Clivage de la polyprotéine virale
Pol	NS7	Polymérase de réplication virale

Tableau 1. Tableau récapitulatif des propriétés des protéines non-structurales des norovirus. (D'après de Rougemont et Belliot, 2016).

B. Détection des norovirus humains

Les méthodes diagnostiques utilisées pour la détection des Norovirus sont basées sur la mise en évidence d'antigènes viraux ou le plus souvent de génomes viraux. La méthode la plus couramment utilisée est l'amplification par RT-PCR en temps réel ou RT-qPCR. Elle consiste en une transcription inverse (RT) de l'ARN viral en ADN suivie d'une amplification de ce dernier par une réaction de polymérisation en chaîne ou Polymerase Chain Reaction (PCR). Les techniques de RT-PCR permettent généralement la détection de 10 à 100 copies d'ARN viral par gramme d'échantillon. Les systèmes de RT-PCR conventionnels sont utilisés pour l'amplification et le séquençage du génome de norovirus pour son génotypage dans l'ORF1 et l'ORF2 (Ando et al., 2000). Des kits commerciaux de détection rapide existent également pour le Norovirus. Ces kits sont basés sur la détection antigénique des souches de Norovirus. Faciles à mettre en œuvre, leur sensibilité est faible (50 à 75%) avec cependant une spécificité de 90%. La détection des virus entériques a récemment été couplée à celle d'autres pathogènes

responsables de gastro-entérites (approche « syndromique »). Cette approche syndromique consiste en la détection de multiples pathogènes par des RT-qPCR multiplexées. Les analyses sérologiques sont quant à elles peu fiables, même s'il a été démontré que l'augmentation des taux d'IgM, IgA et IgG est liée à une protection accrue vis-à-vis des gastro-entérites à norovirus, notamment chez les patients symptomatiques (Graham et al., 1994). Les analyses sérologiques restent du domaine de la recherche plus que de celui du diagnostic.

C. Classification phylogénétique des norovirus humains

L'analyse phylogénétique des norovirus est essentiellement basée sur la caractérisation de la séquence complète des acides aminés de VP1, et de la région NS7 du cadre de lecture ouvert ORF1 (Kroneman et al., 2013). En 2019, une nouvelle classification étendue a été proposée (**Figure 3**) (Chhabra et al., 2019; Vinjé, 2021). Le nombre de norovirus a été élargi à 10 génogroupes, de GI à GX, représentant 49 génotypes. Le génogroupe GI est composé de 9 génotypes GI.1 à GI.9, comptant pour 5 à 10 % des infections chez l'homme. Les norovirus GII sont composés de 22 génotypes GII.1 à GII.22, responsables de 90 à 95 % des gastro-entérites à norovirus chez l'homme dans le monde. Les norovirus GII.4 représentent 50 à 70% des épidémies de norovirus au fil des années. Les norovirus GII.11, GII.18, GII.19 infectent également le porc. Les norovirus GIII sont composés des génotypes GIII.1 à GIII.3 et infectent uniquement les bovins et ovins. Les norovirus GIV sont composés de deux génotypes GIV.1 et GIV.2 et infectent très rarement l'homme (moins de 0,1% des infections à norovirus). Le norovirus GIV.2 peut également infecter le chien. Quant aux norovirus GV, incluant les génotypes GV.1 et GV.2, ils infectent uniquement la souris. Les norovirus GVI et GVII infectent le chien, et sont composés de deux génotypes GVI.1 et GVI.2 et d'un seul génotype GVII. Les norovirus GVIII et GIX infectent exceptionnellement l'homme, pour une incidence de l'ordre de 0,01% à 0,5%, et comprennent un seul génotype. Enfin, le norovirus GX, composé d'un seul génotype a été retrouvé chez la chauve-souris.

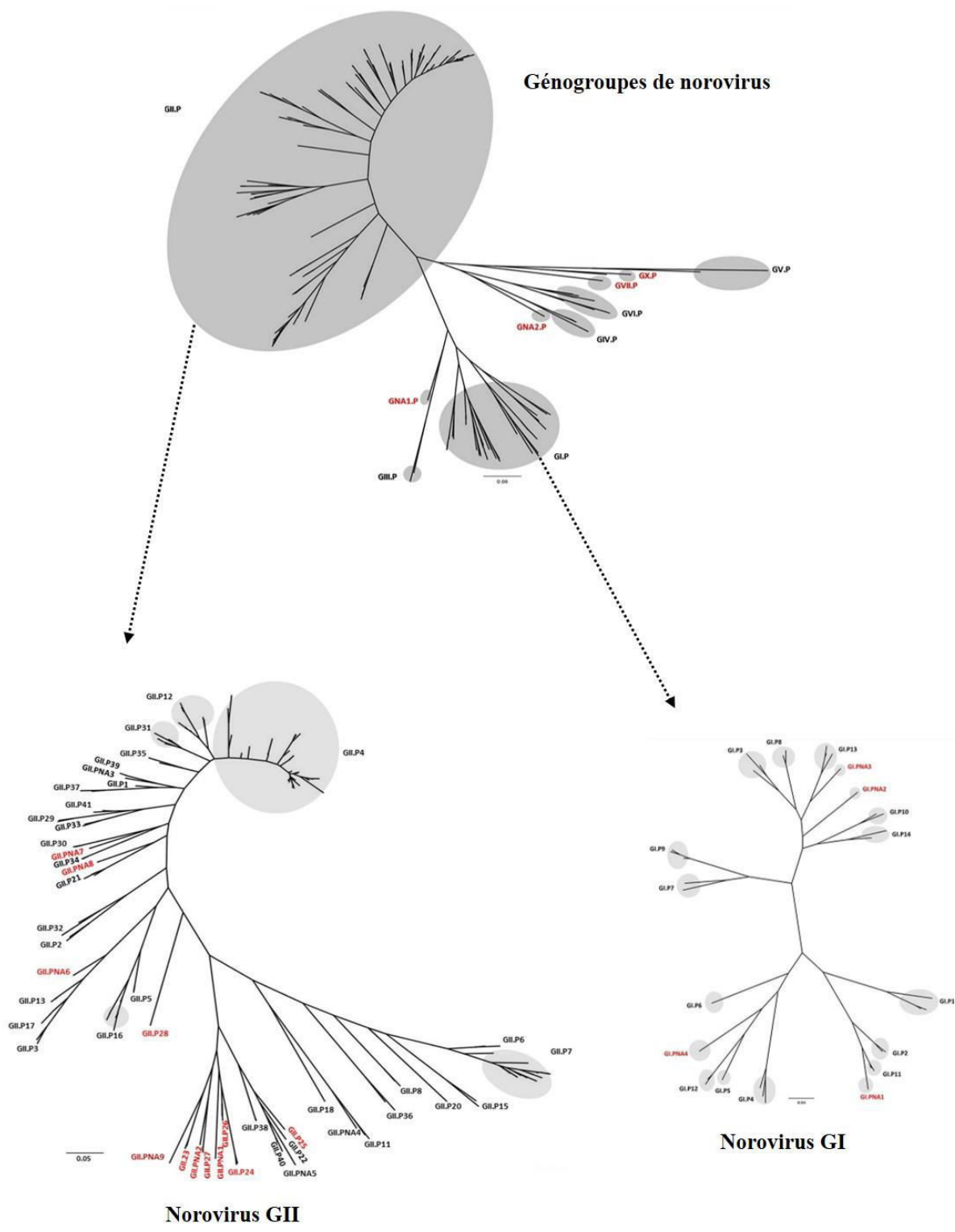


Figure 3. Classification phylogénétique des norovirus. Les génogroupes sont indiqués par des cercles grisés. Les génotypes sont indiqués à chaque extrémité. (D'après Chhabra et al., 2019).

D. Epidémiologie des norovirus humains

Les norovirus humains sont la première cause de gastro-entérite aiguë, et constituent environ 20 % des cas de gastro-entérites aiguës dans le monde (Howley and Knipe, 2020; Lopman et al., 2016). En 2015, le nombre de cas annuels est estimé à 677 millions, dont environ 200 millions de cas chez les enfants de moins de 5 ans. Les norovirus humains sont responsables de 50.000 décès infantiles chaque année dans le monde, à la fois dans les pays en voie de développement et dans les pays industrialisés, pour un total par exemple de 578.000 décès imputés à ces infections virales en 2013 (Lopman et al., 2016; Pires et al., 2015). Chaque année aux Etats-Unis, le norovirus entraînerait des coûts pour la société évalués à environ 60 milliards de dollars (Bartsch et al., 2016). La transmission du virus est essentiellement par voie oro-fécale, par contact avec des surfaces souillées ou ingestion de nourriture contaminée par le virus (Gaythorpe et al., 2018). Les épidémies de norovirus humains surviennent essentiellement dans les milieux communautaires tels que les restaurants, les écoles, les casernes militaires, les établissements de soins ou les foyers d'accueil (Hofmann et al., 2020). Les patients âgés sont plus sujets à risque de complications graves suite à l'infection, avec des taux de mortalité pouvant atteindre 6% dans les pays industrialisés (Lindsay et al., 2015). De manière similaire, les nouveau-nés et nourrissons ayant contracté une infection à norovirus présentent, dans de rares cas, des complications graves comme une entérocolite nécrosante, notamment avec les norovirus GII.3 (Stuart et al., 2010; Turcios-Ruiz et al., 2008). En matière de prévention, des études ont démontré l'efficacité du lavage des mains au savon pendant au moins 20 secondes afin d'éliminer le virus, et l'usage des solutions hydroalcooliques comme agent désinfectant dans l'usage courant en milieu communautaire (Blaney et al., 2011; MacCannell et al., 2011; Park et al., 2010). L'isolement ou l'exclusion des personnes infectées et la fermeture des établissements en situation épidémique est également une mesure efficace contre la propagation des norovirus humains (Lopman et al., 2016).

E. Tropisme viral et réplication cellulaire

Les atteintes histologiques des norovirus humains ont été étudiées la première fois sur des patients volontaires, ayant reçu un inoculum de la souche GI.1 (souche de Norwalk), couplé à l'étude des biopsies jéjunales avant et après inoculation virale (Agus et al., 1973). L'analyse histologique a révélé une importante atrophie villositaire, associée à une vacuolisation cytoplasmique non-lipidique des entérocytes (vacuoles non réhaussées par la coloration Oil Red O), ainsi que la mise en évidence en microscopie électronique à transmission de corps multivésiculaires d'origine virale (**Figure 4**) (Agus et al., 1973).

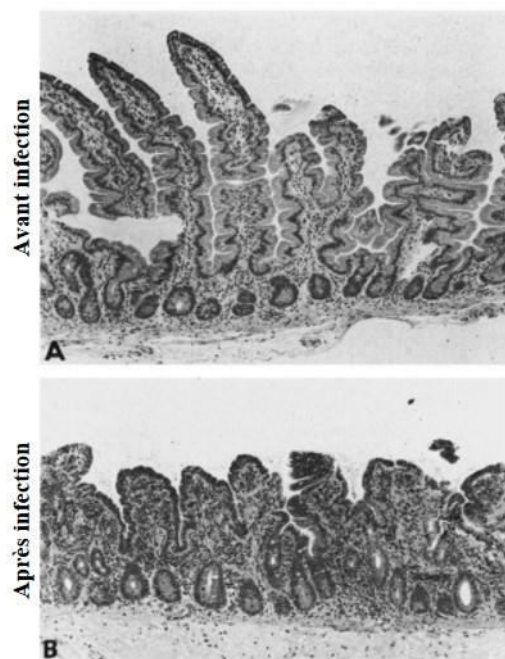


Figure 4. Analyse histologique de biopsies intestinales avant et après inoculation de norovirus GI.1. A : Microscopie optique d'une biopsie intestinale d'un volontaire prise avant l'administration de l'inoculum. L'analyse histologique est sans particularités (HES, X100). B : Microscopie optique d'une biopsie intestinale d'un volontaire durant l'épisode infectieux. Les villosités apparaissent élargies et trapues ; le revêtement épithélial apparaît désorganisé (HES, X100). (D'après Agus et al., 1973).

Le tropisme du norovirus humain est principalement limité aux cellules de l'intestin grêle ainsi qu'aux macrophages de la *lamina propria* intestinale (Graham et al., 1994; Karandikar et al., 2016; Lay et al., 2010; Wobus). L'étude menée chez des patients traités par immunosuppresseurs et souffrant d'infections chroniques à norovirus humains, a montré la présence spécifique de la protéine VP1 au niveau des macrophages de la lamina propria et de la bordure en brosse des entérocytes du duodénum (Karandikar et al., 2016). De plus, la protéine VP1 et les protéines non-structurales des norovirus ont été également détectées dans le

cytoplasme de rares cellules intestinales, indiquant que la réplication virale serait localisée à certains sous-types cellulaires intestinaux (Karandikar et al., 2016).

Une étude très récente a été enfin menée sur une petite série de patients atteints d'infections chroniques à norovirus humains, ayant subi une transplantation d'intestin grêle. Dans ce travail, le norovirus humain se répliquerait principalement au niveau des cellules entéroendocrines pour ce qui est du jéjunum humain, exprimant la chromogranine A, présentes à la base des cryptes de l'intestin grêle (Green et al., 2020).

F. Mise en culture du norovirus humain

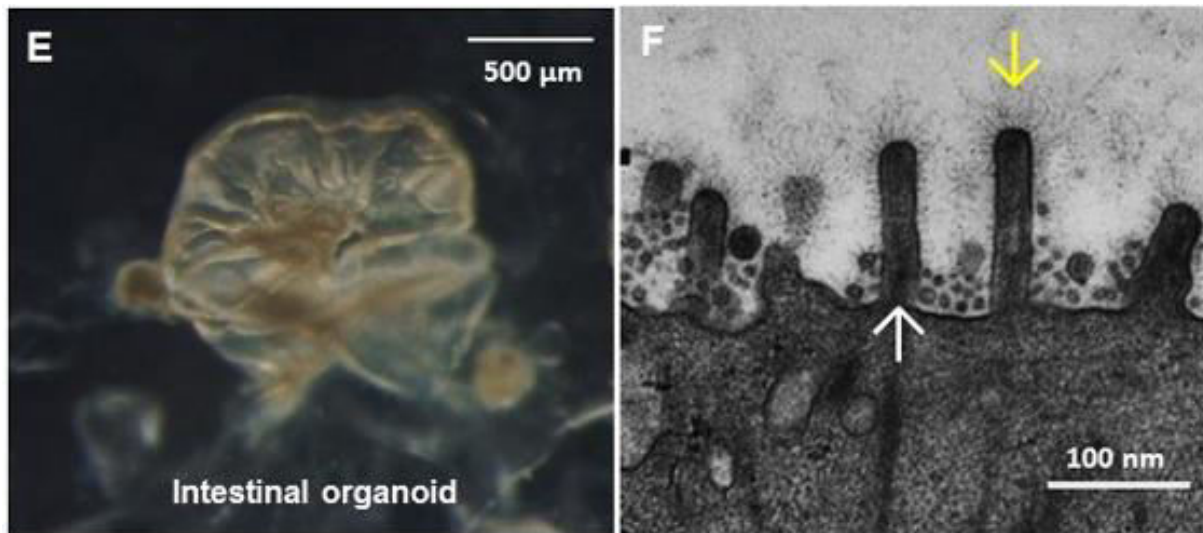
1. Culture du norovirus sur lignées cellulaires

Les essais de culture cellulaire des norovirus humains se sont soldés par des échecs jusqu'à récemment (Duizer et al., 2004). La culture du norovirus sur lignées cellulaires demeure difficile et relève d'un défi technique important. En effet, de nombreuses lignées cellulaires, dont les cellules Caco-2, dérivées de cellules intestinales carcinomateuses, ne constituent pas des modèles fiables pour l'étude de l'infection et de la réplication des norovirus humains (Duizer et al., 2004). Un modèle de culture cellulaire tridimensionnelle, dérivé de cellules Caco-2 (modèle 3-D INT 407), formant des microvillosités à la surface des cellules intestinales, a permis de démontrer l'expression de certains HBGA par ces cellules et la réplication de norovirus des génogroupes GI et GII avec la présence d'un effet cytopathogène viral après 5 passages (Straub et al., 2007).

La transfection de l'ARN viral dans des cellules épithéliales issues de cultures cellulaires primaires a également été testée. Les travaux ont abouti à une réplication virale abortive et de faible amplitude, nécessitant un nombre conséquent de copies virales par tapis cellulaire (1000 fois plus de copies virales que de cellules, sur un tapis cellulaire de 10^5 cellules, avec uniquement 100 à 150 cellules infectées au total) (Asanaka et al., 2005; Guix et al., 2007). Des travaux peu concluants concernant la réplication du norovirus humain sur culture primaire de macrophages humains, en comparaison avec les norovirus murins ont également été publiés (Lay et al., 2010; Wobus et al., 2004, 2006).

2. Culture du norovirus sur organoïdes humains

Le perfectionnement récent des systèmes de culture cellulaire et le développement du concept de culture de tissus humains *in vitro* ont permis le développement des systèmes de cultures d'organoïdes humains intestinaux (Human Intestinal Organoids - HIO). Ces cultures d'organoïdes sont concomitantes du développement de systèmes de bio-impression d'organes ou « cell culture on a chip » (Gijzen et al., 2021; Pantermehl et al., 2021). Les organoïdes se rapprochent le plus des conditions physiologiques rencontrées dans un organe ou un tissu. Cette technologie permet aussi d'étudier le terrain génétique, les profils de sensibilité et/ou de résistance aux traitements anti-cancéreux ou anti-infectieux, ainsi que les interactions cellule-pathogène au niveau subcellulaire (Kim et al., 2020). Pour les norovirus humains, des modèles de culture d'organoïdes ont donc été récemment développés, notamment les cultures d'entéroïdes (Ettayebi et al., 2016). Les cultures d'entéroïdes proposées sont généralement dérivées de cellules intestinales pluripotentes issues des niches prolifératives, situées à la base des cryptes intestinales, possédant un fort pouvoir de prolifération cellulaire (**Figure 5**) (Sato et al., 2009). Le développement des cultures d'entéroïdes humains a donc permis de pallier l'absence actuelle de système de culture des norovirus humains et de se rapprocher des conditions de réplique des norovirus humains *in situ*. L'utilisation de tissus dérivés de résection chirurgicales comme la chirurgie bariatrique, a permis le développement des HIO. Les entéroïdes ont la capacité de reconnaître spécifiquement toutes les VLP dérivées de norovirus humains. Le génotype GII.4 prédominant accrocherait uniquement les entéroïdes « sécréteurs » de manière souche-dépendante (Zhang et al., 2017a). Les glycosphingolipides joueraient également un rôle dans la cinétique d'accroche de particules virales de synthèse (Virus-Like Particle – VLP) sur les entéroïdes, de manière souche-dépendante et « sécréteur » dépendante (Rimkute et al., 2020).



Steps of HIO development

Figure 5. Photographies des différentes étapes de développement des organoïdes intestinaux humains (Human Intestinal Organoids – HIO). Image de gauche : Morphologie d'un HIO entièrement développé. **Image de droite :** microscopie électronique d'une microvillosité typique (flèche blanche) avec ses carbohydrates (flèche jaune) à la surface d'un HIO développé (D'après Zhang et al., 2017).

Des expériences d'infection d'HIO d'iléon et de duodénum ont mis en évidence une réplication virale dans les entérocytes et les cellules entéroendocrines (Ettayebi et al., 2021). Ces mêmes expériences ont montré l'absence de réplication dans des HIO dérivés du côlon (Ettayebi et al., 2021). Si les HIO sont prometteuses, le coût élevé de réalisation des HIO, les difficultés techniques et la nécessité de charges virales élevées pour observer une réplication en font un modèle complexe d'utilisation pour la plupart des laboratoires (Ettayebi et al., 2021).

3. Réplication du norovirus sur poisson-zèbre

Le poisson-zèbre (nom latin : *Danio rerio*) est un poisson tropical d'eau douce de la famille des *Cyprinidae* (Detrich et al., 1999). Le poisson-zèbre a une espérance de vie de 3 ans en captivité, et se reproduit par ponte de centaines d'œufs (Detrich et al., 1999). Les organes des embryons de poisson-zèbre se développent très rapidement en 36 heures (Detrich et al., 1999). Le poisson-zèbre est ainsi largement utilisé en pharmacologie, oncologie et immunologie du fait de la facilité d'utilisation de ce modèle animal et de ses similitudes avec le génome humain (Detrich et al., 1999; Hason and Bartůněk, 2019). L'utilisation du poisson-zèbre en tant que modèle de réplication du norovirus a été récemment proposée (Van Dycke et al., 2019). Dans l'étude, les poissons-zèbres sont utilisés au stade larvaire 3 jours après éclosion. La suspension de selles contenant le norovirus est injectée dans le sac vitellin de l'alevin. Le poisson est alors directement sacrifié et l'ARN est extrait, ou bien le poisson est gardé vivant pendant 48 à 72h

à 30°C avant son sacrifice. Après 3 jours d'incubation (J3), les ARN totaux sont alors extraits. La détection des norovirus s'effectue alors sur les ARN correspondant à J0 et J3. A la suite de la multiplication des virus, la charge virale observée à J3 est toujours supérieure à celle de J0. A l'instar du modèle de réplication sur entéroïdes, les poissons-zèbres sont plus ou moins sensibles à la réplication du norovirus. Cette sensibilité à la réplication est fonction du génotype mais aussi de la souche et de la concentration de virus dans les selles.

Les larves de poisson-zèbre possèdent un intestin semblable à l'intestin antérieur primitif de l'embryon humain, formé de villosités dépourvues de cryptes de Lieberkühn, mais dotées de cellules entéroendocrines à leur base ainsi que d'un gradient de différenciation basal-apical, avec des cellules basales à fort pouvoir prolifératif et des cellules apicales en voie de senescence cellulaire, permettant une régénération tissulaire tout au long de la vie du poisson-zèbre (Wallace et al., 2005). Le poisson-zèbre exprime également des fucosyltransférases, lointaines cousines de celles de l'homme (Kageyama et al., 1999). Après infection des poissons-zèbres avec des norovirus, l'étude de Van Dycke et al. a démontré une réplication des norovirus dans le foie, le pancréas et l'intestin primitif de l'alevin (Van Dycke et al., 2019).

II. LES RECEPTEURS DES NOROVIRUS : LES ANTIGENES TISSULAIRES DE GROUPE SANGUIN (HBGA)

A. Synthèse des antigènes de groupe sanguin chez l'homme

Les antigènes de groupe sanguin sont exprimés à la surface des globules rouges, mais également excrétés dans la salive, et exprimés à la surface des cellules de nombreux tissus. Leur synthèse est sous le contrôle d'enzymes, notamment des fucosyltransférases (**Figure 6**).

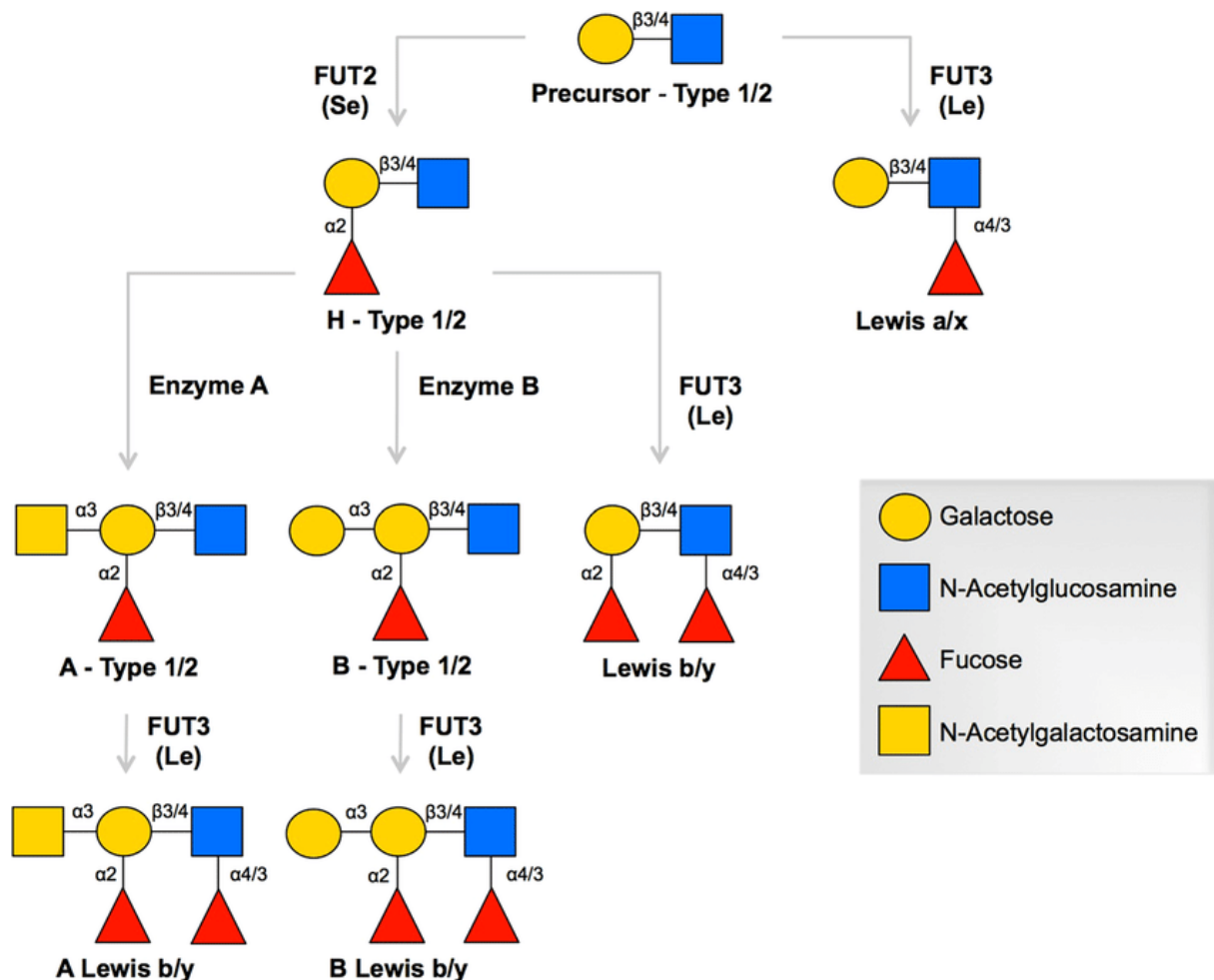


Figure 6. Voies de synthèse des antigènes tissulaires de groupe sanguin (Histo-Blood Group Antigens ou HBGA) dérivant des précurseurs de type 1 et 2. Les sucres sont représentés dans le cadre grisé. Les positions des liaisons osidiques sont indiquées entre chaque sucre. Les réactions enzymatiques sont indiquées par des flèches. Les enzymes sont indiquées à côté des flèches. (D'après Barbé et al., 2018).

Chez l'homme, deux $\alpha 1,2$ – fucosyltransférases dont la synthèse est régulée par les gènes *FUT1* et *FUT2*, sont impliquées dans la synthèse de l'antigène H. Le gène *FUT1* est responsable de la synthèse de l'antigène H de type 2 (H₂) sur les érythrocytes. Le gène *FUT1* est responsable de la synthèse de l'antigène H₂ grâce à l'ajout d'un fucose (Fuc) par une $\alpha 1,2$ – fucosyltransférase en position $\alpha 1,2$ à un précurseur saccharidique de type 2, formé d'un galactose lié en position bêta 1-4 à un N-Acetylglucosamine ($\beta\text{Gal}1-4\beta\text{GlcNAc-R}$). Le gène

FUT2 est, quant à lui, responsable de la synthèse de l'antigène H de type 1 (H₁) excrété dans la salive et les sécrétions muqueuses. *FUT2* permet l'expression d'une α 1,2 – fucosyltransferase qui catalyse l'ajout d'un fucose (Fuc) en position α 1,2 à un précurseur saccharidique de type 1, formé d'un galactose lié en position bêta 1-3 à un N-Acétyleglucosamine (Gal β 1-3GlcNAc), ce qui permet de synthétiser l'antigène H₁. La synthèse des antigènes A et B consiste en l'ajout aux antigènes H₁ ou H₂ d'un motif N-acétylgalactosamine ou un galactose en position α 1,3 par les enzymes A et B, pour donner respectivement les antigènes A et B. L'antigène H caractérisant le groupe sanguin O s'explique notamment par des inactivations des gènes codant pour les enzymes A et B. En prenant en considération les voies de synthèse des antigènes de groupe sanguin conditionnées par les précurseurs de type 1 (gène *FUT2*), la synthèse de l'antigène Lewis a (Le^a) et de l'antigène Lewis b (Le^b) est catalysée par la fucosyltransférase de type 3, codée par le gène *FUT3*. L'antigène Le^a dérive directement du précurseur disaccharidique de type 1 alors que l'antigène Le^b dérive de l'antigène H₁ (pour rappel, composé du précurseur disaccharidique de type 1, auquel un fucose en position α 1,2 a été rajouté par la fucosyltransférase de type 2). Pour les antigènes de groupe sanguin dont la synthèse est sous la dépendance des précurseurs de type 2 (gène *FUT1*), la synthèse de l'antigène Lewis x (Le^x) est catalysée par la même fucosyltransférase de type 3 (gène *FUT3*) par ajout au précurseur de type 2 d'un fucose en position α 1,3. L'ajout d'un fucose à l'antigène H₂ permet la synthèse de l'antigène Lewis y (Le^y).

B. Profils d'accroche des norovirus humains aux HBGA

Les polymorphismes du gène *FUT2* sont un facteur de la susceptibilité aux infections à norovirus (Imbert-Marcille et al., 2014a; Jiang et al., 2017). Les travaux princeps de Marionneau et al. ont démontré que les HBGA sont les ligands qui interagissent avec les norovirus lors de l'infection chez les individus de phénotype sécréteur (Marionneau et al., 2002). L'association de ce phénotype aux infections à norovirus a été par la suite confirmée lors d'une étude menée chez des volontaires (Lindesmith et al., 2003). Les différents polymorphismes du gène *FUT2* permettent de séparer les populations de "sécréteur" et "non-sécréteur". De nombreuses mutations ponctuelles faux-sens ou antisens définissent l'activité de la fucosyltransférase de type 2 (**Figure 7**).

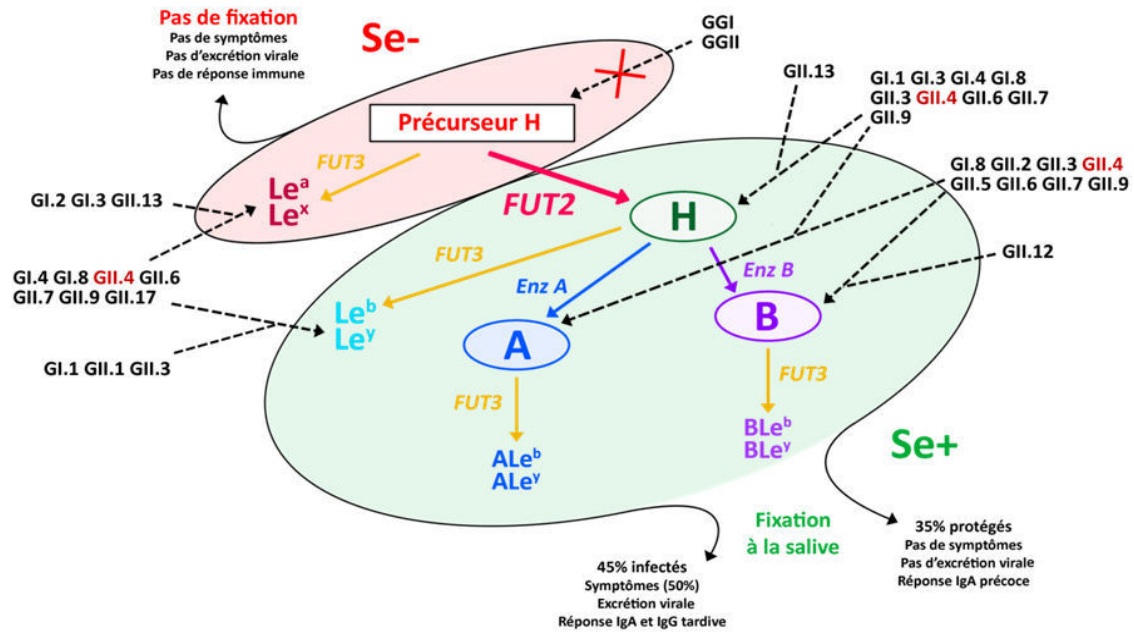


Figure 7. Profils d'attachement des norovirus de génotype I (GI) et II (GII) en fonction des phénotypes sécréteurs (Se+) et non-sécréteur (Se-). Pour chaque HBGA, la liste des génotypes de norovirus pouvant interagir est indiquée par une flèche en pointillés. (D'après Lindesmith et al., 2003; de Rougemont et al., 2010).

Les polymorphismes génétiques les plus couramment retrouvés au sein de la population européenne sont les mutations G428A introduisant un codon stop dans le gène (mutation antisens) et A385T inactivant partiellement l'enzyme (mutation faux-sens). Pour 80% de la population, le gène *FUT2* sauvage est à l'origine de l'expression des antigènes de groupe sanguin ABH(O) au niveau des entérocytes, des sécrétions muqueuses et de la salive. L'expression entérocytaire des antigènes ABH(O) constitue la porte d'entrée des norovirus, optimisant ainsi leur pouvoir infectieux. Pour les 20% restants de la population Européenne, la transmission d'une mutation bi-allélique antisens ou faux sens du gène *FUT2* va entraîner une forte baisse voire une suppression totale de la synthèse des antigènes de groupe sanguin ABH(O) sur les entérocytes et la salive. La susceptibilité aux infections par les norovirus est alors diminuée chez les sujets non-sécréteurs (**Figure 7**). Toutefois, l'accroche des norovirus sur les cellules intestinales serait dépendante du génotype, de la souche concernée, et le spectre d'accroche large aux HBGA de certaines souches de norovirus GII.4 expliquerait en partie leur important pouvoir infectieux et leur prédominance dans le monde (Ayouni et al., 2015a; Lindesmith et al., 2003; Pollock et al., 2018; de Rougemont et al., 2010).

C. Expression tissulaire des HBGA chez l'homme

En histologie et en embryologie, demeure le concept d'expression antigénique différentielle dépendante du sous-type cellulaire et de l'origine embryologique. Sur ce principe, un gradient d'expression différentiel a été décrit chez l'homme au sein du tractus digestif (**Tableau 2**) (Ravn and Dabelsteen, 2000). Chez l'adulte, il existe une expression abondante des antigènes de groupe sanguin au niveau des principales structures dérivant embryologiquement de l'intestin antérieur et moyen, suivant un gradient proximal-distal. En effet, l'estomac, le duodénum, le jéjunum et l'iléon expriment les antigènes ABH(O) de manière sécréteur-dépendante sous le contrôle du gène *FUT2*, ainsi que les antigènes Le^x, Le^y, Le^a et Le^b (Finne et al., 1989). Le côlon proximal, dérivé de l'intestin moyen, exprime les antigènes ABO(H), Le^b et Le^y associé à une expression faible de l'antigène Le^x dans les cryptes hautes (Dabelsteen et al., 1988; Schoentag et al., 1987).

Tissu/origine embryologique	Expression du type de chaîne	Couche cellulaire et type	Expression des carbohydrates	Sécréteur dépendant
Estomac (Endoderme)	Types 1 et 3	Zone fovéolaire superficielle	Le ^a , Le ^b A/B, H sLe ^{a*} , T*, H ₃ , (sTn, Le ^{x*} , sLe ^x), Tn golgien,	Oui
		Cellules mucosécrétantes	A/B, H, sTn, sLe ^{x*} sLe ^{a*}	Oui
	Type2	Glandes gastriques hautes	Le ^{x*}	Oui
		Glandes pyloriques basales	A/B, H, Le ^y ALe ^y	Non
		Cellules mucosécrétantes	Le ^x , Le ^y	Non
		Cellules pariétales	A, sTn	Oui
Cellules principales	H ₂	Non		
Intestin grêle (endoderme)	Types 1, 2 et 3	Villosités superficielles (entérocytes et cellules caliciformes)	A/B, H, Le ^b , Le ^y Le ^{a*} , Le ^{x*} , sTn	Oui
	Type 2 (Type 3)	Glandes de Brunner profondes	A, Le ^x , Le ^y , Tn N-Lac*, Le ^{x*}	Non
Gros intestin (endoderme) proximal	Type 1 (Type 2) (Type 3)	Epithélium de surface	sLe ^a	Non spécifié
		Cryptes hautes	Le ^b , Le ^a , ssLe ^a (Le ^y , H ₂ , Le ^x)	Oui
		Entérocytes	A	Oui
		Cellules caliciformes	ALe ^b	Oui
		Cryptes basales	Le ^y , Le ^{x*} , sTn (caecum uniquement)	Oui
Gros intestin (endoderme) distal	Type 1	Epithélium de surface	sLe ^a	Non
		Cryptes hautes	Le ^a , ssLe ^a	Non
	Type 2	Cryptes basales	Le ^x , Le ^y	Non

Tableau 2. Expression des HBGA dans le tractus digestif. T : antigène T ; Tn : antigène Tn ; sTn : antigène Tn sialylé ; H₃ : chaîne précurseur de type H3 ; N-Lac : N-lactosamine ; ssLe^a : Lewis a disialylé ; ALe^y : antigène A-Lewis y ; * antigène présent chez les sujets non-sécréteurs (D'après Ravn and Dabelsteen, 2000).

Concernant les structures dérivées de l'intestin postérieur, incluant le côlon transverse, le sigmoïde et le rectum, il existe une faible expression ubiquitaire de l'antigène Le^a et des formes disialylées de cet antigène, ainsi qu'une faible expression de l'antigène Le^a dans sa forme monosialylée, non sulfonée et non acétylée, les formes acétylées et sulfonées se retrouvant dans les formes pathologiques comme le Sialyl-Lewis a (sLe^a) (Ruggiero et al., 1988; Schoentag et al., 1987). Dans les structures dérivées de l'intestin postérieur, l'expression des antigènes de groupe sanguin est limitée aux cryptes basales. Ces cryptes basales possèdent un fort pouvoir prolifératif, similaire à celui d'une cellule souche pluripotente ; ce fort pouvoir régénératif explique l'expression antigénique sur toute la hauteur en cas de destruction de la muqueuse jusqu'au niveau de la sous-muqueuse (Nakagoe et al., 1994a). Enfin, il existe une surexpression des antigènes de groupe sanguin comme l'antigène sLe^a détecté par le clone 116-NS-19.9 et l'antigène Sialyl-Lewis x (sLe^x) détecté par le clone CSLEX1, dans certaines affections néoplasiques (Nakagoe et al., 1994a). Quant au côlon fœtal, des études immunohistochimiques datant des années 1980 ont démontré une surexpression de l'ensemble des antigènes ABH(O), et des antigènes Le^a, Le^b, Le^y et de Le^x en anténatal (Abe et al., 1986; Itzkowitz et al., 1986, 1990). Ces mêmes études ancillaires ont également porté sur l'étude de l'expression des antigènes de groupe sanguin en contexte tumoral. Il existerait une profonde altération de la glycobiochimie notamment dans le cas d'adénocarcinomes coliques, pour lesquels une surexpression de l'ensemble des antigènes de groupe sanguins est fréquemment observée (Cordon-Cardo et al., 1986).

L'altération de l'expression des HBGA n'est pas le propre des cancers de l'intestin, mais concerne d'autres pathologies intestinales comme les Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin (MICI).

III. NOROVIRUS ET MALADIES INFLAMMATOIRES CHRONIQUES DE L'INTESTIN

A. Les Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin

Les MICI comprennent deux affections intestinales inflammatoires chroniques que sont la maladie de Crohn (MC) et la rectocolite hémorragique (RCH). La MC a été décrite par Bernard Crohn en 1932, associé aux médecins Léon Ginzburg et Gordon Oppenheimer (Crohn et al., 1984). Les premières descriptions de la RCH remonteraient aux années 1850. Malgré la description relativement ancienne de ces affections, leur évaluation clinique, pathologique et biologique reste encore partiellement connue. Les mécanismes de genèse, d'entretien et de rémission de la maladie sont également peu décrits, laissant de nombreuses questions scientifiques en suspens.

1. Epidémiologie des MICI

En France, les principales données épidémiologiques issues de l'observatoire national des MICI, coordonnées par l'assurance maladie, dénombraient 212 700 personnes prises en charge pour MICI avec un *sex ratio* quasi-identique pour les hommes et les femmes et un âge moyen et médian de 48 ans. Les proportions de sujets atteints de MICI oscillent entre 0,21 ‰ pour la tranche d'âge 0-14 ans jusqu'à 5,48 ‰ pour la tranche d'âge 35-54 ans. Les décès imputables à ces pathologies demeurent rares, restant limités à une moyenne de morbi-mortalité de 1,09% des sujets, avec un âge moyen de décès de 74 ans et un âge médian de décès de 77 ans. Une étude épidémiologique récente a intégré les données de 195 pays, montrant une explosion du nombre de cas passant de 3,7 à 6,8 millions de cas annuels et une prévalence ayant augmenté de 79,5 / 100 000 en 1990, contre 84,3 / 100 000 en 2017. Les pays avec la prévalence la plus élevée demeurent les pays industrialisés, comme le Royaume-Uni (3,73 ‰) ou les Etats-Unis (4,65 ‰) (Alatab et al., 2020).

2. Manifestations cliniques des MICI

Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) sont caractérisées par des douleurs abdominales et une fièvre ainsi que des diarrhées inconstantes. Ces symptômes, souvent invalidants, motivent la réalisation d'un bilan étiologique à la recherche d'une MICI. La MC est une maladie pouvant atteindre l'ensemble du tractus digestif, de la bouche à l'anus, à l'inverse de la RCH qui atteint exclusivement le colon et le rectum. Au cours de la RCH, la présence de sang et de mucus dans les selles est habituelle, alors que dans la MC, les diarrhées

sont souvent non sanglantes. A noter que des iléites de reflux (« *backwash ileitis* ») peuvent s'observer dans les RCH, pouvant les faire classer à tort comme une MC (Haskell et al., 2005). Une dénutrition s'observe couramment au cours des MICI et pourrait être associée à des syndromes carenciels et des retards de croissance dans les formes pré-pubertaires (Hendrickson et al., 2002). Des manifestations extra-intestinales peuvent également survenir au décours de ces maladies, comme des manifestations cutanées (ulcères neutrophiliques – « *pyoderma gangrenosum* »), des arthralgies (spondylarthrites ankylosantes ou sacro-iléites), des uvéites, une ostéoporose précoce ou encore des lithiases urinaires liées à une hypovitaminose D secondaire (Hendrickson et al., 2002). La survenue de cholangites sclérosantes primitives (CSP), se caractérise par une inflammation sévère des voies biliaires intrahépatiques, avec un risque chez les patients atteints de MICI et de CSP de développer un carcinome colorectal de manière précoce (Brentnall et al., 1996).

3. Evaluation histopathologique des MICI

L'évaluation histopathologique des MICI est réalisée par l'interprétation histologique des prélèvements biopsiques, obtenus au cours d'endoscopies digestives, et des pièces opératoires obtenues lors de chirurgies digestives. Cette évaluation histopathologique demeure indispensable, car elle permet de définir la « rémission histologique » (Bryant et al., 2014). Cette dernière correspond à la résolution de l'inflammation active observée histologiquement. Des études ont ainsi montré que la rémission histologique constitue un facteur prédictif important de la rémission clinique des symptômes liés aux exacerbations inflammatoires de MICI (Bryant et al., 2014).

Les classifications histologiques des rectocolites hémorragiques, permettent au gastro-entérologue de grader l'atteinte inflammatoire muqueuse selon des scores simples à utiliser en pratique courante. Le premier score développé dans les années 1990 est le score de Riley, basé sur l'évaluation des abcès cryptiques, du degré d'infiltration inflammatoire et de la présence ou non d'une déplétion mucineuse (Riley et al., 1991). Dans les années 2000, le score de Geboes a été démocratisé pour grader les RCH (Geboes et al., 2000). Le score de Geboes est basé sur les modifications architecturales de la muqueuse, le degré d'infiltration en polynucléaires neutrophiles et éosinophiles du chorion et de l'épithélium, les altérations cryptiques et également la présence ou non d'érosions muqueuses. Une proposition de score simplifié réalisée en 2017 tend à supprimer les altérations cryptiques comme critère de jugement de la sévérité des RCH (**Figure 8**) (Jauregui-Amezaga et al., 2017).

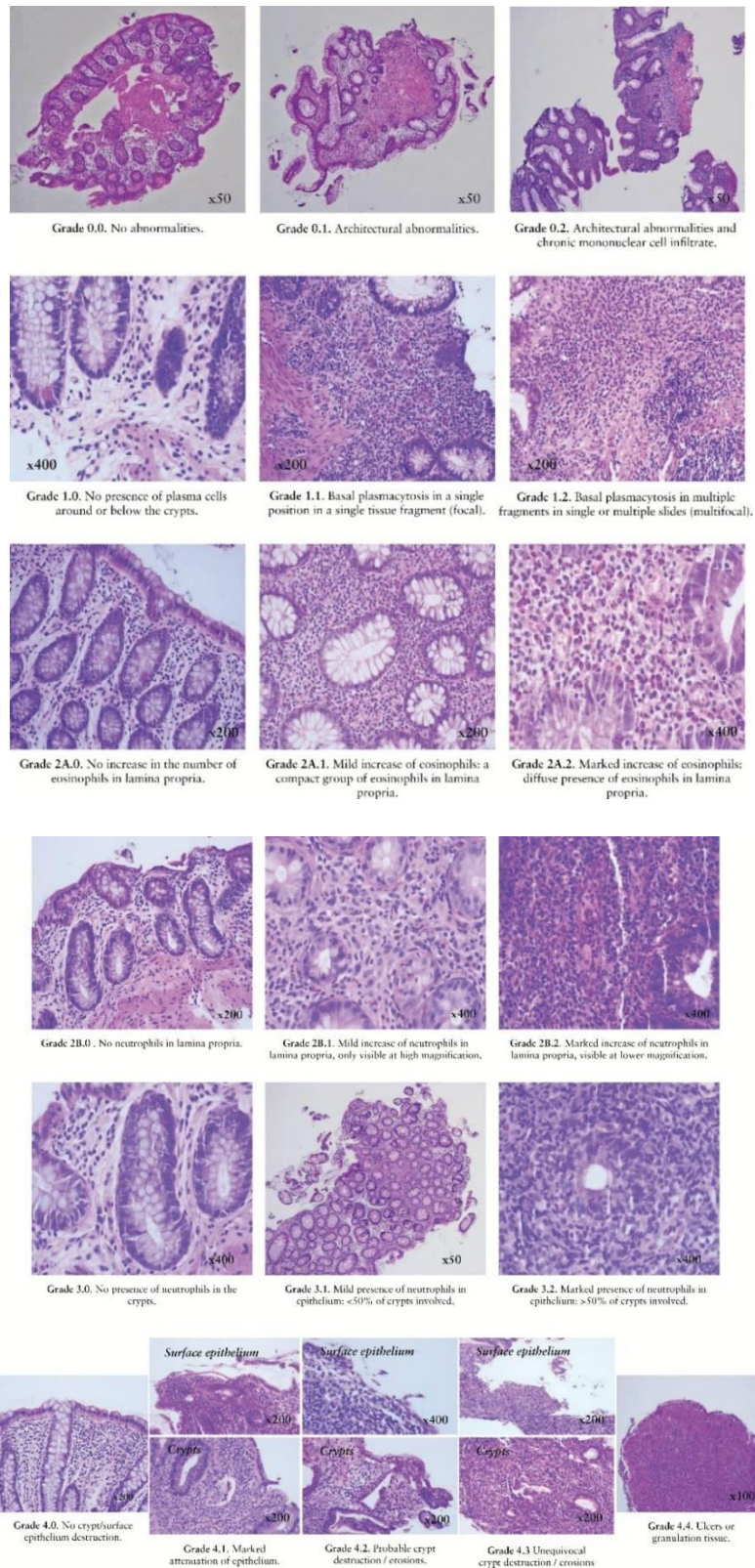


Figure 8. Score de Geboes modifié. (D'après Jauregui-Amezaga et al., 2017).

Dans le même temps, d'autres scores histologiques ont été développés, comme le score de Nancy, basé sur l'appréciation histologique du degré d'inflammation muqueuse et la présence ou non d'ulcérations muqueuses (**Figure 9**) (Marchal-Bressenot et al., 2017).

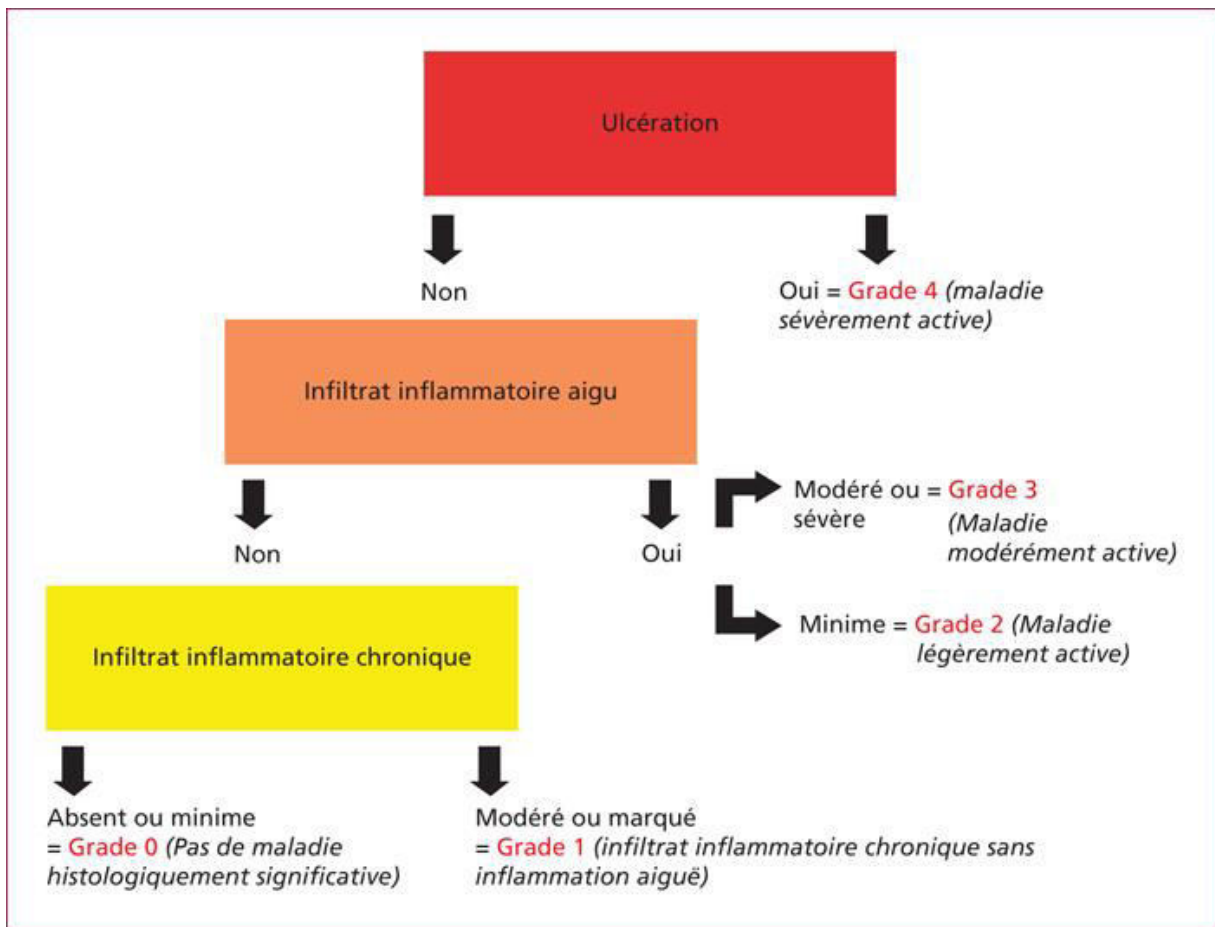


Figure 9. Score histologique de Nancy. (D'après Brichet et Roblin, 2017 ; Marchal-Bressenot et al., 2017).

Les classifications histologiques sont peu utilisées dans la MC du fait d'une mauvaise corrélation avec les paramètres cliniques et endoscopiques (Bryant et al., 2014). Toutefois, de nombreuses tentatives de classification ont été faites, comme la classification de D'Haens, encore appelée « Colonic and Ileal Global Histologic Disease Activity Score » (CGHAS ou IGHAS), prenant en compte les lésions épithéliales, le type d'infiltrat inflammatoire, la présence ou non d'ulcérations muqueuses et le nombre de biopsies lésées.

4. Etiopathogénie des MICI

Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) sont des maladies multifactorielles dont l'étiopathogénie demeure complexe et partiellement expliquée par des facteurs environnementaux (tabac, alimentation), microbiologiques (notion de « microbiote » intestinal), immunologiques, et génétiques tous profondément intriqués les uns aux autres.

La forte prévalence des MICI dans les pays industrialisés serait partiellement expliquée par la faible exposition à des agents pathogènes communs du tube digestif, entraînant une forte vulnérabilité de sujets initialement porteurs de facteurs de susceptibilité génétique (Théorie « hygiéniste ») (Saidel-Odes et Odes, 2014). Cependant, les MICI restent des maladies multifactorielles très complexes, ne pouvant être que partiellement expliquées par la génétique : en effet, le taux de concordance des MICI demeurerait faible au sein de fratries de jumeaux monozygotes (Halme et al., 2006), même si une étude de type *Genome Wide Association Studies* (GWAS) dénombrent au moins 163 loci impliqués dans les interactions entre le microbiote intestinal et les tissus d'un hôte atteint d'une MICI (Jostins et al., 2012). Par ailleurs, de nombreux facteurs environnementaux moduleraient les maladies de Crohn et les rectocolites hémorragiques : le tabagisme actif présenterait un effet bénéfique chez les patients atteints de recto-colite hémorragique, alors qu'il serait néfaste chez les patients atteints de MC (Harries et al., 1982; Somerville et al., 1984). La prise d'une contraception orale, la sédentarité, l'obésité, le climat, la pollution, le niveau de stress psychologique, mais aussi les antécédents de chirurgie digestive pourraient jouer un rôle dans la genèse des MICI (Abegunde et al., 2016). Le microbiote intestinal serait également un des principaux acteurs expliquant l'entretien de l'inflammation dans les MICI : des modifications de la proportion de certaines bactéries, comme par exemple la diminution quantitative des genres *Bacteroides*, *Firmicutes*, *Clostridium*, *Faecalobacterium Prausnitzii*, ou encore *Lactobacillus spp.* en comparaison avec une augmentation des genres *Fusobacterium*, *Escherichia Coli* entéro-invasif, et en Gammaprotéobactéries (Dalal and Chang, 2014). L'âge jouerait également un rôle étroitement lié à la composition du microbiote intestinal pouvant varier à la naissance mais également au cours de la vie (Dominguez-Bello et al., 2011). Le régime alimentaire en modulant la composition du microbiote intestinal interviendrait indirectement sur la genèse et l'entretien des MICI. Un régime riche en lipides et en sucres, une carence en vitamine D ou encore une ingestion de produits contenant des sels d'aluminium favoriseraient l'apparition de MICI (Owczarek et al., 2016; Reif et al., 1997).

Aux altérations du microbiote intestinal liées à l'environnement ou à l'alimentation, et aux différentes susceptibilités génétiques interindividuelles, s'ajoutent des facteurs immunitaires pour expliquer l'étiopathogénie des MICI. Le premier gène identifié dans les voies de signalisation immunitaires, en relation étroite avec le microbiote intestinal, pouvant être impliquées dans les MICI, est le gène *NOD2*. Ce gène permet la stimulation d'une voie immune permettant la reconnaissance d'un peptidoglycane (muramyl-dipeptide) constituant la paroi des bactéries Gram positives et négatives, au niveau des cellules de Paneth, localisées à la base des cryptes de l'intestin grêle (notamment de l'iléon), ces cellules permettant la production de défensines antimicrobiennes (Ogura et al., 2001; Stappenbeck et McGovern, 2017). Des mutations du gène *NOD2*, retrouvées chez les patients atteints de MICI, favoriseraient l'adhésion bactérienne aux muqueuses intestinales (et donc par conséquent modifierait la composition du microbiote intestinal) et entraîneraient une diminution de la production d'Interleukine 10 (IL10), favorisant l'inflammation intestinale (Philpott et Girardin, 2009). Des mutations de gènes de l'autophagie, notamment *ATG16L*, joueraient également un rôle dans la composition du microbiote intestinal et dans la dérégulation des voies de signalisation inflammatoires entraînant les poussées de MICI (Frank et al., 2011).

B. Relations avérées entre virus entériques et MICI

Une revue de la littérature scientifique concernant les interactions entre norovirus et MICI a été publiée récemment par nos soins (**Annexe 2**) (Tarris et al., 2021a). Elle résume et traduit la complexité des interactions hôte-pathogène chez des patients atteints de MICI.

1. Epidémiologie des norovirus dans les MICI

Les études épidémiologiques concernant la prévalence et l'incidence des virus entériques chez les sujets atteints de MICI demeurent rares (**Tableau 3**). La première étude épidémiologique réalisée en 1982 par Gebhard et al. a détecté les norovirus et rotavirus présents dans les selles suivant des diarrhées ainsi que la réalisation de sérologies à 3 mois d'intervalle (Gebhard et al., 1982). 77 patients ont été suivis pendant 14 mois, durant lesquels 65 poussées inflammatoires de MICI ont été répertoriées chez 54 patients. Parmi les 266 selles obtenues durant la période de l'étude, 55 ont été collectées durant des poussées inflammatoires de MICI. L'analyse statistique n'a pas permis de faire le lien entre poussées inflammatoires et infections à rotavirus et norovirus. Toutefois, 5 patients sur 8 avec des sérologies norovirus ou rotavirus positives avaient des tableaux cliniques d'exacerbations de MICI (Gebhard et al., 1982). La seconde étude épidémiologique menée par Khan et al. a comparé les bases de données d'un service

d'urgences pédiatriques (Charleston, Virginie de l'Est) et les résultats de 2666 tests antigéniques IDEIA pour les norovirus GI et GII, sur une période de 10 mois (Khan et al., 2009). Sur l'ensemble des patients (23 patients atteints de MC et 14 patients atteints de RCH), 9 patients (1 patient atteint de MC et 8 patients atteints de RCH), qui avaient présenté des diarrhées sanglantes liées à une exacerbation de MICI, avaient des antigènes de norovirus dans les selles. Au cours de l'étude, un lien épidémiologique a ainsi été établi entre poussées inflammatoires et la présence de norovirus GI et GII dans les selles (Khan et al., 2009). De plus, sur les 9 patients positifs aux norovirus, 3 présentaient également une co-infection à *Clostridium Difficile*, *Adenovirus* ou *Rotavirus* (Khan et al., 2009). Plus récemment, dans le cadre d'une étude menée en Suède, la détection par RT-PCR des norovirus, astrovirus, sapovirus et rotavirus a été réalisée sur 50 échantillons de selles de patients atteints de MICI, prélevés lors de la réalisation d'endoscopies digestives (Kolho et al., 2012). Cette étude n'a pu permettre de mettre en évidence un lien épidémiologique significatif sur cette cohorte au demeurant de petite taille, malgré les nombreux prélèvements réalisés au décours de poussées inflammatoires de MICI chez des patients réfractaires (Kolho et al., 2012). Une étude plus récente, aux Pays-Bas sur 286 patients ayant bénéficié de multiples prélèvements de selles sur une durée totale de 1 an, n'a également démontré aucun lien épidémiologique entre virus entériques et poussées inflammatoires de MICI (Maslee et al., 2013). Enfin, l'étude la plus récente a été réalisée à New-York par Axelrad et al. sur une cohorte de très grande taille, par croisement de bases de données de patients souffrant de gastro-entérites aiguës, ayant bénéficié de la réalisation d'une batterie PCR ciblant de nombreux pathogènes gastro-intestinaux bactériens, viraux et parasitaires (Axelrad et al., 2018). Un total de 9403 patients ayant bénéficié de 13231 batteries PCR ont été pris en compte sur une période de 2 ans. Sur l'ensemble des patients, 577 patients souffraient de MICI (277 patients souffrant de MC et 300 patients souffrant de RCH), et ont été comparés à 8826 patients indemnes de MICI (population contrôle). Les résultats de l'étude ont démontré une prévalence plus importante d'infections par des pathogènes entériques chez les patients MICI, notamment par les norovirus humains, ainsi que par *Escherichia Coli* Entéro-Invasif (EIEC), quel que soit le stade des poussées (Axelrad et al., 2018).

En conclusion, les études épidémiologiques décrivant le lien entre les infections à norovirus et la survenue de poussées inflammatoires de MICI demeurent rares. La puissance statistique des études épidémiologiques réalisées demeure souvent faible, du fait de cohortes de petite taille et d'une faible prévalence des virus entériques dans ces cohortes. Le croisement de bases de données incluant des bassins de population importants a cependant permis d'établir le lien entre les norovirus humains et les poussées de MICI.

Etude	Lieu/Durée	Type d'étude	Cohorte	Tranches d'âge	Echantillons Matériels et Méthodes	Conclusions Discussion
Gebhard et al. 1982 [7]	Juin 1978 Octobre 1980 Minneapolis (Etats-Unis)	Cas-Témoins Suivi prospectif	57 MC 20 RCH 10 N	Tous les patients : 11-64 (moyenne 31,5 ans) Poussées : 49 M, 16 RCH	266 échantillons de selles (55 durant les poussées) : - Tests antigéniques sur selles - Sérologies NoV et RVA (Suivi à 3 mois)	Absence d'association 5 positifs /65 poussées de MICI Sérologies positives (NoV et RVA) corrélées avec des symptômes de poussées de MICI (5/8)
Khan et al. 2009 [11]	Novembre 2006 Août 2007 Charleston (Etats-Unis)	Cas-Témoins Etude rétrospective	23 MC 14 RCH 9 CI 2620 N	Poussées de MICI : 11-18 (moyenne 15,3 ans)	2666 échantillons de selles Kit antigénique Norovirus IDEIA (Dako)	Association entre poussées de MICI et norovirus 1119 positifs 9 poussées de MICI : MC (1/23) : 1 NoV + 1 RVA RCH (7/14) : 7 NoV + 1 hAdV CI (0/9) Saisonnalité de la maladie (p<0.001)
Kolho et al. 2012 [8]	Dates inconnues Helsinki (Finlande)	Suivi prospectif	18 MC 13 RCH 2 CI 17 N	Patients MICI : 2,4-18 (moyenne 12,9 ans) Patients non-MICI (N) : 2,7-16 (moyenne 11 ans)	50 échantillons de selles RT-PCR : (NoV, RVA, hAdV, SaV, hEV)	Absence d'association MICI : 0/33 positifs Non-MICI : 3/50 positifs (2 NoV and 1 SaV)
Maslee et al. 2013 [9]	Août 2009 Novembre 2010 Maastricht (Hollande)	Suivi prospectif	170 MC 116 RCH	Patients MICI : moyenne de 46,2 ans (Déviation standard de 15,2 ans)	286 échantillons de selles / suivi trimestriel pendant 1 an RT-PCR (AdV, hAstV, NoV, RVA)	Absence d'association 86 poussées de MICI : RVA (2.3%), hAdV (2.3%) 200 rémissions de MICI : RVA (0.5%), NoV (0.5%), hAdV (4.5%)
Axelrad et al. 2018 [10]	Mars 2015 Mai 2017 New York (Etats-Unis)	Analyses par croisement de bases de données	277 MC 300 RCH 8826 N	MC : médiane 37,7 ans RCH : médiane 47,1 ans N : médiane 42,9 ans	13231 échantillons de selles Batterie PCR (22 cibles, incluant hAdV, hAstV, NoV, SaV, RVA)	Association entre poussées de MICI et norovirus MC et RCH : Prévalence plus importante des virus entériques (MC ; p<0,05) (RCH ; p<0,019)

MC: Maladie de Crohn; RCH: Rectocolite hémorragique; N: Sain; hAdV: adenovirus; hAstV: astrovirus; hEV: enterovirus; NoV: norovirus; RVA: rotavirus; SaV: sapovirus.

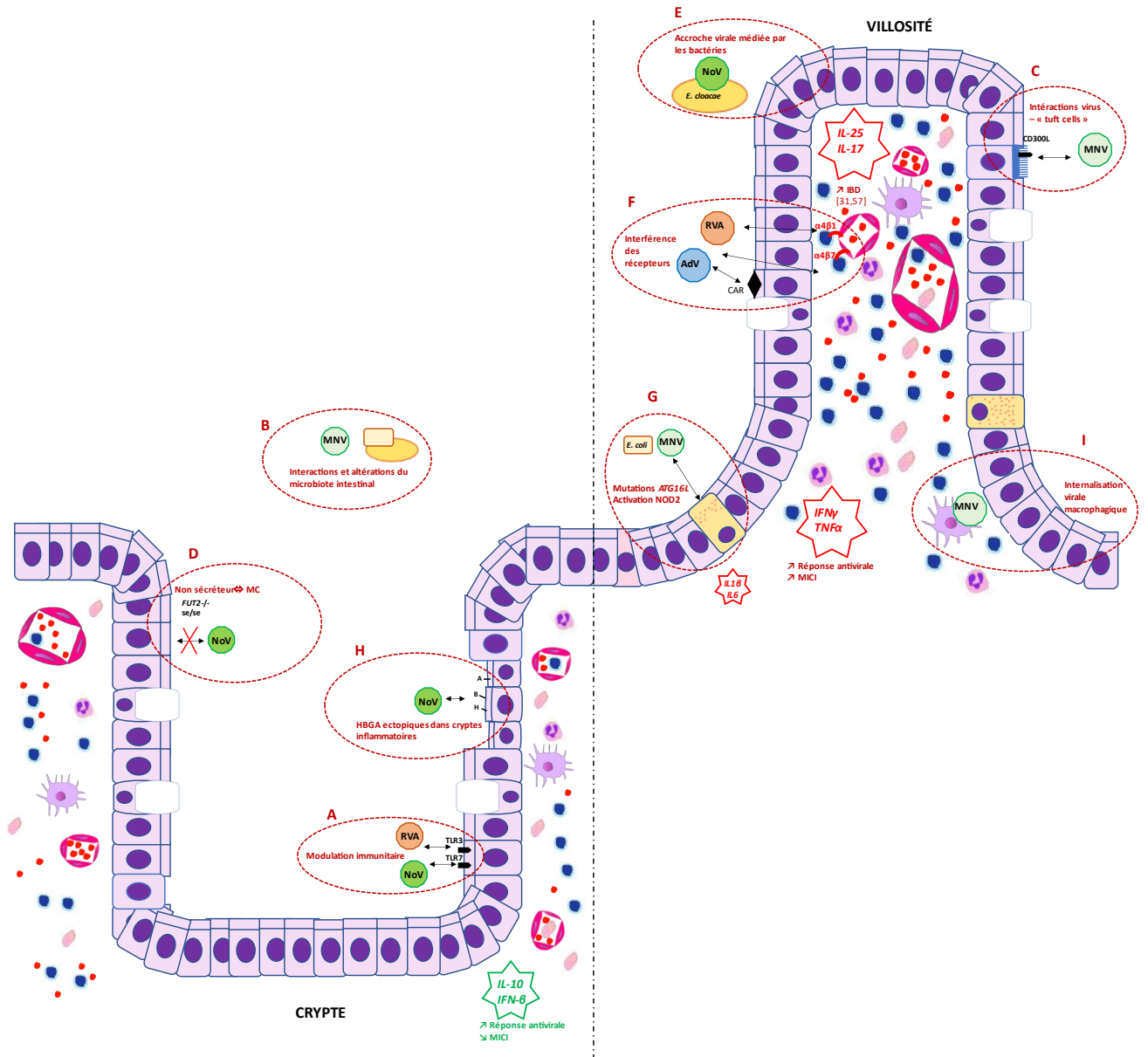
Tableau 3. Etudes épidémiologiques concernant les virus entériques et les poussées inflammatoires de Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin. (D'après Tarris et al., 2021).

2. Interactions virus-tissus et expression HBGA au cours des MICI

Les virus entériques, comme les norovirus et les rotavirus, utilisent les HBGA comme ligands. Une étude d'association pangénomique menée par Hu et al. a démontré une fréquence plus élevée de diverses mutations du gène *FUT3* chez des patients chinois atteints de RCH, par rapport à une population contrôle d'individus ne souffrant pas de MICI (Hu et al., 2016a). Il a été ainsi observé chez ces patients une expression accrue de l'antigène Le^a au niveau du côlon distal inflammatoire (Hu et al., 2016a). D'autres études d'association pangénomiques ont démontré que de nombreux polymorphismes nucléotidiques du gène *FUT2* pourraient ainsi contribuer à la genèse de la MC, du fait d'altérations de l'expression des HBGA dans le tractus intestinal (Franke et al., 2010; McGovern et al., 2010a). Ces altérations d'expression des HBGA modifieraient la capacité d'accroche des pathogènes sur le tractus digestif, et par conséquent leur prévalence et leur pouvoir infectieux. En effet, l'étude menée par Rausch et al. démontre ainsi par comparaison du microbiote intestinal de patients sécréteurs et non-sécréteurs atteints de MC, des différences significatives d'abondance des populations de *Lachnospiraceae*, *Faecalibacterium* et *Lactobacillus* (Rausch et al., 2011). Une analyse génétique menée sur un panel de patients japonais, comprenant 51 patients atteints de MC et 30 patients contrôles indemnes de MICI, a montré la présence d'une grande majorité de sécréteurs, avec une expression anormale des HBGA uniquement au niveau des échantillons tissulaires de côlon inflammatoire (Miyoshi et al., 2011). De plus, cette expression anormale des HBGA précédant le développement de la colite a été vérifiée dans un modèle expérimental de colite inflammatoire utilisant des souris homozygotes déficientes pour la production d'interleukine 10 (IL10^{-/-}) (**Figure 10**) (Miyoshi et al., 2011). L'étude menée par Ruvoën-Clouet et al. démontre la présence d'une expression aberrante de l'antigène sLe^x au niveau de la muqueuse gastrique de patients non-sécréteurs infectés par la souche Cag-A d'*Helicobacter Pylori*, démontrant la possibilité de la modulation d'expression des HBGA par des populations de bactéries à fort pouvoir pathogène, et par conséquence modifiant l'accroche des norovirus et de leur pouvoir infectieux (Ruvoën-Clouet et al., 2014).

Gros intestin

Intestin grêle



				Norovirus humain
				Rotavirus
				Norovirus murin
				Adenovirus
				Bactéries intestinales
				Bactéries intestinales
				Aggravation MICI
				Amélioration MICI

Figure 10. Résumé des mécanismes potentiels sous-tendant les interactions des virus entériques dans le contexte des MICI. Les voies de signalisation de l'inflammation impliquées dans la pathogenèse des MICI sont indiquées en rouge et en vert. **(A)** Les virus entériques, tels que les rotavirus et les norovirus, pourraient moduler la réponse immunitaire au cours des MICI et améliorer les symptômes des MICI par le biais d'une hypersécrétion d'interféron β (IFN β) (Yang et al., 2016). Le rôle protecteur de l'interleukine 10 (IL-10) a été prouvé à travers l'utilisation de modèles murins IL10 $-/-$ arborant des entérocolites après exposition aux virus entériques (Basic et al., 2014; Burich et al., 2001; Hsu et al., 2014; Kühn et al., 1993; Lencioni et al., 2008; Li and He, 2004). **(B)** Les interactions du bactériome et du virome intestinal pourraient également expliquer la pathogenèse des MICI, en effet, une infection à MNV asymptomatique pourrait remplacer les effets bénéfiques de bactéries commensales (Kernbauer et al., 2014). **(C)** Des données scientifiques récentes ont révélé que les norovirus pourraient s'accrocher aux « tuft cells », qui pourraient alors jouer un rôle important dans la voie de signalisation pro-inflammatoire médiée par IL25/IL17, au cours des MICI (Lencioni et al., 2008; Ting et von Moltke, 2019a; Wilen et al., 2018a). **(D)** L'absence de synthèse des HBGA chez les sujets non-sécréteurs du fait de polymorphismes mutationnels des gènes *FUT2* et *FUT3* pourrait être reliée à des altérations des interactions virus-bactérie-cellule qui pourraient être impliqués dans la pathogenèse des MICI (Hu et al., 2016a; McGovern et al., 2010a; Rausch et al., 2011). **(E)** Des interactions entre les virus entériques et des molécules « HBGA-like » à la surface de bactéries commensales ou pathogènes modulées au sein d'un microbiote « MICI-induit » pourraient expliquer les variations de susceptibilité aux virus entériques au cours des MICI (Almand et al., 2017; Lei et al., 2016, 2019). **(F)** L'accroche des virus entériques à des récepteurs critiques impliqués dans l'adhérence leucocytaire et dans la sécrétion cytokinique pourrait également être impliqués dans la pathogenèse des MICI, comme démontré par les interactions des rotavirus et des adénovirus avec des intégrines, ou encore l'activation du récepteur Coxsackie-Adénovirus (CAR) (Chen et al., 2018; Coulson et al., 1997; Hewish et al., 2000; Lin and Castro, 1998; Rajan et al., 2018). **(G)** Des interactions spécifiques entre les virus entériques (notamment le MNV) et des cellules de Paneth défensine-déficientes chez des sujets porteurs de polymorphismes mutationnels du gène *ATG16L* pourraient mener à l'activation du gène *NOD2* et activer les voies de signalisation pro-inflammatoires Th1 et Th17, comme démontré dans les MICI (Cadwell et al., 2010; Homer et al., 2010; Hugot et al., 2001; Kim et al., 2011; Ogura et al., 2001; Plantinga et al., 2011). **(H)** L'expression ectopique des HBGA au sein d'un épithélium intestinal subissant des altérations induites par l'inflammation pourrait alors moduler le potentiel d'accroche des virus entériques (Miyoshi et al., 2011; Ruvoën-Clouet et al., 2014). **(I)** L'internalisation des virus entériques dans les macrophages pourrait stimuler la sécrétion de TNF- α et d'IFN γ , qui sont impliqués dans les voies de signalisation pro-inflammatoires au cours des MICI (Kim et al., 2011; Maloney et al., 2012; Wobus et al., 2006). (D'après Tarris et al., 2021).

3. Interactions norovirus-bactéries au cours des MICI

Les interactions complexes entre virus entériques et bactéries constituant le microbiote intestinal demeurent partiellement expliquées (Pfeiffer et Virgin, 2016). Le contrôle « trans-espèces » des infections aux virus entériques serait assuré par le microbiote intestinal via des phénomènes de tolérance immunitaire en lien avec les lipopolysaccharides bactériens, la modulation immunitaire virale et bactérienne, mais également les interactions directes entre les virus entériques pathogènes et les bactéries commensales du tractus digestif (Pfeiffer and Virgin, 2016; Robinson et al., 2014). Par exemple, des interactions des norovirus humains avec des bactéries commensales comme *Enterobacter cloacae* (souche SENG-6) ou *Staphylococcus aureus* pourraient jouer sur la capacité d'accroche et le pouvoir infectieux des norovirus humains dans l'intestin (**Figure 10**) (Almand et al., 2017; Lei et al., 2016, 2019). En se référant à la diminution des populations bactériennes du genre *Enterobacter* chez des patients atteints de MICI sévères, il est envisageable que les perturbations du potentiel infectieux des virus entériques pourraient survenir chez des patients dont le microbiote intestinal est altéré au cours des poussées inflammatoires de MICI (Ott et al., 2004). Des modèles murins ont permis de démontrer que la composition bactérienne du microbiote intestinal des souris infectées par le MNV pourrait agir comme élément déclencheur de colites murines selon la composition du

microbiote intestinal (Balsega et al., 2019). Les altérations des bactéries du genre *Bacteroides*, liées à des infections à norovirus, pourraient potentiellement induire des colites inflammatoires de manière similaire à ce qui a été observé dans les modèles murins (Bloom et al., 2011; Nelson et al., 2012). Enfin, le MNV posséderait également la capacité de remplacer les fonctions physiologiques des bactéries commensales dans des modèles murins dépourvus de germes bactériens (« germ-free »), démontrant ainsi son rôle singulier dans le fonctionnement du microbiote intestinal (Kernbauer et al., 2014). Le rôle des virus entériques, notamment des norovirus, sur les poussées inflammatoires de MICI demeure alors intimement lié à l'étude conjointe du terrain génétique, des voies de signalisation inflammatoires et des interactions avec le microbiote intestinal des virus entériques chez les individus atteints de MICI, infectés par les norovirus humains.

4. Virus entériques et voies de signalisation au décours des MICI

Les mécanismes cellulaires sous-tendant l'inflammation des muqueuses du tractus digestif, observée au décours des MICI, sont complexes. Il se traduit par le recrutement *in situ* de cytokines pro-inflammatoires et de cellules immunitaires, notamment de l'interleukine 1 (IL-1) et de l'interleukine 17 (IL-17), et d'une polarisation Th1 et Th17 de la réponse lymphocytaire (Ito et al., 2006; Leppkes et al., 2009). La sécrétion *in situ* du facteur de nécrose tumorale TNF- α est également impliquée dans l'exacerbation inflammatoire des MICI. Il a fait l'objet de thérapies anti-TNF- α , encore appelées « biothérapies » (Murch et al., 1993; Peyrin-Biroulet, 2010). A l'opposé, il existe des cytokines anti-inflammatoires, comme l'interleukine 10 (IL-10) ou comme le facteur de croissance tumorale TGF- β qui stimule la régénération épithéliale et a un effet protecteur contre l'inflammation muqueuse (Li and He, 2004; Rani et al., 2011).

Chez la souris, le MNV peut potentiellement aggraver les symptômes des colites inflammatoires, voire être à l'origine de colites inflammatoires murines. L'infection des macrophages par le MNV induirait une importante réponse antivirale par hypersécrétion d'interféron gamma (IFN- γ) (Maloney et al., 2012; Wobus et al., 2004). De façon similaire, une infection à norovirus chez l'homme provoquerait une hypersécrétion d'IFN- γ pouvant aggraver l'inflammation des muqueuses du tractus digestif. Le MNV serait à l'origine de colites inflammatoires du fait d'altérations des cellules épithéliales intestinales liées à l'infection à MNV, dans le cas de modèles murins homozygotes IL-10 déficients (IL10 $-/-$) (Basic et al., 2014; Kühn et al., 1993). Le MNV pourrait également aggraver les symptômes des colites inflammatoires induites par *Helicobacter bilis*, par le biais d'une hypersécrétion d'IFN- γ par les lymphocytes T polyclonaux CD4- CD8- (Burich et al., 2001; Lencioni et al., 2008). D'autres

études ont montré l'implication de cellules ciliées sensibles à des médiateurs chimiques appelées « tuft cells », sécrétant l'IL-17 qui active des lymphocytes « T-helper 2 » (Th2) (Gerbe et al., 2012). Le MNV pourrait infecter ces « tuft cells » via leur accroche au récepteur CD300L et induire leur prolifération ainsi qu'une immunomodulation *in situ* de la barrière muqueuse intestinale, via une hypersécrétion d'interleukine 25 (IL-25) et d'IL-17, cela aggravant potentiellement l'inflammation des muqueuses du tractus digestif murin (**Figure 10**) (Ting et von Moltke, 2019; Wilen et al., 2018).

Chez l'homme, les effets des virus entériques sur les voies de signalisation inflammatoires impliquées dans la genèse ou l'entretien des MICI restent à déterminer. Des études d'infection aux norovirus GI.1 réalisées sur des volontaires ont démontré une élévation des populations lymphocytaires Th1 et une hypersécrétion des cytokines TNF α , IL-8 et IL-10 chez les sujets infectés par comparaison aux témoins (Newman et al., 2015). Une hypersécrétion d'IFN α , IFN β et IFN λ pourrait entraîner une cascade inflammatoire induisant une réponse antivirale dirigée contre les norovirus et rotavirus (Baldrige et al., 2017; Hernández et al., 2015; Metzger et al., 2018). Les norovirus et rotavirus pourraient avoir un rôle protecteur grâce à leur capacité à modérer l'inflammation intestinale via la production d'IFN β , médiée par les Toll-Like Receptors (TLR) 3 et 7 (**Figure 10**) (Yang et al., 2016).

Chez l'homme, l'étude des voies de signalisation inflammatoires au cours des infections aux virus entériques associée aux poussées inflammatoires des MICI reste encore peu explorée, mais serait intimement liée aux voies de signalisation de l'autophagie (Franke et al., 2010). Le gène *NOD2* coderait pour un récepteur de reconnaissance de motifs moléculaires (« Pattern Recognition Receptor » - PRR) entraînant le recrutement de la protéine ATG16L impliquée dans des processus d'autophagie anti-microbiens (Homer et al., 2010). Des polymorphismes mutationnels du gène *NOD2* seraient impliqués dans la genèse des MICI par le biais d'une hyperactivation de NF- κ B par les monocytes de la lamina propria, stimulés par des populations bactériennes commensales (Hugot et al., 2001; Ogura et al., 2001). Des études réalisées sur la souris ont démontré que des anomalies de stockage des granules lysosomaux dans les cellules de Paneth, liées à des variants du gène *ATG16L*, pourraient induire une réponse pro-inflammatoire via l'activation de NOD2 et l'hypersécrétion d'interleukine 1 β (IL-1 β) et d'interleukine 6 (IL-6) (**Figure 10**) (Plantinga et al., 2011). A la lumière de ces travaux, une étude récente a démontré que le MNV pourrait spécifiquement activer les voies de signalisation pro-inflammatoires médiées par *NOD1* et *NOD2*, suivant l'internalisation du MNV dans les macrophages de la lamina propria et l'hypersécrétion de TNF- α liée à une infection bactérienne par *Escherichia Coli* (Kim et al., 2011).

5. Modèles expérimentaux de MICI et virus entériques

Les modèles murins de colites mimant les MICI (induites par des agents chimiques ou utilisant les souris IL10^{-/-} avec altérations des voies de signalisation contrôlant l'inflammation intestinale) soulignent le rôle de l'immunité et de l'environnement dans la genèse des MICI. Ces modèles expérimentaux peuvent être utiles dans les études immunologiques, microbiennes et pour l'essai de nouveaux traceurs diagnostiques ou molécules thérapeutiques (DeVoss and Diehl, 2014; Kiesler et al., 2015). Les nouveaux systèmes de culture cellulaire, comme les HIO, donnent de nouvelles opportunités de recherche sur les MICI, car ces structures cellulaires imitent de manière tridimensionnelle un sous-type cellulaire particulier (Zou et al., 2019). De manière singulière, les HIO réagissent au stress cellulaire notamment du réticulum endoplasmique et auraient des fonctions immunomodulatrices similaires aux fonctions observées *in vivo* (Rees et al., 2020). Les HIO ont également des jonctions intercellulaires de type « jonction serrée », une architecture cellulaire et des propriétés régénératives similaires à celles de l'épithélium intestinal. Toutefois l'absence de cellules dérivées de niches cryptiques, seules à pouvoir se multiplier, abolirait la formation des HIO, et la formation d'organoïdes dérivées de patients MICI serait semblable à celle observée pour des patients sains, indépendamment du niveau d'inflammation intestinale (**Figure 11**) (Buttó et al., 2020; Chen et al., 2017; Meir et al., 2020; Treveil et al., 2020).

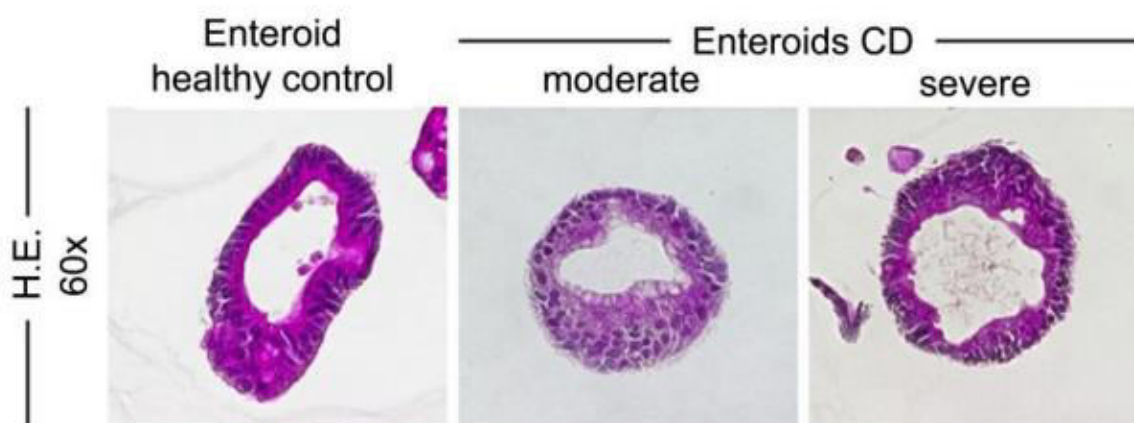


Figure 11. Images H.E. représentatives des entéroïdes générés de donneurs sains et de patients souffrant de maladie de Crohn. (D'après Meir et al., 2020).

Concernant les virus entériques, l'utilisation des HIO, dérivés de cryptes intestinales humaines, issues de chirurgie bariatrique, a démontré son potentiel pour la culture des rotavirus et norovirus humains (Costantini et al., 2018a; Ettayebi et al., 2016; Sato et al., 2009). L'extension de ces techniques aux HIO dérivés de patients MICI reste à étudier pour ces virus entériques.

6. Virus entériques et thérapies utilisées au cours des MICI

Plusieurs approches thérapeutiques innovantes pourraient contribuer à l'amélioration de la symptomatologie chez les patients atteints de MICI, impliquant de prendre en compte les infections éventuelles par les virus entériques. Comme le microbiote intestinal est impliqué dans les poussées inflammatoires de MICI et les mécanismes d'infection par les virus entériques, la réduction de la dysbiose apparaît comme étant une thérapie de choix pour réduire les poussées inflammatoires de MICI. L'utilisation de probiotiques, de transplantation du microbiote fécal ou l'utilisation de bactériophages sont souvent évoquées pour le rétablissement d'un microbiote sain (Sartor et Wu, 2017).

D'un autre côté, le rôle potentiel des infections par les virus entériques dans l'altération potentielle des voies de signalisation pro-inflammatoires liées à l'interféron durant les poussées de MICI reste à démontrer. Les patients atteints de MICI bénéficient le plus souvent de traitements immunomodulateurs, comme les biothérapies anti-TNF qui peuvent perturber les réponses antivirales médiées par les voies des interférons (Agnholt et Kaltoft, 2001; Hu et al., 2019). Les observations réalisées sur modèles murins concernant la genèse et l'entretien de colites par l'infection par le MNV de cellules de Paneth modifiées par des mutations du gène *ATG16L* tendent à démontrer que l'inhibition de la voie du TNF- α pourrait ralentir la progression de la maladie et empêcher la nécroptose intestinale (Matsuzawa-Ishimoto et al., 2017). Des observations cliniques ont permis de démontrer l'efficacité des traitements couramment utilisés au cours des MICI contre les infections par les virus entériques. L'amélioration du tableau clinique d'un patient atteint de recto-colite hémorragique et infecté par le norovirus a par exemple été observée après l'administration d'infliximab (O'Connor et al., 2009). La 6-thioguanine pourrait également inhiber la réplication virale et améliorer la prise en charge des patients MICI infectés, par l'action thérapeutique sur le cycle guanine triphosphate – diphosphate (GTP-GDP) de la protéine Rac1 (Ward et al., 2017; Yin et al., 2018).

IV. OBJECTIFS

Les norovirus sont l'agent étiologique majeur des gastroentérites virales quelle que soit la tranche d'âge considérée. Le lien entre l'infection à norovirus et la présence d'HBGA a été clairement établie chez les individus sains. Les connaissances sur le rôle des virus entériques, en particulier des norovirus et leur relation avec les HBGA, comme facteur aggravant dans le cadre des MICI demeurent également très parcellaires. L'objectif principal de nos travaux a donc été d'étudier l'expression des antigènes de groupe sanguin et la reconnaissance des norovirus humains sur des tissus inflammatoires et sains provenant de patients atteints de MICI. Les récepteurs des norovirus humains ont été caractérisés au niveau des muqueuses inflammatoires, en fonction du degré de sévérité de la maladie. Dans la deuxième partie de la thèse, nous avons étudié les interactions des norovirus humains chez des sujets non-sécréteurs sains ou souffrant de RCH dans un cas, pour évaluer la susceptibilité aux virus entériques de ces sujets. Après la description des techniques utilisées et la description du matériel biologique dans le matériel et méthodes, les résultats obtenus chez les individus souffrant de MICI et non-sécréteurs seront présentés avant l'analyse commentée de ces résultats. Une conclusion générale et les perspectives dégagées par ces travaux de thèse clôtureront le mémoire. Les publications acceptées et soumises sont en annexe du document (**Annexe 1 et 2**).

MATÉRIELS ET MÉTHODES

I. Outils expérimentaux	49
A. Production de particules virales de synthèse (VLP)	49
B. Production de la A1,2-fucosidase	50
II. Mises au point et expérimentations	51
A. Prise en charge des échantillons de tissus humains	51
1. Origine des échantillons	51
2. Prise en charge macroscopique des prélèvements	51
3. Traitements et prise en charge des échantillons tissulaires	52
4. Evaluation des signes d'activité des MICI	52
B. Sélection des patients et des échantillons	53
1. Tissus « sains » contrôles	53
2. Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin (MICI)	53
3. Sujets non-sécréteurs	54
C. Genotypage du gène FUT2	54
1. Extraction ADN	54
2. Séquençage du gène <i>FUT2</i>	54
D. Pré-traitement de coupes histologiques	55
E. Incubation et détection des particules virales sur coupes histologiques	56
H. Expériences de compétition et d'inhibition antigénique sur coupes histologiques	57
1. Macrodissection des blocs tissulaires	57
2. Pré-traitements chimiques	57
3. Pré-traitements enzymatiques	58
4. Inhibition par utilisation de lectines spécifiques	58
5. Inhibition par anticorps monoclonaux spécifiques	59
I. Tests salivaires	59
J. Numérisation et collecte des données	60

I. OUTILS EXPERIMENTAUX

Les expérimentations exposées dans cette thèse font suite aux travaux de recherche menés au CNRvge par le Dr. BELLIOT et le Pr. de ROUGEMONT. Elles ont été rendues possibles grâce à l'utilisation des tissus conservés par le service de Pathologie du CHU de Dijon et l'utilisation de VLP dérivées de souches de norovirus humains GII.3, GII.4 et GII.17, et d'une α 1,2-fucosidase, disponibles au CNRvge. Ces productions ont été réalisées par Madame Marie-Anaïs ESTIENNEY, technicienne de recherche au sein du CNRvge. Les blocs de tissus humains fixés dans le formol et inclus en paraffine utilisés dans ces travaux sont directement issus des archives du service de Pathologie du CHU de Dijon, avec l'assistance technique de Madame Anne-Cécile LARIOTTE.

A. Production de particules virales de synthèse (VLP)

Les souches de norovirus humains utilisées pour la production des VLP ont été caractérisées en biologie moléculaire lors de précédents travaux (de Rougemont et al., 2011). La VLP GII.4 utilisée dans nos travaux est le variant Osaka des norovirus GII.4. La VLP mutante Δ D373 est dérivée d'un variant GII.4 Hunter, pour laquelle la délétion d'un acide aminé en position 373 se situant dans le domaine P2 entraîne une suppression de l'accroche de la VLP sur les HBGA (de Rougemont et al., 2011). Les VLP dérivées de norovirus GII.3 correspondent à la souche SW4, décrite lors d'épidémies de gastroentérites virales provoquant des infections dans des populations pédiatriques de phénotype non-sécréteur (Ayouni et al., 2015b). Enfin, la VLP dérivée de norovirus GII.17 correspond à la souche épidémique Kawasaki-308, devenue pandémique de 2014 à 2016 (Chan et al., 2017). Les VLP utilisées au cours de ces travaux sont dérivées de souches de norovirus humains en partie précédemment typées au sein du CNRvge. Elles correspondent aux souches de norovirus GII.4 Cairo4 (Séquence GenBank : #EU876884), GII. Cairo8 (Séquence GenBank : 876888), GII.17 Kawasaki 308 (#KU587626) et GII.3 SW4 (#KM056394).

La production de VLP s'appuie sur le système de baculovirus permettant la production de protéines recombinantes de capsid de norovirus humains (protéine VP1). Le système baculovirus est un système d'expression de protéines à partir de cellules d'insectes infectées par des baculovirus recombinants permettant l'expression en grande quantité de la protéine recombinante désirée (Belliot et al., 2001; Jiang et al., 1992). La transfection de cellules d'insecte Hi5 ou Sf9 par des baculovirus recombinants permet ainsi la production d'une grande quantité de protéines VP1, qui s'auto-assemblent dans le cytoplasme des cellules d'insecte sous forme de particules virales (Jiang et al., 1992). Une fois assemblées en VLP, les protéines VP1

sont excrétées dans le milieu de culture, facilitant les étapes suivantes de concentration et la purification des VLP comme décrites précédemment (de Rougemont et al., 2011).

La production des VLP a nécessité d'infecter des cellules Hi5, provenant de cellules ovariennes de *Trichoplusia Ni* (Thermo Fischer, Etats-Unis), dans le milieu Express Five (Thermo Fischer, Etats-Unis) permettant la culture des cellules et la production des VLP sans ajout de sérum de veau fœtal. Les VLP ont été concentrées et purifiées depuis le milieu cellulaire à J6 post-infection (Belliot et al., 2001). Les VLP concentrées ont été ensuite re-suspendues à 4°C, la nuit, dans un tampon TNC (Tris 10mM, NaCl 140mM, CaCl₂, pH 7,4) contenant 20µg/ml de leupeptine comme inhibiteur de protéase (Sigma, France). Les VLP concentrées ont été ensuite purifiées sur gradient de chlorure de césium. Le dessalage des VLP et leur suspension ont été effectuées par ultracentrifugation comme décrit ci-dessus. Après quantification des préparations, les VLP purifiées ont été aliquotées, congelées dans de l'azote liquide puis stockées à -40°C.

B. Production de la α 1,2-fucosidase

Les expérimentations présentées dans ces travaux ont nécessité la production d'une enzyme, la α 1,2-fucosidase. Le plasmide pour sa production a été offert par le Pr. Takane KATAYAMA, de l'Université de Tokyo. La technique de synthèse de l' α 1,2-fucosidase a été documentée précédemment par celui-ci (Katayama et al., 2004). Celle-ci a consisté en l'expression de l' α 1,2-fucosidase dans des bactéries BL21 (λ DE3) transformées par le vecteur plasmidique pSA130 exprimant le gène de l' α 1,2-fucosidase (Merck Millipore – Burlington, Etats-Unis). Le lendemain, une colonie bactérienne a été mise en culture dans un milieu enrichi (Terrific Broth) contenant du glycérol, de la peptone et de l'extrait de levure. La synthèse de la protéine a été induite par l'ajout d'isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside. Ces bactéries ont été ensuite incubées à 25°C pendant 2 jours puis centrifugées à 4000 g pendant 20 minutes à 5°C, puis suspendues dans 50 ml de tampon de lyse (50 mM de NaH₂PO₄, 300 mM de NaCl, 10 mM d'imidazole à pH 8,0) et congelées à -80°C. Pour l'extraction de la protéine, les culots cellulaires ont été progressivement décongelés. Les bactéries ont été ensuite fragmentées par sonication. L'efficacité de la sonication bactérienne a été vérifiée par examen direct avec coloration Gram. Le lysat bactérien alors obtenu après sonication a été centrifugé à 10 000 g à 4°C pendant 30 minutes. Après centrifugation, le culot cellulaire a été mélangé à de la résine Ni-NTA Agarose (Qiagen, Allemagne), sous agitation pendant 2 heures à 4°C. Le mélange lysat bactérien-résine a été ensuite transféré sur une colonne de polypropylène (Qiagen, Allemagne), avec 3 lavages successifs par une solution contenant 20 mM d'imidazole, puis élution dans une solution contenant 500 mM d'imidazole. La protéine purifiée a été ensuite

dialysée contre du tampon phosphate de sodium 100 mM à pH 6,5. Une fois la quantité estimée par la technique de Bradford, la protéine a été aliquotée en fraction de 50 µl puis congelée dans de l'azote liquide avant stockage à -40°C jusqu'à utilisation.

II. MISES AU POINT ET EXPERIMENTATIONS

A. Prise en charge des échantillons de tissus humains

Les échantillons utilisés au décours de ces travaux ont été prélevés, traités et stockés suivant des protocoles établis, en accord avec l'Association Française de Qualité en Anatomie Pathologique (AFAQAP) et les pratiques collégalement admises pour la prise en charge d'échantillons tissulaires humains. L'ensemble des échantillons tissulaires utilisés au cours de ces travaux, initialement utilisés dans le cadre de la routine diagnostique, ont alors intégré une collection d'échantillons biologiques à visée de recherche (recherche de catégorie 3) par suite de l'accord d'un Comité de Protection des Personnes (CPP) (Numéro 2018-A03214-51) et l'obtention du consentement des patients concernés par ces échantillons (**Annexe 4**).

1. Origine des échantillons

Les tissus ont été sélectionnés dans la base de données des archives du service de Pathologie du CHU de Dijon. Il s'agissait de biopsies et pièces opératoires obtenues par endoscopie digestive haute ou basse et après résection chirurgicale en cas de MICI réfractaire au traitement médical, ou de complication de la maladie menaçant le pronostic vital. Les échantillons « témoins » indemnes de lésions histologiques, proviennent de pièces opératoires (chirurgies bariatriques ou carcinologiques), et de biopsies de pathologies gastro-intestinales par endoscopie. Des échantillons de tumeurs coliques et issus du tractus digestif fœtal ont servi de témoins positifs pour les expérimentations, du fait de leur abondance en HBGA.

2. Prise en charge macroscopique des prélèvements

Les biopsies et pièces opératoires ont fait l'objet d'une analyse macroscopique avant la prise en charge des échantillons. Les biopsies ont été mesurées et le nombre de fragments biopsiques a préalablement été recensé. Concernant les pièces opératoires analysés au sein du service de Pathologie du CHU de Dijon, une prise en charge macroscopique préliminaire a été nécessaire avant de réaliser l'analyse des échantillons biologiques tissulaires. Celle-ci a consisté en la mesure de la longueur de résection intestinale, de la caractérisation des portions anatomiques concernées par la résection en confrontation avec les données cliniques, l'observation des lésions macroscopiques visibles et la réalisation de l'échantillonnage tissulaire macroscopique après immersion pendant 48h dans du formol tamponné à 4%. Des prélèvements des tranches

de section chirurgicales, des zones lésées et de zones saines à distance ainsi que des ganglions présents dans les mésos ont été réalisés. Un échantillonnage systématique de l'ensemble de la longueur de la résection intestinale a systématiquement été réalisé afin de ne pas occulter d'éventuelles dysplasies acquises en muqueuse plane pouvant être observées au cours des MICI.

3. Traitements et prise en charge des échantillons tissulaires

L'ensemble des échantillons tissulaires utilisés au décours de ces travaux ont subi plusieurs sortes de traitements afin d'assurer leur conservation et d'éviter l'autolyse tissulaire ou la dégradation de structures protéiques, glycaniques et lipidiques, tels que les HBGA. Lors de la réception des échantillons à l'état frais, des prélèvements facultatifs ont été réalisés par immersion des échantillons dans de l'azote liquide à -178°C . L'ensemble des échantillons tissulaires a été initialement immergé dans du formol tamponné pendant au moins 48h. Des bains progressifs d'alcool absolu ont été ensuite réalisés dans l'automate de déshydratation Tissue-Tek VIP[®], suivis de bains de toluène pour permettre une plus grande miscibilité des échantillons avec la paraffine (Sakura Finetek, Japon) (**Annexe 3**). L'inclusion des tissus a nécessité l'utilisation de paraffine chaude à 70°C , suivant un moulage contre une cassette plastique numérotée. Des coupes de $3\mu\text{m}$ d'épaisseur ont été réalisées à partir des blocs de paraffine sur un microtome Leica. Les lames alors obtenues ont été séchées, mis à l'étuve à 56°C pendant 24 heures et conservées avant la réalisation d'une coloration standard pour le diagnostic histopathologique sur automate Tissue-Tek Prisma[®] (Sakura Finetek, Japon) par immersion des lames blanches dans des bains successifs de xylène, d'alcool, d'hématoxyline, d'éosine, d'eau et de safran avant montage sur lamelle avec colle histologique sur l'automate de montage Tissue-Tek Film[®] (Sakura Finetek, Japon) (**Annexe 3**).

4. Evaluation des signes d'activité des MICI

L'ensemble des lames colorées par HES ont été analysées dans le cadre du diagnostic pathologique des MICI. Pour les échantillons biopsiques, le degré d'inflammation muqueuse ainsi que la présence de signes d'activité histologique et d'éventuelles lésions dysplasiques ont été précisés selon des critères précédemment définis (Fenoglio-Preiser et al., 2008; Marchal-Bressenot et al., 2017). Pour les pièces opératoires, le degré d'inflammation ainsi que la présence de signes d'activité histologique et d'éventuelles lésions dysplasiques ont été précisés sur les échantillons prélevés en zone lésée. La présence d'abcès, de fistules ou de signes de péritonite a également été mentionnée. Les tranches de section chirurgicales longitudinales ainsi que les ganglions et la muqueuse saine à distance ont été analysés à la recherche de lésions histologiques. La recherche de réplique immunohistochimique du cytomégalo virus a

systematiquement été réalisée, et s'est avérée négative pour l'ensemble des échantillons analysés. Un compte-rendu de pathologie a été rédigé pour chaque biopsie ou pièce opératoire afin de colliger les différentes lésions histologiques et macroscopiques observées durant la prise en charge du prélèvement.

B. Sélection des patients et des échantillons

1. Tissus « sains » contrôles

La mise au point des techniques d'incubation des VLP sur coupes histologiques a nécessité l'utilisation de tissus « témoins » positifs et négatifs, afin de vérifier la spécificité d'accroche des particules virales sur coupes histologiques et de réduire le bruit de fond éventuel. Les VLP dérivées des norovirus humains GII.4, GII.3 et GII.17 ont été incubées sur coupes de tissu duodéal sain issues de duodéno pancréatectomies céphaliques de patients opérés pour tumeurs pancréatiques. L'ensemble des patients dont dérivent les échantillons tissulaires présentaient un phénotype et un génotype sécréteur, ainsi qu'un groupe sanguin A et O, âgés de 55 et 75 ans (2 patients de groupe A et un patient de groupe O).

2. Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin (MICI)

Vingt-quatre patients dont 16 atteints de MC et 8 atteints de RCH ont été sélectionnés. Les patients étaient âgés de 18 à 65 ans au moment de l'opération, qui a été réalisée entre janvier 2010 et décembre 2014. Le groupe sanguin des patients a été déterminé avant l'intervention et cela pour des raisons de sécurité transfusionnelle. Le typage sanguin a été obtenu auprès de l'Etablissement Français du Sang (EFS) de Bourgogne-Franche Comté.

Les lames colorées par HES ont été relues par 2 pathologistes (LM, GT) afin de caractériser précisément les pourcentages de surface de muqueuse lésionnelle (ML) et de muqueuse quiescente (MQ) (définis comme la surface de muqueuse concernée rapportée à la surface totale de la muqueuse).

- La ML comprend des ulcérations avec une perte de substance, une inflammation sévère pouvant s'associer de manière variable à des abcès cryptiques, des foyers de cryptite et des granulomes et des foyers de régénération épithéliale.
- La MQ est définie comme une muqueuse siège d'une inflammation légère du chorion, sans dommages cryptiques ni altérations architecturales majeures, sans aspect de régénération épithéliale.
- L'ensemble des échantillons ont été également contrôlés pour l'absence de foyer dysplasique et de stigmates de répllication du CMV (recherche d'effet cytopathogène et étude immunohistochimique).

3. Sujets non-sécréteurs

L'ensemble des biopsies de duodénum prélevées entre 2013 et 2015 ont été relues, pour sélectionner 121 échantillons. Les biopsies incluses dans l'étude ont été celles de patients majeurs au moment du diagnostic, de taille suffisante et de qualité adéquate. Un bloc de tissu sain supplémentaire provenant du même patient a également été sélectionné pour l'extraction d'ADN. Les groupes sanguins des patients correspondants ont été obtenus auprès de l'EFS de Bourgogne-Franche Comté (Dr. Marie-Luce BOENNEC). Pour identifier les sujets non-sécréteurs, nous avons déterminé à partir de prélèvements duodénaux l'expression des HBGA par les entérocytes et réalisé le génotypage du gène *FUT2*. Pour le patient atteint de MICI de phénotype non-sécréteur, des échantillons d'iléon, d'appendice, de côlon proximal et de côlon distal ont été utilisés afin de réaliser les expérimentations.

C. Génotypage du gène *FUT2*

Le typage du gène *FUT2* a été réalisé afin de caractériser le statut « sécréteur » ou « non-sécréteur » des patients sélectionnés.

1. Extraction ADN

L'ADN a été extrait à partir des échantillons de tissus sains fixés dans le formol et inclus en paraffine. Douze copeaux de 15 µm d'épaisseur ont été produits au microtome avec une lame propre, puis placés dans des tubes de 1,5 ml. Une lyse cellulaire des copeaux de paraffine a alors été réalisée par ajout de 50 µL de protéinase K à 200 µmol/L à 56°C pendant 18h puis agitation. Le lendemain, après une incubation de 10 minutes à 100°C, une centrifugation de 30 secondes à 14000 tours/minute a été réalisée. La phase liquide a été récupérée par pipetages itératifs en prenant soin de ne pas prélever la paraffine. Le lysat cellulaire obtenu a été placé dans un extracteur Qiasymphony® (Qiagen, Etats-Unis) ou Easymag® (bioMérieux® - Marcy l'Etoile, France). L'extraction ADN a alors été réalisée selon des protocoles définis par les fabricants des extracteurs. L'ADN élué a été ensuite dosé sur l'automate Qubit® (Qiasymphony, Etats-Unis).

2. Séquençage du gène *FUT2*

Le séquençage du gène *FUT2* a été réalisé selon un protocole précédemment décrit (Imbert-Marcille et al., 2014b). La synthèse d'un fragment long et de fragments courts a permis de détecter les polymorphismes G428A et A385T du gène *FUT2*. Les amorces utilisées pour les fragments courts sont des amorces conçues au laboratoire, dénommées ARUB445, ARUB446, ARUB447 et ARUB448 (A. de ROUGEMONT). Les amorces utilisées pour la synthèse des

fragments longs sont l'amorce FUT2-R et les amorces de fragments courts mentionnées précédemment (Imbert-Marcille et al., 2014b) (**Tableau 4**).

FUT2-R	5'-CGG CCG GCT CCC GTT CA-3'	antisens
ARUB445	5'-GAG GAG GAA TAC CGC CAC ATC C-3'	sens
ARUB446	5'-CCC CTG CTC CTG GAC CTT CTA-3'	sens
ARUB447	5'-TAC CAC CTG AAC GAC TGG AT-3'	sens
ARUB448	5'-GTC GTG CAG GGT GAA CTC-3'	antisens

Tableau 4. Amorces utilisées pour les PCR d'amplification afin de réaliser le génotypage FUT2.

L'amplification des fragments ADN a été réalisée avec l'ADN polymérase de haute performance KOD Hot Start DNA polymerase[®] (Novagen, Etats-Unis) sur un thermocycleur Eppendorf Mastercycler[®] (Eppendorf, Allemagne) pour une durée totale de 40 cycles (**Tableau 5**).

Activation de la polymérase	95°C pendant 2 min
Dénaturation de l'ADN	95°C pendant 20 s
Hybridation des amorces	55°C (Température de fusion minimale) pendant 10 s
Elongation de l'ADN	70°C pendant 1 min

Tableau 5. Cycle d'amplification de l'ADN de FUT2 à l'aide de la KOD Hot Start DNA polymérase.

Après purification des produits d'amplification sur colonnes Amicon Ultra[®] (Merck Millipore, Etats-Unis), le séquençage a été réalisé à l'aide du kit de séquençage ABI Big Dye Sequencing Kit[®], contenant des didéoxynucléotides fluorescents (Applied Biosystems, Etats-Unis). Le séquençage a été réalisé sur un séquenceur ABI Prism 3130XL[®] (Applied Biosystems, Etats-Unis). L'analyse des allèles pour la mutation G428A a été effectuée à l'aide du programme CodonCode Aligner[®] (CodonCode corporation, Etats-Unis).

D. Pré-traitement de coupes histologiques

Les coupes réalisées pour étudier l'accroche des particules virales de synthèse et la détection des HBGA ont été déparaffinées dans des bains successifs de xylène et d'alcool à concentration décroissante avant une réhydratation des coupes (Tissue-Tek, Sakura) (**Annexe 3**). L'immersion des coupes dans un bain de peroxyde d'hydrogène dilué dans du méthanol à 3% pendant 20 minutes a permis d'inhiber l'activité peroxydase endogène des tissus. L'excédent d'eau oxygénée a été éliminé par un lavage dans du tampon salin phosphaté (PBS) pendant 5 minutes. Enfin, l'immersion des coupes dans un bain d'albumine de sérum bovin diluée dans du PBS à 1% (BSA/PBS 1%) couplé à un sérum normal de cheval dilué à 3% dans du PBS (NHS/PBS 3%) a saturé les sites antigéniques non-spécifiques (« quenching »).

E. Incubation et détection des particules virales sur coupes histologiques

Les conditions d'incubation des VLP sur les coupes histologiques ont été précédemment décrites (Marionneau et al., 2002). Les particules virales ont été initialement diluées à 5 µg/ml, dans du PBS/BSA 1%. Des dilutions additionnelles de 3 et 1 µg/ml ont également été utilisées afin d'obtenir un signal optimal sans bruit de fond. L'incubation des VLP a été effectuée après le blocage des sites antigéniques non-spécifiques « quenching ». La solution de VLP a été étalée sur les coupes histologiques après séchage des bords de la surface tissulaire à l'aide d'un mouchoir sec, puis l'incubation s'est déroulée en chambre humide à 4°C pendant 18 heures.

La détection des VLP GII.4 a été ensuite réalisée par incubation d'un anticorps monoclonal anti-VP1 (clone 5B9) des souches GII.4 du laboratoire, dilué au 1/2000, révélé par un anticorps secondaire dirigé contre les IgG de souris, couplé à une peroxydase et dilué au 1/1000 (Vector, Etats-Unis). Pour certains marquages, l'anticorps monoclonal 5B9 a été utilisé directement couplé à la peroxydase. L'anticorps monoclonal 5B9 reconnaît exclusivement les norovirus GII.4 par le biais d'un épitope conformationnel. La purification et le couplage des anticorps ont été effectués par la société bioMérieux® (Marcy l'Etoile, France). La détection des VLP GII.3 et GII.17 a été effectuée à l'aide de sérums polyclonaux produits chez le lapin, dilués respectivement au 1/1500 et 1/10000, dans une solution PBS/BSA 1%. Trois lavages de PBS pendant 5 minutes ont permis d'éliminer l'excédent de particules virales non ou faiblement attachées, ainsi que les anticorps libres.

F. Détection tissulaire des antigènes de groupe sanguin et de l'antigène Ki67

Les antigènes A et B ont été détectés par l'incubation d'anticorps murins anti-A (clone 9113D10 - Diagast, France) et anti-B (clone 9621A8 – Diagast, France) dilués au 1/1000^{ème} dans du PBS/BSA 1%. L'antigène H a été détecté avec la lectine Ulex Europaeus Agglutinin-I (UEA-I), directement couplée à un fluorochrome (Alexa-488) à une concentration de 1µg/ml (Sigma-Aldrich, Etats-Unis). Les antigènes Le^a et Le^b ont été détectés respectivement par les clones 7LE et 2-25LE à la concentration de 0,5 µg/ml. L'antigène sLe^x a été détecté par incubation de l'anticorps CSLEX1 à la concentration de 2µg/ml (Becton Dickinson, Etats-Unis). La détection des antigènes sLe^a avec le clone NS-1116-19.9 (Agilent Technologies, Etats-Unis) et Le^x avec le clone MEM158 (Sigma-Aldrich, Etats-Unis) ; à des dilutions respectives de 1/20 et 1/1000. La détection du signal a été réalisée soit sur un automate Dako Omnis (Agilent Technologies, Etats-Unis) selon les recommandations du constructeur, soit selon des techniques manuelles décrites ultérieurement.

La détection immunohistochimique de l'antigène Ki67 a été réalisée sur automate Dako Omnis (Agilent Technologies, Etats-Unis) avec l'anticorps MIB-1 dilué au 1/20^{ème} dans un diluant d'anticorps Emerald (Merck Millipore, Etats-Unis) suivant les recommandations du fabricant.

G. Révélation des marquages

La révélation de l'activité des peroxydases a nécessité la saturation des coupes histologiques en eau oxygénée puis l'incubation d'un cosubstrat chromogène, la 3'-3'-diaminobenzidine (DAB), du kit de révélation Vectastain[®] (Vector, Etats-Unis), pendant exactement 1 minute et 30 secondes. La révélation des marquages sur l'automate Dako Omnis[®] a été réalisée selon les recommandations définies par le constructeur, utilisant un kit de révélation du constructeur contenant de la DAB à des concentrations définies. Les lames d'immunofluorescence ont été montées à l'aide d'une lamelle et d'un milieu de montage commercialisé par la société bioMérieux[®] (Marcy l'Etoile, France).

H. Expériences de compétition et d'inhibition antigénique sur coupes histologiques

1. Macrodissection des blocs tissulaires

Afin de réaliser les expérimentations d'inhibition antigénique et des traitements enzymatiques, les questions de l'abondance des sites antigéniques et de la stœchiométrie des molécules disponibles à la surface des cellules du tractus digestif se sont alors posées. Pour ces expériences de compétition, des coupes histologiques ont été produites. Pour standardiser la technique, une macrodissection des blocs de tissu, à l'aide d'un bistouri stérile a permis de récupérer une zone tissulaire d'intérêt de taille définie (2 à 3 mm² environ) et de la réinclure dans un nouveau bloc. Les blocs macrodiséqués correspondent aux échantillons 13 (MC – Côlon Transverse – MQ et ML) et 22 (RCH – Sigmoide – ML) (**Tableau 6 et 7**). Des coupes histologiques issus d'échantillons biopsiques de duodénums sains ont également été utilisées comme contrôles.

2. Pré-traitements chimiques

Pour l'élimination des sucres, en particulier des HBGA, les coupes histologiques ont été incubées avec 50 mM de périodate de sodium (NaIO₄) dilué dans un tampon d'acétate de sodium à 50 mM et à pH 5,0. Les coupes ont été traitées chimiquement pendant 30 minutes à température ambiante avant rinçage dans un bain de glycine à 1% dans de l'eau distillée pendant 10 minutes à température ambiante pour neutraliser les radicaux libres présents (Easton and Hay, 1986; Eylar et Jeanloz, 1962). Les coupes ont été ensuite traitées au peroxyde d'hydrogène comme décrit précédemment.

3. Pré-traitements enzymatiques

L'utilisation de sialidase et d' α 1,2 fucosidase sur les coupes histologiques a permis respectivement d'ôter les groupements sialiques caractérisant les ligands sLe^a et sLe^x et le groupement α 1,2 fucose, caractéristique de l'antigène H. L'utilisation de ces enzymes a permis de contrôler la spécificité des anticorps reconnaissant les antigènes sLe^a, sLe^x et H. Ces traitements enzymatiques ont ainsi permis de déterminer le rôle des groupements sialique et α 1,2 fucose dans l'attachement des VLP. Après préparation des coupes histologiques de surface réduite (après macrodissection), les enzymes ont été incubées pendant 18h à 37°C. Vingt microgrammes d' α 1,2 fucosidase dilués dans 50 mM de PBS à pH 5,0 ont été utilisés pour chaque coupe histologique. Dix mU de sialidase provenant de *Vibrio cholerae* dilués dans 100 mM d'acétate de sodium pH 5,4 ont été utilisés pour l'expérimentation. Un renouvellement de la sialidase ou de la fucosidase a été effectué après 6h de traitement. En guise de contrôle négatif, l' α 1,2 fucosidase et la sialidase ont été inactivées par ébullition à 97°C pendant 10 minutes sur un agitateur thermique Thermomixer[®], avant d'être incubé sur les coupes histologiques (Eppendorf, Allemagne).

4. Inhibition par utilisation de lectines spécifiques

Des lectines ont été utilisées pour des expériences de compétition du fait de leur spécificité pour certains motifs saccharidiques. Ces expériences ont permis de préciser le rôle de certains déterminants antigéniques dans l'accroche des VLP, et donc de servir de témoins confirmant la spécificité d'accroche des VLP. La lectine dérivée de Lotus Tetragonolobus (Lotus Tetragonolobus Lectin – LTL), possède une affinité spécifique pour les motifs fucose en position α 1,3 caractéristique de Le^x (Yan et al., 1997). La lectine dérivée d'Aleuria Aurantia (Aleuria Aurantia Lectin – AAL), reconnaît tous les motifs α -L-fucose, quelle que soit la position stérique, et avec de très fortes affinités hormis pour les motifs L-fucose en position α -1,6 (Matsumura et al., 2009; Olausson et al., 2008). La lectine dérivée d'Helix Pomatia (Helix Pomatia Agglutinin – HPA) possède une forte affinité pour l'antigène de groupe sanguin A ainsi que l'antigène Forssman (Torres and Smith, 1988). Enfin, la lectine dérivée de l'Ajonc UEA-I possède une très forte affinité pour les motifs L-fucose en position α -1,2, permettant ainsi l'inhibition de l'antigène H et des motifs Le^b et Le^a (Baldus et al., 1996). Lors des expérimentations d'inhibition d'accroche des VLP, 20 μ g de lectine ont été incubées sur chaque coupe histologique, à la concentration d'1 mg/ml dans du PBS, à 4°C pendant la nuit. L'excès de lectines a été éliminé par 3 lavages de PBS 1% à température ambiante avant l'incubation des VLP.

5. Inhibition par anticorps monoclonaux spécifiques

Pour déterminer le rôle de chaque antigène de groupe sanguin dans l'attachement des norovirus, des coupes histologiques ont été pré-incubées avec des anticorps monoclonaux spécifiques de chaque antigène. Pour ces expérimentations, 50 µg d'anticorps monoclonal anti-Le^a, anti-Le^x, anti-sLe^a et anti-sLe^x ont été incubés pendant 18 heures à 4°C sur les coupes histologiques. L'incubation a été suivie de 3 rinçages au PBS avant l'ajout de 5 µg de VLP. Les VLP éventuellement accrochées sur les coupes histologiques ont été détectées à l'aide de l'anticorps 5B9 complexé à la peroxydase, l'anticorps étant dilué au 1/2000^{ème} dans une solution BSA/PBS 1%.

I. Tests salivaires

1. Expérimentations d'accroche des VLP sur salives

Le gène *FUT2* conditionne l'expression des HBGA sur tissus intestinaux, mais également au niveau de la salive. L'attachement des VLP à des extraits salivaires a été précédemment décrit (Marionneau et al., 2002). Cette technique permet d'évaluer sur un panel de salives le profil d'accroche d'une souche de norovirus sur des échantillons représentatifs des groupes sanguins, incluant des salives d'individus non sécréteurs déficients pour le gène *FUT2*. Dans nos travaux, des expériences d'accroche des VLP GII.4, GII.3 et GII.17 ont été réalisées sur une collection de salives de sujets non-sécréteurs utilisée dans une précédente étude (Ayouni et al., 2015b). 34 salives de patients non-sécréteurs ont été ainsi utilisées pour les essais d'accroche des VLP (Ayouni et al., 2015b). L'utilisation des salives a été approuvée par le comité d'éthique de l'hôpital Fattouma Bourguiba de Monastir (Tunisie) (**Annexe 4**). Les tests salivaires ont consisté en l'incubation des VLP sur salives et leur détection. Les salives préalablement chauffées ont été initialement diluées au 1/1000^{ème} dans un tampon carbonate/bicarbonate à pH 9,6. Deux-cent microlitres de chaque dilution ont été distribués dans des puits sur plaques ELISA puis incubés à 37°C pendant la nuit. Le lendemain, la saturation des sites antigéniques non-spécifiques a été réalisée par ajout de 200µL de lait écrémé à 4°C dilué dans du PBS à 4% (Blotto-PBS 4%), pendant 1h30 à 37°C. Après 3 lavages dans du PBS, l'incubation de 500 ng par puit de VLP a alors été réalisée, diluées dans le tampon de Blotto-PBS 4% (100 µl par puit) pendant 2h à 37°C. La détection des VLP a été réalisée avec l'anticorps 5B9-HRP au 1/2000^{ème} (directement couplé à une peroxydase), ou les sérums immuns anti-GII.17 au 1/10000^{ème} et GII.3 au 1/1000^{ème}. Les anticorps anti-GII.17 et anti-GII.3 ont nécessité l'incubation d'un anticorps secondaire anti-IgG de lapin couplé à une peroxydase (clone A0545, Sigma), dilué au 1/2000^{ème} dans du PBS pendant 45 minutes à 37°C. La révélation de la réaction a enfin été réalisée par ajout de 100µl de tétraméthyl-benzidine (TMB) pendant exactement 10 minutes à

température ambiante à l'abri de la lumière. La réaction enzymatique a été interrompue par ajout de 50 µl d'acide chlorhydrique 1N. La mesure des densités optiques (DO) a été réalisée à 450 nm pour la lecture (DO450) et 620 nm pour le filtre témoin, sur un spectrophotomètre (Biorad® - Etats-Unis).

2. Expérimentations d'inhibition d'accroche des VLP sur salives

Les tests d'inhibition d'accroche des VLP GII.4 de la souche Cairo4 ont été réalisés dans le cadre de nos travaux. Des essais préliminaires d'accroche des VLP GII.4 (Souche Cairo4) ont été réalisés pour déterminer les dilutions optimales pour obtenir une DO450 comprise entre 0,5 et 1 en ELISA, servant alors d'étalon pour nos expérimentations. Du fait d'une importante saturation antigénique avec les anticorps monoclonaux utilisés pour les expérimentations de compétition, les salives ont été diluées respectivement au 1/1000^{ème}, 1/8000^{ème} ou 1/16000^{ème} dans un tampon carbonate/bicarbonate à pH 9,6 et incubées sur plaque ELISA à 37°C pendant la nuit. Quatre lavages ont été réalisés au PBS, puis les puits ont été incubés avec des anticorps monoclonaux spécifiques dirigés contre les motifs Le^a, Le^b ou Le^x, dilués en cascade dans du PBS à des concentrations allant de 500 ng/puit à 8 ng/puit. Les anticorps ont été incubés à 37°C pendant la nuit. La plaque ELISA a ensuite été saturée avec du Blotto-PBS 4% pendant 90 minutes à 37°C, avant l'incubation de 250 ng/puit de VLP GII.4 pendant 120 minutes à 37°C. L'accroche des VLP a ensuite été détectée avec l'anticorps 5B9 couplé à la peroxydase. L'activité de la peroxydase a ensuite été révélée par l'incubation de TMB pendant 10 minutes à température ambiante avant l'ajout d'HCl 1N. La lecture des densités optiques (DO) a été ensuite effectuée comme précédemment.

J. Numérisation et collecte des données

L'ensemble des lames colorées (HES et immunomarquages) a été numérisé sur un scanner de lames Nanozoomer® 2.0 HT (Hamamatsu, Japon). Les images numérisées ont été archivées dans un espace de stockage sécurisé. Les images obtenues ont été visualisées avec le logiciel NDP View® 2.4 (Hamamatsu, Japon). Les photographies en immunofluorescence ont été réalisées à l'aide d'un appareil photo Nikon® F1 (Tokyo, Japon), monté sur un microscope à fluorescence Nikon® Eclipse 50I (Tokyo, Japon).

RESULTATS

I. EXPRESSION DES HBGA ET ACCROCHE DES VIRUS ENTERIQUES DANS LES MALADIES INFLAMMATOIRES CHRONIQUES DE L'INTESTIN.....	62
A. DESCRIPTION DE LA COHORTE	62
1. Maladie de Crohn	62
2. Rectocolite hémorragique.....	63
B. GENOTYPAGE DU GENE <i>FUT2</i> DES PATIENTS	63
C. ATTACHEMENT DES VLP SUR TISSUS SAINS.....	65
D. EXPERIENCES D'ACCROCHE VLP ET DETECTION DES HBGA DANS LES MICI	66
1. Maladie de Crohn	66
2. Rectocolite hémorragique.....	70
E. CARACTERISATION DES RECEPTEURS DES NOROVIRUS GII.4 EN CONDITIONS INFLAMMATOIRES.....	72
1. Rôle des antigènes ABH(O) dans l'accroche VLP GII.4 sur muqueuse régénérative	73
2. Rôle des motifs sialiques dans l'accroche VLP GII.4 sur muqueuse régénérative	74
3. Rôle des motifs Lewis dans l'accroche des VLP GII.4 sur muqueuse régénérative	75
4. Expériences d'accroche des VLP GII.4 et GII.17	77
F. COMMENTAIRE SUR L'INTERACTION DES NOROVIRUS HUMAINS SUR LES MUQUEUSES INFLAMMATOIRES AU COURS DES MICI..	78
II. EXPRESSION DES HBGA ET ACCROCHE DES VIRUS ENTERIQUES CHEZ LES SUJETS NON-SECRETEURS	81
A. EXPERIENCES SUR SALIVES DE SUJETS NON-SECRETEURS.....	81
1. Expériences d'accroche des VLP GII.4, GII.3 et GII.17	81
2. Rôle des antigènes Lewis dans l'accroche des VLP sur salives de patients non-sécréteurs.....	82
B. DEPISTAGE DES SUJETS NON-SECRETEURS POUR LES ANALYSES HISTOLOGIQUES	83
C. EXPERIENCES D'ACCROCHE ET DETECTION DES HBGA SUR DUODENUMS SAINS DE SUJETS NON-SECRETEURS.....	84
1. Expériences d'accroche VLP et expression HBGA du duodénum sain de sujets non-sécréteurs	84
2. Caractérisation des récepteurs des VLP du duodénum sain de sujets non-sécréteurs.....	86
D. RECONNAISSANCE DES VLP ET DETECTION DES HBGA CHEZ UN SUJET NON-SECRETEUR SOUFFRANT DE RCH	88
1. Accroche VLP et détection HBGA en zones de MQ.....	88
2. Accroche VLP et détection HBGA en zones de ML.....	90

I. EXPRESSION DES HBGA ET ACCROCHE DES VIRUS ENTERIQUES DANS LES MALADIES INFLAMMATOIRES CHRONIQUES DE L'INTESTIN

Les résultats des travaux présentés dans la première partie ont fait l'objet d'une publication (Annexe 1).

A. Description de la cohorte

La cohorte est composée de 24 patients, dont 16 atteints de MC et 9 de RCH. Les patients ont été suivis au CHU de Dijon, et ont bénéficié d'une intervention chirurgicale pour des MICI réfractaires au traitement médical. Les patients, âgés de 18 à 65 ans ont bénéficié d'un diagnostic anatomopathologique entre janvier 2010 et décembre 2014 dans le service de Pathologie du CHU de Dijon.

1. Maladie de Crohn

Echantillon	Âge (sexe)	Portion anatomique	Histologie	ABH(O)	Statut <i>FUT2</i>
1	55 (M)	Iléon	MQ (80%) / ML (20%)	O	Se/Se
2	25 (F)	Iléon	MQ (100%)	A	Se/Se
3	34 (F)	Iléon	MQ (80%) / ML (20%)	AB	Se/Se
4	22 (F)	Iléon	MQ (100%)	A	Se/Se
5	25 (F)	Iléon	MQ (100%)	A	Se/Se
6	29 (M)	Iléon	MQ (30%) / ML (70%)	O	Se/Se
7	49 (F)	Iléon	MQ (90%) / ML (10%)	A	Se/Se
8	46 (M)	Côlon Proximal	MQ (100%)	O	Se/se
9	42 (F)	Côlon Proximal	MQ (100%)	A	Se/Se
10	36 (F)	Côlon Proximal	MQ (100%)	A	Se/se
11	32 (M)	Côlon Transverse	MQ (80%) / ML (20%)	A	Se/se
12	24 (F)	Côlon Transverse	MQ (100%)	B	Se/Se
13	26 (F)	Côlon Transverse	MQ (50%) / ML (50%)	A	Se/se
14	30 (F)	Côlon Transverse	MQ (100%)	A	Se/se
15	22 (M)	Sigmoïde	MQ (100%)	O	Se/se
16	50 (F)	Sigmoïde	MQ (90%) / ML (10%)	A	Se/Se

Tableau 6. Liste des échantillons issus des patients atteints de maladie de Crohn. Les pourcentages de surface de muqueuse quiescente (MQ) et muqueuse lésionnelle (ML) sont indiqués entre parenthèses.

La moyenne d'âge des patients atteints de MC était de 34,18 ans. La sex-ratio était de 1/2. La cohorte comprenait 4 patients de groupe O, 9 patients de groupe A, 1 patient de groupe B et 1 patient de groupe AB. Sept échantillons d'iléon, 3 échantillons de côlon proximal, 4

échantillons de côlon transverse et 2 échantillons de sigmoïde ont été analysés. Les échantillons d'iléon comprenaient une MQ mêlée à une ML (N=4) ou uniquement une MQ (N=3). Les échantillons de côlon proximal comprenaient uniquement une MQ (N=3). Les échantillons de côlon transverse comprenaient une MQ mêlée à une ML (N=2) ou uniquement une MQ (N=2). Les 2 échantillons de sigmoïde comprenaient une MQ unique ou une MQ mêlée à une ML (**Tableau 6**). Chaque échantillon provient d'un patient différent, sauf les échantillons 7 et 16 qui correspondent à deux pièces opératoires différentes du même patient, opéré à deux reprises.

2. Rectocolite hémorragique

Echantillon	Âge (sexe)	Portion anatomique	Histologie	ABH(O)	Statut FUT2
17	33 (M)	Sigmoïde	MQ (100%)	A	Se/Se
18	42 (M)	Sigmoïde	MQ (90%) / ML (10%)	O	Se/se
19	30 (F)	Sigmoïde	MQ (100%)	O	Se/Se
20	26 (F)	Sigmoïde	ML (100%)	B	Se/se
21	47 (M)	Sigmoïde	MQ (30%) / ML (70%)	O	Se/se
22	40 (F)	Sigmoïde	ML (100%)	A	Se/se
23	32 (F)	Rectum	MQ (100%)	A	Se/se
24	42 (F)	Rectum	ML (100%)	O	Se/se
25	58 (M)	Rectum	MQ (60%) / ML (40%)	AB	Se/se

Tableau 7. Liste des échantillons issus des patients atteints de rectocolite hémorragique. Les pourcentages de surface de muqueuse quiescente (MQ) et muqueuse lésionnelle (ML) sont indiqués entre parenthèses.

La moyenne d'âge des patients atteints de RCH était de 36,5 ans. La sex-ratio était de 1/2. La cohorte comprenait 4 patients de groupe O, 3 patients de groupe A, un patient de groupe B et un patient de groupe AB. Six échantillons de sigmoïde et 3 échantillons de rectum ont été analysés. Les échantillons de sigmoïde comprenaient soit une MQ (N=2), une ML (N=2) ou une MQ mêlée à une ML (N=2). Quant aux 3 échantillons de rectum, ils étaient successivement composés d'une MQ, une ML ou une MQ mêlée à une ML (**Tableau 7**).

B. Génotypage du gène *FUT2* des patients

Pour le génotypage, nous avons analysé une portion du gène *FUT2* pour la mutation G428A. L'analyse du chromatogramme pour cette position a permis de définir le caractère homozygote ou hétérozygote pour cette mutation (**Figure 12**). La mutation définissant le phénotype non-sécréteur étant récessive (G428A présent sur les 2 allèles), le phénotype sécréteur correspond à 1 génotype homozygote (absence de mutation sur les 2 allèles) ou hétérozygote (1 allèle portant la mutation G428A). Après génotypage, 2 patients ont été génotypés comme sécréteurs homozygotes (Se/Se) et 7 patients sécréteurs hétérozygotes (Se/se) atteints de RCH. Pour les

patients atteints de MC, il a été retrouvé 9 sécréteurs homozygotes et 6 sécréteurs hétérozygotes (Tableau 6 et 7, Figure 12).

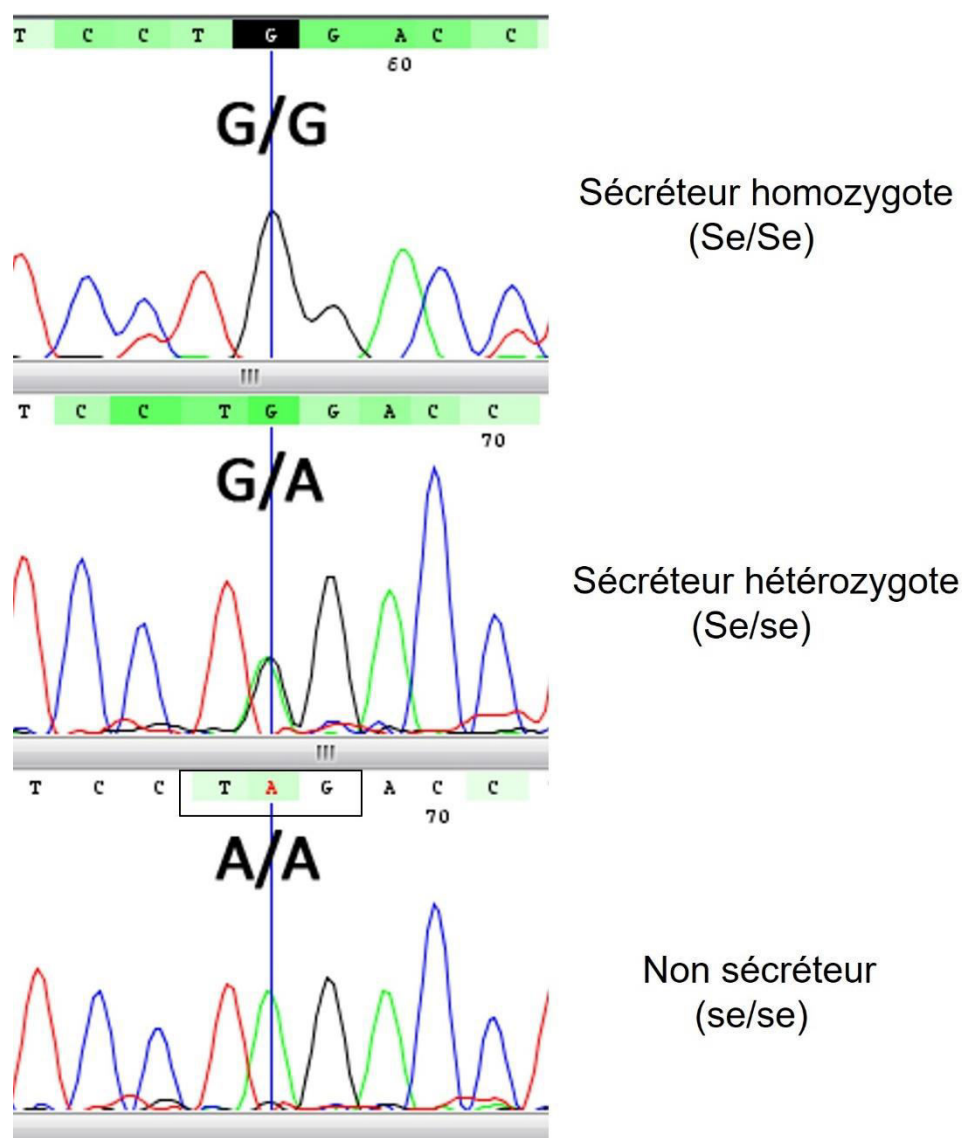


Figure 12. Extraits de séquences Sanger sur le logiciel CodonCode Aligner®, centrées sur la position 428 du gène FUT2. De haut en bas, la première illustration montre un double pic G/G, signifiant alors que le nucléotide G est présent sur les deux allèles, correspondant à un sécréteur homozygote (Se/Se). La seconde illustration montre un pic G associé à un pic A, soit G/A, montrant alors qu'un des allèles possède un nucléotide G en position 428, alors que l'autre allèle possède un nucléotide A en position 428, correspondant à un sécréteur hétérozygote (Se/se). La dernière illustration montre un double pic A/A, montrant alors que les deux allèles portent le nucléotide A en position 428, correspondant à un non-sécréteur (se/se).

C. Attachement des VLP sur tissus sains

L'objectif initial a été de démontrer l'efficacité et la spécificité de l'attachement des VLP sur les HBGA exprimés sur duodénum sain, où les norovirus humains présentent un tropisme important (Marionneau et al., 2002). Nous avons observé un attachement marqué sur l'ensemble de la surface des villosités duodénales, notamment au niveau des entérocytes duodénaux, ainsi qu'au niveau des glandes sous-muqueuses de Brunner, comme décrit précédemment (Marionneau et al., 2002) (**Figure 13**).

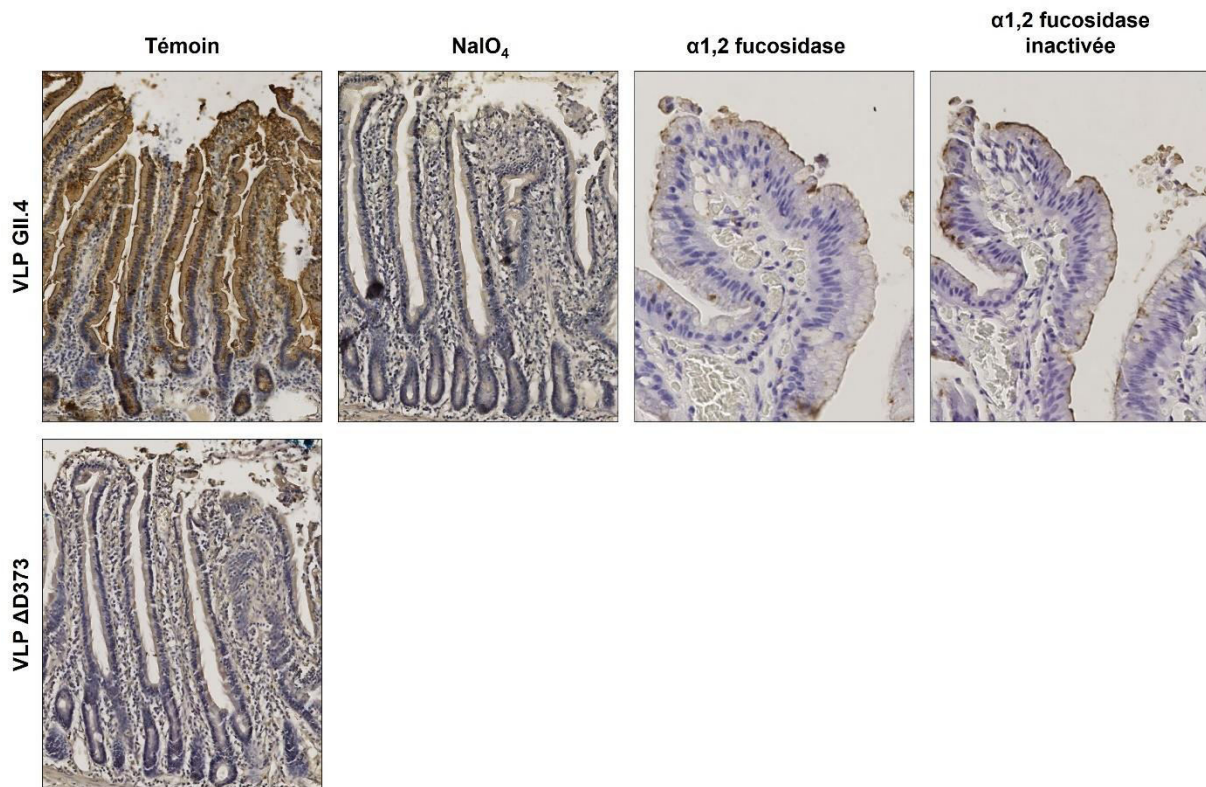


Figure 13. Démonstration de la spécificité d'accroche des VLP dans des échantillons duodénaux sains d'un patient de groupe sanguin A ayant subi une duodéno pancréatectomie céphalique. Les coupes histologiques ont été prétraitées avec 50 mM de périodate de sodium (NaIO_4), de l' α 1,2 fucosidase (bouillie ou non), avant incubation des VLP GII.4. Les VLP mutées Δ D373 ont été incubées sans réaliser de prétraitement des coupes histologiques. La détection antigénique est démontrée par un marquage marron. Les lames « témoin » et avec prétraitements sont indiquées en haut de chaque colonne (D'après Tarris et al., 2021).

L'absence d'accroche des VLP mutantes Δ D373, a permis de démontrer la spécificité d'accroche des VLP aux HBGA (**Figure 13**). Des prétraitements des coupes histologiques de duodénum sain ont également permis de s'assurer de la spécificité de l'accroche des VLP. L'immersion des lames dans 50 mM de NaIO_4 a permis de supprimer l'attachement des VLP sur les coupes histologiques, démontrant ainsi la nécessité de sucres pour permettre l'interaction des VLP GII.4 sur les tissus (**Figure 13**). La préincubation de 3 mU d' α -1,2-fucosidase sur coupes histologiques a fortement diminué l'accroche des VLP GII.4, démontrant ainsi l'importance de l'antigène H dans l'accroche des VLP GII.4 (**Figure 13**). L'action de l' α 1,2 fucosidase a été cependant incomplète sur les coupes histologiques de duodénum, car elles

provenaient d'un patient de groupe sanguin A ; en effet la N-acétylgalactosamine caractérisant l'antigène A diminue l'efficacité de la coupure des motifs α 1,2 fucose par l'enzyme (Ito et al., 2006). La préincubation de la lectine HPA a inhibé l'attachement des VLP GII.4 sur le duodénum sain d'un patient de groupe sanguin A, confirmant ainsi la spécificité de l'accroche des VLP GII.4 sur l'antigène A (**Figure 14**).

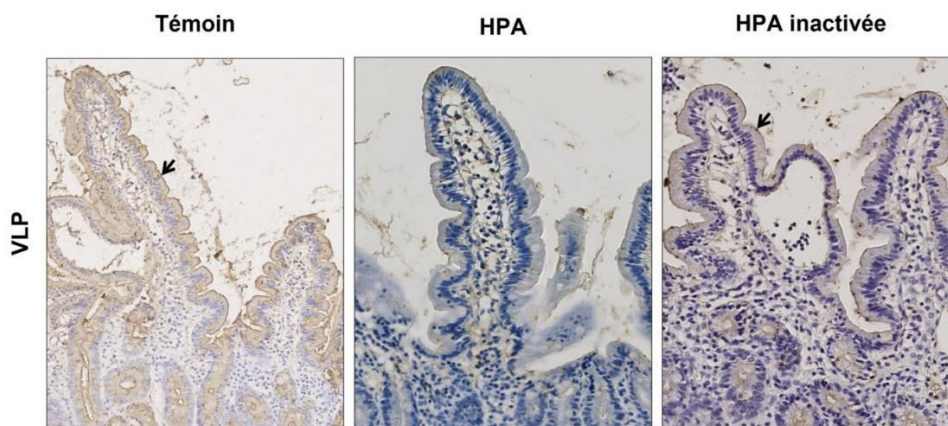


Figure 14. Démonstration de la spécificité de l'accroche des VLP sur une biopsie de duodénum sain d'un patient souffrant de RCH (patient 22). Les témoins et prétraitements sont indiqués au-dessus des images. La lectine HPA a été inactivée par chauffage et utilisée comme témoin négatif. La détection des VLP GII.4 est indiquée par des flèches (D'après Tarris et al., 2021).

Les expérimentations réalisées sur duodénum sain ont donc permis de s'assurer de la spécificité d'accroche des VLP GII.4 par le biais des HBGA au niveau de la surface des entérocytes et des glandes de Brunner. Ces expérimentations ont alors été réalisées sur tissus inflammatoires de patients souffrant de MICI et de sujets non-sécréteurs.

D. Expériences d'accroche VLP et détection des HBGA dans les MICI

1. Maladie de Crohn

a. Caractérisation des échantillons

Dix-neuf échantillons issus de résection intestinales et de colectomies subtotaales et transverses de MICI réfractaires ont été analysés. Une analyse histologique a permis de vérifier l'absence de lésions pré-cancéreuses (dysplasiques), et de caractériser les lésions histologiques inflammatoires. Neuf échantillons avec MQ (dont 3 d'iléon, 3 de côlon proximal, 1 de côlon transverse et 2 de sigmoïde), et sept échantillons avec MQ et ML (dont 4 iléaux, 2 coliques transverses et 1 sigmoïdien) ont été recensés. Une étude immunohistochimique avec l'anticorps anti-Ki67 a révélé un marquage nucléaire prédominant dans les niches cryptiques basales ainsi que dans les zones de ML (**Figure 15**).

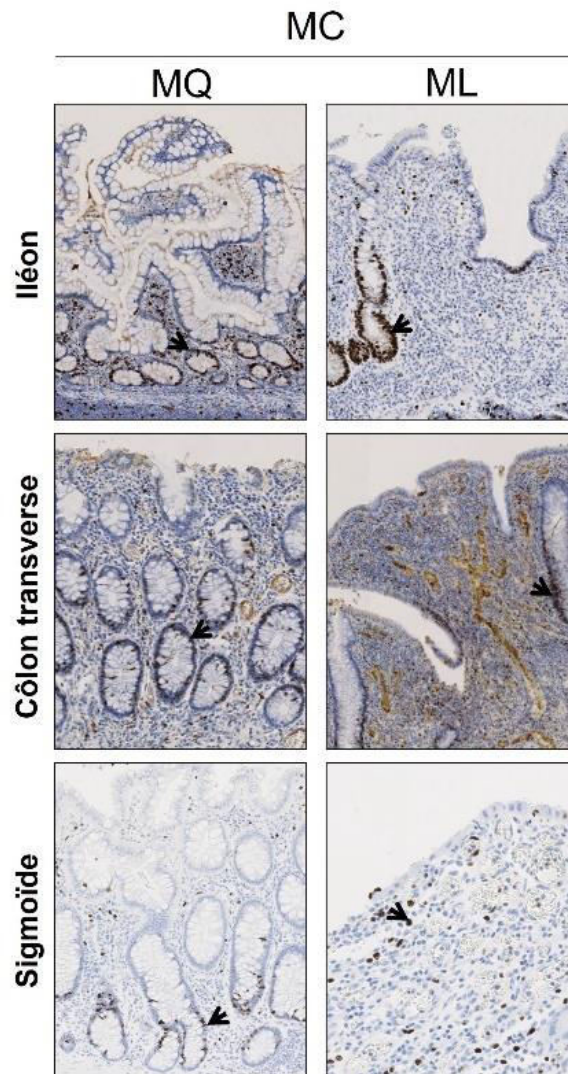


Figure 15. Détection de l'antigène Ki67 dans les échantillons de MC. Le marquage par Ki67 apparaît de couleur noire et ponctué au niveau du noyau (flèches). Les sites anatomiques sont indiqués sur la gauche de chaque image. L'origine des échantillons, les zones de MQ et de ML sont indiquées en haut de chaque colonne (D'après Tarris et al., 2021).

b. Iléon

Dans nos travaux, les échantillons iléaux expriment fortement les antigènes ABH(O), qui co-localisent avec les VLP GII.4 au niveau des zones de MQ et ML (**Figure 16 et 17**). Au sein des zones de ML, la distribution des antigènes Lewis (Le^a , sLe^a , Le^x , sLe^x) est ubiquitaire (**Figure 17**). Dans les zones de MQ, l'expression des antigènes Le^a , sLe^a , Le^x est cependant focale, limitée aux cellules caliciformes, et variable (de 10 à 80 % des cellules caliciformes) (**Figure 16**). Pour les zones de MQ, l'expression de sLe^x est limitée aux cryptes basales, sur une surface muqueuse totale marquée d'environ 5 à 10 % (**Figure 16**).

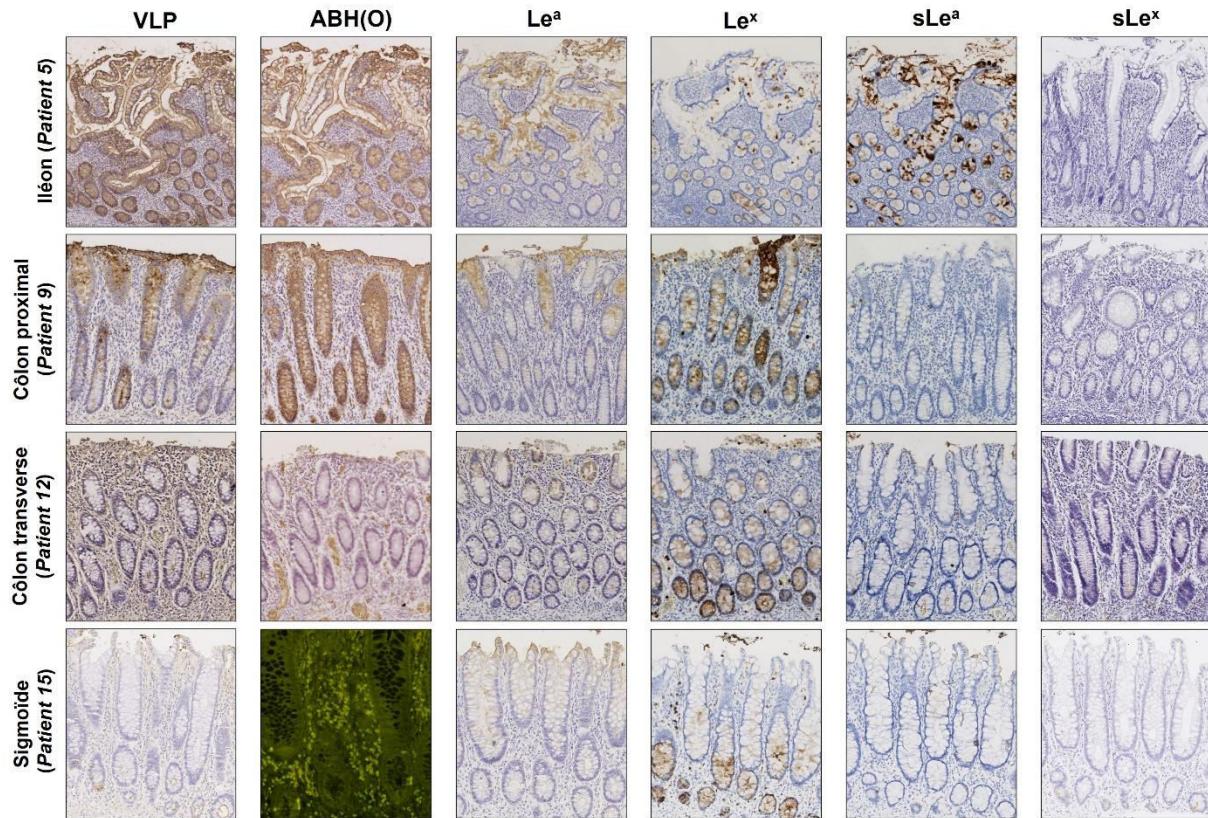


Figure 16. Immunodétection des échantillons de MC d'iléon (patient 5), de côlon proximal (patient 9), de côlon transverse (patient 12) et de côlon distal (patient 15) avec MQ. Des anticorps monoclonaux ont été utilisés pour la détection des antigènes de groupe sanguin A, Le^a Le^x, sLe^a, sLe^x et des VLP GII.4. Le motif α 1,2-fucose a été détecté par l'utilisation de lectine UEA-I conjuguée au FITC. La détection des anticorps et des lectines est montrée en marron et par fluorescence verte, respectivement. Les antigènes détectés sont indiqués en haut de chaque colonne. Les échantillons tissulaires sont indiqués à gauche de chaque ligne (D'après Tarris et al., 2021).

c. Côlon proximal

Les échantillons de côlon proximal affichent une accroche pan-muqueuse des VLP GII.4 qui co-localisent avec les antigènes ABH(O), présents sur l'ensemble des cryptes coliques. Les antigènes Le^a et Le^x sont fortement exprimés au niveau du cytoplasme des cellules caliciformes, toutefois avec une expression très faible et focale de l'antigène sLe^a au niveau des cellules caliciformes (**Figure 16**). Au niveau du côlon proximal, l'antigène sLe^x est exprimé faiblement au niveau des niches cryptiques basales prolifératives, de manière superposable à celle de l'antigène Ki67 (**Figure 15 et 16**).

d. Côlon transverse

L'expression des antigènes ABH(O) demeure très faible et focale dans les zones de ML, voire absente des zones de MQ (**Figure 16 et 17**). En l'absence d'expression des antigènes ABH(O), les MQ démontrent une très faible accroche des VLP GII.4, tandis que les ML présentent un attachement marqué des VLP GII.4 au niveau des lambeaux d'épithélium régénératif (**Figure 17**). L'expression des antigènes Lewis (Le^a, sLe^a, Le^x, sLe^x) est prononcée et ubiquitaire dans

les ML, au contraire des MQ où l'expression des antigènes Lewis reste inconstante. L'antigène Le^a affiche une expression faible et focale au niveau du cytoplasme des cellules caliciformes (30 à 80% de la surface muqueuse totale), hormis pour l'échantillon 14 où l'expression est ubiquitaire (**Figure 16**). Au niveau des MQ, les cellules caliciformes expriment également les antigènes Le^x et sLe^a à des degrés variables (10-70% pour Le^x, 5-30% pour sLe^a). L'expression de l'antigène sLe^x demeure quant à elle faible et focale au niveau des MQ, celle-ci étant restreinte aux niches prolifératives cryptiques basales (**Figure 16**).

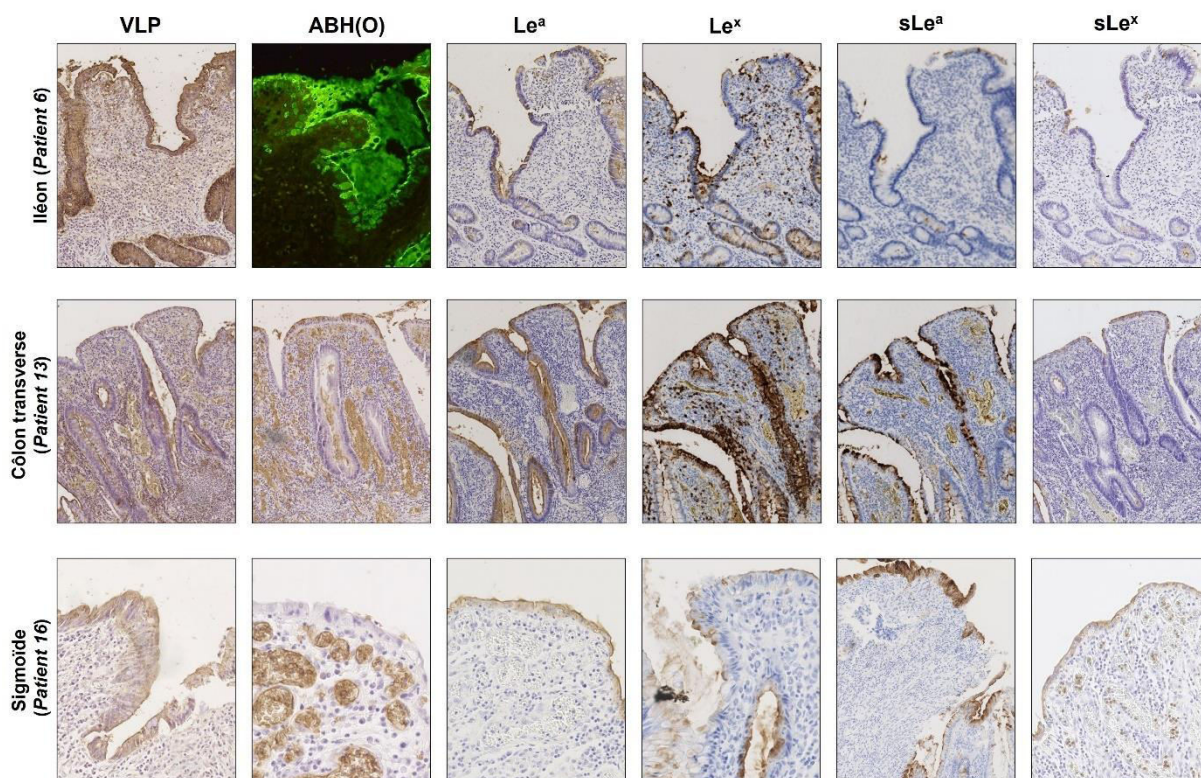


Figure 17. Immunodétection des échantillons de MC d'iléon (patient 6), côlon transverse (patient 13) et de côlon distal (patient 15) avec ML. Des anticorps monoclonaux ont été utilisés pour la détection des antigènes de groupe sanguin A, Le^a Le^x, sLe^a, sLe^x et des VLP GII.4. Le motif α 1,2-fucose a été détecté par l'utilisation de lectine UEA-I conjuguée au FITC. La détection des anticorps et des lectines est montrée en marron et par fluorescence verte, respectivement. Les antigènes détectés sont indiqués en haut de chaque colonne. Les échantillons tissulaires sont indiqués à gauche de chaque ligne (D'après Tarris et al., 2021).

e. Sigmoïde

Les échantillons sigmoïdiens expriment très faiblement les antigènes de groupe sanguin ABH(O) dans les ML (0,25% de la surface muqueuse totale en moyenne). Les VLP GII.4 ont été détectées de manière ubiquitaire sur les ML, tandis que les MQ ont démontré une accroche faible et focale, cantonnée aux niches prolifératives cryptiques basales (20% de la surface muqueuse totale) (**Figure 16 et 17**). L'expression des antigènes Lewis (Le^a, sLe^a, Le^x, sLe^x) est ubiquitaire au niveau des ML, au contraire des MQ sigmoïdiennes où l'expression de Le^a et sLe^a Le^a et Le^x demeure faible et focale au niveau des cellules caliciformes (10-50% de la surface muqueuse totale marquée pour Le^a, 5-10% de la surface muqueuse totale marquée pour

sLe^a, 20-30% pour Le^x). L'expression de l'antigène sLe^x demeure quant à elle restreinte aux niches prolifératives cryptiques basales des MQ (5% de la surface muqueuse totale) (**Figure 16**).

2. Rectocolite hémorragique

Huit échantillons tissulaires de sigmoïdectomie et de colectomie subtotale ont été analysés, comprenant 6 échantillons sigmoïdiens et 3 échantillons rectaux. L'analyse histologique a permis de vérifier l'absence de dysplasie, et de caractériser les lésions histologiques inflammatoires. Trois échantillons comprenaient uniquement des MQ (2 de sigmoïde et 1 de rectum), 3 échantillons comportaient des MQ et ML (2 de sigmoïde et 1 de rectum), et 2 échantillons comportaient uniquement des ML (1 de sigmoïde et 1 de rectum). L'étude immunohistochimique avec l'anticorps anti-Ki67 a montré un marquage nucléaire prédominant dans les niches cryptiques basales ainsi que dans les zones de ML (**Figure 18**).

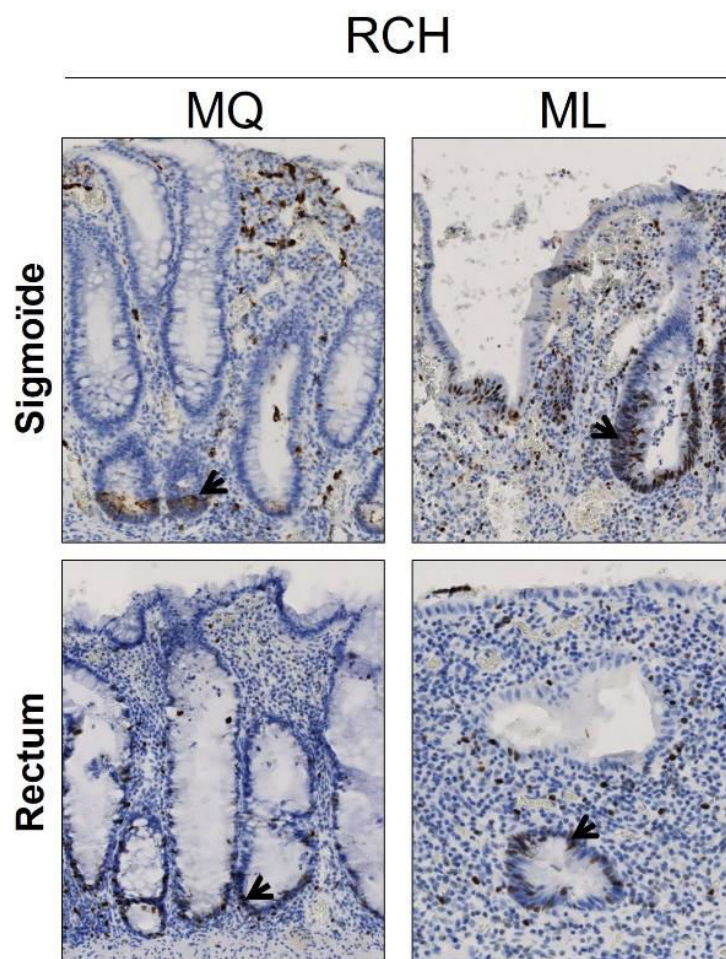


Figure 18. Détection de l'antigène Ki67 dans les échantillons de RCH. Le marquage Ki67 apparaît de couleur noire et ponctué au niveau du noyau (flèches). Les sites anatomiques sont indiqués sur la gauche de chaque image. L'origine des échantillons, les zones de MQ et de ML sont indiquées en haut de chaque colonne (D'après Tarris et al., 2021).

a. Sigmoïde

Les échantillons de sigmoïde n'expriment pas les antigènes ABH(O) dans les MQ, et très faiblement dans les ML. L'accroche des VLP GII.4 a été restreinte aux niches cryptiques basales (20-30% de la surface muqueuse totale) dans les MQ. L'expression des antigènes Le^a et sLe^a est focale au niveau des cellules caliciformes des cryptes basales et superficielles (50-80% de surface totale marquée pour Le^a et 30-70% de surface totale marquée pour sLe^a) tandis que l'expression des antigènes Le^x et sLe^x demeure focale, au niveau des niches cryptiques basales (**Figure 19**). Dans les ML, l'accroche des VLP GII.4 est ubiquitaire. Il en est de même pour l'ensemble des antigènes Lewis (Le^a, sLe^a, Le^x, sLe^x), à la surface des lambeaux d'épithélium régénératif (**Figure 19**).

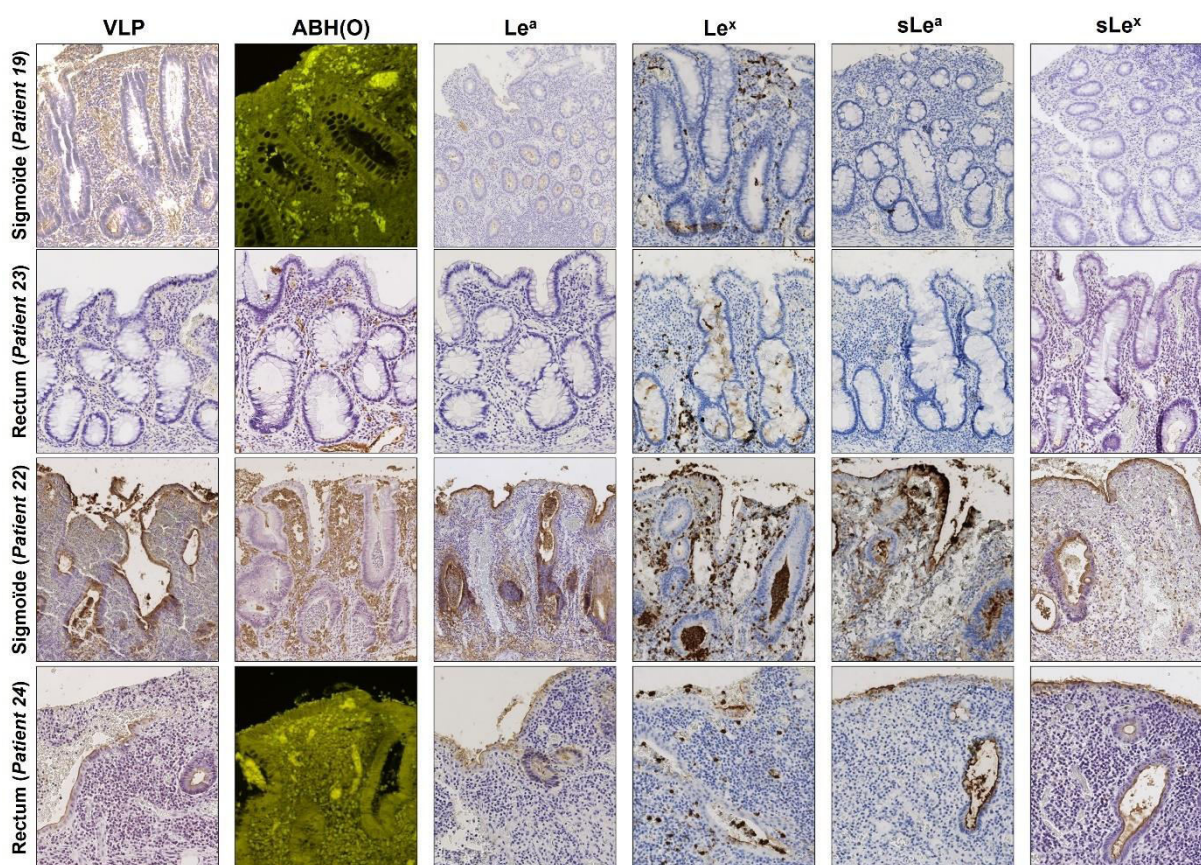


Figure 19. Immunodétection des échantillons de RCH de côlon (patient 19) et rectum (patient 23) de MQ, et de sigmoïde (patient 22) et rectum (patient 24) avec ML. Des anticorps monoclonaux ont été utilisés pour la détection des antigènes de groupe sanguin A, Le^a Le^x, sLe^a, s Le^x et des VLP GII.4. Le motif α 1,2-fucose a été détecté par l'utilisation de lectine UEA-I conjuguée au FITC. La détection des anticorps et des lectines est montrée en marron et par fluorescence verte, respectivement. Les antigènes détectés sont indiqués en haut de chaque colonne. Les échantillons tissulaires sont indiqués à gauche de chaque ligne (D'après Tarris et al., 2021).

b. Rectum

Pour les 3 échantillons rectaux, les MQ n'expriment pas les antigènes ABH(O). L'expression des antigènes Lewis (Le^a , sLe^a , Le^x , sLe^x) demeure très focalement cantonnée à la surface des niches cryptiques prolifératives ainsi que l'accroche des VLP GII.4 (**Figure 19**). Concernant les ML rectales, l'accroche des VLP GII.4 s'est avérée ubiquitaire, ainsi que l'expression des antigènes Lewis (Le^a , sLe^a , Le^x , sLe^x) (**Figure 19**).

En résumé, l'accroche des VLP GII.4 demeure constante au niveau des tissus exprimant fortement les antigènes ABH(O), incluant l'iléon ou le côlon proximal, démontrant le rôle clé des HBGA dans l'accroche des norovirus humains. Pour le côlon transverse, le côlon distal et le rectum, de fortes discordances des profils d'accroche des VLP GII.4 au niveau des MQ et ML ont été observées, en l'absence d'expression des antigènes ABH(O). L'accroche des VLP GII.4 et l'expression d'antigènes Lewis (Le^a , sLe^a , Le^x , sLe^x) au niveau des niches cryptiques possédant un fort pouvoir prolifératif pour les MQ, ou de lambeaux d'épithélium régénératif pour les ML, laisse supposer que les antigènes de type Lewis, sous la forme sialylée ou non, peuvent remplir le rôle de récepteur des norovirus humains en zones inflammatoires lésionnelles. De façon surprenante, nous avons fait le même constat pour les tissus de patients atteints de MC, où là encore on observe une surexpression des antigènes de type Lewis. L'étape suivante a donc été de caractériser plus précisément les HBGA responsables de l'accroche des norovirus pour les MC et RCH dans un contexte inflammatoire et régénératif.

E. Caractérisation des récepteurs des norovirus GII.4 en conditions inflammatoires

Nos observations ont mis en lumière l'attachement des norovirus GII.4 sur les zones de ML pour les MC et les RCH. Ces zones n'expriment pas les antigènes ABH(O) mais les antigènes Lewis. L'étape suivante a été de démontrer que l'attachement des norovirus implique effectivement les antigènes Lewis par des techniques de compétition/inhibition sur des coupes histologiques. L'ensemble des expérimentations d'inhibition d'accroche des VLP GII.4 ont été réalisées sur les échantillons des patients 13 et 22 qui correspondent respectivement à un échantillon de côlon transverse issu d'un patient atteint d'une MC, et un échantillon de sigmoïde d'un patient atteint de RCH (**Tableau 6 et 7**). Les deux patients sont de groupe sanguin A.

1. Rôle des antigènes ABH(O) dans l'accroche VLP GII.4 sur muqueuse régénérative

L'absence d'attachement des VLP mutantes $\Delta D373$ suggère de manière indirecte que l'accroche des VLP GII.4 sur les zones de ML implique des HBGA (**Figure 20**) (de Rougemont et al., 2011). L'implication des HBGA dans l'accroche des VLP GII.4 a alors été étudiée lors d'expériences de compétition en utilisant sur des coupes histologiques, des lectines, des anticorps monoclonaux spécifiques associés selon le cas à des prétraitements enzymatiques des tissus.

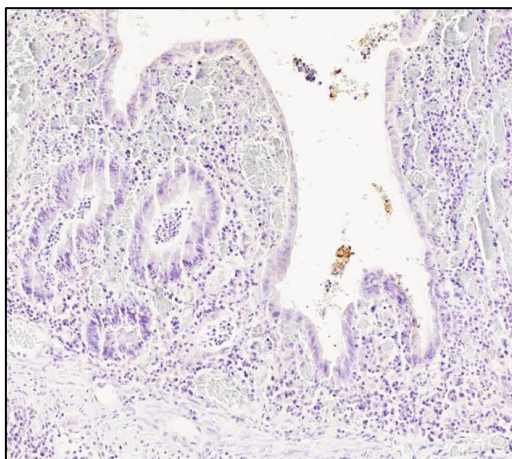


Figure 20. Attachement de la VLP $\Delta D373$ sur coupe histologique de ML de sigmoïde (patient 22), montrant l'absence de détection.

L'absence d'implication des antigènes ABH(O) dans l'accroche des norovirus humains sur les zones de ML a été démontrée par la préincubation des coupes histologiques avec les lectines UEA-I ou HPA, affines respectivement pour les antigènes H et A. L'incubation avec les lectines a été effectuée avant l'incubation des VLP. Même si UEA-I fonctionne mal sur les antigènes A et O, l'accroche résiduelle des VLP sur les ML à la fois des patients souffrant de MC et de RCH a suggéré que celle-ci était indépendante de l'expression d'antigènes ABH(O) (**Figure 21**).

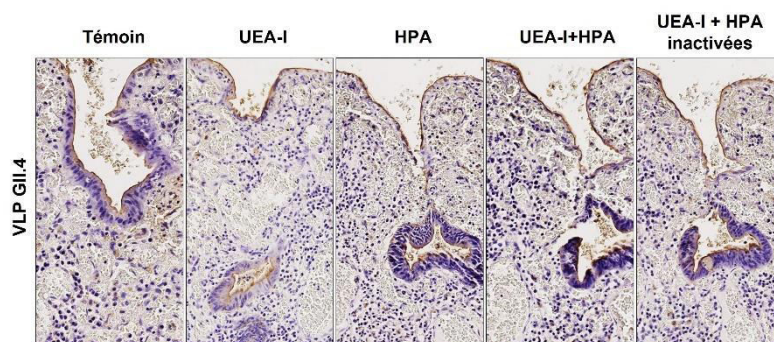


Figure 21. Expériences d'inhibition d'accroche des VLP GII.4 sur coupes histologiques de ML de sigmoïde (patient 22). Les coupes histologiques ont été pré-incubées avec la lectine UEA-I seule, couplée à HPA, ou bouillie, montrant une accroche constante des VLP GII.4 sur les ML. La détection des marquages est indiquée en marron sur les images. Les prétraitements réalisés sont indiqués en haut de chaque image. L'incubation de la VLP GII.4 a été réalisée pour toutes les coupes histologiques (indiqué à gauche de la ligne).

2. Rôle des motifs sialiques dans l'accroche VLP GII.4 sur muqueuse régénérative

Pour déterminer le rôle possible des acides sialiques, composants de sLe^a et sLe^x, dans l'attachement des VLP, des coupes histologiques ont été incubées avec de la sialidase pour éliminer l'acide sialique des tissus. Dans un premier temps, nous avons contrôlé l'efficacité du traitement enzymatique.

Nous avons effectué le prétraitement des coupes histologiques avec 10 mU de neuraminidase de *Vibrio cholerae*. Après traitement enzymatique, nous avons démontré que ni CSLEX1, anticorps spécifique de sLe^x, ni NS-1116-19.9, spécifique de sLe^a, ne reconnaissent ces structures (**Figure 22**). Cette absence de marquage a donc prouvé que le traitement à la neuraminidase est efficace pour l'élimination de l'acide sialique des antigènes sLe^a et sLe^x. Dans un deuxième temps, nous avons effectué des expériences d'attachement de VLP après traitement à la sialidase. L'observation d'un attachement distinct des VLP sur les zones de ML ont prouvé que les acides sialiques présents sur sLe^a et sLe^x ne contribuent en rien à la reconnaissance des particules de norovirus.

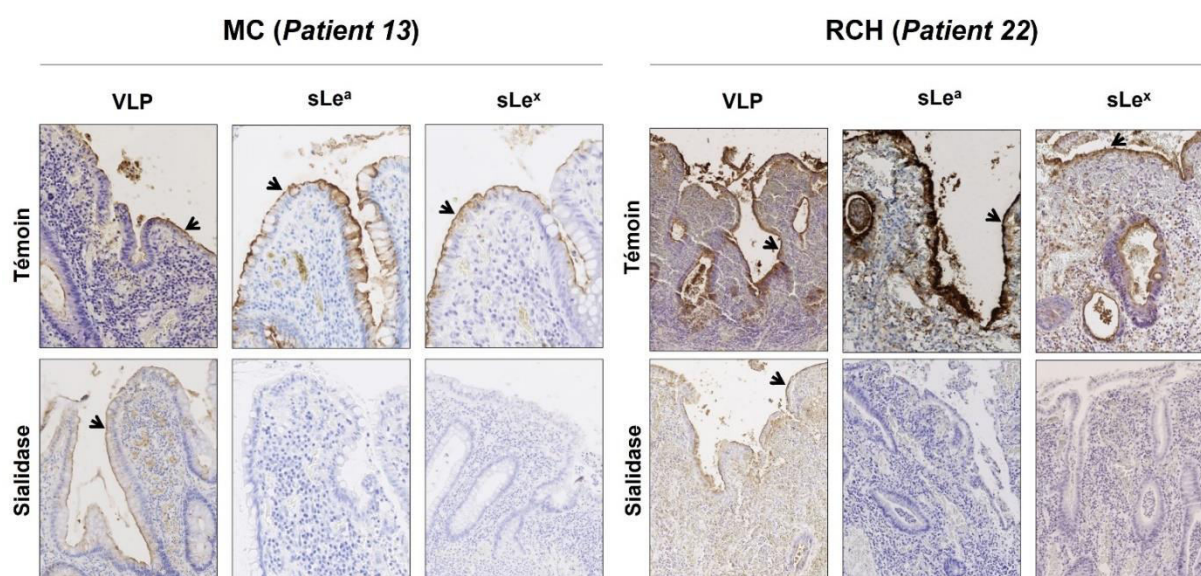


Figure 22. Immunodétection sur coupes histologiques de ML de côlon transverse de MC (patient 13) et de sigmoïde de RCH (patient 22). Des anticorps monoclonaux ont été utilisés pour la détection de sLe^a, sLe^x et des VLP GII.4. La détection des marquages est indiquée par une coloration marron sur les coupes histologiques (flèches). Les témoins et prétraitements par sialidase sont indiqués à la gauche de chaque ligne. Les antigènes détectés sont indiqués en haut de chaque colonne (D'après Tarris et al., 2021).

3. Rôle des motifs Lewis dans l'accroche des VLP GII.4 sur muqueuse régénérative

L'absence d'antigènes ABH(O) dans les zones de ML, suggèrent que ces antigènes ne sont pas responsables de l'attachement des VLP au niveau des ML, au contraire de ce qui est observé sur duodénum sain. La présence des antigènes Lewis étant avérée, il est donc resté à démontrer leur rôle dans l'attachement des norovirus. Nous avons utilisé deux stratégies. La première a été de saturer les sites antigéniques par l'ajout de lectines spécifiques des HBGA. Ces expériences ont été complétées par une seconde série d'expériences de compétition de l'attachement des VLP à l'aide d'anticorps monoclonaux spécifiques des antigènes Le^a et Le^x. L'incubation de la lectine AAL a ainsi permis de neutraliser efficacement l'attachement des VLP sur les zones des ML (**Figure 23**). La même lectine détruite par la chaleur n'a eu aucun effet inhibiteur sur l'attachement des VLP sur les muqueuses (**Figure 23**). Ces résultats ont été observés aussi bien pour les tissus provenant de CD que pour les tissus provenant de RCH. Ces résultats ont démontré que des groupements fucose positionnés en position $\alpha 1,2$, $\alpha 1,3$ (caractéristique de Le^a) ou $\alpha 1,4$ (caractéristique de Le^x) pourraient être impliqués dans la reconnaissance des VLP sur les zones de ML.

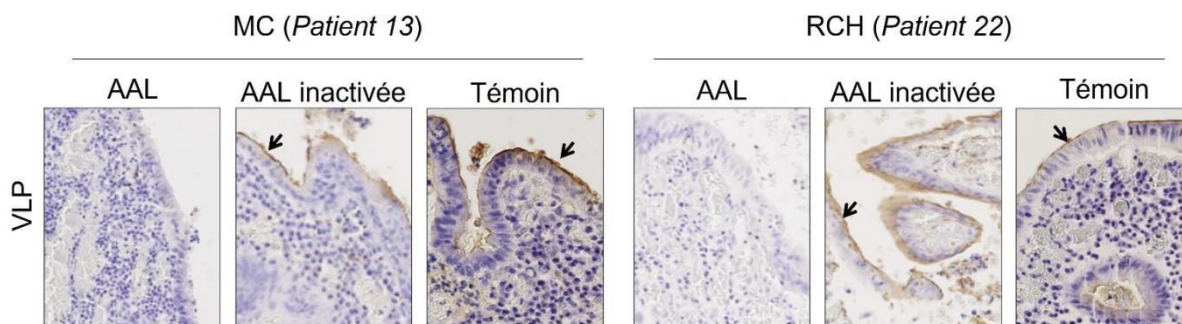


Figure 23. Expériences d'inhibition d'accroche des VLP GII.4 sur coupes histologiques de ML de côlon transverse de MC (patient 13) et de sigmoïde de RCH (patient 22). Les VLP GII.4 ont été incubés après l'incubation de AAL inactivée par la chaleur ou non. Les prétraitements et témoins sont indiqués en haut de chaque image. Les VLP GII.4 ont été utilisées, indiqués à gauche de la ligne. L'accroche spécifique des VLP est indiquée par des flèches (D'après Tarris et al., 2021).

La lectine LTL a la propriété de reconnaître le L-fucose. Dans la littérature, des expériences de compétition par cette lectine ont permis de démontrer la reconnaissance de Le^x alors que Le^a n'était pas reconnu (Yan et al., 1997). Les auteurs ont observé que la présence d'un acide sialique empêche la reconnaissance de Le^a par la lectine. Dans les expériences de compétition que nous avons menées, des coupes histologiques de l'échantillon du patient 22, souffrant de RCH, et du patient 13, souffrant de MC, ont été préincubées avec la lectine LTL avant l'ajout des VLP. Certaines de ces coupes ont été auparavant traitées avec de la sialidase et/ou incubées avec des lectines (UEAI et HPA). Quel que soit le traitement, l'incubation de la lectine LTL

n'a eu que peu d'effet sur le marquage des zones de ML, certes faible, par les VLP (**Figure 24**). Ces résultats préliminaires ont suggéré que le rôle de l'antigène Le^x dans l'attachement des VLP était probablement mineur. Le rôle secondaire de Le^x a été ensuite confirmé lors d'expériences d'inhibition compétitives à l'aide d'anticorps anti-Le^x (clone MEM158) (**Figure 25**). Les coupes histologiques ont été incubées avec les anticorps anti-Le^a ou anti-Le^x, ou les deux à la fois. Dans les deux cas, la suppression du signal a été clairement constatée après incubation de l'anticorps anti-Le^a alors qu'un marquage résiduel a été observé avec l'anticorps anti-Le^x, confirmant les résultats obtenus avec les lectines AAL et LTL. La spécificité des anticorps monoclonaux a donc permis de démontrer que l'attachement aux tissus inflammatoires des MC et RCH implique principalement l'antigène Le^a.

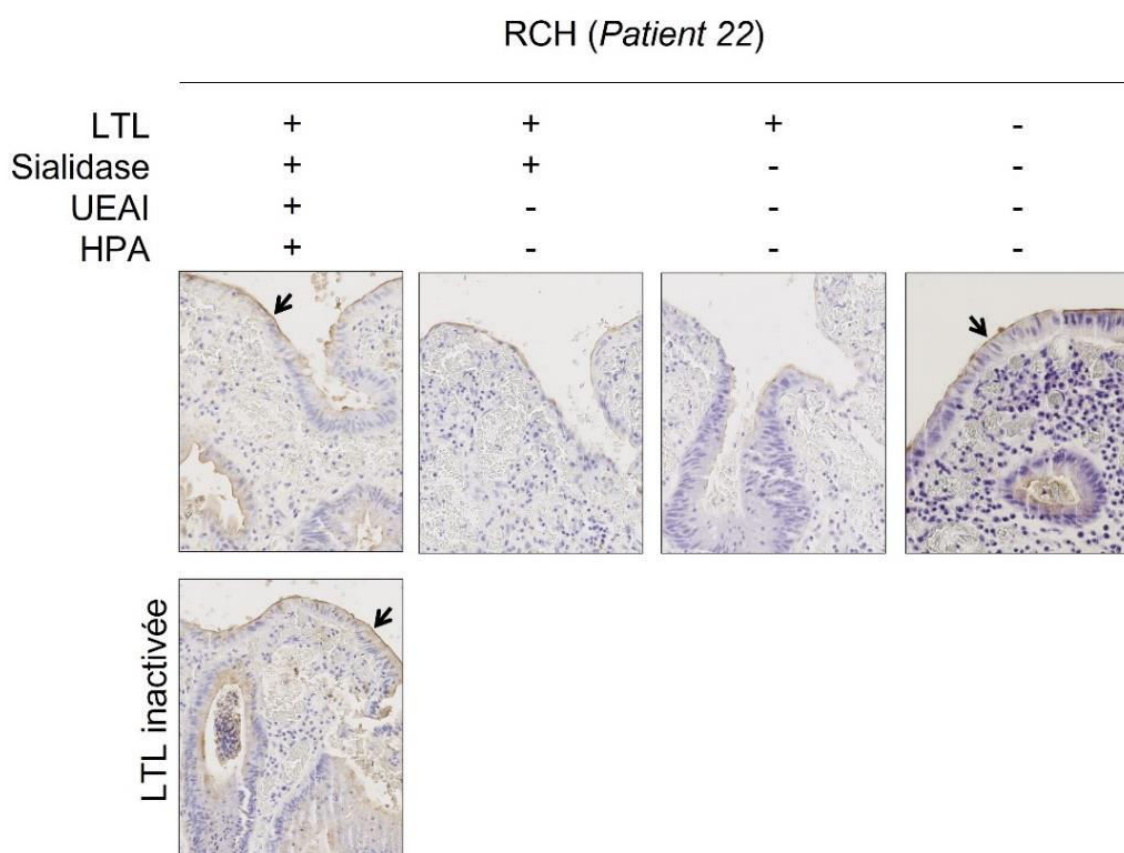


Figure 24. Expériences d'inhibition d'accroche des VLP GII.4 sur coupes histologiques en ML de RCH (patient 22). Des coupes histologiques de ML sigmoïdiennes de RCH ont été incubées avec une combinaison de lectines (LTL, UEAI, HPA), de la sialidase, ou de la LTL inactivée par la chaleur, préalablement à l'incubation des VLP GII.4. Les prétraitements sont indiqués en haut de chaque colonne par des symboles + (traitement) et - (absence de traitement). L'accroche spécifique des VLP est indiquée par des flèches. (D'après Tarris et al., 2021).

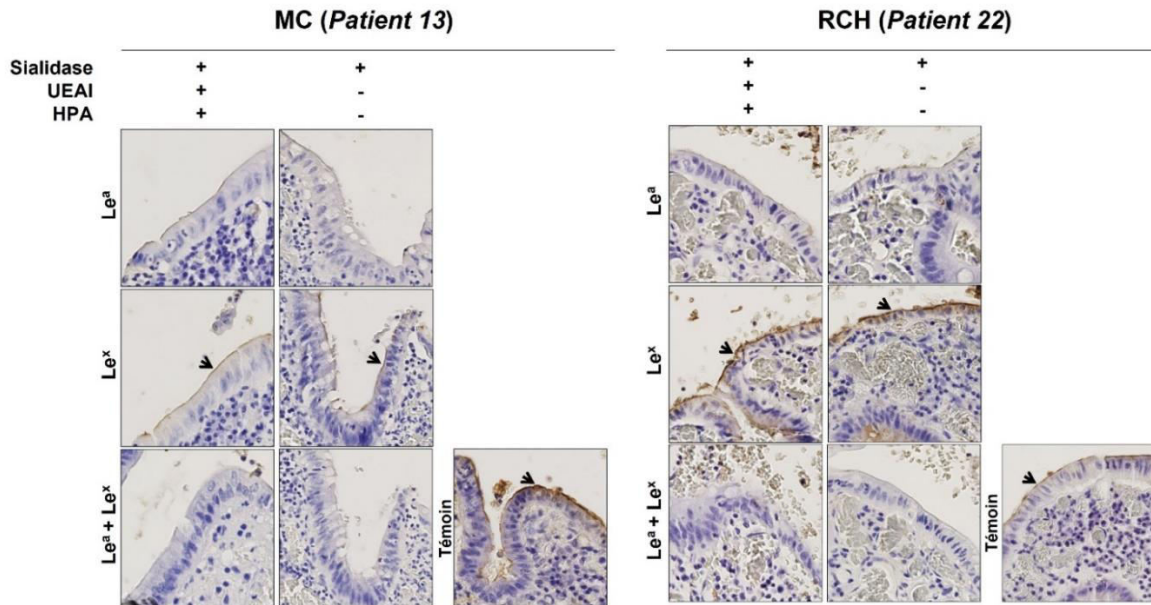


Figure 25. Expériences d'inhibition d'accroche des VLP GII.4 dans les ML de côlon transverse de MC (patient 13) et de sigmoïde de RCH (patient 22). Les coupes histologiques ont été prétraitées avec des anticorps monoclonaux spécifiques dirigés contre Le^a, Le^x, seuls ou combinés, avant l'incubation des VLP. Les témoins et prétraitements par lectines et sialidase sont indiqués à la gauche de chaque image et en haut de chaque colonne par des symboles + (traitement) et - (absence de traitement). L'accroche spécifique des VLP est indiquée par des flèches (D'après Tarris et al., 2021).

4. Expériences d'accroche des VLP GII.4 et GII.17

Des expériences d'accroche des VLP de génotypes GII.3 (Souche SW4) et GII.17 (variant Kawasaki 308) ont été réalisées sur des coupes histologiques de ML de côlon et sigmoïdes des patients atteints de MICI, mais également de duodénum sain (**Figure 26**). L'accroche positive des VLP GII.3 et GII.17 a permis de démontrer la spécificité d'accroche des VLP sur duodénum sain. L'analyse histologique a confirmé l'absence d'accroche pour les VLP GII.3 en ML, tandis que les VLP GII.17 démontraient une accroche importante mais focale sur les ML. Nous avons donc conclu que l'accroche des VLP de norovirus était non seulement dépendante du site anatomique, du sous-type cellulaire mais également du génotype de norovirus.

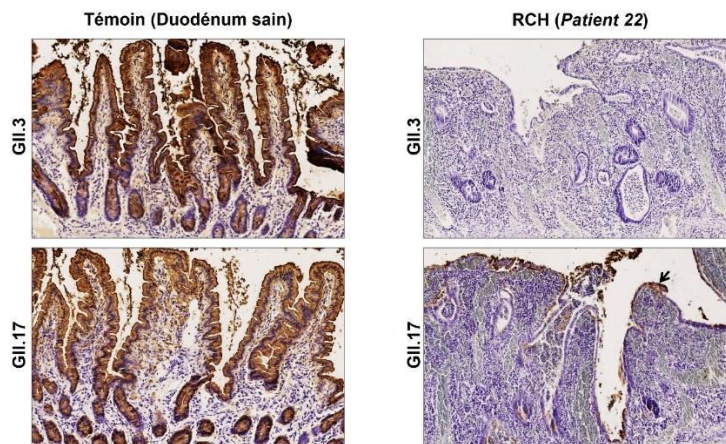


Figure 26. Accroche des VLP GII.3 et GII.17 sur duodénum sain (témoin) et ML de sigmoïde de RCH (patient 22). Le génotype des VLP est indiqué à la gauche de chaque image. Le marquage spécifique des VLP GII.17 sur les zones de ML est indiqué par une flèche (D'après Tarris et al., 2021).

F. Commentaire sur l'interaction des norovirus humains sur les muqueuses inflammatoires au cours des MICI

Parce que les HBGA sont les ligands connus des norovirus humains, l'objectif de l'étude menée sur les patients MICI sécréteurs a été de déterminer les interactions entre les norovirus humains et les HBGA sur ces muqueuses lésées de l'intestin grêle, du côlon et du rectum de ces patients. Dans la littérature, il est admis que les norovirus humains se répliquent dans l'intestin grêle, grâce à l'expression importante des HBGA. De la même façon on considère que les norovirus humains ne se répliquent pas dans le côlon d'un adulte sain (Green et al., 2020; Howley and Knipe, 2020; Karandikar et al., 2016). Les connaissances sur les virus entériques dans le cadre de pathologies lourdes restent parcellaires. L'analyse d'échantillons tissulaires provenant de patients souffrant de MICI, ayant développé des gastroentérites à norovirus, particulièrement GII.4 ou GII.17, ou des gastroentérites liées à d'autres virus entériques comme les rotavirus de groupe A, qui reconnaissent également les HBGA, pourrait permettre d'étudier la réplication de ces virus au niveau des cellules intestinales en contexte inflammatoire (Hu et al., 2012; Huang et al., 2012). Dans nos expérimentations, nous avons observé que les VLP dérivées de norovirus humains reconnaissent spécifiquement les HBGA sur des cellules épithéliales duodénales, comme décrit précédemment (Marionneau et al., 2002). A l'inverse, les VLP ne s'accrochent pas au niveau des cellules épithéliales du côlon sain, où toutefois une faible expression pan-colique de l'antigène Le^a est observée (Yuan et al., 1985a). Le côlon distal et le rectum expriment également les antigènes Le^x et Le^y au niveau des cryptes basales, possédant un fort pouvoir prolifératif (Brown et al., 1984; Cooper et al., 1991; Nakagoe et al., 1994b). A l'inverse, les zones de muqueuse régénérative n'expriment pas l'antigène Ki67, démontrant leur faible potentiel prolifératif. L'analyse des tissus pathologiques coliques et rectaux de patients atteints de MC et de RCH a permis de démontrer une accroche des VLP GII.4 et GII.17, mais pas des VLP GII.3 sur les zones de muqueuse régénérative. Ces observations démontrent que l'accroche des VLP est dépendante du génotype au niveau des zones de muqueuse régénérative. L'accroche des norovirus humains GII.4 à sLe^x a été démontrée précédemment in vitro, à l'aide de VLP GII.4, mais la signification biologique de cette accroche est alors restée jusqu'alors sans explication (Rydell et al., 2009). Il est question de « sialic pathway » pour évoquer le rôle éventuel de l'acide sialique dans la reconnaissance des norovirus en plus du rôle central joué par le motif α 1,2 fucose que l'on retrouve dans les antigènes ABH(O) (Han et al., 2014; Rydell et al., 2009; Wegener et al., 2017). Nos expérimentations démontrent donc que les antigènes Le^a et dans une moindre mesure Le^x, seuls ou associés à des motifs sialiques, sont impliqués dans la reconnaissance spécifique des norovirus humains sur les zones inflammatoires régénératives dans le cadre des MC et RCH sévères. Dans les MC et les RCH, la surexpression

des antigènes Le^a et Le^x et leurs formes sialylées au niveau des zones de régénération épithéliale a été observée quel que soit le site anatomique. Ces antigènes et leurs formes sialylées ont fait l'objet de nombreuses études qui ont démontré chez la souris que l'antigène sLe^a est surexprimé dans un contexte de colite induite par le sodium dextran sulfate (DSS), par l'hyperactivation de l' α 3/4 fucosyltransférase, dont l'action est médiée par le gène *FUT3* (Brazil et al., 2013). Les motifs sLe^a s'accrocheraient au récepteur CD44v6, jouant un rôle dans la migration épithéliale des leucocytes par augmentation de la O-glycosylation protéique lors des processus inflammatoires (Brazil et al., 2013). Dans ce même modèle de souris, l'utilisation d'anticorps dirigés contre les molécules sLe^x et sLe^a améliore la régénération épithéliale (Kelm et al., 2020). Une étude réalisée chez l'homme, en utilisant des biopsies de patients souffrant de MICI, montre une surexpression de la molécule sLe^x au niveau de ces mêmes zones de régénération épithéliale, et démontre le rôle de cette molécule dans l'adhésion et la migration leucocytaire (Vainer et al., 1998). L'expression de sLe^a a également été documentée chez l'homme sur les muqueuses régénératives dans les RCH (Cooper and Steplewski, 1988). De manière surprenante, l'expression de sLe^a serait réversible dans les zones de muqueuse colique régénérative de RCH (Cooper and Steplewski, 1988). Des études complémentaires devraient alors se focaliser sur le devenir des norovirus humains après l'accroche sur les ligands Le^a et Le^x. Même si l'accroche des virus est souvent suivie d'une internalisation des particules virales dans les cellules avant réplication, il est concevable que l'accroche des norovirus humains entraîne l'internalisation et la réplication au niveau des zones régénératives. Les conséquences physiologiques de la réplication du norovirus humain, plus particulièrement dans les zones de muqueuses régénératives coliques et rectales, sont ainsi inconnues. L'utilisation de modèles murins exprimant les antigènes sLe^x et sLe^a au niveau des zones de muqueuse régénérative au cours de colites pourrait permettre d'étudier la réplication du norovirus murin et la perturbation qui en suit des voies de signalisation. La transposition à l'homme est également possible par l'étude de tissus de patients souffrant de MICI, potentiellement infectés par les norovirus humains. L'étude de la réplication virale couplée à celle des voies de signalisation cellulaire par imagerie moléculaire permettrait alors d'étudier les profils transcriptionnels et protéiques de ces cellules régénératives, que reconnaissent les norovirus humains GII.4 et GII.17 dans notre étude. Dans nos travaux, nous avons donc démontré l'attachement spécifique des norovirus aux zones inflammatoires de patients MICI alors que les études de surveillance de souche à grande échelle tendent à confirmer nos résultats (Axelrad et al., 2018; Khan et al., 2009). La démonstration des effets de cette reconnaissance par les tissus inflammatoires est plus difficile à produire. Est-ce que le simple fait de cette reconnaissance provoque une réponse immunitaire ? Est-ce que cette réponse immunitaire entraîne une réponse inflammatoire

indépendamment du devenir des virus ? Enfin, il reste à démontrer la réplication des norovirus sur les tissus inflammatoires. La stratégie développée par l'équipe de K. Green mêlant immunomarquages et hybridation de sondes ARN sens et antisens pourrait permettre de vérifier si la réplication des norovirus est possible dans les cellules régénératives, caractérisant les poussées de MICI.

La démonstration de l'accroche spécifique des VLP GII.4 sur les ML de côlon distal et de sigmoïde par le biais principalement de Le^a et dans une moindre mesure de Le^x, sous les formes sialylées ou non, que ce soit dans les MC ou dans les RCH, a été démontrée en l'absence d'expression des antigènes ABH(O). De même, l'absence d'expression des antigènes ABH(O) chez les sujets non-sécréteurs portant des mutations du gène *FUT2* entraînant une déficience de synthèse des motifs α 1,2 fucose laisse supposer que les individus non-sécréteurs sont « protégés » des infections à norovirus. La possibilité d'interactions des norovirus avec les muqueuses des patients non-sécréteurs souffrant de MICI reste à évaluer. Dans la deuxième partie de la thèse, nous avons étudié les interactions de plusieurs génotypes de norovirus en conditions physiologiques ou pathologiques pour identifier les ligands participant à la reconnaissance des norovirus chez les non-sécréteurs.

II. EXPRESSION DES HBGA ET ACCROCHE DES VIRUS ENTERIQUES CHEZ LES SUJETS NON-SECRETEURS

A. Expériences sur salives de sujets non-sécréteurs

1. Expériences d'accroche des VLP GII.4, GII.3 et GII.17

Trente-quatre salives d'individus non-sécréteurs ont été utilisées pour les expérimentations d'accroche des VLP GII.3, GII.4 et GII.17 (**Figure 27**). Un génotypage préliminaire et un phénotypage HBGA réalisé sur les salives a démontré que les patients étaient non-sécréteurs Le^a positifs et Le^b négatifs (Le^a+Le^b-). Un traitement au périodate de sodium des salives a entièrement supprimé l'accroche des VLP GII.4, suggérant que l'accroche des VLP était médiée par des sucres. L'accroche des VLP GII.4 du variant Osaka (27ABOR) sur les salives de patients non-sécréteurs a été documentée précédemment, et a servi de témoin positif pour l'attachement des non-sécréteurs (de Rougemont et al., 2011). Le seuil de positivité de détection des VLP a été arbitrairement défini à 0,2 de DO450. Nos résultats ont démontré que l'amplitude d'accroche des VLP aux salives des non-sécréteurs était globalement inférieure aux amplitudes d'accroche des salives de sujets sécréteurs, comme décrit précédemment (de Rougemont et al., 2011). Les VLP GII.4 ont accroché 15 des 34 salives avec des DO450 allant de 0,211 à 0,69. Les VLP GII.17 ont été détectées pour 2 des 34 salives avec des DO450 supérieures à 0,3. De plus, les deux salives positives pour les VLP GII.17 possédaient parmi les DO450 les plus élevées pour GII.4 (**Figure 27**). Enfin, les VLP GII.3 n'ont pas accroché les salives des 34 non-sécréteurs, ce qui confirme les résultats déjà publiés (**Figure 27**) (Ayouni et al., 2015b).

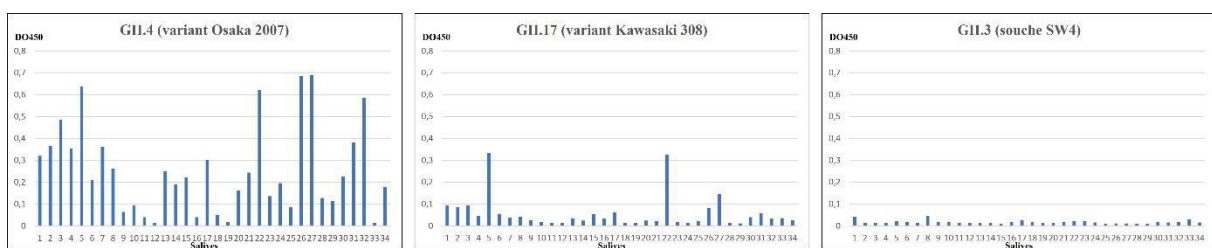


Figure 27. Histogramme et tableau détaillé des DO à 450 nm de détection ELISA des VLP GII.4 (variant Osaka 2007), GII.3 (souche SW4) et GII.17 (souche Kawasaki 308) sur les échantillons de salive des 34 patients non-sécréteurs. Les DO sont indiqués en ordonnées. Les numéros des patients dont dérivent les échantillons sont indiqués en abscisses.

2. Rôle des antigènes Lewis dans l'accroche des VLP sur salives de patients non-sécréteurs

Quatre salives de la cohorte tunisienne ont été sélectionnées en raison d'une quantité suffisante de matériel disponible pour les expérimentations de compétition. Les expérimentations ont permis de déterminer le rôle des HBGA dans la reconnaissance des VLP GII.4 (**Figure 28**). Les expérimentations de compétition n'ont pas été réalisées pour les VLP GII.17 et GII.3 du fait d'une reconnaissance faible ou nulle pour ces deux génotypes. Pour chaque patient, les salives déposées sur les puits ont été incubées avec des quantités croissantes d'anticorps monoclonaux spécifiques de Le^a, Le^b ou Le^x, allant de 8 à 500 ng d'anticorps/puit. Pour les anticorps anti-Le^b et anti-Le^x, l'absence d'inhibition de l'accroche des VLP GII.4 sur les salives a démontré que les antigènes Le^b et Le^x n'étaient pas impliqués dans la liaison des VLP GII.4 sur les salives de sujets non-sécréteurs. A l'inverse, l'inhibition forte de l'accroche des VLP GII.4 avec les anticorps anti-Le^a a démontré le rôle pivot de la molécule Le^a dans l'attachement des VLP GII.4 sur les salives de sujets non-sécréteurs. Ces observations suggèrent que l'antigène Le^a participerait à la reconnaissance de certains norovirus, en particulier les GII.4, chez les non-sécréteurs si on considère que le statut HBGA des salives reflète l'expression des HBGA dans l'intestin.

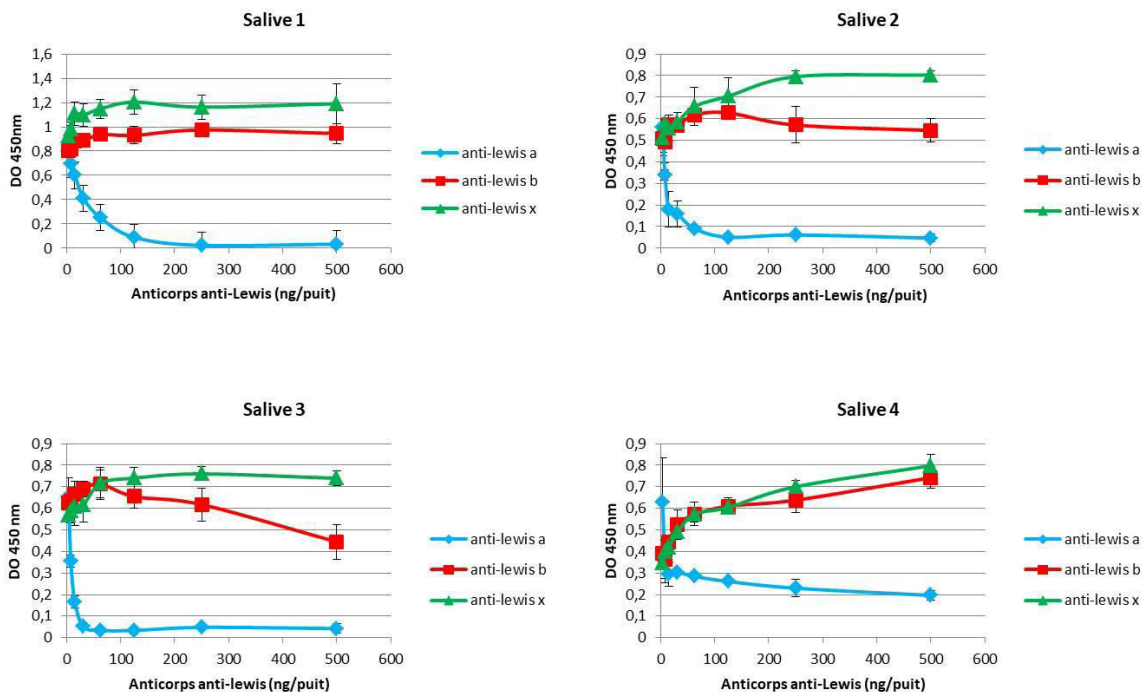


Figure 28. Compétition des VLP GII.4 sur les 4 salives de non-sécréteurs de la cohorte tunisienne. Les expérimentations ont été réalisées à l'aide de quantités progressives d'anticorps anti-Le^a (bleu), anti-Le^b (rouge) et anti-Le^x (vert), dont les quantités ont été indiquées en abscisses de chaque graphique. Pour les 4 salives, l'absorbance (DO450) est indiquée en ordonnées.

B. Dépistage des sujets non-sécréteurs pour les analyses histologiques

L'étape suivante de nos travaux a été d'analyser les interactions des norovirus avec des tissus duodénaux sains d'individus non-sécréteurs. Nous avons sélectionné des blocs correspondant à des biopsies duodénales de 121 patients sans lésion histologique. L'absence d'expression des antigènes A, B ou H au niveau de la muqueuse duodénale et la présence de la mutation homozygote G428A ont été les critères utilisés pour sélectionner les sujets non-sécréteurs. Treize patients non-sécréteurs âgés de 18 à 76 ans (moyenne d'âge : 53 ans), comprenant 11 femmes et 2 hommes ont été choisis (**Tableau 8**). Aux échantillons duodénaux, nous avons ajouté un quatorzième patient. Il s'agit d'une patiente de 26 ans, de groupe sanguin B, souffrant d'une RCH résistante au traitement médical, opérée d'une colectomie subtotalaire emportant l'iléon, l'appendice, le côlon proximal et le côlon transverse. L'analyse histologique a révélé des zones de MQ dans l'iléon et l'appendice, mais également de ML dans le côlon proximal et transverse, sans foyer de dysplasie.

Patient	Localisation anatomique	Histologie	Âge	Sexe	ABH(O)
1NS	Duodénum	Sain	33	F	O
2NS	Duodénum	Sain	56	F	A
3NS	Duodénum	Sain	60	F	O
4NS	Duodénum	Sain	58	F	O
5NS	Duodénum	Sain	71	F	O
6NS	Duodénum	Sain	64	F	B
7NS	Duodénum	Sain	44	F	A
8NS	Duodénum	Sain	46	M	A
9NS	Duodénum	Sain	70	F	A
10NS	Duodénum	Sain	64	M	A
11NS	Duodénum	Sain	29	F	A
12NS	Duodénum	Sain	18	F	A
13NS	Duodénum	Sain	76	F	O
14NS (RCH)	Iléon	MQ (100%)	26	F	B
	Appendice	MQ (100%)			
	Côlon proximal	MQ (50%) / ML (50%)			
	Côlon transverse	MQ (30%) / ML (70%)			

Tableau 8. Description des patients non-sécréteurs. L'âge est indiqué en années. M : Masculin. F : Féminin. ABH(O) : groupe sanguin du patient. MQ : pourcentage de surface de muqueuse quiescente sur l'échantillon étudié, indiqué entre parenthèses. ML : pourcentage de muqueuse lésionnelle sur l'échantillon étudié, indiqué entre parenthèses.

C. Expériences d'accroche et détection des HBGA sur duodénums sains de sujets non-sécréteurs

Dans une étude précédente, il a été démontré l'absence d'accroche des VLP dérivées de la souche SW4 de génotype GII.3 sur la salive d'un sujet non-sécréteur, infecté par la souche SW4 (Ayouni et al., 2015b). Dans ces travaux, les VLP dérivées de la souche SW4 ont été produites à partir du génome viral du virus isolé dans les selles de ce patient non-sécréteur. Les VLP SW4 n'interagissaient pas avec la salive dudit patient. Il a été fait l'hypothèse que des ligands autres que les HBGA pourraient intervenir dans la reconnaissance du norovirus SW4 ou alors qu'il y avait des différences spatiales dans la présentation des HBGA sur la muqueuse intestinale par rapport aux HBGA salivaires. Pour répondre à ces questions, nous avons analysé les tissus de patients non-sécréteurs à l'aide des VLP dérivées des génotypes GII.3, GII.4 et GII.17. Ces expérimentations d'accroche de VLP GII.4, GII.3 et GII.17 ont alors permis d'étudier le rôle des HBGA dans l'accroche des norovirus chez les non-sécréteurs.

1. Expériences d'accroche VLP et expression HBGA du duodénum sain de sujets non-sécréteurs

Dans un premier temps, les VLP dérivées de souches de norovirus 27ABOR (GII.4), Kawasaki 308 (GII.17) et SW4 (GII.3) ont été incubées sur des coupes histologiques dérivées des duodénums sains des 13 patients non-sécréteurs (**Figure 29**). L'accroche sur les villosités duodénales des échantillons des patients 1NS à 9NS s'est avérée importante pour l'ensemble des VLP. Elle a été associée à une très forte expression de Le^a, et une expression plus faible de Le^b, Le^x et Le^y (**Figure 29 et 30**). Les échantillons des patients 10NS et 13NS n'ont montré qu'un attachement faible et focal des VLP 27ABOR, associé à une expression de Le^x et une très faible expression de Le^a (**Figure 29 et 30**). Quant à l'échantillon du patient 12NS, l'accroche isolée des VLP dérivées des souches SW4 et Kawasaki 308, était corrélée à une forte expression de Le^a et Le^x, et à une faible expression de Le^x et Le^y (**Figure 29 et 30**).

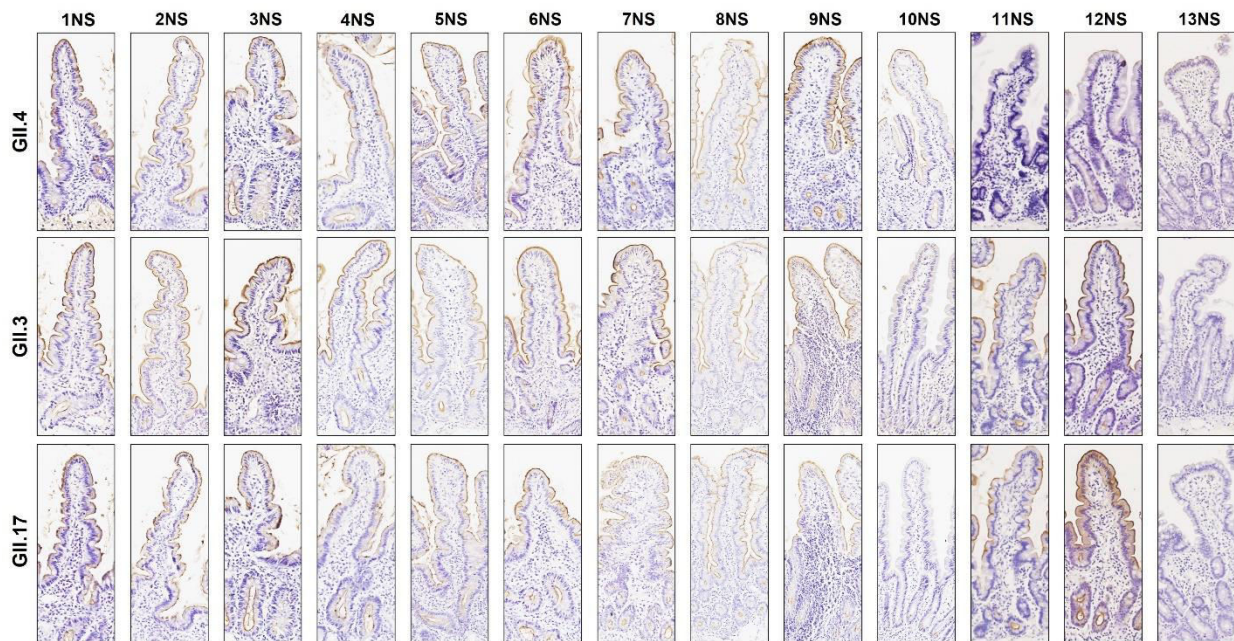


Figure 29. Interaction des VLP GII.4 (variant Osaka 2007), VLP GII.3 (souche SW4), VLP GII.17 (variant Kawasaki 308) sur coupes histologiques de duodénum sain des 13 sujets non-sécréteurs. Le numéro de l'échantillon est indiqué en haut de chaque colonne. Le génotype des VLP utilisées est indiqué à gauche de chaque ligne. La détection des VLP est indiquée par un marquage de couleur marron (flèches). L'ensemble des images ont été réalisées au grossissement X100.

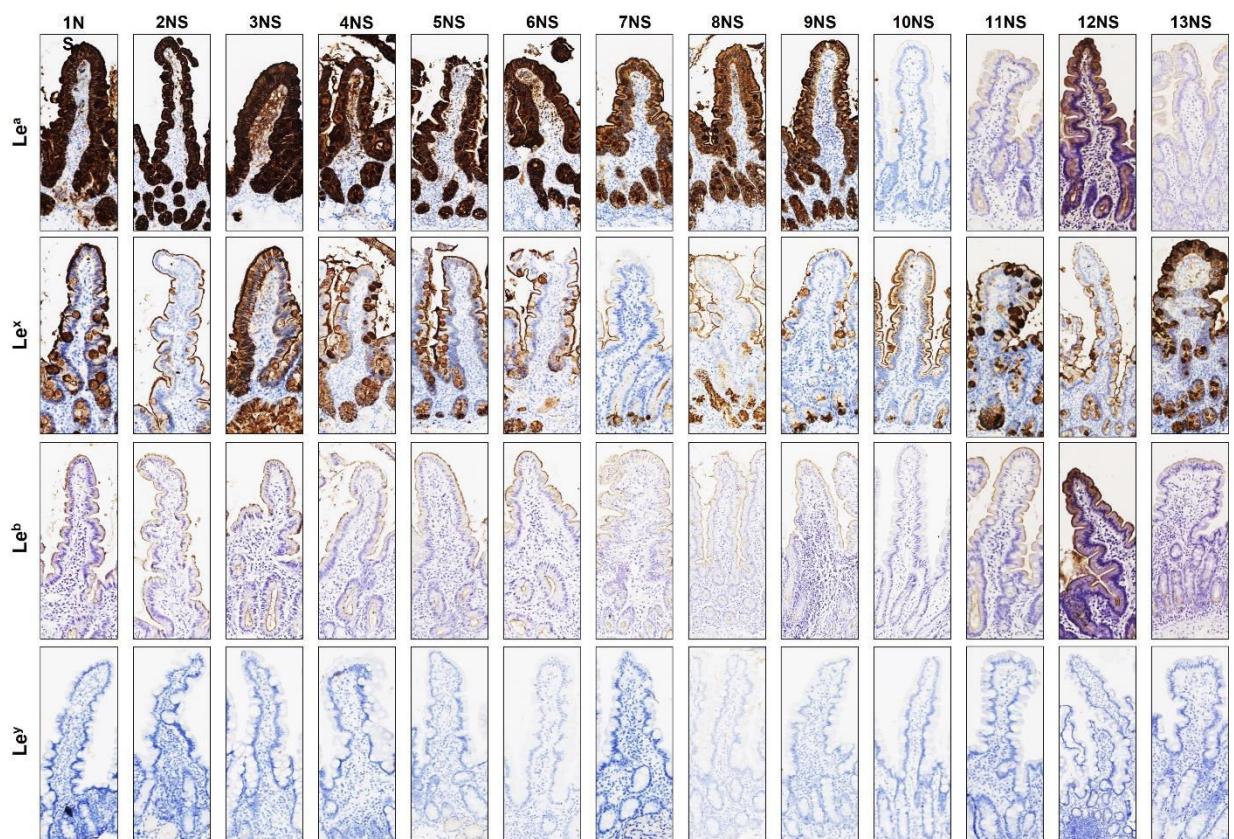


Figure 30. Détection immunohistochimique des antigènes Le^a, Le^x, Le^b, Le^y sur coupes histologiques de duodénum sain des 13 sujets non-sécréteurs. Le numéro de l'échantillon est indiqué en haut de chaque colonne. Les antigènes détectés sont indiqués à gauche de chaque ligne. Les marquages antigéniques positifs apparaissent de couleur marron sur les images. L'ensemble des clichés ont été réalisées au grossissement X100.

2. Caractérisation des récepteurs des VLP du duodénum sain de sujets non-sécréteurs

A l'aune de nos résultats, des expérimentations d'inhibition d'accroche réalisées sur des coupes histologiques dérivées des échantillons des patients 3NS, 11NS et 12NS ont permis d'étudier le rôle des antigènes Lewis dans la reconnaissance des VLP sur le duodénum sain des sujets non-sécréteurs (**Figure 31**). L'exiguïté du matériel biopsique utilisé n'a pas permis de réaliser les expérimentations de compétition sur des coupes sériées, issues du même échantillon. Pour l'échantillon du patient 3NS, la préincubation des coupes histologiques avec 50 µg d'anticorps anti-Le^a, seul ou couplé à l'anticorps anti-Le^x a fortement inhibé la détection des VLP GII.4, tandis que la préincubation des anticorps anti-Le^x n'a pas montré d'inhibition de l'accroche des VLP GII.4. Des résultats identiques ont été observés par préincubation des anticorps anti-Le^a seuls ou couplés à l'anticorps anti-Le^b sur les échantillons 11NS et 12NS, préalablement à la détection des VLP des souches Kawasaki 308 (GII.17) et SW4 (GII.3), respectivement. La préincubation de l'anticorps anti-Le^b n'a pas permis d'inhiber la détection des VLP des souches Kawasaki 308 et SW4. Nos expérimentations ont mis en évidence le rôle pivot de l'antigène Le^a dans la reconnaissance des VLP dérivées des norovirus GII.4, GII.3 et GII.17 chez les sujets non-sécréteurs, que ce soit au niveau de l'intestin grêle ou de la salive. Les discordances d'accroche observées sur salives et le duodénum sain suggèrent que ces variations sont dépendantes des niveaux d'expression des antigènes Le^a, Le^b et Le^x, et des affinités d'accroche des différentes souches étudiées. Cela suggère également que l'attachement ou l'absence de reconnaissance des VLP sur des échantillons salivaires ne reflète pas nécessairement les conditions physiologiques rencontrées au niveau de l'intestin pour l'interaction des norovirus avec les HBGA. Nos résultats laissent donc supposer que les biopsies duodénales reflètent plus la réalité physiologique. L'étape suivante a consisté à éclairer le rôle de ces ligands sur les tissus inflammatoires du patient MICI non-sécréteur (patient 14NS).

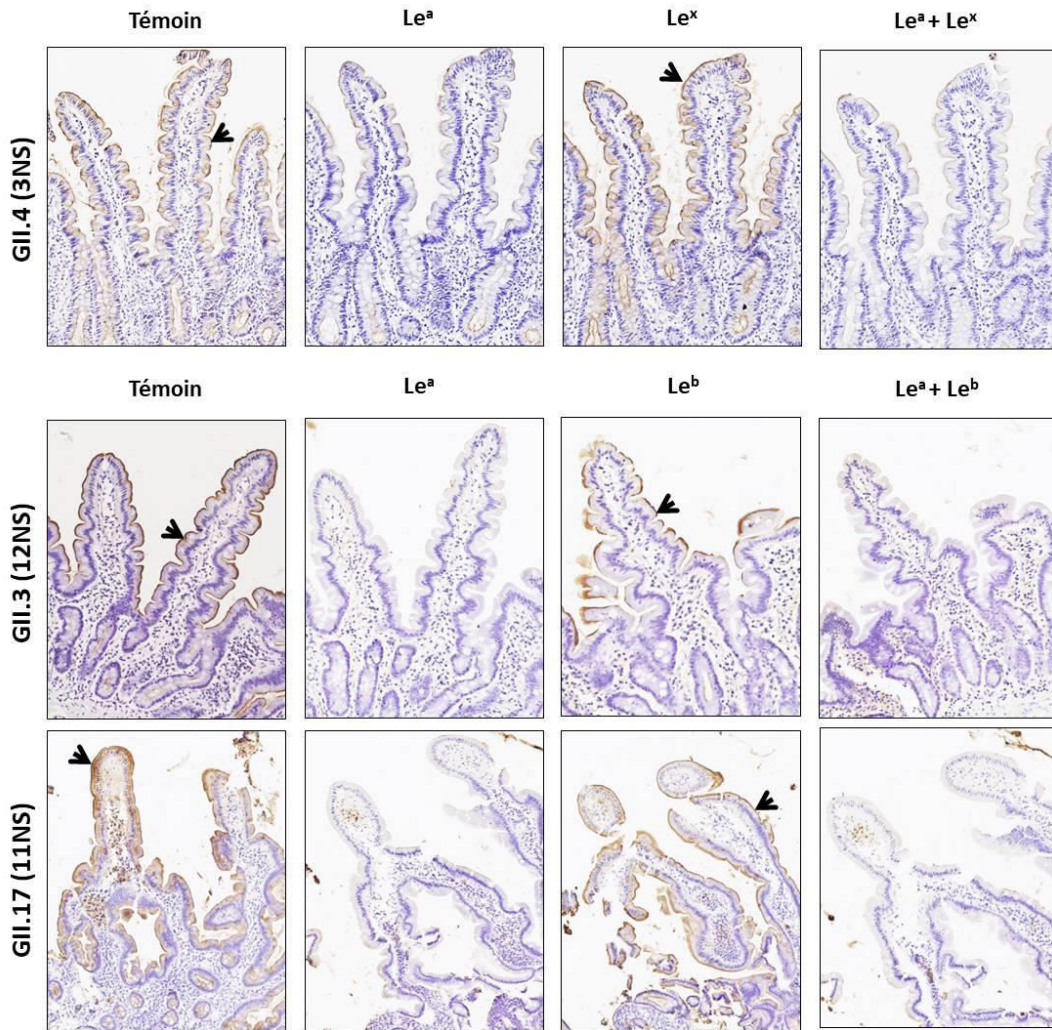


Figure 31. Compétitions d'accroche des VLP sur coupes histologiques de duodénum sain des échantillons correspondant aux patients 3NS, 11NS et 12NS. Les coupes histologiques ont été préincubées avec des anticorps anti- Le^a, anti-Le^x ou anti-Le^b, couplés ou non, suivie d'une incubation des VLP GII.4, GII.3 ou GII.17. Les témoins et anticorps préincubés pour les expérimentations réalisées sont indiqués en haut de chaque colonne. La VLP détectée est indiquée à gauche de chaque ligne. L'échantillon utilisé est indiqué entre parenthèses à gauche de chaque ligne. Les marquages antigéniques positifs apparaissent de couleur marron sur les images (flèches). L'ensemble des images ont été réalisées au grossissement X100.

D. Reconnaissance des VLP et détection des HBGA chez un sujet non-sécréteur souffrant de RCH

Après la caractérisation des HBGA de muqueuses duodénales saines d'individus non-sécréteurs et l'étude des interactions des VLP de trois génotypes de norovirus, nous avons ensuite caractérisé l'accroche des VLP et l'expression des HBGA sur les MQ et ML d'un patient non-sécréteur souffrant de RCH (patient 14NS) (**Tableau 8**). Des expériences de compétition d'attachement des VLP ont permis de caractériser les récepteurs des norovirus humains en muqueuse quiescente et lésionnelle chez ce patient.

1. Accroche VLP et détection HBGA en zones de MQ

L'analyse de l'accroche des VLP et la détection des HBGA ont été d'abord réalisées sur l'iléon, le côlon proximal, le côlon distal et l'appendice en MQ (**Figure 32 et 33**). Nous avons observé que les VLP des trois génotypes interagissaient avec la muqueuse iléale alors que l'antigène B n'était pas exprimé au niveau de celle-ci (**Figure 32**). A l'inverse, l'iléon exprime fortement les antigènes Le^a, Le^x et Le^b, ainsi que l'antigène sLe^a au niveau des cellules caliciformes des villosités (**Figure 33**). Les antigènes Le^y et sLe^x ont été focalement détectés au niveau des cryptes iléales (**Figure 33**). Les VLP GII.4 et GII.17 ont également été détectées au niveau de l'appendice en l'absence d'expression de l'antigène B (**Figure 32 et 33**). Les cryptes de l'appendice expriment fortement les antigènes Le^a, Le^x et Le^b, ainsi que l'antigène sLe^a au niveau des cryptes superficielles (**Figure 33**). Les expériences réalisées sur côlon proximal et distal ont montré une accroche isolée, uniquement des VLP GII.4, limitée aux cryptes basales dans le côlon distal (**Figure 32**). Le côlon proximal et le côlon distal expriment ainsi les antigènes Le^a, Le^x et Le^b, ainsi que l'antigène sLe^a au niveau des cryptes superficielles pour le côlon proximal, alors que le côlon distal exprime sLe^a et sLe^x au niveau des cryptes basales (**Figure 33**). La détection de l'antigène Le^b dans l'iléon de ce sujet non-sécréteur s'explique par une réaction croisée du clone 2-25LE avec le motif Le^a, comme décrit dans la littérature (Good et al., 1992). La faible intensité des immunomarquages avec l'anticorps anti-Le^b a été alors considérée comme négative.

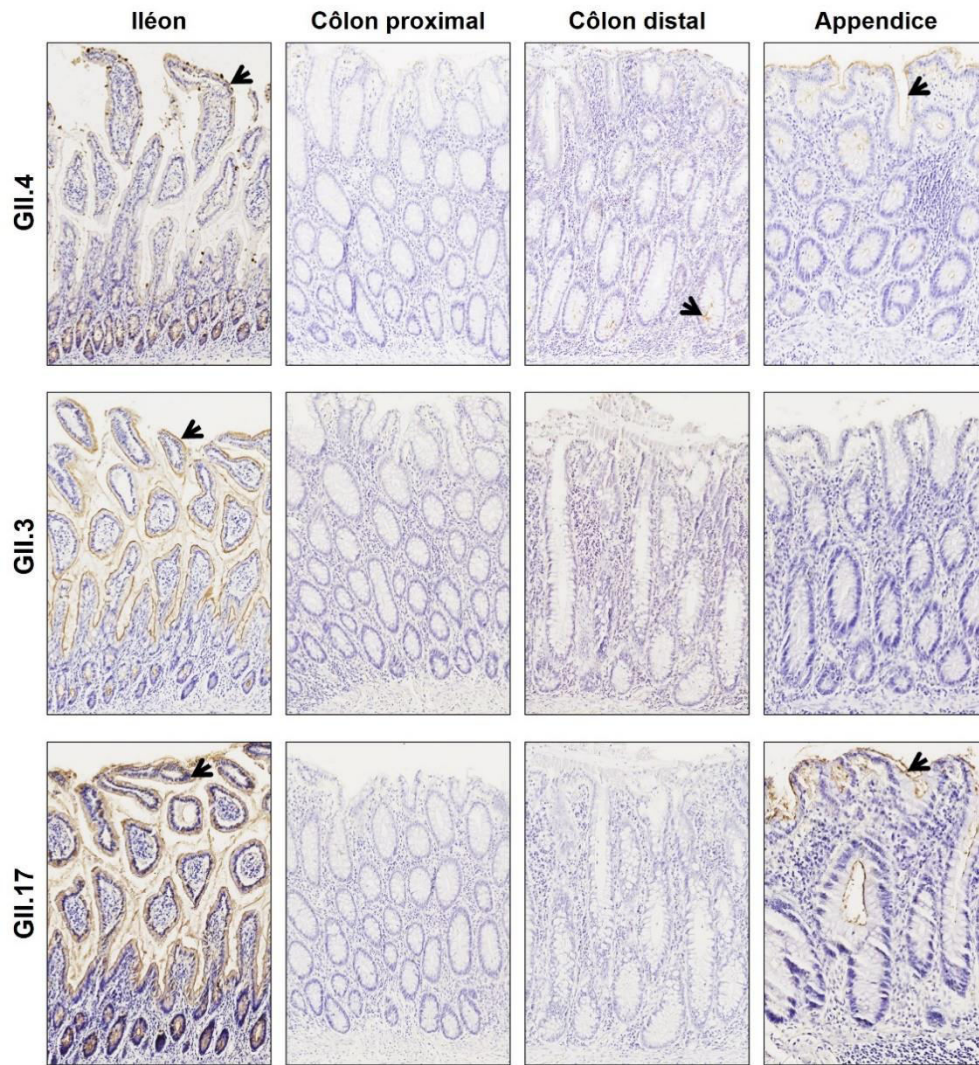


Figure 32. Interactions des VLP GII.4 (variant Osaka 2007), VLP GII.3 (souche SW4), VLP GII.17 (variant Kawasaki 308) sur coupes histologiques en zones de MQ d'iléon, côlon proximal, côlon distal et appendice du patient 14NS. Le site anatomique d'origine de chaque échantillon de tissu est indiqué en haut de chaque colonne. La détection des VLP est indiquée par un marquage de couleur marron (flèches). L'ensemble des images ont été réalisées au grossissement X100.

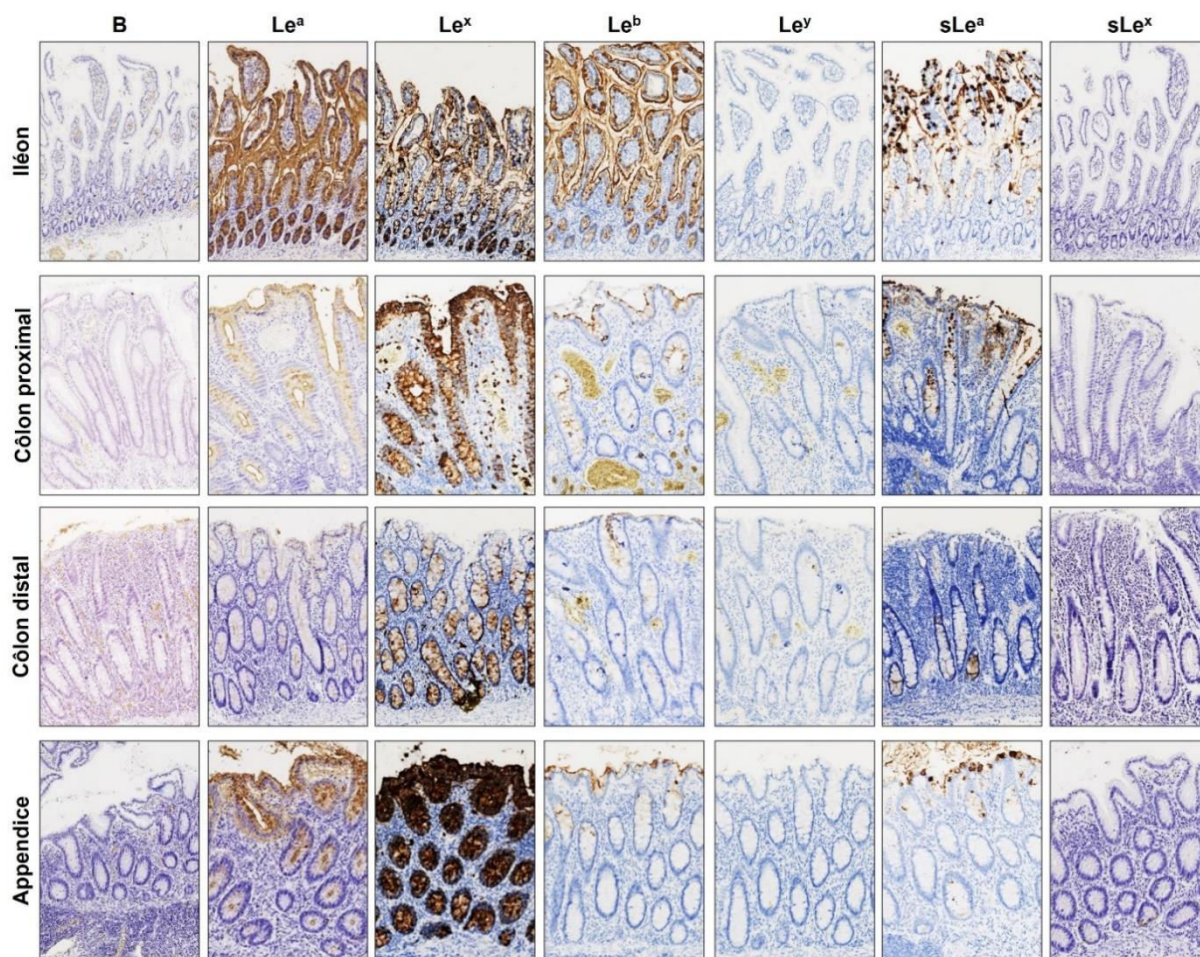


Figure 33. Détection immunohistochimique des antigènes B, sLe^a, sLe^x, Le^a, Le^x, Le^b, Le^y sur coupes histologiques en zones de MQ d'iléon, côlon proximal, côlon distal et appendice du patient 14NS. Le site anatomique d'origine de chaque échantillon de tissu est indiqué à gauche de chaque ligne. Les antigènes détectés sont indiqués en haut de chaque colonne. Les marquages antigéniques positifs apparaissent de couleur marron. L'ensemble des images ont été réalisées au grossissement X100.

2. Accroche VLP et détection HBGA en zones de ML

Afin de caractériser les ligands interagissant avec les norovirus en zones inflammatoires chez le patient 14NS, nous avons étudié l'attachement des VLP et l'expression des HBGA en ML sur des échantillons de côlon proximal et transverse (**Figure 34**). L'accroche des VLP s'est avérée importante pour les VLP GII.4 et GII.17, alors que nous n'avons observé aucune interaction des VLP GII.3 avec les ML pour les échantillons de côlon proximal et transverse (**Figure 34**). Ces observations ont suggéré que l'accroche des VLP sur la ML dépend du génotype, de manière similaire à ce que nous avons observé chez les sujets sécréteurs souffrant de MICI. Les zones de ML expriment fortement les antigènes Le^a, Le^x, et plus modérément les antigènes sLe^a et sLe^x, et cela de manière similaire pour le côlon proximal et transverse (**Figure 35**). Nos observations suggèrent que l'attachement des VLP sur la ML dépend donc du génotype de norovirus chez les sujets non-sécréteurs. Nos observations suggèrent également

que l'expression antigénique n'est donc pas dépendante du phénotype sécréteur ou non-sécréteur mais des altérations histologiques liées à l'inflammation et à la régénération cellulaire.

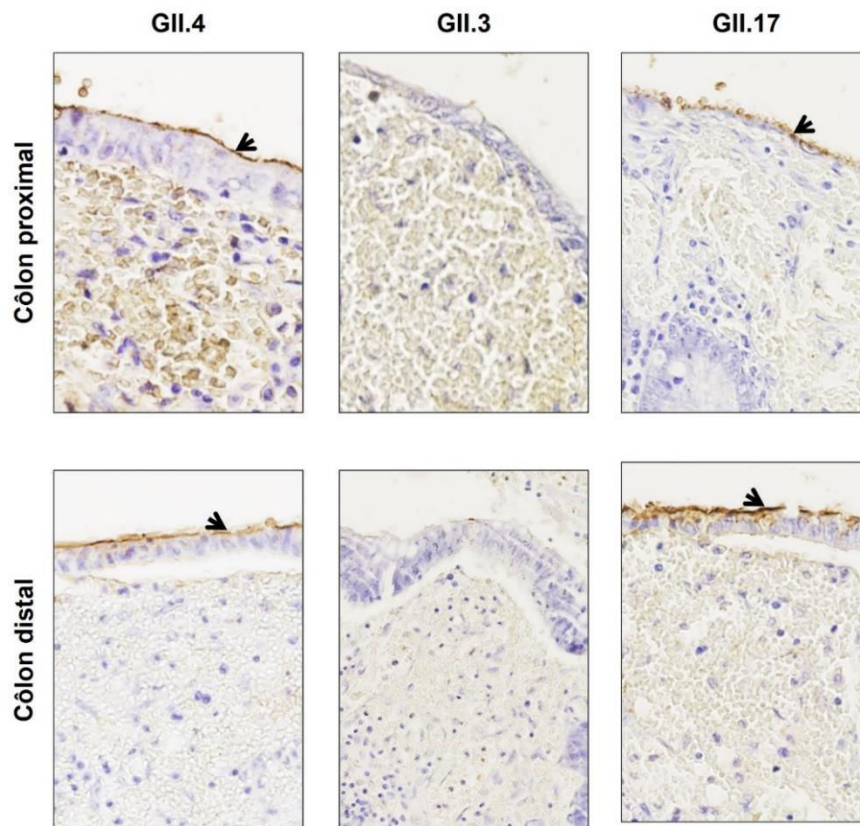


Figure 34. Interaction des VLP GII.4, VLP GII.3, VLP GII.17 sur coupes histologiques en zones de ML de côlon proximal et distal du patient 14NS. Le site anatomique d'origine de chaque échantillon de tissu est indiqué à gauche de chaque ligne. Les VLP détectées sont indiquées en haut de chaque colonne. La détection des VLP est indiquée par un marquage de couleur marron (flèches). L'ensemble des images ont été réalisées au grossissement X400.

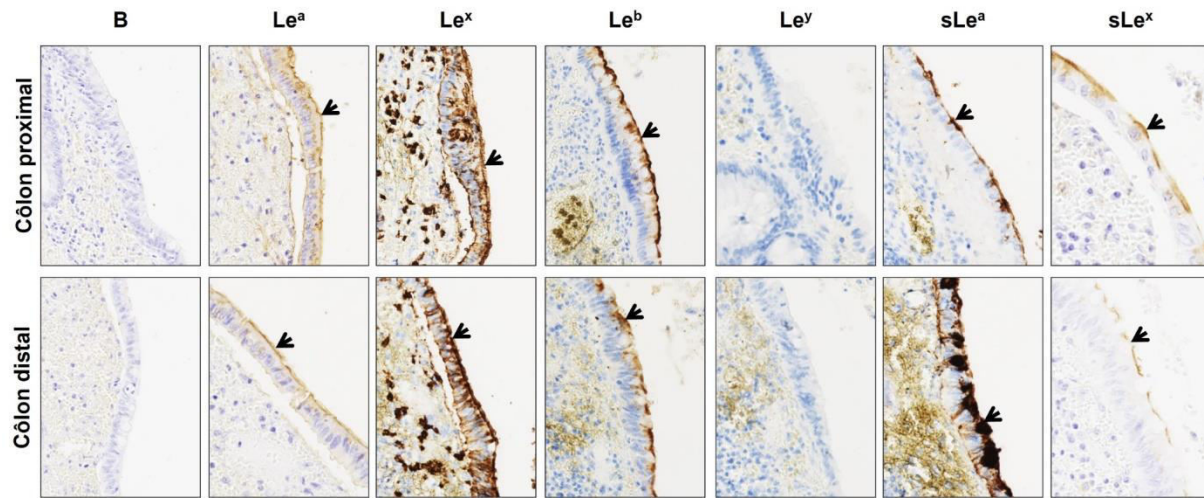


Figure 35. Détection immunohistochimique des antigènes B, sLe^a, sLe^x, Le^a, Le^x, Le^b, Le^y sur coupes histologiques en zones de ML de côlon proximal et distal du patient 14NS. Le site anatomique d'origine de chaque échantillon de tissu est indiqué à gauche de chaque ligne. Les antigènes détectés sont indiqués en haut de chaque colonne. Les marquages antigéniques positifs apparaissent de couleur marron (flèches). L'ensemble des images ont été réalisées au grossissement X400.

3. Expérimentations de compétition en zones de muqueuse lésionnelle

Afin de caractériser plus en détail les récepteurs responsables de l'accroche des VLP en ML, des expérimentations de compétition ont été réalisées grâce à la préincubation d'anticorps monoclonaux anti-Le^a et anti-Le^x, sur coupes histologiques de côlon transverse. La préincubation d'anticorps anti-Le^a sur les coupes histologiques de côlon distal a totalement inhibé l'attachement des VLP GII.4 et GII.17 en zones de ML, alors que la préincubation des anticorps anti-Le^x n'a pas altéré l'attachement des VLP par la ML (**Figure 36**). Nos observations démontrent donc que l'antigène Le^a est responsable de l'attachement des norovirus humains sur la ML non seulement chez cet individu non-sécréteur mais quel que soit le phénotype sécréteur ou non-sécréteur de patients souffrant de MICI.

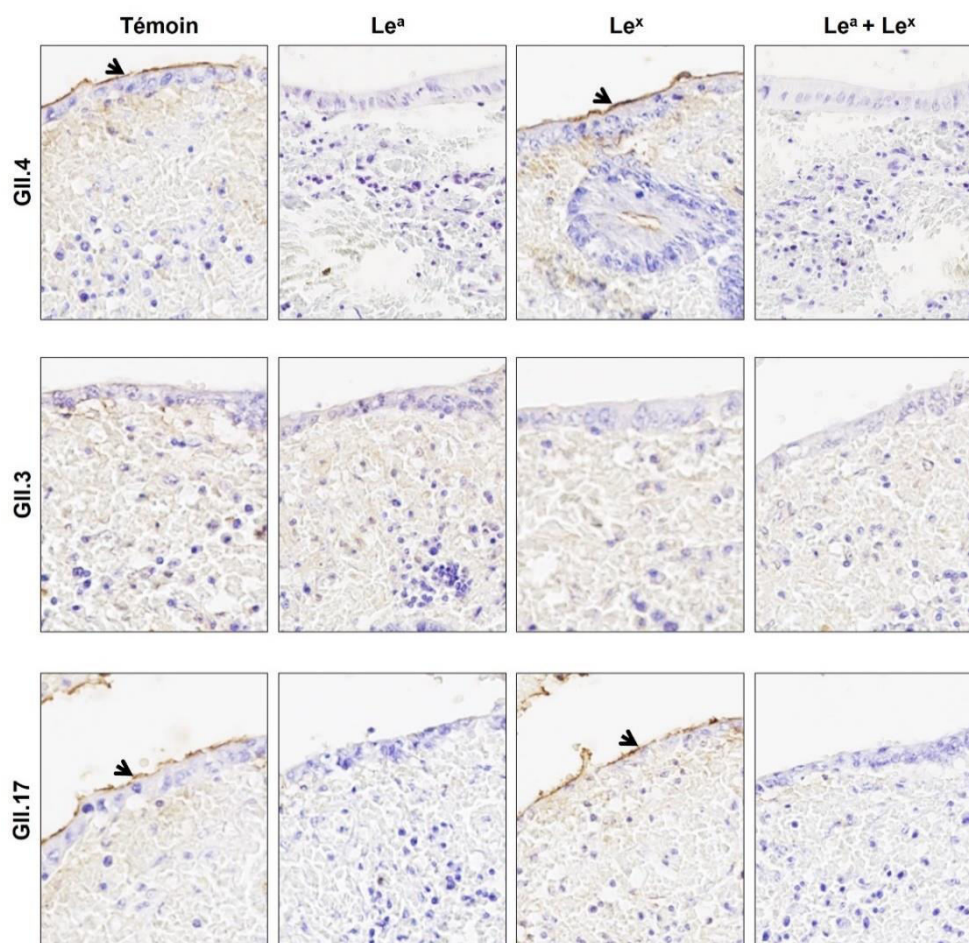


Figure 36. Compétition sur coupes histologiques en zones de ML de côlon distal du patient 14NS. Les coupes histologiques ont été préincubées avec des anticorps anti- Le^a, anti-Le^x, couplés ou non, suivie d'une incubation des VLP GII.4, GII.3 ou GII.17. Les anticorps utilisés sont indiqués en haut de chaque colonne. Le génotype des VLP est indiqué à gauche de chaque ligne. L'échantillon utilisé est indiqué entre parenthèses à gauche de chaque ligne. Les marquages antigéniques positifs sont de couleur marron (flèches). L'ensemble des images ont été réalisées au grossissement X400.

E. Commentaire sur les interactions des norovirus humains sur les tissus intestinaux de sujets non-sécréteurs

Nous avons démontré que les VLP GII.4, GII.3 et GII.17 s'accrochent sur la muqueuse de l'intestin grêle de sujets non-sécréteurs. L'étude des interactions des norovirus humains avec les tissus intestinaux de sujets non-sécréteurs a été rarement abordée. En contexte épidémique, les prélèvements de salive faciles à réaliser sont restés un standard dans la compréhension du pouvoir infectieux des norovirus humains et des interactions avec les HBGA d'un point de vue moléculaire. L'obtention de prélèvements biopsiques intestinaux en contexte épidémique demeure difficile, voire impossible, eu égard aux contraintes réglementaires et à la rareté relative des non-sécréteurs

dans la population. Le développement récent des systèmes de culture des norovirus humains à l'aide des HIO constitue une avancée majeure dans l'étude des norovirus. Cette technologie permettrait de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents à l'accroche et à la réplication des norovirus humains chez des sujets non-sécréteurs. Il a été aussi démontré que la réplication des norovirus GII.4 est restreinte aux HIO dérivés de patients sécréteurs, sous le contrôle du gène *FUT2* (Costantini et al., 2018b; Haga et al., 2020). A l'inverse, il a été démontré que la réplication du GII.3 est compatible avec les HIO dérivés de sujets non-sécréteurs (Ettayebi et al., 2016; Zhang et al., 2017b). Dans nos travaux, l'objectif principal a été de déterminer dans un premier temps les interactions des norovirus humains avec l'intestin grêle sain de sujets non-sécréteurs, à l'aide de VLP dérivées des génotypes GII.3, GII.4 et GII.17. Dans une étude précédente, il a été observé l'absence d'accroche des VLP GII.3 sur des salives de patients non-sécréteurs pourtant infectés par ce génotype, en contradiction avec nos travaux réalisées sur les coupes de duodénum de sujets non-sécréteurs. Nos observations démontrent que les VLP GII.3 dérivées de la souche SW4 mais aussi les GII.17 pourraient effectivement infecter les non-sécréteurs en contexte épidémique. Cela confirmerait les résultats obtenus avec les HIO. Nous avons alors initialement formulé l'hypothèse que des ligands différents des HBGA, absents dans la salive, seraient impliqués dans la reconnaissance des norovirus GII.3 par les entérocytes chez les sujets non-sécréteurs. Nos observations démontrent que les VLP GII.3 s'accrochent sur l'antigène Le^a exprimé par le duodénum sain des sujets non-sécréteurs. Toutefois, certains patients ont également présenté des profils d'accroche négatifs au niveau du duodénum sain, n'exprimant pas l'antigène Le^a. Il est concevable que des niveaux d'expression différents de l'antigène Le^a expliquent les différences d'accroche des norovirus humains chez les non-sécréteurs au niveau de l'intestin grêle. Des variations des niveaux d'expression du gène *FUT3* au sein des populations pourraient ainsi expliquer les différences d'expression de l'antigène Le^a, dont le rôle pivot dans l'accroche des norovirus humains a été démontré en contexte sain chez les non-sécréteurs, mais également en contexte inflammatoire chez les patients souffrant de MICI, indépendamment du phénotype sécréteur ou non-sécréteur.

Ces données reflètent les importantes discordances entre les profils d'accroche sur les salives de sujets de phénotype non-sécréteur et les interactions observées sur les cellules intestinales. Ces discordances ont déjà été rapportées dans la littérature, en inhibant l'attachement des VLP sur des cellules Caco-2 par l'utilisation d'anticorps monoclonaux spécifique des antigènes Lewis

(Carmona-Vicente et al., 2016). Les essais d'accroche des norovirus humains sur salive ne reflètent donc pas entièrement les interactions des norovirus humains au niveau du tube digestif. L'accès à l'antigène Le^a et l'abondance de cet antigène pourraient expliquer les résultats très variables entre salive et coupes histologiques. Des différences de conformation et d'abondance des sucres sur les cellules intestinales par rapport aux salives pourraient donc expliquer les différences d'accroche des VLP.

Nous avons également démontré que le variant Osaka/2007 pourrait interagir avec les salives de sujets non-sécréteurs. Ces résultats sont contradictoires avec les essais de mise en culture des norovirus GII.4 sur les HIO, qui démontrent l'absence d'accroche du variant Osaka/2007 au niveau des HIO, mais la présence d'une accroche et de la réplication des norovirus GII.3 et GII.17 sur les HIO dérivés de sujets sécréteurs et non-sécréteurs (Haga et al., 2020; Lindesmith et al., 2020; Zhang et al., 2017b). Nous avons également démontré que les VLP GII.4 et GII.17 accrochent les zones de muqueuse régénérative du patient 14, souffrant de RCH. La ramification des sucres, la quantité et la disponibilité des HBGA pourraient, là aussi, varier de manière significative et donc modifier les profils d'accroche des norovirus humains au niveau des muqueuses régénératives, où la composition des mucines apparaît simplifiée, s'associant souvent à une augmentation des niveaux d'expression du gène *FUT3* (Brazil et al., 2013).

De plus, l'expression faible pan-colique de l'antigène Le^a dans le côlon par rapport à l'intestin grêle pourrait expliquer pourquoi la muqueuse duodénale saine interagit avec les VLP GII.17 et GII.3, alors que les VLP GII.3 n'interagissent pas avec la muqueuse du côlon proximal ou distal, où l'expression de Le^a est plus faible, par une activité plus faible de l' α 3/4-fucosyltransférase et de faibles niveaux d'expression du gène *FUT3*. Des études réalisées sur différentes populations Asiatiques, Américaines et Européennes ont montré qu'il existe de nombreux polymorphismes du gène *FUT3*, expliquant alors d'importantes variations d'expression des antigènes Le^a et sLe^a au niveau des globules rouges (Cakir et al., 2002; Liu et al., 1999). Des études complémentaires de populations, comparant les profils d'accroche des VLP dérivées de norovirus humains sur salives et tissus intestinaux provenant des mêmes patients, pourraient permettre d'améliorer la compréhension des mécanismes sous-jacents à ces différences d'accroche des norovirus humains. De plus, l'interrogation d'une base de données de génétique des populations, couplée au recueil d'échantillons tissulaires intestinaux au sein des archives de différents laboratoires d'anatomie pathologique, permettrait alors de préciser les profils d'accroche des VLP dérivées de norovirus

humains, et donc de mieux comprendre les profils d'interaction des norovirus humains avec la muqueuse de l'intestin grêle en fonction de l'expression des gènes *FUT2* et *FUT3*.

Nous avons également démontré que les VLP GII.4, et GII.17 accrochent les zones de muqueuse régénérative des sujets non-sécréteurs, de manière identique aux sujets sécréteurs, mais également pour les MC et les RCH. De précédentes études ont souligné le lien épidémiologique entre le statut non-sécréteur et l'apparition des MICI (Hu et al., 2016b; McGovern et al., 2010b). Dans nos travaux, un seul sujet non-sécréteur a été dépisté sur l'ensemble des échantillons sélectionnés. Des études de populations combinant l'étude des variations génétiques des gènes *FUT2* et *FUT3* et des interactions des norovirus humains avec les tissus intestinaux chez les sujets atteints de MICI sur une population de plus grande ampleur permettraient de confirmer ou d'infirmer ce lien entre phénotype non-sécréteur et MICI.

CONCLUSIONS

Dans nos travaux, nous avons démontré que les ligands impliqués dans l'accroche des norovirus humains chez les non-sécréteurs et chez les patients souffrant de MICI sont le fait de la surexpression de l'antigène Le^a. L'utilisation de VLP dérivées de norovirus humains de génotype GII.4, GII.3 et GII.17 sur les tissus intestinaux a permis de démontrer que l'accroche des norovirus est dépendante du génotype, du sous-type cellulaire, des altérations cellulaires et de la localisation anatomique dans le tube digestif. Des variations d'expression des gènes *FUT2* et *FUT3*, et par conséquent des niveaux d'activité des α 1,2 et α 3,4 fucosyltransférases au niveau cellulaire sont à l'origine de variations d'expression des antigènes ABH(O) et Lewis. La diversité antigénique des HBGA expliquerait alors les variations d'accroche des norovirus humains, en contexte sain et inflammatoire, que ce soit chez les sujets sécréteurs ou non-sécréteurs. Nous avons démontré que la reconnaissance des norovirus humains était possible dans un contexte inflammatoire. De façon surprenante, elle concernait aussi bien l'intestin grêle, lieu habituel de réplication des norovirus, que le côlon. Les mêmes acteurs antigéniques participent à l'attachement des norovirus, principalement l'antigène Le^a, que ce soit chez des sujets atteints de RCH ou de MC, qu'ils soient sécréteurs ou non-sécréteurs. Les faits expérimentaux relevant du travail à la paillasse restent évidemment à confirmer d'un point de vue clinique. Au stade d'avancement de nos travaux, le devenir des particules virales interagissant avec les tissus inflammatoires est inconnu. Nous ne savons pas, par exemple, si la reconnaissance des VLP par les tissus régénératifs est suivie d'une internalisation du virus et de sa réplication. Il se peut également que l'attache des norovirus aux tissus inflammatoires ne soit pas suivie de la réplication du virus. En revanche, cette interaction pourrait être un facteur perturbateur de la réponse immunitaire aggravant la réponse inflammatoire. Il est maintenant démontré que les MICI se caractérisent par une dysbiose de la flore intestinale qui serait à la fois la cause et la conséquence de conflits immunitaires. Dans la plupart de ces travaux, les auteurs se sont attachés à étudier le microbiote intestinal par des techniques de séquençage haut débit et en excluant le plus souvent le virome. Il apparaît cependant que la distribution des bactériophages lors de la dysbiose est aussi modifiée. Dans ce cas, la susceptibilité aux infections virales, en particulier aux norovirus, est envisageable. Les dernières études à grande échelle sur les MICI le confirment (Axelrad et al., 2018). L'usage de plus en plus fréquent des techniques de séquençage haut débit a maintenant démontré l'existence des dysbioses de la flore

intestinale dans le cadre de ces pathologies. Il reste alors à caractériser les interactions de cette flore avec les muqueuses inflammatoires du tube digestif. A l'aune de nos travaux, l'interaction des norovirus avec les tissus inflammatoires est possible par le biais des antigènes Lewis. L'analyse du virome est alors à entreprendre dans des travaux futurs.

En dépit de la démonstration au niveau moléculaire du rôle pivot de l'antigène Le^a dans les interactions des norovirus humains avec les muqueuses digestives inflammatoires et celles de sujets non-sécréteurs, ces travaux demandent également confirmation. Tout d'abord, nous avons démontré la variabilité d'accroche des VLP dérivées de certaines souches ou variants de norovirus humains, de génotypes GII.3, GII.4 et GII.17. L'extrapolation à d'autres génotypes ou génogroupes, comme les norovirus GI, demeure alors difficile en l'absence de VLP. L'accroche des VLP sur coupes histologiques est un modèle « figé » où les processus dynamiques d'interaction des virus avec les cellules intestinales, comme par exemple l'action de médiateurs chimiques antiviraux tels que l'IFN γ ne sont pas pris en compte. L'étude d'éventuels corécepteurs pouvant participer à l'accroche virale n'a pas été réalisée dans ces travaux. Le faible recrutement de patients n'a pas permis d'établir de relation statistiquement significative entre l'occurrence d'une MICI ou d'un phénotype non-sécréteur et des perturbations d'accroche des VLP. L'échantillonnage sélectif réalisé pour chaque organe issu de régions anatomiques différentes pourrait également être un biais dans la réalisation de nos expérimentations. Enfin, nous n'avons recherché que la mutation G428A du gène *FUT2*, qui est la plus fréquente chez les non-sécréteurs issus de populations européennes et méditerranéennes. D'autres polymorphismes des gènes *FUT2* et *FUT3* sont aussi susceptibles d'influencer l'expression des HBGA.

Plusieurs perspectives d'axes de recherche peuvent découler de nos travaux. Tout d'abord à travers la découverte des sites d'accroche des norovirus humains au niveau du côlon et du rectum inflammatoire, l'étude de la réplication des norovirus humains au niveau des tissus inflammatoires et régénératifs pourrait alors être réalisée chez des patients atteints de MICI sévères, sous traitements immunosuppresseurs, potentiellement porteurs d'infections asymptomatiques à norovirus. Cette étude nécessiterait l'utilisation de tissus de patients atteints de MICI, porteurs d'une infection à norovirus. L'étude de la répartition des populations inflammatoires au niveau tissulaire pourrait également être réalisée, afin de déterminer si l'accroche des norovirus humains sur les antigènes sLe^x et sLe^a, ligands intervenant dans l'adhésion leucocytaire au cours des MICI,

jouerait un rôle dans la réponse inflammatoire et la polarisation lymphocytaire (Mann and Li, 2014). L'étude de la perturbation de la voie de signalisation Wnt-APC- β caténine, et du TGF- β , impliqués dans la régénération cellulaire au cours des MICI, pourrait être menée chez des sujets atteints de MICI, infectés par les norovirus humains (Koch, 2017; Miyoshi et al., 2012). Cette étude pourrait être réalisée à l'aide de tissus intestinaux provenant de ces patients, obtenus par biopsies ou résections chirurgicales. Une autre approche consisterait en l'inoculation de souches de norovirus humains sur des cultures tridimensionnelles d'organoïdes coliques dérivés de patients souffrant de MICI. Ces organoïdes coliques régénératifs dérivés de tissus de patients souffrant de MICI expriment des signaux cellulaires pro-inflammatoires et de mort cellulaire programmée (d'Aldebert et al., 2020; Qu et al., 2021). L'administration par voie endoscopique d'organoïdes coliques ou rectaux dérivés de muqueuses saines pourrait être une approche thérapeutique prometteuse dans la régénération de tissus lésés au cours des MICI (Okamoto et al., 2020). L'impact d'une potentielle infection chronique à norovirus chez un patient atteint de MICI sur la régénération épithéliale, et donc sur la rémission de la maladie, devrait alors être évalué dans le futur (Green, 2014). Le développement d'un vaccin efficace contre les norovirus humains, utilisant des VLP ou un adénovirus recombinant, devra alors faire l'objet d'une évaluation plus précise chez les sujets atteints de MICI (Esposito and Principi, 2020).

L'étude des HBGA et de l'accroche des VLP dérivées de norovirus humains dans le cadre de néoplasies ou de lésions dysplasiques pourra également constituer un nouvel axe de recherche. En effet, la démonstration de l'utilisation des VLP comme transporteurs moléculaires (« nanocarriers ») apparaît prometteuse (Nooraei et al., 2021; Rohovie et al., 2017). La surexpression des HBGA dans les processus néoplasiques comme le cancer du côlon pourrait être une cible de choix pour ces « nanocarriers » (Yuan et al., 1985b). De plus, l'expression des HBGA en contexte néoplasique, notamment des antigènes sLe^x et sLe^a, serait également un marqueur de mauvais pronostic et de dissémination métastatique dans les cancers du côlon (Dennis et al., 1999; Hakomori, 2002; Hittelet et al., 2003; Shiozaki et al., 2011). L'étude de l'expression des HBGA au cours de lésions pré-néoplasiques pourrait constituer une aide diagnostique rapide et peu coûteuse dans le diagnostic précis de ces affections (Hall et al., 1989).

Des perspectives de recherche sont également envisageables pour l'étude du pouvoir infectieux des norovirus chez les sujets non-sécréteurs. Sous réserve de l'accord d'un comité d'éthique, des

prélèvements de salive au cours d'une gastroscopie avec biopsies duodénales, pourraient permettre de comparer des profils d'accroche des VLP de manière plus fiable chez des sujets de phénotype non-sécréteur. Des études à l'échelle atomique de l'interaction des VLP dérivées de différents génotypes de norovirus humains avec les sucres constituant les motifs Lewis au niveau de la salive et du glycocalyx intestinal permettraient de mieux comprendre la dynamique des interactions des norovirus humains avec les HBGA chez les sujets non-sécréteurs. Une étude pangénomique des populations permettrait de faire le lien de ces profils d'accroche à des profils mutationnels précis pour les gènes FUT2 et FUT3. Enfin, l'étude de l'activité des α 1,2, α 1,3 et α 1,4 fucosyltransférases au niveau intestinal chez les sécréteurs et les non-sécréteurs pourrait permettre de mieux comprendre les profils d'expression des antigènes ABH(O) et Lewis. L'étude d'éventuelles modifications de la glycosylation des cellules intestinales par le microbiote intestinal, pouvant influencer la composition en HBGA des muqueuses de l'appareil digestif, paraît aussi intéressante.

Les MICI restent donc des pathologies multifactorielles complexes où microbiologie, fond génétique et système immunitaire jouent un rôle. A l'instar des agents bactériens pathogènes, les virus pourraient également influencer sur la progression de ces pathologies. Si les études épidémiologiques et virologiques sont à poursuivre, nos travaux ont souligné le rôle pivot que pouvaient jouer certains HBGA et en particulier l'antigène Le^a. L'objectif de toutes ces études est évidemment l'amélioration de la prise en charge des patients avec le développement de nouveaux outils thérapeutiques. L'administration par exemple de futurs vaccins norovirus (plus d'une dizaine de solutions vaccinales sont en cours d'évaluation) ou du vaccin rotavirus pourrait être porteuse d'espoir pour la réduction des poussées inflammatoires, souvent invalidantes chez ces patients.

ANNEXES

ANNEXE 1: "SPECIFIC NOROVIRUS INTERACTION WITH LEWIS X AND LEWIS A ON HUMAN INTESTINAL INFLAMMATORY MUCOSA DURING REFRACTORY INFLAMMATORY BOWEL DISEASE"	102
ANNEXE 2: "ENTERIC VIRUSES AND INFLAMMATORY BOWEL DISEASE"	117
ANNEXE 3 : TABLEAUX DES PROTOCOLES D'UTILISATION SUR AUTOMATE DAKO OMNIS®	131
ANNEXE 4 : AUTORISATIONS LEGALES	133

**ANNEXE 1: “SPECIFIC NOROVIRUS INTERACTION WITH LEWIS X
AND LEWIS A ON HUMAN INTESTINAL INFLAMMATORY MUCOSA
DURING REFRACTORY INFLAMMATORY BOWEL DISEASE”**



Specific Norovirus Interaction with Lewis x and Lewis a on Human Intestinal Inflammatory Mucosa during Refractory Inflammatory Bowel Disease

Georges Tarris,^a Alexis de Rougemont,^{b,c} Marie Estienney,^{b,c} Maeva Charkaoui,^d Thomas Mouillot,^d Bernard Bonnotte,^{e,f} Christophe Michiels,^d Laurent Martin,^{a,f} Gaël Belliot^{b,c}

^aDepartment of Pathology, University Hospital of Dijon, Dijon, France

^bNational Reference Centre for Gastroenteritis Viruses, Laboratory of Virology, University Hospital of Dijon, Dijon, France

^cUMR PAM A 02.102 Procédés Alimentaires et Microbiologiques, Université de Bourgogne Franche-Comté/AgroSup Dijon, Dijon, France

^dDepartment of Gastroenterology and Hepatology, University Hospital of Dijon, Dijon, France

^eDepartment of Internal Medicine and Clinical Immunology, University Hospital of Dijon, Dijon, France

^fUniv. Bourgogne Franche-Comté, INSERM, EFS BFC, UMR1098, Interactions Hôte-Greffon-Tumeur/Ingénierie Cellulaire et Génique, Dijon, France

ABSTRACT Inflammatory bowel disease (IBD), which includes Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC), is related to immunological and microbial factors, with the possible implication of enteric viruses. We characterized the interaction between human noroviruses (HuNoVs) and blood group antigens in refractory CD and UC using HuNoV virus-like particles (VLPs) and histological tissues. Immunohistochemistry was conducted on inflammatory tissue samples from the small intestine, colon, and rectum in 15 CD and 9 UC patients. Analysis of the regenerative mucosa of the colon and rectum revealed strong expression of sialylated Lewis a (sLe^a) and Lewis x (sLe^x) antigens and HuNoV VLP binding in the absence of ABO antigen expression in both UC and CD. Competition experiments using sialidase, lectins, and monoclonal antibodies demonstrated that HuNoV attachment mostly involved Le^a and, to a lesser extent, Le^x moieties on regenerative mucosa in both UC and CD. Further studies will be required to understand the implications of specific HuNoV binding to regenerative mucosa in refractory IBD.

IMPORTANCE Inflammatory bowel diseases (IBD), including Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC), are progressive diseases affecting millions of people each year. Flare-ups during IBD result in severe mucosal alterations of the small intestine (in CD) and in the colon and rectum (in CD and UC). Immunohistochemical analysis of CD and UC samples showed strong expression of known tumoral markers sialyl Lewis a (CA19.9) and sialyl Lewis x (CD15s) antigens on colonic and rectal regenerative mucosa, concurrent with strong human norovirus (HuNov) VLP GII.4 affinity. Sialidase treatment and competition experiments using histo-blood group antigen (HBGA)-specific monoclonal antibodies and lectins clearly demonstrated the implication of the Lewis a moiety and, to a lesser extent, the Lewis x moiety in HuNov recognition in regenerative mucosa of CD and UC tissues. Further studies are required to explore the possible implications of enteric viruses in the impairment of epithelial repair and dysregulation of inflammatory pathways during severe IBD.

KEYWORDS Crohn's disease, ulcerative colitis, norovirus, HBGA, inflammation, gut inflammation

Inflammatory bowel disease (IBD), which includes Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC), is a progressive gastrointestinal condition that affects millions of people worldwide. In Europe, IBD incurs health care costs totaling more than €5 billion every

Citation Tarris G, de Rougemont A, Estienney M, Charkaoui M, Mouillot T, Bonnotte B, Michiels C, Martin L, Belliot G. 2021. Specific norovirus interaction with Lewis x and Lewis a on human intestinal inflammatory mucosa during refractory inflammatory bowel disease. *mSphere* 6:e01185-20. <https://doi.org/10.1128/mSphere.01185-20>.

Editor Michael J. Imperiale, University of Michigan-Ann Arbor

Copyright © 2021 Tarris et al. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution 4.0 International license](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Address correspondence to Laurent Martin, laurent.martin@chu-dijon.fr, or Gaël Belliot, gael.belliot@u-bourgogne.fr.

Received 23 November 2020

Accepted 15 December 2020

Published 13 January 2021

year (1). CD is characterized by mucosal ulcerations involving the entire intestinal tract, while UC only affects the colon and rectum. The two diseases have similar symptoms, including abdominal pain, fatigue, diarrhea, and significant weight loss in some cases (2). Besides the fact that IBD is debilitating, patients have a greater likelihood of developing precancerous mucosal lesions (dysplasia) and cancer throughout the course of the disease. The etiology of IBD is currently not well understood, but the literature mainly suggests it is due to autoimmunity combined with environmental factors and dysbiosis of the intestinal flora (3). IBD is also characterized by a reduction in glycosylation at the surface of the epithelium (4). It has been suggested that simplified glycan structures on the lumen of the intestinal cells might increase the odds of adventitious contact between enteric pathogens and the intestinal epithelium, therefore increasing the risk of inflammation (5). Infectious diseases are a recurring problem for people with IBD because treatment increases the risk of opportunistic infections (6). Among bacterial and viral enteric pathogens, human noroviruses (HuNoVs) are one of the most common causes of gastroenteritis in all age groups, and they are responsible for 18% of gastroenteritis cases worldwide. The genus *Norovirus* belongs to the *Caliciviridae* and is divided into seven genogroups (GI to GVII). GI and GII include the HuNoVs and are subdivided into 8 (GI.1 to GI.8) and 22 genotypes (GII.1 to GII.22), respectively (7). Epidemiological surveys show that GII.4 HuNoV has been largely predominant in the world over the last two decades. There appears to be a strong correlation between the secretor phenotype and an increased susceptibility to norovirus infections in healthy individuals. So far, it is unclear whether HuNoV infections constitute a causal or an aggravating factor for IBDs (8), and there are conflicting reports about the increased detection rate of HuNoV in IBD patients. While the results of two epidemiological studies showed no correlation between HuNoV infection and CD (9), it has been hypothesized that an asymptomatic HuNoV infection may encourage a disruption in the intestinal flora, favoring the emergence of CD (10).

The natural ligands of the HuNoV are histo-blood group antigens (HBGAs). HBGAs are complex carbohydrate structures within ramified glycans that are part of mucin glycoproteins or glycolipids (11). An active *FUT2* gene, encoding the type 2-fucosyltransferase, is responsible for the expression of the A, B, and H antigens in the small intestine and in the proximal colon, defining the secretor phenotype (12, 13). This phenotype contributes to the expression of Lewis b (Le^b) and y (Le^y) antigens, provided the *FUT3* gene is active. For 20% of the European population, the *FUT2* gene is inactivated by a recessive nonsense mutation (14). The null allele defines the nonsecretor phenotype, which is characterized by the absence of A, B, H, Le^b , and Le^y antigens in mucosa and secretions. However, an active *FUT3* gene is responsible for the synthesis of Lewis a (Le^a) and Lewis x (Le^x) antigens in nonsecretor individuals.

HBGAs are displayed at the surface of enterocytes in the small intestine, mainly in the duodenal mucosa. For all but the Le^a antigen, which has a pan-colonic distribution in both secretor and nonsecretor individuals, HBGAs are found at the surface of the proximal colon but not the healthy distal colon or rectum (15–20).

The literature relative to the relationship between IBD and HBGA expression remains scarce. It seems there is no obvious correlation between the distribution of ABO antigens and CD (21). The analysis of inflammatory colonic tissues for the presence of sialyl Lewis a (sLe^a , also known as CA19.9) antigens during moderate and severe UC has shown that sLe^a molecules are absent during inactive and mildly active phases. However, the antigen is found in regenerative colonic epithelium in active UC, expressing similar markers to those observed in dysplasia (22). However, unlike dysplasia, sLe^a expression was found to be reversible in quiescent UC (19, 23). The increased risk of CD-related ileitis in individuals with nonsecretor status was recently shown in a genetic linkage study of CD cases in the European population; this association has also been suggested for IBD (21, 24, 25). For UC, several polymorphisms of the *FUT3* gene could be involved in the genesis of the disease (26).

Microbial factors are also at play, and data show that IBDs could be related to

changes in the bacterial composition of the microbiota, as exemplified by a decreased number of *Faecalibacterium prausnitzii* during flare-ups (27). The combination of these changes and the appearance of new pathogens could disrupt or exacerbate host immune response during colitis (28). However, little is known about the role of viruses. To date, we know that the bacteriophage composition changes during IBD—*Caudovirales* and *Microviridae* become predominant, while there is a bacterial impoverishment (29). Still, we are unsure whether the observed increase in bacteriophages is an aggravating factor or a consequence.

Data from murine models show that IBD-triggering factors include a combination of immunological and genetic elements, as well as the occurrence of infection. The use of cultivatable murine norovirus (MNV) in mice has shown that mucosal inflammation of the intestine is induced by viral infection if the mice are unable to produce the anti-inflammatory interleukin 10 (IL-10) cytokine (30). Additionally, as a proof of principle, Cadwell et al. have shown that the combination of genetic background and viral infection could induce structural changes in certain intestinal cells (i.e., Paneth cells), excessive inflammatory response, and Crohn's disease-like ileal disorder (31). The data from murine models suggest that similar triggering and/or aggravating factors may emerge during viral infection in humans as well. That being said, the role of the widely spread HuNoVs is still largely unknown in the context of IBD, much like the role of the expression of the HBGA natural HuNoV ligands. In the present study, we determined the putative interaction between HuNoVs and intestinal mucosa during IBD flare-ups. We focused on characterizing HBGA expression and HuNoV interaction at the surface of inflammatory tissue in samples from individuals diagnosed with UC or CD.

RESULTS

Histological observations and *FUT2* genotype. We analyzed 19 samples of resected tissue from CD patients, including samples from the ileum ($n=7$), proximal colon ($n=3$), transverse colon ($n=4$), and sigmoid ($n=2$). We also analyzed 9 samples of resected tissue from UC patients, including samples from the sigmoid colon ($n=6$) and rectum ($n=3$) (Table 1).

Preliminary histological observations ruled out discernible features of dysplasia. The mucosa samples were classified as quiescent mucosa (QM) or regenerative mucosa (RM) (Table 1). QM was characterized as mildly inflamed or healed mucosa without major architectural alterations. RM was characterized as severely inflamed mucosa with marked architectural alterations and regenerative epithelium. We determined the percentage of QM and RM for each tissue sample. In 9 CD and 3 UC samples, only QM was observed (i.e., QM 100%). In 7 CD and 3 UC samples, both QM and RM were observed. Finally, in 3 UC samples (patients 20, 22, and 24) the tissue was exclusively regenerative (i.e., RM 100%). Additionally, the nuclear proliferative marker *Ki-67* antigen was detected in proliferative niches located in the basal crypts compartment, with low levels detected in the tissue defined as regenerative mucosa (32, 33) (Fig. S1 in the supplemental material). *FUT2* genotyping was performed in order to identify secretor and nonsecretor individuals. The entire cohort belonged to the secretor genotype, including 2 homozygous and 7 heterozygous UC patients, and 9 homozygous and 6 heterozygous CD patients. No statistically significant genotype distribution was observed within the cohort (Table 1).

Norovirus binding specificity. Baculovirus-expressed synthetic virus-like particles (VLPs) were used to mimic HuNoV capsid behavior. Binding assays on healthy duodenal sections displayed VLP attachment on the apical surface of enterocytes, as previously described in physiological conditions (34) (Fig. 1). VLP binding was abolished after sodium periodate treatment, demonstrating the involvement of carbohydrates. The absence of binding using Δ D373 VLPs confirmed that the attachment of Gil.4 VLPs was HBGA-specific (Fig. 1). This observation was correlated with a strong reduction in VLP binding capacity following α 1,2 fucosidase treatment. The next objective was to determine whether there were alterations in HBGA expression in CD and UC tissues, and thereby in norovirus VLP binding.

TABLE 1 Cohort used for the study

Sample ^{a,b}	Age (gender) ^c	Pathology ^d	Anatomical site	HES stain ^e	Blood group	FUT2 genotype ^f
1	55 (M)	CD	Ileum	QM (80%)/RM (20%)	O	Sec/Sec
2	25 (F)	CD	Ileum	QM (100%)	A	Sec/Sec
3	34 (F)	CD	Ileum	QM (80%)/RM (20%)	AB	Sec/Sec
4	22 (F)	CD	Ileum	QM (100%)	A	Sec/Sec
5	25 (F)	CD	Ileum	QM (100%)	A	Sec/Sec
6	29 (M)	CD	Ileum	QM (30%)/RM (70%)	O	Sec/Sec
7	49 (F)	CD	Ileum	QM (90%)/RM (10%)	A	Sec/Sec
8	46 (M)	CD	Proximal colon	QM (100%)	O	Sec/sec
9	42 (F)	CD	Proximal colon	QM (100%)	A	Sec/Sec
10	36 (F)	CD	Proximal colon	QM (100%)	A	Sec/sec
11	32 (M)	CD	Transverse colon	QM (80%)/RM (20%)	A	Sec/sec
12	24 (F)	CD	Transverse colon	QM (100%)	B	Sec/Sec
13	26 (F)	CD	Transverse colon	QM (50%)/RM (50%)	A	Sec/sec
14	30 (F)	CD	Transverse colon	QM (100%)	A	Sec/sec
15	22 (M)	CD	Sigmoid	QM (100%)	O	Sec/sec
16	50 (F)	CD	Sigmoid	QM (90%)/RM (10%)	A	Sec/Sec
17	33 (M)	UC	Sigmoid	QM (100%)	A	Sec/Sec
18	42 (M)	UC	Sigmoid	QM (90%)/RM (10%)	O	Sec/sec
19	30 (F)	UC	Sigmoid	QM (100%)	O	Sec/Sec
20	26 (F)	UC	Sigmoid	RM (100%)	B	Sec/sec
21	47 (M)	UC	Sigmoid	QM (30%)/RM (70%)	O	Sec/sec
22	40 (F)	UC	Sigmoid	RM (100%)	A	Sec/sec
23	32 (F)	UC	Rectum	QM (100%)	A	Sec/sec
24	42 (F)	UC	Rectum	RM (100%)	O	Sec/sec
25	58 (M)	UC	Rectum	QM (60%)/RM (40%)	AB	Sec/sec

^aSamples 13 and 22, which were used for the competition experiments, are indicated in bold.

^bSamples 7 and 16 correspond to two different surgeries for the same patient at an 8-month interval.

^cAge of the patient at the time of the surgical procedure is given in years. M, male; F, female.

^dCD, Crohn's disease; UC, ulcerative colitis.

^ePercentage of mucosal surface area for each patient sample. QM, quiescent mucosa; RM, regenerative mucosa; HES, hematoxylin eosin saffron.

^fSec/sec, heterozygous secretor; Sec/Sec, homozygous secretor.

Crohn's disease. All the samples from CD patients contained QM, and 7 of these samples also included RM (10% to 70% of the total mucosal surface) (Table S1). Ileal samples strongly expressed ABO antigens, which colocalized with VLP binding for RM and QM (Fig. 2 and 3). In RM, the distribution of Lewis antigens (i.e., Le^a, sLe^a, Le^x, and sLe^x) was pan-mucosal. In QM, the presence of Lewis antigens was somewhat in contrast, i.e., Le^a, sLe^a, and Le^x were only found in goblet cells, and their distribution varied considerably from one patient to another (10% to 80% of goblet cells). sLe^x expression was limited to 5% to 10% of the basal crypts in QM.

Proximal colon samples showed pan-mucosal distribution of the ABO antigens, which correlated with pan-mucosal attachment of HuNoV VLPs. Le^a and Le^x antigens were strongly expressed in goblet cells, while only 1% to 5% of goblet cells expressed sLe^a antigens. In ileal samples characterized as QM, the sLe^x antigen was expressed in only 1% to 5% of basal crypts (Fig. 2).

In transverse colon samples, ABO antigens were weakly detected in RM (0 to 0.5%) and absent in QM (Fig. 3). Surprisingly, we did observe VLP binding to basal crypts and goblet cells in QM, while in RM there was a marked pan-mucosal distribution of VLP binding despite the absence of ABO antigens. We also observed the strong expression of Lewis and sialylated Lewis antigens in all RM mucosae. Le^a expression was restricted to goblet cells in QM (30% to 80%) except for patient 14, who showed pan-mucosal expression of the antigen. Antigen expression in goblet cells was also observed for Le^x (10% to 70%) and sLe^a (5% to 30% of goblet cells). sLe^x expression was restricted to 5% of the total mucosae, corresponding to the basal crypts.

For sigmoid samples, ABO antigens were absent in QM and poorly expressed in RM (mean 0.25%). VLP binding was observed in all RM (100%), contrasting with QM, which displayed poor VLP attachment (mean 20%) (Fig. 3). We observed strong pan-mucosal expression of the Lewis and sialylated Lewis antigens in RM. In QM, Le^a and sLe^a were

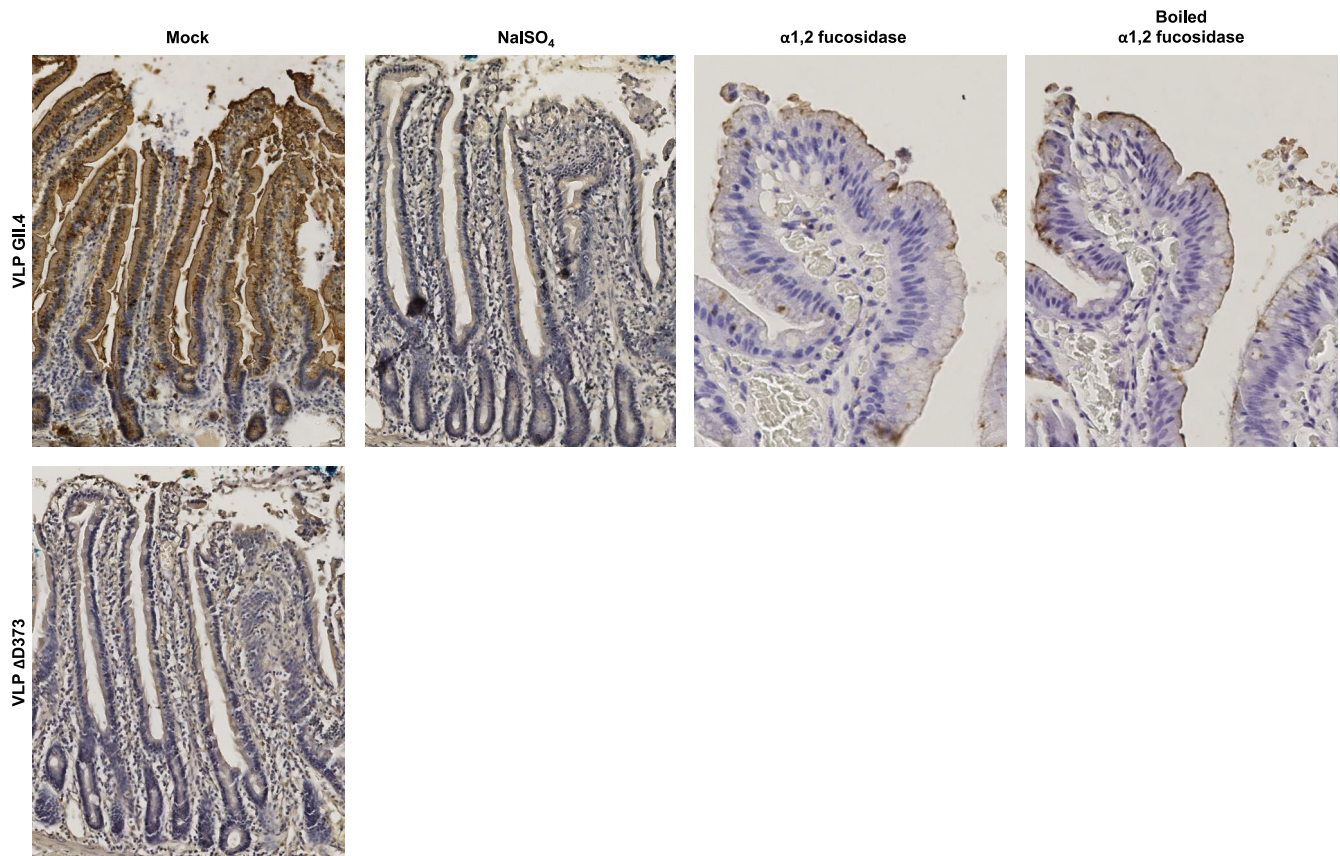


FIG 1 VLP binding specificity demonstrated in a healthy duodenal sample from a blood group A patient who underwent duodenopancreatectomy. Slides were pretreated with either 50 mM sodium periodate (NaIO_4) or α 1,2 fucosidase (boiled or cold) before incubation with HuNoV GII.4 VLP. Mutated Δ D373 GII.4 VLPs were used as negative controls. For this experiment and the following, VLP binding was detected with GII.4 VP1-specific MAb labeled with peroxidase. Peroxidase activity was detected by colorimetry using H_2O_2 and 3,3'-diaminobenzidine (DAB), giving a brown staining. Mock and pretreatments are indicated above each image.

only expressed in goblet cells, accounting for 10% to 50% and 5% to 10% of the cells, respectively. Le^x and sLe^x expression accounted for 20% to 30% and 5% of the cells, respectively, and were mainly restricted to basal crypts.

Ulcerative colitis. The samples from the 8 UC patients contained a combination of QM and RM. Patient 17 had only QM and patient 22 had only RM. For sigmoid and rectal samples, strong VLP attachment was observed in RM while mucosal ABO expression remained absent or patchy (patients 18 and 25) (Fig. 4). VLP binding was concomitantly associated with strong expression of Le^a (50% to 100% of mucosae), sLe^a (50% to 100% of mucosae), Le^x (80% to 100% of mucosae), and sLe^x (80% to 100% of mucosae) (Table S2). In sigmoid and rectal samples with QM, VLP binding remained localized to 20% to 30% of basal crypts and also up to 60% of goblet cells (patient 18). There was a large distribution of Le^a (50% to 80%) and sLe^a (30% to 70%) in goblet cells, while expression of Le^x and sLe^x was somewhat lower in the same samples. In patients 17, 18, and 19, Le^x and sLe^x antigens were found in 10% to 30% and 5% to 20% of basal crypts, respectively. In patient 21, Le^x and sLe^x antigen expression was restricted to 30 and 10% of goblet cells, respectively. For QM in the sigmoid, VLP binding was scattered in 5% to 10% of basal crypts (Fig. 4). Contrary to the tissues described above, there was almost no expression of Le^a and sLe^a . Inversely, 20% to 40% of the basal crypts expressed Le^x , while sLe^x expression was only 5% to 10%.

In summary, our analysis of refractory UC and CD samples shows discordant patterns of VLP binding during epithelial regeneration in the transverse colon, sigmoid, and rectum, with poor ABO antigen expression. In addition, marked VLP attachment in RM correlated with a strong expression of Lewis antigens from the ileum to the rectum.

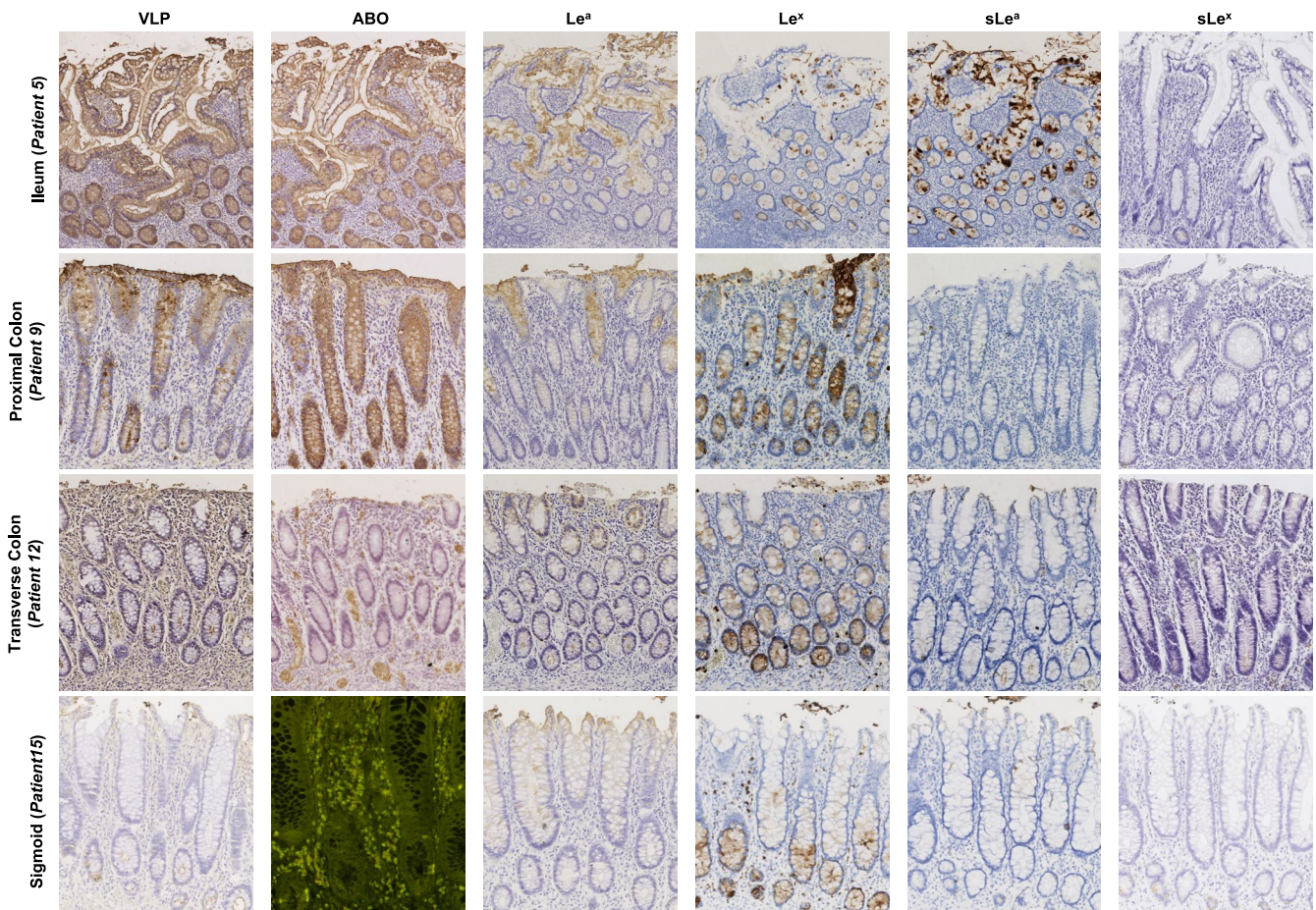


FIG 2 HBGA detection and HuNoV binding in CD ileum (patient 5), proximal colon (patient 9), transverse colon (patient 12), and distal colon (patient 15) showing quiescent mucosa. For this figure and the next two figures, blood group A, Le^a, Le^x, sLe^a, and sLe^x antigens were detected with specific Mabs in a colorimetric assay using DAB. The α 1,2 fucose moiety characterizing the H antigen was detected using fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated UEA-I lectin. Detected antigens are indicated above each column. Patient numbers and tissue sample types are indicated at the left of each row.

The CD samples from the ileum and proximal colon strongly expressed ABO antigens and showed marked VLP attachment in QM. QM from the transverse colon to the rectum did not express ABO antigens, and VLP attachment was almost exclusively located in goblet cells and basal crypts. Lewis and sialylated Lewis antigens were also present in goblet cells and basal crypts in QM. Our data suggest that other ligands might be responsible for HuNoV binding, especially in RM, where ABO antigens were absent. Previous *in vitro* studies showed that GII.4 HuNoV specifically recognizes the sLe^x antigen, with no *in vitro* recognition of Le^x or sLe^a (35). We thus hypothesized that sLe^x and/or other Lewis antigens are responsible for HuNoV binding by inflammatory tissues (36).

Characterization of norovirus attachment on regenerative mucosa. (i) Ulcerative colitis. One macrodissected sigmoid colon sample (patient 22; Table 1) was selected for further characterization of HuNoV attachment (Fig. 5). In a preliminary experiment, the removal of sialic acid moieties from the distal colon did not inhibit VLP attachment to inflammatory tissues, suggesting that the sialic acid moiety from sLe^x and sLe^a were not involved in HuNoV recognition (Fig. 5). Because ABO antigens are the main natural ligands for norovirus binding, competition experiments using specific lectins verified the role of the A and H antigens in VLP attachment. Lectins *Helix pomatia* agglutinin (HPA) and UEA-1 are specific to the A and H antigens, respectively. Control assays performed on a duodenal biopsy sample from patient 22 showed that the preincubation of sections with both lectins together abolished HuNoV GII.4 VLP binding, indicating that both lectins efficiently blocked VLP attachment to the A and H antigens (Fig. S2).

Similarly, both lectins were incubated with histological sections of the colon

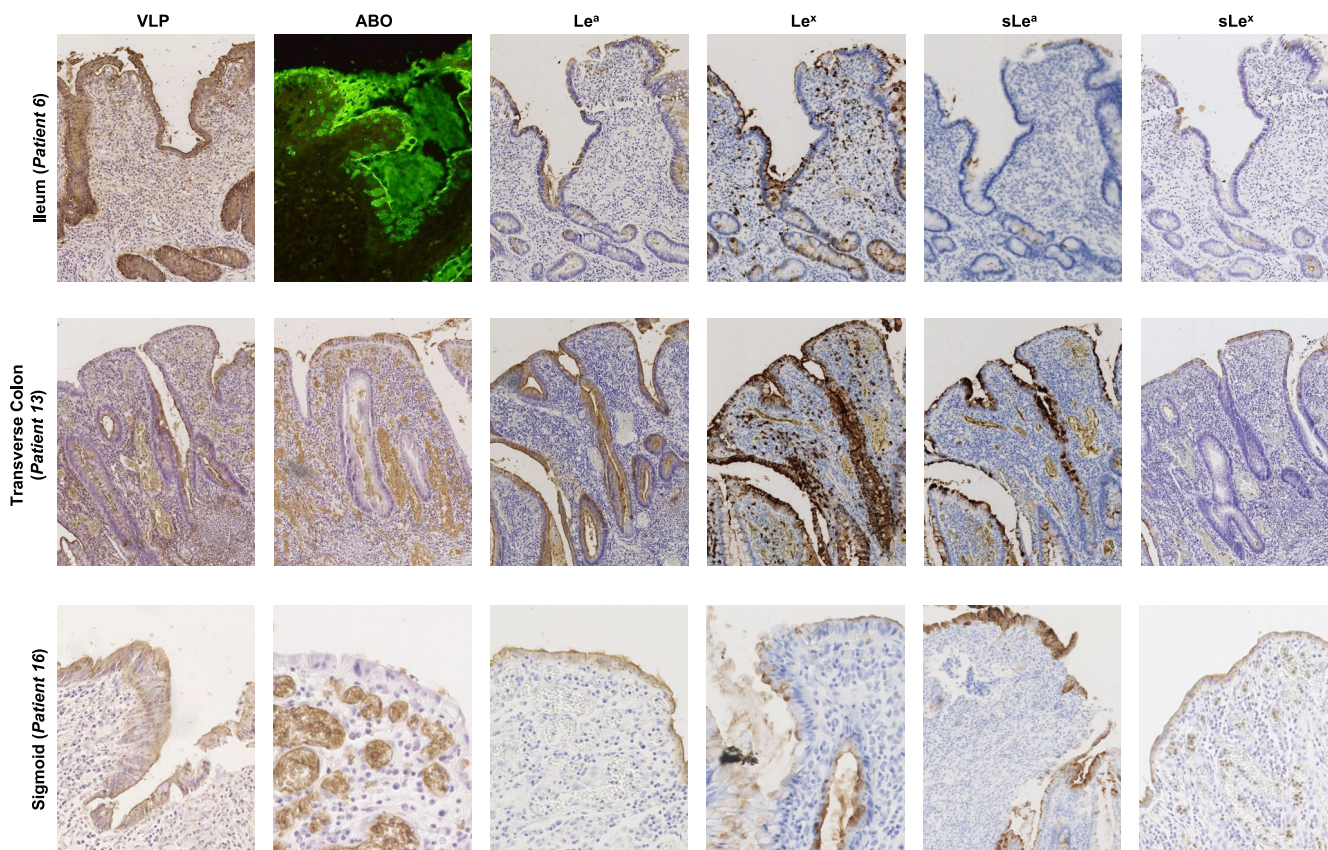


FIG 3 HBGA detection and HuNoV binding in CD ileum (patient 6), transverse colon (patient 13), and sigmoid (patient 16) showing regenerative mucosa. Detected antigens are indicated above each column. Patient numbers and tissue sample types are indicated at the left of each row.

harboring inflammatory areas. Binding assays showed that VLPs did interact with regenerative epithelium despite inhibition of the A and H antigen binding activity, proving that other ligands were also involved in HuNoV attachment. Furthermore, no VLP binding to HBGAs was observed when using $\Delta D373$ VLPs, suggesting that HBGA or HBGA-like antigens were still involved (data not shown) (37).

In order to determine the role of each antigen in HuNoV recognition, tissue sections were incubated with *H. pomatia* and *Ulex europaeus* agglutinin I (UEA-I) lectins to efficiently suppress putative A and H antigen binding activity on regenerative mucosa. *Lotus tetragonolobus* and *Aleuria aurantia* lectins were also used to inhibit VLP attachment. *L. tetragonolobus* lectin can specifically recognize Le^x antigens if the sialic acid moiety is absent (38). Therefore, tissue sections were pretreated with sialidase, then preincubated with *H. pomatia* and UEA-I lectins, and finally incubated with *L. tetragonolobus* lectin (Fig. S3). The marked VLP attachment on inflammatory areas suggested that the Le^x antigen did not play an important role in HuNoV recognition. *A. aurantia* specifically recognizes $\alpha 1,2$, $\alpha 1,3$, $\alpha 1,4$, and $\alpha 1,6$ fucose moieties and can therefore recognize Le^a and Le^x antigens (39, 40). The *A. aurantia* lectin completely inhibited VLP attachment, whereas the use of boiled lectin as a negative control was not able to inhibit HuNoV recognition (Fig. S4). Our data suggest that $\alpha 1,4$ (Le^a) and/or $\alpha 1,3$ (Le^x) fucose were the main ligands involved in HuNoV binding in regenerative mucosa in UC.

To pursue these results further, the sections were incubated either with Le^x -specific or Le^a -specific antibodies, or both, after sialidase treatment and preincubation with *H. pomatia* and UEA-I lectins (Fig. 6). Weaker VLP binding still occurred with Le^x -specific antibodies, while VLP binding was totally abolished when Le^a -specific antibodies were incubated alone or in addition to Le^x -specific antibodies (Fig. 6). We found that the Le^a antigen and to a lesser extent the Le^x antigen (alone or as part of sLe^a and sLe^x

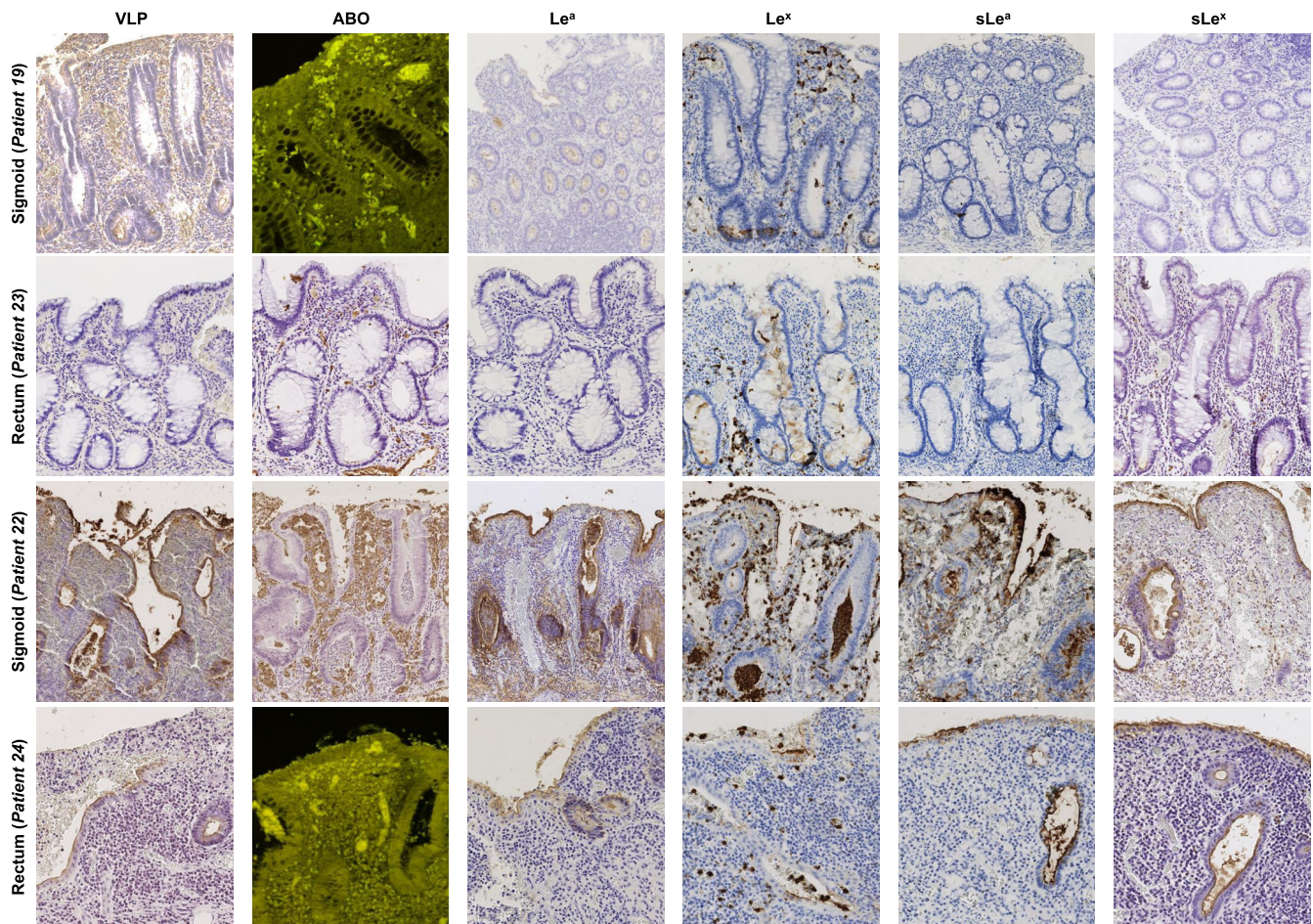


FIG 4 HBGA detection and HuNoV binding in UC colon (patient 19) and rectum (patient 23) with quiescent mucosa (QM), and sigmoid (patient 22) and rectum (patient 24) with severe inflammation and regenerative mucosa (RM). The detected antigen is indicated above the column panel. QM, RM, patient numbers, and tissue sample types are indicated at the left of each row.

molecules) were responsible for the specific recognition of HuNoV GII.4 VLP on regenerative mucosa in UC.

(ii) Crohn's disease. Data obtained from the CD group showed that regenerative mucosa strongly expressed sLe^a and sLe^x ligands, in addition to specific HuNoV GII.4 VLP binding without significant ABO antigen expression. Selective inhibition using specific antibodies and lectins helped to characterize HuNoV GII.4 VLP binding in refractory CD.

Competition experiments were performed using a macrodissected transverse colon sample for further characterization of VLP binding (patient 13, Table 1). Sialidase treatment failed to inhibit HuNoV GII.4 VLP binding, again suggesting that the sialic acid moiety was not involved in HuNoV GII.4 VLP recognition (Fig. 5). After sialidase pretreatment and incubation with *H. pomatia* and UEA-I lectins, tissue sections were incubated with Le^a-specific and Le^x-specific antibodies (individually and in combination), which abolished HuNoV GII.4 VLP binding (Fig. 6).

Our results show that HuNoV GII.4 VLPs specifically recognize Le^a and sLe^a and, to a lesser extent, Le^x antigens in regenerative mucosa during both refractory CD and UC. On the contrary, we observed poor HuNoV GII.4 VLP binding in quiescent and healthy colonic and rectal mucosa, without significant ABO expression.

DISCUSSION

The immunological aspects of inflammatory bowel syndrome (IBD) and the dysbiosis of the intestinal flora have largely been documented in the literature, yet little is

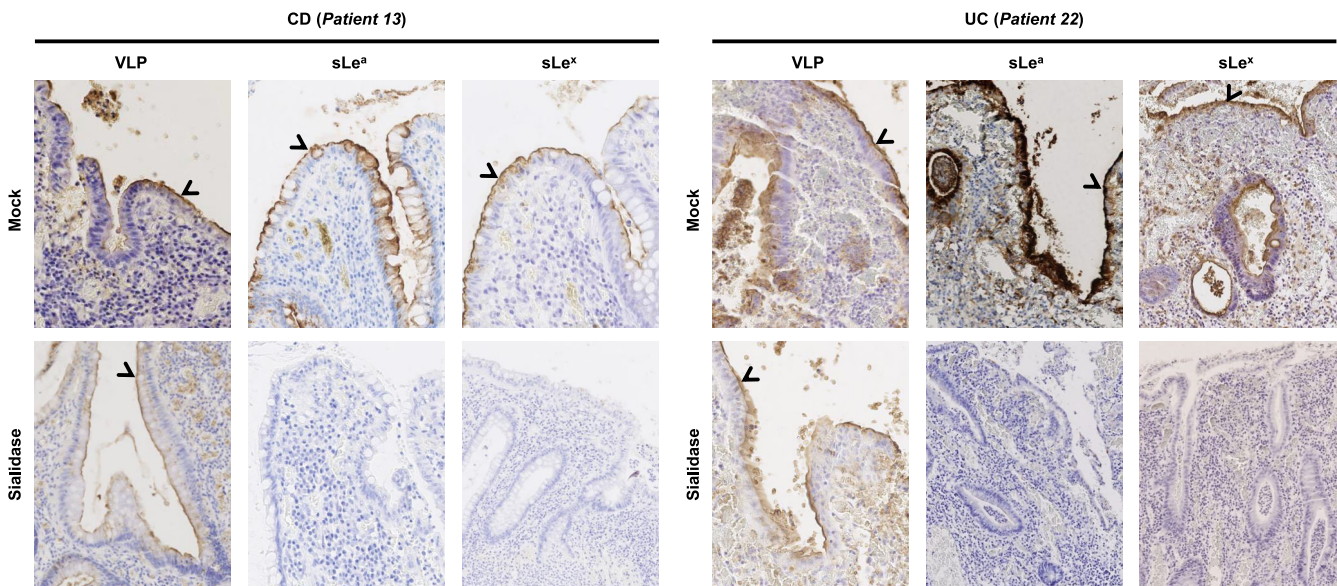


FIG 5 Role of the sialic acid moiety into HuNoV attachment. Attached VLP to mucosa and presence of sLe^a and sLe^x were detected in CD (patient 13) and UC (patient 22) macrodissected tissue samples following sialidase treatment. The efficacy of the sialidase treatment for the removal of the sialic acid was controlled by the absence of immunostaining following incubation with sLe^a- and sLe^x-specific Mabs. Mock and sialidase treatments are indicated on the left of each row. Detected antigens are indicated above each column panel. Specific staining is indicated with an arrowhead.

known about the interactions between viral enteric pathogens and the intestinal tract when it is affected by IBD. In both Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC), we observed that Le^a and Le^x antigens and their sialylated counterparts were specifically expressed by inflammatory and regenerative tissues from all patients, especially in regenerative mucosa (RM). The presence of these ligands was striking, especially in the colon, where they are absent in physiological conditions. Our data can be explained by the fact that regenerative and inflammatory tissues are characterized by a capacity to express a large panel of molecules; this capacity is lost once cell differentiation is achieved. Since histo-blood group antigens (HBGAs) are natural ligands for human noroviruses (HuNoVs), the objective of our study was to determine the interaction between HuNoVs and pathological mucosae from the intestine, colon, and rectum of patients with IBD.

One recent study has clearly shown the small intestine is the main replication site for HuNoVs as a result of highly expressed HBGAs (41), while it is assumed that HuNoVs do not replicate in the colonic epithelium of healthy adults (42). In our preliminary experiments, we did indeed observe that HuNoV virus-like particles (VLPs) specifically recognized HBGAs on duodenal cells, as described previously (34). On the contrary, VLP did not bind at the surface of epithelial cells in the healthy tissue of the colon, where HBGAs are not normally expressed. Analysis of pathological tissues from the colon and rectum of CD and UC patients showed structurally disorganized cells from regenerative epithelium on the luminal side and, unlike in healthy tissue, we observed a strong attachment of GII.4 VLPs. Additional experiments using GII.3 and GII.17 VLPs also showed that GII.17 did specifically bind to regenerative and inflamed areas, while GII.3 did not, suggesting that HuNoV binding in the context of IBD was genotype-specific (Fig. S5). At the cellular level, VLP attachment occurred on the surface of the regenerative mucosa expressing sLe^a and sLe^x in the absence of histological features characterizing precancerous lesions. The binding of HuNoV to sLe^x has previously been characterized *in vitro* using GII.4 HuNoV VLP, but the biological significance of this process remains unclear (35). Rydell et al. suggested there is a "sialic pathway" for norovirus attachment in addition to the established " α 1-2 fucose" pathway characterizing HuNoV-HBGA interaction. Our data showed that Le^a and Le^x antigens, alone or associated with a sialic acid moiety, were responsible for HuNoV capsid recognition on

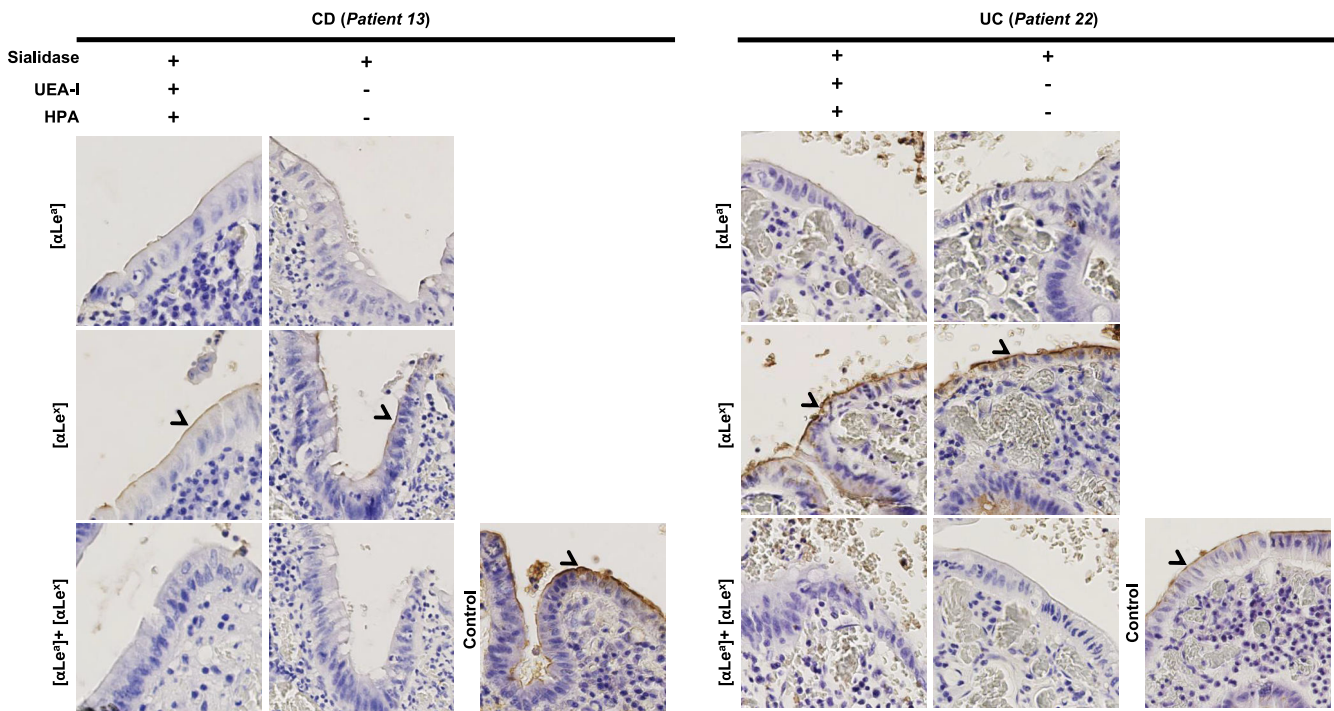


FIG 6 Role of the Lewis antigens in HuNoV specific attachment to pathological CD (patient 13) and UC (patient 22) mucosae. Tissues were first preincubated with a combination of sialidase and lectins (UEA-I and HPA). Presence or absence of treatment is indicated above the column panel by positive and minus signs, respectively. The objective was then to specifically inhibit VLP with Lewis-specific Mabs. Slides were first pretreated with specific MABs against Le^a (α Le^a), Le^x (α Le^x), or both combined before HuNoV GII.4 VLP incubation. The Mabs used for the experiments are indicated in bracket at the left side of each row. For the control, VLPs were directly incubated on tissue without any pretreatment with sialidase, lectins, or Mabs. VLP attachment is indicated by arrowheads and magnified areas correspond to dashed boxes.

inflammatory and healing tissues during UC and CD flare-ups. Future research should thus focus on the fate of HuNoVs after they bind to Le^a and Le^x ligands.

In healthy intestines, HuNoV replication is generally thought to take place mainly in the enterocytes where HBGAs are abundantly expressed (43). Although viral attachment is followed by the internalization of the particles in the cells before their replication, we do not know whether HuNoV attachment triggers their internalization and replication in regenerative cells. We are therefore left wondering about the physiological consequences of HuNoV replication, specifically in inflammatory mucosa from the colon in IBD. Since the etiology of IBD is complex and multifactorial, the role of enteric viruses remains unclear. This is especially true for the dysbiosis seen in IBD microbiota (29). We could hypothesize that this unusual attachment might be involved in the disruption of the intestinal flora. However, although we previously demonstrated that HuNoV VLPs could attach to injured mucosa from the colon and rectum, cells from healing and inflammatory tissues might obstruct HuNoV replication, even after successful attachment. That being said, the newly formed virus-HBGA complex might activate the immune system and exacerbate the inflammatory process. In the future, it will be important to determine whether the presence of viral enteric pathogens and their interaction with enteric cells is correlated with the inflammatory response observed in IBD. This would require the histological analysis of IBD patients suffering from infection with HuNoV gastroenteritis or other enteric viruses, such as group A rotaviruses, which also recognize HBGA ligands (44, 45).

One shortcoming of our study is the limited number of UC and CD samples, limiting the robustness of our statistical analysis. In addition, the experiment showing that Le^a and Le^x antigens were involved in the recognition of HuNoV was only conducted on the samples from two patients. Only severe cases of IBD were included in the study, in compliance with the recommendation of the French national ethical committee, which explains why only 27 patients were included in our study. Additional studies are

therefore needed to pursue this vein of research, provided there is enough available biological material. That being said, it is worth mentioning that inflammatory areas were characterized for all UC and CD patients of the study and showed the presence of Le^a and Le^x antigens. This observation strongly suggests that both antigens might be involved into NoV recognition on inflammatory areas. The other limitation of the study is the use of VLPs that might not entirely reflect biological properties of native HuNoV particles. Even though VLPs are not infectious like native particles, they have been essential for demonstrating the role of HBGAs as HuNoV natural ligands (34). Therefore, the specific binding of VLPs or native HuNoV on inflammatory mucosa is not necessarily followed by viral replication. However, virus attachment may trigger activation of the immune system.

Further study of the microbiota in combination with epidemiological data will help to unravel the precise role of common viral enteric pathogens during IBD. Recent findings regarding HuNoV replication in human intestinal enteroids (HIEs) and organoids (HIOs) are promising (46, 47). The use of organoids derived from IBD patients might be useful to study specific virus-host interactions and genetic responses, as described previously (48).

From a clinical point of view, epidemiological studies have shown that opportunistic HuNoV infections require special medical care in immunocompromised patients, especially in grafted patients. Such opportunistic infections might occur in UC and CD patients as well, meaning they too would require special medical attention. In this case, the use of vaccines and antiviral therapies should potentially be considered in patients diagnosed with IBD.

MATERIALS AND METHODS

Patient and tissue specimens. Tissue samples from individuals with refractory UC and CD who underwent bowel resection between 2010 and 2014 were selected from the Pathology Department files of the University Hospital of Dijon. Approval for the study (reference 18.11.29.52329) was granted by the French national ethics committee (CPP19002), and consent for further histological analysis and *FUT2* genotyping was obtained from each patient. Slides were reviewed by two pathologists in order to rule out dysplasia and cancer according to previously defined criteria (49). Twenty-five surgical resection specimens from 24 IBD patients suffering from either UC ($n=9$) or CD ($n=15$) were selected (Table 1). The patients all presented a clearly defined histopathological and clinical diagnosis. The UC cohort was composed of four males and five females aged 26 to 58 years (median age: 40 years). For the nine patients suffering from UC, samples of distal colon ($n=6$) and rectum ($n=3$) were used for histological analysis. The CD cohort was composed of five males and ten females aged 22 to 50 years (median age: 32 years). For the 16 CD cases, the samples consisted of jejunoleum ($n=7$; 2 jejunum and 5 ileum), proximal colon ($n=3$), and distal colon ($n=6$; 2 sigmoid colon and 4 transverse colon).

For each case, one block of formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissue was selected. For one CD patient, two different surgical resection specimens were retrieved (one block of jejunum and one block of distal colon).

Histological preparation and antigen detection. Ultrathin ($4\mu\text{m}$) microtome sections were cut from paraffin blocks. Sections were then deparaffinized and rehydrated in xylene and pure ethanol using a Tissue-tek Prisma slide stainer (Sakura Finetek Europe). Endogenous peroxidase activity was inhibited using 3% H₂O₂ in molecular-grade methanol (Sigma-Aldrich, Germany). Slides were washed with phosphate-buffered saline (PBS) for 5 min before incubation with 1% bovine serum albumin (BSA) and 3% normal horse serum diluted in PBS, for 2 h at room temperature.

HuNoV virus-like particles (VLPs) and antibodies were all diluted in PBS with 1% BSA. Primary monoclonal antibodies (MAbs) were all detected with horseradish peroxidase (HRP)-labeled mouse specific antibodies (Vector Labs, USA) and incubated for 45 min at room temperature. Peroxidase activity was revealed with 3,3'-diaminobenzidine for 1.5 min at room temperature (Vector Labs, USA), and sections were rinsed and counterstained with hematoxylin (Dako, Agilent Technologies, USA). From 1 to $5\mu\text{g}$ of in-house purified GII.4/2007-Osaka (Cairo 4 variant strain) (EU876884), hereafter referred to as "GII.4 VLPs," and $\Delta\text{D}373$ GII.4/2004-Hunter VLPs (E1057 mutant variant unable to bind to HBGAs, used as a negative control) (EU876890), hereafter referred to as " $\Delta\text{D}373$ VLPs," were used for the histological binding assays (37). Production and purification of recombinant VLPs as well as VLP binding assays on histological sections have been described previously (34, 37) (Fig. S6). In-house GII.4-specific MAb directly labeled with peroxidase was used for the detection of GII.4 and $\Delta\text{D}373$ VLPs. A and B antigens were detected with 1,000-fold diluted MAbs 9113D10 and 9621A8 (Diagast, Loos, France), respectively, while H antigen was detected with $1\mu\text{g}/\text{ml}$ *Ulex europaeus* agglutinin I (UEA-I) lectin labeled with fluorescein isothiocyanate (Sigma-Aldrich, Germany). Le^a and Le^x were detected with $0.5\mu\text{g}/\text{ml}$ of MAbs MEM-158 and 7Le (Sigma-Aldrich, Germany), respectively. Sialyl Lewis a and sialyl Lewis x (sLe^x also known as CD15s) were detected with $2\mu\text{g}/\text{ml}$ of MAbs NS-1116-19.9 (Dako, Agilent Technologies, USA) and CSLEX1 (Becton, Dickinson, USA), respectively. The cell proliferation marker K_i-67 was detected with MAb MIB-1 (Dako, Agilent Technologies, USA). For K_i-67 and sLe^a antigens, the epitopes were unmasked by heating at 95°C for 30 min prior to detection on a Dako OMNIS automate (Agilent Technologies, USA). When indicated,

sections were first treated with 3 mU/ml of *Vibrio cholerae* sialidase (Sigma-Aldrich, Germany) prior to incubation with antibodies or VLPs, as described previously (34). α 1,2 Fucosidase enzyme was a kind gift of Takane Katayama (Kyoto University, Japan) and was used as described previously (34, 50).

For the immunohistological characterization of the tissue, the proportion of labeled area was determined for each sample. The values correspond to the ratio between labeled mucosa and total mucosa of the tissue section, as shown in Tables S1 and S2.

Competition assays. For the characterization of the ligands recognized by the GII.4 HuNoV, histological blocks embedded in paraffin were selected from two patients with blood group A: (i) a 26-year-old woman (sample 13) suffering from CD with a total colectomy, and (ii) a 44-year-old woman suffering from UC with subtotal colectomy (sample 22). A tissue area of one square millimeter, comprising regenerative mucosa, was dissected from the original samples for the competition experiments.

Sections were first treated with sialidase as described above. Then the sections were incubated with 10 μ g of *Helix pomatia* and UEA-I lectins (Sigma-Aldrich) in 400 μ l/section of PBS overnight at 4°C. After 3 washes with PBS, the sections were incubated with 10 μ g of *Aleuria aurantia* or *Lotus tetragonolobus* lectins (all from CliniSciences, France) or both combined, diluted in 400 μ l/section of PBS.

For the competition assays using MAbs, sections were either preincubated with 40 μ g/ml of Le^x- or Le^a-specific MAbs or a combination of both. The sections were then rinsed three times in PBS prior to incubation with 3 μ g/ml of purified GII.4 VLP at 4°C for 18 h. VLPs were detected as described above. Treatment of the sections with 50 mM sodium periodate (Sigma-Aldrich) was used for the removal of carbohydrates, as described previously (34).

FUT2 genotyping. For each patient, DNA was extracted from healthy FFPE tissue. Tissue sections were incubated with proteinase K for 18 h at 56°C prior to extraction on the QiaSymphony (Qiagen, USA) following the manufacturer recommendations. The DNA was diluted in water and used for the PCR amplification of a portion of the *FUT2* gene and sequencing (51). Genetic analysis of the G428A and A385T mutations was performed using the codon aligner suite (CodonCode Corporation, USA).

Data availability. Digitized images (WSI format) from the histological analyses and HuNoV VLPs used in the manuscript are available upon request.

SUPPLEMENTAL MATERIAL

Supplemental material is available online only.

FIG S1, PDF file, 0.4 MB.

FIG S2, PDF file, 0.4 MB.

FIG S3, PDF file, 0.1 MB.

FIG S4, PDF file, 0.2 MB.

FIG S5, PDF file, 0.6 MB.

FIG S6, PDF file, 0.1 MB.

TABLE S1, PDF file, 0.1 MB.

TABLE S2, PDF file, 0.1 MB.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the National Reference Center for Viral Gastroenteritis and the Dijon-Bourgogne University Hospital (France). Georges Tarris received a fellowship from the Faculty of Medicine, University of Burgundy (Dijon, France).

Financial support was received from Santé Publique France (SPF) and Fonds Européen de Développement Régional (FEDER) number IGDA 2017-6200FEO001S01850.

We thank Suzanne Rankin and Stephanie Lemaire for technical and editorial assistance.

We declare no commercial affiliations or patent-licensing arrangements in the study design, the collection, analysis, and interpretation of data, the writing of the report, or the decision to submit the paper for publication that could be regarded as posing a conflict of interest concerning the submitted manuscript.

Specific author contributions: conceptualization, G.T., L.M., and G.B.; methodology, G.T. and G.B.; investigation, G.T., A.D.R., M.E., and G.B.; resources, A.D.R., M.E., M.C., T.M., C.M., L.M., and G.B.; data curation, M.C., T.M., and C.M.; validation, B.B., C.M., L.M., and G. B.; writing original draft, G.T. and G.B.; writing review and editing, A.D.R. and B.B.; funding acquisition, A.D.R., L.M., and G.B.; supervision, L.M. and G.B.

REFERENCES

- Burisch J, Jess T, Martinato M, Lakatos PL, ECCO -EpiCom. 2013. The burden of inflammatory bowel disease in Europe. *J Crohns Colitis* 7:322–337. <https://doi.org/10.1016/j.crohns.2013.01.010>.
- Fenoglio-Preiser CM, Noffsinger AE, Stemmermann GN, Lantz PE, Isaacson PG. 2008. *Gastrointestinal pathology*, 3rd ed, p 593–690. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA.

3. Manichanh C, Borruel N, Casellas F, Guarner F. 2012. The gut microbiota in IBD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 9:599–608. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2012.152>.
4. Theodoratou E, Campbell H, Ventham NT, Kolarich D, Pucic-Bakovic M, Zoldos V, Fernandes D, Pemberton IK, Rudan I, Kennedy NA, Wuhrer M, Nimmo E, Annese V, McGovern DP, Satsangi J, Lauc G. 2014. The role of glycosylation in IBD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 11:588–600. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.78>.
5. Swidsinski A, Loening-Baucke V, Theissig F, Engelhardt H, Bengmark S, Koch S, Lochs H, Dorffel Y. 2007. Comparative study of the intestinal mucus barrier in normal and inflamed colon. *Gut* 56:343–350. <https://doi.org/10.1136/gut.2006.098160>.
6. Mazzola G, Macaluso FS, Adamoli L, Renna S, Cascio A, Orlando A. 2017. Diagnostic and vaccine strategies to prevent infections in patients with inflammatory bowel disease. *J Infect* 74:433–441. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2017.02.009>.
7. Vinje J. 2015. Advances in laboratory methods for detection and typing of norovirus. *J Clin Microbiol* 53:373–381. <https://doi.org/10.1128/JCM.01535-14>.
8. Karlinger K, Gyorke T, Mako E, Mester A, Tarjan Z. 2000. The epidemiology and the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Eur J Radiol* 35:154–167. [https://doi.org/10.1016/s0720-048x\(00\)00238-2](https://doi.org/10.1016/s0720-048x(00)00238-2).
9. Wagner J, Sim WH, Lee KJ, Kirkwood CD. 2013. Current knowledge and systematic review of viruses associated with Crohn's disease. *Rev Med Virol* 23:145–171. <https://doi.org/10.1002/rmv.1720>.
10. Chamillard M, Cesaro A, Lober PE, Hober D. 2014. Decoding norovirus infection in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 20:767–770. <https://doi.org/10.1097/01.MIB.0000440613.83703.4a>.
11. Jass JR, Robertson AM. 1994. Colorectal mucin histochemistry in health and disease: a critical review. *Pathol Int* 44:487–504. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1827.1994.tb02599.x>.
12. Le Pendu J, Marionneau S, Cailleau-Thomas A, Rocher J, Le Moullac-Vaidye B, Clement M. 2001. ABH and Lewis histo-blood group antigens in cancer. *Apmis* 109:9–31. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2001.tb00011.x>.
13. Marionneau S, Cailleau-Thomas A, Rocher J, Le Moullac-Vaidye B, Ruvoen N, Clement M, Le Pendu J. 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. [https://doi.org/10.1016/S0300-9084\(01\)01321-9](https://doi.org/10.1016/S0300-9084(01)01321-9).
14. Oriol R, Candelier JJ, Mollicone R. 2000. Molecular genetics of H. *Vox Sang* 78 Suppl 2:105–108.
15. Yuan M, Itzkowitz SH, Palekar A, Shamsuddin AM, Phelps PC, Trump BF, Kim YS. 1985. Distribution of blood group antigens A, B, H, Lewis, and Lewisb in human normal, fetal, and malignant colonic tissue. *Cancer Res* 45:4499–4511.
16. Cordon-Cardo C, Lloyd KO, Sakamoto J, McGroarty ME, Old LJ, Melamed MR. 1986. Immunohistologic expression of blood-group antigens in normal human gastrointestinal tract and colonic carcinoma. *Int J Cancer* 37:667–676. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910370505>.
17. Sakamoto J, Furukawa K, Cordon-Cardo C, Yin BW, Rettig WJ, Oettgen HF, Old LJ, Ko L. 1986. Expression of Lewis, Lewisb, X, and Y blood group antigens in human colonic tumors and normal tissue and in human tumor-derived cell lines. *Cancer Res* 46:1553–1561.
18. Schoentag R, Primus FJ, Kuhns W. 1987. ABH and Lewis blood group expression in colorectal carcinoma. *Cancer Res* 47:1695–1700.
19. Cooper HS, Marshall C, Ruggiero F, Steplewski Z. 1987. Hyperplastic polyps of the colon and rectum. An immunohistochemical study with monoclonal antibodies against blood groups antigens (sialosyl-Lea, Leb, Lex, Ley, A, B, H). *Lab Invest* 57:421–428.
20. Ravn V, Dabelsteen E. 2000. Tissue distribution of histo-blood group antigens. *APMIS* 108:1–28. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0463.2000.d01-1.x>.
21. Forni D, Cleyner I, Ferrante M, Cassinotti A, Cagliani R, Ardizzone S, Vermeire S, Fichera M, Lombardini M, Maconi G, de Franchis R, Asselta R, Biasin M, Clerici M, Sironi M. 2014. ABO histo-blood group might modulate predisposition to Crohn's disease and affect disease behavior. *J Crohns Colitis* 8:489–494. <https://doi.org/10.1016/j.crohns.2013.10.014>.
22. Cooper HS, Steplewski Z. 1988. Immunohistologic study of ulcerative colitis with monoclonal antibodies against tumor-associated and/or differentiation antigens. *Gastroenterology* 95:686–693. [https://doi.org/10.1016/s0016-5085\(88\)80015-5](https://doi.org/10.1016/s0016-5085(88)80015-5).
23. Bara J, Zabaleta EH, Mollicone R, Nap M, Burtin P. 1986. Distribution of GICA in normal gastrointestinal and endocervical mucosae and in mucinous ovarian cysts using antibody NS 19–9. *Am J Clin Pathol* 85:152–159. <https://doi.org/10.1093/ajcp/85.2.152>.
24. McGovern DP, Jones MR, Taylor KD, Marcianti K, Yan X, Dubinsky M, Ippoliti A, Vasiliauskas E, Berel D, Derkowski C, Dutridge D, Fleshner P, Shih DQ, Melmed G, Mengesha E, King L, Pressman S, Haritunians T, Guo X, Targan SR, Rotter JI, International IBD Genetics Consortium. 2010. Fucosyltransferase 2 (FUT2) non-secretor status is associated with Crohn's disease. *Hum Mol Genet* 19:3468–3476. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddq248>.
25. Parmar AS, Alakulppi N, Paavola-Sakki P, Kurppa K, Halme L, Farkkila M, Turunen U, Lappalainen M, Kontula K, Kaukinen K, Maki M, Lindfors K, Partanen J, Sistonen P, Matto J, Wacklin P, Saavalainen P, Einarsdottir E. 2012. Association study of FUT2 (rs601338) with celiac disease and inflammatory bowel disease in the Finnish population. *Tissue Antigens* 80:488–493. <https://doi.org/10.1111/tan.12016>.
26. Hu D, Zhang D, Zheng S, Guo M, Lin X, Jiang Y. 2016. Association of ulcerative colitis with FUT2 and FUT3 polymorphisms in patients from south-east China. *PLoS One* 11:e0146557. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146557>.
27. Sokol H, Seksik P, Furet JP, Firmesse O, Nion-Larmurier I, Beaugerie L, Cosnes J, Corthier G, Marteau P, Dore J. 2009. Low counts of Faecalibacterium prausnitzii in colitis microbiota. *Inflamm Bowel Dis* 15:1183–1189. <https://doi.org/10.1002/ibd.20903>.
28. Ni J, Wu GD, Albenberg L, Tomov VT. 2017. Gut microbiota and IBD: causation or correlation? *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 14:573–584. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2017.88>.
29. Norman JM, Handley SA, Baldrige MT, Droit L, Liu CY, Keller BC, Kambal A, Monaco CL, Zhao G, Fleshner P, Stappenbeck TS, McGovern DP, Keshavarzian A, Mutlu EA, Sauk J, Gevers D, Xavier RJ, Wang D, Parkes M, Virgin HW. 2015. Disease-specific alterations in the enteric virome in inflammatory bowel disease. *Cell* 160:447–460. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.01.002>.
30. Basic M, Keubler LM, Buettner M, Achard M, Breves G, Schroder B, Smoczek A, Jorns A, Wedekind D, Zschemisch NH, Gunther C, Neumann D, Lienenklaus S, Weiss S, Horneff MW, Mahler M, Bleich A. 2014. Norovirus triggered microbiota-driven mucosal inflammation in interleukin 10-deficient mice. *Inflamm Bowel Dis* 20:431–443. <https://doi.org/10.1097/01.MIB.0000441346.86827.ed>.
31. Cadwell K. 2010. Crohn's disease susceptibility gene interactions, a NOD to the newcomer ATG16L1. *Gastroenterology* 139:1448–1450. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2010.09.023>.
32. Andersen SN, Rognum TO, Bakka A, Clausen OP. 1998. Ki-67: a useful marker for the evaluation of dysplasia in ulcerative colitis. *Mol Pathol* 51:327–332. <https://doi.org/10.1136/mp.51.6.327>.
33. Sjoqvist U, Ost A, Lofberg R. 1999. Increased expression of proliferative Ki-67 nuclear antigen is correlated with dysplastic colorectal epithelium in ulcerative colitis. *Int J Colorectal Dis* 14:107–113. <https://doi.org/10.1007/s003840050194>.
34. Marionneau S, Ruvoen N, Le Moullac-Vaidye B, Clement M, Cailleau-Thomas A, Ruiz-Palacois G, Huang P, Jiang X, Le Pendu J. 2002. Norwalk virus binds to histo-blood group antigens present on gastroduodenal epithelial cells of secretor individuals. *Gastroenterology* 122:1967–1977. <https://doi.org/10.1053/gast.2002.33661>.
35. Rydell GE, Nilsson J, Rodriguez-Diaz J, Ruvoen-Clouet N, Svensson L, Le Pendu J, Larson G. 2009. Human noroviruses recognize sialyl Lewis x neoglycoprotein. *Glycobiology* 19:309–320. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwn139>.
36. Lowe JB. 2003. Glycan-dependent leukocyte adhesion and recruitment in inflammation. *Curr Opin Cell Biol* 15:531–538. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2003.08.002>.
37. de Rougemont A, Ruvoen-Clouet N, Simon B, Estienney M, Elie-Caille C, Aho S, Pothier P, Le Pendu J, Boireau W, Belliot G. 2011. Qualitative and quantitative analysis of the binding of GII.4 norovirus variants onto human blood group antigens. *J Virol* 85:4057–4070. <https://doi.org/10.1128/JVI.02077-10>.
38. Yan L, Wilkins PP, Alvarez-Manilla G, Do SI, Smith DF, Cummings RD. 1997. Immobilized Lotus tetragonolobus agglutinin binds oligosaccharides containing the Lex determinant. *Glycoconj J* 14:45–55. <https://doi.org/10.1023/A:1018508914551>.
39. Wimmerova M, Mitchell E, Sanchez JF, Gautier C, Imberty A. 2003. Crystal structure of fungal lectin: six-bladed beta-propeller fold and novel fucose recognition mode for *Aleuria aurantia* lectin. *J Biol Chem* 278:27059–27067. <https://doi.org/10.1074/jbc.M302642200>.
40. Haselhorst T, Weimar T, Peters T. 2001. Molecular recognition of sialyl Lewis (x) and related saccharides by two lectins. *J Am Chem Soc* 123:10705–10714. <https://doi.org/10.1021/ja011156h>.
41. Green KY, Kaufman SS, Nagata BM, Chaimongkol N, Kim DY, Levenson EA, Tin CM, Yardley AB, Johnson JA, Barletta ABF, Khan KM, Yazigi NA,

- Subramanian S, Moturi SR, Fishbein TM, Moore IN, Sosnovtsev SV. 2020. Human norovirus targets enteroendocrine epithelial cells in the small intestine. *Nat Commun* 11:2759. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16491-3>.
42. Green KY. 2007. *Caliciviridae: the noroviruses*, p 949–980. In Knipe DM, Howley PM (ed), *Fields virology*, 5th ed, vol1. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA.
43. Karandikar UC, Crawford SE, Ajami NJ, Murakami K, Kou B, Ettayebi K, Papanicolaou GA, Jongwutiwes U, Perales MA, Shia J, Mercer D, Finegold MJ, Vinje J, Atmar RL, Estes MK. 2016. Detection of human norovirus in intestinal biopsies from immunocompromised transplant patients. *J Gen Virol* 97:2291–2300. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000545>.
44. Hu L, Crawford SE, Czako R, Cortes-Penfield NW, Smith DF, Le Pendu J, Estes MK, Prasad BV. 2012. Cell attachment protein VP8* of a human rotavirus specifically interacts with A-type histo-blood group antigen. *Nature* 485:256–259. <https://doi.org/10.1038/nature10996>.
45. Huang P, Xia M, Tan M, Zhong W, Wei C, Wang L, Morrow A, Jiang X. 2012. Spike protein VP8* of human rotavirus recognizes histo-blood group antigens in a type-specific manner. *J Virol* 86:4833–4843. <https://doi.org/10.1128/JVI.05507-11>.
46. Ettayebi K, Crawford SE, Murakami K, Broughman JR, Karandikar U, Tenge VR, Neill FH, Blutt SE, Zeng XL, Qu L, Kou B, Opekun AR, Burrin D, Graham DY, Ramani S, Atmar RL, Estes MK. 2016. Replication of human noroviruses in stem cell-derived human enteroids. *Science* 353:1387–1393. <https://doi.org/10.1126/science.aaf5211>.
47. Zhang D, Tan M, Zhong W, Xia M, Huang P, Jiang X. 2017. Human intestinal organoids express histo-blood group antigens, bind norovirus VLPs, and support limited norovirus replication. *Sci Rep* 7:12621. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-12736-2>.
48. Dotti I, Mora-Buch R, Ferrer-Picon E, Planell N, Jung P, Masamunt MC, Leal RF, Martin de Carpi J, Llach J, Ordas I, Batlle E, Panes J, Salas A. 2017. Alterations in the epithelial stem cell compartment could contribute to permanent changes in the mucosa of patients with ulcerative colitis. *Gut* 66:2069–2079. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2016-312609>.
49. Riddell RH, Goldman H, Ransohoff DF, Appelman HD, Fenoglio CM, Haggitt RC, Ahren C, Correa P, Hamilton SR, Morson BC. 1983. Dysplasia in inflammatory bowel disease: standardized classification with provisional clinical applications. *Hum Pathol* 14:931–968. [https://doi.org/10.1016/s0046-8177\(83\)80175-0](https://doi.org/10.1016/s0046-8177(83)80175-0).
50. Katayama T, Sakuma A, Kimura T, Makimura Y, Hiratake J, Sakata K, Yamano T, Kumagai H, Yamamoto K. 2004. Molecular cloning and characterization of *Bifidobacterium bifidum* 1,2- α -L-fucosidase (AfcA), a novel inverting glycosidase (glycoside hydrolase family 95). *J Bacteriol* 186:4885–4893. <https://doi.org/10.1128/JB.186.15.4885-4893.2004>.
51. Imbert-Marcille BM, Barbe L, Dupe M, Le Moullac-Vaidye B, Besse B, Peltier C, Ruvoen-Clouet N, Le Pendu J. 2014. A FUT2 gene common polymorphism determines resistance to rotavirus A of the P[8] genotype. *J Infect Dis* 209:1227–1230. <https://doi.org/10.1093/infdis/jit655>.

ANNEXE 2: “ENTERIC VIRUSES AND INFLAMMATORY BOWEL DISEASE”

Review

Enteric Viruses and Inflammatory Bowel Disease

Georges Tarris^{1,2}, Alexis de Rougemont² , Maëva Charkaoui³, Christophe Michiels³, Laurent Martin¹ and Gaël Belliot^{2,*}

¹ Department of Pathology, University Hospital of Dijon, F 21000 Dijon, France; georges.tarris@chu-dijon.fr (G.T.); laurent.martin@chu-dijon.fr (L.M.)

² National Reference Centre for Gastroenteritis Viruses, Laboratory of Virology, University Hospital of Dijon, F 21000 Dijon, France; alexis.de-rougemont@u-bourgogne.fr

³ Department of Hepatogastroenterology, University Hospital of Dijon, F 21000 Dijon, France; maeva.charkaoui@chu-dijon.fr (M.C.); christophe.michiels@chu-dijon.fr (C.M.)

* Correspondence: gael.belliot@u-bourgogne.fr; Tel.: +33-380-293-171; Fax: +33-380-293-280

Abstract: Inflammatory bowel diseases (IBD), including ulcerative colitis (UC) and Crohn's disease (CD), is a multifactorial disease in which dietary, genetic, immunological, and microbial factors are at play. The role of enteric viruses in IBD remains only partially explored. To date, epidemiological studies have not fully described the role of enteric viruses in inflammatory flare-ups, especially that of human noroviruses and rotaviruses, which are the main causative agents of viral gastroenteritis. Genome-wide association studies have demonstrated the association between IBD, polymorphisms of the *FUT2* and *FUT3* genes (which drive the synthesis of histo-blood group antigens), and ligands for norovirus and rotavirus in the intestine. The role of autophagy in defensin-deficient Paneth cells and the perturbations of cytokine secretion in T-helper 1 and T-helper 17 inflammatory pathways following enteric virus infections have been demonstrated as well. Enteric virus interactions with commensal bacteria could play a significant role in the modulation of enteric virus infections in IBD. Based on the currently incomplete knowledge of the complex phenomena underlying IBD pathogenesis, future studies using multi-sampling and data integration combined with new techniques such as human intestinal enteroids could help to decipher the role of enteric viruses in IBD.

Keywords: norovirus; rotavirus; astrovirus; sapovirus; adenovirus; aichi virus; Crohn's disease; ulcerative colitis; inflammatory bowel disease



Citation: Tarris, G.; de Rougemont, A.; Charkaoui, M.; Michiels, C.; Martin, L.; Belliot, G. Enteric Viruses and Inflammatory Bowel Disease. *Viruses* **2021**, *13*, 104. <https://doi.org/10.3390/v13010104>

Academic Editor: Susana Guix
Received: 23 November 2020
Accepted: 8 January 2021
Published: 13 January 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Inflammatory bowel disease (IBD), which includes ulcerative colitis (UC) and Crohn's disease (CD), is an important public health issue with an estimated 6.8 million cases worldwide and prevalence rates ranging from 79.5 to 84.3 per 100,000 individuals [1]. Both CD and UC are characterized by chronic mucosal inflammation, with CD affecting proximal to distal segments of the gastrointestinal tract (stomach, small intestine, large intestine) and UC affecting only the distal segments (colon and rectum) [2]. The pathological features of CD and UC are different. In CD, there is transmural inflammation involving the full thickness of the bowel, with lymphoplasmacytic aggregates, epithelioid granulomas, mucosal edema, scarring fibrosis, and neural thickening of tissues. In UC, histopathology usually shows patchy mucosal ulcerations, mucosal edema, hemorrhagic foci of the lamina propria, and cryptic damage [2]. Paneth cell metaplasia has been described in the distal colon in both conditions [3]. Altogether, IBD involves microbial, environmental, dietary, immunological, and genetic factors, though the mechanisms underlying intestinal inflammation remain debated [4,5]. While the effect of cytomegalovirus (CMV) infection on IBD has been confirmed, the role of enteric viruses in inflammatory bursts of IBD, pathogenesis, and exacerbation of disease symptoms is controversial [6,7]. Despite recent data suggesting that there is an increased risk of serious viral infections in IBD patients, especially in those undergoing prolonged IBD therapy, the risk factors and predictors of enteric virus

infections have not been clearly identified in these individuals [8]. Enteric viruses include the *Picornaviridae* (enteroviruses, polioviruses, coxsackie viruses, echoviruses, and hepatitis A virus), *Adenoviridae* (adenovirus), *Caliciviridae* (norovirus and sapovirus), *Astroviridae* (astrovirus), and *Reoviridae* (rotaviruses) families. Their role in IBD pathogenesis remains largely unknown. Here, we review various aspects of enteric virus infections in IBD, including epidemiology, virus–host interactions, gut microbiota, inflammatory pathways, virome studies, and therapeutic approaches.

2. Epidemiology of Enteric Viruses in IBD

Few epidemiological studies have focused on the prevalence of enteric viruses in IBD (Table 1), and the conclusions of these studies can be contradictory because of the techniques used for virus detection (RT-PCR or rapid antigenic test) or the small size of the cohorts. The first epidemiological study was conducted in 1982 by Gebhard et al. [9]. The study aimed to detect norovirus and rotavirus antigens in stool samples from IBD patients in combination with serological analysis. For 14 months, 77 patients were followed, during which 65 flare-ups were observed in 54 patients. A total of 266 stool samples were tested, of which 55 were obtained during disease exacerbation. The study was not able to make a clear association between IBD relapse and enteric virus infections. However, the authors concluded that five out of eight patients with serological evidence of enteric virus infection showed symptoms of exacerbation during a 3-month period ($p < 0.01$) [9]. Another epidemiological study by Khan et al. compared the medical records of a pediatric emergency department and norovirus-positive stool specimens ($n = 2666$ cases) over a 10-month period [10]. Nine patients (1 CD and 8 UC) with bloody diarrhea linked to IBD relapse had at least one positive stool for norovirus antigen using the rapid test. Considering that the cohort included 23 CD and 14 UC patients, the study showed a significant association between UC relapse and norovirus presence in stool ($p < 0.01$) [10]. Three of the norovirus-positive IBD patients were coinfecting with either *Clostridium difficile*, adenovirus, or rotavirus [10]. Conversely, a prospective screening of 50 stool specimens for norovirus, rotavirus, astrovirus, and sapovirus in a Swedish pediatric IBD cohort during routine endoscopy procedures showed no prevalence of enteric viruses during IBD flare-ups; however, a very low prevalence of GII noroviruses or sapoviruses was found in non-IBD patients in which IBD was ruled out by endoscopy [11]. Another prospective study in a Dutch cohort aimed to detect enteric viruses in stool samples from 286 IBD patients during their 1-year trimestral follow-up. The results suggested a low prevalence of enteric viruses in both baseline and active IBD, and no epidemiological link could be established between disease activity and enteric virus infections [12]. The largest and most recent study showed a clear association between enteric viruses and IBD flare-ups using data-crossing from 9403 patients in whom 13,231 stool tests were performed using a gastrointestinal pathogen PCR panel over a 2-year period. Here, Axelrad et al. compared 577 IBD patients (277 CD and 300 UC) to 8826 controls and demonstrated the greater prevalence of enteric infections (such as norovirus; $p < 0.001$) as well as *Enteroinvasive Escherichia coli* (EIEC) in both CD and UC patients during IBD flare-ups [13,14].

Table 1. Enteric viruses and inflammatory bowel disease (epidemiological studies).

Study	Location/ Duration	Study Design	Cohort	Age Range	Samples, Materials and Methods	Conclusions Discussion
Gebhard et al., 1982 [9]	June 1978 October 1980 Minneapolis (USA)	Prospective Case control Follow-up	57 CD 20 UC 10 N	All patients: 11–64 (mean 31.5) 49 CD flare-ups 16 UC flare-ups	266 stool samples (55 during flare-up): Stool antigens -NoV and RVA Serology (3 mo follow-up)	No association 5 positive/65 flare-ups Positive serologies (NoV and RVA) correlated with severe symptoms (5/8)
Khan et al., 2009 [10]	November 2006 August 2007 Charleston (USA)	Retrospective Case control	23 CD 14 UC 9 IC 2620 N	IBD flare-ups: 11–18 (mean 15.3)	2666 stool samples Norovirus IDEIA assay kit (Dako)	Association NoV-IBD flare-ups 1119 positive 9 IBD flare-ups: CD (1/23): 1 NoV + 1 RVA UC (7/14): 7 NoV + 1 hAdV IC (0/9) Disease seasonality ($p < 0.001$)
Kolho et al., 2012 [11]	Dates unknown Helsinki (Finland)	Prospective Follow-up	18 CD 13 UC 2 IC 17 N	All IBD: 2.4–18 (mean 12.9) All non-IBD (N): 2.7–16 (mean 11)	50 stool samples RT-PCR: (NoV, RVA, hAdV, SaV, hEV)	No association IBD: 0/33 Non-IBD: 3/50 (2 NoV and 1 SaV)
Masclee et al., 2013 [12]	August 2009 November 2010 Maastricht (Netherlands)	Prospective Follow-up	170 CD 116 UC	All IBD: mean 46.2 (SD = 15.2)	286 stool samples/ 3-month follow-up RT-PCR (AdV, hAstV, NoV, RVA)	No association 86 IBD flare-ups RVA (2.3%), hAdV (2.3%) 200 IBD remissions RVA (0.5%), NoV (0.5%), hAdV (4.5%)
Axelrad et al., [13,14]	March 2015 May 2017 New York (USA)	Cross-sectional database analysis	277 CD 300 UC 8826 N	CD: median 37.7 UC: median 47.1 N: median 42.9	13,231 stool samples Panel PCR test (22 analytes, including hAdV, hAstV, NoV, SaV, RVA)	Association NoV-IBD flare-ups CD and UC: higher prevalence of NoV (CD; $p < 0.05$) (UC; $p < 0.019$)

CD: Crohn's disease; UC: ulcerative colitis; N: healthy; hAdV: adenovirus; hAstV: astrovirus; hEV: enterovirus; NoV: norovirus; RVA: rotavirus; SaV: sapovirus.

3. Histo-Blood Group Antigens and Virus–Tissue Interactions in Patients with IBD

Enteric viruses, noroviruses, and rotaviruses use histo-blood group antigens (HBGAs) as natural ligands with a significant duodenal tropism [15]. The expression of HBGAs is mainly due to the expression of α 1,2-fucosyltransferase (FUT2), catalyzing the addition of a fucose with an alpha-1,2 linkage to disaccharide precursors at the surface of enterocytes [15,16]. While several *FUT2* mutations have been reported, the G428A mutation is the most commonly described in European and Mediterranean populations, and it results in a “non-secretor phenotype” and the absence of expression of ABO antigens at the surface of secretor-dependent tissues (i.e., tissues in which the expression of ABO blood group antigens is non-constitutive and conditioned by the *FUT2* gene). The synthesis of Lewis antigens is consecutive to H₁ chain expression and is driven by the *FUT3* gene, which encodes α 1,3-fucosyltransferase (FUT3). The enzyme adds a fucose with an alpha-1,3 linkage to an H₁ precursor to produce Lewis b (Le^b, major form) and Lewis y (Le^y, minor form) antigens in the presence of an active *FUT2* gene. In the absence of active *FUT2*, *FUT3* adds a fucose to a disaccharide precursor to produce Lewis a (Le^a, major form) and Lewis x (Le^x, minor form) antigens [17]. A genome-wide association study (GWAS) conducted in Chinese patients diagnosed with UC demonstrated higher frequencies of mutant *FUT3* gene in UC patients compared to controls [18]. Higher frequencies of *FUT3* mutants were also observed in patients with distal colitis, along with an increased expression of the Lewis a antigen in the inflamed colon [18]. Other GWAS have demonstrated that multiple single nucleotide polymorphisms (SNPs) of the *FUT2* gene were associated with CD pathogenesis due to alterations of HBGA expression in the gut [19,20]. Unlike ileal CD, a Japanese study has documented the weak occurrence of relapses of colonic CD in non-secretor patients, which was related to the ectopic expression of secretor-dependent blood group antigens in inflammatory mucosa (Figure 1) [21]. Furthermore, Rausch et al. compared the bacterial composition in patients with CD and either a secretor or non-secretor phenotype. Secretor and non-secretor individuals had significant differences in their bacterial composition. Variations in HBGA composition changed the capacity for bacterial attachment and nutrition, with greater concentrations of *Lachnospiraceae* and decreased concentrations of *Faecalibacterium* or *Lactobacillus* spp. That being said, no correlation was established with enteric viruses [22].

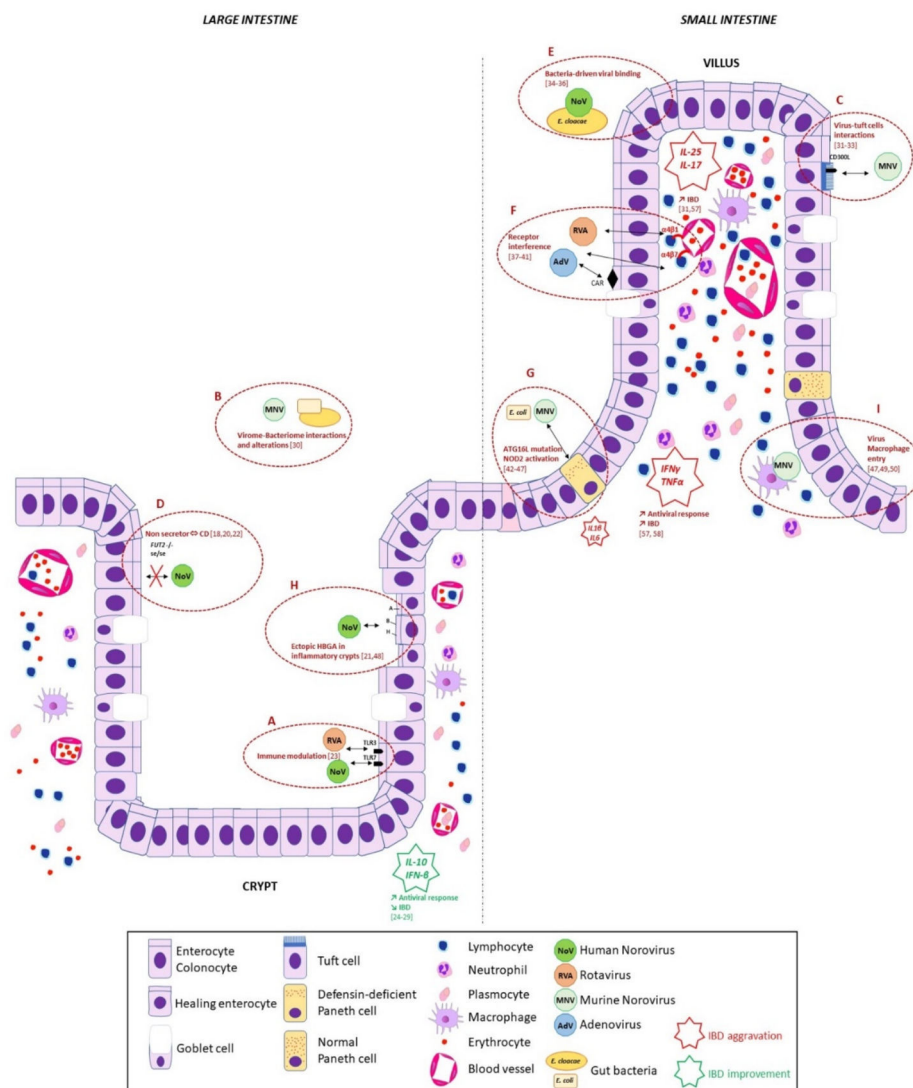


Figure 1. Summary of potential mechanisms underlying enteric virus interactions during the course of inflammatory bowel disease (IBD). Inflammatory pathways involved in IBD pathogenesis are shown in red and green stars. (A) Enteric viruses, such as rotavirus and norovirus, may modulate the immune response during IBD and improve the symptoms of IBD through the increased secretion of interferon β (IFN β) [23]. The protective role of interleukin (IL)-10 was confirmed in IL-10^{-/-} murine models showing enterocolitis after exposition to enteric viruses [24–29]. (B) Interactions of the gut bacteriome and virome could also explain IBD pathogenesis, for instance, an asymptomatic murine norovirus (MNV) infection could replace the effects of beneficial commensal bacteria [30]. (C) Recent scientific data revealed that norovirus may bind to tuft cells, which would then play an important role in the IL-25/IL-17 inflammatory pathway, as seen during IBD [31–33]. (D) The absence of histo-blood group antigen (HBGA) synthesis in non-secretor subjects carrying polymorphisms of the *FUT2* and *FUT3* genes could be linked to altered virus–bacteria–cell interactions and involved in the pathogenesis of IBD [18,20,22]. (E) Interactions between enteric viruses and HBGA-like molecules at the surface of commensal or pathogenic bacteria modulated by an “IBD-shaped” microbiota could explain the variations in susceptibility to enteric viruses during IBD [34–36]. (F) Binding of enteric viruses to critical receptors involved in leukocyte adhesion and cytokine secretion could also be part of IBD pathogenesis, as exemplified by rotavirus and adenovirus interactions with integrins, or activation of the Coxsackie–Adenovirus Receptor (CAR) [37–41]. (G) Specific interactions between enteric viruses (MNV) and defensin-deficient Paneth cells in patients carrying polymorphisms of the *ATG16L* gene could lead to the activation of the *NOD2* gene and upregulate T-helper 1 (Th1) or T-helper 17 (Th17) inflammatory pathways, as seen in IBD [42–47]. (H) Ectopic expression of HBGA in intestinal epithelium undergoing alterations induced by inflammation may modulate the binding potency of enteric viruses [21,48]. (I) Enteric virus entry in macrophages stimulates tumor necrosis factor alpha (TNF- α) and interferon gamma (IFN γ) secretion, which are involved in IBD pro-inflammatory pathways [47,49,50].

There is a clear interaction between noroviruses and intestinal tissues in pathologic conditions. For instance, greater expression of the sialylated Lewis x antigen (CD15s) has been described in Portuguese patients suffering from chronic gastritis and carrying the Cag-A positive *Helicobacter pylori* strain. However, there was no clear explanation for the phenomena underlying pathologic alterations of the glycosylation processes during inflammation, whether due to the display of the *H. pylori* strain or to pathologic alterations induced by inflammatory processes (Figure 1) [48]. The exact role of enteric viruses and their interactions with intestinal cells in the context of IBD is relatively unknown. However, there is increasing evidence of their implications in the dysregulation of inflammatory pathways and their complex interactions with bacterial and yeast organisms.

4. Enteric Virus Interactions with Bacteria in IBD

The interactions between enteric viruses and bacteria are complex and remain poorly explored: viral enteric infections could be promoted by intestinal eukaryotic bacteria, and bacterial infections could be promoted by enteric viruses [51]. For example, the selective interaction of noroviruses with bacteria expressing HBGA-like molecules, such as the *Enterobacter cloacae* SENG-6 strain, could inhibit norovirus binding on intestinal cells or, on the contrary, enhance norovirus infection (Figure 1) [34–36]. The decrease in *Enterobacter* sp. during severe IBD could also increase the probability of norovirus infection in the colonic mucosa [52]. Recent scientific literature has confirmed that the occurrence of IBD or IBD-like symptoms in mice, induced by murine noroviruses (MNV), might be highly dependent upon the composition of the murine gut microbiota without altering its composition [53,54]. Of course, murine models might tend to differ from human models, especially in complex multifactorial diseases like IBD. Microbiome studies have shown that human norovirus infections could disrupt the gut microbiota, resulting in a reduced number of bacteroidetes and increased proteobacteria, especially non-virulent *E. coli* strains [55,56]. Murine models further demonstrated that MNV could even shape the microbiota and replace the function of commensal bacteria in germ-free mice (Figure 1) [30]. Further studies will be required to detail the mechanisms underlying virome and bacteriome interactions in IBD patients and their role in the dysregulation of inflammatory pathways underlying IBD relapse.

5. Enteric Viruses and Inflammatory Pathways in IBD

The cellular mechanisms that underlie the activation of mucosal inflammation in IBD have largely been explored in recent decades, including the recruitment of inflammatory cells in the mucosa and the secretion of proinflammatory cytokines. The role of interleukin-17 (IL-17) and interferon gamma (IFN γ) in the T-helper 1 (Th1) and T-helper 17 (Th17) lymphocytic response is known to worsen the progression of CD and UC (Figure 1) [31,57]. Tumor necrosis factor alpha (TNF- α) is also known to increase proinflammatory interleukins at a mucosal level, and therefore increase mucosal inflammation [58]. By contrast, protective molecules like interleukin-10 and tumor growth factor beta (TGF- β) protect the mucosa from colitis and stimulate epithelial repair and ulcer healing [24,59]. Noroviruses are known to replicate in macrophages with the inhibition of replication mediated by IFN γ [49,50]. Interestingly, recent studies have shown that rotaviruses bind to $\alpha 4\beta 1$ integrins in MA104 and Caco-2 cell lines, whose integrins are involved in leukocyte adhesion and hematopoiesis [38–40]. Adenoviruses also use $\alpha 4\beta 1$ and $\alpha 4\beta 7$ integrins for binding in HT29 cells (Figure 1) [37]. Further investigations are needed to better understand the effects of enteric viruses in lymphocyte homing and their role in mucosal inflammation.

Current scientific data about the mechanisms underlying the putative role of enteric viruses in mucosal inflammation come mainly from murine models for practical, ethical, and financial reasons. Interestingly, enteric virus infections, including poliovirus, norovirus, and rotavirus, appear to be promoted by interactions with commensal bacteria through the action of bacterial lipopolysaccharides in murine models and cultured human B cells [60–64]. MNV could also disrupt the epithelial barrier and induce epithelial injury in IL-10-deficient mice, who are known to develop chronic enterocolitis, though without a

clear understanding of the repercussions on gut microbiota [25,26]. Further studies conducted in homozygous IL-10-deficient mice showed that MNV had no effect on the course of *H. pylori*-induced IBD, but it did have immunomodulatory effects on *H. bilis*-driven IBD, showing high secretion of IFN γ by polyclonal T cells [27–29].

As for human norovirus, norovirus challenge studies have revealed elevated levels of Th1 lymphocytic cytokines such as TNF α , IL-8, and IL-10 [65]. More precisely, IFN α and IFN β , but also IFN λ , could induce an antiviral gene expression cascade following norovirus or rotavirus infections (Figure 1) [66–68]. The role of enteric virus infections in the dysregulation of the interferon pathway during IBD remains unclear, especially because many patients undergo anti-TNF therapy, which in turn may downregulate the interferon antiviral response and alter the course of intestinal epithelial repair [69,70].

Conversely, the protective role of enteric viruses in the course of IBD is shown by other mechanisms: enteric viruses could alleviate intestinal inflammation via the production of IFN β , mediated by toll-like receptors (TLR) 3 and 7 (Figure 1) [23].

Concerning the IL-17 pathway (Th2 lymphocyte activation), recent studies have incriminated tuft cells, which are an immune mediator that plays a role in MNV pathogenesis. MNV could bind to tuft cells via the CD300L receptor and induce proliferation, which in return could stimulate the synthesis of interleukin 25 (IL-25) and therefore stimulate intestinal modeling and inflammation during IBD (Figure 1) [32,33].

6. Enteric Viruses and Autophagy in IBD

GWASs have helped to decipher the role of several autophagy genes involved in the pathogenesis of IBD [19]. The *NOD2* gene encodes for a pattern recognition receptor (PRR) that recruits ATG16L at the bacterial infection site [44]. It is well known that *NOD2* gene mutations induce CD and UC through exaggerated activation of NF- κ B in monocytes following bacterial stimulation [45,46]. In murine models, aberrant packaging of lysosomal granules in Paneth cells of the intestine linked to *ATG16L1^{HM}* mutations is triggered by MNV infection, which then leads to altered immune function in the mucosal barrier, reduced autophagy, and an increased risk of IBD (Figure 1) [42]. More specifically, in the context of CD, *ATG16L1^{HM}* polymorphisms may modulate proinflammatory responses upon *NOD2* activation, inducing IL-1 β and IL-6 release by peripheral blood mononuclear cells [43]. Moreover, MNV specifically activates *NOD1* and *NOD2* signaling pathways following macrophage entry, stimulating TNF- α production secondary to infection with pathogenic *E. coli* [47].

7. Enteric Virome Studies in IBD

It has recently been hypothesized that the mammalian intestinal virome could be related to intestinal homeostasis in relationship to eukaryotes and prokaryotes. This virome may thus contribute to disease pathogenesis through microbial lysis, epithelial cell infection, or immune activation following translocation through epithelial cells [71]. Next-generation sequencing (NGS) has recently been used to study the enteric virome. However, these studies show considerable discrepancies in viral identification and significant interindividual variability [72,73]. In captive rhesus macaques suffering from idiopathic chronic diarrhea (ICD), a disease similar to UC, virome studies revealed an increased prevalence of *Picornaviridae* (including poliovirus and enterovirus) compared to healthy controls [74]. A vast expansion of *Caudovirales* bacteriophages has been shown in the gut virome of human IBD patients, without any further characterization of pathogenic enteric viruses [75,76]. Additionally, high levels of *Anelloviridae* have been found in the stool of patients undergoing long-term immunosuppressive therapy [77]. A study conducted on 70 pediatric IBD patients using a high throughput sequencing method for virome analysis (VirCapSeq-Vert) found that there was a very low prevalence of enteric viruses (rotavirus, calicivirus, and adenovirus) in the stools of those who were newly diagnosed with UC [78].

8. Experimental Models of IBD in Enteric Viruses

Murine models mimicking IBD (chemically induced IBD or transgenic mice such as IL-10 homozygous deficient mice with altered immune function) tend to simulate one aspect of IBD. These murine models can be considered useful in phases 1 and 2 of drug trials, for the testing of new biomarkers, and as experimental models for immunological and microbial studies [79,80].

The use of new cell culture systems, such as human intestinal enteroids (HIEs), opens new research opportunities for IBD because they closely mimic physiological conditions. Indeed, HIEs represent the tri-dimensional reconstruction of cellular subtypes originating from one specific tissue type [81]. Recent studies have shown that HIEs react to cellular stress and increase the dendritic cell activation and endoplasmic reticulum synthesis of proinflammatory cytokines [82]. HIEs could also be used to examine the impairment of intestinal regeneration, the disruption of the epithelial barrier during IBD flares, or gene regulation and in vivo cellular interactions [83–86]. In a secretor-dependent fashion, norovirus binding and replication could be further examined in HIEs derived from IBD tissues [87,88]. Further modeling of personalized HIEs in IBD patients will help to understand the consequences of enteric virus binding and replication at a sub-cellular level.

9. Enteric Viruses and Therapies Used in IBD

The control of dysbiosis is a promising therapy for reducing IBD flare-ups, as exemplified by the use of probiotics and bacteriophages to target aggressive bacteria. Such therapy could be helpful in regulating the bacterial flora, and consequently, in modulating susceptibility to enteric viruses [89]. That being said, some of the biggest advances in IBD therapy include the use of TNF- α antagonists, Janus Kinase (JAK) inhibitors, and IL-12/23 antagonists [90]. Inhibitors of lymphocyte homing have also recently been developed for use against chemokine receptor 9 (CCR9) and the α 4 β 1 and α 4 β 7 integrins [90]. Previous observations of the close interactions of *ATG16L* gene polymorphisms, MNV infection in Paneth cell transformation, and induction of IBD in murine models suggest that TNF α blockade may slow disease progression and help prevent intestinal necroptosis [91]. One patient diagnosed with UC who also contracted a norovirus infection showed disease improvement following administration of infliximab [92]. Furthermore, the Coxsackie–Adenovirus Receptor (CAR), which is involved in the regulation of colon cells, could decrease the TNF α -induced inflammatory response when upregulated (Figure 1) [41]. The binding of adenoviruses to inflamed colon cells will need to be further examined in the context of anti-TNF therapy. For rotavirus, it appears that the 6-thioguanine drug could inhibit virus replication through inhibition of Rac1 GTP/GDP cycling [93]. The use of 6-thioguanine, which showed limited efficacy as a biotherapy in refractory IBD, could be discussed in patients with a concomitant rotavirus infection [94].

10. Conclusions

Epidemiological studies, even on a large scale, are insufficient to characterize the precise role of enteric viruses in IBD relapse. IBD is influenced by microbial factors, which vary considerably between individuals, complex inflammatory pathways, and cell–virus interactions. They are also affected by confounding variables such as diet, age, smoking, or psychological stress, as demonstrated in monozygotic twins [95,96].

Real-time integrated studies are needed to decipher the mechanisms underlying IBD pathogenesis. Such studies would then contribute to the development of personalized therapeutic approaches to IBD [97–99]. With the advent of artificial intelligence and big data, analysis of the “integratome” (from the so-called “integrated omics”) should also open new avenues of research for enteric virus infections in IBD [100]. However, in addition to potential ethical issues (genetic analyses or biologic sampling), these types of studies remain under development and imply considerable financial costs. Nevertheless, research in this domain holds great promise for the future. Finally, vaccination against major enteric

viruses (i.e., rotavirus and norovirus) could be a means of improving the management of patients suffering from IBD.

Author Contributions: Conceptualization: G.T. and G.B.; writing—original draft: G.T., M.C., G.B., and C.M.; writing—review and editing: G.T., G.B., M.C., L.M., and A.d.R. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Acknowledgments: We would like to thank Suzanne Rankin for her editorial assistance.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Alatab, S.; Sepanlou, S.G.; Ikuta, K.; Vahedi, H.; Bisignano, C.; Safiri, S.; Sadeghi, A.; Nixon, M.R.; Abdoli, A.; Abolhassani, H.; et al. The Global, Regional, and National Burden of Inflammatory Bowel Disease in 195 Countries and Territories, 1990–2017: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet Gastroenterol. Hepatol.* **2020**, *5*, 17–30. [[CrossRef](#)]
2. Lee, H.; Westerhoff, M.; Shen, B.; Liu, X. Clinical Aspects of Idiopathic Inflammatory Bowel Disease: A Review for Pathologists. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **2016**, *140*, 413–428. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Simmonds, N.; Furman, M.; Karanika, E.; Phillips, A.; Bates, A.W. Paneth Cell Metaplasia in Newly Diagnosed Inflammatory Bowel Disease in Children. *BMC Gastroenterol.* **2014**, *14*, 93. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Fiocchi, C. Inflammatory Bowel Disease: Etiology and Pathogenesis. *Gastroenterology* **1998**, *115*, 182–205. [[CrossRef](#)]
5. Lee, S.H.; Kwon, J.E.; Cho, M.-L. Immunological Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease. *Intest. Res.* **2018**, *16*, 26–42. [[CrossRef](#)]
6. Al-Zafiri, R.; Gologan, A.; Galiatsatos, P.; Szilagy, A. Cytomegalovirus Complicating Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterol. Hepatol.* **2012**, *8*, 230–239.
7. Römken, T.E.; Bulte, G.J.; Nissen, L.H.; Drenth, J.P. Cytomegalovirus in Inflammatory Bowel Disease: A Systematic Review. *World J. Gastroenterol.* **2016**, *22*, 1321–1330. [[CrossRef](#)]
8. Wisniewski, A.; Kirchgessner, J.; Seksik, P.; Landman, C.; Bourrier, A.; Nion-Larmurier, I.; Marteau, P.; Cosnes, J.; Sokol, H.; Beaugerie, L. Increased Incidence of Systemic Serious Viral Infections in Patients with Inflammatory Bowel Disease Associates with Active Disease and Use of Thiopurines. *United Eur. Gastroenterol. J.* **2020**, *8*, 303–313. [[CrossRef](#)]
9. Gebhard, R.L.; Greenberg, H.B.; Singh, N.; Henry, P.; Sharp, H.L.; Kaplan, L.; Kapikian, A.Z. Acute Viral Enteritis and Exacerbations of Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology* **1982**, *83*, 1207–1209. [[CrossRef](#)]
10. Khan, R.R.; Lawson, A.D.; Minnich, L.L.; Martin, K.; Nasir, A.; Emmett, M.K.; Welch, C.A.; Udall, J.N. Gastrointestinal Norovirus Infection Associated with Exacerbation of Inflammatory Bowel Disease. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **2009**, *48*, 328–333. [[CrossRef](#)]
11. Kolho, K.-L.; Klemola, P.; Simonen-Tikka, M.-L.; Ollonen, M.-L.; Roivainen, M. Enteric Viral Pathogens in Children with Inflammatory Bowel Disease. *J. Med. Virol.* **2012**, *84*, 345–347. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Masclee, G.M.C.; Penders, J.; Pierik, M.; Wolffs, P.; Jonkers, D. Enteropathogenic Viruses Triggers for Exacerbation in IBD? A Prospective Cohort Study Using Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction. *Inflamm. Bowel Dis.* **2013**, *19*, 124–131. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Axelrad, J.E.; Joelson, A.; Green, P.H.R.; Lawlor, G.; Lichtiger, S.; Cadwell, K.; Lebowitz, B. Enteric Infections Are Common in Patients with Flares of Inflammatory Bowel Disease. *Am. J. Gastroenterol.* **2018**, *113*, 1530–1539. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Axelrad, J.E.; Cadwell, K.H.; Colombel, J.-F.; Shah, S.C. Systematic Review: Gastrointestinal Infection and Incident Inflammatory Bowel Disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **2020**, *51*, 1222–1232. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Marionneau, S.; Ruvoën, N.; Le Moullac-Vaidye, B.; Clement, M.; Cailleau-Thomas, A.; Ruiz-Palacois, G.; Huang, P.; Jiang, X.; Le Pendu, J. Norwalk Virus Binds to Histo-Blood Group Antigens Present on Gastrointestinal Epithelial Cells of Secretor Individuals. *Gastroenterology* **2002**, *122*, 1967–1977. [[CrossRef](#)]
16. Ravn, V.; Dabelsteen, E. Tissue Distribution of Histo-Blood Group Antigens. *Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.* **2000**, *108*, 1–28. [[CrossRef](#)]
17. Cartron, J.-P.; Rouger, P. *Molecular Basis of Human Blood Group Antigens*; Springer: New York, NY, USA, 1995; ISBN 978-0-306-44853-9.
18. Hu, D.; Zhang, D.; Zheng, S.; Guo, M.; Lin, X.; Jiang, Y. Association of Ulcerative Colitis with FUT2 and FUT3 Polymorphisms in Patients from Southeast China. *PLoS ONE* **2016**, *11*. [[CrossRef](#)]
19. Franke, A.; McGovern, D.P.B.; Barrett, J.C.; Wang, K.; Radford-Smith, G.L.; Ahmad, T.; Lees, C.W.; Balschun, T.; Lee, J.; Roberts, R.; et al. Genome-Wide Meta-Analysis Increases to 71 the Number of Confirmed Crohn’s Disease Susceptibility Loci. *Nat. Genet.* **2010**, *42*, 1118–1125. [[CrossRef](#)]
20. McGovern, D.P.B.; Jones, M.R.; Taylor, K.D.; Marcianti, K.; Yan, X.; Dubinsky, M.; Ippoliti, A.; Vasiliauskas, E.; Berel, D.; Derkowski, C.; et al. Fucosyltransferase 2 (FUT2) Non-Secretor Status Is Associated with Crohn’s Disease. *Hum. Mol. Genet.* **2010**, *19*, 3468–3476. [[CrossRef](#)]

21. Miyoshi, J.; Yajima, T.; Okamoto, S.; Matsuoka, K.; Inoue, N.; Hisamatsu, T.; Shimamura, K.; Nakazawa, A.; Kanai, T.; Ogata, H.; et al. Ectopic Expression of Blood Type Antigens in Inflamed Mucosa with Higher Incidence of FUT2 Secretor Status in Colonic Crohn's Disease. *J. Gastroenterol.* **2011**, *46*, 1056–1063. [[CrossRef](#)]
22. Rausch, P.; Rehman, A.; Künzel, S.; Häslar, R.; Ott, S.J.; Schreiber, S.; Rosenstiel, P.; Franke, A.; Baines, J.F. Colonic Mucosa-Associated Microbiota Is Influenced by an Interaction of Crohn Disease and FUT2 (Secretor) Genotype. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 19030–19035. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Yang, J.-Y.; Kim, M.-S.; Kim, E.; Cheon, J.H.; Lee, Y.-S.; Kim, Y.; Lee, S.-H.; Seo, S.-U.; Shin, S.-H.; Choi, S.S.; et al. Enteric Viruses Ameliorate Gut Inflammation via Toll-like Receptor 3 and Toll-like Receptor 7-Mediated Interferon- β Production. *Immunity* **2016**, *44*, 889–900. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Li, M.-C.; He, S.-H. IL-10 and Its Related Cytokines for Treatment of Inflammatory Bowel Disease. *World J. Gastroenterol.* **2004**, *10*, 620–625. [[CrossRef](#)]
25. Basic, M.; Keubler, L.M.; Buettner, M.; Achard, M.; Breves, G.; Schröder, B.; Smoczek, A.; Jörns, A.; Wedekind, D.; Zschemisch, N.H.; et al. Norovirus Triggered Microbiota-Driven Mucosal Inflammation in Interleukin 10-Deficient Mice. *Inflamm. Bowel Dis.* **2014**, *20*, 431–443. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Kühn, R.; Löhler, J.; Rennick, D.; Rajewsky, K.; Müller, W. Interleukin-10-Deficient Mice Develop Chronic Enterocolitis. *Cell* **1993**, *75*, 263–274. [[CrossRef](#)]
27. Burich, A.; Hershberg, R.; Waggle, K.; Zeng, W.; Brabb, T.; Westrich, G.; Viney, J.L.; Maggio-Price, L. Helicobacter-Induced Inflammatory Bowel Disease in IL-10- and T Cell-Deficient Mice. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **2001**, *281*, G764–G778. [[CrossRef](#)]
28. Hsu, C.C.; Paik, J.; Treuting, P.M.; Seamons, A.; Meeker, S.M.; Brabb, T.L.; Maggio-Price, L. Infection with Murine Norovirus 4 Does Not Alter Helicobacter-Induced Inflammatory Bowel Disease in Il10(-/-) Mice. *Comp. Med.* **2014**, *64*, 256–263.
29. Lencioni, K.C.; Seamons, A.; Treuting, P.M.; Maggio-Price, L.; Brabb, T. Murine Norovirus: An Intercurrent Variable in a Mouse Model of Bacteria-Induced Inflammatory Bowel Disease. *Comp. Med.* **2008**, *58*, 522–533.
30. Kernbauer, E.; Ding, Y.; Cadwell, K. An Enteric Virus Can Replace the Beneficial Function of Commensal Bacteria. *Nature* **2014**, *516*, 94–98. [[CrossRef](#)]
31. Leppkes, M.; Becker, C.; Ivanov, I.I.; Hirth, S.; Wirtz, S.; Neufert, C.; Pouly, S.; Murphy, A.J.; Valenzuela, D.M.; Yancopoulos, G.D.; et al. ROR γ -Expressing Th17 Cells Induce Murine Chronic Intestinal Inflammation via Redundant Effects of IL-17A and IL-17F. *Gastroenterology* **2009**, *136*, 257–267. [[CrossRef](#)]
32. Ting, H.-A.; von Moltke, J. The Immune Function of Tuft Cells at Gut Mucosal Surfaces and Beyond. *J. Immunol.* **2019**, *202*, 1321–1329. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Wilen, C.B.; Lee, S.; Hsieh, L.-Y.; Orchard, R.C.; Desai, C.; Hykes, B.L.; McAllaster, M.R.; Balce, D.R.; Feehley, T.; Brestoff, J.R.; et al. Tropism for Tuft Cells Determines Immune Promotion of Norovirus Pathogenesis. *Science* **2018**, *360*, 204–208. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Almand, E.A.; Moore, M.D.; Outlaw, J.; Jaykus, L.-A. Human Norovirus Binding to Select Bacteria Representative of the Human Gut Microbiota. *PLoS ONE* **2017**, *12*. [[CrossRef](#)]
35. Lei, S.; Samuel, H.; Twitchell, E.; Bui, T.; Ramesh, A.; Wen, K.; Weiss, M.; Li, G.; Yang, X.; Jiang, X.; et al. Enterobacter Cloacae Inhibits Human Norovirus Infectivity in Gnotobiotic Pigs. *Sci. Rep.* **2016**, *6*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Lei, S.; Twitchell, E.L.; Ramesh, A.K.; Bui, T.; Majette, E.; Tin, C.M.; Avery, R.; Arango-Argoty, G.; Zhang, L.; Becker-Dreps, S.; et al. Enhanced GII.4 Human Norovirus Infection in Gnotobiotic Pigs Transplanted with a Human Gut Microbiota. *J. Gen. Virol.* **2019**, *100*, 1530–1540. [[CrossRef](#)]
37. Rajan, A.; Persson, B.D.; Frångsmyr, L.; Olofsson, A.; Sandblad, L.; Heino, J.; Takada, Y.; Mould, A.P.; Schnapp, L.M.; Gall, J.; et al. Enteric Species F Human Adenoviruses Use Laminin-Binding Integrins as Co-Receptors for Infection of Ht-29 Cells. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 10019. [[CrossRef](#)]
38. Hewish, M.J.; Takada, Y.; Coulson, B.S. Integrins A2 β 1 and A4 β 1 Can Mediate SA11 Rotavirus Attachment and Entry into Cells. *J. Virol.* **2000**, *74*, 228–236. [[CrossRef](#)]
39. Lin, K.C.; Castro, A.C. Very Late Antigen 4 (VLA4) Antagonists as Anti-Inflammatory Agents. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1998**, *2*, 453–457. [[CrossRef](#)]
40. Coulson, B.S.; Londrigan, S.L.; Lee, D.J. Rotavirus Contains Integrin Ligand Sequences and a Disintegrin-like Domain That Are Implicated in Virus Entry into Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 5389–5394. [[CrossRef](#)]
41. Chen, X.; Liu, R.; Liu, X.; Xu, C.; Wang, X. Protective Role of Coxsackie-Adenovirus Receptor in the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Diseases. *BioMed Res. Int.* **2018**, *2018*, 7207268. [[CrossRef](#)]
42. Cadwell, K.; Patel, K.K.; Maloney, N.S.; Liu, T.-C.; Ng, A.C.Y.; Storer, C.E.; Head, R.D.; Xavier, R.; Stappenbeck, T.S.; Virgin, H.W. Virus-Plus-Susceptibility Gene Interaction Determines Crohn's Disease Gene Atg16L1 Phenotypes in Intestine. *Cell* **2010**, *141*, 1135–1145. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Plantinga, T.S.; Crisan, T.O.; Oosting, M.; van de Veerdonk, F.L.; de Jong, D.J.; Philpott, D.J.; van der Meer, J.W.M.; Girardin, S.E.; Joosten, L.A.B.; Netea, M.G. Crohn's Disease-Associated ATG16L1 Polymorphism Modulates pro-Inflammatory Cytokine Responses Selectively upon Activation of NOD2. *Gut* **2011**, *60*, 1229–1235. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

44. Homer, C.R.; Richmond, A.L.; Rebert, N.A.; Achkar, J.-P.; McDonald, C. ATG16L1 and NOD2 Interact in an Autophagy-Dependent, Anti-Bacterial Pathway Implicated in Crohn's Disease Pathogenesis. *Gastroenterology* **2010**, *139*, 1630–1641.e2. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Hugot, J.P.; Chamaillard, M.; Zouali, H.; Lesage, S.; Cézard, J.P.; Belaiche, J.; Almer, S.; Tysk, C.; O'Morain, C.A.; Gassull, M.; et al. Association of NOD2 Leucine-Rich Repeat Variants with Susceptibility to Crohn's Disease. *Nature* **2001**, *411*, 599–603. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Ogura, Y.; Bonen, D.K.; Inohara, N.; Nicolae, D.L.; Chen, F.F.; Ramos, R.; Britton, H.; Moran, T.; Karaliuskas, R.; Duerr, R.H.; et al. A Frameshift Mutation in NOD2 Associated with Susceptibility to Crohn's Disease. *Nature* **2001**, *411*, 603–606. [[CrossRef](#)]
47. Kim, Y.-G.; Park, J.-H.; Reimer, T.; Baker, D.P.; Kawai, T.; Kumar, H.; Akira, S.; Wobus, C.; Núñez, G. Viral Infection Augments Nod1/2 Signaling to Potentiate Lethality Associated With Secondary Bacterial Infections. *Cell Host Microbe* **2011**, *9*, 496–507. [[CrossRef](#)]
48. Ruvoën-Clouet, N.; Magalhaes, A.; Marcos-Silva, L.; Breiman, A.; Figueiredo, C.; David, L.; Le Pendu, J. Increase in Genogroup II.4 Norovirus Host Spectrum by CagA-Positive Helicobacter Pylori Infection. *J. Infect. Dis.* **2014**, *210*, 183–191. [[CrossRef](#)]
49. Maloney, N.S.; Thackray, L.B.; Goel, G.; Hwang, S.; Duan, E.; Vachharajani, P.; Xavier, R.; Virgin, H.W. Essential Cell-Autonomous Role for Interferon (IFN) Regulatory Factor 1 in IFN- γ -Mediated Inhibition of Norovirus Replication in Macrophages. *J. Virol.* **2012**, *86*, 12655–12664. [[CrossRef](#)]
50. Wobus, C.E.; Karst, S.M.; Thackray, L.B.; Chang, K.-O.; Sosnovtsev, S.V.; Belliot, G.; Krug, A.; Mackenzie, J.M.; Green, K.Y.; Virgin, H.W. Replication of Norovirus in Cell Culture Reveals a Tropism for Dendritic Cells and Macrophages. *PLoS Biol.* **2004**, *2*. [[CrossRef](#)]
51. Pfeiffer, J.K.; Virgin, H.W. Transkingdom Control of Viral Infection and Immunity in the Mammalian Intestine. *Science* **2016**, *351*. [[CrossRef](#)]
52. Ott, S.J.; Musfeldt, M.; Wenderoth, D.F.; Hampe, J.; Brant, O.; Fölsch, U.R.; Timmis, K.N.; Schreiber, S. Reduction in Diversity of the Colonic Mucosa Associated Bacterial Microflora in Patients with Active Inflammatory Bowel Disease. *Gut* **2004**, *53*, 685–693. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Bolsega, S.; Basic, M.; Smoczek, A.; Buettner, M.; Eberl, C.; Ahrens, D.; Odum, K.A.; Stecher, B.; Bleich, A. Composition of the Intestinal Microbiota Determines the Outcome of Virus-Triggered Colitis in Mice. *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 1708. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Nelson, A.M.; Elftman, M.D.; Pinto, A.K.; Baldrige, M.; Hooper, P.; Kuczynski, J.; Petrosino, J.F.; Young, V.B.; Wobus, C.E. Murine Norovirus Infection Does Not Cause Major Disruptions in the Murine Intestinal Microbiota. *Microbiome* **2013**, *1*, 7. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Bloom, S.M.; Bijanki, V.N.; Nava, G.M.; Sun, L.; Malvin, N.P.; Donermeyer, D.L.; Dunne, W.M.; Allen, P.M.; Stappenbeck, T.S. Commensal Bacteroides Species Induce Colitis in Host-Genotype-Specific Fashion in a Mouse Model of Inflammatory Bowel Disease. *Cell Host Microbe* **2011**, *9*, 390–403. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Nelson, A.M.; Walk, S.T.; Taube, S.; Taniuchi, M.; Houpt, E.R.; Wobus, C.E.; Young, V.B. Disruption of the Human Gut Microbiota Following Norovirus Infection. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e48224. [[CrossRef](#)]
57. Ito, R.; Shin-Ya, M.; Kishida, T.; Urano, A.; Takada, R.; Sakagami, J.; Imanishi, J.; Kita, M.; Ueda, Y.; Iwakura, Y.; et al. Interferon-Gamma Is Causatively Involved in Experimental Inflammatory Bowel Disease in Mice. *Clin. Exp. Immunol.* **2006**, *146*, 330–338. [[CrossRef](#)]
58. Murch, S.H.; Braegger, C.P.; Walker-Smith, J.A.; MacDonald, T.T. Location of Tumour Necrosis Factor Alpha by Immunohistochemistry in Chronic Inflammatory Bowel Disease. *Gut* **1993**, *34*, 1705–1709. [[CrossRef](#)]
59. Rani, R.; Smulian, A.G.; Greaves, D.R.; Hogan, S.P.; Herbert, D.R. TGF- β Limits IL-33 Production and Promotes the Resolution of Colitis through Regulation of Macrophage Function. *Eur. J. Immunol.* **2011**, *41*, 2000–2009. [[CrossRef](#)]
60. Jones, M.K.; Watanabe, M.; Zhu, S.; Graves, C.L.; Keyes, L.R.; Grau, K.R.; Gonzalez-Hernandez, M.B.; Iovine, N.M.; Wobus, C.E.; Vinjé, J.; et al. Enteric Bacteria Promote Human and Mouse Norovirus Infection of B Cells. *Science* **2014**, *346*, 755. [[CrossRef](#)]
61. Kuss, S.K.; Best, G.T.; Etheredge, C.A.; Pruijssers, A.J.; Frierson, J.M.; Hooper, L.V.; Dermody, T.S.; Pfeiffer, J.K. Intestinal Microbiota Promote Enteric Virus Replication and Systemic Pathogenesis. *Science* **2011**, *334*, 249–252. [[CrossRef](#)]
62. Robinson, C.M.; Jesudhasan, P.R.; Pfeiffer, J.K. Bacterial Lipopolysaccharide Binding Enhances Virion Stability and Promotes Environmental Fitness of an Enteric Virus. *Cell Host Microbe* **2014**, *15*, 36–46. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Roth, A.N.; Grau, K.R.; Karst, S.M. Diverse Mechanisms Underlie Enhancement of Enteric Viruses by the Mammalian Intestinal Microbiota. *Viruses* **2019**, *11*, 760. [[CrossRef](#)]
64. Uchiyama, R.; Chassaing, B.; Zhang, B.; Gewirtz, A.T. Antibiotic Treatment Suppresses Rotavirus Infection and Enhances Specific Humoral Immunity. *J. Infect. Dis.* **2014**, *210*, 171–182. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Newman, K.L.; Moe, C.L.; Kirby, A.E.; Flanders, W.D.; Parkos, C.A.; Leon, J.S. Human Norovirus Infection and the Acute Serum Cytokine Response. *Clin. Exp. Immunol.* **2015**, *182*, 195–203. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Baldrige, M.T.; Lee, S.; Brown, J.J.; McAllister, N.; Urbanek, K.; Dermody, T.S.; Nice, T.J.; Virgin, H.W. Expression of Ifnlr1 on Intestinal Epithelial Cells Is Critical to the Antiviral Effects of Interferon Lambda against Norovirus and Reovirus. *J. Virol.* **2017**, *91*, e02079-16. [[CrossRef](#)]

67. Hernández, P.P.; Mahlakoiv, T.; Yang, I.; Schwierzeck, V.; Nguyen, N.; Guendel, F.; Gronke, K.; Ryffel, B.; Hoelscher, C.; Dumoutier, L.; et al. Interferon- λ and Interleukin 22 Act Synergistically for the Induction of Interferon-Stimulated Genes and Control of Rotavirus Infection. *Nat. Immunol.* **2015**, *16*, 698–707. [[CrossRef](#)]
68. Metzger, R.N.; Krug, A.B.; Eisenächer, K. Enteric Virome Sensing—Its Role in Intestinal Homeostasis and Immunity. *Viruses* **2018**, *10*, 146. [[CrossRef](#)]
69. Agnholt, J.; Kaltoft, K. Infliximab Downregulates Interferon-Gamma Production in Activated Gut T-Lymphocytes from Patients with Crohn’s Disease. *Cytokine* **2001**, *15*, 212–222. [[CrossRef](#)]
70. Hu, S.; Yuan, J.; Xu, J.; Li, X.; Zhang, G.; Ma, Q.; Zhang, B.; Hu, T.; Song, G. TNF- α and IFN- γ Synergistically Inhibit the Repairing Ability of Mesenchymal Stem Cells on Mice Colitis and Colon Cancer. *Am. J. Transl. Res.* **2019**, *11*, 6207–6220.
71. Carding, S.R.; Davis, N.; Hoyles, L. Review Article: The Human Intestinal Virome in Health and Disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **2017**, *46*, 800–815. [[CrossRef](#)]
72. Minot, S.; Sinha, R.; Chen, J.; Li, H.; Keilbaugh, S.A.; Wu, G.D.; Lewis, J.D.; Bushman, F.D. The Human Gut Virome: Inter-Individual Variation and Dynamic Response to Diet. *Genome Res.* **2011**, *21*, 1616–1625. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Minot, S.; Bryson, A.; Chehoud, C.; Wu, G.D.; Lewis, J.D.; Bushman, F.D. Rapid Evolution of the Human Gut Virome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, 12450–12455. [[CrossRef](#)]
74. Kapusinszky, B.; Ardeshir, A.; Mulvaney, U.; Deng, X.; Delwart, E. Case-Control Comparison of Enteric Viromes in Captive Rhesus Macaques with Acute or Idiopathic Chronic Diarrhea. *J. Virol.* **2017**, *91*, e00952-17. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Fernandes, M.A.; Verstraete, S.G.; Phan, T.G.; Deng, X.; Stekol, E.; LaMere, B.; Lynch, S.V.; Heyman, M.B.; Delwart, E. Enteric Virome and Bacterial Microbiota in Children with Ulcerative Colitis and Crohn’s Disease. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **2019**, *68*, 30–36. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Norman, J.M.; Handley, S.A.; Baldridge, M.T.; Droit, L.; Liu, C.Y.; Keller, B.C.; Kambal, A.; Monaco, C.L.; Zhao, G.; Fleshner, P.; et al. Disease-Specific Alterations in the Enteric Virome in Inflammatory Bowel Disease. *Cell* **2015**, *160*, 447–460. [[CrossRef](#)]
77. Liang, G.; Conrad, M.A.; Kelsen, J.R.; Kessler, L.R.; Breton, J.; Albenberg, L.G.; Marakos, S.; Galgano, A.; Devas, N.; Erlichman, J.; et al. The Dynamics of the Stool Virome in Very Early Onset Inflammatory Bowel Disease. *J. Crohns Colitis* **2020**, *14*, 1600–1610. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
78. Tokarz, R.; Hyams, J.S.; Mack, D.R.; Boyle, B.; Griffiths, A.M.; LeLeiko, N.S.; Sauer, C.G.; Shah, S.; Markowitz, J.; Baker, S.S.; et al. Characterization of Stool Virome in Children Newly Diagnosed with Moderate to Severe Ulcerative Colitis. *Inflamm. Bowel Dis.* **2019**, *25*, 1656–1662. [[CrossRef](#)]
79. DeVoss, J.; Diehl, L. Murine Models of Inflammatory Bowel Disease (IBD): Challenges of Modeling Human Disease. *Toxicol. Pathol.* **2014**, *42*, 99–110. [[CrossRef](#)]
80. Kiesler, P.; Fuss, I.J.; Strober, W. Experimental Models of Inflammatory Bowel Diseases. *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.* **2015**, *1*, 154–170. [[CrossRef](#)]
81. Zou, W.Y.; Blutt, S.E.; Crawford, S.E.; Ettayebi, K.; Zeng, X.-L.; Saxena, K.; Ramani, S.; Karandikar, U.C.; Zachos, N.C.; Estes, M.K. Human Intestinal Enteroids: New Models to Study Gastrointestinal Virus Infections. *Methods Mol. Biol.* **2019**, *1576*, 229–247. [[CrossRef](#)]
82. Rees, W.D.; Stahl, M.; Jacobson, K.; Bressler, B.; Sly, L.M.; Vallance, B.A.; Steiner, T.S. Enteroids Derived From Inflammatory Bowel Disease Patients Display Dysregulated Endoplasmic Reticulum Stress Pathways, Leading to Differential Inflammatory Responses and Dendritic Cell Maturation. *J. Crohns Colitis* **2020**, *14*, 948–961. [[CrossRef](#)]
83. Buttó, L.F.; Pelletier, A.; More, S.K.; Zhao, N.; Osme, A.; Hager, C.L.; Ghannoum, M.A.; Sekaly, R.-P.; Cominelli, F.; Dave, M. Intestinal Stem Cell Niche Defects Result in Impaired 3D Organoid Formation in Mouse Models of Crohn’s Disease-like Ileitis. *Stem Cell Rep.* **2020**, *15*, 389–407. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Meir, M.; Salm, J.; Fey, C.; Schweinlin, M.; Kollmann, C.; Kannapin, F.; Germer, C.-T.; Waschke, J.; Beck, C.; Burkard, N.; et al. Enteroids Generated from Patients with Severe Inflammation in Crohn’s Disease Maintain Alterations of Junctional Proteins. *J. Crohns Colitis* **2020**, *14*, 1473–1487. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
85. Chen, Y.; Zhou, W.; Roh, T.; Estes, M.K.; Kaplan, D.L. In Vitro Enteroid-Derived Three-Dimensional Tissue Model of Human Small Intestinal Epithelium with Innate Immune Responses. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0187880. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
86. Treveil, A.; Sudhakar, P.; Matthews, Z.J.; Wrzesiński, T.; Jones, E.J.; Brooks, J.; Ölbei, M.; Hautefort, I.; Hall, L.J.; Carding, S.R.; et al. Regulatory Network Analysis of Paneth Cell and Goblet Cell Enriched Gut Organoids Using Transcriptomics Approaches. *Mol. Omics* **2020**, *16*, 39–58. [[CrossRef](#)]
87. Ettayebi, K.; Crawford, S.E.; Murakami, K.; Broughman, J.R.; Karandikar, U.; Tenge, V.R.; Neill, F.H.; Blutt, S.E.; Zeng, X.-L.; Qu, L.; et al. Replication of Human Noroviruses in Stem Cell-Derived Human Enteroids. *Science* **2016**, *353*, 1387–1393. [[CrossRef](#)]
88. Costantini, V.; Morantz, E.K.; Browne, H.; Ettayebi, K.; Zeng, X.-L.; Atmar, R.L.; Estes, M.K.; Vinjé, J. Human Norovirus Replication in Human Intestinal Enteroids as Model to Evaluate Virus Inactivation. *Emerg. Infect. Dis.* **2018**, *24*, 1453–1464. [[CrossRef](#)]
89. Sartor, R.B.; Wu, G.D. Roles for Intestinal Bacteria, Viruses, and Fungi in Pathogenesis of Inflammatory Bowel Diseases and Therapeutic Approaches. *Gastroenterology* **2017**, *152*, 327–339.e4. [[CrossRef](#)]
90. Pedersen, J.; Coskun, M.; Soendergaard, C.; Salem, M.; Nielsen, O.H. Inflammatory Pathways of Importance for Management of Inflammatory Bowel Disease. *World J. Gastroenterol.* **2014**, *20*, 64–77. [[CrossRef](#)]

91. Matsuzawa-Ishimoto, Y.; Shono, Y.; Gomez, L.E.; Hubbard-Lucey, V.M.; Cammer, M.; Neil, J.; Dewan, M.Z.; Lieberman, S.R.; Lazrak, A.; Marinis, J.M.; et al. Autophagy Protein ATG16L1 Prevents Necroptosis in the Intestinal Epithelium. *J. Exp. Med.* **2017**, *214*, 3687–3705. [[CrossRef](#)]
92. O'Connor, J.P.A.; O'Moráin, C.A.; Neary, P.; Breslin, N.P. Use of Infliximab as Rescue Therapy in Acute Severe Ulcerative Colitis with Recent Norovirus Infection. *J. Crohns Colitis* **2009**, *3*, 204–206. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
93. Yin, Y.; Chen, S.; Hakim, M.S.; Wang, W.; Xu, L.; Dang, W.; Qu, C.; Verhaar, A.P.; Su, J.; Fuhler, G.M.; et al. 6-Thioguanine Inhibits Rotavirus Replication through Suppression of Rac1 GDP/GTP Cycling. *Antiviral Res.* **2018**, *156*, 92–101. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
94. Ward, M.G.; Patel, K.V.; Kariyawasam, V.C.; Goel, R.; Warner, B.; Elliott, T.R.; Blaker, P.A.; Irving, P.M.; Marinaki, A.M.; Sanderson, J.D. Thioguanine in Inflammatory Bowel Disease: Long-Term Efficacy and Safety. *United Eur. Gastroenterol. J.* **2017**, *5*, 563–570. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
95. Halfvarson, J.; Bodin, L.; Tysk, C.; Lindberg, E.; Järnerot, G. Inflammatory Bowel Disease in a Swedish Twin Cohort: A Long-Term Follow-up of Concordance and Clinical Characteristics. *Gastroenterology* **2003**, *124*, 1767–1773. [[CrossRef](#)]
96. Tysk, C.; Lindberg, E.; Järnerot, G.; Flodérus-Myrhed, B. Ulcerative Colitis and Crohn's Disease in an Unselected Population of Monozygotic and Dizygotic Twins. A Study of Heritability and the Influence of Smoking. *Gut* **1988**, *29*, 990–996. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
97. Imhann, F.; Van der Velde, K.J.; Barbieri, R.; Alberts, R.; Voskuil, M.D.; Vich Vila, A.; Collij, V.; Spekhorst, L.M.; der Sloot KWJ, V.; Peters, V.; et al. The 1000IBD Project: Multi-Omics Data of 1000 Inflammatory Bowel Disease Patients; Data Release 1. *BMC Gastroenterol.* **2019**, *19*, 5. [[CrossRef](#)]
98. Kumar, M.; Garand, M.; Al Khodor, S. Integrating Omics for a Better Understanding of Inflammatory Bowel Disease: A Step towards Personalized Medicine. *J. Transl. Med.* **2019**, *17*, 419. [[CrossRef](#)]
99. Lloyd-Price, J.; Arze, C.; Ananthakrishnan, A.N.; Schirmer, M.; Avila-Pacheco, J.; Poon, T.W.; Andrews, E.; Ajami, N.J.; Bonham, K.S.; Brislawn, C.J.; et al. Multi-Omics of the Gut Microbial Ecosystem in Inflammatory Bowel Diseases. *Nature* **2019**, *569*, 655–662. [[CrossRef](#)]
100. Fiocchi, C. Integrating Omics: The Future of IBD? *Dig. Dis.* **2014**, *32*, 96–102. [[CrossRef](#)]

ANNEXE 3 : TABLEAUX DES PROTOCOLES D'UTILISATION SUR AUTOMATE DAKO OMNIS®

Alcool 100°	1 heure 30
Alcool 100°	30 minutes
Alcool 100°	1 heure
Alcool 100°	1 heure
Alcool 100°	1 heure
Alcool 100°	1 heure 30
Toluène	30 minutes
Toluène	45 minutes
Toluène	1 heure 15
Paraffine	30 minutes
Paraffine	1 heure
Paraffine	1 heure
Paraffine	1 heure

Tableau 9. Protocole de déshydratation et d'inclusion en paraffine des tissus préalablement fixés dans le formol tamponné à 4%, dans l'automate Tissue-Tek VIP®. La colonne de gauche indique les bains et la colonne de droite indique la durée d'immersion des tissus, selon un ordre successif allant de haut en bas.

Xylène	2 minutes
Xylène	4 minutes
Alcool 100°	1 minute
Alcool 80° + Hydroxyde de potassium	2 minutes
Eau courante	2 minutes
Eau distillée	30 secondes
Hématoxyline	4 minutes
Eau courante	2 minutes
Eau chlorhydrique	10 secondes
Eau bicarbonatée	45 secondes
Eau courante	1 minute
Eau distillée	30 secondes
Eosine	2 minutes
Eau courante	1 minute
Alcool 100°	30 secondes
Alcool 100°	30 secondes
Safran	20 secondes
Alcool 100°	30 secondes
Alcool 100°	30 secondes
Xylène	30 secondes
Xylène	15 secondes

Tableau 10. Protocole de coloration standard par Hématoxyline Eosine Safran (HES) des lames blanches sur l'automate Tissue-Tek Prisma®. Les bains utilisés pour immersion des lames blanches paraffine sont indiqués sur la colonne de gauche ; les temps d'immersion sont indiqués sur la colonne de droite, de manière successive de haut en bas.

Xylène	2 minutes
Xylène	2 minutes
Alcool 100°	1 minute
Alcool 80° + Hydroxyde de Potassium	2 minutes
Eau courante	2 minutes
Eau distillée	Avant utilisation

Tableau 11. Programme de déparaffinage « long » de l'automate Tissue-Tek Prisma®. La colonne de gauche indique les bains réalisés, et la colonne de droite indique les temps d'immersion des lames dans les différents bains successifs indiqués de haut en bas.

ANNEXE 4 : AUTORISATIONS LEGALES



Secrétariat : Madame Brigitte PILATE-DAUSSY
(Portail des Champs – Secteur Bleu – Porte 74 bis – RDC)
e-mail : cpp.idf.7-bicetre@wanadoo.fr
site internet : <http://cpp.idf.7.bicetre.free.fr>
Téléphone : 01 45 21 28 46 – Télécopie : 01 45 21 21 45
Portable : 06 21 25 49 30

Bureau :
Présidente : Anne-Marie TABURET
Vice Présidente : Françoise BOISSY
Trésorier : Claude COTTET
Secrétaire : François HIRSCH

A Madame PHU
CHU Dijon Bourgogne

Avis simplifié

Le CPP IdF VII a évalué votre protocole identifié par les n° 18.11.29.52329 et **CPP19002** et dont le titre est :

« Expression des antigènes tissulaires de groupe sanguin et susceptibilité aux infections à Norovirus au cours des Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin (MICI) »

à la séance plénière du **9 janvier 2019**.

À la suite des réponses aux questions posées, reçues le **28 mars 2019** et évaluées en bureau,

le CPP donne **un avis favorable**

Le 10 avril 2019

Anne-Marie Taburet

Le comité a été saisi : 09-05-2013

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

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

Le Comité a examiné les documents suivants relatifs à ce projet :

- Protocole de l'étude

Ont participé à la délibération :

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

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

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

Le comité a adopté la décision suivante :

Avis favorable

Date de l'avis : 28-05-2013

Signature du Président du Comité d'Ethique



REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

- Abe, K., Hakomori, S., and Ohshiba, S. (1986). Differential expression of difucosyl type 2 chain (LeY) defined by monoclonal antibody AH6 in different locations of colonic epithelia, various histological types of colonic polyps, and adenocarcinomas. *Cancer Res* 46, 2639–2644.
- Abegunde, A.T., Muhammad, B.H., Bhatti, O., and Ali, T. (2016). Environmental risk factors for inflammatory bowel diseases: Evidence based literature review. *World J Gastroenterol* 22, 6296–6317.
- Agnholt, J., and Kaltoft, K. (2001). Infliximab downregulates interferon-gamma production in activated gut T-lymphocytes from patients with Crohn's disease. *Cytokine* 15, 212–222.
- Agus, S.G., Dolin, R., Wyatt, R.G., Tousimis, A.J., and Northrup, R.S. (1973). Acute infectious nonbacterial gastroenteritis: intestinal histopathology. Histologic and enzymatic alterations during illness produced by the Norwalk agent in man. *Ann Intern Med* 79, 18–25.
- Alatab, S., Sepanlou, S.G., Ikuta, K., Vahedi, H., Bisignano, C., Safiri, S., Sadeghi, A., Nixon, M.R., Abdoli, A., Abolhassani, H., et al. (2020). The global, regional, and national burden of inflammatory bowel disease in 195 countries and territories, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *The Lancet Gastroenterology & Hepatology* 5, 17–30.
- d'Aldebert, E., Quaranta, M., Sébert, M., Bonnet, D., Kirzin, S., Portier, G., Duffas, J.-P., Chabot, S., Lluel, P., Allart, S., et al. (2020). Characterization of Human Colon Organoids From Inflammatory Bowel Disease Patients. *Front Cell Dev Biol* 8, 363.
- Allen, D.J., Gray, J.J., Gallimore, C.I., Xerry, J., and Iturriza-Gómara, M. (2008). Analysis of amino acid variation in the P2 domain of the GII-4 norovirus VP1 protein reveals putative variant-specific epitopes. *PLoS One* 3, e1485.
- Almand, E.A., Moore, M.D., Outlaw, J., and Jaykus, L.-A. (2017). Human norovirus binding to select bacteria representative of the human gut microbiota. *PLoS One* 12, e0173124.
- Ando, T., Noel, J.S., and Fankhauser, R.L. (2000). Genetic classification of "Norwalk-like viruses. *J Infect Dis* 181 Suppl 2, S336-348.
- Asanaka, M., Atmar, R.L., Ruvolo, V., Crawford, S.E., Neill, F.H., and Estes, M.K. (2005). Replication and packaging of Norwalk virus RNA in cultured mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 10327–10332.
- Axelrad, J.E., Joelson, A., Green, P.H.R., Lawlor, G., Lichtiger, S., Cadwell, K., and Lebowitz, B. (2018). Enteric Infections Are Common in Patients with Flares of Inflammatory Bowel Disease. *Am J Gastroenterol* 113, 1530–1539.
- Ayouni, S., Sdiri-Loulizi, K., de Rougemont, A., Estienney, M., Ambert-Balay, K., Aho, S., Hamami, S., Aouni, M., Neji-Guediche, M., Pothier, P., et al. (2015a). Rotavirus P[8] Infections in Persons with Secretor and Nonsecretor Phenotypes, Tunisia. *Emerg Infect Dis* 21, 2055–2058.
- Ayouni, S., Estienney, M., Sdiri-Loulizi, K., Ambert-Balay, K., de Rougemont, A., Aho, S., Hammami, S., Aouni, M., Guédiche, M.N., Pothier, P., et al. (2015b). Relationship between GII.3 norovirus infections and blood group antigens in young children in Tunisia. *Clinical Microbiology and Infection* 21, 874.e1-874.e8.

B

Baldrige, M.T., Lee, S., Brown, J.J., McAllister, N., Urbanek, K., Dermody, T.S., Nice, T.J., and Virgin, H.W. (2017). Expression of Ifnlr1 on Intestinal Epithelial Cells Is Critical to the Antiviral Effects of Interferon Lambda against Norovirus and Reovirus. *Journal of Virology* 91.

Baldus, S.E., Thiele, J., Park, Y.O., Hanisch, F.G., Bara, J., and Fischer, R. (1996). Characterization of the binding specificity of *Anguilla anguilla* agglutinin (AAA) in comparison to *Ulex europaeus* agglutinin I (UEA-I). *Glycoconj J* 13, 585–590.

Barbé, L., Le Moullac-Vaidye, B., Echasserieu, K., Bernardeau, K., Carton, T., Bovin, N., Nordgren, J., Svensson, L., Ruvoën-Clouet, N., and Le Pendu, J. (2018). Histo-blood group antigen-binding specificities of human rotaviruses are associated with gastroenteritis but not with in vitro infection. *Sci Rep* 8.

Bartsch, S.M., Lopman, B.A., Ozawa, S., Hall, A.J., and Lee, B.Y. (2016). Global Economic Burden of Norovirus Gastroenteritis. *PLoS One* 11, e0151219.

Basic, M., Keubler, L.M., Buettner, M., Achard, M., Breves, G., Schröder, B., Smoczek, A., Jörns, A., Wedekind, D., Zschemisch, N.H., et al. (2014). Norovirus triggered microbiota-driven mucosal inflammation in interleukin 10-deficient mice. *Inflamm Bowel Dis* 20, 431–443.

Belliot, G., Noel, J.S., Li, J.F., Seto, Y., Humphrey, C.D., Ando, T., Glass, R.I., and Monroe, S.S. (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.

Belliot, G., Sosnovtsev, S.V., Mitra, T., Hammer, C., Garfield, M., and Green, K.Y. (2003). In vitro proteolytic processing of the MD145 norovirus ORF1 nonstructural polyprotein yields stable precursors and products similar to those detected in calicivirus-infected cells. *J Virol* 77, 10957–10974.

Belliot, G., Sosnovtsev, S.V., Chang, K.-O., Babu, V., Uche, U., Arnold, J.J., Cameron, C.E., and Green, K.Y. (2005). Norovirus proteinase-polymerase and polymerase are both active forms of RNA-dependent RNA polymerase. *J Virol* 79, 2393–2403.

Belliot, G., Sosnovtsev, S.V., Chang, K.-O., McPhie, P., and Green, K.Y. (2008). Nucleotidylation of the VPg protein of a human norovirus by its proteinase-polymerase precursor protein. *Virology* 374, 33–49.

Bertolotti-Ciarlet, A., White, L.J., Chen, R., Prasad, B.V.V., and Estes, M.K. (2002). Structural requirements for the assembly of Norwalk virus-like particles. *J Virol* 76, 4044–4055.

Blaney, D.D., Daly, E.R., Kirkland, K.B., Tongren, J.E., Kelso, P.T., and Talbot, E.A. (2011). Use of alcohol-based hand sanitizers as a risk factor for norovirus outbreaks in long-term care facilities in northern New England: December 2006 to March 2007. *Am J Infect Control* 39, 296–301.

Bloom, S.M., Bijanki, V.N., Nava, G.M., Sun, L., Malvin, N.P., Donermeyer, D.L., Dunne, W.M., Allen, P.M., and Stappenbeck, T.S. (2011). Commensal *Bacteroides* species induce colitis in host-genotype-specific fashion in a mouse model of inflammatory bowel disease. *Cell Host Microbe* 9, 390–403.

Bolsega, S., Basic, M., Smoczek, A., Buettner, M., Eberl, C., Ahrens, D., Odum, K.A., Stecher, B., and Bleich, A. (2019). Composition of the Intestinal Microbiota Determines the Outcome of Virus-Triggered Colitis in Mice. *Front Immunol* 10, 1708.

Brazil, J.C., Liu, R., Sumagin, R., Kolegraff, K.N., Nusrat, A., Cummings, R.D., Parkos, C.A., and Louis, N.A. (2013). $\alpha 3/4$ Fucosyltransferase 3-dependent synthesis of Sialyl Lewis A on CD44 variant containing exon 6 mediates polymorphonuclear leukocyte detachment from intestinal epithelium during transepithelial migration. *J Immunol* 191, 4804–4817.

- Brentnall, T.A., Haggitt, R.C., Rabinovitch, P.S., Kimmey, M.B., Bronner, M.P., Levine, D.S., Kowdley, K.V., Stevens, A.C., Crispin, D.A., Emond, M., et al. (1996). Risk and natural history of colonic neoplasia in patients with primary sclerosing cholangitis and ulcerative colitis. *Gastroenterology* *110*, 331–338.
- Brichet, L., and Roblin, X. (2017). Scores d'activité dans la rectocolite hémorragique. *Hépatogastro & Oncologie Digestive* *24*, 78–83.
- Brown, A., Ellis, I.O., Embleton, M.J., Baldwin, R.W., Turner, D.R., and Hardcastle, J.D. (1984). Immunohistochemical localization of Y hapten and the structurally related H type-2 blood-group antigen on large-bowel tumours and normal adult tissues. *Int. J. Cancer* *33*, 727–736.
- Bryant, R.V., Winer, S., Travis, S.P.L., and Riddell, R.H. (2014). Systematic review: histological remission in inflammatory bowel disease. Is “complete” remission the new treatment paradigm? An IOIBD initiative. *J Crohns Colitis* *8*, 1582–1597.
- Burich, A., Hershberg, R., Waggie, K., Zeng, W., Brabb, T., Westrich, G., Viney, J.L., and Maggio-Price, L. (2001). Helicobacter-induced inflammatory bowel disease in IL-10- and T cell-deficient mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* *281*, G764-778.
- Buttó, L.F., Pelletier, A., More, S.K., Zhao, N., Osme, A., Hager, C.L., Ghannoum, M.A., Sekaly, R.-P., Cominelli, F., and Dave, M. (2020). Intestinal Stem Cell Niche Defects Result in Impaired 3D Organoid Formation in Mouse Models of Crohn's Disease-like Ileitis. *Stem Cell Reports* *15*, 389–407.

C

- Cadwell, K., Patel, K.K., Maloney, N.S., Liu, T.-C., Ng, A.C.Y., Storer, C.E., Head, R.D., Xavier, R., Stappenbeck, T.S., and Virgin, H.W. (2010). Virus-plus-susceptibility gene interaction determines Crohn's disease gene Atg16L1 phenotypes in intestine. *Cell* *141*, 1135–1145.
- Cakir, B., Pankow, J.S., Salomaa, V., Couper, D., Morris, T.L., Brantley, K.R., Hiller, K.M., Heiss, G., and Weston, B.W. (2002). Distribution of Lewis (FUT3) genotype and allele: frequencies in a biethnic United States population. *Ann Hematol* *81*, 558–565.
- Carmona-Vicente, N., Allen, D.J., Rodríguez-Díaz, J., Iturriza-Gómara, M., and Buesa, J. (2016). Antibodies against Lewis antigens inhibit the binding of human norovirus GII.4 virus-like particles to saliva but not to intestinal Caco-2 cells. *Virology* *13*, 82.
- Chan, M.C.W., Hu, Y., Chen, H., Podkolzin, A.T., Zaytseva, E.V., Komano, J., Sakon, N., Poovorawan, Y., Vongpunsawad, S., Thanusuwannasak, T., et al. (2017). Global Spread of Norovirus GII.17 Kawasaki 308, 2014-2016. *Emerg Infect Dis* *23*, 1359–1354.
- Chen, X., Liu, R., Liu, X., Xu, C., and Wang, X. (2018). Protective Role of Coxsackie-Adenovirus Receptor in the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Diseases. *Biomed Res Int* *2018*, 7207268.
- Chen, Y., Zhou, W., Roh, T., Estes, M.K., and Kaplan, D.L. (2017). In vitro enteroid-derived three-dimensional tissue model of human small intestinal epithelium with innate immune responses. *PLoS One* *12*, e0187880.
- Chhabra, P., de Graaf, M., Parra, G.I., Chan, M.C.-W., Green, K., Martella, V., Wang, Q., White, P.A., Katayama, K., Vennema, H., et al. (2019). Updated classification of norovirus genogroups and genotypes. *J Gen Virol* *100*, 1393–1406.
- Cooper, H.S., and Steplewski, Z. (1988). Immunohistologic study of ulcerative colitis with monoclonal antibodies against tumor-associated and/or differentiation antigens. *Gastroenterology* *95*, 686–693.

Cooper, H.S., Malecha, M.J., Bass, C., Fagel, P.L., and Steplewski, Z. (1991). Expression of blood group antigens H-2, Le(y), and sialylated-Le(a) in human colorectal carcinoma. An immunohistochemical study using double-labeling techniques. *Am J Pathol* 138, 103–110.

Cordon-Cardo, C., Lloyd, K.O., Sakamoto, J., McGroarty, M.E., Old, L.J., and Melamed, M.R. (1986). Immunohistologic expression of blood-group antigens in normal human gastrointestinal tract and colonic carcinoma. *Int J Cancer* 37, 667–676.

Costantini, V., Morantz, E.K., Browne, H., Ettayebi, K., Zeng, X.-L., Atmar, R.L., Estes, M.K., and Vinjé, J. (2018a). Human Norovirus Replication in Human Intestinal Enteroids as Model to Evaluate Virus Inactivation. *Emerg Infect Dis* 24, 1453–1464.

Costantini, V., Morantz, E.K., Browne, H., Ettayebi, K., Zeng, X.-L., Atmar, R.L., Estes, M.K., and Vinjé, J. (2018b). Human Norovirus Replication in Human Intestinal Enteroids as Model to Evaluate Virus Inactivation. *Emerg Infect Dis* 24, 1453–1464.

Coulson, B.S., Londrigan, S.L., and Lee, D.J. (1997). Rotavirus contains integrin ligand sequences and a disintegrin-like domain that are implicated in virus entry into cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 5389–5394.

Crohn, B.B., Ginzburg, L., and Oppenheimer, G.D. (1984). Regional Ileitis: A Pathologic and Clinical Entity. *JAMA* 251, 73–79.

D

Dabelsteen, E., Graem, N., Clausen, H., and Hakomori, S. (1988). Structural variations of blood group A antigens in human normal colon and carcinomas. *Cancer Res* 48, 181–187.

Dalal, S.R., and Chang, E.B. (2014). The microbial basis of inflammatory bowel diseases. *J Clin Invest* 124, 4190–4196.

Dennis, J.W., Granovsky, M., and Warren, C.E. (1999). Glycoprotein glycosylation and cancer progression. *Biochim Biophys Acta* 1473, 21–34.

Detrich, H.W., Westerfield, M., and Zon, L.I. (1999). *The Zebrafish: Biology* (Academic Press).

DeVoss, J., and Diehl, L. (2014). Murine models of inflammatory bowel disease (IBD): challenges of modeling human disease. *Toxicol Pathol* 42, 99–110.

Doerflinger, S.Y., Cortese, M., Romero-Brey, I., Menne, Z., Tubiana, T., Schenk, C., White, P.A., Bartenschlager, R., Bressanelli, S., Hansman, G.S., et al. (2017). Membrane alterations induced by nonstructural proteins of human norovirus. *PLoS Pathog* 13, e1006705.

Dominguez-Bello, M.G., Blaser, M.J., Ley, R.E., and Knight, R. (2011). Development of the human gastrointestinal microbiota and insights from high-throughput sequencing. *Gastroenterology* 140, 1713–1719.

Duizer, E., Schwab, K.J., Neill, F.H., Atmar, R.L., Koopmans, M.P.G., and Estes, M.K. (2004). Laboratory efforts to cultivate noroviruses. *J Gen Virol* 85, 79–87.

E

Easton, C.J., and Hay, M.P. (1986). Preferential reactivity of glycine residues in free radical reactions of amino acid derivatives. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 55–57.

Esposito, S., and Principi, N. (2020). Norovirus Vaccine: Priorities for Future Research and Development. *Front Immunol* *11*, 1383.

Ettayebi, K., Crawford, S.E., Murakami, K., Broughman, J.R., Karandikar, U., Tenge, V.R., Neill, F.H., Blutt, S.E., Zeng, X.-L., Qu, L., et al. (2016). Replication of human noroviruses in stem cell-derived human enteroids. *Science* *353*, 1387–1393.

Ettayebi, K., Tenge, V.R., Cortes-Penfield, N.W., Crawford, S.E., Neill, F.H., Zeng, X.-L., Yu, X., Ayyar, B.V., Burrin, D., Ramani, S., et al. (2021). New Insights and Enhanced Human Norovirus Cultivation in Human Intestinal Enteroids. *MSphere* *6*, e01136-20.

Eylar, E.H., and Jeanloz, R.W. (1962). Periodate Oxidation of the α 1 Acid Glycoprotein of Human Plasma. *Journal of Biological Chemistry* *237*, 1021–1025.

F

Fenoglio-Preiser, C.M., Noffsinger, A.E., Stemmermann, G.N., and Lantz, P.E. (2008). *Gastrointestinal Pathology: An Atlas and Text* (Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins).

Fernandez-Vega, V., Sosnovtsev, S.V., Belliot, G., King, A.D., Mitra, T., Gorbalenya, A., and Green, K.Y. (2004). Norwalk virus N-terminal nonstructural protein is associated with disassembly of the Golgi complex in transfected cells. *J Virol* *78*, 4827–4837.

Finne, J., Breimer, M.E., Hansson, G.C., Karlsson, K.A., Leffler, H., Vliegenthart, J.F., and van Halbeek, H. (1989). Novel polyfucosylated N-linked glycopeptides with blood group A, H, X, and Y determinants from human small intestinal epithelial cells. *J Biol Chem* *264*, 5720–5735.

Frank, D.N., Robertson, C.E., Hamm, C.M., Kpadeh, Z., Zhang, T., Chen, H., Zhu, W., Sartor, R.B., Boedeker, E.C., Harpaz, N., et al. (2011). Disease phenotype and genotype are associated with shifts in intestinal-associated microbiota in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis* *17*, 179–184.

Franke, A., McGovern, D.P.B., Barrett, J.C., Wang, K., Radford-Smith, G.L., Ahmad, T., Lees, C.W., Balschun, T., Lee, J., Roberts, R., et al. (2010). Genome-wide meta-analysis increases to 71 the number of confirmed Crohn's disease susceptibility loci. *Nat Genet* *42*, 1118–1125.

G

Gaythorpe, K. a. M., Trotter, C.L., Lopman, B., Steele, M., and Conlan, A.J.K. (2018). Norovirus transmission dynamics: a modelling review. *Epidemiol Infect* *146*, 147–158.

Gebhard, R.L., Greenberg, H.B., Singh, N., Henry, P., Sharp, H.L., Kaplan, L., and Kapikian, A.Z. (1982). Acute viral enteritis and exacerbations of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* *83*, 1207–1209.

Geboes, K., Riddell, R., Ost, A., Jensfelt, B., Persson, T., and Lofberg, R. (2000). A reproducible grading scale for histological assessment of inflammation in ulcerative colitis. *Gut* *47*, 404–409.

Gerbe, F., Legraverend, C., and Jay, P. (2012). The intestinal epithelium tuft cells: specification and function. *Cell Mol Life Sci* *69*, 2907–2917.

Gijzen, L., Yousef Yengej, F.A., Schutgens, F., Vormann, M.K., Ammerlaan, C.M.E., Nicolas, A., Kurek, D., Vulto, P., Rookmaaker, M.B., Lanz, H.L., et al. (2021). Culture and analysis of kidney tubuloids and perfused tubuloid cells-on-a-chip. *Nat Protoc*.

Good, A.H., Yau, O., Lamontagne, L.R., and Oriol, R. (1992). Serological and chemical specificities of twelve monoclonal anti-Lea and anti-Leb antibodies. *Vox Sang* *62*, 180–189.

Graham, D.Y., Jiang, X., Tanaka, T., Opekun, A.R., Madore, H.P., and Estes, M.K. (1994). Norwalk virus infection of volunteers: new insights based on improved assays. *J Infect Dis* *170*, 34–43.

Green, K.Y. (2014). Norovirus infection in immunocompromised hosts. *Clinical Microbiology and Infection* *20*, 717–723.

Green, K.Y., Kaufman, S.S., Nagata, B.M., Chaimongkol, N., Kim, D.Y., Levenson, E.A., Tin, C.M., Yardley, A.B., Johnson, J.A., Barletta, A.B.F., et al. (2020). Human norovirus targets enteroendocrine epithelial cells in the small intestine. *Nat Commun* *11*, 2759.

Guix, S., Asanaka, M., Katayama, K., Crawford, S.E., Neill, F.H., Atmar, R.L., and Estes, M.K. (2007). Norwalk virus RNA is infectious in mammalian cells. *J Virol* *81*, 12238–12248.

H

Haga, K., Ettayebi, K., Tenge, V.R., Karandikar, U.C., Lewis, M.A., Lin, S.-C., Neill, F.H., Ayar, B.V., Zeng, X.-L., Larson, G., et al. (2020). Genetic Manipulation of Human Intestinal Enteroids Demonstrates the Necessity of a Functional Fucosyltransferase 2 Gene for Secretor-Dependent Human Norovirus Infection. *MBio* *11*.

Hakomori, S. (2002). Glycosylation defining cancer malignancy: New wine in an old bottle. *Proc Natl Acad Sci U S A* *99*, 10231–10233.

Hall, J.B., Chou, S.T., and Louis, C.J. (1989). The expression of Lewis antigens in neoplasms of the gastrointestinal tract. *Pathology* *21*, 239–247.

Halme, L., Paavola-Sakki, P., Turunen, U., Lappalainen, M., Farkkila, M., and Kontula, K. (2006). Family and twin studies in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* *12*, 3668–3672.

Han, L., Tan, M., Xia, M., Kitova, E.N., Jiang, X., and Klassen, J.S. (2014). Gangliosides are ligands for human noroviruses. *J Am Chem Soc* *136*, 12631–12637.

Hardy, M.E., Crone, T.J., Brower, J.E., and Ettayebi, K. (2002). Substrate specificity of the Norwalk virus 3C-like proteinase. *Virus Research* *89*, 29–39.

Harries, A.D., Baird, A., and Rhodes, J. (1982). Non-smoking: a feature of ulcerative colitis. *Br Med J (Clin Res Ed)* *284*, 706.

Haskell, H., Andrews, C.W., Reddy, S.I., Dendrinis, K., Farraye, F.A., Stucchi, A.F., Becker, J.M., and Odze, R.D. (2005). Pathologic features and clinical significance of “backwash” ileitis in ulcerative colitis. *Am J Surg Pathol* *29*, 1472–1481.

Hason, M., and Bartůněk, P. (2019). Zebrafish Models of Cancer—New Insights on Modeling Human Cancer in a Non-Mammalian Vertebrate. *Genes (Basel)* *10*, 935.

Hendrickson, B.A., Gokhale, R., and Cho, J.H. (2002). Clinical Aspects and Pathophysiology of Inflammatory Bowel Disease. *Clin Microbiol Rev* *15*, 79–94.

Hernández, P.P., Mahlaköiv, T., Yang, I., Schwierzeck, V., Nguyen, N., Guendel, F., Gronke, K., Ryffel, B., Hölscher, C., Dumoutier, L., et al. (2015). Interferon- λ and interleukin 22 act synergistically for the induction of interferon-stimulated genes and control of rotavirus infection. *Nature Immunology* *16*, 698–707.

Hewish, M.J., Takada, Y., and Coulson, B.S. (2000). Integrins $\alpha 2\beta 1$ and $\alpha 4\beta 1$ Can Mediate SA11 Rotavirus Attachment and Entry into Cells. *J Virol* *74*, 228–236.

Hittelet, A., Camby, I., Nagy, N., Legendre, H., Bronckart, Y., Decaestecker, C., Kaltner, H., Nifant'ev, N.E., Bovin, N.V., Pector, J.-C., et al. (2003). Binding Sites for Lewis Antigens Are Expressed by Human Colon Cancer Cells and Negatively Affect Their Migration. *Lab Invest* 83, 777–787.

Hofmann, F.M., Olawumi, E., Michaelis, M., Stößel, U., and Hofmann, F. (2020). Significance of norovirus in occupational health: a review of published norovirus outbreaks in Central and Northern Europe. *Int Arch Occup Environ Health* 93, 911–923.

Homer, C.R., Richmond, A.L., Rebert, N.A., Achkar, J.-P., and McDonald, C. (2010). ATG16L1 and NOD2 interact in an autophagy-dependent antibacterial pathway implicated in Crohn's disease pathogenesis. *Gastroenterology* 139, 1630–1641, 1641.e1-2.

Howley, P.M., and Knipe, D.M. (2020). *Fields Virology: Emerging Viruses* (Wolters Kluwer Health).

Hsu, C.C., Paik, J., Treuting, P.M., Seamons, A., Meeker, S.M., Brabb, T.L., and Maggio-Price, L. (2014). Infection with Murine Norovirus 4 Does Not Alter Helicobacter-Induced Inflammatory Bowel Disease in IL10^{-/-} Mice. *Comp Med* 64, 256–263.

Hu, D., Zhang, D., Zheng, S., Guo, M., Lin, X., and Jiang, Y. (2016a). Association of Ulcerative Colitis with FUT2 and FUT3 Polymorphisms in Patients from Southeast China. *PLoS One* 11, e0146557.

Hu, D., Zhang, D., Zheng, S., Guo, M., Lin, X., and Jiang, Y. (2016b). Association of Ulcerative Colitis with FUT2 and FUT3 Polymorphisms in Patients from Southeast China. *PLOS ONE* 11, e0146557.

Hu, L., Crawford, S.E., Czako, R., Cortes-Penfield, N.W., Smith, D.F., Le Pendu, J., Estes, M.K., and Prasad, B.V.V. (2012). Cell attachment protein VP8* of a human rotavirus specifically interacts with A-type histo-blood group antigen. *Nature* 485, 256–259.

Hu, S., Yuan, J., Xu, J., Li, X., Zhang, G., Ma, Q., Zhang, B., Hu, T., and Song, G. (2019). TNF- α and IFN- γ synergistically inhibit the repairing ability of mesenchymal stem cells on mice colitis and colon cancer. *Am J Transl Res* 11, 6207–6220.

Huang, P., Xia, M., Tan, M., Zhong, W., Wei, C., Wang, L., Morrow, A., and Jiang, X. (2012). Spike protein VP8* of human rotavirus recognizes histo-blood group antigens in a type-specific manner. *J Virol* 86, 4833–4843.

Hugot, J.P., Chamaillard, M., Zouali, H., Lesage, S., Cézard, J.P., Belaiche, J., Almer, S., Tysk, C., O'Morain, C.A., Gassull, M., et al. (2001). Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 411, 599–603.

I

Imbert-Marcille, B.-M., Barbé, L., Dupé, M., Le Moullac-Vaidye, B., Besse, B., Peltier, C., Ruvoën-Clouet, N., and Le Pendu, J. (2014a). A FUT2 gene common polymorphism determines resistance to rotavirus A of the P[8] genotype. *J. Infect. Dis.* 209, 1227–1230.

Imbert-Marcille, B.-M., Barbé, L., Dupé, M., Le Moullac-Vaidye, B., Besse, B., Peltier, C., Ruvoën-Clouet, N., and Le Pendu, J. (2014b). A FUT2 gene common polymorphism determines resistance to rotavirus A of the P[8] genotype. *J Infect Dis* 209, 1227–1230.

Ito, R., Shin-Ya, M., Kishida, T., Urano, A., Takada, R., Sakagami, J., Imanishi, J., Kita, M., Ueda, Y., Iwakura, Y., et al. (2006). Interferon-gamma is causatively involved in experimental inflammatory bowel disease in mice. *Clin Exp Immunol* 146, 330–338.

Itzkowitz, S.H., Yuan, M., Fukushi, Y., Palekar, A., Phelps, P.C., Shamsuddin, A.M., Trump, B.F., Hakomori, S., and Kim, Y.S. (1986). Lewisx- and sialylated Lewisx-related antigen expression in human malignant and nonmalignant colonic tissues. *Cancer Res* 46, 2627–2632.

Itzkowitz, S.H., Dahiya, R., Byrd, J.C., and Kim, Y.S. (1990). Blood group antigen synthesis and degradation in normal and cancerous colonic tissues. *Gastroenterology* 99, 431–442.

J

Jauregui-Amezaga, A., Geerits, A., Das, Y., Lemmens, B., Sagaert, X., Bessissow, T., Lobatón, T., Ferrante, M., Van Assche, G., Bisschops, R., et al. (2017). A Simplified Geboes Score for Ulcerative Colitis. *Journal of Crohn's and Colitis* 11, 305–313.

Jiang, X., Wang, M., Graham, D.Y., and Estes, M.K. (1992). Expression, self-assembly, and antigenicity of the Norwalk virus capsid protein. *Journal of Virology* 66, 6527–6532.

Jiang, X., Wang, M., Wang, K., and Estes, M.K. (1993). Sequence and genomic organization of Norwalk virus. *Virology* 195, 51–61.

Jiang, X., Liu, Y., and Tan, M. (2017). Histo-blood group antigens as receptors for rotavirus, new understanding on rotavirus epidemiology and vaccine strategy. *Emerg Microbes Infect* 6, e22.

Jostins, L., Ripke, S., Weersma, R.K., Duerr, R.H., McGovern, D.P., Hui, K.Y., Lee, J.C., Philip Schumm, L., Sharma, Y., Anderson, C.A., et al. (2012). Host–microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. *Nature* 491, 119–124.

K

Kageyama, N., Natsuka, S., and Hase, S. (1999). Molecular cloning and characterization of two zebrafish alpha(1,3)fucosyltransferase genes developmentally regulated in embryogenesis. *J Biochem* 125, 838–845.

Kapikian, A.Z., Wyatt, R.G., Dolin, R., Thornhill, T.S., Kalica, A.R., and Chanock, R.M. (1972). Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *J Virol* 10, 1075–1081.

Karandikar, U.C., Crawford, S.E., Ajami, N.J., Murakami, K., Kou, B., Ettayebi, K., Papanicolaou, G.A., Jongwutiwes, U., Perales, M.-A., Shia, J., et al. (2016). Detection of human norovirus in intestinal biopsies from immunocompromised transplant patients. *J Gen Virol* 97, 2291–2300.

Katayama, T., Sakuma, A., Kimura, T., Makimura, Y., Hiratake, J., Sakata, K., Yamanoi, T., Kumagai, H., and Yamamoto, K. (2004). Molecular cloning and characterization of *Bifidobacterium bifidum* 1,2-alpha-L-fucosidase (AfcA), a novel inverting glycosidase (glycoside hydrolase family 95). *J Bacteriol* 186, 4885–4893.

Kelm, M., Quiros, M., Azcutia, V., Boerner, K., Cummings, R.D., Nusrat, A., Brazil, J.C., and Parkos, C.A. (2020). Targeting epithelium-expressed sialyl Lewis glycans improves colonic mucosal wound healing and protects against colitis. *JCI Insight* 5.

Kernbauer, E., Ding, Y., and Cadwell, K. (2014). An enteric virus can replace the beneficial function of commensal bacteria. *Nature* 516, 94–98.

Khan, R.R., Lawson, A.D., Minnich, L.L., Martin, K., Nasir, A., Emmett, M.K., Welch, C.A., and Udall, J.N. (2009). Gastrointestinal norovirus infection associated with exacerbation of inflammatory bowel disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 48, 328–333.

Kiesler, P., Fuss, I.J., and Strober, W. (2015). Experimental Models of Inflammatory Bowel Diseases. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 1, 154–170.

Kim, J., Koo, B.-K., and Knoblich, J.A. (2020). Human organoids: model systems for human biology and medicine. *Nat Rev Mol Cell Biol* 21, 571–584.

Kim, Y.-G., Park, J.-H., Reimer, T., Baker, D.P., Kawai, T., Kumar, H., Akira, S., Wobus, C., and Núñez, G. (2011). Viral infection augments Nod1/2 signaling to potentiate lethality associated with secondary bacterial infections. *Cell Host Microbe* 9, 496–507.

Koch, S. (2017). Extrinsic control of Wnt signaling in the intestine. *Differentiation* 97, 1–8.

Kolho, K.-L., Klemola, P., Simonen-Tikka, M.-L., Ollonen, M.-L., and Roivainen, M. (2012). Enteric viral pathogens in children with inflammatory bowel disease. *J Med Virol* 84, 345–347.

Kroneman, A., Vega, E., Vennema, H., Vinjé, J., White, P.A., Hansman, G., Green, K., Martella, V., Katayama, K., and Koopmans, M. (2013). Proposal for a unified norovirus nomenclature and genotyping. *Arch Virol* 158, 2059–2068.

Kühn, R., Löhler, J., Rennick, D., Rajewsky, K., and Müller, W. (1993). Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* 75, 263–274.

L

Lateef, Z., Gimenez, G., Baker, E.S., and Ward, V.K. (2017). Transcriptomic analysis of human norovirus NS1-2 protein highlights a multifunctional role in murine monocytes. *BMC Genomics* 18, 39.

Lay, M.K., Atmar, R.L., Guix, S., Bharadwaj, U., He, H., Neill, F.H., Sastry, K.J., Yao, Q., and Estes, M.K. (2010). Norwalk virus does not replicate in human macrophages or dendritic cells derived from the peripheral blood of susceptible humans. *Virology* 406, 1–11.

Lei, S., Samuel, H., Twitchell, E., Bui, T., Ramesh, A., Wen, K., Weiss, M., Li, G., Yang, X., Jiang, X., et al. (2016). Enterobacter cloacae inhibits human norovirus infectivity in gnotobiotic pigs. *Sci Rep* 6, 25017.

Lei, S., Twitchell, E.L., Ramesh, A.K., Bui, T., Majette, E., Tin, C.M., Avery, R., Arango-Argoty, G., Zhang, L., Becker-Dreps, S., et al. (2019). Enhanced GII.4 human norovirus infection in gnotobiotic pigs transplanted with a human gut microbiota. *J Gen Virol* 100, 1530–1540.

Lencioni, K.C., Seamons, A., Treuting, P.M., Maggio-Price, L., and Brabb, T. (2008). Murine norovirus: an intercurrent variable in a mouse model of bacteria-induced inflammatory bowel disease. *Comp Med* 58, 522–533.

Leppkes, M., Becker, C., Ivanov, I.I., Hirth, S., Wirtz, S., Neufert, C., Pouly, S., Murphy, A.J., Valenzuela, D.M., Yancopoulos, G.D., et al. (2009). RORgamma-expressing Th17 cells induce murine chronic intestinal inflammation via redundant effects of IL-17A and IL-17F. *Gastroenterology* 136, 257–267.

Li, M.-C., and He, S.-H. (2004). IL-10 and its related cytokines for treatment of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 10, 620–625.

Lin, K.C., and Castro, A.C. (1998). Very late antigen 4 (VLA4) antagonists as anti-inflammatory agents. *Curr Opin Chem Biol* 2, 453–457.

Lindesmith, L., Moe, C., Marionneau, S., Ruvoen, N., Jiang, X., Lindblad, L., Stewart, P., LePendou, J., and Baric, R. (2003). Human susceptibility and resistance to Norwalk virus infection. *Nat. Med.* 9, 548–553.

Lindesmith, L.C., Brewer-Jensen, P.D., Mallory, M.L., Jensen, K., Yount, B.L., Costantini, V., Collins, M.H., Edwards, C.E., Sheahan, T.P., Vinjé, J., et al. (2020). Virus–Host Interactions Between Nonsecretors and Human Norovirus. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology* 10, 245–267.

Lindsay, L., Wolter, J., De Coster, I., Van Damme, P., and Verstraeten, T. (2015). A decade of norovirus disease risk among older adults in upper-middle and high income countries: a systematic review. *BMC Infect Dis* 15, 425.

Liu, Y.H., Koda, Y., Soejima, M., Pang, H., Wang, B., and Kimura, H. (1999). Lewis (FUT3) genotypes in two different Chinese populations. *J Forensic Sci* 44, 82–86.

Liu, Z., Zhang, M., Shen, Z., Chen, H., Zhang, W., Xu, X., Lai, Z., Sun, W., Zhao, Z., and Zhang, J. (2019). The coordinating role of the human norovirus minor capsid protein VP2 is essential to functional change and nuclear localization of the major capsid protein VP1. *Arch Virol* 164, 1173–1180.

Lopman, B.A., Steele, D., Kirkwood, C.D., and Parashar, U.D. (2016). The Vast and Varied Global Burden of Norovirus: Prospects for Prevention and Control. *PLoS Med* 13, e1001999.

M

MacCannell, T., Umscheid, C.A., Agarwal, R.K., Lee, I., Kuntz, G., Stevenson, K.B., and Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee-HICPAC (2011). Guideline for the prevention and control of norovirus gastroenteritis outbreaks in healthcare settings. *Infect Control Hosp Epidemiol* 32, 939–969.

Maloney, N.S., Thackray, L.B., Goel, G., Hwang, S., Duan, E., Vachharajani, P., Xavier, R., and Virgin, H.W. (2012). Essential cell-autonomous role for interferon (IFN) regulatory factor 1 in IFN- γ -mediated inhibition of norovirus replication in macrophages. *J Virol* 86, 12655–12664.

Mann, E.R., and Li, X. (2014). Intestinal antigen-presenting cells in mucosal immune homeostasis: Crosstalk between dendritic cells, macrophages and B-cells. *World J Gastroenterol* 20, 9653–9664.

Marchal-Bressenot, A., Salleron, J., Boulagnon-Rombi, C., Bastien, C., Cahn, V., Cadiot, G., Diebold, M.-D., Danese, S., Reinisch, W., Schreiber, S., et al. (2017). Development and validation of the Nancy histological index for UC. *Gut* 66, 43–49.

Marionneau, S., Ruvoën, N., Le Moullac-Vaidye, B., Clement, M., Cailleau-Thomas, A., Ruiz-Palacois, G., Huang, P., Jiang, X., and Le Pendu, J. (2002). Norwalk virus binds to histo-blood group antigens present on gastroduodenal epithelial cells of secretor individuals. *Gastroenterology* 122, 1967–1977.

Masclée, G.M.C., Penders, J., Pierik, M., Wolffs, P., and Jonkers, D. (2013). Enteropathogenic viruses: triggers for exacerbation in IBD? A prospective cohort study using real-time quantitative polymerase chain reaction. *Inflamm Bowel Dis* 19, 124–131.

Matsumura, K., Higashida, K., Hata, Y., Kominami, J., Nakamura-Tsuruta, S., and Hirabayashi, J. (2009). Comparative analysis of oligosaccharide specificities of fucose-specific lectins from *Aspergillus oryzae* and *Aleuria aurantia* using frontal affinity chromatography. *Anal Biochem* 386, 217–221.

Matsuzawa-Ishimoto, Y., Shono, Y., Gomez, L.E., Hubbard-Lucey, V.M., Cammer, M., Neil, J., Dewan, M.Z., Lieberman, S.R., Lazrak, A., Marinis, J.M., et al. (2017). Autophagy protein ATG16L1 prevents necroptosis in the intestinal epithelium. *Journal of Experimental Medicine* 214, 3687–3705.

May, J., Korba, B., Medvedev, A., and Viswanathan, P. (2013). Enzyme kinetics of the human norovirus protease control virus polyprotein processing order. *Virology* 444, 218–224.

McGovern, D.P.B., Jones, M.R., Taylor, K.D., Marciante, K., Yan, X., Dubinsky, M., Ippoliti, A., Vasilias, E., Berel, D., Derkowski, C., et al. (2010a). Fucosyltransferase 2 (FUT2) non-secretor status is associated with Crohn's disease. *Hum Mol Genet* *19*, 3468–3476.

McGovern, D.P.B., Jones, M.R., Taylor, K.D., Marciante, K., Yan, X., Dubinsky, M., Ippoliti, A., Vasilias, E., Berel, D., Derkowski, C., et al. (2010b). Fucosyltransferase 2 (FUT2) non-secretor status is associated with Crohn's disease. *Hum Mol Genet* *19*, 3468–3476.

Medvedev, A., Viswanathan, P., May, J., and Korba, B. (2017). Regulation of human norovirus VPg nucleotidylation by ProPol and nucleoside triphosphate binding by its amino terminal sequence in vitro. *Virology* *503*, 37–45.

Meir, M., Salm, J., Fey, C., Schweinlin, M., Kollmann, C., Kannapin, F., Germer, C.-T., Waschke, J., Beck, C., Burkard, N., et al. (2020). Enteroids Generated from Patients with Severe Inflammation in Crohn's Disease Maintain Alterations of Junctional Proteins. *J Crohns Colitis* *14*, 1473–1487.

Metzger, R.N., Krug, A.B., and Eisenacher, K. (2018). Enteric Virome Sensing—Its Role in Intestinal Homeostasis and Immunity. *Viruses* *10*, 146.

Miyoshi, H., Ajima, R., Luo, C.T., Yamaguchi, T.P., and Stappenbeck, T.S. (2012). Wnt5a potentiates TGF- β signaling to promote colonic crypt regeneration after tissue injury. *Science* *338*, 108–113.

Miyoshi, J., Yajima, T., Okamoto, S., Matsuoka, K., Inoue, N., Hisamatsu, T., Shimamura, K., Nakazawa, A., Kanai, T., Ogata, H., et al. (2011). Ectopic expression of blood type antigens in inflamed mucosa with higher incidence of FUT2 secretor status in colonic Crohn's disease. *J Gastroenterol* *46*, 1056–1063.

Murch, S.H., Braegger, C.P., Walker-Smith, J.A., and MacDonald, T.T. (1993). Location of tumour necrosis factor alpha by immunohistochemistry in chronic inflammatory bowel disease. *Gut* *34*, 1705–1709.

N

Nakagoe, T., Fukushima, K., Hirota, M., Kusano, H., Ayabe, H., Tomita, M., and Kamihira, S. (1994a). An immunohistochemical employer monoclonal antibodies against Le(a), sialyl Le(a), Le(x), and sialyl Le(x) antigens in primary colorectal, carcinomas and lymph node and hepatic lesions. *J Gastroenterol* *29*, 129–138.

Nakagoe, T., Fukushima, K., Hirota, M., Kusano, H., Ayabe, H., Tomita, M., and Kamihira, S. (1994b). An immunohistochemical employer monoclonal antibodies against Le(a), sialyl Le(a), Le(x), and sialyl Le(x) antigens in primary colorectal, carcinomas and lymph node and hepatic lesions. *J. Gastroenterol.* *29*, 129–138.

Nelson, A.M., Walk, S.T., Taube, S., Taniuchi, M., Houpt, E.R., Wobus, C.E., and Young, V.B. (2012). Disruption of the Human Gut Microbiota following Norovirus Infection. *PLOS ONE* *7*, e48224.

Newman, K.L., Moe, C.L., Kirby, A.E., Flanders, W.D., Parkos, C.A., and Leon, J.S. (2015). Human norovirus infection and the acute serum cytokine response. *Clin Exp Immunol* *182*, 195–203.

Nooraei, S., Bahrulolum, H., Hoseini, Z.S., Katalani, C., Hajizade, A., Easton, A.J., and Ahmadian, G. (2021). Virus-like particles: preparation, immunogenicity and their roles as nanovaccines and drug nanocarriers. *Journal of Nanobiotechnology* *19*, 59.

O

O'Connor, J.P.A., O'Moráin, C.A., Neary, P., and Breslin, N.P. (2009). Use of Infliximab as rescue therapy in acute severe Ulcerative Colitis with recent norovirus infection. *J Crohns Colitis* *3*, 204–206.

Ogura, Y., Bonen, D.K., Inohara, N., Nicolae, D.L., Chen, F.F., Ramos, R., Britton, H., Moran, T., Karaliuskas, R., Duerr, R.H., et al. (2001). A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 411, 603–606.

Okamoto, R., Shimizu, H., Suzuki, K., Kawamoto, A., Takahashi, J., Kawai, M., Nagata, S., Hiraguri, Y., Takeoka, S., Sugihara, H.Y., et al. (2020). Organoid-based regenerative medicine for inflammatory bowel disease. *Regen Ther* 13, 1–6.

Olausson, J., Tibell, L., Jonsson, B.-H., and Pålsson, P. (2008). Detection of a high affinity binding site in recombinant Aleuria aurantia lectin. *Glycoconj J* 25, 753–762.

Ott, S.J., Musfeldt, M., Wenderoth, D.F., Hampe, J., Brant, O., Fölsch, U.R., Timmis, K.N., and Schreiber, S. (2004). Reduction in diversity of the colonic mucosa associated bacterial microflora in patients with active inflammatory bowel disease. *Gut* 53, 685–693.

Owczarek, D., Rodacki, T., Domagała-Rodacka, R., Cibor, D., and Mach, T. (2016). Diet and nutritional factors in inflammatory bowel diseases. *World J Gastroenterol* 22, 895–905.

P

Pantermehl, S., Emmert, S., Foth, A., Grabow, N., Alkildani, S., Bader, R., Barbeck, M., and Jung, O. (2021). 3D Printing for Soft Tissue Regeneration and Applications in Medicine. *Biomedicines* 9.

Park, G.W., Barclay, L., Macinga, D., Charbonneau, D., Pettigrew, C.A., and Vinjé, J. (2010). Comparative efficacy of seven hand sanitizers against murine norovirus, feline calicivirus, and GII.4 norovirus. *J Food Prot* 73, 2232–2238.

Peyrin-Biroulet, L. (2010). Anti-TNF therapy in inflammatory bowel diseases: a huge review. *Minerva Gastroenterol Dietol* 56, 233–243.

Pfeiffer, J.K., and Virgin, H.W. (2016). Viral immunity. Transkingdom control of viral infection and immunity in the mammalian intestine. *Science* 351.

Pfister, T., and Wimmer, E. (2001). Polypeptide p41 of a Norwalk-like virus is a nucleic acid-independent nucleoside triphosphatase. *J Virol* 75, 1611–1619.

Philpott, D.J., and Girardin, S.E. (2009). Crohn's disease-associated Nod2 mutants reduce IL10 transcription. *Nat Immunol* 10, 455–457.

Pires, S.M., Fischer-Walker, C.L., Lanata, C.F., Devleeschauwer, B., Hall, A.J., Kirk, M.D., Duarte, A.S.R., Black, R.E., and Angulo, F.J. (2015). Aetiology-Specific Estimates of the Global and Regional Incidence and Mortality of Diarrhoeal Diseases Commonly Transmitted through Food. *PLoS One* 10, e0142927.

Plantinga, T.S., Crisan, T.O., Oosting, M., van de Veerdonk, F.L., de Jong, D.J., Philpott, D.J., van der Meer, J.W.M., Girardin, S.E., Joosten, L.A.B., and Netea, M.G. (2011). Crohn's disease-associated ATG16L1 polymorphism modulates pro-inflammatory cytokine responses selectively upon activation of NOD2. *Gut* 60, 1229–1235.

Pollock, L., Bennett, A., Jere, K.C., Dube, Q., Mandolo, J., Bar-Zeev, N., Heyderman, R.S., Cunliffe, N.A., and Iturriza-Gomara, M. (2018). Non-secretor histo-blood group antigen phenotype is associated with reduced risk of clinical rotavirus vaccine failure in Malawian infants. *Clin. Infect. Dis.*

Prasad, B.V., Hardy, M.E., Dokland, T., Bella, J., Rossmann, M.G., and Estes, M.K. (1999). X-ray crystallographic structure of the Norwalk virus capsid. *Science* 286, 287–290.

Q

Qu, M., Xiong, L., Lyu, Y., Zhang, X., Shen, J., Guan, J., Chai, P., Lin, Z., Nie, B., Li, C., et al. (2021). Establishment of intestinal organoid cultures modeling injury-associated epithelial regeneration. *Cell Res* 31, 259–271.

R

Rajan, A., Persson, B.D., Frängsmyr, L., Olofsson, A., Sandblad, L., Heino, J., Takada, Y., Mould, A.P., Schnapp, L.M., Gall, J., et al. (2018). Enteric Species F Human Adenoviruses use Laminin-Binding Integrins as Co-Receptors for Infection of Ht-29 Cells. *Sci Rep* 8, 10019.

Rani, R., Smulian, A.G., Greaves, D.R., Hogan, S.P., and Herbert, D.R. (2011). TGF- β limits IL-33 production and promotes the resolution of colitis through regulation of macrophage function. *Eur J Immunol* 41, 2000–2009.

Rausch, P., Rehman, A., Künzel, S., Häsler, R., Ott, S.J., Schreiber, S., Rosenstiel, P., Franke, A., and Baines, J.F. (2011). Colonic mucosa-associated microbiota is influenced by an interaction of Crohn disease and FUT2 (Secretor) genotype. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 19030–19035.

Ravn, V., and Dabelsteen, E. (2000). Tissue distribution of histo-blood group antigens. *APMIS* 108, 1–28.

Rees, W.D., Stahl, M., Jacobson, K., Bressler, B., Sly, L.M., Vallance, B.A., and Steiner, T.S. (2020). Enteroids Derived From Inflammatory Bowel Disease Patients Display Dysregulated Endoplasmic Reticulum Stress Pathways, Leading to Differential Inflammatory Responses and Dendritic Cell Maturation. *Journal of Crohn's and Colitis* 14, 948–961.

Reif, S., Klein, I., Lubin, F., Farbstein, M., Hallak, A., and Gilat, T. (1997). Pre-illness dietary factors in inflammatory bowel disease. *Gut* 40, 754–760.

Riley, S.A., Mani, V., Goodman, M.J., Dutt, S., and Herd, M.E. (1991). Microscopic activity in ulcerative colitis: what does it mean? *Gut* 32, 174–178.

Rimkute, I., Thorsteinsson, K., Henricsson, M., Tenge, V.R., Yu, X., Lin, S.-C., Haga, K., Atmar, R.L., Lycke, N., Nilsson, J., et al. (2020). Histo-blood group antigens of glycosphingolipids predict susceptibility of human intestinal enteroids to norovirus infection. *J Biol Chem* 295, 15974–15987.

Robinson, C.M., Jesudhasan, P.R., and Pfeiffer, J.K. (2014). Bacterial lipopolysaccharide binding enhances virion stability and promotes environmental fitness of an enteric virus. *Cell Host Microbe* 15, 36–46.

Rohovie, M.J., Nagasawa, M., and Swartz, J.R. (2017). Virus-like particles: Next-generation nanoparticles for targeted therapeutic delivery. *Bioeng Transl Med* 2, 43–57.

Roth, A.N., and Karst, S.M. (2016). Norovirus mechanisms of immune antagonism. *Curr Opin Virol* 16, 24–30.

de Rougemont, A., and Belliot, G. (2016). Norovirus. *EMC*.

de Rougemont, A., Ambert-Balay, K., Belliot, G., and Pothier, P. (2010). Actualités sur les norovirus. *Med Sci (Paris)* 26, 73–78.

de Rougemont, A., Ruvoen-Clouet, N., Simon, B., Estienney, M., Elie-Caille, C., Aho, S., Pothier, P., Le Pendu, J., Boireau, W., and Belliot, G. (2011). Qualitative and quantitative analysis of the binding of GII.4 norovirus variants onto human blood group antigens. *J Virol* 85, 4057–4070.

Ruggiero, F., Cooper, H.S., and Steplewski, Z. (1988). Immunohistochemical study of colorectal adenomas with monoclonal antibodies against blood group antigens (sialosyl-Le(a), Le(a), Le(b), Le(x), Le(y), A, B, and H). *Lab Invest* 59, 96–103.

Ruvoën-Clouet, N., Magalhaes, A., Marcos-Silva, L., Breiman, A., Figueiredo, C., David, L., and Le Pendu, J. (2014). Increase in genogroup II.4 norovirus host spectrum by CagA-positive *Helicobacter pylori* infection. *J Infect Dis* 210, 183–191.

Rydell, G.E., Nilsson, J., Rodriguez-Diaz, J., Ruvoën-Clouet, N., Svensson, L., Le Pendu, J., and Larson, G. (2009). Human noroviruses recognize sialyl Lewis x neoglycoprotein. *Glycobiology* 19, 309–320.

S

Saidel-Odes, L., and Odes, S. (2014). Hygiene hypothesis in inflammatory bowel disease. *Ann Gastroenterol* 27, 189–190.

Sartor, R.B., and Wu, G.D. (2017). Roles for Intestinal Bacteria, Viruses, and Fungi in Pathogenesis of Inflammatory Bowel Diseases and Therapeutic Approaches. *Gastroenterology* 152, 327-339.e4.

Sato, T., Vries, R.G., Snippert, H.J., van de Wetering, M., Barker, N., Stange, D.E., van Es, J.H., Abo, A., Kujala, P., Peters, P.J., et al. (2009). Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature* 459, 262–265.

Schoentag, R., Primus, F.J., and Kuhns, W. (1987). ABH and Lewis blood group expression in colorectal carcinoma. *Cancer Res* 47, 1695–1700.

Sharp, T.M., Guix, S., Katayama, K., Crawford, S.E., and Estes, M.K. (2010). Inhibition of cellular protein secretion by norwalk virus nonstructural protein p22 requires a mimic of an endoplasmic reticulum export signal. *PLoS One* 5, e13130.

Shiozaki, K., Yamaguchi, K., Takahashi, K., Moriya, S., and Miyagi, T. (2011). Regulation of Sialyl Lewis Antigen Expression in Colon Cancer Cells by Sialidase NEU4. *J Biol Chem* 286, 21052–21061.

Somerville, K.W., Logan, R.F., Edmond, M., and Langman, M.J. (1984). Smoking and Crohn's disease. *Br Med J (Clin Res Ed)* 289, 954–956.

Sosnovtsev, S.V., Belliot, G., Chang, K.-O., Prikhodko, V.G., Thackray, L.B., Wobus, C.E., Karst, S.M., Virgin, H.W., and Green, K.Y. (2006). Cleavage Map and Proteolytic Processing of the Murine Norovirus Nonstructural Polyprotein in Infected Cells. *J Virol* 80, 7816–7831.

Stappenbeck, T.S., and McGovern, D.P.B. (2017). Paneth Cell Alterations in the Development and Phenotype of Crohn's Disease. *Gastroenterology* 152, 322–326.

Straub, T.M., Höner zu Bentrup, K., Coghlan, P.O., Dohnalkova, A., Mayer, B.K., Bartholomew, R.A., Valdez, C.O., Bruckner-Lea, C.J., Gerba, C.P., Abbaszadegan, M.A., et al. (2007). In Vitro Cell Culture Infectivity Assay for Human Noroviruses. *Emerg Infect Dis* 13, 396–403.

Stuart, R.L., Tan, K., Mahar, J.E., Kirkwood, C.D., Andrew Ramsden, C., Andrianopoulos, N., Jolley, D., Bawden, K., Doherty, R., Kotsanas, D., et al. (2010). An outbreak of necrotizing enterocolitis associated with norovirus genotype GII.3. *Pediatr Infect Dis J* 29, 644–647.

T

Takahashi, D., Kim, Y., Lovell, S., Prakash, O., Groutas, W.C., and Chang, K.-O. (2013). Structural and inhibitor studies of norovirus 3C-like proteases. *Virus Res* 178, 437–444.

Tan, M., Hegde, R.S., and Jiang, X. (2004). The P domain of norovirus capsid protein forms dimer and binds to histo-blood group antigen receptors. *J Virol* 78, 6233–6242.

Tarris, G., de Rougemont, A., Charkaoui, M., Michiels, C., Martin, L., and Belliot, G. (2021a). Enteric Viruses and Inflammatory Bowel Disease. *Viruses* 13.

Tarris, G., de Rougemont, A., Estienne, M., Charkaoui, M., Mouillot, T., Bonnotte, B., Michiels, C., Martin, L., and Belliot, G. (2021b). Specific Norovirus Interaction with Lewis x and Lewis a on Human Intestinal Inflammatory Mucosa during Refractory Inflammatory Bowel Disease. *MSphere* 6.

Thorne, L.G., and Goodfellow, I.G. (2014). Norovirus gene expression and replication. *J Gen Virol* 95, 278–291.

Ting, H.-A., and von Moltke, J. (2019a). The Immune Function of Tuft Cells at Gut Mucosal Surfaces and Beyond. *J Immunol* 202, 1321–1329.

Ting, H.-A., and von Moltke, J. (2019b). The Immune Function of Tuft Cells at Gut Mucosal Surfaces and Beyond. *J Immunol* 202, 1321–1329.

Torres, B.V., and Smith, D.F. (1988). Purification of Forssman and human blood group A glycolipids by affinity chromatography on immobilized Helix pomatia lectin. *Anal Biochem* 170, 209–219.

Treveil, A., Sudhakar, P., Matthews, Z.J., Wrzesiński, T., Jones, E.J., Brooks, J., Ölbei, M., Hautefort, I., Hall, L.J., Carding, S.R., et al. (2020). Regulatory network analysis of Paneth cell and goblet cell enriched gut organoids using transcriptomics approaches. *Mol Omics* 16, 39–58.

Turcios-Ruiz, R.M., Axelrod, P., St John, K., Bullitt, E., Donahue, J., Robinson, N., and Friss, H.E. (2008). Outbreak of necrotizing enterocolitis caused by norovirus in a neonatal intensive care unit. *J Pediatr* 153, 339–344.

V

Vainer, B., Nielsen, O.H., and Horn, T. (1998). Expression of E-selectin, sialyl Lewis X, and macrophage inflammatory protein-1 α by colonic epithelial cells in ulcerative colitis. *Dig Dis Sci* 43, 596–608.

Van Dycke, J., Ny, A., Conceição-Neto, N., Maes, J., Hosmillo, M., Cuvry, A., Goodfellow, I., Nogueira, T.C., Verbeke, E., Matthijnsens, J., et al. (2019). A robust human norovirus replication model in zebrafish larvae. *PLoS Pathog* 15, e1008009.

Vinje, J. (2021). Norovirus virtual symposium 2021 - Global trends in norovirus genotype distribution. Bill and Melinda Gates Foundation.

Vongpunsawad, S., Venkataram Prasad, B.V., and Estes, M.K. (2013). Norwalk Virus Minor Capsid Protein VP2 Associates within the VP1 Shell Domain. *J Virol* 87, 4818–4825.

W

Wallace, K.N., Akhter, S., Smith, E.M., Lorent, K., and Pack, M. (2005). Intestinal growth and differentiation in zebrafish. *Mech Dev* 122, 157–173.

Ward, M.G., Patel, K.V., Kariyawasam, V.C., Goel, R., Warner, B., Elliott, T.R., Blaker, P.A., Irving, P.M., Marinaki, A.M., and Sanderson, J.D. (2017). Thioguanine in inflammatory bowel disease: Long-term efficacy and safety. *United European Gastroenterol J* 5, 563–570.

Wegener, H., Mallagaray, Á., Schöne, T., Peters, T., Lockhauserbäumer, J., Yan, H., Uetrecht, C., Hansman, G.S., and Taube, S. (2017). Human norovirus GII.4(MI001) P dimer binds fucosylated and sialylated carbohydrates. *Glycobiology* 27, 1027–1037.

Wilén, C.B., Lee, S., Hsieh, L.-Y., Orchard, R.C., Desai, C., Hykes, B.L., McAllaster, M.R., Balce, D.R., Feehley, T., Brestoff, J.R., et al. (2018a). Tropism for tuft cells determines immune promotion of norovirus pathogenesis. *Science* 360, 204–208.

Wilén, C.B., Lee, S., Hsieh, L.L., Orchard, R.C., Desai, C., Hykes, B.L., McAllaster, M.R., Balce, D.R., Feehley, T., Brestoff, J.R., et al. (2018b). Tropism for tuft cells determines immune promotion of norovirus pathogenesis. *Science* 360, 204–208.

Wilhelmi, I., Roman, E., and Sánchez-Fauquier, A. (2003). Viruses causing gastroenteritis. *Clin Microbiol Infect* 9, 247–262.

Wobus, C.E. The Dual Tropism of Noroviruses. *Journal of Virology* 92, e01010-17.

Wobus, C.E., Karst, S.M., Thackray, L.B., Chang, K.-O., Sosnovtsev, S.V., Belliot, G., Krug, A., Mackenzie, J.M., Green, K.Y., and Virgin, H.W. (2004). Replication of Norovirus in cell culture reveals a tropism for dendritic cells and macrophages. *PLoS Biol* 2, e432.

Wobus, C.E., Thackray, L.B., and Virgin, H.W. (2006). Murine norovirus: a model system to study norovirus biology and pathogenesis. *J Virol* 80, 5104–5112.

Y

Yan, L., Wilkins, P.P., Alvarez-Manilla, G., Do, S.I., Smith, D.F., and Cummings, R.D. (1997). Immobilized Lotus tetragonolobus agglutinin binds oligosaccharides containing the Le(x) determinant. *Glycoconj J* 14, 45–55.

Yang, J.-Y., Kim, M.-S., Kim, E., Cheon, J.H., Lee, Y.-S., Kim, Y., Lee, S.-H., Seo, S.-U., Shin, S.-H., Choi, S.S., et al. (2016). Enteric Viruses Ameliorate Gut Inflammation via Toll-like Receptor 3 and Toll-like Receptor 7-Mediated Interferon- β Production. *Immunity* 44, 889–900.

Yen, J.-B., Wei, L.-H., Chen, L.-W., Chen, L.-Y., Hung, C.-H., Wang, S.-S., and Chang, P.-J. (2018). Subcellular Localization and Functional Characterization of GII.4 Norovirus-Encoded NTPase. *J Virol* 92.

Yin, Y., Chen, S., Hakim, M.S., Wang, W., Xu, L., Dang, W., Qu, C., Verhaar, A.P., Su, J., Fuhler, G.M., et al. (2018). 6-Thioguanine inhibits rotavirus replication through suppression of Rac1 GDP/GTP cycling. *Antiviral Res* 156, 92–101.

Yuan, M., Itzkowitz, S.H., Palekar, A., Shamsuddin, A.M., Phelps, P.C., Trump, B.F., and Kim, Y.S. (1985a). Distribution of Blood Group Antigens A, B, H, Lewis_a, and Lewis_b in Human Normal, Fetal, and Malignant Colonic Tissue. *Cancer Res* 45, 4499–4511.

Yuan, M., Itzkowitz, S.H., Palekar, A., Shamsuddin, A.M., Phelps, P.C., Trump, B.F., and Kim, Y.S. (1985b). Distribution of blood group antigens A, B, H, Lewis_a, and Lewis_b in human normal, fetal, and malignant colonic tissue. *Cancer Res* 45, 4499–4511.

Z

Zhang, D., Tan, M., Zhong, W., Xia, M., Huang, P., and Jiang, X. (2017a). Human intestinal organoids express histo-blood group antigens, bind norovirus VLPs, and support limited norovirus replication. *Sci Rep* 7.

Zhang, D., Tan, M., Zhong, W., Xia, M., Huang, P., and Jiang, X. (2017b). Human intestinal organoids express histo-blood group antigens, bind norovirus VLPs, and support limited norovirus replication. *Sci Rep* 7, 12621.

Zou, W.Y., Blutt, S.E., Crawford, S.E., Ettayebi, K., Zeng, X.-L., Saxena, K., Ramani, S., Karandikar, U.C., Zachos, N.C., and Estes, M.K. (2019). Human Intestinal Enteroids: New Models to Study Gastrointestinal Virus Infections. *Methods Mol Biol* 1576, 229–247.