



## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : [ddoc-thesesexercice-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-thesesexercice-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

UNIVERSITE DE LORRAINE  
2017

---

FACULTE DE PHARMACIE

**MEMOIRE**  
**du DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES**  
**d'Innovation Pharmaceutique et Recherche**

Soutenu devant le Jury Interrégional

le 29 Juin 2017

par **Cédric HARTARD**  
né le 03 décembre 1988, à Metz (57)

Conformément aux dispositions de l'arrêté du 4 octobre 1988 tient lieu de

**THESE**  
**pour le DIPLOME D'ETAT**  
**de DOCTEUR en PHARMACIE**

---

**Toxi-infections alimentaires collectives : Apport de la norme ISO 15216 pour évaluer le risque lié à la présence de norovirus humains dans les fruits de mer**

---

**Membres du Jury**

<b>Président :</b>	Pr Christophe GANTZER	Professeur des universités, Faculté de Pharmacie, Université de Lorraine
<b>Directeur :</b>	Dr Sandrine BANAS	Maitre de conférences, Faculté de Pharmacie, Université de Lorraine
<b>Juges :</b>	Dr Nicolas BOUDAUD	Responsable de projets virologie, ACTALIA, Pôle sécurité des aliments, Saint-Lô
	Pr Sophie GANGLOFF	Professeur des universités, Faculté de Pharmacie, Université de Reims Champagne-Ardenne
	Dr Nadine PETITPAIN	Pharmacien, Praticien hospitalier, CHRU de Nancy

**UNIVERSITÉ DE LORRAINE  
FACULTÉ DE PHARMACIE  
Année universitaire 2016-2017**

***DOYEN***

Francine PAULUS

***Vice-Doyen***

Béatrice FAIVRE

***Directeur des Etudes***

Virginie PICHON

***Conseil de la Pédagogie***

Président, Brigitte LEININGER-MULLER

***Collège d'Enseignement Pharmaceutique Hospitalier***

Président, Béatrice DEMORE

***Commission Prospective Facultaire***

Président, Christophe GANTZER

Vice-Président, Jean-Louis MERLIN

***Commission de la Recherche***

Président, Raphaël DUVAL

***Responsable de la filière Officine***

***Responsables de la filière Industrie***

***Responsable de la filière Hôpital***

***Responsable Pharma Plus ENSIC***

***Responsable Pharma Plus ENSAIA***

***Responsable Pharma Plus ENSGSI***

***Responsable de la Communication***

***Responsable de la Cellule de Formation Continue et individuelle***

***Responsable de la Commission d'agrément des maîtres de stage***

***Responsable ERASMUS***

Béatrice FAIVRE

Isabelle LARTAUD,

Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

Béatrice DEMORE

Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

Raphaël DUVAL

Igor CLAROT

Marie-Paule SAUDER

Béatrice FAIVRE

Béatrice FAIVRE

Mihayl VARBANOV

***DOYENS HONORAIRES***

Chantal FINANCE

Claude VIGNERON

***PROFESSEURS EMERITES***

Jeffrey ATKINSON

Jean-Claude BLOCK

Max HENRY

Alain MARSURA ☰

Claude VIGNERON

***PROFESSEURS HONORAIRES***

Roger BONALY

Pierre DIXNEUF

Marie-Madeleine GALTEAU

Thérèse GIRARD

Michel JACQUE

Pierre LABRUDE

Vincent LOPPINET

Janine SCHWARTZBROD

Louis SCHWARTZBROD

***MAITRES DE CONFERENCES HONORAIRES***

Monique ALBERT

Mariette BEAUD

Gérald CATAU

Jean-Claude CHEVIN

Jocelyne COLLOMB

Bernard DANGIEN

Marie-Claude FUZELLIER

Françoise HINZELIN

Francine KEDZIEREWICZ

Marie-Hélène LIVERTOUX

Bernard MIGNOT

Jean-Louis MONAL

Blandine MOREAU

Dominique NOTTER

Christine PERDICAKIS

Marie-France POCHON

Anne ROVEL

Gabriel TROCKLE

Maria WELLMAN-ROUSSEAU

Colette ZINUTTI

***ASSISTANTS HONORAIRES***

Marie-Catherine BERTHE

Annie PAVIS

**PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS**

Danièle BENSOUSSAN-LEJZEROWICZ	82	<i>Thérapie cellulaire</i>
Jean-Louis MERLIN	82	<i>Biologie cellulaire</i>
Alain NICOLAS	80	<i>Chimie analytique et Bromatologie</i>
Jean-Michel SIMON	81	<i>Economie de la santé, Législation pharmaceutique</i>
Nathalie THILLY	81	<i>Santé publique et Epidémiologie</i>

**PROFESSEURS DES UNIVERSITES**

Christine CAPDEVILLE-ATKINSON	86	<i>Pharmacologie</i>
Igor CLAROT ✎	85	<i>Chimie analytique</i>
Joël DUCOURNEAU	85	<i>Biophysique, Acoustique, Audioprothèse</i>
Raphaël DUVAL	87	<i>Microbiologie clinique</i>
Béatrice FAIVRE	87	<i>Biologie cellulaire, Hématologie</i>
Luc FERRARI	86	<i>Toxicologie</i>
Pascale FRIANT-MICHEL	85	<i>Mathématiques, Physique</i>
Christophe GANTZER	87	<i>Microbiologie</i>
Frédéric JORAND	87	<i>Eau, Santé, Environnement</i>
Isabelle LARTAUD	86	<i>Pharmacologie</i>
Dominique LAURAIN-MATTAR	86	<i>Pharmacognosie</i>
Brigitte LEININGER-MULLER	87	<i>Biochimie</i>
Pierre LEROY	85	<i>Chimie physique</i>
Philippe MAINCENT	85	<i>Pharmacie galénique</i>
Patrick MENU	86	<i>Physiologie</i>
Jean-Bernard REGNOUF de VAINS	86	<i>Chimie thérapeutique</i>
Bertrand RIHN	87	<i>Biochimie, Biologie moléculaire</i>

**MAITRES DE CONFÉRENCES DES UNIVERSITÉS - PRATICIENS HOSPITALIERS**

Béatrice DEMORE	81	<i>Pharmacie clinique</i>
Alexandre HARLE ✎	82	<i>Biologie cellulaire oncologique</i>
Julien PERRIN	82	<i>Hématologie biologique</i>
Marie SOCHA	81	<i>Pharmacie clinique, thérapeutique et biotechnique</i>

**MAITRES DE CONFÉRENCES**

Sandrine BANAS	87	<i>Parasitologie</i>
Xavier BELLANGER	87	<i>Parasitologie, Mycologie médicale</i>
Emmanuelle BENOIT	86	<i>Communication et Santé</i>
Isabelle BERTRAND	87	<i>Microbiologie</i>
Michel BOISBRUN	86	<i>Chimie thérapeutique</i>
François BONNEAUX	86	<i>Chimie thérapeutique</i>
Ariane BOUDIER	85	<i>Chimie Physique</i>
Cédric BOURA	86	<i>Physiologie</i>
Joël COULON	87	<i>Biochimie</i>
Sébastien DADE	85	<i>Bio-informatique</i>
Dominique DECOLIN	85	<i>Chimie analytique</i>
Roudayna DIAB	85	<i>Pharmacie galénique</i>
Natacha DREUMONT	87	<i>Biochimie générale, Biochimie clinique</i>
Florence DUMARCAZ	86	<i>Chimie thérapeutique</i>
François DUPUIS	86	<i>Pharmacologie</i>
Adil FAIZ	85	<i>Biophysique, Acoustique</i>
Anthony GANDIN	87	<i>Mycologie, Botanique</i>
Caroline GAUCHER	86	<i>Chimie physique, Pharmacologie</i>
Stéphane GIBAUD	86	<i>Pharmacie clinique</i>
Thierry HUMBERT	86	<i>Chimie organique</i>
Olivier JOUBERT	86	<i>Toxicologie, Sécurité sanitaire</i>
Alexandrine LAMBERT	85	<i>Informatique, Biostatistiques</i>
Julie LEONHARD	86/01	<i>Droit en Santé</i>
Christophe MERLIN	87	<i>Microbiologie environnementale</i>
Maxime MOURER	86	<i>Chimie organique</i>
Coumba NDIAYE ✎	86	<i>Epidémiologie et Santé publique</i>
Marianne PARENT ✎	85	<i>Pharmacie galénique</i>

**ENSEIGNANTS (suite)***Section CNU\***Discipline d'enseignement*

Francine PAULUS	85	<i>Informatique</i>
Caroline PERRIN-SARRADO	86	<i>Pharmacologie</i>
Virginie PICHON	85	<i>Biophysique</i>
Sophie PINEL	85	<i>Informatique en Santé (e-santé)</i>
Anne SAPIN-MINET	85	<i>Pharmacie galénique</i>
Marie-Paule SAUDER	87	<i>Mycologie, Botanique</i>
Guillaume SAUTREY	85	<i>Chimie analytique</i>
Rosella SPINA	86	<i>Pharmacognosie</i>
Sabrina TOUCHET	86	<i>Pharmacochimie</i>
Mihayl VARBANOV	87	<i>Immuno-Virologie</i>
Marie-Noëlle VAULTIER	87	<i>Mycologie, Botanique</i>
Emilie VELOT	86	<i>Physiologie-Physiopathologie humaines</i>
Mohamed ZAIQU	87	<i>Biochimie et Biologie moléculaire</i>

**PROFESSEUR ASSOCIE**

Anne MAHEUT-BOSSER	86	<i>Sémiologie</i>
--------------------	----	-------------------

**PROFESSEUR AGREGE**

Christophe COCHAUD	11	<i>Anglais</i>
--------------------	----	----------------

✉ En attente de nomination

**\*Disciplines du Conseil National des Universités :**

80 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences physico-chimiques et ingénierie appliquée à la santé

81 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences du médicament et des autres produits de santé

82 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences biologiques, fondamentales et cliniques

85 : Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences physico-chimiques et ingénierie appliquée à la santé

86 : Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences du médicament et des autres produits de santé

87 : Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences biologiques, fondamentales et cliniques

11 : Professeur agrégé de lettres et sciences humaines en langues et littératures anglaises et anglo-saxonnes

# SERMENT DES APOTHICAires



**J**e jure, en présence des maîtres de la Faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

**D**'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

**D**'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

**D**e ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

**Q**ue les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

**Q**ue je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.



« LA FACULTE N'ENTEND DONNER AUCUNE APPROBATION,  
NI IMPROBATION AUX OPINIONS EMISES DANS LES  
THESES, CES OPINIONS DOIVENT ETRE CONSIDERES  
COMME PROPRES A LEUR AUTEUR ».

# REMERCIEMENTS

---

***A Monsieur le Professeur Christophe GANTZER,***  
*Professeur des universités, Faculté de Pharmacie de Nancy.*

*Vous me faites l'honneur de présider cette thèse, je vous en remercie sincèrement. Veuillez trouver ici l'expression de mon respect et de ma profonde reconnaissance.*

**A Madame le Docteur Sandrine BANAS,**  
Maitre de conférences, Faculté de Pharmacie de Nancy.

*Pour la liberté que tu m'as accordée lors de la réalisation de ce travail. Sois assurée de mes remerciements.*

**A Monsieur le Docteur Nicolas BOUDAUD,**  
Responsable de projets virologie, Pôle sécurité des aliments - ACTALIA, Saint-Lô.

*Pour l'honneur que tu me fais en participant à ce jury et pour l'intérêt que tu portes à ce travail. Reçois ici toute ma gratitude.*

**A Madame le Professeur Sophie GANGLOFF,**  
Professeur des universités, Faculté de Pharmacie de Reims.

*Vous me faites l'honneur de juger ce travail. Veuillez croire en ma profonde reconnaissance.*

**A Madame le Docteur Nadine PETITPAIN,**  
Pharmacien, Praticien hospitalier, CHRU de Nancy.

*Pour avoir accepté de juger ce travail, veuillez trouver ici le témoignage de ma gratitude.*

*A mes amis rencontrés à la fac et ailleurs,*

*Au personnel des pharmacies par lesquelles je suis passé ainsi qu'à mes co-internes avec qui j'ai fait mes premiers pas à l'hôpital,*

*A toute l'équipe du Laboratoire de Chimie Physique et Microbiologie pour l'Environnement de Nancy qui m'a initié au métier de chercheur.*

***A mes parents,***

*Pour m'avoir toujours soutenu et encouragé dans tout ce que j'ai entrepris. Je vous dédie cette thèse.*

***A l'ensemble de ma famille,***

*Pour vos encouragements.*

***A Laura,***

*Pour m'avoir soutenu au quotidien pendant ces longues années...*

# TABLE DES MATIERES

---

<b>LISTE DES FIGURES .....</b>	<b>IV</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX .....</b>	<b>VI</b>
<b>LISTE DES ABREVIATIONS .....</b>	<b>VII</b>
<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>1</b>
<b>I. LES TOXI-INFECTIONS ALIMENTAIRES COLLECTIVES .....</b>	<b>3</b>
<b>I.1 Définition .....</b>	<b>3</b>
<b>I.2 Origine des TIAC - Concept des 5 M.....</b>	<b>4</b>
I.2.1 Les matières premières .....	5
I.2.2 Le matériel.....	5
I.2.3 Le milieu .....	5
I.2.4 Les méthodes .....	6
I.2.5 La main d'œuvre.....	6
<b>I.3 Déclaration des TIAC .....</b>	<b>7</b>
<b>I.4 Statistiques.....</b>	<b>8</b>
<b>I.5 Pathogènes en cause .....</b>	<b>12</b>
I.5.1 Principales bactéries responsables de TIAC .....	13
I.5.1.1 <i>Salmonella</i> spp.....	13
I.5.1.2 <i>Campylobacter</i> spp. ....	16
I.5.1.3 Bactéries produisant des toxines.....	17
I.5.2 Bactéries responsables des TIAC les plus graves .....	21
I.5.2.1 <i>Listeria monocytogenes</i> .....	21
I.5.2.2 <i>Clostridium botulinum</i> .....	22
I.5.3 Virus .....	24
I.5.3.1 Virus de l'hépatite A .....	25
I.5.3.2 Virus de l'hépatite E .....	27
<b>II. LES NOROVIRUS .....</b>	<b>29</b>
<b>II.1 Structure et classification .....</b>	<b>30</b>
II.1.1 Génome.....	31

II.1.2 Capside .....	32
II.1.3 Classification .....	34
<b>II.2 Cycle de réPLICATION .....</b>	<b>37</b>
II.2.1 Alternatives à l'étude des norovirus humains .....	37
II.2.2 Adhésion du virus .....	38
II.2.2.1 Tropisme cellulaire .....	38
II.2.2.2 Récepteur viral .....	39
II.2.2.3 Rôle du microbiote intestinal .....	40
II.2.3 Pénétration et décapsidation .....	41
II.2.4 Traduction des protéines virales .....	42
II.2.5 RéPLICATION du génome .....	44
II.2.6 Encapsidation et libération des virions .....	45
<b>II.3 L'infection par les norovirus .....</b>	<b>47</b>
II.3.1 Transmission .....	47
II.3.2 Clinique .....	48
II.3.3 Contexte épidémiologique .....	51
II.3.3.1 Epidémiologie moléculaire.....	53
II.3.3.2 Les épidémies de gastroentérites causées par les norovirus.....	55
II.3.3.3 Les cas sporadiques .....	58
II.3.3.4 Aspect économique des gastroentérites causées par les norovirus.....	59
<b>II.4 Sensibilité aux norovirus.....</b>	<b>62</b>
II.4.1 Importance du polymorphisme des HBGA dans l'infection par les norovirus.....	62
II.4.1.1 Les HBGA.....	62
II.4.1.2 Biosynthèse des antigènes A, B, H et Lewis .....	63
II.4.1.3 Interaction entre les norovirus humains et les HBGA.....	67
II.4.2 Réponse immunitaire et vaccination .....	69
<b>II.5 Diagnostic des infections à Norovirus .....</b>	<b>71</b>
II.5.1 Méthodes immunologiques .....	71
II.5.2 Méthodes moléculaires .....	73
<b>II.6 Place des norovirus dans les TIAC .....</b>	<b>76</b>
II.6.1 Aliments en cause .....	77
II.6.2 Facteurs favorisant la présence des norovirus dans les denrées alimentaires ..	79
II.6.2.1 Stabilité dans l'environnement.....	79
II.6.2.2 Accumulation des norovirus dans les denrées alimentaires.....	81

<b>III. LA NORME ISO 15216.....</b>	<b>83</b>
<b>III.1 Contexte réglementaire .....</b>	<b>83</b>
III.1.1 Evaluation de la qualité microbiologique des mollusques bivalves en Europe..	83
III.1.2 Limites des indicateurs bactériens .....	85
<b>III.2 Description de la norme ISO 15216.....</b>	<b>87</b>
III.2.1 Extraction des virus .....	88
III.2.1.1 A partir des mollusques bivalves .....	88
III.2.1.2 A partir des fruits rouges et salades .....	90
III.2.1.3 A partir des eaux embouteillées .....	90
III.2.1.4 A partir des surfaces alimentaires .....	90
III.2.1.5 Etalon interne .....	91
III.2.2 Extraction des acides nucléiques.....	91
III.2.3 Quantification des génomes par RT-PCR en temps réel.....	92
III.2.3.1 Détection des génomes de norovirus et du virus de l'hépatite A .....	92
III.2.3.2 Détermination du rendement d'extraction .....	93
III.2.3.3 Inhibition.....	93
<b>III.3 Interprétation des résultats .....</b>	<b>94</b>
III.3.1 Sous-estimation du danger viral.....	94
III.3.2 Surestimation du danger viral .....	96
III.3.3 Mise en place d'un seuil de risque .....	96
III.3.4 Pondération du danger lié à la présence de génomes de norovirus dans les mollusques bivalves .....	98
<b>CONCLUSION.....</b>	<b>101</b>
<b>REFERENCES .....</b>	<b>105</b>

# LISTE DES FIGURES

---

<b>Figure 1</b> : Diagramme des causes et effets d'Ishikawa appliqué à la contamination des aliments par les microorganismes pathogènes .....	4
<b>Figure 2</b> : Cascade de Mossel montrant la perte d'informations dans le recensement des TIAC .....	9
<b>Figure 3</b> : Nombre de foyers de TIAC déclaré aux ARS et aux DDCSPP en France entre 1987 et 2014 .....	11
<b>Figure 4</b> : Etiologie des TIAC recensées en Europe en 2014.....	12
<b>Figure 5</b> : Etiologie des TIAC recensées en Europe entre 2008 et 2014.....	25
<b>Figure 6</b> : Observation par immunomicroscopie électronique d'un agrégat de norovirus..	30
<b>Figure 7</b> : Organisation du génome des norovirus .....	32
<b>Figure 8</b> : Structure de la capsid des norovirus .....	33
<b>Figure 9</b> : Phylogénie des norovirus.....	36
<b>Figure 10</b> : Modèle expliquant les étapes précoces de l'infection des norovirus .....	41
<b>Figure 11</b> : Cycle de réplication des norovirus .....	43
<b>Figure 12</b> : Proposition de deux mécanismes à l'origine de la synthèse des ARN subgénomiques des norovirus .....	46
<b>Figure 13</b> : Cycle de transmission des pathologies liées au péril fécal.....	47
<b>Figure 14</b> : Contexte épidémiologique des infections à norovirus .....	52
<b>Figure 15</b> : Emergence successive des différentes souches de norovirus du génotype GII.4 à l'origine d'épidémies de gastroentérites depuis 2000 .....	54
<b>Figure 16</b> : Détection des norovirus appartenant au génotype GII.17 à travers le monde, de 1978 à 2015 .....	55
<b>Figure 17</b> : Contexte et nombre d'épidémies de gastroentérites causées par les norovirus déclarées aux États-Unis entre 2009 et 2013 .....	56
<b>Figure 18</b> : Charge de morbidité des différentes maladies d'origine alimentaire exprimée pour un cas et pour une population de 100 000 habitants.....	60

<b>Figure 19</b> : Coût moyen de la prise en charge médicale et de la perte de productivité lié aux gastroentérites causées par les norovirus, rapporté au nombre de cas par zone géographique et par tranche d'âge .....	61
<b>Figure 20</b> : Voies de synthèse des différents HBGA impliqués dans la reconnaissance des norovirus .....	64
<b>Figure 21</b> : Modèle schématique présentant les interactions entre différentes souches de norovirus humains et les récepteurs HBGA .....	69
<b>Figure 22</b> : Technique ELISA de type sandwich utilisée pour détecter les antigènes des norovirus .....	72
<b>Figure 23</b> : Fonctionnement des tests immunochromatographiques utilisés pour la détection des antigènes de norovirus .....	73
<b>Figure 24</b> : Principe de la PCR en temps réel (qPCR) .....	75
<b>Figure 25</b> : Place des norovirus dans les maladies alimentaires .....	78
<b>Figure 26</b> : Conduite à tenir avant la distribution des mollusques bivalves selon leur zone de production.....	84
<b>Figure 27</b> : Description de la norme ISO 15216 relative à la recherche du virus de l'hépatite A et des norovirus dans les aliments par RT-PCR en temps réel.....	89
<b>Figure 28</b> : Logigramme permettant l'interprétation d'un résultat positif lors de la détection du génome d'un virus pathogène dans une matrice alimentaire par les techniques de biologie moléculaire.....	99

# LISTE DES TABLEAUX

---

<b>Tableau I</b> : Nombre de TIAC recensées en Europe en 2014 .....	10
<b>Tableau II</b> : Taux de portage asymptomatique des norovirus observés dans différentes populations à travers le monde .....	50
<b>Tableau III</b> : Prévalence des norovirus dans les épidémies de gastroentérites .....	52
<b>Tableau IV</b> : Glycosyltransférases impliquées dans la synthèse des antigènes A, B, H et Lewis à partir des chaînes précurseurs .....	65
<b>Tableau V</b> : Classement sanitaire des zones conchyliques en Europe .....	84
<b>Tableau VI</b> : Amorces et sondes utilisées pour la détection du virus de l'hépatite A et des norovirus du génogroupe GI et GII dans les matrices alimentaires .....	92
<b>Tableau VII</b> : Probabilité de détecter des génomes de norovirus dans des lots de coquillages en fonction de leur prévalence et de leur concentration .....	95

# LISTE DES ABREVIATIONS

---

<b>ADN</b>	Acide désoxyribonucléique
<b>ADNc</b>	ADN complémentaire
<b>AFSSA</b>	Agence française de sécurité sanitaire des aliments
<b>ANSES</b>	Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
<b>ARN</b>	Acide ribonucléique
<b>ARNm</b>	ARN messager
<b>ARS</b>	Agence régionale de santé
<b>CDC</b>	<i>Centers for disease control and prevention</i>
<b>CEN</b>	Comité européen de normalisation
<b>cg</b>	Copies de génome
<b>CLI</b>	Chair et liquide intervalvaire
<b>CNR</b>	Centre national de référence
<b>Cq</b>	Cycle de quantification
<b>DALY</b>	<i>Disability-adjusted life years</i> (Espérance de vie corrigée de l'incapacité)
<b>DDCSPP</b>	Direction départementale de la cohésion sociale et de la protection des populations
<b>DGAL</b>	Direction générale de l'alimentation
<b>DGCCRF</b>	Direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes
<b>DGS</b>	Direction générale de la santé
<b>DI<sub>50</sub></b>	Dose infectieuse entraînant des signes cliniques chez 50 % des sujets inoculés
<b>DMI</b>	Dose minimale infectieuse
<b>DO</b>	Déclaration obligatoire
<b>eIF</b>	<i>Eukarotic initiation factor</i>
<b>EFSA</b>	<i>European food safety authority</i>
<b>ELISA</b>	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
<b>EMA</b>	Ethidium monoazide
<b>FAO</b>	<i>Food and agriculture organization of the United Nations</i>
<b>FCV</b>	Calicivirus félin
<b>FDA</b>	<i>Food and drug administration</i>
<b>HBGA</b>	<i>Histo-blood group antigens</i> (Antigènes tissulaires de groupes sanguins)
<b>ICC-PCR</b>	<i>Integrated cell culture - PCR</i>

<b>ICTV</b>	<i>International committee on taxonomy of viruses</i>
<b>InVS</b>	Institut de veille sanitaire
<b>ISO</b>	<i>International organization for standardization</i>
<b>LAMP</b>	<i>Loop-mediated isothermal amplification</i>
<b>LOD</b>	Limite de détection
<b>LOQ</b>	Limite de quantification
<b>ME</b>	Microscope électronique
<b>MIQE</b>	<i>Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments</i>
<b>MNV</b>	Norovirus murin
<b>NASBA</b>	<i>Nucleic acid sequence based amplification</i>
<b>NoV</b>	Norovirus
<b>OMS</b>	Organisation mondial de la santé
<b>ORF</b>	<i>Open reading frame</i>
<b>PABP</b>	<i>Poly(A)-binding protein</i>
<b>PBS</b>	<i>Phosphate buffered saline</i>
<b>PCR</b>	<i>Polymerase chain reaction</i>
<b>PEG</b>	Polyéthylène glycol
<b>PMA</b>	Propidium monoazide
<b>qPCR</b>	PCR en temps réel
<b>RASFF</b>	<i>Rapid alert system for food and feed</i>
<b>RdRp</b>	ARN polymérase ARN-dépendante
<b>RHDV</b>	<i>Rabbit haemoragic disease virus</i>
<b>RT</b>	<i>Reverse transcription</i>
<b>SRSV</b>	<i>Small round structured virus</i>
<b>TGBE</b>	<i>Tris glycine beef extract buffer</i>
<b>TIAC</b>	Toxi-infection alimentaire collective
<b>UFC</b>	Unités formant colonies
<b>USLD</b>	Unité de soins de longue durée
<b>VHA</b>	Virus de l'hépatite A
<b>VHE</b>	Virus de l'hépatite E
<b>VLP</b>	<i>Virus-like particle</i>
<b>VPg</b>	<i>Viral protein genome-linked</i>

# INTRODUCTION

---

Bien qu'à l'origine de symptômes généralement bénins, les norovirus représentent actuellement un réel problème de santé publique de par leur forte incidence en pathologie humaine. Très contagieux, ces virus sont en effet responsables chaque année de plus de 700 millions de cas de gastroentérites à travers le monde et sont la première étiologie des épidémies hivernales. Les norovirus sont également responsables de toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) et sont d'ailleurs identifiés comme en étant la principale cause aux États-Unis. En France, bien que leur implication dans les maladies alimentaires semble moins importante, le nombre de cas reste préoccupant.

La transmission particulièrement efficace des norovirus, qu'elle ait lieu directement entre les individus ou alors qu'elle se fasse par le biais d'aliments, est favorisée par différents facteurs. Les norovirus présentent tout d'abord une excellente stabilité dans l'environnement. Ainsi, après leur excrétion par les sujets infectés, les particules infectieuses sont capables de persister dans les eaux, sur des surfaces inertes, ou encore dans les matrices alimentaires même après congélation. D'autre part, la virulence des norovirus est extrêmement élevée puisque l'ingestion de très faibles quantités de particules virales est suffisante pour infecter un nouvel individu. Enfin, les norovirus possèdent des caractéristiques intrinsèques d'échappement à l'immunité collective qui facilite leur propagation au sein de la population.

Lorsque la transmission des norovirus se fait par les aliments, la contamination des denrées résulte généralement d'un contact direct avec des virus présents dans l'environnement ou alors elle est liée à leur manutention par du personnel excrétant des particules virales. Compte tenu de ce mode de contamination, certains aliments sont identifiés comme étant plus fréquemment à l'origine de ce type de TIAC. Il s'agit par exemple des coquillages pouvant être contaminés en cas de pollution des zones conchyliocoles ou encore de certains végétaux contaminés en cas d'irrigation des cultures avec des eaux souillées.

Afin de limiter l'incidence des maladies alimentaires, des mesures réglementaires sont définies pour contrôler au mieux la qualité microbiologique des denrées. En Europe, la qualité microbiologique des fruits de mer est par exemple estimée par la recherche d'*Escherichia coli*, un indicateur bactérien de pollution fécale. Il apparaît aujourd'hui que l'application de cet unique critère microbiologique présente certaines limites pour garantir la sécurité du consommateur, notamment vis-à-vis du danger lié à la présence de norovirus dans les coquillages.

En réponse à cette problématique, la recherche directe des norovirus dans les aliments les plus à risque est logiquement proposée. Dans ce but, la norme ISO 15216 aboutit en 2017 décrit une technique permettant entre autre la détection des génomes de norovirus dans différents types de matrices alimentaires, y compris les mollusques bivalves. Son application pourrait ainsi définir de nouveaux critères afin de mieux contrôler la qualité microbiologique de ces aliments.

Dans ce contexte particulier, nous nous intéresserons dans la première partie de ce document à l'incidence des TIAC et aux pathogènes les plus fréquemment incriminés. Nous insisterons plus particulièrement dans une seconde partie sur la physiopathologie des norovirus et leur rôle dans les maladies alimentaires. Enfin, dans une dernière partie, nous discuterons de la mise en place de la norme ISO 15216, en abordant notamment certaines limites déjà envisagées.

# I. LES TOXI-INFECTIONS ALIMENTAIRES COLLECTIVES

---

Chaque année en France, des milliers de personnes souffrent de maladies infectieuses d'origine alimentaire. Le plus souvent sans gravité, ces pathologies ont néanmoins une grande incidence sociale et économique qui justifie leur surveillance. Cette veille est assurée par différents acteurs et systèmes d'alerte, que ce soit au niveau national (InVS, ARS, CNR, DGS, DGAL, ANSES, DGCCRF) ou au niveau européen (RASFF, EFSA).

Le recensement accru des foyers de toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) a pour objectif de déclencher aussi rapidement que possible les investigations nécessaires à identifier leurs causes ; il contribue ainsi à la mise en place de mesures correctrices afin d'améliorer la sécurité alimentaire.

## I.1 Définition

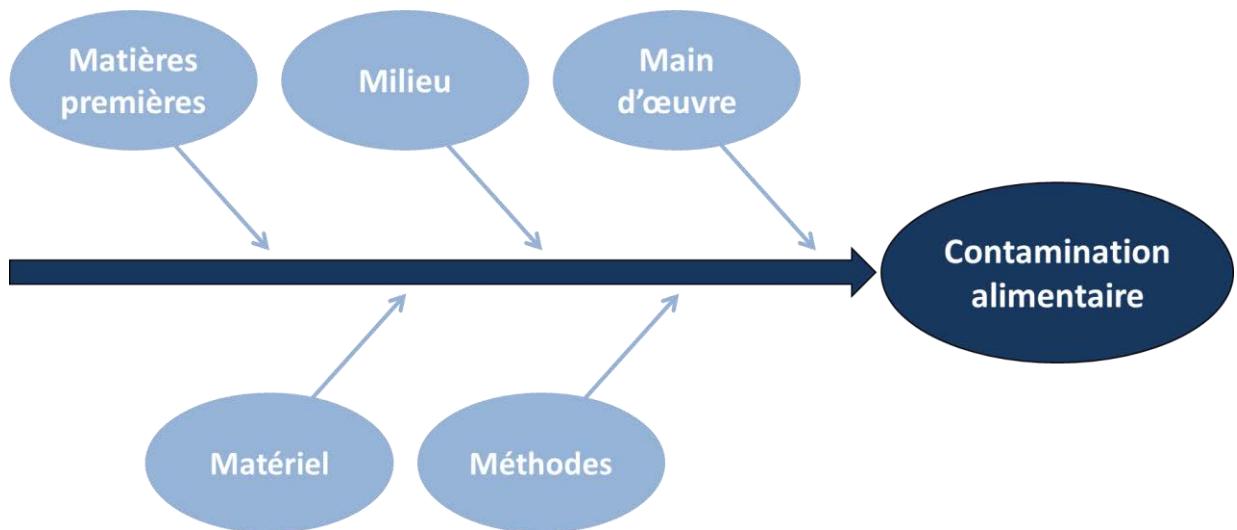
Un foyer de TIAC est définie par « l'apparition d'au moins deux cas d'une symptomatologie, en général digestive, dont on peut rapporter la cause à une même origine alimentaire » (Pignault *et al.*, 1991).

Les maladies alimentaires peuvent avoir différentes origines en lien avec les microorganismes. Elles peuvent tout d'abord résulter de l'ingestion massive de pathogènes et de leurs toxines présents dans un aliment ; on parle alors de toxi-infections. Elles peuvent également être causées par l'ingestion de toxines uniquement ; il s'agit dans ce cas d'intoxications. Si l'ingestion de catabolites toxiques produits lors de la dégradation d'un aliment par des microorganismes est en cause, on parle alors d'intoxication. Enfin, les maladies peuvent être le résultat de l'ingestion d'une quantité très faible de microorganismes. Dans ce cas, c'est la multiplication *in vivo* des germes qui sera à l'origine des symptômes ; on parle alors d'infection. Le terme générique de TIAC regroupe l'ensemble de ces situations.

## I.2 Origine des TIAC - Concept des 5 M

La contamination des aliments par des microorganismes pathogènes peut se produire tout au long du processus de transformation. Les étapes les plus critiques sont notamment identifiables grâce à des outils couramment employés pour améliorer la gestion de la qualité. Le diagramme des causes et effets d'Ishikawa (Best & Neuhauser, 2008) organisé autour du concept des « 5M » (*i.e.* matières premières, milieu, main d'œuvre, matériel et méthodes) en est un exemple (**Figure 1**).

Dans l'industrie alimentaire, des mesures sont ainsi prises à chacune des étapes du processus de transformation, afin de garantir aux consommateurs des denrées sans danger.



**Figure 1 : Diagramme des causes et effets d'Ishikawa appliqué à la contamination des aliments par les microorganismes pathogènes.** Si la contamination des denrées alimentaires est causée par un microorganisme pathogène présent dans les matières premières avant le processus de transformation, on parle de contamination endogène. Par opposition, les différentes étapes nécessaires à l'obtention du produit fini constituent un risque de contamination exogène.

### I.2.1 Les matières premières

La contamination des matières premières est directement liée à la présence de pathogènes dans l'environnement (e.g. sol, eau) ou au niveau du tractus digestif des animaux dans le cas de produits carnés. Dans le cas des coquillages, c'est la présence de microorganismes dans les eaux des zones conchyliques qui est par exemple la principale cause de contamination.

La lutte contre les maladies alimentaires débute donc tout d'abord par le contrôle rigoureux des matières premières (e.g. examens vétérinaires des animaux, analyses microbiologiques des produits) mais aussi de leur environnement (e.g. classification des zones conchyliques, réglementation de l'irrigation des cultures maraîchères). Par la suite, leur stockage dans des conditions appropriées permet de limiter la prolifération des microorganismes éventuellement présents, si ceux-ci sont capables de se multiplier dans les denrées en question. Dans le cas des produits d'origine animale, le respect des bonnes pratiques durant le transport et l'abattage des animaux permet également de limiter la contamination des produits.

### I.2.2 Le matériel

Le matériel utilisé lors du processus de transformation des denrées alimentaires est également une source potentielle de contamination. Ce paramètre regroupe l'ensemble des machines, outils et autres surfaces qui sont en contact direct avec les produits.

Afin de limiter la contamination des aliments, il convient donc d'utiliser du matériel adapté à chacune des tâches à effectuer (e.g. matériel étanche, lisse, facilement démontable, sans angle mort) et de composition appropriée (e.g. inox, verre, aluminium). Il convient également de respecter les règles de nettoyage et de désinfection des instruments utilisés.

### I.2.3 Le milieu

La bonne tenue des locaux abritant les étapes de transformation des denrées alimentaires est un paramètre essentiel. De manière générale, les locaux doivent être conçus afin de permettre le maintien d'un niveau d'hygiène suffisant (e.g. revêtements lisses et facilement nettoyables, absence d'angles vifs entre les murs et les sols) et ils

doivent être sectorisés (e.g. zone de stockage, chaîne de production, laboratoire, bureaux). Il est également important de limiter la contamination de l'environnement de travail par les poussières en aménageant par exemple les abords des locaux et en stockant les déchets générés dans des endroits appropriés afin d'éviter la prolifération des ravageurs.

De la même manière, la qualité de l'air ambiant ainsi que de l'eau utilisée en chaîne de production est un paramètre à maîtriser par la réalisation régulière d'analyses microbiologiques. Enfin, le circuit des produits doit systématiquement suivre la règle de la « marche en avant » afin de limiter les contaminations croisées.

#### I.2.4 Les méthodes

Différents paramètres doivent également être pris en compte durant le processus de transformation des aliments afin d'en limiter la contamination. Le recours à des opérations automatisées peut par exemple être préférable à la manipulation des denrées par les employés. Par ailleurs, le respect de la chaîne du froid tout au long du processus permet de limiter la croissance bactérienne. Il convient également de profiter de certains paramètres directement liés aux aliments ou à leur préparation pour contrôler la prolifération des germes (e.g. eau disponible, pH, teneur en sels et en sucres, conditionnement sous atmosphère protectrice). Enfin, certains traitements comme la cuisson, la pasteurisation, la stérilisation, la pascalisation ou encore l'ionisation permettent d'éliminer les pathogènes potentiellement présents.

#### I.2.5 La main d'œuvre

La dernière source de contamination des denrées alimentaires identifiée est la main d'œuvre. Il s'agit sans doute du paramètre le plus important puisque c'est le personnel qui conditionne les autres « M », en contrôlant par exemple les matières premières, en assurant le nettoyage du matériel et des locaux, ou en réalisant la méthode.

Une étape primordiale est donc la formation des employés à leur poste. De la même manière, la formation aux règles d'hygiène et leur respect strict est indispensable. Il convient alors d'adapter les équipements afin de faciliter le respect de ces règles (e.g. sanitaires à pédales, pédiluves, vêtements de travail avec port de masques et

gants si nécessaire). Enfin, l'état de santé du personnel doit être régulièrement évalué, afin notamment de dépister le portage sain de certains germes pathogènes.

## I.3 Déclaration des TIAC

Malgré la bonne connaissance des situations pouvant conduire à la contamination des denrées alimentaires et la mise en place de mesures préventives, les TIAC demeurent un problème récurrent qui justifie la mise en place d'un système de surveillance.

Au titre du code de la santé publique, la surveillance des TIAC est assurée depuis 1987 par la déclaration obligatoire (DO) (Ministère des affaires sociales et de l'emploi, 1986). Ce processus a pour objectif de recueillir autant d'information que possible en rapport avec la survenue d'une pathologie, afin de contribuer notamment à la mise en place des mesures nécessaires à limiter sa propagation. Dans le cas des TIAC, ce dispositif participe activement à la sécurité alimentaire puisqu'il contribue à l'identification et au retrait du marché des denrées susceptibles d'être dangereuses pour le consommateur afin d'éviter la survenue d'une crise alimentaire.

La déclaration d'une maladie obligatoire se fait généralement en deux temps ; on distingue ainsi le signalement et la notification (InVS, 2003). Le signalement d'un foyer de TIAC permet une intervention urgente afin de mettre en place les mesures de prévention autour des cas. Il doit être sans délai et toutes personnes suspectant une TIAC, c'est-à-dire les médecins, les biologistes, les responsables d'établissements (e.g. écoles, hôpitaux), mais aussi les malades eux-mêmes, peuvent être à l'origine du signalement par tous moyens auprès de l'ARS du lieu concerné.

La notification quant à elle est exclusivement effectuée par le médecin ou le biologiste en charge du diagnostic. Elle permet de transmettre à l'ARS puis à l'InVS les données nécessaires à la surveillance épidémiologique de la maladie en question.

Cette veille sanitaire permet la réalisation d'enquêtes épidémiologiques descriptives afin d'établir la prévalence et la saisonnalité des TIAC. Elle permet alors d'identifier les pathogènes en cause, ainsi que les situations, les lieux ou encore les aliments les plus à risque. Dans ce but, d'autres investigations sont également mises en place comme des enquêtes cas/témoins ou des analyses microbiologiques afin

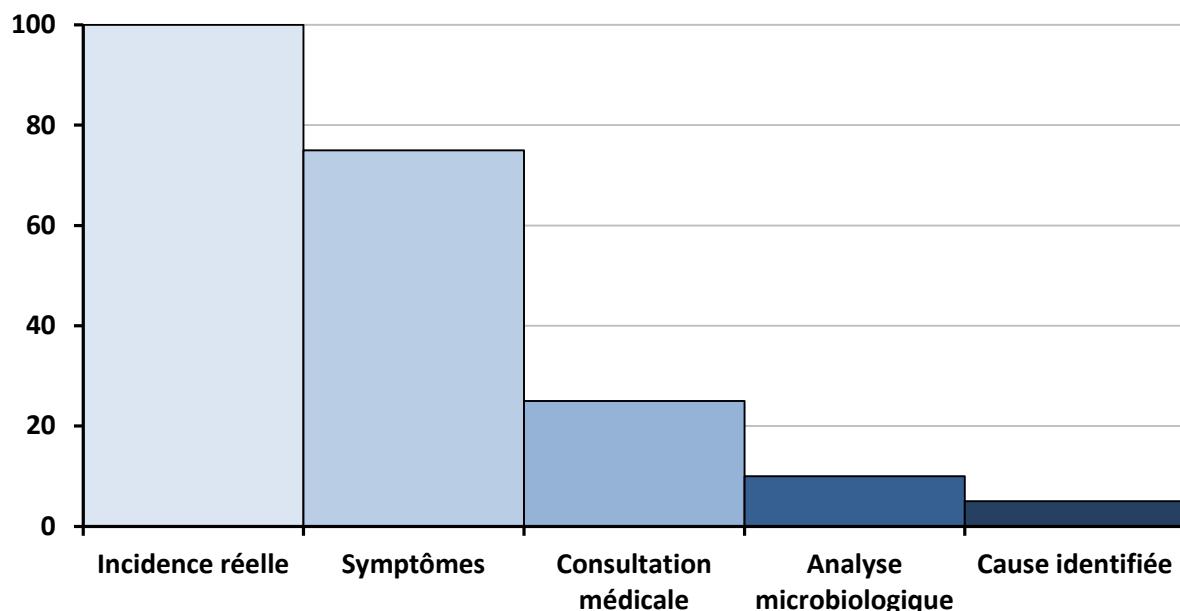
d'incriminer les aliments en cause. Enfin, la détermination des facteurs ayant conduits à la contamination des aliments peut permettre la mise en place des actions de prévention nécessaires.

## I.4 Statistiques

Le recensement exhaustif de l'ensemble des foyers de TIAC est extrêmement difficile, il apparaît donc inconcevable de pouvoir évaluer avec exactitude leur incidence. Si plusieurs facteurs sont à l'origine de la sous-estimation du nombre annuel de TIAC, la raison principale est que, puisque les symptômes observés sont dans la plupart des cas bénins, les patients consultent rarement leur médecin et la notification n'est dans ce cas pas effectuée. Ainsi, la majorité des foyers de TIAC déclarés concerne surtout les épisodes survenant dans les collectivités, puisqu'ils sont remarquables par le nombre d'individus concernés, ou alors les épisodes les plus graves, puisqu'ils nécessitent une consultation médicale, voire une hospitalisation.

Un second facteur pouvant limiter le recueil exhaustif de l'ensemble des foyers est la difficulté à diagnostiquer de manière formelle une TIAC. En effet, même en cas de consultation, il n'est pas toujours aisés de relier les symptômes observés à une étiologie alimentaire, ce qui explique que l'on parle plus souvent de TIAC suspectée plutôt que de TIAC avérée. En effet, alors que pour certains pathogènes la période d'incubation est brève, voire extrêmement courte (*i.e.* intoxications), pour d'autres, les symptômes apparaissent plusieurs jours voire plusieurs semaines après la consommation de l'aliment contaminé.

Cette perte d'informations classiquement observée lors du recensement des foyers de TIAC est bien connue et est décrite par la cascade de Mossel (**Figure 2**) (Leclerc & Mossel, 1989). Bien que cette modélisation ait été proposée il y a presque 30 ans, elle est encore largement admise aujourd'hui et on considère globalement que l'incidence réelle des TIAC peut être 10 à 100 fois supérieure au nombre de foyers recensés.



**Figure 2 : Cascade de Mossel montrant la perte d'informations dans le recensement des TIAC, d'après Leclerc & Mossel, 1989.** Pour 100 individus contaminés, on estime qu'un diagnostic de certitude correspondant à l'isolement du pathogène en cause est effectué chez seulement 5 d'entre eux.

En 2014, en dépit de leur sous-estimation évidente, 5 251 foyers de TIAC ont été déclarés en Europe (European Food Safety Authority, 2015), ce qui correspond à environ 1,04 foyer pour 100 000 habitants (**Tableau I**). Si le nombre de foyers déclarés par habitant est globalement plus élevé dans les pays de l'Europe de l'Est, allant par exemple jusqu'à plus de 24 foyers pour 100 000 habitants en Lettonie, c'est en France qu'a été rapporté le plus grand nombre de foyers ( $n = 1 364$ ), représentant ainsi 26 % de l'ensemble des TIAC recensées en Europe.

Le nombre remarquable de foyers observés dans l'hexagone pourrait facilement être expliqué par le fait que la France soit l'un des pays les plus peuplé d'Europe ; il apparaît donc logique qu'en valeur absolue, le nombre d'épidémies recensées soit élevé. On remarque néanmoins qu'à population comparable voire supérieure, l'Allemagne et le Royaume-Uni comptent respectivement 3 et 20 fois moins de TIAC déclarées. De la même manière en Italie, une seule épidémie a été déclarée en 2014.

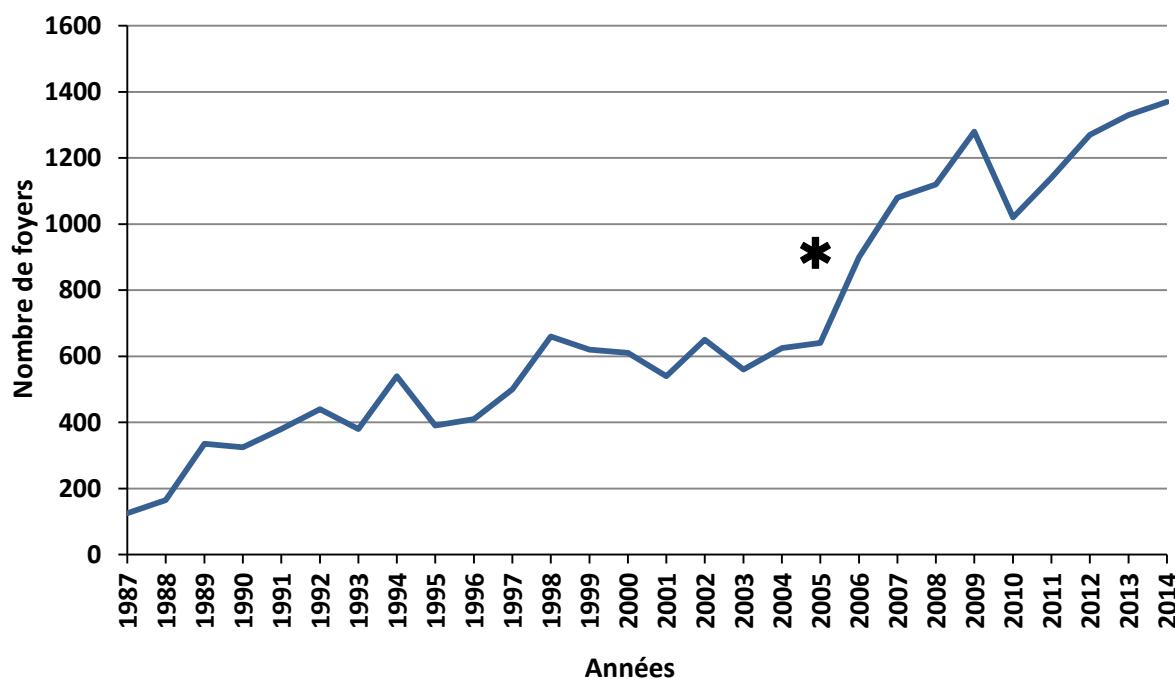
Tableau I : Nombre de TIAC recensées en Europe en 2014, d'après l'EFSA, 2015.

Pays	Epidémies avérées			Epidémies suspectées			Nombre total d'épidémies	Pour 100 000 habitants	
	Nombre	Cas	Hospitalisation	Décès	Nombre	Cas	Hospitalisation	Décès	
Allemagne	28	788	156	4	402	1 516	327	2	430
Autriche	13	601	71	1	83	189	50	0	96
Belgique	16	387	37	0	354	1 402	27	0	370
Bulgarie	0	0	0	0	14	130	36	0	14
Croatie	25	256	37	0	19	109	12	0	44
Danemark	31	1 667	15	0	26	521	8	0	57
Espagne	143	2 130	183	2	291	2 699	194	2	434
Estonie	0	0	0	0	6	12	10	0	6
Finlande	16	555	17	0	25	423	4	0	41
France	122	1 646	116	0	1 242	10 416	530	2	1 364
Grèce	1	13	1	0	3	113	2	0	4
Hongrie	13	776	63	2	24	931	49	0	37
Irlande	3	9	4	0	17	125	1	0	20
Islande	4	39	0	0	1	3	0	0	5
Italie	0	0	0	0	1	4	1	0	1
Lettonie	3	22	18	0	488	1 282	910	0	491
Lithuanie	11	143	89	0	236	585	496	0	247
Malte	0	0	0	0	22	91	7	0	22
Norvège	5	188	0	0	50	751	0	0	55
Pays-Bas	6	107	3	0	201	1 548	22	1	207
Pologne	71	910	323	2	311	3 758	896	5	382
Portugal	6	193	55	0	19	709	58	0	25
République Tchèque	0	0	0	0	37	1 100	239	0	37
Roumanie	13	262	138	0	14	117	61	0	27
Royaume Uni	45	1 266	43	4	25	824	21	0	70
Slovaquie	8	372	72	0	457	2 401	985	0	465
Slovénie	4	178	32	0	4	47	5	0	8
Suède	14	489	3	0	338	1 843	11	0	352
Suisse	7	131	6	4	4	41	3	0	11
<b>TOTAL (Etats membres)</b>	<b>592</b>	<b>12 770</b>	<b>1 476</b>	<b>15</b>	<b>4 659</b>	<b>32 895</b>	<b>4 962</b>	<b>12</b>	<b>5 251</b>

Ce chiffre pourrait également être expliqué par la performance du système de déclaration des TIAC en France, et notamment par la mise en place de différents outils de suivi conduisant à un recensement massif des foyers. On pourrait ainsi considérer que la fréquence des TIAC n'y est pas plus importante que dans les autres pays d'Europe de l'Ouest, mais que les épisodes sont simplement mieux identifiés, mieux déclarés et que des analyses microbiologiques sont faites plus fréquemment.

En tenant compte de ces différents biais, il apparaît délicat d'interpréter l'augmentation du nombre de foyers de TIAC observée ces 3 dernières décennies en France, puisqu'il est difficile de faire la part des choses entre une réelle augmentation et une meilleure déclaration. Notons en effet qu'à partir de 2004, l'année où a été introduit le logiciel WinTiac® dédié à l'informatisation des procédures de déclaration (Delmas *et al.*, 2010), le nombre de foyers a pratiquement doublé par rapport aux années précédentes (**Figure 3**).

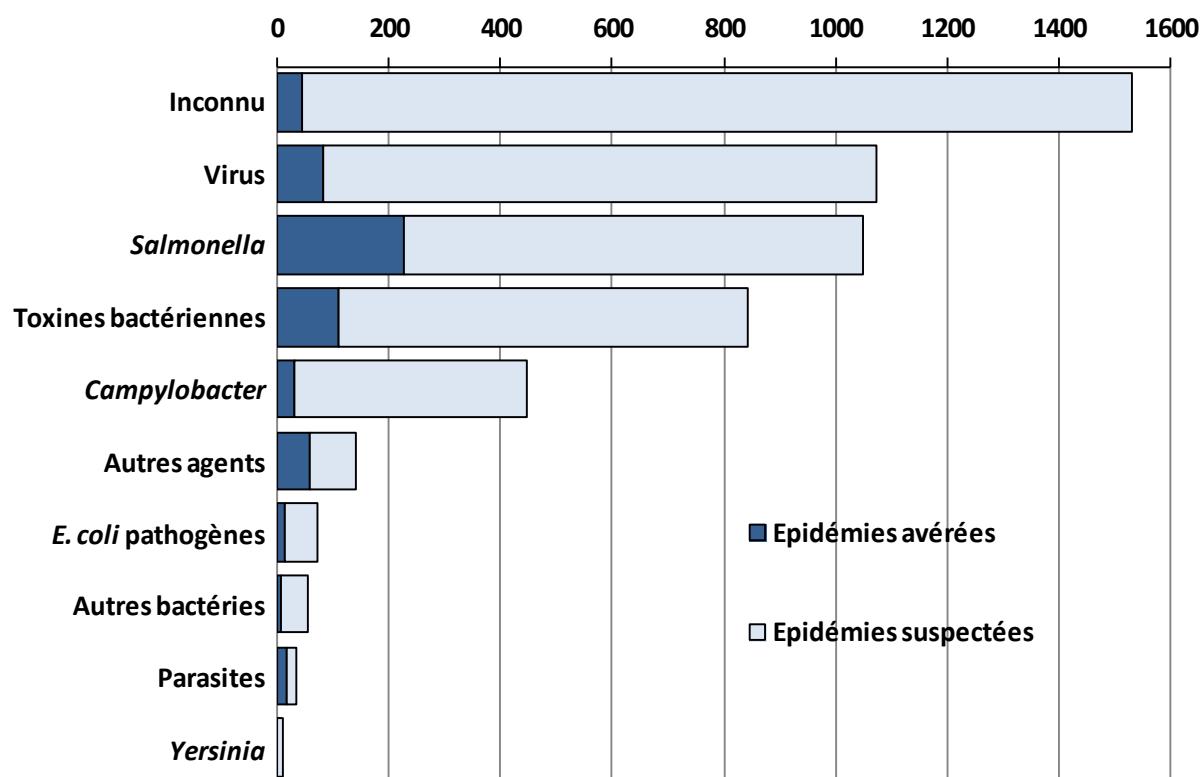
De manière générale, alors qu'en 1988 on recensait moins de 200 foyers de TIAC par an en France, leur incidence a été multipliée par 2 pour la période 1990-1995, et on dénombre depuis ces 10 dernières années plus de 1 000 foyers par an.



**Figure 3 : Nombre de foyers de TIAC déclaré aux ARS et aux DDCSPP en France entre 1987 et 2014, d'après l'InVS, 2015. \***, Mise en place du logiciel WinTiac® facilitant le processus de déclaration.

## I.5 Pathogènes en cause

En 2014, parmi l'ensemble des foyers de TIAC recensés au niveau européen (**Figure 4**), un pathogène a pu être identifié dans 70,9 % des cas d'épidémies avérées (European Food Safety Authority, 2015). Durant cette même période, parmi les 1 380 épidémies recensées par l'InVS en France, un agent pathogène a été formellement identifié ou suspecté dans respectivement 18 % et 69 % des cas et l'étiologie est restée inconnue pour 13 % d'entre eux (InVS, 2015).



**Figure 4 : Etiologie des TIAC recensées en Europe en 2014, d'après l'EFSA, 2015.** Le terme virus comprend ici les adénovirus, les calicivirus, le virus de l'hépatite A, les flavivivirus et les rotavirus. Les toxines bactériennes comprennent les toxines produites par *Bacillus*, *Clostridium* et *Staphylococcus*. Les autres agents regroupent les produits chimiques, l'histamine, les lectines, les toxines marines, les champignons toxiques et les esters cireux. Les parasites regroupent *Trichinella*, *Cryptosporidium*, *Giardia* et *Anisakis*. Les autres bactéries comprennent *Brucella*, *Listeria*, *Shigella* et *Vibrio parahaemolyticus*.

En dépit des quelques disparités existantes entre les chiffres annoncés au niveau national et ceux avancés au niveau européen, qui sont sans doute liées à la variabilité des critères utilisés pour distinguer une épidémie avérée d'une épidémie suspectée, les conclusions concernant l'étiologie des TIAC sont globalement similaires. Il apparaît que certaines bactéries, comme *Salmonella*, les bactéries produisant des toxines, ou encore *Campylobacter* sont remarquables par leur implication dans les maladies alimentaires. Par ailleurs, d'autres bactéries, bien que plus rarement à l'origine de TIAC, se font remarquer par la dangerosité des infections qu'elles provoquent. C'est le cas par exemple de *Clostridium botulinum* et de *Listeria monocytogenes*. Enfin, depuis quelques années, les virus tiennent une part de plus en plus importante dans les maladies alimentaires.

## **I.5.1 Principales bactéries responsables de TIAC**

### **I.5.1.1 *Salmonella spp.***

La salmonellose est l'une des maladies alimentaires les plus répandues. Il s'agit d'une toxi-infection causée par les bactéries du genre *Salmonella*. En 2014, ces bactéries étaient responsables de 20 % des TIAC recensées en Europe (European Food Safety Authority, 2015). Les salmonelles sont des entérobactéries (*i.e.* bacilles à Gram négatif) de la flore intestinale des vertébrés. On les retrouve ainsi dans le tube digestif de nombreux animaux destinés à l'alimentation (*e.g.* volaille, porc, bovins) mais aussi chez certains animaux de compagnie comme les chiens, les chats, les oiseaux et les reptiles (Sánchez-Vargas *et al.*, 2011).

Parmi les nombreux sérotypes existants, *S. enterica* sérotype *enteritidis* (*S. enteritidis*) et *S. typhimurium* sont les plus impliqués dans les cas de salmonelloses non typhiques (Sánchez-Vargas *et al.*, 2011). L'un des réservoirs naturels les plus importants étant la volaille, l'Homme contracte souvent la maladie suite à la consommation d'œufs, mais d'autres aliments comme les laitages, les pâtisseries, la viande ou les coquillages peuvent également être incriminés (Fatica & Schneider, 2011; Gopinath *et al.*, 2012; Pires *et al.*, 2014). Des contaminations faisant suite à la consommation d'eau peuvent également être rapportées, si celle-ci est polluée par des excréments d'animaux porteurs. Les TIAC causées par les salmonelles peuvent parfois être de grande envergure, comme ce fut notamment le cas aux États-Unis en 1994, où 224 000 personnes ont été infectées suite à la consommation de crèmes glacées contaminées (Hennessy *et al.*,

1996). Dans ce type de contamination, la dose minimale infectieuse (DMI) est de l'ordre de  $10^5$ - $10^6$  UFC (unités formant colonies) et les symptômes apparaissent généralement après une période d'incubation de 12 à 24 heures. Ils sont dus à la colonisation de l'intestin et des ganglions mésentériques par les bactéries, provoquant une entérocolite (Collège des Universitaires de Maladies Infectieuses et Tropicales, 2016). Les signes cliniques correspondant sont alors des diarrhées souvent fébriles avec douleurs abdominales et céphalées. Le passage des bactéries dans la circulation systémique est rare mais reste possible. Dans ce cas, les endotoxines libérées lors de la lyse bactérienne provoquent des manifestations extra-digestives.

La pathologie est généralement d'évolution favorable et la guérison est habituellement observée en 3 à 5 jours. Certains sujets peuvent cependant demeurer porteurs sains et contribuent alors à la dissémination des bactéries. La mise en place d'une antibiothérapie n'est généralement pas recommandée dans le traitement des salmonelloses puisqu'elle contribue à l'émergence de souches résistantes. Elle peut néanmoins être nécessaire dans le traitement des cas les plus graves avec manifestations extra-digestives, et dans ce cas, les fluoroquinolones sont généralement indiquées (Collège des Universitaires de Maladies Infectieuses et Tropicales, 2016).

En parallèle de ce tableau clinique, deux autres sérotypes, *S. enterica* sérotype *typhi* (*S. typhi*) et *S. paratyphi*, sont responsables de la fièvre typhoïde également appelée fièvre entérique. Contrairement à *S. enteritidis* et *S. typhimurium*, ces deux sérotypes sont strictement humains et ne sont donc pas responsables de zoonoses (Dave & Sefton, 2015; Sánchez-Vargas *et al.*, 2011) ; ils peuvent cependant être à l'origine de TIAC en cas de contamination d'un aliment par un porteur sain. Les TIAC les plus célèbres engendrées par *S. typhi* sont celles liées à Mary Mallon, dite « *Typhoid Mary* » (Soper, 1907). Entre 1900 et 1907, cette cuisinière et premier porteur sain identifié aux États-Unis fut à l'origine de l'infection de 51 personnes, parmi lesquelles 3 décédèrent. Actuellement en France, même si la majorité des cas de fièvre typhoïde observés sont des cas d'importation contractés en zone d'endémie, des TIAC ont encore été recensées ces 10 dernières années (Delmas *et al.*, 2010).

La période d'incubation de la fièvre typhoïde est relativement longue puisqu'elle peut s'étendre jusqu'à 3 semaines. Elle est généralement associée à une fièvre ascendante qui correspond au passage des germes à travers la muqueuse intestinale puis à l'envahissement progressif des plaques de Peyer, des ganglions lymphatiques mésentériques, de la lymphe et enfin de la circulation sanguine. C'est la bactériémie

associée à la libération d'endotoxines qui est responsable des symptômes. On observe classiquement une altération de l'état général associant fièvre, céphalées, diarrhées ou constipation, anorexie et parfois une bradycardie, des éruptions cutanées, une splénomégalie et des signes neurologiques appelés *tuphos* (Dave & Sefton, 2015; Sánchez-Vargas *et al.*, 2011). Les complications digestives les plus redoutées sont les hémorragies causées par des ulcérations, notamment au niveau des plaques de Peyer, ainsi que la perforation de la paroi intestinale, préférentiellement localisée au niveau de l'iléon. Il existe également des complications cardio-respiratoires (e.g. pneumonie et endocardite), au niveau du système nerveux central (e.g. méningite, hémorragies), ainsi que des complications rénales ou hématologiques. En l'absence d'un traitement antibiotique approprié (*i.e.* fluoroquinolone ou céphalosporine de 3<sup>ème</sup> génération selon la sensibilité de la souche), la fièvre typhoïde est fatale dans 10 à 25 % des cas (Collège des Universitaires de Maladies Infectieuses et Tropicales, 2016; Dave & Sefton, 2015).

Les mesures de précaution permettant de limiter la transmission des salmonelles non typhiques consistent tout d'abord à la réalisation de dépistages réguliers au sein des élevages de volailles. En industrie alimentaire, différents traitements peuvent être appliqués aux denrées alimentaires les plus à risque. Il s'agit par exemple de la pasteurisation du lait et de l'ionisation des cuisses de grenouille, des crevettes congelées ou des abats de volaille. De même, chez le consommateur, la cuisson des aliments à cœur et la consommation rapide des produits à base d'œufs sont des moyens efficaces permettant de réduire la transmission des salmonelles.

Pour lutter contre la transmission des sérotypes à l'origine de la fièvre typhoïde, le respect des bonnes pratiques d'hygiène durant la préparation des aliments est essentiel. Une vaccination est également disponible, elle est recommandée en cas de voyage dans une zone endémique. Avec une efficacité de l'ordre de 60 à 70 % (Collège des Universitaires de Maladies Infectieuses et Tropicales, 2016) et ne conférant aucune protection contre *S. paratyphi*, elle ne se substitue en aucun cas aux règles d'hygiène et aux mesures de précaution vis-à-vis de l'eau et des aliments. Enfin, il est important de rappeler que tous les cas de fièvre typhoïde doivent systématiquement faire l'objet d'une déclaration obligatoire, même en dehors d'un contexte de TIAC.

### **I.5.1.2 *Campylobacter spp.***

La campylobactérose est une toxi-infection provoquée par les bactéries du genre *Campylobacter*. Il s'agit de bacilles à Gram négatif micro-aérophiles de forme incurvée, commensales de la flore intestinale des mammifères et des oiseaux. Les campylobacters, en particulier *C. jejuni*, sont la première cause d'infections intestinales bactériennes dans le monde, devant les salmonelles (Nichols *et al.*, 2012; Platts-Mills & Kosek, 2014), et sont particulièrement décrits au Royaume-Uni (Tam *et al.*, 2012). Bien que principalement responsables de cas sporadiques car incapables de se multiplier dans les aliments, les campylobacters étaient tout de même à l'origine de 8,5 % de l'ensemble des TIAC recensées en Europe en 2014 (European Food Safety Authority, 2015).

Les aliments le plus souvent à l'origine des entérites à *Campylobacter* sont la volaille et le lait cru. Plusieurs études ont d'ailleurs démontré que les carcasses de volailles étaient largement contaminées par *Campylobacter* durant le processus d'abattage, avec une prévalence pouvant atteindre 85 % (European Food Safety Authority, 2010; Hue *et al.*, 2008; Sahin *et al.*, 2015).

S'agissant d'une bactérie thermolabile, les TIAC engendrées par *Campylobacter* sont dans la plupart des cas dues à une contamination croisée, c'est-à-dire à un transfert des pathogènes présents sur l'aliment cru vers l'aliment cuit. La DMI est relativement faible, de l'ordre de  $10^2$ - $10^3$  UFC, et la période d'incubation varie entre 2 et 5 jours. Après ingestion, *Campylobacter* colonise le tractus intestinal de l'individu provoquant ainsi une inflammation locale. Certaines souches sont également capables de produire diverses cytokines et une entérotoxine LT thermolabile apparentée à la toxine cholérique, qui provoque une fuite hydrique et électrolytique au niveau de la lumière intestinale (Wassenaar, 1997). Les symptômes résultants sont des diarrhées fébriles, parfois sanguinolentes, accompagnées de douleurs abdominales et de céphalées. La guérison est généralement observée après 2 à 5 jours. Dans de rares cas, des complications graves peuvent apparaître, avec notamment des atteintes articulaires (*i.e.* arthrites réactionnelles) ou neurologiques (*i.e.* syndrome de Guillain-Barré). Les cas les plus graves nécessitent le recours à une antibiothérapie, utilisant généralement un macrolide ou une fluoroquinolone (Collège des Universitaires de Maladies Infectieuses et Tropicales, 2016).

Les mesures de précaution limitant la transmission des campylobacters à l'Homme sont tout d'abord le respect des bonnes pratiques d'abattage qui permettent de limiter la contamination des carcasses de volailles par les matières fécales. Chez le consommateur, la cuisson des aliments est suffisante pour éliminer la bactérie. Il convient néanmoins de veiller au risque de contamination croisée par le lavage régulier des mains et des ustensiles lors de la manipulation des aliments crus.

### I.5.1.3 Bactéries produisant des toxines

Les bactéries produisant des toxines étaient en 2014 à l'origine de 16,1 % des foyers de TIAC recensés en Europe (European Food Safety Authority, 2015). Selon le germe en cause, la physiopathologie est variée puisqu'il peut s'agir d'une intoxication (e.g. *Staphylococcus aureus*), d'une toxi-infection (e.g. *Clostridium perfringens*) ou encore des deux phénomènes à la fois (e.g. *Bacillus cereus*).

- ***Staphylococcus aureus***

*Staphylococcus aureus* est un cocci à Gram positif aéro-anaérobiose, halophile, bien connu pour son implication dans les infections nosocomiales. Cette bactérie est également responsable d'intoxications alimentaires appelées entérotoxicoses staphylococciques.

La contamination des aliments par *S. aureus* fait généralement suite à leur manipulation par un porteur sain ou par une personne hébergeant les bactéries au niveau de plaies cutanées (e.g. furoncle, panaris). *S. aureus* appartient en effet à la flore commensale de l'Homme et est largement retrouvée au niveau de la peau, du cuir chevelu, du pharynx et des muqueuses nasales, avec un taux de portage d'environ 30 % (Wertheim *et al.*, 2005).

Après la contamination de l'aliment, et s'il est maintenu à une température favorable, les staphylocoques vont s'y multiplier et dans le cas de souches toxinogènes, des entérotoxines émétiques vont être produites. Compte tenu de ce processus particulier, ces TIAC sont parfois qualifiées de « maladie des banquets » préférentiellement décrites lors de repas servis sous la forme de buffets (Mossong *et al.*, 2015; Pillsbury *et al.*, 2013), puisqu'un séjour de quelques heures à température ambiante est suffisant pour que les bactéries produisent les toxines. Les aliments le plus souvent impliqués dans ce type de

TIAC sont les salades composées, les crèmes, les pâtisseries et plus généralement tous les plats nécessitant des manipulations par le cuisinier. On recense également des intoxications liées à la consommation de lait cru ou de fromages et dans ce cas, c'est la présence de *S. aureus* au niveau des pis de l'animal qui est généralement à l'origine de la contamination du lait.

Contrairement aux toxi-infections, les intoxications sont caractérisées par une période d'incubation très brève. Les entérotoxicoses staphylococciques sont en effet à l'origine de vomissements brutaux sans fièvre associés à des céphalées apparaissant 30 minutes à 2 heures seulement après la consommation de l'aliment contaminé. Les symptômes résultent de l'action des entérotoxines émétiques qui, par la stimulation des terminaisons du nerf vague au niveau du tractus digestif, activent le centre médullaire du vomissement. De bon pronostic, ces symptômes disparaissent généralement après 12 à 24 heures. La survenue d'un choc toxique staphylococcique est cependant possible en cas d'intoxication massive. Dans ce cas, les toxines ingérées vont jouer le rôle de superantigènes et stimuler de manière excessive le système immunitaire entraînant fièvre, hypotension et une érythrodermie scarlatiniforme (Collège des Universitaires de Maladies Infectieuses et Tropicales, 2016).

Afin de limiter ce type d'intoxication, le respect des bonnes pratiques d'hygiène est essentiel. Il convient ainsi au personnel cuisinier de manipuler les aliments avec des gants, de porter un filet à cheveux et de panser les plaies éventuelles. Par ailleurs, afin de limiter la croissance du pathogène dans les aliments, il impératif de respecter la chaîne du froid et d'éviter de servir les plats trop à l'avance lors des buffets. Enfin, notons que bien que *S. aureus* soit une bactérie thermolabile, les entérotoxines qu'elle produit sont particulièrement stables à la chaleur et la recuisson des aliments préalablement contaminés ne protège donc pas de l'intoxication.

- ***Clostridium perfringens***

*C. perfringens* est un bacille à Gram positif anaérobiose, sporulé, dont certaines souches sont productrices d'entérotoxines. Ce pathogène est principalement retrouvé dans le tube digestif des animaux, mais aussi dans les sols et la poussière. Il s'agit d'un germe fréquemment retrouvé dans les denrées d'origine animale, contaminées soit durant l'éviscération des animaux à l'abattoir, soit à partir de l'environnement souillé.

Les spores de *C. perfringens* étant particulièrement résistantes, ils sont capables de perdurer à la cuisson des aliments. L'anaérobiose partielle provoquée lors de la cuisson favorise d'ailleurs leur germination, assurant ensuite une multiplication rapide des bactéries durant le refroidissement de l'aliment en question. Ainsi, les denrées alimentaires classiquement impliquées dans ce type de TIAC sont les viandes en sauces servies dans la restauration collective, cuisinées en grand volume et ayant subi un refroidissement trop lent.

Une ingestion massive de bactéries, de l'ordre de  $10^5$  à  $10^6$  UFC, est nécessaire à la survenue des symptômes. Une fois dans le tube digestif, le changement brutal de pH entre l'estomac et l'intestin grêle va provoquer la sporulation des bactéries qui est associée à la libération de l'entérotoxine à responsable des symptômes. Ainsi, les pathologies causées par *C. perfringens* sont des toxi-infections puisque cette toxine étant thermolabile, c'est l'ingestion préalable de la bactérie qui est responsable de la pathologie. L'incubation est généralement brève, de 8 à 16 heures, et les symptômes associés sont des diarrhées sans fièvre ni vomissement persistant pendant 12 à 24 heures (Collège des Universitaires de Maladies Infectieuses et Tropicales, 2016). Certaines souches de *C. perfringens* sont également capables de produire une toxine  $\beta$  à l'origine d'entérocolites nécrosantes (Petit *et al.*, 1999). Ce type d'infection souvent fatale est principalement observé dans les pays en développement.

Concernant les mesures permettant de lutter contre ce type de toxi-infections, la restriction hydrique des animaux avant leur abattage permet de limiter la bactériémie post-prandiale souvent à l'origine de la contamination de la viande. Par ailleurs, les matières premières contenant fréquemment des quantités faibles de bactéries, ce sont surtout les conditions de cuisson puis de conservation des préparations culinaires qui déterminent leur niveau de contamination. Il convient alors de consommer les plats immédiatement après cuisson, ou dans le cas contraire de les maintenir au chaud ou de les refroidir rapidement.

- ***Bacillus cereus***

*B. cereus* est un bacille à Gram positif sporulé, aéro-anaérobiose, d'origine tellurique. Les spores de *B. cereus* sont retrouvées dans un grand nombre de denrées alimentaires d'origine végétale comme le riz, les pommes de terre et les épices.

Les spores étant résistantes à la température, les bactéries se multiplient dans les denrées alimentaires après cuisson, en cas de refroidissement lent. La DMI est de l'ordre de  $10^6$  UFC. Selon la souche, *B. cereus* est capable de produire deux types de toxines entraînant deux symptomatologies différentes. La première toxine, le céréulide, est émétique. Elle est produite directement dans l'aliment durant la multiplication des bactéries. Cette toxine étant thermostable, la recuisson des aliments ne prévient pas de l'intoxication. Dans ce cas, le mécanisme d'action et les symptômes ressemblent beaucoup à ceux produits par la toxine de *S. aureus*, avec des vomissements survenant 1 à 6 heures après la consommation de l'aliment. Cette intoxication dite « du restaurant chinois » est fréquemment associée à la consommation d'aliments amylacés préparés en grand volume, comme le riz, les pâtes, les semoules et le blé (Cadel Six et al., 2012).

La seconde toxine produite par *B. cereus* est quant à elle thermolabile. Elle est produite par la bactérie directement dans le tube digestif de l'Homme après une période d'incubation de 8 à 16 heures. Cette toxine a une action diarrhéigène et dans ce cas, la toxi-infection est comparable à celle causée par *C. perfringens*. Cette symptomatologie est plutôt observée suite à la consommation de viande hachée.

Les épisodes de gastroentérites causés par *B. cereus* sont généralement sans gravité et la guérison est habituellement observée en 12 à 24 heures. En matière de prophylaxie, la consommation des préparations culinaires directement après cuisson ou leur refroidissement rapide permet de limiter ce type de TIAC. Le lavage et l'épluchage des végétaux permettent de réduire le nombre de bactéries présentes sur les denrées alimentaires. Enfin dans l'industrie alimentaire, l'ionisation des herbes aromatiques et des épices permet de limiter la présence de cette bactérie.

## I.5.2 Bactéries responsables des TIAC les plus graves

### I.5.2.1 *Listeria monocytogenes*

*L. monocytogenes* est un bacille à Gram positif à multiplication intracellulaire. Il s'agit d'une bactérie saprophyte principalement présente dans le sol, les eaux et les végétaux, mais parfois retrouvée dans le tractus digestif de l'Homme ou des animaux en cas de portage sain.

La listériose est une infection d'origine alimentaire peut fréquente chez l'Homme. La plupart des cas sont sporadiques mais de petites épidémies sont parfois décrites. *Listeria* est un germe ubiquiste retrouvé à la surface d'une grande variété d'aliments. S'agissant d'une bactérie thermolabile, les denrées fréquemment à l'origine des cas de listériose sont celles consommées crues comme la charcuterie, les rillettes, les crudités, ou encore les poissons fumés (Lecuit, 2007). *Listeria* se multiplie facilement dans les aliments, cette bactérie psychrophile est d'ailleurs capable de croître à des températures inférieures à 4°C. De ce fait, la dose infectieuse est facilement atteinte dans les aliments contaminés, en particulier en cas de rupture de la chaîne du froid.

Après ingestion, les bactéries franchissent la muqueuse digestive, gagnent les ganglions lymphatiques périphériques puis atteignent le foie et la rate par l'intermédiaire de la circulation sanguine et des monocytes. *L. monocytogenes* est un germe opportuniste. A ce stade, la maladie est donc souvent contrôlée chez les sujets immunocompétents et l'infection demeure asymptomatique (Collège des Universitaires de Maladies Infectieuses et Tropicales, 2016). En revanche, chez les personnes ayant un système immunitaire plus fragile comme les nouveau-nés, les personnes âgées, les immunodéprimés ou encore les femmes enceintes, une bactériémie peut apparaître, exposant particulièrement le système nerveux central et le placenta.

Dans ce type d'infection, la période d'incubation est très variable, allant de quelques jours à 8 semaines. Les formes septicémiques observées chez les immunodéprimés associent une fièvre élevée et des algies multiples d'apparition brutale (Collège des Universitaires de Maladies Infectieuses et Tropicales, 2016). Par la suite, l'atteinte neuro-méningée peut se présenter sous la forme d'une méningite pure ou d'une méningo-encéphalite avec une atteinte particulière du rhombencéphale, conduisant à la paralysie des nerfs crâniens. Dans ce cas, le pronostic est généralement sévère avec une mortalité élevée ou des séquelles importantes.

Dans le cas de l'infection materno-infantile, la pathologie est souvent résumée à un syndrome pseudo-grippal sans séquelle chez la mère. En revanche, la contamination de l'enfant *in utero* par voie placentaire ou plus rarement lors de l'accouchement entraîne des complications particulièrement graves. Si elle est précoce, l'infection anténatale peut en effet conduire à l'avortement. Plus tardive, elle conduira à la naissance prématurée de l'enfant associée à la réapparition des symptômes fébriles chez la mère. On observe dans ce cas un tableau clinique sévère chez le nouveau-né, associant cyanose, apnée, détresse respiratoire, conduisant à une mortalité élevée. Enfin, dans le cas d'une contamination per-partum, l'atteinte méningée est prédominante. Le traitement des listérioses, qu'il s'agisse d'une atteinte neuro-méningée ou d'une septicémie, associe l'amoxicilline à forte dose et un aminoside.

La prévention des listérioses repose principalement sur le respect de quelques règles alimentaires par les sujets les plus sensibles. En effet, il convient alors d'éviter la consommation des aliments à risque, tels que la charcuterie, les rillettes, les pâtés, les fromages à pâte molle au lait cru, les poissons fumés, les coquillages, les graines germées et tout autre aliment consommé cru. Il est également conseillé de laver et d'éplucher les légumes et de bien cuire les produits carnés. La recuisson des aliments ayant séjourné au réfrigérateur est également importante afin d'éliminer les bactéries qui se développent particulièrement bien dans ce type d'environnement. Il convient d'ailleurs de désinfecter régulièrement les réfrigérateurs fréquemment contaminés par *Listeria*, d'y maintenir une température suffisamment basse, d'y séparer les aliments crus des plats cuits et de respecter les dates limites de consommation des produits entreposés. Enfin, durant la grossesse, il est préconisé de proscrire l'utilisation d'éponges, couramment colonisées par *Listeria*.

### **I.5.2.2 *Clostridium botulinum***

*C. botulinum* est un bacille à Gram positif anaérobiose strict et sporulé, présent de manière ubiquitaire dans le sol, les poussières, l'eau et occasionnellement dans le tractus digestif de l'Homme ou des animaux. Cette bactérie est responsable du botulisme, une intoxication rare mais gravissime. En France, entre 2010 et 2012, 24 foyers de botulisme ont été confirmés, impliquant au total 51 personnes (Mazuet *et al.*, 2014).

La toxine botulique est produite par la bactérie lors de sa multiplication. Celle-ci n'étant possible qu'en anaérobiose stricte, certains aliments sont particulièrement propices à son développement. Il s'agit par exemple des denrées peu acides conditionnées en boites de conserve comme les asperges, les haricots verts, les betteraves ou le maïs, ou encore les aliments conservés par salaison comme les jambons et certains poissons.

Alors que la toxine botulique est thermolabile, les spores de *C. botulinum* sont particulièrement résistantes (Fujinaga, 2010). La majorité des intoxications a ainsi pour origine la consommation de terrines et jambons artisanaux mal préparés et mal conservés ou encore de conserves familiales mal stérilisées (Mazuet et al., 2011). La période d'incubation entre l'ingestion de la toxine et l'apparition des premiers signes cliniques est généralement de 12 à 24 heures mais elle peut s'étendre jusqu'à 8 jours. La toxine botulique provoque une paralysie flasque en inhibant la libération d'acétylcholine au niveau des jonctions neuromusculaires. Les premiers signes cliniques observés sont généralement dus à l'atteinte des muscles de l'accommodation, entraînant troubles de la vision, diplopie et mydriase. Rapidement les signes dysautonomiques se complètent, marqués au niveau buccal par une xérostomie, des difficultés de déglutition et d'élocution, et par une constipation et une rétention urinaire (Mazuet et al., 2011). Dans les formes les plus graves, les paralysies atteignent les membres et les muscles respiratoires, engageant le pronostic vital. Le traitement du botulisme est essentiellement symptomatique et nécessite pour les formes les plus graves une assistance respiratoire. Une sérothérapie peut être indiquée mais elle ne sera efficace que dans les 24 premières heures suivant l'apparition des symptômes (Collège des Universitaires de Maladies Infectieuses et Tropicales, 2016).

En parallèle de l'intoxication, des toxi-infections botuliques sont parfois observées. Elles sont la conséquence de l'ingestion et de la germination de spores de *C. botulinum* dans l'intestin, suivie de la synthèse *in vivo* des toxines. Ce phénomène est principalement observé chez les nourrissons (Paricio et al., 2006) en raison de leur flore intestinale encore immature.

L'intoxication botulique est une pathologie très grave, puisqu'elle est mortelle dans 5 à 10 % des cas. Contrairement aux autres pathogènes, la déclaration d'un seul cas est d'ailleurs suffisante à définir une TIAC et à lancer le processus d'alerte (Mazuet et al., 2011). Les moyens permettant de limiter ce type d'intoxication est tout d'abord une stérilisation adéquate des aliments afin d'éliminer les spores bactériennes. Dans l'industrie alimentaire, la résistance des spores de *C. botulinum* sert d'ailleurs de référence pour le

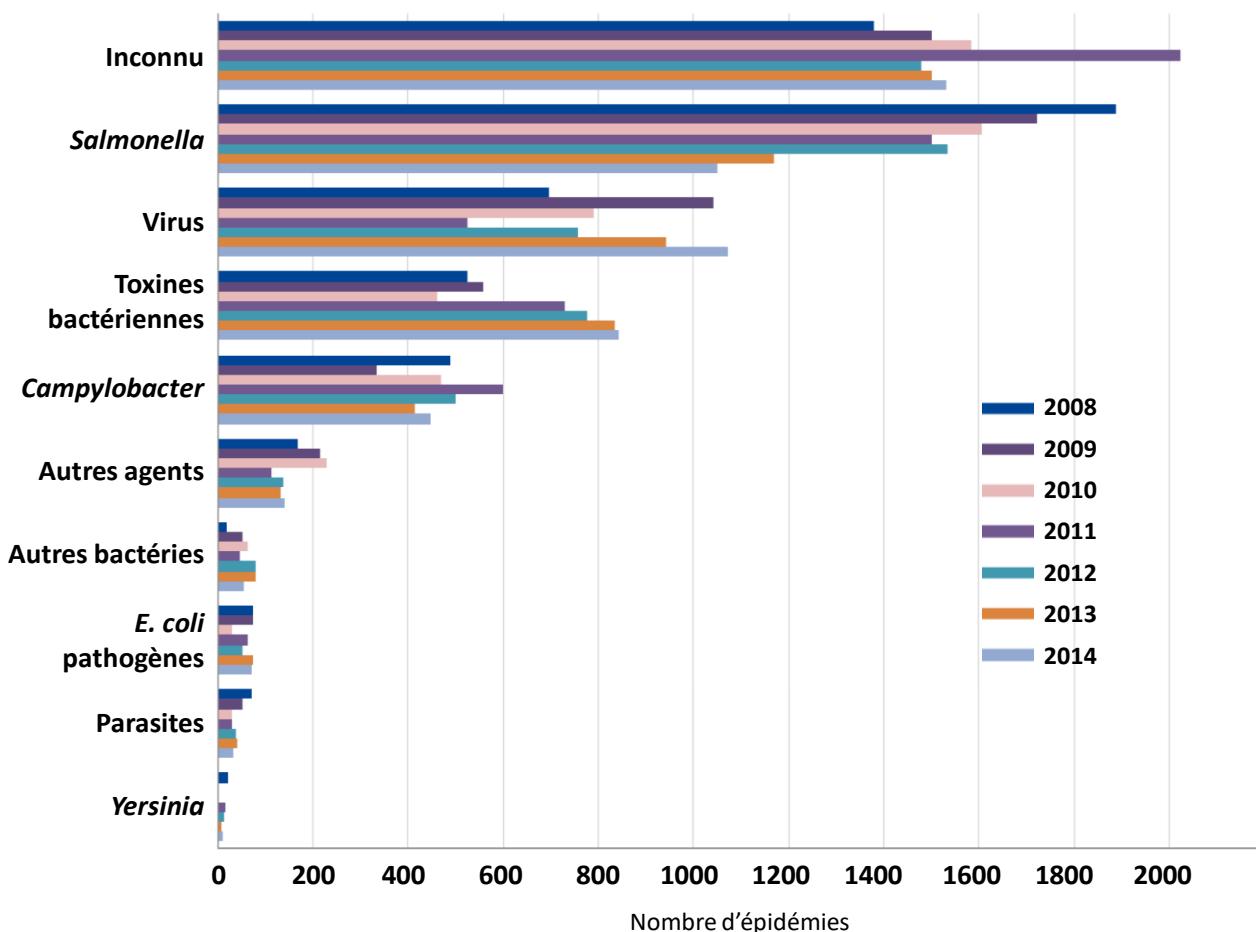
barème de stérilisation utilisé, une température de 121°C au cœur du produit pendant 3 minutes permettant de réduire la quantité de spores de *C. botulinum* de 12 unités logarithmiques. Dans le cas des jambons artisanaux, il est impératif de respecter des concentrations en chlorure de sodium et en nitrites permettant d'inhiber la croissance de *C. botulinum* au cœur de l'aliment. Le respect de la chaîne du froid pour les denrées non stérilisées est également essentiel. Enfin, afin de prévenir le botulisme infantile, la consommation de miel par les nourrissons de moins de 12 mois est contre indiquée, cet aliment contenant fréquemment des spores bactériennes (Grabowski & Klein, 2015).

### I.5.3 Virus

Les virus sont une cause très fréquente de maladies alimentaires. Si leur incidence a toujours été importante (**Figure 5**), ils étaient pour la première fois en 2014 la principale étiologie connue des TIAC recensées en Europe (European Food Safety Authority, 2015).

Le danger lié à la présence de virus pathogènes dans les denrées alimentaires est particulièrement difficile à maîtriser car leur détection est difficile. D'ailleurs, si d'un point de vue réglementaire certains pathogènes sont directement recherchés dans certaines matrices alimentaires (Parlement Européen, 2005), aucun virus n'est actuellement recherché en routine.

La difficulté repose principalement sur le fait que, contrairement aux bactéries, les virus ne sont pas capables de proliférer dans l'environnement ou dans les matrices alimentaires. Ils sont donc généralement présents dans les aliments contaminés en quantité faible mais suffisante pour infecter les consommateurs. Les virus les plus souvent à l'origine de maladies alimentaires dans les pays industrialisés sont les norovirus mais d'autres virus comme ceux responsables des hépatites à transmission orale peuvent aussi être impliqués (Koopmans *et al.*, 2002). Les infections causées par les norovirus seront développées dans un chapitre particulier.



**Figure 5 : Etiologie des TIAC recensées en Europe entre 2008 et 2014, d'après l'EFSA, 2015.** En 2014, Les virus étaient responsables de 20,4 % des TIAC déclarées en Europe.

### I.5.3.1 Virus de l'hépatite A

Le virus de l'hépatite A (VHA) est un virus nu de forme icosaédrique composé d'un génome à ARN. Il appartient à la famille des *Picornaviridae* et au genre *Hepadovirus*. Six génotypes sont actuellement décrits, dont 3 sont capables d'infecter l'Homme.

Tout comme les norovirus, le VHA se transmet par la voie féco-orale, ce qui signifie que des denrées alimentaires peuvent être à l'origine de la transmission. Les aliments fréquemment identifiés dans la transmission du VHA sont les coquillages et les légumes (Bellou *et al.*, 2013; Boxman *et al.*, 2016; Conaty *et al.*, 2000; Gossner & Severi, 2014; Severi *et al.*, 2015). La TIAC la plus importante attribuée au VHA est d'ailleurs liée à la consommation de palourdes crues, qui ont été responsables de la contamination de près de 300 000 individus à Shanghai en 1988 (Halliday *et al.*, 1991).

La prévalence du VHA est très importante dans certaines régions du monde puisqu'elle est directement liée aux conditions sanitaires précaires (Jacobsen & Wiersma, 2010). De ce fait, l'hépatite A est généralement contractée pendant la petite enfance dans les pays en développement et dans ce cas, la pathologie est le plus souvent asymptomatique. A l'inverse, compte tenu des progrès en matière d'hygiène dans les pays développés, l'exposition au virus durant l'enfance est de plus en plus rare et des primo-infections de l'adulte sont parfois observées, conduisant à une symptomatologie plus ou moins sévère.

Après son ingestion, le VHA se multiplie au niveau des hépatocytes et est ensuite excrété dans les selles via les voies biliaires. L'infection par le VHA est marquée par une période d'incubation entre la contamination et l'apparition des premiers symptômes relativement longue, puisqu'elle peut s'étendre de 10 jours à 8 semaines. On observe ensuite les signes cliniques classiques d'une hépatite, avec une première phase pré-ictérique peu spécifique associant asthénie, anorexie, et nausées pendant 1 à 3 semaines, suivie d'un ictère avec hépatosplénomégalie pendant une période de 10 à 15 jours (Collège des Universitaires de Maladies Infectieuses et Tropicales, 2016). Après l'infection, un syndrome pseudo-grippal peut persister plusieurs semaines mais on n'observe jamais d'évolution vers la chronicité. La sévérité de la pathologie augmente considérablement avec l'âge et la complication la plus redoutée est l'hépatite fulminante, observée chez près de 2 % des patients âgés de plus de 50 ans. De pronostic sévère, elle nécessite dans la plupart des cas une transplantation hépatique.

Les mesures de prophylaxie à l'égard de l'hépatite A sont tout d'abord le respect des règles d'hygiènes afin d'éviter la contamination féco-orale. Un vaccin est également disponible et recommandé en cas de voyage en zone de haute endémicité. Il peut également être indiqué pour l'entourage proche des patients atteints d'hépatite A afin d'éviter la dissémination du virus. En France, même hors contexte de TIAC, l'hépatite A fait partie des maladies à déclaration obligatoire. Abandonnée en 1984, la déclaration des cas d'hépatite A est à nouveau d'actualité depuis 2006 en raison de la recrudescence de la maladie et de sa gravité potentielle chez l'adulte (Ministère de la santé et des solidarités, 2005). Durant la première année de surveillance par la déclaration obligatoire, 1 313 cas d'hépatite A ont été notifiés en France (Couturier *et al.*, 2007). Parmi eux, plus de 40 % faisaient suite à un séjour hors métropole et 20 % étaient lié à la consommation de fruits de mer.

### I.5.3.2 Virus de l'hépatite E

Le virus de l'hépatite E (VHE), seul représentant du genre *Hepevirus*, est un virus appartenant à la famille des *Hepeviridae*. Tout comme le VHA, il s'agit d'un virus nu à ARN simple brin. Actuellement 4 génotypes sont décrits, chacun caractérisé par une distribution géographique et une spécificité d'hôte particulière.

Alors que les génotypes 1 et 2 sont exclusivement isolés chez l'Homme, les génotypes 3 et 4 circulent de manière asymptomatique chez certains animaux comme le porc, le sanglier ou le cerf, mais peuvent occasionnellement infecter l'Homme (Pavio *et al.*, 2010a). De la même manière que le VHA, le VHE se transmet principalement par la voie féco-orale. Les génotypes 1 et 2 sont généralement transmis par la consommation d'eau souillée ; ils sont ainsi principalement à l'origine d'infections dans les pays en développement et sont particulièrement présents en Asie pour le génotype 1 et en Afrique et en Amérique latine pour le génotype 2 (Kamar *et al.*, 2012). Concernant les génotypes animaux, le génotype 3 présente une distribution mondiale alors que le génotype 4 circule principalement en Asie du Sud-Est.

On recense chaque année environ 20 millions de cas d'hépatite E, principalement observés dans les pays en développement (Chaudhry *et al.*, 2015). Les cas d'hépatite E décrits dans les pays développés sont généralement des zoonoses liées au génotype 3, faisant suite à la consommation d'abats insuffisamment cuits provenant d'animaux porteurs. En France, environ 500 cas sont recensés annuellement et on observe une fréquence plus importante dans le sud du pays, en lien avec les habitudes alimentaires (Colson *et al.*, 2010).

La période d'incubation varie entre 2 et 6 semaines. Tout comme l'hépatite A, de nombreuses formes sont asymptomatiques et la sévérité de la pathologie est corrélée avec l'âge du patient. Après une phase prodromique d'une dizaine de jours caractérisée par un syndrome pseudo-grippal, les symptômes classiquement observés sont un ictere associé à une hépatosplénomégalie. L'évolution de la pathologie est généralement favorable dans un délai de 3 à 5 semaines mais le pronostic vital peut parfois être engagé avec la survenue d'une hépatite fulminante chez 1 à 5 % des adultes (Pavio *et al.*, 2010b). Cette complication est d'autant plus fréquente lorsque la pathologie survient pendant la grossesse. Les femmes enceintes sont en effet exposées à un risque accru d'insuffisance hépatique aiguë et on note un taux de mortalité pouvant atteindre 25 % lorsque l'infection est contractée durant le 3<sup>ème</sup> trimestre de grossesse. Par ailleurs, une transmission

verticale au fœtus est observée dans plus de 30 % des cas (Chaudhry *et al.*, 2015; Kumar *et al.*, 2004). Enfin, contrairement à l'hépatite A, des formes chroniques sont parfois décrites, principalement chez l'immunodéprimé (Kamar *et al.*, 2012).

En matière de prophylaxie, les mesures d'hygiène classiques permettant d'éviter la contamination des ressources hydriques sont essentielles dans les pays en développement. En France et dans les autres pays développés, il est recommandé aux personnes présentant un risque accru de complications d'éviter de consommer des charcuteries crues à base de foie de porc. Enfin, un vaccin contre le VHE a été mis au point mais il est uniquement disponible en Chine (Zhang *et al.*, 2014).

## II. LES NOROVIRUS

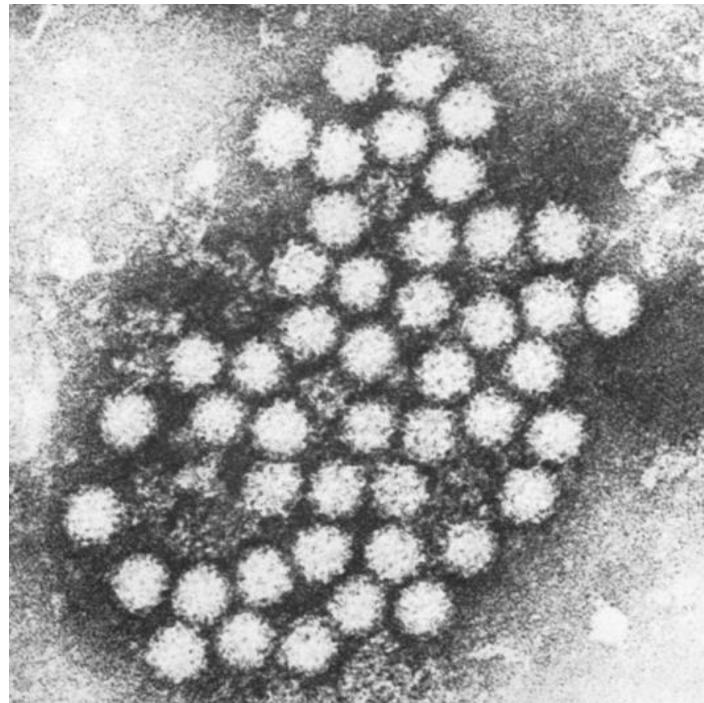
---

Les norovirus sont à l'heure actuelle une des principales causes de gastroentérites, que ce soit dans les pays en développement ou dans les pays industrialisés. Ils sont fréquemment la cause d'épidémies, qu'elles soient d'origine alimentaire ou non, et l'apparition de mutations au niveau de leur génome conduit à l'émergence régulière de nouvelles souches. C'est pourquoi, à l'heure actuelle, les gastroentérites causées par les norovirus constituent un réel problème de santé publique.

Historiquement, le premier norovirus humain a pu être identifié à la suite d'une épidémie de gastroentérites touchant les élèves et enseignants d'une école primaire de la ville de Norwalk, dans l'Ohio (États-Unis) en novembre 1968 (Kapikian *et al.*, 1972). Ce n'est que 5 ans plus tard que pour la première fois, l'agent pathogène responsable de cette épidémie a pu être réellement identifié. En 1972, l'utilisation de la microscopie électronique couplée à un marquage immunologique a en effet permis de révéler la présence de particules de 27 nm de diamètre dans les selles de volontaires infectés par un filtrat de selles provenant des victimes de l'épidémie de 1968 (**Figure 6**). Ce virus fut alors baptisé «virus Norwalk».

Le virus Norwalk est donc le premier agent viral formellement identifié à l'origine d'une épidémie de gastroentérites, bien que 50 ans plus tôt, une étiologie virale avait déjà été envisagée lors de la description d'épidémies de gastroentérites non bactériennes (Bradley, 1943; Gordon *et al.*, 1947; Gray, 1939; Zahorsky, 1929).

Durant les années qui ont suivies la découverte du virus Norwalk, de nombreux autres virus entériques ont été isolés au cours d'épidémies. Ces virus furent également nommés selon leur lieu de découverte (e.g. Southampton virus, Desert Shield virus, Snow Mountain virus, Mexico virus, Toronto virus, Camberwell virus, Hawaii virus) et furent regroupés sous l'appellation SRSV pour *Small Round Structured Viruses*, en référence à leur aspect en microscopie électronique. Il faudra attendre 2002 pour que l'ensemble de ces virus soit classé sous le genre *Norovirus* par le comité international de taxonomie des virus (ICTV).



**Figure 6 : Observation par immunomicroscopie électronique d'un agrégat de norovirus, d'après Kapikian et al., 1972.** Des particules de 27 nm de diamètre sont observées dans un échantillon de selles filtrées, après marquage par incubation avec un antisérum provenant d'un volontaire infecté par le virus Norwalk (grossissement x 231 500).

## II.1 Structure et classification

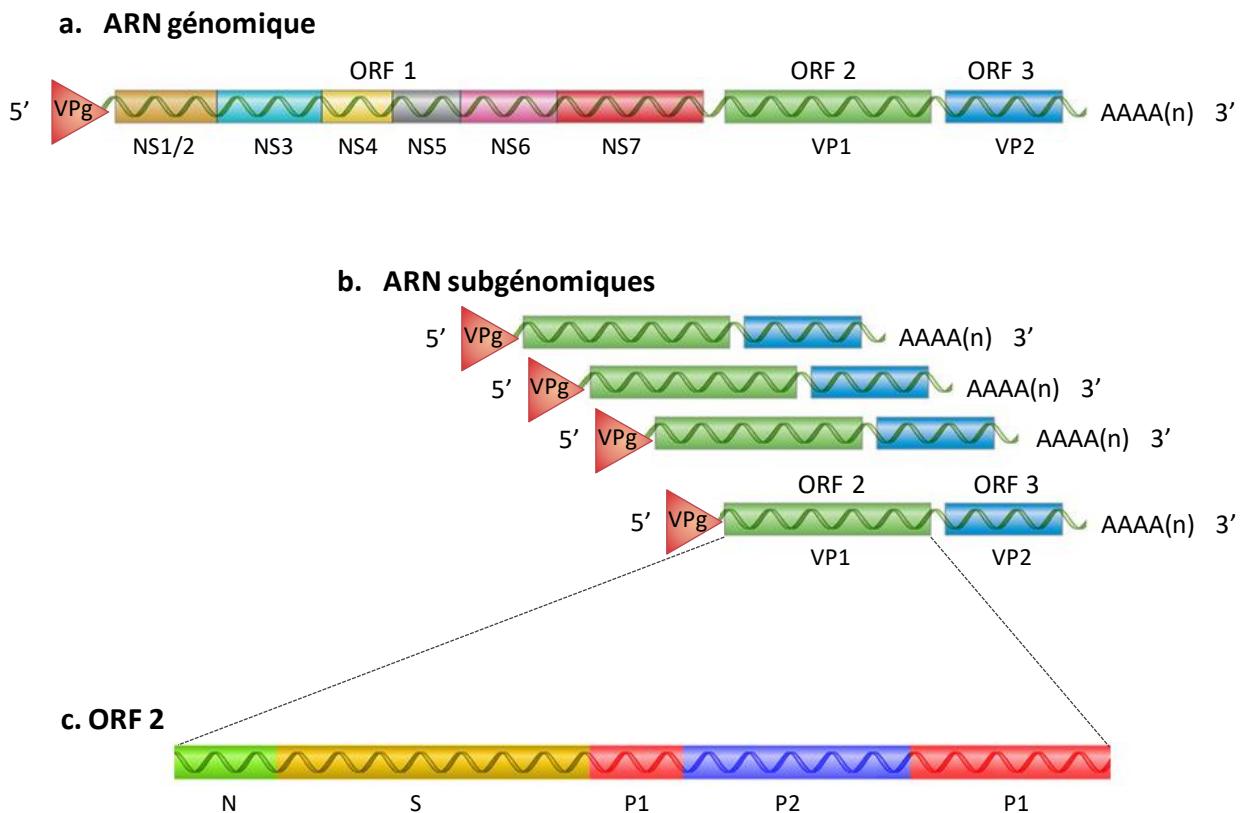
La famille des *Caliciviridae* regroupe depuis 2012 les genres *Lagovirus*, *Nebovirus*, *Norovirus*, *Sapovirus* et *Lagovirus* (King et al., 2012). Le nom de cette famille est dérivé du mot latin *calyx*. Il fait référence aux dépressions en forme de calices visibles à la surface de ces virus lorsqu'ils sont observés en microscopie électronique. La famille des *Caliciviridae* est composée de virus non enveloppés présentant une forme icosaédrique et les genres *Norovirus* et *Sapovirus* contiennent tous deux des virus capables d'infecter l'Homme. Dans le cas des norovirus, ils mesurent entre 27 et 35 nm de diamètre.

## II.1.1 Génome

Les norovirus possèdent un génome à ARN monocaténaire de polarité positive. Sa taille varie entre 7,5 et 7,7 kb (Jiang *et al.*, 1993). A l'extrémité 5', il est associé de manière covalente à une protéine VPg (*viral protein genome-linked*) qui joue le rôle de coiffe. Une queue poly(A) est présente à son extrémité 3' (**Figure 7**). Le génome des norovirus est organisé en trois cadres de lecture ouverts (ORFs) (Atmar, 2010; Lambden *et al.*, 1993). Parmi eux, L'ORF1 code une polyprotéine précurseur d'environ 195 kDa (Belliot *et al.*, 2003) qui fournira après clivage 6 protéines non structurales (NS) dont la fonction n'est pas toujours complètement élucidée. Il s'agit de :

- la protéine NS1/2 (p48 ou N-term), qui serait impliquée dans la formation du complexe de réPLICATION (Hyde & Mackenzie, 2010; Thorne & Goodfellow, 2014);
- la protéine NS3 (p41 ou 2C-like), une NTPase qui aurait également un rôle d'hélicase (Hardy, 2005; Pfister & Wimmer, 2001);
- la protéine NS4 (p22 ou 3A-like), qui interagit avec le cytosquelette et le complexe de réPLICATION (Hardy, 2005; Hyde & Mackenzie, 2010);
- la protéine NS5 (VPg), protéine de coiffe de 15 kDa liée au génome en 5' qui est nécessaire à la réPLICATION et à la traduction de l'ARN (Daughenbaugh *et al.*, 2006);
- la protéine NS6 (Pro, 3C-like), cystéine-protéase qui est responsable du clivage en 5 points de la polyprotéine non structurale (Herod *et al.*, 2014; Sosnovtsev *et al.*, 2006);
- la protéine NS7 (RdRp ou Pol), ARN polymérase ARN-dépendante qui assure la réPLICATION du génome (Högblom *et al.*, 2009).

Les ORF2 et ORF3 quant à eux codent respectivement la protéine majeure (VP1) et la protéine mineure (VP2) de capsidé (Glass *et al.*, 2000; Thorne & Goodfellow, 2014). Ces deux protéines de structure sont majoritairement traduites à partir des ARN subgénomiques. Il s'agit de fragments de génome identiques à l'ARN génomique en 3', présents en grande quantité dans la cellule hôte lors du processus de réPLICATION du virus. Comme l'ARN génomique, ces ARN subgénomiques sont liés en 5' à une protéine VPg et présentent une queue poly(A) en 3' (Herbert *et al.*, 1997) (**Figure 7**).



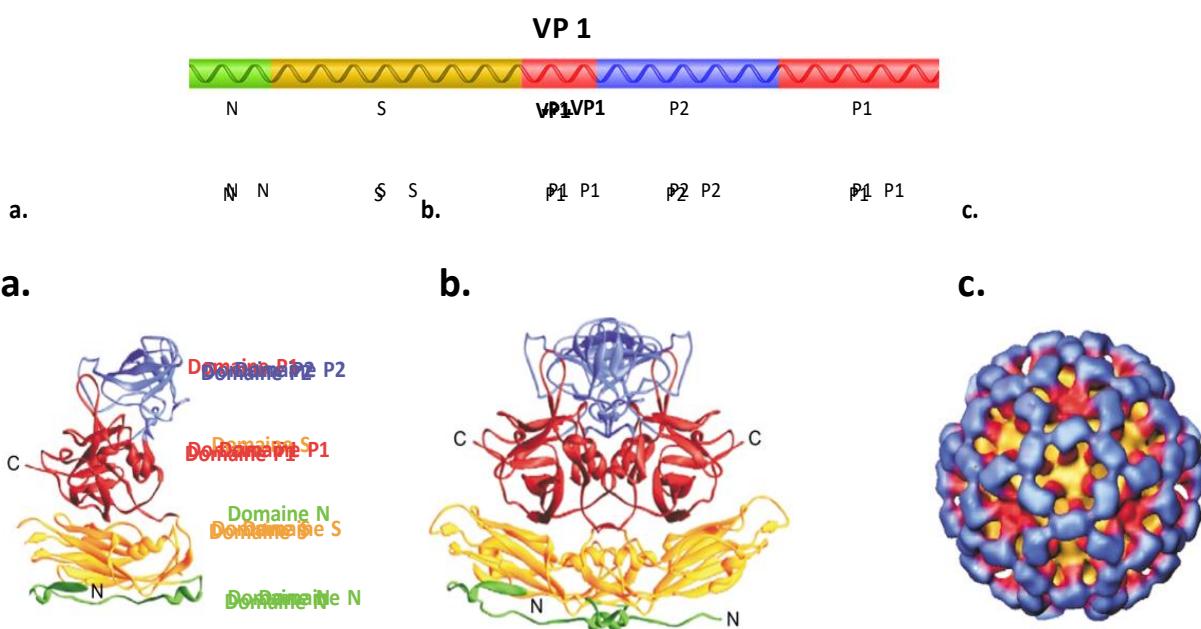
**Figure 7 : Organisation du génome des norovirus, adaptée de Bok et al., 2012 et Robilotti et al., 2015.** **a.** Le génome des norovirus est composé de trois ORFs. L'ORF1 code pour une polyprotéine qui fournira après clivage 6 protéines non structurales : les protéines NS1/2 (p48), NS3 (NTPase), NS4 (p22), NS5 (VPg), NS6 (Pro) et NS7 (Pol). **b.** Les ORF2 et ORF3 codent respectivement la protéine majeure de capsid (VP1) et la protéine mineure de capsid (VP2). Elles sont traduites majoritairement à partir des ARN subgénomiques. **c.** La protéine structurale VP1 est constituée des domaines P (P1 et P2), S et N.

## II.1.2 Capside

La structure de la capsid des norovirus a principalement été étudiée grâce à des techniques de cristallographie aux rayons X et de cryomicroscopie électronique (Prasad et al., 1999, 1994). Elle présente une symétrie icosaédrique d'ordre 3 et contient 90 dimères de la protéine de structure VP1. Cette protéine de masse comprise entre 58 et 60 kDa (Hardy, 2005) est constituée de trois domaines : on retrouve le domaine variable P (*protruding* ou protubérance) exposé en surface de la capsid et constitué des sous-domaines P1 et P2 ; le domaine S (*shell* ou coque) qui correspond à la région la plus conservée ; et le domaine N, situé à l'extrémité N-terminale de la protéine, qui constitue la face interne de la capsid (Prasad et al., 1999) (**Figures 7 et 8**). Le domaine P est impliqué dans la reconnaissance des antigènes de groupes sanguins (*Histo-blood groups antigens* ou HBGA) par les

norovirus. Ces motifs situés à la surface de nombreux types cellulaires humains semblent jouer un rôle essentiel dans le processus d'infection des norovirus (Tan & Jiang, 2005a) (**voir chapitre II.4.1 – Importance du polymorphisme des HBGA dans l'infection par les norovirus**). Cette reconnaissance se fait plus précisément au niveau du sous-domaine P2 hypervariable (Chakravarty *et al.*, 2005).

La capsidie virale des norovirus contient également quelques exemplaires de la protéine VP2 (Prasad *et al.*, 1994) dont la masse est comprise entre 22 et 29 kDa (Hardy, 2005). Les protéines VP2 sont associées au domaine S de la protéine VP1 sur la face interne de la capsidie ; elles jouent ainsi un rôle dans la stabilité de la capsidie. Elles sont également essentielles au déroulement du cycle viral (Glass *et al.*, 2003; Vongpunsawad *et al.*, 2013).



## II.1.3 Classification

Les norovirus sont caractérisés par une très grande variabilité génétique et antigénique, considérée comme un mécanisme d'évolution et de survie commun à l'ensemble des virus à ARN (Domingo & Holland, 1997). Ainsi, en plus des virus capables d'infecter l'Homme, le genre *Norovirus* regroupe des virus ayant un tropisme pour d'autres espèces animales. Ces variabilités observées au sein du genre ont conduit à la définition de plusieurs génogroupes et génotypes.

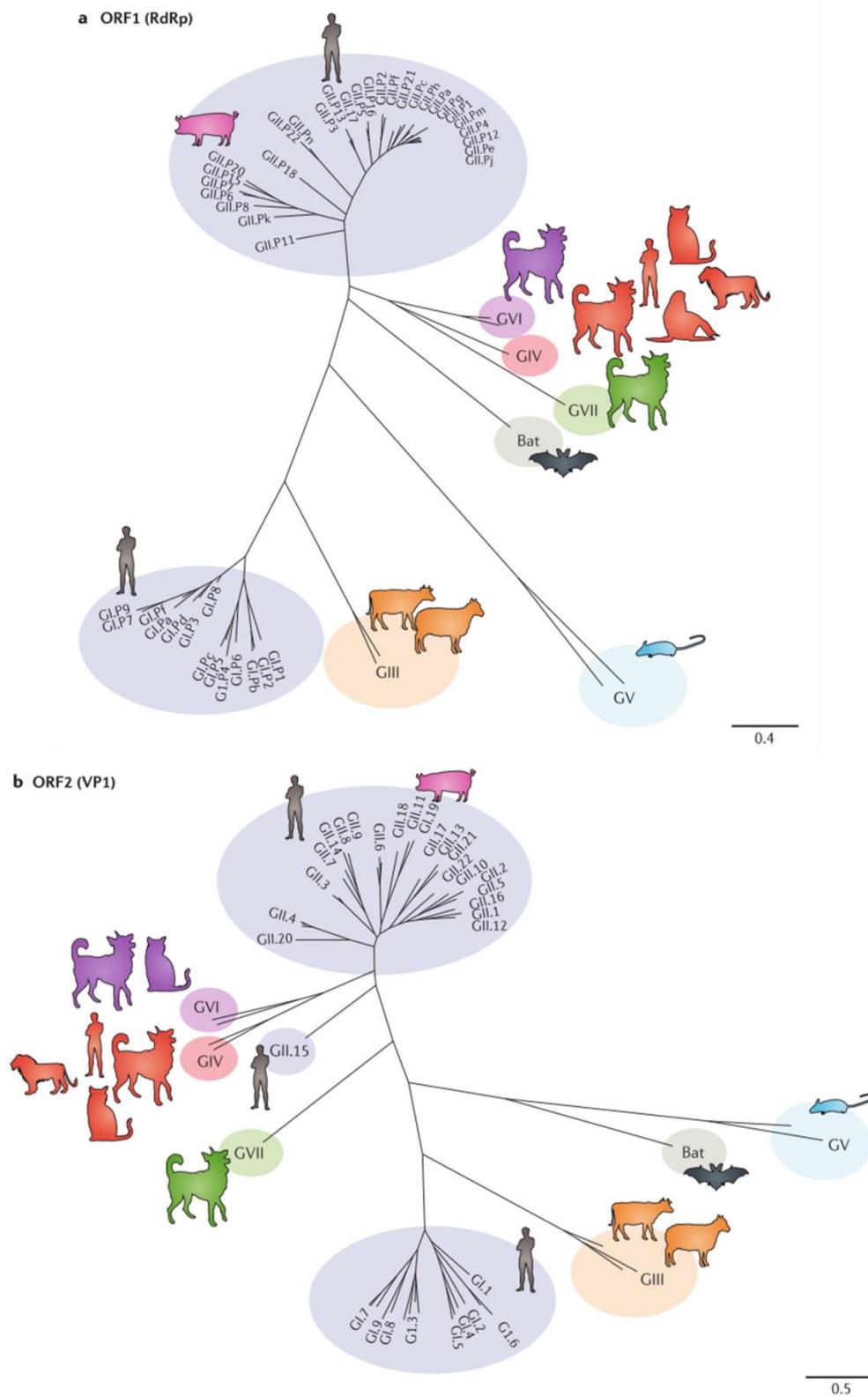
Historiquement, la première classification des norovirus était basée sur des essais de marquages immunologiques observés par microscopie électronique (Green *et al.*, 1995; Lewis *et al.*, 1995). Ce type d'approche utilisant des caractères antigéniques s'est cependant révélé peu précis et peu reproductible. De ce fait, une nouvelle classification basée sur des critères génétiques est rapidement apparue comme étant le meilleur moyen de caractériser ces virus.

En 2003, suite à la découverte de norovirus capables d'infecter la souris (norovirus murin ou MNV), le séquençage des norovirus avait permis de définir 5 génogroupes (Karst, 2003). L'absence de consensus quant à la région du génome à séquencer rendait cependant les résultats difficilement comparables d'un laboratoire à l'autre, en particulier lorsqu'il était question des norovirus humains (Ando *et al.*, 2000). En 2006, les travaux de Zheng *et al.* ont permis d'unifier cette classification. En se basant uniquement sur la séquence du gène codant la protéine majeure de capsid VP1, une hiérarchisation du genre *Norovirus* à trois niveaux comprenant le génogroupe, le génotype ainsi que la souche a été décrite. Les auteurs ont d'ailleurs confirmé la répartition des norovirus connus en 5 génogroupes et ont ensuite proposé leur subdivision en 29 génotypes. En utilisant cette classification, ils ont observé une variabilité génétique comprise entre 0 et 14,1 % pour les virus regroupés au sein d'une même souche, comprise entre 14,3 et 43,8 % pour les virus figurant dans un même génotype et comprise entre 45,0 et 61,4 % pour les virus regroupés au sein d'un même génogroupe. Cette classification qui fut officiellement acceptée lors de la 3<sup>ème</sup> conférence internationale sur les calicivirus en 2007 (Atmar, 2010) a récemment été modifiée par la définition d'un 6<sup>ème</sup> génogroupe, suite à l'isolement de norovirus d'origine canine (Mesquita *et al.*, 2010). Les données les plus récentes permettent donc aujourd'hui de classer les norovirus en 6 génogroupes (GI à GVI) et plus de 40 génotypes. Cette classification est en constante évolution, si bien que la mise en place d'un 7<sup>ème</sup> génogroupe est actuellement proposée (Vinjé, 2015).

Parmi les 6 génogroupes de norovirus actuellement définis, les génogroupes GI, GII et GIV contiennent des souches ayant un tropisme pour l'Homme. Les données actuelles répertorient 9 génotypes au sein du génogroupe GI (GI.1 à GI.9) ; on compte 22 génotypes dans le génogroupe GII, incluant les génotypes GII.11, GII.18 et GII.19 uniquement isolés chez le porcin (Mattison *et al.*, 2007; Sugieda & Nakajima, 2002; Wang *et al.*, 2005) ; et le génogroupe GIV contient 2 génotypes, le génotype GIV.1 capable d'infecter l'Homme et le génotype GIV.2 infectant uniquement les félins et les canins (Di Martino *et al.*, 2016; Martella *et al.*, 2009, 2007). Les génogroupes GIII, GV et GVI quant à eux contiennent respectivement des souches bovines (Han *et al.*, 2004; Oliver *et al.*, 2003), murines (Hsu *et al.*, 2007; Karst, 2003) et canines (Mesquita *et al.*, 2010).

Plus récemment et motivée par le fort taux de recombinaison observé en particulier au niveau des ORF1 et ORF2, une autre nomenclature utilisant à la fois la séquence codant la protéine majeure de capside VP1 et la séquence codant l'ARN polymérase a été proposée (Kroneman *et al.*, 2013) (**Figure 9**).

Les informations qui permettent d'identifier les différentes souches de norovirus selon cette nomenclature reprennent les informations suivantes : On retrouve le génogroupe auquel elle appartient (GI-VI), son hôte (humain, porcin, bovin, etc.), le code ISO du pays dans lequel elle a été isolée, l'année d'échantillonnage, le génotype (basé sur l'étude de la séquence du gène codant la protéine VP1 et/ou du gène codant l'ARN polymérase), ainsi que le variant identifié par un nom de ville et un numéro de série (exemple : norovirusGII/Hu/FR/2004/GII.Pg\_GII.1/Paris23).



**Figure 9 : Phylogénie des norovirus, d'après de Graaf et al., 2016. a.** Analyse phylogénétique basée sur la séquence de l'ORF1 du génome codant l'ARN polymérase. **b.** Analyse phylogénétique basée sur la séquence de l'ORF2 codant la protéine majeure de capsid VP1. Bien que présentant de nombreuses similarités, des phylogénies différentes apparaissent selon la séquence utilisée. Ces représentations prennent en compte la définition d'un génogroupe GVII proposée par Vinjé et al., 2015.

## II.2 Cycle de réplication

### II.2.1 Alternatives à l'étude des norovirus humains

L'étude du mécanisme de réplication des norovirus humains fut particulièrement difficile puisqu'il n'existe pas, jusqu'il y a peu, de système cellulaire efficace permettant leur réplication. Des avancées ont été faites dans ce domaine en utilisant notamment des modèles cellulaires tridimensionnels d'épithélium intestinal pour leur culture (Straub *et al.*, 2013, 2011). Plus récemment encore, des systèmes de culture utilisant des lymphocytes B (Jones *et al.*, 2015, 2014), ou des cellules souches intestinales (Ettayebi *et al.*, 2016) ont été proposés. Ces différentes techniques sont cependant difficiles à mettre en œuvre à l'heure actuelle et certaines d'entre elles s'avèrent peu reproductibles (Herbst-Kralovetz *et al.*, 2013; Papafragkou *et al.*, 2013). De plus, elles semblent peu représentatives du cycle viral naturel des norovirus puisque leur application ne permet d'observer qu'une multiplication virale modérée (*i.e.* augmentation du nombre de copies de génome de 1 à 3 unités logarithmiques), bien en deçà des niveaux de multiplication observés lors de la réplication *in vivo* du virus. A l'heure actuelle, ces techniques n'ont donc pas encore permis d'étudier de manière plus précise le cycle viral des norovirus humains.

Pour mieux comprendre la réplication des norovirus, des alternatives ont donc été utilisées. Ce mécanisme a notamment pu être exploré par l'étude du calicivirus félin (FCV), un autre membre de la famille des *Caliciviridae* qui présente l'avantage d'être cultivable (Chaudhry *et al.*, 2006) ; par l'étude des souches cultivables de norovirus murins (Karst, 2003) ; par l'élaboration de répliques de norovirus humains maintenus dans des lignées cellulaires (Chang *et al.*, 2006) ; ou encore par la transfection du génome de norovirus humains dans des cellules eucaryotes (Guix *et al.*, 2007). L'utilisation de VLPs de norovirus (virus-like particles) a également permis l'étude de la phase précoce de l'infection qui correspond aux interactions entre le virus et ses ligands à la surface de la cellule hôte. Les VLPs sont des capsides vides formées par l'auto-assemblage spontané des protéines VP1 après leur expression *in vitro* (Jiang *et al.*, 1992b). Bien que ces particules ne contiennent pas de copie de la protéine VP2, elles ont l'avantage de présenter des caractéristiques morphologiques et antigéniques similaires à celles des norovirus et peuvent être produites en grande quantité (Jiang *et al.*, 1992b; Taube *et al.*, 2005). Elles sont cependant dépourvues de capacité d'infection puisqu'elles ne contiennent pas de génome.

## II.2.2 Adhésion du virus

### II.2.2.1 Tropisme cellulaire

Les norovirus humains pénètrent l'organisme par voie orale pour atteindre l'intestin qui est le site de l'infection. Alors que la majorité des virus entériques pathogènes humains infectent les entérocytes, les efforts réalisés pour cultiver les norovirus sur ce type cellulaire demeurent infructueux, supposant un tropisme différent (Duizer, 2004; Gonzalez-Hernandez *et al.*, 2013; Wobus *et al.*, 2004).

La possibilité de répliquer des norovirus murins de manière *in vitro* sur des lignées de macrophages ou de cellules dendritiques (Mumphrey *et al.*, 2007; Wobus *et al.*, 2004) ainsi que les essais concernant la culture des souches humaines sur des lymphocytes B ont suggéré que les cellules présentatrices d'antigènes pourraient être la cible majeure des norovirus (Karst *et al.*, 2014). Ce tropisme dirigé vers les cellules de l'immunité a d'ailleurs également été observé de manière *in vivo* chez l'Homme. En effet, après l'infection, alors que des antigènes viraux sont retrouvés dans les entérocytes, ils sont également présents au niveau de la *lamina propria*, un tissu conjonctif riche en cellules présentatrices d'antigènes situé sous l'épithélium intestinal (Chan *et al.*, 2011; Lay *et al.*, 2010). Dans ce type de tissu, les lymphocytes B présents majoritairement au niveau des plaques de Peyer semblent être particulièrement impliqués dans la réplication du virus. Leur rôle dans le cycle du norovirus a d'ailleurs été établi pour le modèle murin (Green, 2016; Jones *et al.*, 2014; Karst, 2015) mais semble également avéré pour les souches humaines puisqu'une récente étude a démontré que bien qu'un déficit en lymphocytes B chez l'individu n'empêchait pas l'infection, la quantité de virions qui en résultait était significativement réduite (Brown *et al.*, 2016).

Si ce tropisme dirigé vers les lymphocytes B présents dans la *lamina propria* est avéré, il est donc nécessaire en premier lieu aux virus de franchir la barrière épithéliale. Ce passage serait réalisé par un mécanisme d'internalisation sans phénomène de réplication (Marionneau *et al.*, 2002), mettant en jeu les cellules M de l'épithélium (Karst & Tibbetts, 2016). Des auteurs ont en effet remarqué que l'absence de cellule M chez un individu conduisait à une infection réduite par le norovirus (Gonzalez-Hernandez *et al.*, 2014). Les cellules M sont des cellules spécialisées ayant une activité d'endocytose. Elles permettent la présentation des antigènes prélevés dans la lumière intestinale au tissu lymphoïde sous-jacent. Ces cellules sont souvent utilisées par les pathogènes pour traverser l'épithélium qui

profitent à leur niveau de la présence de certains récepteurs et de la finesse de la couche de mucus protectrice (Mabbott *et al.*, 2013).

Actuellement, de nombreuses interrogations subsistent encore quant au tropisme des norovirus. En effet, bien que l'implication des lymphocytes B et le mécanisme permettant leur passage à travers l'épithélium intestinal soient deux hypothèses largement décrites dans la littérature, d'autres théories sont parfois émises. A titre d'exemple, le plus récent système cellulaire décrit permettant la culture de certaines souches de norovirus humains s'appuie sur l'utilisation de cellules souches intestinales et non pas sur l'utilisation de lymphocytes B (Ettayebi *et al.*, 2016).

### **II.2.2.2 Récepteur viral**

Une fois sa cellule hôte atteinte, la première étape du cycle de l'infection impose au virus de pouvoir s'y adhérer. Très souvent, les oligosaccharides présents sur les glycoprotéines ou glycolipides des cellules sont utilisés par les pathogènes comme molécules d'attachement. Pour le modèle murin par exemple, l'adhésion du virus est effectuée via les acides sialiques terminaux des gangliosides présents en surface des macrophages hôtes (Taube *et al.*, 2009).

Les norovirus humains, eux, sont capables de reconnaître les antigènes tissulaires de groupes sanguins ou HBGA. Ces motifs sont largement distribués dans la plupart des tissus du corps humain, aussi bien à la surface des cellules sanguines circulantes qu'à celles des cellules épithéliales et endothéliales, et en particulier au niveau de l'intestin (Marionneau *et al.*, 2002). Ils sont également retrouvés sous forme libre dans certains fluides biologiques.

Leur rôle dans le processus d'infection des norovirus humains a été mis en évidence lors de tests d'inoculation à des volontaires sains ou encore lors d'analyses épidémiologiques (Lindesmith *et al.*, 2003). Ces expérimentations ont d'ailleurs révélé que la présence ou l'absence de certains types d'HBGA orientait en partie la susceptibilité des individus à l'infection (**voir chapitre II.4.1 – Importance du polymorphisme des HBGA dans l'infection par les norovirus**).

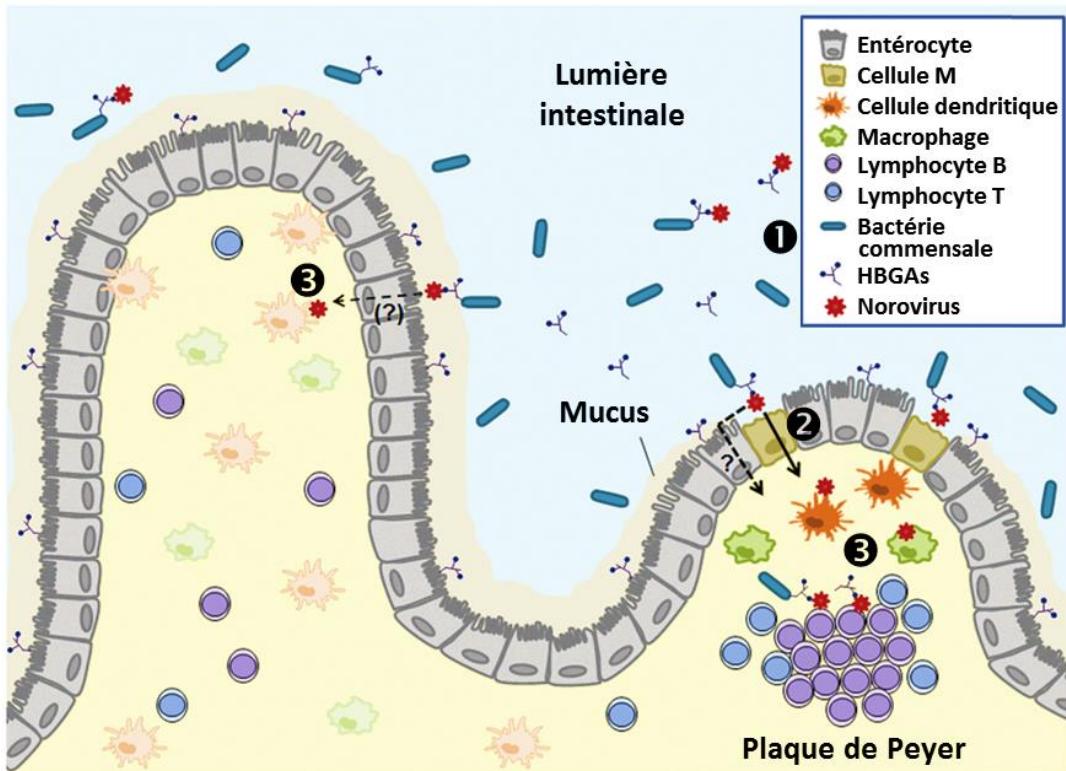
### II.2.2.3 Rôle du microbiote intestinal

De récentes études suggèrent que le microbiote intestinal interviendrait également dans le processus d'infection de l'Homme par les norovirus. L'existence d'interactions entre la flore commensale intestinale et certains virus pathogènes est en effet bien décrite, ce phénomène pouvant conférer à certains virus une meilleure stabilité, faciliter leur transport, favoriser la reconnaissance de certains récepteurs ou encore moduler la réponse immunitaire de l'hôte (Karst, 2016; Pfeiffer & Virgin, 2016).

Dans le cas des norovirus, le microbiote intestinal participerait au transport du virus à travers la barrière épithéliale ainsi qu'à sa présentation aux lymphocytes B (**Figure 10**). Certaines bactéries commensales du tractus digestif expriment en effet à leur surface des motifs HBGA qui permettent une interaction avec les norovirus (Miura *et al.*, 2013; Rasko *et al.*, 2000).

La présence de certaines souches d'*Enterobacter cloacae* exprimant des HBGA de type H est d'ailleurs apparue essentielle au processus d'infection des lymphocytes B lors d'essais *in vitro* (Jones *et al.*, 2014; Karst & Tibbetts, 2016; Karst & Wobus, 2015). En effet, lors de l'incubation de norovirus humains avec des lymphocytes B, une baisse de l'infection était observée lorsque les virus utilisés provenaient de selles filtrées, signifiant l'absence de bactérie. Inversement, l'ajout de bactéries exprimant des HBGA de type H ou encore l'ajout d'HBGA libres permettait de retrouver le caractère infectieux des norovirus.

L'implication des bactéries dans le transport et dans la présentation des norovirus vers les lymphocytes B est là aussi sujette à controverse. En effet, la présence de ces bactéries est par exemple apparue délétère au cycle d'infection des norovirus lors d'essais *in vivo* récemment réalisés chez le porc (Lei *et al.*, 2016).



**Figure 10 : Modèle expliquant les étapes précoce de l'infection des norovirus proposé par Karst & Wobus, 2015.** 1. Les norovirus sont capables d'adhérer aux HBGA présents à la surface des entérocytes, libres dans la lumière intestinale, ou présents à la surface des bactéries commensales. 2. Ils sont ensuite transportés à travers la barrière épithéliale par transcytose via les cellules M. 3. Les norovirus sont présentés aux cellules de l'immunité situées dans la *lamina propria* (lymphocytes B, macrophages et cellules dendritiques).

### II.2.3 Pénétration et décapsidation

Compte tenu des interrogations qui subsistent encore quant à leur tropisme, peu d'informations sont disponibles concernant les étapes de pénétration et de décapsidation des norovirus humains. La majorité des connaissances sur ce sujet provient d'essais réalisés sur des virus modèles permettant difficilement de conclure quant aux processus impliqués dans l'internalisation des souches humaines.

On sait par exemple que l'internalisation des norovirus murins dans les macrophages est médiée par un système mettant en jeu des molécules de dynamine et de cholestérol (Gerondopoulos *et al.*, 2010). Concernant le FCV, ce mécanisme serait dépendant de la clathrine (Stuart & Brown, 2006).

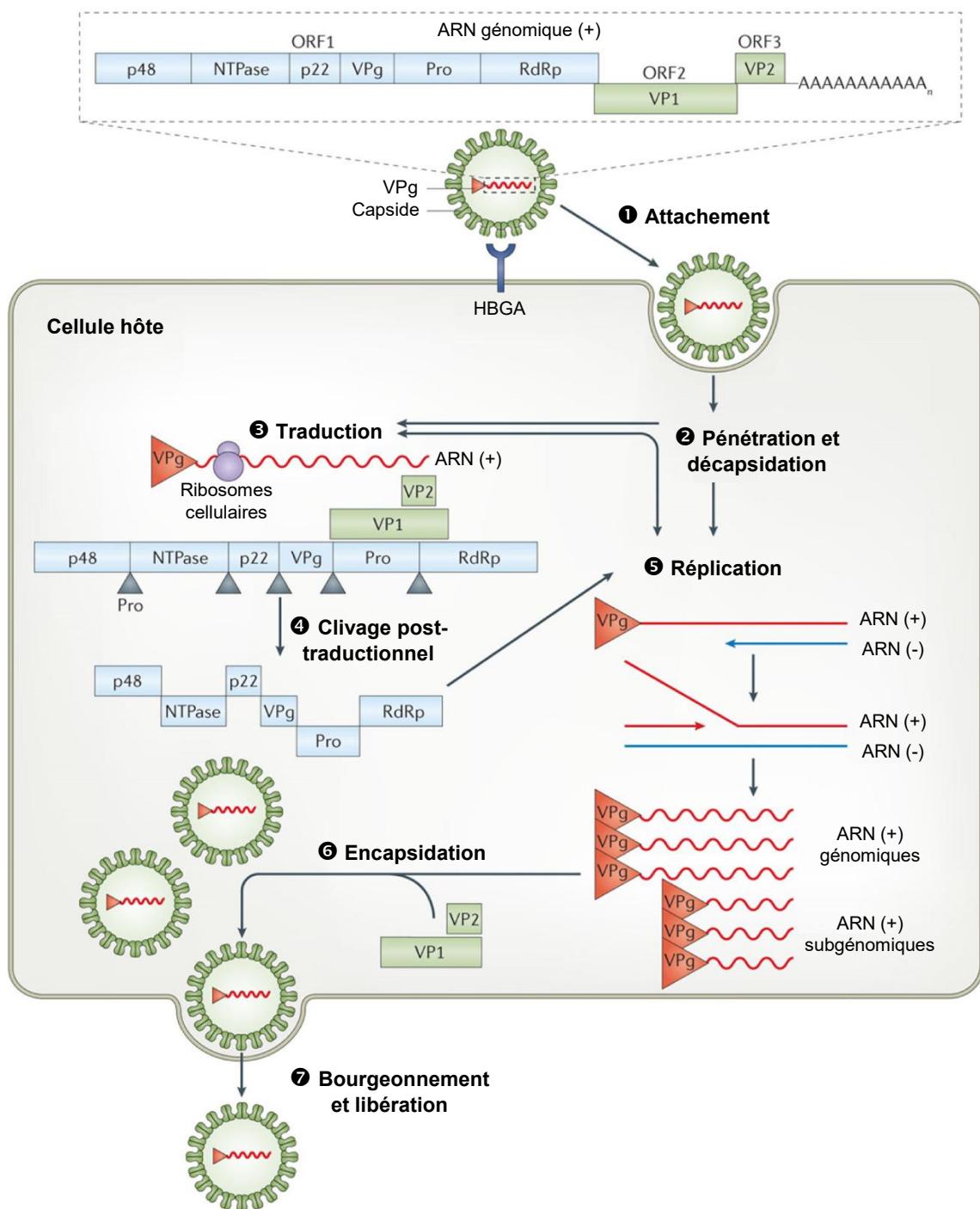
## II.2.4 Traduction des protéines virales

Une fois le norovirus à l'intérieur de la cellule hôte, la première étape intracellulaire de la réplication est la traduction des protéines non structurales à partir de l'ARN génomique viral. A la différence des étapes d'adhésion et de pénétration du virus, ce mécanisme semble être relativement bien connu puisque la structure du génome des norovirus est bien établie et que l'étape de traduction des protéines se déroule de manière assez similaire chez l'ensemble des virus à ARN de polarité positive.

Après sa libération dans le cytoplasme de la cellule infectée, le génome du virus se comporte comme un ARN messager (ARNm) ; il est donc directement traduit en protéines par la machinerie cellulaire (**Figure 11**). La protéine VPg qui est fixée en 5' de la molécule d'ARN semble jouer un rôle essentiel lors de cette étape puisque son absence réduit de manière significative le caractère infectieux du virus (Chaudhry *et al.*, 2006; Guix *et al.*, 2007). Cette protéine intervient notamment dans le recrutement des facteurs d'initiation présents dans la cellule hôte afin de former le complexe d'initiation de la traduction. Il est constitué du facteur d'initiation eIF4F (lui-même composé des sous unités eIF4G, eIF4E et eIF4A) et du facteur d'initiation eIF3 (Thorne & Goodfellow, 2014). On retrouve également à son niveau la protéine PABP [*poly(A)-binding protein*] qui, en se liant spécifiquement à la séquence poly(A) présente à l'extrémité 3' du génome, permet à la molécule d'ARN de former une pseudo-boucle et de constituer ainsi une structure essentielle au bon déroulement de la traduction (Wells *et al.*, 1998).

La traduction débute par l'ORF1. Cette étape permet la synthèse de la polyprotéine qui fournira après clivage par la protéine NS6 les 6 protéines non structurales indispensables à la réplication du virus.

Concernant la traduction des protéines de capside VP1 et VP2, elle est principalement réalisée à partir des brins d'ARN subgénomiques (Naphthine *et al.*, 2009). Les brins d'ARN subgénomiques sont des fragments de génome composés de l'ORF2 (protéine VP1) et de l'ORF3 (protéine VP2) également liés à une protéine VPg en 5'. Ils sont synthétisés en grande quantité lors de la réplication du génome, cette stratégie permettant de produire le nombre important de protéines de capside nécessaires à l'assemblage des virions.



**Figure 11 : Cycle de réplication des norovirus proposé par de Graaf et al., 2016.**  
 1. L'adhésion du norovirus à sa cellule hôte se fait par le biais des récepteurs HBGA largement répandus dans l'organisme. 2. La pénétration et la décapsidation du virus dans la cellule hôte sont des étapes mal connues. 3. Le génome du norovirus est traduit en une polyprotéine et en protéines structurales VP1 et VP2 par la machinerie cellulaire. 4. La polyprotéine est clivée en protéines non structurales qui seront nécessaires à la réplication du génome viral. 5. La réplication du génome (ARN génomiques et subgénomiques) est assurée par l'ARN polymérase ARN dépendante à partir d'un brin d'ARN (-) complémentaire de l'ARN génomique. 6. Les génomes répliqués sont encapsidés pour produire de nouveaux virions. 7. Les virions sont libérés de la cellule hôte.

## II.2.5 RéPLICATION DU GÉNOME

Comme pour tous les virus possédant un ARN de polarité positive, la réPLICATION du génome des norovirus débute d'abord par la synthèse d'un intermédiaire ARN (-), complémentaire du brin d'ARN initial, qui permet d'aboutir à la forme réPLICATIVE double brin du génome (**Figure 11**). Le brin d'ARN (-) servira ensuite de trame à la synthèse des nouveaux génomes qui seront soit encapsidés dans les nouveaux virions, soit traduits afin d'amplifier la synthèse protéique, comme c'est le cas notamment lors de la synthèse des protéines de capside à partir des ARN subgénomiques.

Les différentes étapes de la réPLICATION du génome ont lieu dans la région péri-nucléaire de la cellule hôte (Hyde *et al.*, 2009; Wobus *et al.*, 2004). A ce niveau, la co-localisation de l'ensemble des composants impliqués dans ce mécanisme forme le complexe de réPLICATION (Hyde *et al.*, 2009; Hyde & Mackenzie, 2010). On y retrouve nécessairement les protéines non structurales et la forme réPLICATIVE double brin du génome, mais aussi des protéines de structure VP1 et VP2 qui y jouent un rôle essentiel, ainsi que des composants membranaires provenant de l'appareil de Golgi et du réticulum endoplasmique de la cellule hôte. Dans le cas des norovirus murins, ce sont les protéines NS1/2 et NS4 qui permettent le recrutement des composants dérivés de la cellule hôte (Hyde & Mackenzie, 2010).

Il existe deux mécanismes de réPLICATION distincts (Belliot *et al.*, 2005; Rohayem *et al.*, 2006), l'un assurant la synthèse du brin d'ARN (-) complémentaire permettant la formation de la forme réPLICATIVE double brin du génome (*i.e.* synthèse *de novo*), et l'autre correspondant à la synthèse des ARN (+) à partir de ce dernier (*i.e.* synthèse VPg-dépendante). Dans les deux cas, c'est la polymérase virale ARN dépendante (RdRp ou protéine NS7) synthétisée lors de la traduction qui est à l'origine de la réPLICATION.

La synthèse *de novo* est assurée après interaction de la RdRp avec les protéines structurales VP1 nouvellement traduites ou provenant du virion à l'origine de l'infection. Cette interaction est réalisée au niveau de structures en boucle présentes dans le domaine S de la protéine VP1 (Subba-Reddy *et al.*, 2012).

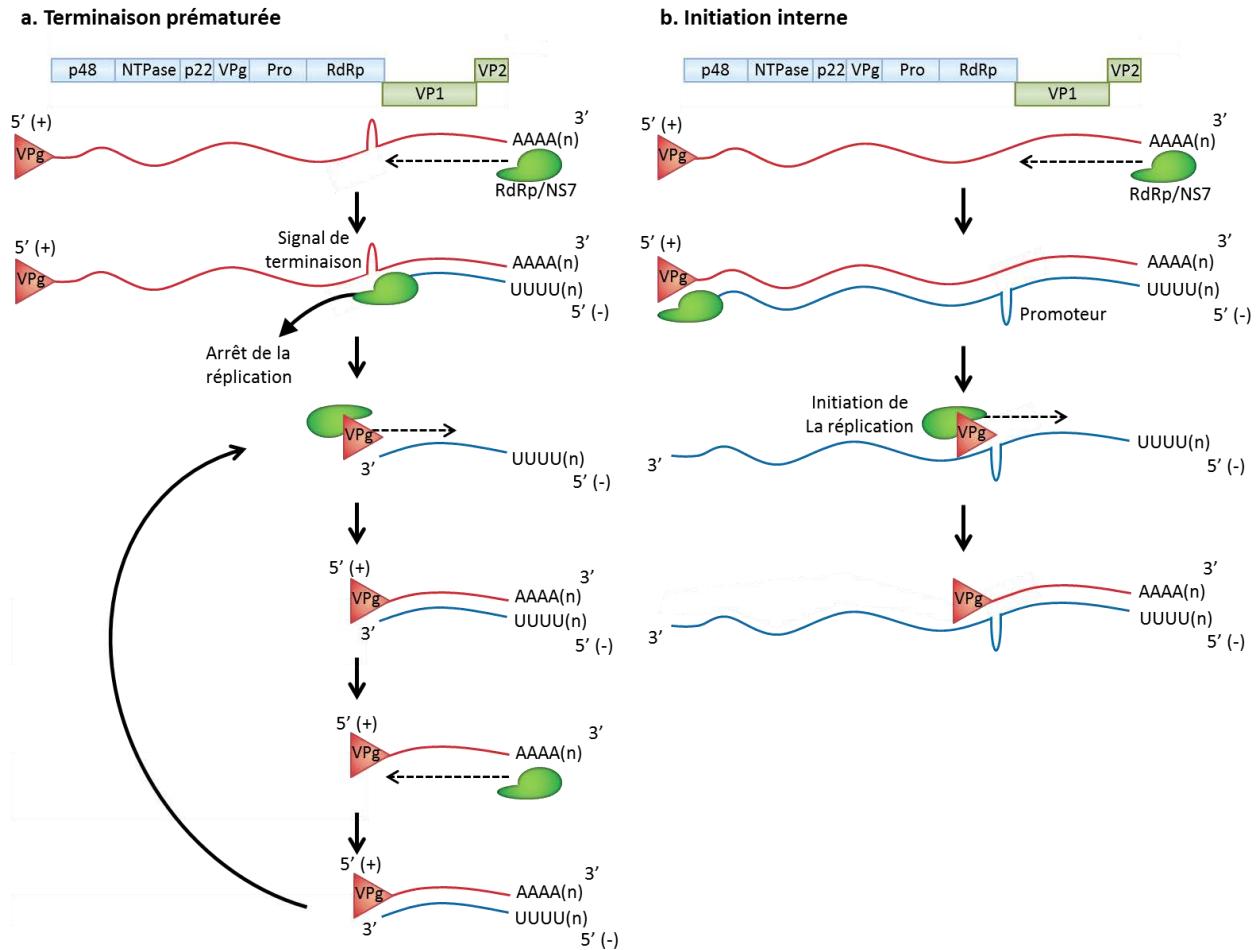
Dans le cas de la synthèse VPg-dépendante qui aboutit à la production des ARN (+) génomiques et subgénomiques, la RdRp initie la réPLICATION du génome à l'extrémité 3' du brin d'ARN (-) ainsi que la fixation covalente de la protéine VPg en 5' du nouveau brin d'ARN (+). Il s'agit d'un liaison phosphodiester entre une tyrosine présente au niveau de la protéine VPg et une guanine (Subba-Reddy *et al.*, 2011) présente invariablement en 5' du génome chez tous les membres de la famille des *Caliciviridae* (Thorne & Goodfellow, 2014).

Concernant la synthèse des ARN subgénomiques qui correspondent finalement à des génomes viraux incomplets, deux hypothèses sont avancées (**Figure 12**) (Thorne & Goodfellow, 2014). La première suppose une terminaison prématuée de la synthèse du brin d'ARN (-) complémentaire, causée par la présence d'un signal de terminaison situé sur le brin (+). Le fragment d'ARN (-) résultant servirait ensuite de matrice pour la production d'un ARN (+) subgénomique. La seconde hypothèse suggère la formation d'une structure secondaire située au niveau du brin (-) complémentaire, qui servirait de promoteur pour la synthèse du brin d'ARN (+) subgénomique. La présence d'une région hyper conservée en épingle à cheveux en 3' de la région codant la protéine VP1 sur le brin d'ARN (-) chez tous les membres de la famille des *Caliciviridae* oriente en faveur de la seconde hypothèse (Simmonds *et al.*, 2008).

## II.2.6 Encapsidation et libération des virions

Encore une fois, les mécanismes permettant l'assemblage des nouveaux virions et leur sortie de la cellule hôte sont peu connus. On constate cependant que les protéines majeures de capside VP1 sont capables de s'auto-assembler de manière spontanée. Bien que les protéines mineures de capside VP2 ne sont pas nécessaires à l'auto-assemblage des capsides puisque étant absentes lors de la synthèse de VLPs, leur présence est néanmoins indispensable à la stabilité et au maintien du caractère infectieux des nouveaux virions (Sosnovtsev *et al.*, 2005). Durant l'auto-assemblage, les génomes viraux nouvellement synthétisés sont internalisés dans les capsides. Les chances d'encapsider une molécule d'ARN durant cette étape pourraient être favorisées par l'interaction des génomes présentant un caractère acide avec les protéines VP2 de nature basique (Thorne & Goodfellow, 2014). Une interaction entre la protéine VPg liée à l'ARN et les protéines de structure VP1 est également proposée, ce qui assurerait l'encapsidation préférentielle des ARN viraux plutôt que celle des ARNm cellulaires (Kaiser *et al.*, 2006).

Après leur assemblage dans le cytoplasme de la cellule hôte, les norovirus humains nouvellement produits seraient libérés après apoptose cellulaire. Ce processus est en effet largement répandu chez d'autres membres de la famille des *Caliciviridae* (Bok *et al.*, 2009b; Sosnovtsev *et al.*, 2003) et la présence de corps apoptotiques au niveau du tube digestif de l'Homme après l'infection semble confirmer ce mécanisme (Troeger *et al.*, 2009). Dans le cas du norovirus murin, l'apoptose de la cellule est causée par la diminution de l'activité régulatrice de la survivine entraînant l'activation des caspases (Bok *et al.*, 2009b; Furman *et al.*, 2009). La cathepsine B et le cytochrome C interviennent également dans ce processus.

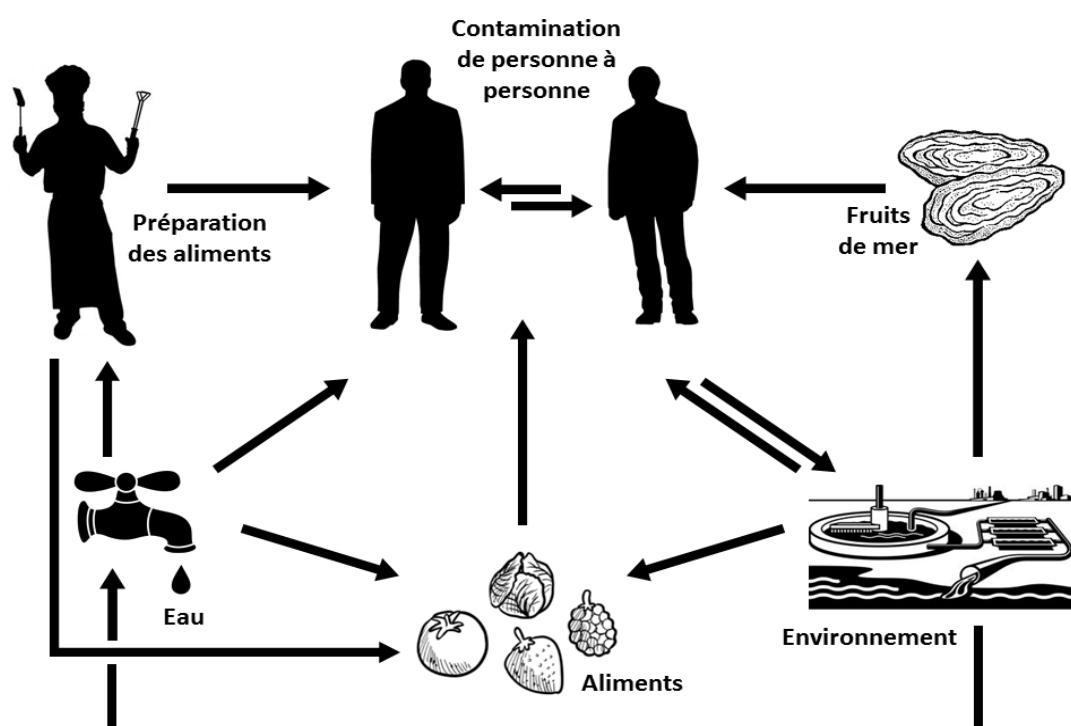


**Figure 12 : Proposition de deux mécanismes à l'origine de la synthèse des ARN subgénomiques des norovirus, adaptée de Throne et al., 2014.** **a. Terminaison prématuée** : La présence d'un signal de terminaison au niveau du brin d'ARN (+) entraîne un arrêt prématué de la synthèse du brin d'ARN (-) complémentaire. Le fragment d'ARN (-) servira ensuite de matrice pour la synthèse des ARN (+) subgénomiques. **b. Initiation interne** : La présence d'un promoteur en aval de la région codant la protéine VP1 sur le brin d'ARN (-) permet d'initier la synthèse des ARN subgénomiques.

## II.3 L'infection par les norovirus

### II.3.1 Transmission

Comme pour les autres agents pathogènes responsables de gastroentérites, la transmission des norovirus se fait principalement par la voie féco-orale (**Figure 13**). Elle est le plus souvent directe, c'est-à-dire de personne à personne, mais la propagation du virus peut également se faire de manière indirecte et dans ce cas, elle se fait par le biais de surfaces, d'eaux souillées ou encore d'aliments contaminés par des virus infectieux (**voir chapitre II.6 – Place des norovirus dans les TIAC**). Plus rarement, une transmission aérienne peut être observée, rendue possible par la présence de norovirus dans les vomissures des personnes infectées (Kirking *et al.*, 2010; Marks *et al.*, 2000; Tung-Thompson *et al.*, 2015). Ce type de contamination favorise considérablement la survenue d'épidémies dans les environnements confinés.



**Figure 13 : Cycle de transmission des pathologies liées au péril fécal.** Dans le cas des norovirus, la présence de particules infectieuses dans l'environnement fait suite à leur excrétion massive par les individus infectés. Ces virus peuvent ensuite être transmis à d'autres individus par le biais d'eaux souillées ou d'aliments contaminés, en particulier les fruits de mer ou végétaux qui ont été en contact avec des eaux contaminées. Une contamination directe de personne à personne peut également avoir lieu, favorisant l'explosion des épidémies.

De manière générale, les épidémies causées par les norovirus sont caractérisées par un taux d'attaque important, c'est-à-dire qu'elles engendrent de nombreux cas secondaires. Les caractéristiques de l'infection ainsi que certains facteurs liés aux norovirus eux-mêmes font de ces derniers des pathogènes particulièrement contagieux. Par ailleurs, certains contextes ou environnements sont particulièrement propices à la transmission du virus (**voir chapitre II.3.3.2 – Les épidémies de gastroentérites causées par les norovirus**).

L'explosion de ce type d'épidémie est tout d'abord liée à l'excrétion massive des virus par les individus infectés. Elle débute généralement 18 heures post-infection et persiste en moyenne 7 à 10 jours (Atmar *et al.*, 2008). L'excrétion virale est maximale entre le 2<sup>ème</sup> et le 5<sup>ème</sup> jour de l'infection mais elle peut perdurer plusieurs mois en cas de forme chronique chez l'immunodéprimé (Siebenga *et al.*, 2008). Durant cette période, des concentrations de l'ordre de  $10^8$  à  $10^{10}$  particules virales/g de selles sont classiquement observées.

Le second facteur favorisant les épidémies est la bonne stabilité des norovirus dans l'environnement, permettant une dissémination massive du virus après son excrétion (**voir chapitre II.6.2.1 – Stabilité dans l'environnement**). En effet, comme tous les virus nus, c'est à dire dépourvus d'enveloppe lipidique, les norovirus sont capables de persister sous forme infectieuse dans les eaux environnementales, à la surface des aliments ou encore à la surface de matériaux inertes comme les poignées de portes, les boutons d'ascenseur, les sanitaires et les ustensiles. Peu de données sont cependant disponibles concernant leur stabilité puisque les techniques de culture qui permettraient d'étudier leur inactivation sont très récentes (Ettayebi *et al.*, 2016; Jones *et al.*, 2014).

Enfin, le dernier paramètre favorisant la contagion du virus est la faible charge virale nécessaire à l'infection d'un nouvel individu. En effet, la DI<sub>50</sub>, c'est à dire la quantité de virus nécessaire pour entraîner des signes cliniques chez 50 % des sujets après inoculation, est estimée à environ 18 particules virales (Teunis *et al.*, 2008).

## II.3.2 Clinique

Les norovirus font partie des principaux agents des gastroentérites, toutes classes d'âges confondues. Ces infections présentent une distribution saisonnière, avec un pic épidémique généralement observé en période hivernale (Mounts *et al.*, 2000). Des épidémies isolées peuvent cependant apparaître tout au long de l'année.

La symptomatologie des gastroentérites causées par les norovirus est caractérisée par l'apparition brutale de vomissements pouvant être associés à des diarrhées. On retrouve

également des douleurs abdominales et une hyperthermie pouvant être accompagnées de myalgies et de céphalées. Ces symptômes apparaissent généralement après une période d'incubation relativement courte, de l'ordre de 12 à 48 heures (Lee *et al.*, 2013). La forte prévalence de nausées et vomissements en cas de gastroentérites est généralement un critère d'orientation en faveur d'une étiologie à norovirus. Ce virus est d'ailleurs appelé « *Winter vomiting disease* » dans les pays anglo-saxons, en raison de la saisonnalité des épidémies et de cette symptomatologie particulière.

Ces épisodes de gastroentérites sont généralement bénins et de courte durée. La rémission complète est en effet observée après 48 à 72 heures chez les individus immunocompétents (Rockx *et al.*, 2002). Des formes cliniques plus graves peuvent cependant se manifester, avec un risque de déshydratation pouvant entraîner un déséquilibre électrolytique en particulier chez les nourrissons et les personnes âgées (Murata *et al.*, 2007; Schwartz *et al.*, 2011). Dans ce cas, la gravité des symptômes peut parfois conduire à l'hospitalisation des patients et engager le pronostic vital.

Dans de rares cas, des manifestations inhabituelles sont observées avec par exemple l'apparition d'une trombocytopénie (Arness *et al.*, 2000), de convulsions (Chan *et al.*, 2011; Medici *et al.*, 2010), d'une atteinte hépatique marquée par l'élévation des transaminases (Zenda *et al.*, 2011), d'une encéphalopathie (Ito *et al.*, 2006), d'une insuffisance rénale aigüe (Kanai *et al.*, 2010), d'une coagulation intravasculaire disséminée (CDC, 2002a) ou encore d'un syndrome urémique hémolytique (Sugimoto *et al.*, 2007). Enfin, chez les individus immunodéprimés, des formes chroniques sont parfois observées (Bok & Green, 2012).

La clinique particulière des gastroentérites causées par les norovirus a été décrite en 1982 afin de tenter de distinguer cet agent des autres pathogènes (Kaplan *et al.*, 1982a). Les critères de Kaplan ainsi définis sont (i) une période d'incubation de 24 à 48 heures, (ii) la manifestation des symptômes pendant une période allant de 12 à 60 heures, (iii) des vomissements chez plus de 50 % des individus atteints, et (iv) une coproculture négative pour la recherche de bactéries pathogènes ou de parasites. Plus récemment, ces critères ont été réévalués par l'analyse des données récoltées au cours de 4 050 épidémies de gastroentérites, dont 549 étaient causées par les norovirus (Turcios *et al.*, 2006). Dans cette étude, les critères de Kaplan ont montré une forte spécificité (99 %) et une sensibilité modérée (68 %) pour identifier les épidémies causées par les norovirus. L'ajout d'autres critères, tels que le ratio fièvre/vomissements ou le ratio diarrhées/vomissements a permis d'augmenter cette sensibilité mais a cependant diminué le degré de spécificité, amenant les

auteurs à conclure que finalement, les critères définis initialement par Kaplan étaient les plus adaptés.

En dépit de ces symptômes fréquemment observés, un portage asymptomatique peut également exister. Egalement associé à une excrétion virale, il contribue à la transmission du virus. Ce phénomène est le plus souvent documenté chez les enfants (**Tableau II**). De récentes études ont par exemple révélé un taux de portage asymptomatique pouvant atteindre près de 50 % de la population infantile des pays en voie de développement. Dans les pays développés, le portage asymptomatique est moins fréquent mais il demeure néanmoins possible. En France, un taux de portage de 11,6 % a par exemple été observé dans une population pédiatrique de patients immunodéprimés (Frange *et al.*, 2012). Bien que présentant un terrain immunitaire particulier, aucun signe clinique de gastroentérite n'a été observé chez ces enfants. De la même manière en Angleterre, une étude incluant 2 205 individus a retrouvé un portage asymptomatique chez 16,4 % des sujets, avec une prévalence plus importante chez les enfants de 5 ans. Elle dépassait 25 % chez les enfants de moins de 3 ans et était à peine supérieure à 5 % chez les adultes de plus de 35 ans.

**Tableau II : Taux de portage asymptomatique des norovirus observés dans différentes populations à travers le monde, adapté de Robilotti *et al.*, 2015.**

Pays	Population	Taux de portage asymptomatique (%)	Référence
Nicaragua	Enfants	11,7 (19/163)	(Bucardo <i>et al.</i> , 2010)
Mexique	Enfants	49,2 (31/63)	(Garcia <i>et al.</i> , 2006)
Brésil	Enfants	37,5 (21/56)	(Marques M. de O. <i>et al.</i> , 2014)
Burkina Faso	Enfants	24,8 (31/125)	(Huynen <i>et al.</i> , 2013)
France	Enfants immunodéprimés	11,6 (5/43)	(Frange <i>et al.</i> , 2012)
Angleterre	Adultes et enfants	16,4 (362/2205)	(Phillips <i>et al.</i> , 2010)
Corée du Sud	Adultes (manutentionnaires)	1,0 (66/6441)	(Jeong <i>et al.</i> , 2013)
Corée du Sud	Adultes (manutentionnaires)	3,4 (26/776)	(Yu <i>et al.</i> , 2011)

### II.3.3 Contexte épidémiologique

Si les norovirus constituent la cause la plus fréquente de gastroentérites épidémiques, ils sont également une cause non négligeable de gastroentérites sporadiques. A l'origine de 18 % des gastroentérites à travers le monde, soit près de 700 millions de cas annuels (Ahmed *et al.*, 2014; Bartsch *et al.*, 2016; Lopman *et al.*, 2016), les norovirus sont la cause de plus de 200 000 décès chaque année, dont 70 000 surviennent parmi la population pédiatrique des pays en voie de développement (Lanata *et al.*, 2013; Lopman *et al.*, 2015; Patel *et al.*, 2008).

Dans les pays industrialisés, les norovirus sont responsables de plus de la moitié des cas de gastroentérites (**Tableau III**) et de 95 % des gastroentérites non bactériennes (Patel *et al.*, 2009). On recense par exemple aux États-Unis plus de 20 millions de cas annuels qui génèrent près de 2 millions de consultations médicales, 400 000 visites aux urgences et 70 000 hospitalisations. Ces virus y sont responsables chaque année de 600 à 800 décès (Hall *et al.*, 2013) dont 90 % surviennent chez les individus de plus de 65 ans. Ainsi, alors que le taux de décès lié aux norovirus oscille dans la population générale entre 0,2 et 0,4/10 000 habitants, il est 20 fois plus élevé dans la population âgée (Belliot *et al.*, 2014).

En Europe, le nombre total de cas annuel de gastroentérites causées par les norovirus est estimé à 58 millions (Bartsch *et al.*, 2016), engendrant environ 1 800 décès. Parmi eux, environ 15 millions de cas et près de 400 décès sont directement liés à la consommation d'aliments contaminés (World Health Organization, 2015).

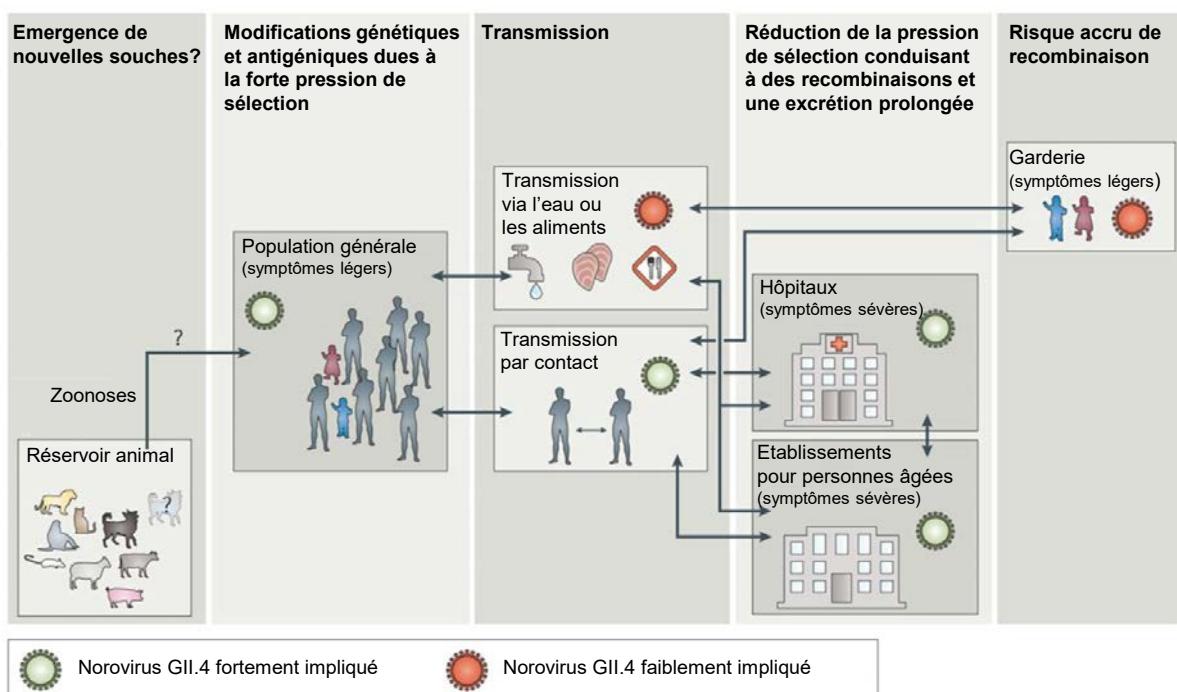
Parmi les différents génogroupes de norovirus pouvant infecter l'Homme, le génogroupe GII est à lui seul responsable de près de 90 % des cas (Bull *et al.*, 2010; Vega *et al.*, 2014) et plus précisément, les souches appartenant au génotype GII.4 sont particulièrement impliquées dans la survenue d'épidémies (**Figure 14**), si bien qu'elles sont parfois associées à de véritables pandémies (Bull *et al.*, 2010; White, 2014).

Alors que le génotype GII.4 est préférentiellement associé à une transmission interindividuelle, les autres génotypes sont plutôt identifiés en cas de transmission via les aliments (Vega *et al.*, 2014). Les virus du génogroupe GI quant à eux sont souvent décrits dans les transmissions liées à l'eau puisque ce génogroupe présenterait une meilleure stabilité dans l'environnement (Lysén *et al.*, 2009; Seitz *et al.*, 2011).

**Tableau III : Prévalence des norovirus dans les épidémies de gastroentérites, d'après Patel *et al.*, 2009.**

Pays	Durée de l'étude (mois)	Méthode de détection	Nombre d'épidémies	Prévalence des norovirus (%)	Référence
Espagne	24	RT-PCR	30	47	(Buesa <i>et al.</i> , 2002)
Suède	48	ME	676	59	(Hedlund <i>et al.</i> , 2000)
Allemagne	48	RT-PCR	544	45	(Ike <i>et al.</i> , 2006)
Royaume-Uni	96	ME	5241	36	(Lopman <i>et al.</i> , 2003)
Hongrie	36	ME et RT-PCR	581	43	(Reuter <i>et al.</i> , 2005)
Pays-Bas	12	RT-PCR	281	55	(van Duynhoven <i>et al.</i> , 2005)

ME = Microscopie électronique



**Figure 14 : Contexte épidémiologique des infections à norovirus, d'après de Graaf *et al.*, 2016.** Le mode de transmission et la pression de sélection exercée sur les virus est variable selon les génotypes. Ainsi, le génotype GII.4, fréquemment impliqué dans les épidémies de gastroentérites, est préférentiellement associé aux transmissions directes, alors que les autres génotypes ou génotypes sont plutôt retrouvés en cas de transmission via les aliments ou l'eau. Dans les structures de soins, la présence du génotype GII.4 et l'excration prolongée des virus par les patients les plus fragiles favorisent l'apparition de mutations génétiques. Enfin, la diversité des autres génotypes dans les garderies augmenterait le risque de recombinaison des virus.

### II.3.3.1 Épidémiologie moléculaire

- **Le génotype GII.4**

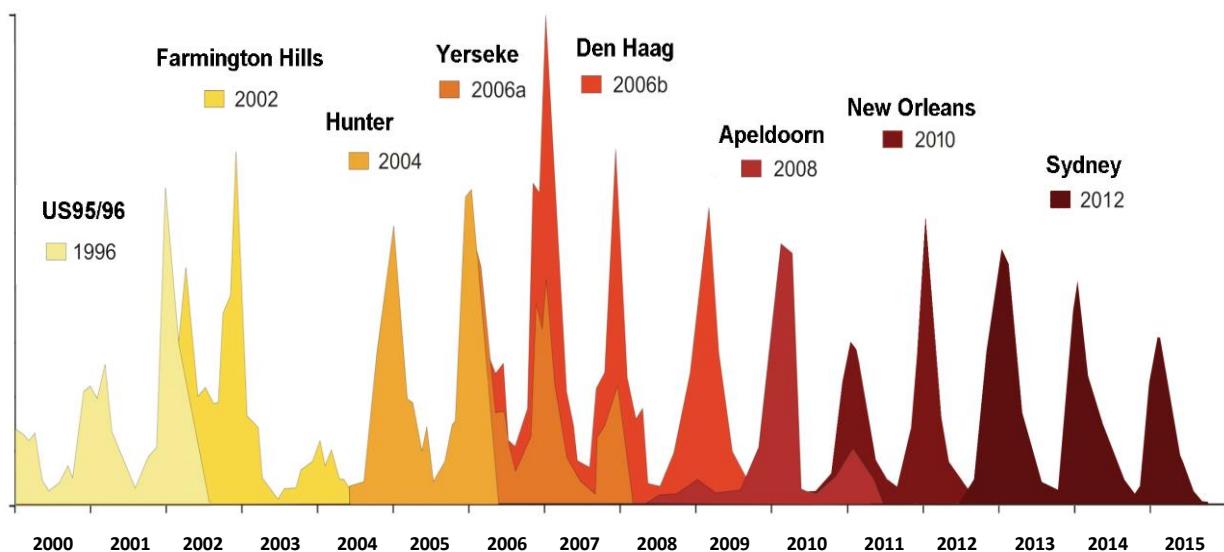
En dépit de la grande diversité génétique résultant du nombre important de mutations et de recombinaisons observées chez les membres du genre *Norovirus*, le génotype GII.4 est responsable à lui seul de près de 80 % des épidémies de gastroentérites causées par les norovirus à travers le monde (Hoa Tran *et al.*, 2013; Noel *et al.*, 1999; Siebenga *et al.*, 2009).

Ce génotype est caractérisé par un phénomène d'échappement à l'immunité collective qui conduit régulièrement à la sélection et à l'émergence de nouvelles souches. Ainsi, tous les 2 ou 3 ans en moyenne, certaines souches du génotype GII.4 se distinguent particulièrement par leur implication dans la survenue d'épidémies.

Ce phénomène d'échappement serait favorisé par un taux d'erreur plus important de l'ARN polymérase, conduisant à l'apparition relativement fréquente de mutations au niveau du génome (Bull *et al.*, 2010). Cette dérive génétique conduit par exemple à une évolution de la protéine majeure de capsid VP1 au rythme de  $10^{-3}$  substitution par nucléotide et par an (Bok *et al.*, 2009a) permettant au virus du génotype GII.4 d'assurer potentiellement de nouvelles interactions avec les récepteurs HBGA (Lindesmith *et al.*, 2008).

Ainsi durant ces dernières années, plusieurs souches ont été remarquables en matière de prévalence (**Figure 15**) et on peut leur attribuer au moins 6 pandémies majeures depuis 1995 (White, 2014).

Au milieu des années 1990, la souche GII.4 US95/96 (Noel *et al.*, 1999; White *et al.*, 2002) a par exemple été à l'origine de plus de la moitié des épidémies de gastroentérites survenues aux États-Unis et de 85 % de celles déclarées aux Pays-Bas (Vinjé *et al.*, 1997). Cette souche a progressivement été remplacée par le variant GII.4 Farmington Hills (Lopman *et al.*, 2004; Widdowson *et al.*, 2004) qui fut responsable de 80 % des épidémies aux États-Unis en 2002. En 2004, la souche GII.4 Hunter (Bull *et al.*, 2006) a ensuite principalement émergé en Europe, en Australie et en Asie. Aux États-Unis et en Europe, la souche GII.4 Den Haag est apparue en 2006 (Eden *et al.*, 2010). Enfin, si la souche GII.4 New Orleans (Yen *et al.*, 2011) était majoritairement rencontrée à partir de 2009, elle fut remplacée par la souche GII.4 Sydney largement rencontrée depuis 2012 (Eden *et al.*, 2014; van Beek *et al.*, 2013).

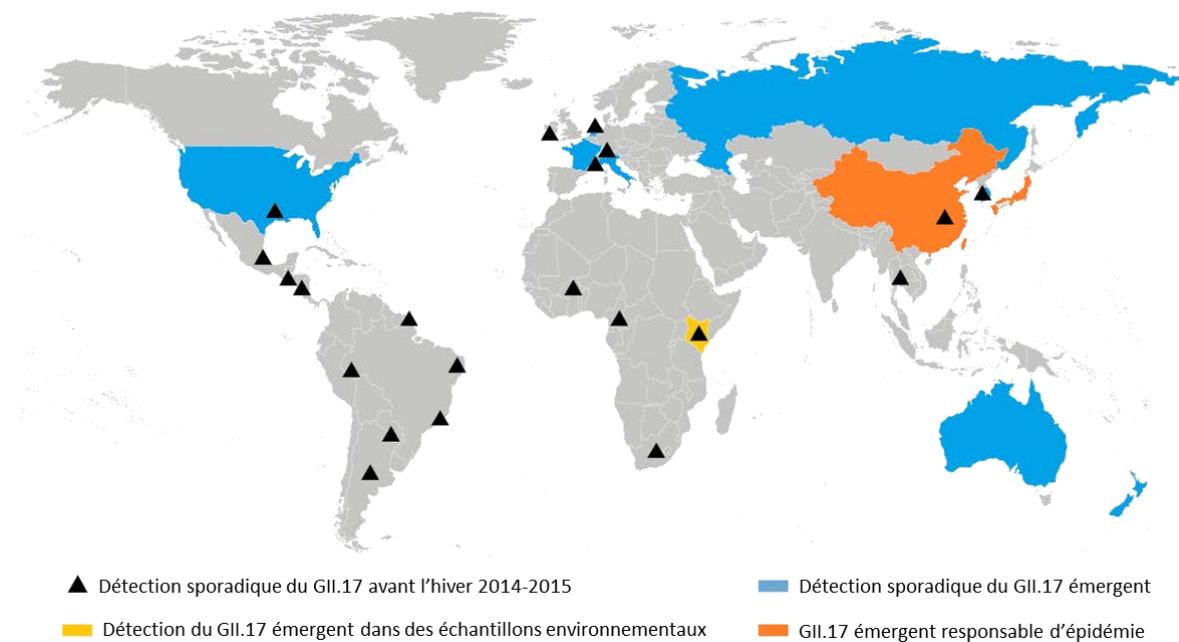


**Figure 15 : Emergence successive des différentes souches de norovirus du génotype GII.4 à l'origine d'épidémies de gastroentérites depuis 2000.** (Document personnel, Dr De Rougemont, CNR virus entériques Dijon, France)

- **Le génotype GII.17**

Alors que la première souche fut isolée en 1978 (Rackoff *et al.*, 2013), le génotype GII.17 n'a globalement été détecté que de manière sporadique à travers le monde durant ces 40 dernières années (Figure 16). L'hiver 2014-2015 a cependant été marqué par une explosion des épidémies causées par ce génotype, survenant principalement en Chine et au Japon. L'incidence de ce génotype émergent fut telle qu'elle était parfois supérieure à celle du génotype GII.4 dans la région concernée (Chen *et al.*, 2015; Fu *et al.*, 2015; Gao *et al.*, 2015; Lu *et al.*, 2015; Matsushima *et al.*, 2015). Durant cette période, le GII.17 a d'ailleurs été responsable d'une augmentation de 35 % des cas de gastroentérites à Pékin (Gao *et al.*, 2015).

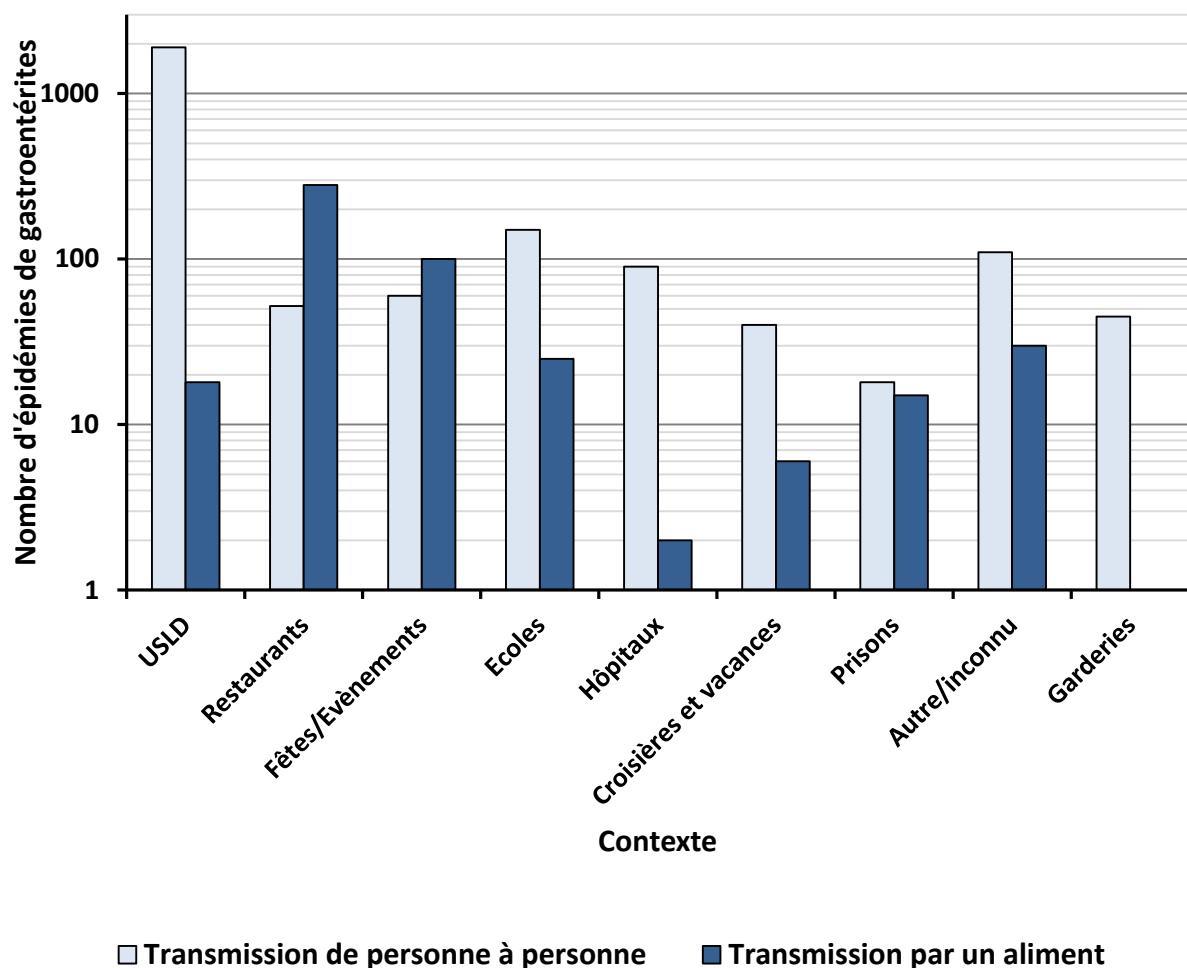
Comme le génotype GII.4, le génotype GII.17 est caractérisé par des mutations fréquentes, survenant en particulier au niveau de la protéine majeure de capsid VP1. Plus fréquentes que celles observées pour le génotype GII.4, ces mutations font de ce dernier un candidat idéal pour échapper à l'immunité collective (Chan *et al.*, 2015). Depuis peu, des souches émergentes ont également été détectées aux États-Unis et en Europe (de Graaf *et al.*, 2015; Medici *et al.*, 2015; Parra & Green, 2015).



**Figure 16 : Détection des norovirus appartenant au génotype GII.17 à travers le monde, de 1978 à 2015, d'après de Graaf et al., 2015.**

### II.3.3.2 Les épidémies de gastroentérites causées par les norovirus

L'excrétion massive de particules virales infectieuses dans les selles est propice à la transmission du virus dans l'entourage des malades. Une transmission secondaire est observée dans environ 30 % des cas (Atmar, 2010) et s'effectue principalement par contact direct entre les individus ou alors par le biais de surfaces souillées. Puisque les cas primaires sont souvent causés par la consommation d'aliments ou d'eaux contaminées, certains environnements sont particulièrement propices à l'explosion des épidémies (**Figure 17**). C'est le cas par exemple des écoles (Daniels et al., 2000), des garderies (Uchino et al., 2006), des bateaux de croisière (Chimonas et al., 2008; Verhoef et al., 2008a), des hôpitaux (Johnston et al., 2007), des restaurants (Koopmans & Duizer, 2004; Vega et al., 2014), ou encore des bases militaires (CDC, 2002a; de Laval et al., 2011; Mayet et al., 2011; Wadl et al., 2010). Des épidémies ont également été décrites dans des camps de réfugiés (Nomura et al., 2008), lors de pèlerinages (Verhoef et al., 2008b) ou encore dans des camps de colonies de vacances (Solano et al., 2014). Tous ces environnements sont caractérisés par une certaine promiscuité entre les individus, le recours à la restauration collective ou encore des difficultés à maintenir un niveau d'hygiène correct.



**Figure 17 : Contexte et nombre d'épidémies de gastroentérites causées par les norovirus déclarées aux États-Unis entre 2009 et 2013, d'après Vega et al., 2014.**  
USLD = Unités de soins de longue durée.

### • Structures de soins

Les norovirus sont fréquemment à l'origine d'épidémies survenant dans les structures de soins (Grima et al., 2009; Leuenberger et al., 2007; Sommer et al., 2009). Ces épidémies peuvent toucher aussi bien les patients que le personnel médical. Elles sont difficiles à éradiquer et leur ampleur entraîne généralement un coût important pour la structure (Belliot et al., 2014). Le virus peut être introduit par le personnel médical (Mattner et al., 2005), par les visiteurs, par des patients infectés avant leur admission, mais aussi via les aliments servis lors de la restauration collective. Dans ce cas, le personnel des cuisines peut être à l'origine de la contamination accidentelle des produits (Pether & Caul, 1983).

Ces épidémies sont particulièrement redoutées puisque la symptomatologie est généralement plus sévère chez les patients fragilisés. Afin d'éviter leur propagation, l'isolement rapide des patients atteints et l'éviction du personnel malade jusqu'à guérison doivent être envisagés. Les norovirus sont en effet une des causes les plus fréquentes de fermeture de services de soins (Hansen *et al.*, 2007).

- **Restaurants et aliments**

Chaque année aux États-Unis, 1 personne sur 6 développerait une gastroentérite d'origine alimentaire et les norovirus seraient à l'origine de plus de la moitié des cas. Certains aliments sont en effet particulièrement associés à leur transmission (**voir chapitre II.6 – Place des norovirus dans les TIAC**).

La contamination des aliments peut avoir lieu dans l'environnement ou durant leur manipulation par des personnes infectées, que ce soit lors de leur transport, leur transformation ou leur distribution. Elle peut également se faire par contact avec des matériaux ou des ustensiles souillés (Rönnqvist *et al.*, 2014).

Aux États-Unis, les TIAC causées par les norovirus sont généralement associées aux plats nécessitant de nombreuses étapes de manipulation, comme les salades ou les sandwiches. Les aliments crus sont particulièrement incriminés (Rönnqvist *et al.*, 2014; Widdowson *et al.*, 2005) et la contamination par les employés est souvent identifiée (CDC, 2011).

- **Ecoles et crèches**

Les écoles et les crèches sont d'autres structures propices à l'explosion des épidémies engendrées par les norovirus (Aldridge *et al.*, 2016; Uchino *et al.*, 2006). Il s'agit en effet de lieux de promiscuité, dont les occupants ont souvent recours à la restauration collective. Par ailleurs, en cas de non-respect des règles d'hygiène, la transmission secondaire par contact direct est particulièrement facilitée.

En cas d'épidémie, les mesures prises afin de limiter la transmission du virus sont généralement la désinfection des locaux et le renforcement des règles d'hygiène classiques. Des mesures de plus grande ampleur sont parfois nécessaires, comme ce fut notamment le cas aux États-Unis où une épidémie a été à l'origine de la fermeture provisoire d'un campus universitaire.

- **Bateaux de croisière**

Les épidémies de gastroentérites survenant lors de croisières sont particulièrement décrites puisque les bateaux représentent un environnement favorable à la transmission du virus (Chimonas *et al.*, 2008; Sasaki *et al.*, 2006; Widdowson *et al.*, 2004). Aux États-Unis, elles font d'ailleurs l'objet d'une surveillance accrue dans le cadre du « *Vessel Sanitation Program* » qui impose à tous les navires de croisière de déclarer au moins 24 heures avant amarrage dans un port le nombre de cas de gastroentérites répertorié à bord (Freeland *et al.*, 2016). Des épidémies touchant près de 75 % des passagers ont parfois été décrites (Bert *et al.*, 2014; Widdowson *et al.*, 2004), pouvant même se propager d'une croisière à l'autre en cas de contamination des membres de l'équipage qui servent alors de réservoir au pathogène (CDC, 2002b).

Des épidémies liées à d'autres moyens de transport ont également été décrites, notamment lors de voyages en avions (Kirking *et al.*, 2010; Kornyllo *et al.*, 2009) ou encore en bus (Beller *et al.*, 1997; Hoefnagel *et al.*, 2012).

- **Bases militaires**

Les épidémies de gastroentérites sont particulièrement redoutées dans les camps militaires (CDC, 2002a; de Laval *et al.*, 2011; Mayet *et al.*, 2011; Wadl *et al.*, 2010). En effet, même si leur symptomatologie est relativement bénigne, elles ont un impact significativement négatif sur le déroulement des opérations militaires (Sanders *et al.*, 2005). En 2009, plus de 6 000 cas de gastroentérites ont été recensés parmi les troupes militaires françaises (Delacour *et al.*, 2010). Parmi les soldats américains présents en Irak ou en Afghanistan entre 2003 et 2004, près de 75 % ont signalé au moins un épisode diarrhéique, la moitié étant suffisamment grave pour nécessiter des soins médicaux. Ces nombreux cas de gastroentérites ont été la cause d'environ 6 visites à l'infirmérie par mois pour 100 soldats. Ils correspondaient à une perte de 13 jours de travail par mois pour 100 soldats (Sanders *et al.*, 2005).

### **II.3.3.3 Les cas sporadiques**

En dehors d'un contexte épidémique, la place que tiennent les norovirus dans la survenue des gastroentérites sporadiques est peu documentée mais elle semble non négligeable (Patel *et al.*, 2009).

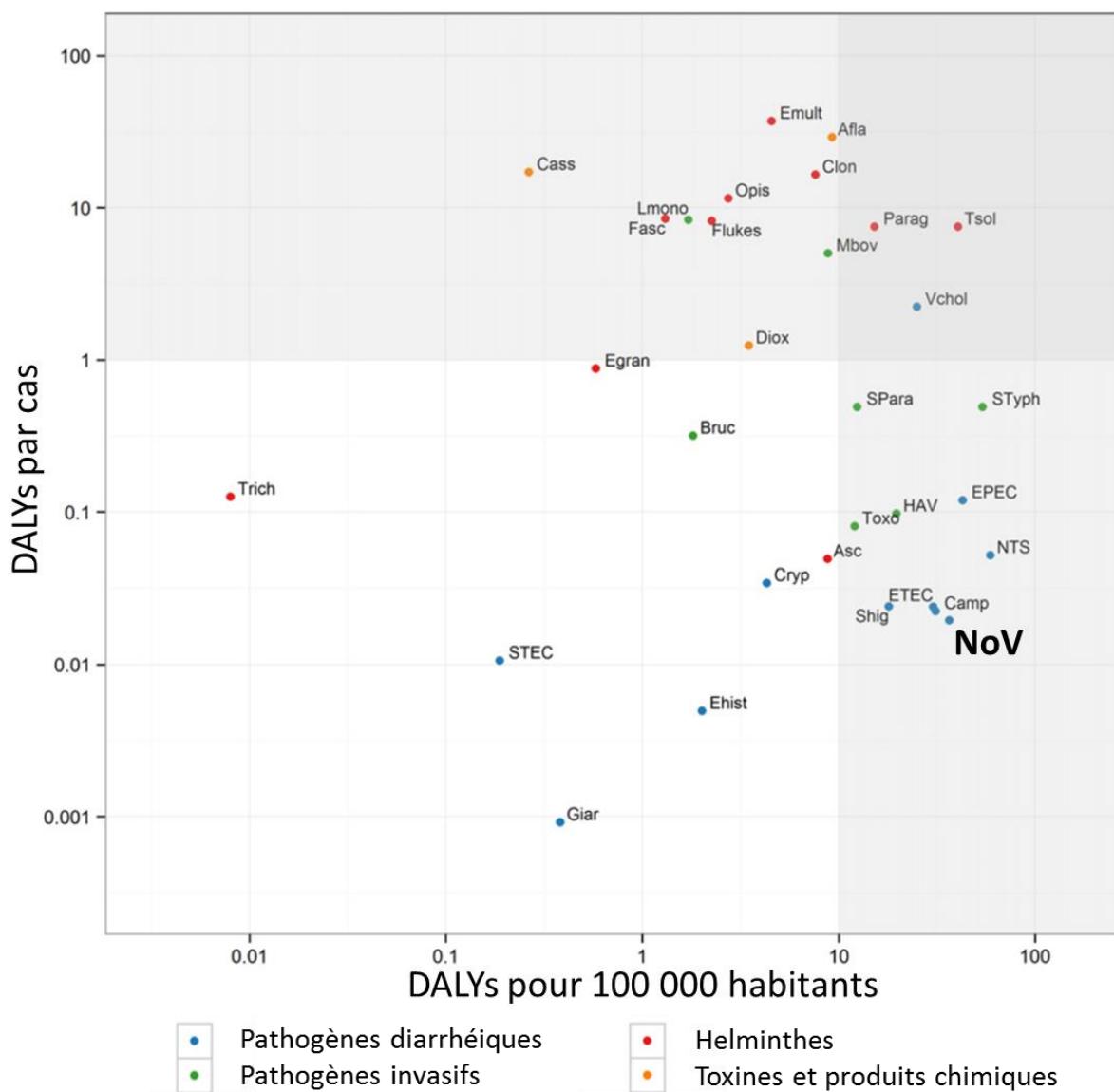
Une étude visant à rechercher par PCR un panel de virus entériques dans des échantillons de selles recueillis au cours de 2 486 cas de gastroentérites sporadiques a par exemple retrouvé des norovirus dans 17 % des prélèvements, alors que seulement un tiers des échantillons était positif pour un virus donné (Pang *et al.*, 2014). De la même manière, une méta-analyse reprenant les données de 31 études évoque que les norovirus seraient à l'origine de 12 % des cas sporadiques (Patel *et al.*, 2008).

#### **II.3.3.4 Aspect économique des gastroentérites causées par les norovirus**

Le nombre important de gastroentérites à travers le monde a pour conséquences de mobiliser des ressources importantes. En effet, même si les norovirus ne sont généralement responsables que de troubles bénins, ils représentent un fardeau économique important à l'échelle d'une société (**Figure 18**).

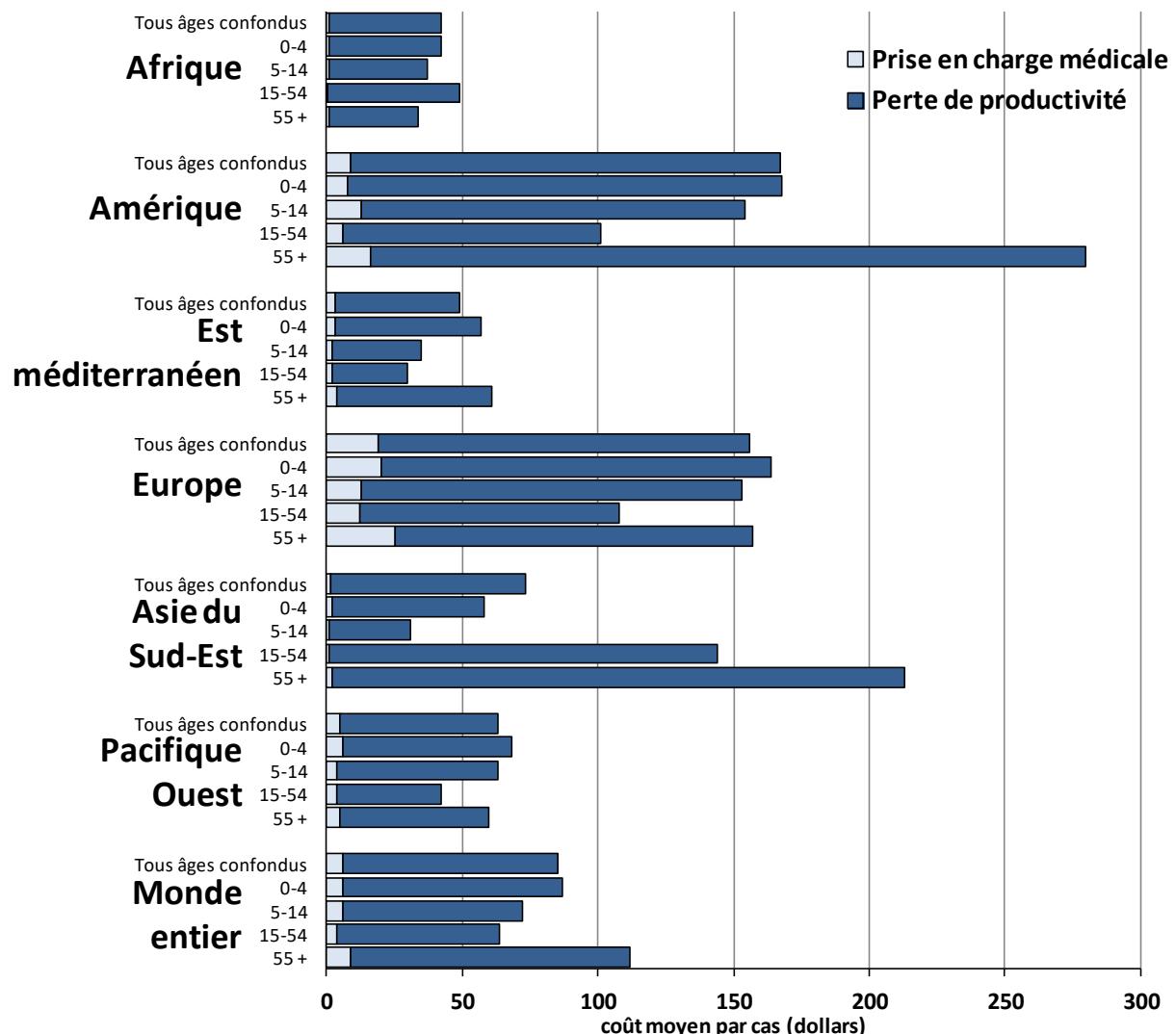
Aux États-Unis, on évalue le coût annuel lié à la prise en charge des TIAC causées par les norovirus à près de 1,8 milliard d'euros (Hoffmann *et al.*, 2012). Ce calcul tient compte à la fois de la prise en charge médicale et du nombre de décès, mais aussi de la baisse de productivité liée aux arrêts de travail. Si l'on considère cette fois la totalité des cas de gastroentérites causées par les norovirus, ce coût est évalué à plus de 20 milliards d'euros (Bartsch *et al.*, 2016). En Europe, il serait de plus de 8 milliards d'euros par an.

Au niveau mondial, on estime ainsi que la perte financière engendrée par les gastroentérites causées par les norovirus est supérieure à 53 milliards d'euros (*i.e.* 3,7 milliards d'euros liés directement à la prise en charge médicale et 50 milliards d'euros liés à la perte de productivité). Rapporté au nombre de cas, le coût moyen de la prise en charge d'une gastroentérite est d'environ 77 euros. Ce coût est très variable selon les zones géographiques avec notamment des disparités concernant les coûts résultant de la prise en charge médicale qui sont plus élevés en Europe et en Amérique (**Figure 19**). Ces coûts sont également plus élevés pour les individus de plus de 55 ans.



**Figure 18 : Charge de morbidité des différentes maladies d'origine alimentaire exprimée pour un cas et pour une population de 100 000 habitants, adaptée de Havelaar et al., 2015. DALY : Disability-Adjusted Life Year = Espérance de vie corrigée de l'incapacité ; il s'agit d'un indicateur permettant d'évaluer la gravité d'une pathologie. Dans le cas des norovirus, alors que le DALY par cas est faible, c'est-à-dire que les infections constituent des pathologies sans gravité, le DALY rapporté à l'échelle d'une population est conséquent, suggérant de l'impact important des norovirus en termes de santé publique.**

**NoV**: norovirus; **Camp**: *Campylobacter* spp.; **EPEC**: *Escherichia coli* entéropathogène; **ETEC**: *E. coli* entérotoxinogène; **STEC**: *E. coli* producteur de shiga toxines; **NTS**: *Salmonella enterica* non Typhi; **Shig**: *Shigella* spp.; **Vchol**: *Vibrio cholerae*; **Ehist**: *Entamoeba histolytica*; **Cryp**: *Cryptosporidium* spp.; **Giar**: *Giardia* spp.; **HAV**: Virus de l'hépatite A; **Bruc**: *Brucella* spp.; **Lmono**: *Listeria monocytogenes*; **Mbov**: *Mycobacterium bovis*; **SPara**: *Salmonella Paratyphi* A; **STyph**: *Salmonella Typhi*; **Toxo**: *Toxoplasma gondii*; **Egran**: *Echinococcus granulosus*; **Emult**: *E. multilocularis*; **Tsol**: *Taenia solium*; **Asc**: *Ascaris* spp.; **Trich**: *Trichinella* spp.; **Clon**: *Clonorchis sinensis*; **Fasc**: *Fasciola* spp.; **Flukes**: Trématodes intestinaux; **Opis**: *Opisthorchis* spp.; **Parag**: *Paragonimus* spp.; **Diox**: Dioxines; **Afla**: Aflatoxines.



**Figure 19 : Coût moyen de la prise en charge médicale et de la perte de productivité lié aux gastroentérites causées par les norovirus, rapporté au nombre de cas par zone géographique et par tranche d'âge, adaptée de Bartsch et al., 2016.** Les 6 zones géographiques sont définies selon la nomenclature utilisée par l'Organisme Mondial de la Santé.

## II.4 Sensibilité aux norovirus

Dès les premières études consistant à inoculer des norovirus à des volontaires sains, une sensibilité variable vis-à-vis de l'infection a été constatée chez les individus (Johnson *et al.*, 1990; Matsui & Greenberg, 1990; Parrino *et al.*, 1977; Wyatt *et al.*, 1974). Il y a 40 ans, Parrino *et al.* ont par exemple observé qu'après inoculation du virus Norwalk à 12 volontaires, seulement 6 d'entre eux ont présenté les symptômes d'une gastroentérite. Lors d'une seconde inoculation réalisée 27 à 42 mois plus tard chez les mêmes individus, les 6 volontaires qui avaient été malades la première fois ont à nouveau développé une gastroentérite, alors que les 6 autres individus restaient insensibles au virus. Enfin, lors d'une 3<sup>ème</sup> inoculation effectuée 4 à 8 semaines plus tard chez les 6 volontaires symptomatiques, seul 1 individu a déclaré la maladie. Ces observations ont donc permis aux auteurs de conclure à l'existence d'une immunité naturelle aux norovirus, mais aussi au développement d'une immunité à court terme en cas de réexposition rapide au pathogène. Ces deux phénomènes, seulement constatés à cette époque, semblent aujourd'hui bien explicables.

### II.4.1 Importance du polymorphisme des HBGA dans l'infection par les norovirus

#### II.4.1.1 Les HBGA

La présence d'« agglutinogènes » à la surface des érythrocytes a été décrite pour la première fois par Landsteiner en 1901, définissant ainsi le système de groupe sanguin ABO qui explique en partie les incompatibilités parfois observées lors de transfusion sanguine (Schwarz & Dorner, 2003). Bien des années plus tard, la large distribution des antigènes A, B et H correspondant au système ABO a été observée au niveau tissulaire (Oriol *et al.*, 1981) au point d'être considérés aujourd'hui comme de véritables antigènes d'histocompatibilité. Ces antigènes sont en effet retrouvés à la surface de nombreux types cellulaires comme l'épithélium respiratoire, les épithéliums digestif et urinaire, mais aussi sous forme libre dans les liquides biologiques (e.g. salive, lait, sang, fluides gastriques) (Marionneau *et al.*, 2001; Ravn & Dabelsteen, 2000). Ces observations ont suggéré de les regrouper avec d'autres antigènes, sous le terme d'antigènes tissulaires de groupes sanguins ou HBGA (*histo-blood group antigens*).

Les HBGA semblent jouer un rôle essentiel dans le processus d'infection des norovirus humains. On sait que dans le corps humain, de nombreux glycanes servent de

récepteurs aux virus pathogènes (Olofsson & Bergström, 2005) comme c'est le cas par exemple de l'héparane sulfate pour l'*Herpes simplex virus* (Shieh et al., 1992) ou des acides sialiques pour l'*Influenza virus* (Suzuki et al., 2000). De la même manière, les norovirus humains présentent une affinité particulière pour certains types d'HBGA.

Les HBGA servant de ligands et de possibles récepteurs aux norovirus sont les antigènes A, B et H ainsi que les antigènes Lewis. C'est deux types de système antigénique sont portés par la même molécule et sont le produit d'une cascade enzymatique. L'expression des HBGA chez l'individu dépend ainsi du polymorphisme des loci *ABO*, *FUT2* et *FUT3* (**Figure 20**).

#### II.4.1.2 Biosynthèse des antigènes A, B, H et Lewis

- **Les chaines précurseurs**

Les antigènes HBGA sont des carbohydrates complexes résultant de l'ajout successif de différents monosaccharides sur la partie terminale de chaines précurseurs présentes à la surface des cellules. Ces chaines précurseurs sont constituées d'un disaccharide lié à un glycolipide, une glycoprotéine ou un sphingolipide. Chez l'Homme, il existe plusieurs types de chaines précurseurs et toutes portent un galactose en position terminale. Parmi elles, deux types sont prédominants : le type 1 [ $\text{Gal}(\beta 1 \rightarrow 3)\text{GlcNac--R}$ ], majoritairement retrouvé à la surface des tissus dérivés de l'endoderme (e.g. épithélium digestif, urinaire, respiratoire) ainsi que dans les fluides de l'organisme et le type 2 [ $\text{Gal}(\beta 1 \rightarrow 4)\text{GlcNac--R}$ ], majoritairement synthétisé à la surface des érythrocytes et de l'endothélium vasculaire.

L'addition des différents monosaccharides conduisant à la synthèse des HBGA à partir des chaines précurseurs est assurée par diverses glycosyltransférases (**Tableau IV**).

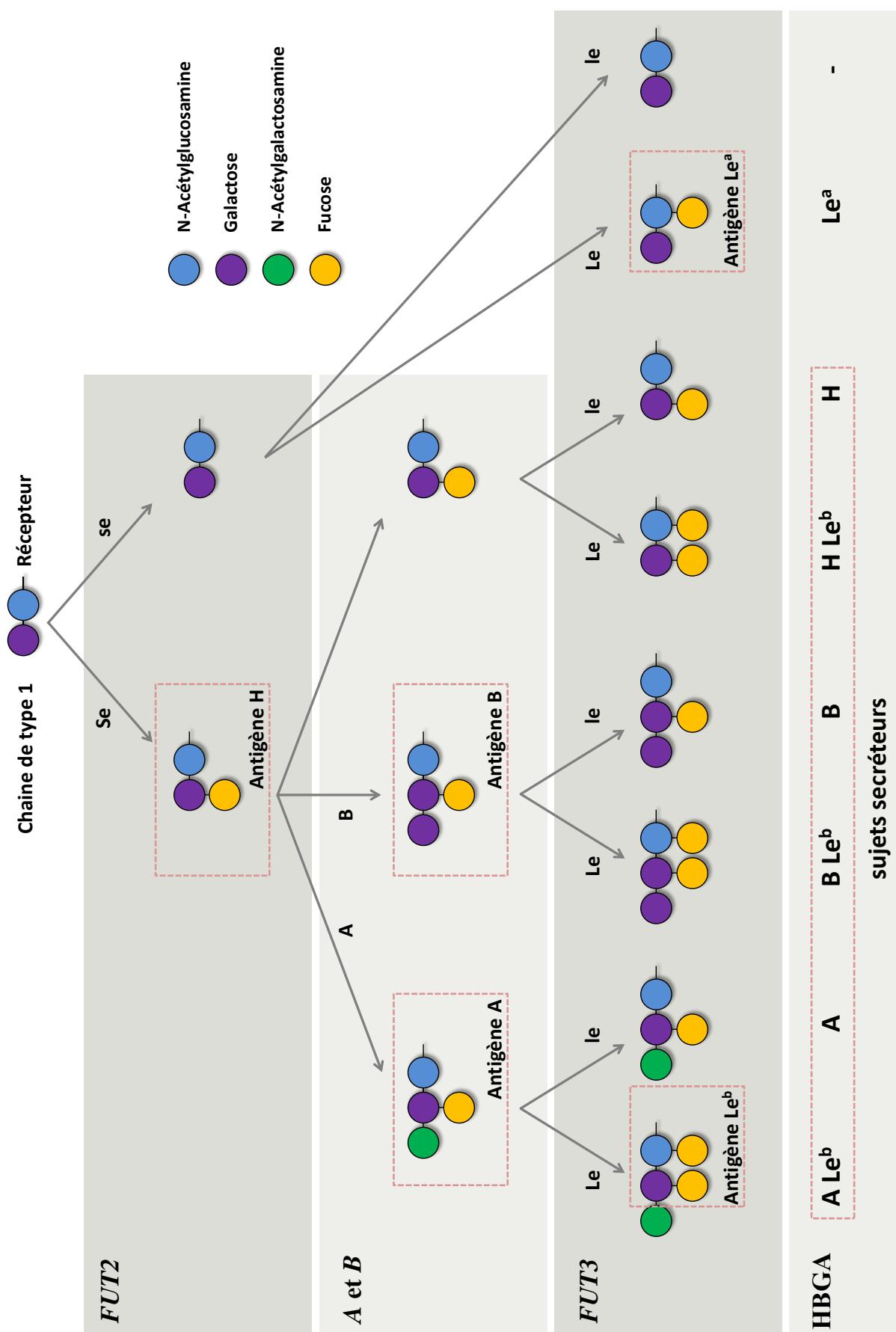


Figure 20 : Voies de synthèse des différents HBGA impliqués dans la reconnaissance des norovirus.

**Tableau IV : Glycosyltransférases impliquées dans la synthèse des antigènes A, B, H et Lewis à partir des chaînes précurseurs.**

Système	Gène	Enzymes	Ose ajouté
H (ISBT018)	<i>FUT1</i> *	$\alpha$ -1-2-L-fucosyltransférase	$\alpha$ -L-Fucose
Se	<i>FUT2</i> **		
ABO (ISBT001)	A	$\alpha$ -N-acétylgalactosaminyltransférase	N-acétylgalactosamine
	B	$\alpha$ -D-galactosyltransférase	D-Galactose
Lewis (ISBT007)	<i>FUT3</i>	$\alpha$ 1,3-4-L-fucosyltransférase	Fucose

ISBT = International Society for Blood Transfusion

\*L'enzyme codée par le gène *FUT1* présente une affinité particulière pour les chaînes précurseurs de type 2 ; elle est donc majoritairement responsable de la synthèse de la substance H au niveau des érythrocytes.

\*\*L'enzyme codée par le gène *FUT2* présente une affinité particulière pour les chaînes précurseurs de type 1 ; elle est donc majoritairement responsable de la synthèse de la substance H au niveau des HBGA (Sarnesto *et al.*, 1992, 1990).

### • Biosynthèse des antigènes H

L'antigène H est le produit d'une réaction enzymatique conduisant à l'ajout d'un fucose sur le galactose terminal d'une chaîne précurseur. Chez l'Homme, cette réaction est catalysée par une  $\alpha$ 1,2-fucosyltransférase, codé soit par le gène *FUT1* (H) ou par le gène *FUT2* (Se) selon la nature de la chaîne précurseur. Chacun des gènes *FUT1* et *FUT2* possède deux allèles, l'un dominant et l'autre récessif, c'est-à-dire non fonctionnel.

Au niveau des érythrocytes, c'est l'enzyme H (gène *FUT1*) présentant une affinité particulière pour les chaînes de type 2 qui intervient. La double présence chez un individu de l'allèle récessif *h* du gène *H* est rare. Ce génotype *h/h* correspond au phénotype Bombay caractérisé par l'absence d'antigène H à la surface des érythrocytes (Bhatia & Sanghvi, 1962; Bhende *et al.*, 1952).

Concernant la synthèse des HBGA, c'est le gène *FUT2* (Se) qui est responsable de la formation de la substance H à partir des chaînes précurseurs de type 1. Chez les individus possédant au moins un allèle fonctionnel, c'est-à-dire les génotypes Se/Se ou Se/se, la présence de l'antigène H au niveau des HBGA conduit au phénotype dit sécréteur. Ce phénotype est caractérisé par la synthèse par les cellules muqueuses d'antigènes solubles retrouvés dans les liquides biologiques. La double présence de l'allèle récessif du gène

*FUT2* chez un individu correspond au phénotype non-sécréteur (génotype *se/se*). Contrairement au phénotype Bombay (*i.e.* absence de substance H au niveau des érythrocytes), les individus non-sécréteurs sont relativement fréquents puisque la prévalence mondiale est d'environ 20 % (Koda *et al.*, 2001). Dans la population caucasienne, la mutation non-sens G428A correspondant à la formation prématuée d'un codon stop est dans la plupart des cas à l'origine de l'allèle récessif *se*. Dans la population asiatique, c'est la mutation A385T qui est principalement retrouvée (Koda *et al.*, 2001).

Qu'il soit présent à la surface des érythrocytes ou alors sur les chaînes précurseurs de type 1 des autres types cellulaires, l'antigène H est le substrat des enzymes A et B du système ABO.

- **Biosynthèse des antigènes A, B et H**

Les gènes *A* et *B* sont codominants, c'est-à-dire qu'ils sont capables de s'exprimer simultanément chez un individu. Les enzymes correspondant à l'expression de chacun des gènes, une  $\alpha$ 1,3-N-galactosaminyltransférase et une  $\alpha$ 1,3-galactosyltransférase, assurent respectivement l'ajout d'un N-acétylgalactosamine ou d'un second galactose sur le galactose de l'antigène H. Ainsi, en l'absence des enzymes A et B, seul l'antigène H est exprimé à la surface des érythrocytes, ce qui conduit au phénotype O.

Ces deux enzymes interviennent de la même manière dans la voie de synthèse des HBGA, permettant l'expression des antigènes A et B au niveau des autres cellules de l'organisme ainsi que dans les sécrétions. En leur absence, seul l'antigène H est présent dans les fluides biologiques des individus, à condition qu'ils soient sécréteurs.

- **Biosynthèse des antigènes Lewis**

Le système Lewis est régi par le gène *FUT3* (*LE*). Il code une fucosyltransférase qui assure l'ajout d'un fucose au niveau du N-acétylglucosamine des chaînes précurseurs. Ce gène existe également sous la forme de deux allèles, l'allèle Le dominant et l'allèle le récessif. À la différence des enzymes A, B, et H, l'enzyme LE n'intervient pas directement au niveau des précurseurs greffés sur les cellules. Elle produit essentiellement des substances hydrosolubles présentes dans le plasma et les sécrétions qui seront par la suite adsorbées sur les chaînes glucidiques au niveau des cellules.

Lors de la synthèse des HBGA, si le substrat de l'enzyme LE est une chaîne précurseur de type 1 nue, c'est-à-dire dépourvue de substance H (*i.e.* phénotype non-sécréteur) et donc *a fortiori* d'antigène A ou B, l'ajout d'un fucose conduira alors à l'antigène Le<sup>a</sup>. Chez les individus sécréteurs, l'ajout d'un fucose au niveau de la substance H, qu'elle soit préalablement associée à l'antigène A, B ou non, conduit à la formation de l'antigène Le<sup>b</sup>. L'antigène Le<sup>b</sup> est donc le produit de l'action séquentielle des enzymes SE et LE.

Dans la population caucasienne, la prévalence de l'antigène Le<sup>a</sup> est d'environ 20 % alors que l'antigène Le<sup>b</sup> est retrouvé chez 70 % des individus.

#### II.4.1.3 Interaction entre les norovirus humains et les HBGA

L'étude des interactions entre les HBGA et les norovirus humains a été motivée suite à une découverte concernant le virus responsable de la maladie virale hémorragique du lapin (*rabbit haemorrhagic disease virus*, RHDV). Des chercheurs ont en effet observé que le RHDV, également membre de la famille des *Caliciviridae*, utilisait les antigènes de type H comme récepteur pour infecter sa cellule hôte et qu'il était également capable d'agglutiner les érythrocytes humains exprimant ce même antigène (Ruvoën-Clouet *et al.*, 2000). Suite à ces observations, et puisque les deux virus appartiennent à la même famille, Marionneau *et al.* ont étudié de plus près les norovirus et ont démontré qu'ils étaient eux aussi capables d'interagir avec ces récepteurs présents dans la salive ou au niveau du tractus digestif de l'Homme (Marionneau *et al.*, 2002). Cette découverte est à l'origine de nombreux travaux initiés afin de mieux comprendre la relation entre les norovirus humains et les HBGA.

Depuis, les observations faites lors de tests d'inoculation ou au cours d'épidémies de gastroentérites ont par exemple révélé un lien entre le polymorphisme des HBGA exprimés chez les individus et leur sensibilité à l'infection, pouvant conduire parfois à une résistance naturelle vis-à-vis du virus (Hutson *et al.*, 2005, 2002, Lindesmith *et al.*, 2005, 2003; Thorven *et al.*, 2005). A titre d'exemple, on a observé que lors d'une exposition au virus Norwalk (génotype GI.1), les individus non-sécréteurs, c'est-à-dire dépourvus d'un gène *FUT2* fonctionnel, ne développaient pas les symptômes de la maladie, et on n'observait pas de réponse immunitaire ou d'excrétion de génome viral dans leurs selles (Hutson *et al.*, 2005; Lindesmith *et al.*, 2005). A l'inverse, tous les individus présentant des symptômes étaient de statut sécréteur. En plus de l'importance du polymorphisme du gène *FUT2* vis-à-vis des infections, ces études ont également révélé que les individus appartenant au groupe sanguin B étaient moins sévèrement infectés que ceux appartenant aux groupes sanguins A ou O (Hutson *et al.*, 2005, 2002). La protection apportée par le statut non-sécréteur vis-à-vis des

norovirus a également été observée lors d'épidémies engendrées par le virus Lordsdale, appartenant au génotype GII.4 (Thorven *et al.*, 2005).

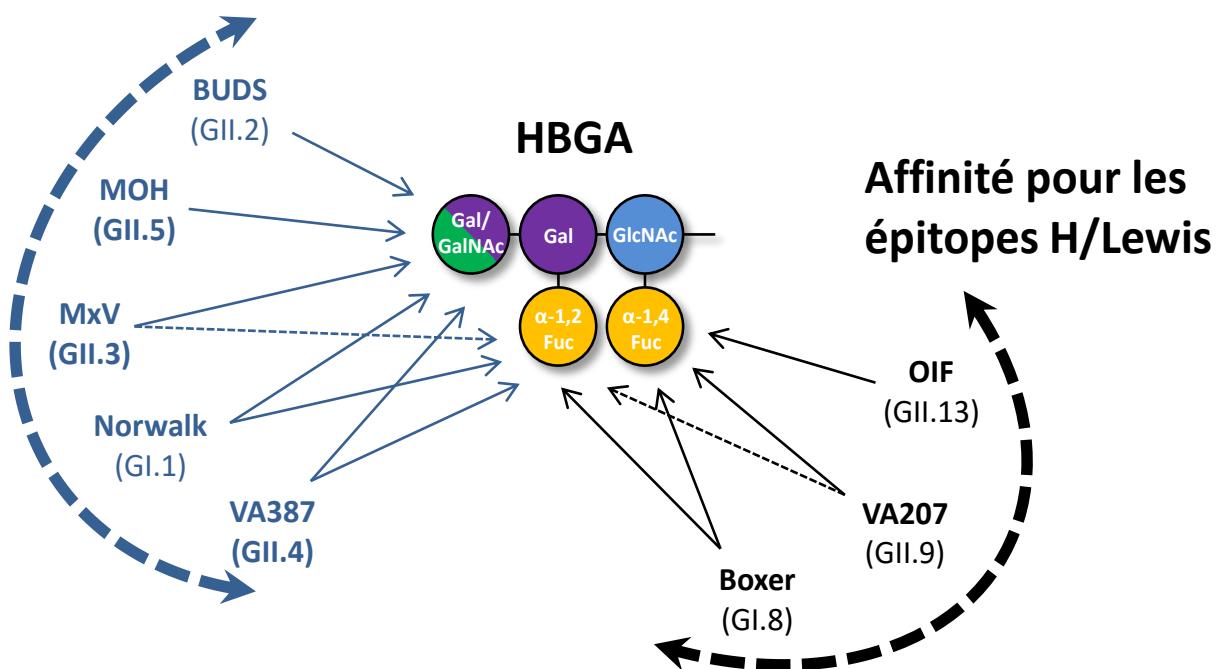
Les interactions entre les différents génotypes de norovirus et les HBGA ont également largement été étudiées *in vitro*, lors d'essais utilisant des HBGA salivaires, des HBGA synthétiques ou encore par des techniques d'hémagglutination (Debbink *et al.*, 2012; Donaldson *et al.*, 2010; Harrington *et al.*, 2004, 2002; Huang *et al.*, 2005; Karst, 2010; Le Pendu *et al.*, 2006; Tan & Jiang, 2010).

On sait aujourd'hui que l'interaction entre les norovirus et les HBGA implique le domaine P2 de la protéine majeure de capsid VP1 (Ruvoën & Le Pendu, 2013; Tan & Jiang, 2005a). Ces essais ont également permis de démontrer que le virus Norwalk avait une affinité particulière pour les épitopes A et H des individus sécréteurs mais qu'ils ne se fixaient pas aux HBGA présentant l'épitope B (Huang *et al.*, 2003). Ces résultats concernant la protection apportée par l'antigène B concordent donc avec les observations faites auparavant lors des essais *in vivo*. Certains auteurs expliquent ce phénomène par le masquage de la substance H lorsque l'antigène B est présent (Le Pendu *et al.*, 2006).

En se basant sur ces observations, certains auteurs ont classé les norovirus selon leur affinité pour les HBGA (Huang *et al.*, 2005). On peut ainsi distinguer les virus ayant une affinité pour les épitopes A et/ou B ainsi que pour la substance H mais ne présentant pas d'affinité pour la substance Lewis, et les virus présentant une affinité pour la substance Lewis ou H mais pas pour les épitopes A et B (**Figure 21**). Notons que selon cette classification, aucun lien n'existe entre le profil de fixation des différentes souches et leur classification génétique. En effet, certaines souches appartenant à un même génogroupe voire à un même génotype peuvent présenter des affinités très différentes pour les HBGA (Huang *et al.*, 2005).

Dans l'état actuel des connaissances, il apparaît que globalement les virus appartenant au génotype GII.4 reconnaissent le plus large spectre d'HBGA, ce qui explique leur forte prévalence en termes d'épidémiologie. Par ailleurs, alors que le statut non-sécréteur est très souvent associé à une immunité face aux norovirus, des cas de gastroentérites causées par des virus du génotype GII.4 ont cependant été rapportés chez ce type d'individu (Carlsson *et al.*, 2009; Nordgren *et al.*, 2013). Enfin, alors que certaines souches ne semblent pas présenter d'affinité particulière pour un type d'HBGA, pour d'autres, des résultats variables sont parfois observés (Donaldson *et al.*, 2010; Huang *et al.*, 2005, 2003; Tan *et al.*, 2008; Tan & Jiang, 2005b).

## Affinité pour les épitopes A/B/H



**Figure 21 : Modèle schématique présentant les interactions entre différentes souches de norovirus humains et les récepteurs HBGA, adaptée de Tan & Jiang, 2010.** Les flèches en pointillés indiquent des interactions plus fragiles entre le virus et le récepteur.

## II.4.2 Réponse immunitaire et vaccination

Lors des premiers essais visant à évaluer la réponse immunitaire résultant de l'exposition au virus Norwalk, les chercheurs ont observé avec étonnement que la présence préalable d'anticorps sériques dirigés contre le virus ne conférait pas aux individus une résistance à l'infection. Ils ont constaté au contraire que les infections étaient plus fréquentes chez les individus présentant initialement une forte charge d'anticorps (Blacklow *et al.*, 1979; Donaldson *et al.*, 2010; Johnson *et al.*, 1990). Ce phénomène peu explicable à l'époque apparaît aujourd'hui tout à fait logique, compte tenu de la prédisposition de certains individus à l'infection. Ainsi, la présence d'anticorps sériques chez un individu pourrait signifier une sensibilité accrue à une souche de norovirus donnée et inversement.

En dépit des phénomènes de résistance naturelle liés au polymorphisme des HBGA, la forte diversité antigénique des norovirus fait que globalement, la plupart des individus seront infectés au cours de leur vie. En effet, alors qu'une séroconversion est déjà observée chez la moitié des enfants de moins de 5 ans, les données épidémiologiques révèlent que presque tous les individus sont séropositifs à l'âge adulte (Cubitt *et al.*, 1998; Donaldson *et al.*, 2010; Hinkula *et al.*, 1995; Jing *et al.*, 2000; Parker *et al.*, 1995).

Ces différents travaux ont également permis d'observer la mise en place d'une immunité adaptative après exposition, assurant une protection contre une souche donnée pendant une période de 8 semaines à 6 mois (Johnson *et al.*, 1990; Parrino *et al.*, 1977). En revanche, il semblerait qu'il n'existe pas d'immunité à long terme et qu'une réinfection par la même souche est possible après 2 à 3 années (Glass *et al.*, 2009; Karst, 2010; Le Pendu *et al.*, 2006; Parrino *et al.*, 1977).

Ainsi, la diversité des souches virales associée à l'absence d'immunité à long terme sont les deux contraintes majeures à la mise au point d'un vaccin efficace contre les norovirus. Des essais cliniques sont néanmoins réalisés dans ce but, notamment afin d'évaluer l'immunité apportée par l'administration de VLPs de norovirus par voie intranasale ou intramusculaire (Atmar *et al.*, 2011; Baehner *et al.*, 2016; Bernstein *et al.*, 2015; Riddle & Walker, 2016). Les VLPs utilisées dans ce contexte sont généralement dérivées du virus Norwalk ou résultent d'un consensus de plusieurs variants de virus du génotype GII.4. Les premiers résultats de ces études sont variables. En effet, si une réponse immunitaire est souvent observée et que suite à une exposition au virus, le nombre de cas de gastroentérites est plus faible dans le groupe vacciné par rapport au groupe placebo, la protection apportée par la vaccination semble modérée, limitant surtout la sévérité des symptômes.

On considère néanmoins qu'un vaccin efficace dans seulement 50 % des cas et qui apporterait une immunité pendant une période de 12 mois seulement présenterait déjà un intérêt économique (Robilotti *et al.*, 2015). Enfin, compte tenu des caractéristiques particulières des norovirus, il semble que la mise au point d'un vaccin multivalent qui bénéficierait d'une reformulation régulière à l'image du vaccin antigrippal soit la stratégie la plus adaptée (Glass *et al.*, 2009; Robilotti *et al.*, 2015).

## II.5 Diagnostic des infections à Norovirus

Puisque les gastroentérites engendrées par les norovirus sont dans la plupart des cas bénignes et que leur prise en charge ne nécessite généralement pas de traitement spécifique, le diagnostic de ces infections ne semble pas être une étape primordiale pour assurer la bonne prise en charge des patients. Il présente toutefois plusieurs intérêts.

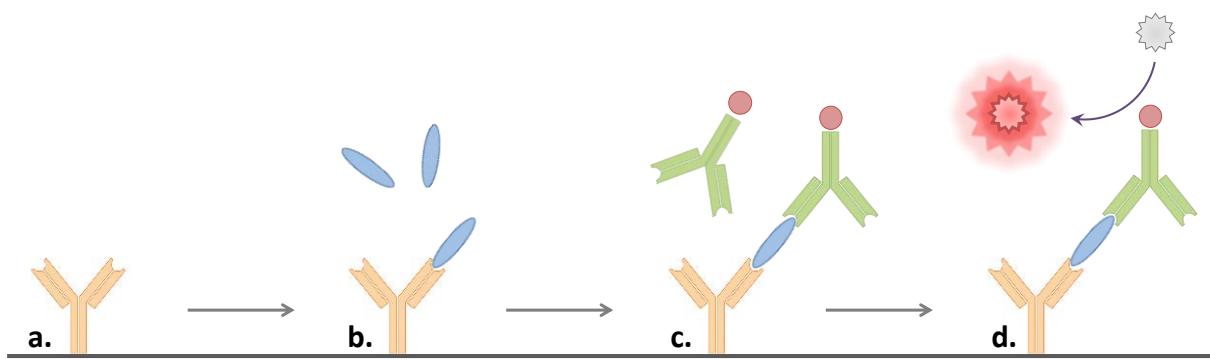
La recherche des norovirus permet par exemple de confirmer l'étiologie virale d'une gastroentérite et participe ainsi à la lutte contre l'utilisation inappropriée des antibiotiques. Elle est également très utile en cas de TIAC, puisqu'elle permet de confirmer le lien entre un aliment et une épidémie. Dans ce cas, il est généralement nécessaire de séquencer le génome des virus isolés chez les patients afin de les comparer à ceux retrouvés dans l'aliment en question.

La détection des norovirus est réalisée dans les selles des patients puisqu'ils y sont généralement présents en forte concentration. Alors que la microscopie électronique a historiquement été utilisée pour observer le virus Norwalk, de nombreuses nouvelles méthodes sont aujourd'hui disponibles pour leur recherche. Parmi elles, les méthodes immunologiques et moléculaires sont largement utilisées du fait de leur simplicité, leur coût relativement faible et leur bonne reproductibilité.

### II.5.1 Méthodes immunologiques

Les méthodes immunologiques s'appuient sur la reconnaissance spécifique entre un antigène et un anticorps. Parmi ces méthodes, la technique ELISA (*Enzyme-linked ImmunoSorbent Assay*) de type sandwich est largement utilisée (de Bruin *et al.*, 2006; Jiang *et al.*, 2000; Kirby *et al.*, 2010). Cette technique est basée sur la capture des antigènes de norovirus par des anticorps spécifiques liés à un support, qui seront ensuite révélés par un second anticorps marqué (**Figure 22**).

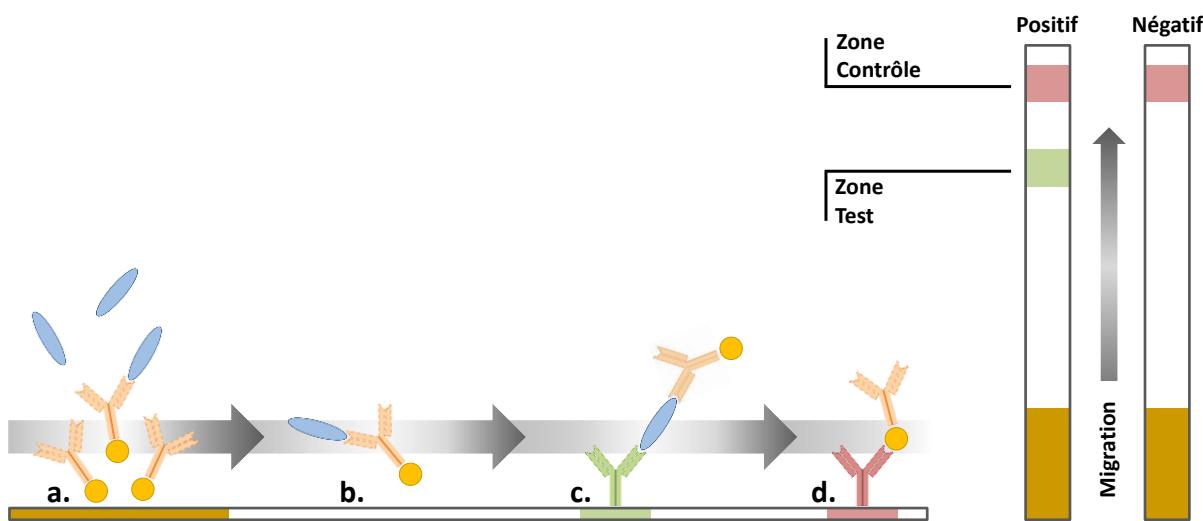
Actuellement, plusieurs kits commerciaux utilisant cette technique permettent la détection simultanée des norovirus des génogroupes GI et GII dans les selles. Leur sensibilité et leur spécificité est cependant variable en fonction de la charge virale et du génogroupe en question (Burton-MacLeod *et al.*, 2004; Robilotti *et al.*, 2015; Vinjé, 2015). Aussi, en cas de résultat négatif, une seconde analyse par une autres techniques est vivement recommandée (de Bruin *et al.*, 2006; Gray *et al.*, 2007; Kele *et al.*, 2011; Patel *et al.*, 2009).



**Figure 22 : Technique ELISA de type sandwich utilisée pour détecter les antigènes des norovirus.** a. La plaque est fonctionnalisée avec des anticorps de capture capables de reconnaître spécifiquement certains antigènes des norovirus. b. Lorsque l'échantillon est ajouté, les antigènes de norovirus éventuellement présents se lient aux anticorps fixés. Les antigènes non liés sont ensuite éliminés par lavage. c. Des anticorps secondaires conjugués à une enzyme sont ajoutés, ils reconnaissent un autre épitope de l'antigène du virus. Les anticorps non liés sont éliminés par lavage. d. Un substrat convertible en un produit détectable est ajouté. La détection d'un signal signifie donc que des antigènes de norovirus sont présents dans l'échantillon analysé.

En parallèle des techniques ELISA, des tests immunochromatographiques sont également utilisés (Bruins *et al.*, 2010). Ces tests qui se présentent sous la forme de bandelettes de nitrocellulose offrent l'avantage de rendre un résultat très rapide, en moins de 20 minutes. Après la mise en contact de l'échantillon avec des anticorps spécifiques marqués, les complexes antigènes-anticorps formés vont migrer par capillarité le long de la bandelette sur laquelle est fixé un second anticorps. La fixation du complexe antigène-anticorps à son niveau se traduit alors par l'apparition d'une ligne colorée (Figure 23). Là encore, la sensibilité de ces techniques est variable selon le génotype considéré (Vinjé, 2015).

De manière générale, l'utilisation d'approches immunologiques pour la détection des norovirus est rendue difficile par la diversité et la dérive antigénique des souches. De ce fait, afin d'élargir le spectre de détection de ces méthodes, l'utilisation d'anticorps monoclonaux capables d'effectuer des réactions croisées avec différents antigènes ou encore l'utilisation d'anticorps polyclonaux est vivement recommandée lors de l'élaboration de ces techniques (Kirby & Iturriza-Gomara, 2012; Vinjé, 2015).



**Figure 23 : Fonctionnement des tests immunochromatographiques utilisés pour la détection des antigènes de norovirus.** a. Les antigènes présents dans l'échantillon forment un complexe avec des anticorps spécifiques marqués. b. Les complexes antigènes-anticorps migrent par capillarité le long de la membrane. c. Au niveau de la zone de test, les complexes antigènes-anticorps sont capturés par un second anticorps spécifique, révélant un test positif. d. L'excédent d'anticorps est capturé au niveau de la zone de contrôle, permettant de confirmer le bon fonctionnement du test.

## II.5.2 Méthodes moléculaires

A la différence des techniques immunologiques, les approches moléculaires reposent sur la recherche du génome d'un virus dans un échantillon. Dans ce type d'approche, la PCR (*polymerase chain reaction*) est la méthode de référence. Cette technique est en effet largement utilisée pour détecter de nombreux pathogènes dans différents types de prélèvements, qu'ils s'agissent d'échantillons cliniques ou de prélèvements environnementaux. Elle repose sur l'amplification successive *in vitro* d'un fragment d'ADN viral présent initialement en faible quantité dans un échantillon, jusqu'à permettre sa détection.

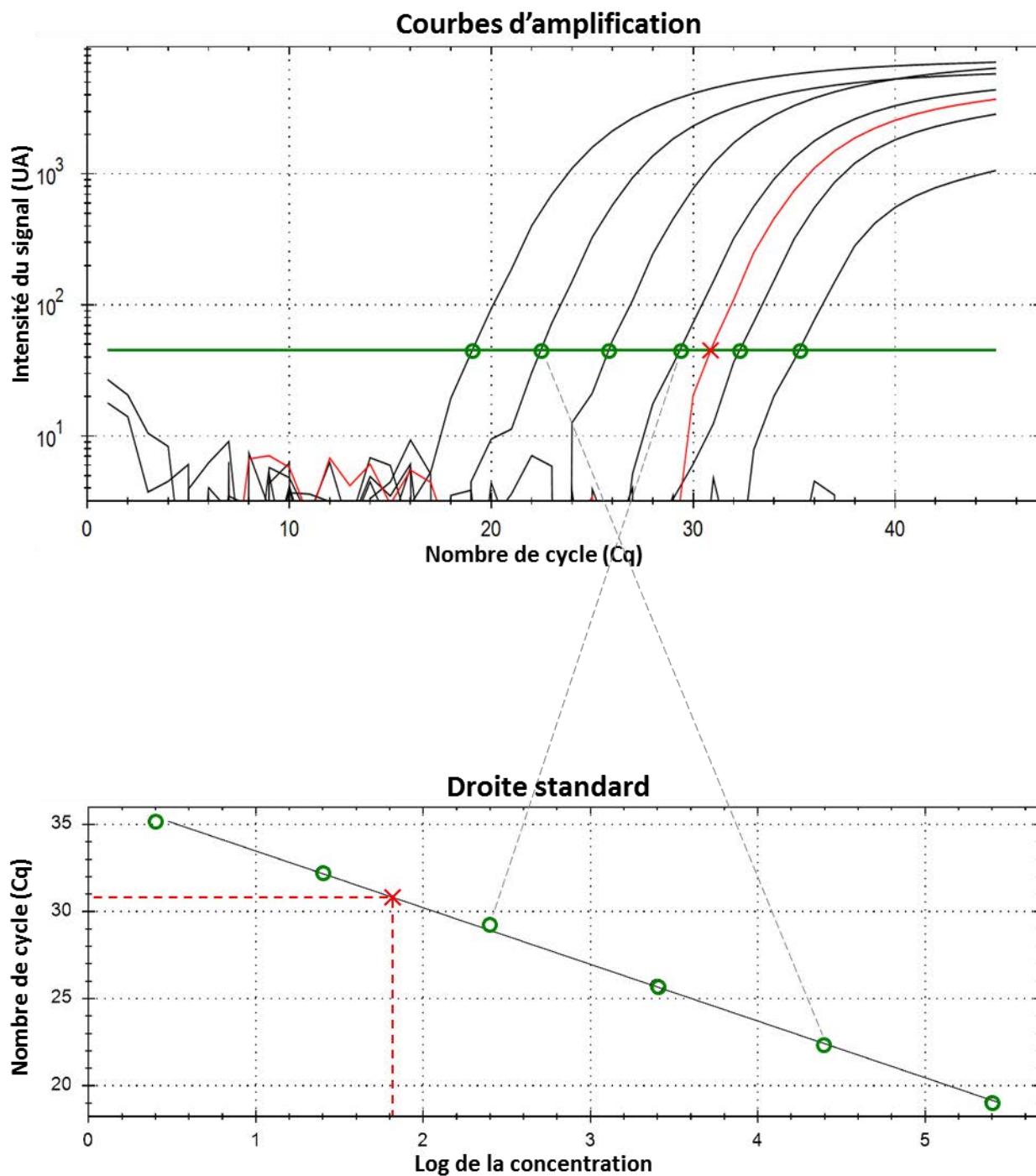
La PCR nécessite l'utilisation de deux amores sens et antisens qui définissent la région du génome à amplifier ainsi que d'une polymérase thermostable qui assure la synthèse des fragments de génome appelés amplicons. Concernant la recherche des norovirus, et puisqu'il s'agit de virus à ARN, une étape préalable de transcription inverse (RT, *reverse*

*transcription)* doit d'abord être effectuée afin de synthétiser un ADN complémentaire (ADNc) du brin d'ARN, qui servira ensuite de matrice pour la synthèse des amplicons.

Après la transcription inverse, chaque cycle de PCR est constitué de trois étapes définies par des températures différentes. Dans un premier temps, une étape de chauffage à 95°C permet de dénaturer l'ADN afin de séparer les deux brins qui le composent. La seconde étape est généralement réalisée autour de 60°C, la température étant dépendante des séquences des amorces utilisées. Elle permet l'hybridation des deux amorces au niveau du génome. Enfin, une dernière étape permet l'elongation des amplicons à partir des amorces sous l'action de la polymérase. Là encore, la température est dépendante de la nature de la polymérase utilisée. Puisque les amplicons générés à chaque cycle sont à leur tour utilisés comme matrice pour les cycles suivants, leur quantité croît de manière exponentielle au cours de la réaction.

Au cours des années 1990, le séquençage complet du génome du virus Norwalk (Jiang *et al.*, 1990) a permis le design des premières amorces utilisées pour la détection du génome des norovirus par RT-PCR. Ces amorces ciblaient généralement un fragment du gène codant la polymérase du virus (De Leon *et al.*, 1992; Green *et al.*, 1993; Jiang *et al.*, 1992a; Moe *et al.*, 1994). Si par la suite les séquences d'autres norovirus ont été prises en compte lors du design des amorces afin d'augmenter le spectre de détection de la technique (Ando *et al.*, 1995; Le Guyader *et al.*, 1996; Lees *et al.*, 1995), les PCR les plus récentes tendent à cibler une région hyper conservée de la jonction entre l'ORF1 et l'ORF2 (Hymas *et al.*, 2007; Kageyama *et al.*, 2003; Kirby & Iturriza-Gomara, 2012; Mohamed *et al.*, 2006; Pang *et al.*, 2005; Vega *et al.*, 2011).

Une fois les cycles d'amplification achevés, la détection des amplicons peut se faire par divers moyens. A l'origine, les techniques de RT-PCR en point final nécessitaient de vérifier la formation des amplicons par migration du produit de PCR par électrophorèse sur un gel d'agarose. Les récentes techniques de RT-PCR en temps réel (RT-qPCR) permettent aujourd'hui de suivre leur formation à chaque cycle d'amplification. Ces techniques présentent donc l'avantage d'être quantitatives, puisque le nombre de cycles nécessaires à la synthèse d'une quantité suffisante d'amplicons permettant leur détection est fonction de la quantité de génome initialement présente (**Figure 24**). La quantification des amplicons peut se faire en utilisant des agents intercalants de type SYBR-Green (Miller *et al.*, 2002; Pang *et al.*, 2004), des sondes d'hydrolyse (Hoehne & Schreier, 2006; Kageyama *et al.*, 2003; Rolfe *et al.*, 2007), ou encore des sondes d'hybridation (Hymas *et al.*, 2007) qui fourniront un signal d'intensité proportionnelle au nombre d'amplicons.



**Figure 24 : Principe de la PCR en temps réel (qPCR).** La technique de PCR en temps réel est basée sur le suivi en continu de la fluorescence émise par les amplicons néoformés. Il existe une relation linéaire entre le logarithme de la quantité de matériel génétique cible initialement présente dans l'échantillon et le nombre de cycle d'amplification (Cq) nécessaire à l'obtention d'un signal d'intensité supérieure au bruit de fond. Ainsi la réalisation d'une gamme étalon contenant des quantités connues de matériel génétique cible (noir) permet la réalisation d'une droite standard (i.e. Cq en fonction du logarithme de la concentration) qui sera alors utilisée pour quantifier l'échantillon (rouge).

De cette manière, en associant différents couples d'amorces et de sondes, les techniques de PCR peuvent également être mises en œuvre pour assurer la détection simultanée des différents génogroupes de norovirus dans un échantillon (i.e. multiplexage) (Farkas *et al.*, 2015; Hoehne & Schreier, 2006; Pang *et al.*, 2005).

Par ailleurs, puisque la PCR est souvent la technique de référence lorsqu'il s'agit de rechercher des pathogènes dans les selles, plusieurs kits ont été développés afin de permettre la détection simultanée de plusieurs microorganismes (Binnicker, 2015; Duong *et al.*, 2016; Navidad *et al.*, 2013; Reddington *et al.*, 2014). Leur utilisation combine généralement les étapes d'extraction et de purification des acides nucléiques, ainsi que l'amplification des génomes par (RT-)PCR multiplex et la détection des amplicons par hybridation ou par fusion. Certains kits permettent par exemple de rechercher jusqu'à 22 pathogènes différents (i.e. virus, bactéries et parasites), incluant évidemment les norovirus.

Enfin, en parallèle des techniques de PCR, des méthodes permettant une amplification isotherme des génomes sont parfois appliquées à la recherche des norovirus. La technique NASBA (*Nucleic acid sequence-based amplification*) (Compton, 1991; Deiman *et al.*, 2002; Patterson *et al.*, 2006) et la technique LAMP (*Loop-mediated isothermal amplification*) (Fukuda *et al.*, 2006; Luo *et al.*, 2014; Yaren *et al.*, 2016) en sont deux exemples.

## **II.6 Place des norovirus dans les TIAC**

Au niveau mondial, les norovirus seraient à l'origine d'environ 20 % des 600 millions de cas de maladies alimentaires estimés annuellement (Havelaar *et al.*, 2015). Leur rôle dans les TIAC est particulièrement perçu aux États-Unis où ils seraient à l'origine de près de 60 % des cas (Hall *et al.*, 2011; Scallan *et al.*, 2011).

En Europe, leur implication dans les TIAC semble moins importante, ce phénomène pouvant être expliqué par les différences entre les habitudes alimentaires, notamment concernant la consommation de plats préparés. Ainsi, bien qu'ils ne soient pas l'agent majoritaire des TIAC (Glasset *et al.*, 2016), leur implication reste néanmoins préoccupante puisqu'ils seraient tout de même à l'origine de 14 % des TIAC recensées (European Food Safety Authority, 2015).

## II.6.1 Aliments en cause

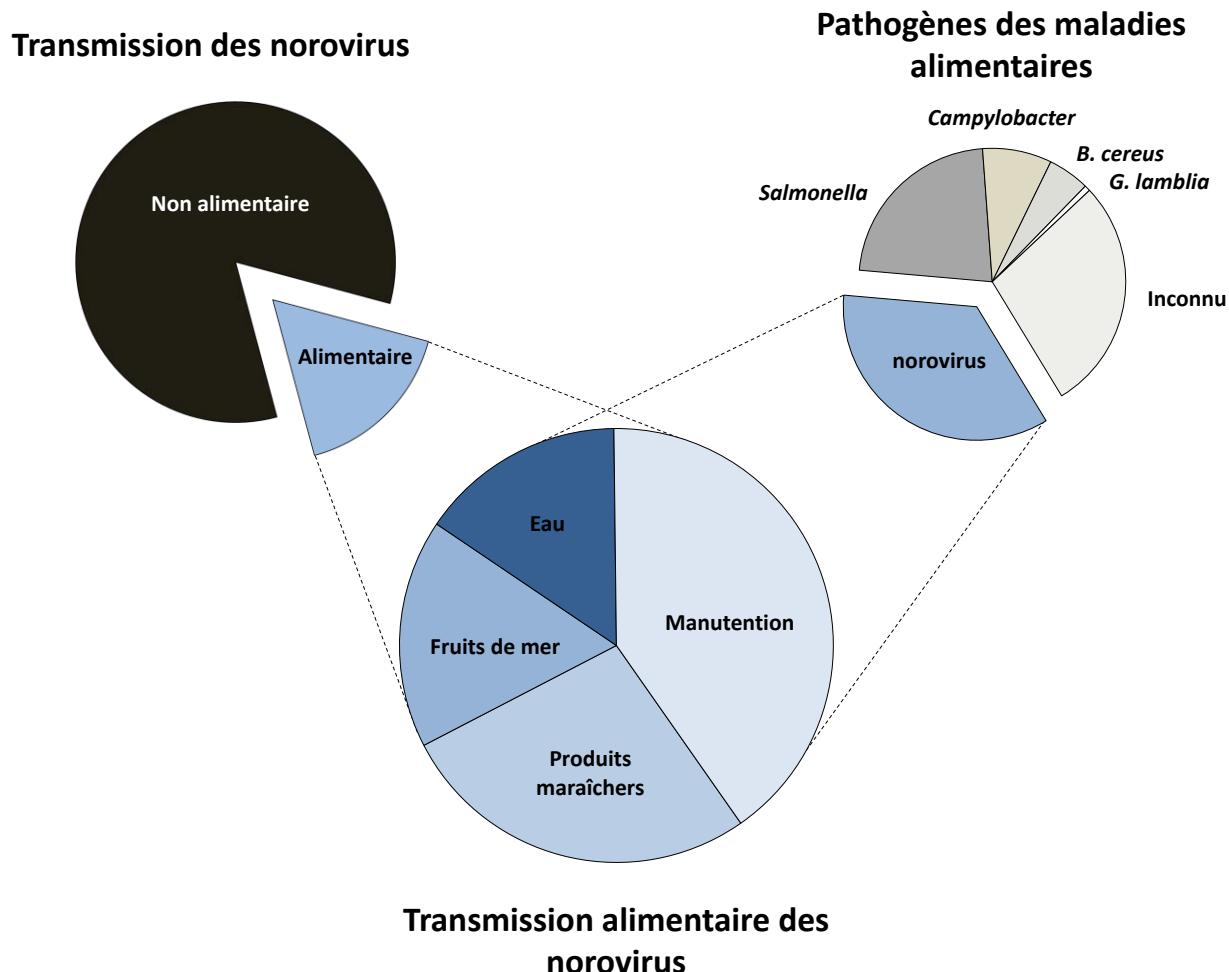
Le rôle prépondérant que tiennent certains aliments dans la propagation des norovirus est aujourd’hui parfaitement admis (Bitler *et al.*, 2013; Duizer & Koopmans, 2013). On distingue ainsi trois catégories de denrées dont la consommation est régulièrement associée à ce type de TIAC ; il s’agit des fruits de mer, des produits maraîchers et de l’eau (**Figure 25**).

Le lien entre les maladies alimentaires et la consommation de fruits de mer est connu depuis plus d’un siècle (Richards, 1988) et la littérature regorge de description d’épidémies de gastroentérites causées par les norovirus en rapport avec la consommation de coquillages (Baker *et al.*, 2011; Gallimore *et al.*, 2005; Le Guyader *et al.*, 2006a; Westrell *et al.*, 2010). En 2014, la consommation de coquillages a été à l’origine de 35 % des 76 TIAC formellement attribuées aux norovirus en Europe (European Food Safety Authority, 2015). Par ailleurs, une récente méta-analyse de la littérature scientifique révèle que les norovirus seraient à l’origine de 83,7 % des TIAC liées à la consommation de coquillages (Bellou *et al.*, 2013).

La contamination des fruits de mer a généralement lieu dans la zone conchylicole. Ces zones situées en bord de côtes sont en effet parfois soumises à une contamination fécale significative, en particulier en cas de rejets d’eaux usées brutes par les stations d’épuration qui peuvent survenir suite à un disfonctionnement du système de traitement des eaux ou en cas d’intempéries. D’autres évènements plus anecdotiques sont également rapportés, comme des contaminations causées par la vidange des eaux usées de bateaux à proximité des zones d’élevage (Campos & Lees, 2014).

Les bivalves filtreurs qui regroupent entre autres les moules, les huîtres, les palourdes et les coques sont particulièrement exposés à la pollution fécale. Ces coquillages sont en effet capables d’accumuler au niveau de leurs organes digestifs les virus entériques pathogènes présents dans les eaux environnantes par la filtration de grands volumes d’eau (Atmar *et al.*, 1996; Burkhardt & Calci, 2000; Schwab *et al.*, 1998).

Notons enfin que le risque pour le consommateur est considérablement augmenté en cas de consommation de fruits de mer insuffisamment cuits voire crus, comme c’est classiquement le cas pour les huîtres.



**Figure 25 : Place des norovirus dans les maladies alimentaires, d'après Duizer & Koopmans, 2013.**

Concernant les produits maraîchers, la contamination des denrées fait généralement suite à l'irrigation ou au nettoyage des végétaux avec de l'eau souillée. En parallèle de cette situation, la manutention par du personnel excrétant des virus peut également être évoquée.

Certains types de végétaux sont particulièrement identifiés dans la transmission des norovirus, et là encore, il s'agit de ceux consommés crus ou peu cuits. On note par exemple un rôle prépondérant des salades vertes (Ethelberg *et al.*, 2010; Müller *et al.*, 2016) et des fruits rouges conservés par surgélation (Einöder-Moreno *et al.*, 2016; Le Guyader *et al.*, 2004; Maunula *et al.*, 2009; Müller *et al.*, 2015). En 2012, des fraises surgelées contaminées en provenance de Chine ont par exemple été à l'origine de la plus grande épidémie alimentaire jamais décrite en Allemagne, touchant près de 11 000 individus (Bernard *et al.*, 2014).

Enfin, si les eaux souillées sont fréquemment à l'origine de la présence des norovirus à la surface des denrées alimentaires, elles peuvent également être directement à l'origine de la contamination des individus.

Des épidémies ont par exemples été décrites suite à la consommation d'eaux de boissons provenant de puits (Parshionikar *et al.*, 2003), de fontaines (Hoebe *et al.*, 2004), du réseau urbain (Carrique-Mas *et al.*, 2003; Gallay *et al.*, 2006; Kaplan *et al.*, 1982b) ou encore suite à la consommation de glaçons (Khan *et al.*, 1994). Les eaux embouteillées peuvent également être à l'origine de TIAC comme ce fut le cas en 2016 dans la région de Barcelone, où plus de 4 000 cas de gastroentérites ont été déclarés et ont conduit à la fermeture provisoire d'une usine d'embouteillage. Notons également que des cas associés à des activités récréatives aquatiques sont parfois recensés, qu'elles aient lieu dans des sites naturels (Sartorius *et al.*, 2007) ou en piscines (Maunula *et al.*, 2004; Podewils *et al.*, 2007).

Il apparaît en définitive que toutes les denrées alimentaires manipulées par du personnel infecté sont susceptibles d'être associées à la transmission des norovirus. De manière non exhaustive, des sandwiches (Daniels *et al.*, 2000; Zomer *et al.*, 2010), des pains (de Wit *et al.*, 2007) de la charcuterie (Malek *et al.*, 2009) ou des pâtisseries (Friedman *et al.*, 2005) ont déjà été impliqués dans la survenue de TIAC causées par les norovirus.

## **II.6.2 Facteurs favorisant la présence des norovirus dans les denrées alimentaires**

### **II.6.2.1 Stabilité dans l'environnement**

Contrairement aux bactéries, les virus ne possèdent pas de métabolisme intermédiaire ; ils ne sont donc pas capables de se multiplier en dehors de leur cellule hôte. De ce fait, dès qu'ils sont présents dans l'environnement ou à la surface des aliments, les virus sont uniquement soumis à un phénomène d'inactivation, plus ou moins rapide.

Différents facteurs sont responsables de l'inactivation des virus dans le milieu extérieur. On retrouve des paramètres physiques (e.g. température, humidité, UV), chimiques (e.g. pH, salinité, présence d'enzymes ou de matières organiques) ou microbiologiques (e.g. activité microbienne, prédation par des protozoaires). A l'inverse, d'autres facteurs contribuent à maintenir le caractère infectieux des virus, comme par exemple l'agrégation des particules virales entre elles ou encore leur adsorption aux matières en suspension.

Les virus à l'origine de TIAC sont globalement tous caractérisés par une excellente stabilité dans l'environnement. Dans le cas des norovirus, il est cependant difficile d'estimer la persistance des particules virales puisque les systèmes permettant leur culture ne sont décrits que depuis très récemment (Ettayebi *et al.*, 2016).

A l'heure actuelle, la plupart des connaissances concernant la stabilité et la persistance des norovirus humains résultent donc d'essais effectués sur des virus modèles comme le FCV ou le MNV, qui appartiennent respectivement à la même famille et au même genre que les norovirus humains. Les conclusions observées à partir de ces modèles semblent néanmoins difficiles à extrapoler aux génogroupes humains. Après 30 minutes d'incubation à 37°C et à pH 2, on observe par exemple une perte du caractère infectieux du FCV de 5 unités logarithmiques alors que dans les mêmes conditions, un perte de moins d'une unité logarithmique est observée pour le MNV (Cannon *et al.*, 2006; Duizer *et al.*, 2004).

D'autres études tentent d'évaluer la persistance des norovirus en s'intéressant à la stabilité de leur génome. Il s'avère par exemple que ce dernier est capable de persister plus de 700 jours dans des eaux à 12°C (Charles *et al.*, 2009). Là encore, ces résultats sont peu prédictibles de la persistance du caractère infectieux des particules virales. De manière plus formelle, des essais d'inoculation à des volontaires sains ont néanmoins montré que les norovirus sont capables de persister sous forme infectieuse pendant plus de 60 jours dans de l'eau à température ambiante placée à l'obscurité (Seitz *et al.*, 2011) et qu'ils sont capables de résister à des concentrations en chlore supérieures à celles classiquement utilisées lors du traitement de potabilisation des eaux (Keswick *et al.*, 1985).

Enfin, la persistance des norovirus humains est parfois évaluée par l'étude de la perte d'adhésion des particules virales soumises à différentes conditions d'inactivation (Dancho *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2011; Wang & Tian, 2014). Dans ce cas, un virus est considéré infectieux s'il est encore capable de reconnaître son récepteur.

De manière plus générale, une récente revue faisant un bilan des connaissances concernant la persistance des norovirus humains souligne particulièrement le problème lié à leur présence dans les aliments. Il apparaît en effet que ces virus sont capables de persister à la surface des fruits rouges, des salades ou dans les fruits de mer pendant une période excédant la durée de vie des produits, y compris en cas de congélation (Cook *et al.*, 2016).

## **II.6.2.2 Accumulation des norovirus dans les denrées alimentaires**

Alors que la présence de pathogènes dans les fruits de mer ou à la surface de certains végétaux est expliquée par leur mode de production et de culture qui implique un contact avec des eaux potentiellement souillées, d'autres facteurs doivent être considérés. Il apparaît par exemple que dans le cas des coquillages, l'accumulation des microorganismes est préférentiellement observée lorsqu'il s'agit de virus (Di Girolamo *et al.*, 1977).

Si l'on s'intéresse plus précisément aux norovirus, plusieurs études ont en effet mis en évidence la présence dans les huîtres de carbohydrates pouvant servir de ligands à ces pathogènes (Le Guyader *et al.*, 2006b; Tian *et al.*, 2007, 2006). Ces récepteurs baptisés « HBGA-like » sont très proches d'un point de vue structural des récepteurs viraux présents dans le corps humain et de ce fait, ils seraient à l'origine de l'accumulation spécifique des norovirus dans les fruits de mer. L'expression de ces récepteurs dans les coquillages est variable selon la saison et le tissu (e.g. hépatopancréas, branchies ou manteau). De plus, comme observé dans le corps humain, l'adhésion des norovirus à ces récepteurs est variable selon le génogroupe considéré (Maalouf *et al.*, 2011, 2010).

Ces récepteurs ont également été identifiés à la surface de certains végétaux comme les laitues (Esseili *et al.*, 2012; Gao *et al.*, 2016), particulièrement impliqués dans ce type de TIAC. Leur présence expliquerait en partie l'élimination particulièrement difficile des norovirus, même en cas de lavage mécanique (Cook *et al.*, 2016). En parallèle de ces récepteurs particuliers, notons également que des interactions non spécifiques sont largement impliquées dans l'adhésion des pathogènes aux matrices alimentaires (Berger *et al.*, 2010; DiCaprio *et al.*, 2015).

Notons enfin que le VHA, lui aussi fortement impliqué dans les TIAC en lien avec la consommation de fruits de mer, présenterait également une affinité particulière pour certains carbohydrates présents dans les coquillages (Ko *et al.*, 2011).



## III. LA NORME ISO 15216

---

### III.1 Contexte réglementaire

La recherche exhaustive dans les eaux ou dans les aliments de l'ensemble des pathogènes pouvant infecter l'Homme n'étant pas envisageable car trop longue et trop coûteuse, la qualité microbiologique de ces produits est classiquement évaluée en ciblant certains microorganismes qui constituent des critères de sécurité microbiologiques. D'après la législation, ces critères permettent de « fixer une limite au-delà de laquelle on doit considérer qu'une denrée alimentaire est contaminée de manière inacceptable par les micro-organismes pour lesquels les critères sont établis » (Parlement Européen, 2005).

#### III.1.1 Evaluation de la qualité microbiologique des mollusques bivalves en Europe

Dans le domaine conchylicole, la qualité microbiologique des fruits de mer est évaluée par la recherche de certains indicateurs bactériens qui permettent d'estimer la contamination fécale.

Alors qu'aux États-Unis la FDA (*Food & Drug Administration*) préconise la recherche des coliformes fécaux dans les eaux conchyliques, en Europe, la qualité microbiologique des fruits de mer est régit par le Règlement (CE) 854/2004, qui assure la classification des zones conchyliques professionnelles selon leur niveau de pollution fécale estimé par la recherche d'*E. coli* directement dans les coquillages (Parlement Européen, 2004).

La législation est précisée par le Règlement (UE) 2015/2285 applicable depuis le 1<sup>er</sup> Janvier 2017 (Commission Européenne, 2015) qui permet d'harmoniser les critères avec ceux définis par le *Codex alimentarius*. Ainsi, les concentrations d'*E. coli* mesurées dans les coquillages (chair et liquide intervalvaire, CLI) permettent de définir différents niveaux de pollution (**Tableau V**) qui déterminent la conduite à tenir avant la commercialisation des produits (**Figure 26**).

Tableau V : Classement sanitaire des zones conchyliques en Europe.

Classification Européenne	Critère microbiologique ( <i>E. coli</i> pour 100 g de chair et liquide intervalvaire [CLI])
Zone A	80 % < 230 <i>E. coli</i> / 100 g CLI Aucun > 700 <i>E. coli</i> / 100 g CLI
Zone B	90 % < 4 600 <i>E. coli</i> / 100 g CLI Aucun > 46 000 <i>E. coli</i> / 100 g CLI
Zone C	100 % < 46 000 <i>E. coli</i> / 100 g CLI
Zone non classée	> 46 000 <i>E. coli</i> / 100 g CLI

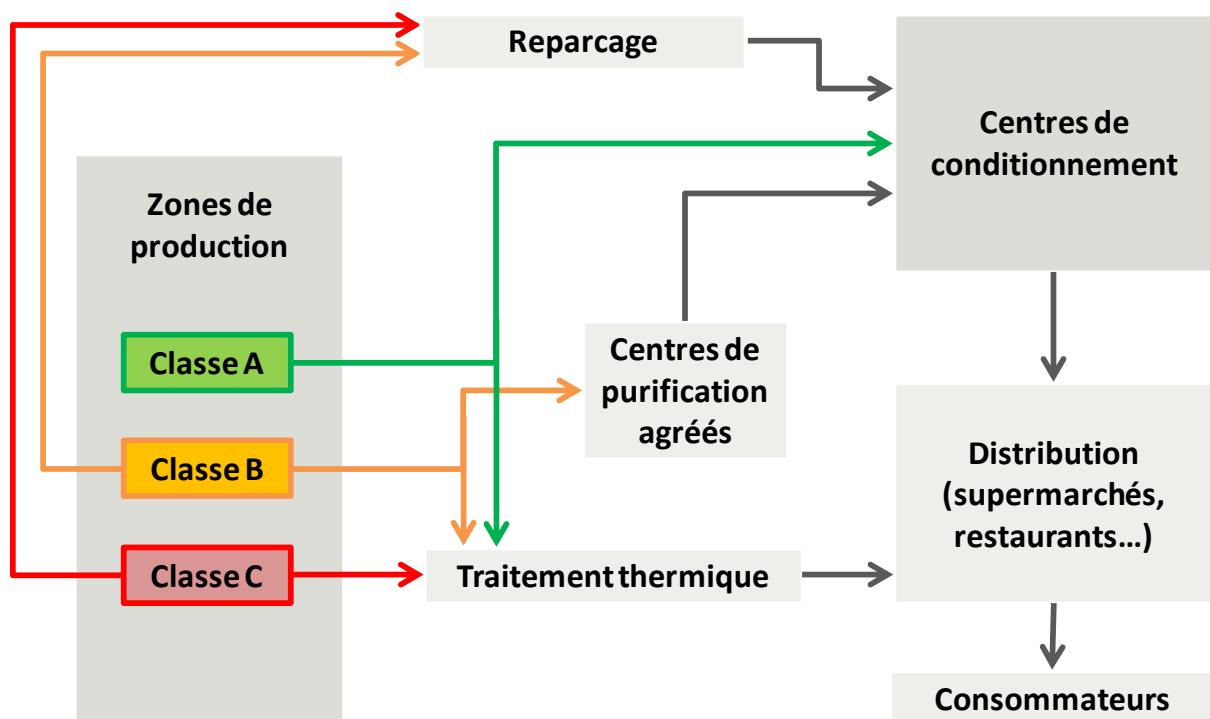


Figure 26 : Conduite à tenir avant la distribution des mollusques bivalves selon leur zone de production, d'après l'EFSA, 2016.

Alors que les coquillages élevés puis récoltés en zones classées A peuvent directement être mis sur le marché pour la consommation humaine, ceux récoltés dans les zones classées B ou C doivent subir au préalable un traitement visant à diminuer leur niveau de pollution. Il peut s'agir dans ce cas soit d'une dépuration par immersion en eau propre pendant une période donnée, soit d'un traitement thermique.

Dans le cas des fruits de mer issus de zones classées B, la dépuration est effectuée en centres agréés par immersion dans des bassins alimentés par de l'eau de mer naturellement propre ou ayant subi un traitement approprié. En France, cette dépuration est généralement effectuée pendant une période de 48 heures, temps généralement suffisant pour réduire le nombre de bactéries afin d'obtenir des produits conformes à la législation (i.e.  $< 230 E. coli /100 g$  de CLI). Le reparcage des coquillages dans une zone naturelle de qualité satisfaisante est également possible mais cette pratique n'est pas utilisée en France, faute de zones suffisamment contrôlées.

Concernant la purification des coquillages provenant de zones classées C, un reparcage d'une durée minimum de 2 mois peut être proposé. Cette pratique étant inexistante en France, la cuisson est alors la seule alternative à la commercialisation des produits. Enfin, la commercialisation des fruits de mer provenant de zones non classées est interdite (i.e.  $> 46 000 E. coli / 100 g$  CLI).

En Europe, 40 % des zones conchyliocoles commerciales sont classées A, 50 % sont classées B et 5 % sont classées C (European Food Safety Authority, 2011). Il apparaît donc que la majorité des fruits de mer nécessite une purification avant leur mise sur le marché.

### III.1.2 Limites des indicateurs bactériens

Si la présence d'*E. coli* dans des fruits de mer ne fait aucun doute quant à leur contamination par des matières fécales et donc au danger pour la santé des consommateurs, l'absence de cet indicateur bactérien n'est pas pour autant toujours synonyme de sûreté d'un point de vue microbiologique. Plusieurs arguments montrent en effet que la recherche d'*E. coli* est contestable pour témoigner notamment de la présence de virus entériques pathogènes dans les coquillages et dans l'environnement.

Il est tout d'abord largement démontré aujourd'hui que les indicateurs bactériens sont moins résistants que les virus entériques dans l'environnement (Harwood *et al.*, 2005; Havelaar *et al.*, 1993). Ainsi, en cas de pollution fécale ancienne, des virus entériques peuvent être

présents sous forme infectieuse dans des matrices alimentaires ou dans l'eau alors même que les indicateurs bactériens ne sont pas retrouvés.

Par ailleurs, il apparaît que lors de la dépuration des coquillages, les cinétiques d'élimination d'*E. coli* et des virus entériques pathogènes sont bien différentes (Formiga-Cruz *et al.*, 2002; Lees, 2000; Ueki *et al.*, 2007). En effet, alors que la dépuration des coquillages permet aisément de retrouver des concentrations en *E. coli* acceptables d'un point de vue réglementaire et qu'elle permet également de réduire de manière significative la contamination par d'autres bactéries (Son & Fleet, 1980), cette pratique semble peu efficace pour éliminer les norovirus. Ainsi, une dépuration de 48 heures permet généralement de réduire la concentration d'*E. coli* dans les fruits de mer de 95 % alors qu'une réduction de seulement 7 % est observée dans le cas des norovirus (Schwab *et al.*, 1998). La difficulté à éliminer les norovirus est également soulignée par leur prévalence qui est sensiblement la même qu'il s'agisse de coquillages dépurés ou non (Formiga-Cruz *et al.*, 2002).

En conséquence des différences de comportement observées entre norovirus et indicateurs bactériens, que ce soit en termes de survie, d'accumulation dans les fruits de mer ou d'élimination, il résulte que des coquillages en parfait accord avec la législation européenne puissent parfois être à l'origine de TIAC (Doré *et al.*, 2010; European Food Safety Authority, 2012, 2011; Le Guyader *et al.*, 2008).

Face à ce constat, la communauté scientifique s'accorde aujourd'hui à dire que les indicateurs bactériens ne sont pas capables de décrire la pollution virale parfois présente dans les denrées alimentaires et que d'autres critères microbiologiques devraient être adoptés (Formiga-Cruz *et al.*, 2002; Lees, 2000). D'un point de vue législatif, les limites des indicateurs bactériens sont également soulignées et le règlement (CE) 2073/2005 relatif aux critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires stipule « qu'il conviendrait en particulier de fixer des critères applicables aux virus pathogènes dans les mollusques bivalves vivants si les méthodes d'analyse sont suffisamment développées » (Parlement Européen, 2005).

En réponse à cette situation, le développement de méthodes permettant la détection directe de certains virus pathogènes dans les matrices alimentaires et en particulier dans les fruits de mer a donc été proposé.

## III.2 Description de la norme ISO 15216

Lorsque la recherche directe de certains virus entériques pathogènes dans les matrices alimentaires est souhaitée, peu d'alternatives sont actuellement envisageables parmi l'ensemble des techniques disponibles. En effet, compte tenu de leurs faibles concentrations dans l'environnement et dans le cas des norovirus, en l'absence de système efficace permettant leur culture en routine, il apparaît que seules les approches moléculaires soient suffisamment sensibles pour pouvoir les détecter dans les aliments.

Ainsi, ces dernières années, de nombreux protocoles permettant la détection des norovirus dans les aliments ont vu le jour, si bien qu'en 2006, on comptait 13 méthodes permettant leur élution à partir de matrices alimentaires, 29 techniques d'extraction des génomes et pas moins de 13 systèmes différents de PCR (document personnel Dr Boudaud, Actalia, France). Si ce nombre important de protocoles reflète évidemment la volonté de disposer de techniques plus efficaces afin d'estimer le danger viral dans les aliments, il est néanmoins rapidement apparu nécessaire de valider et de standardiser ces techniques de détection et d'y inclure une démarche qualité indispensable à la validation des résultats (Lees, 2010).

Dans cette perspective, le groupe de travail CEN/TC275/WG6/TAG4 a été initié en 2004 au sein du comité européen de normalisation (CEN) afin d'élaborer des procédures harmonisées pour l'analyse de matrices alimentaires et ainsi établir un système de surveillance des virus entériques.

Les méthodes de détection proposées s'intéressent particulièrement aux matrices alimentaires régulièrement à l'origine de TIAC d'origine virale. Parmi ces aliments à risque, on retrouve évidemment les mollusques bivalves, les fruits rouges et les salades, mais des procédures permettant l'analyse d'eaux embouteillées et de surfaces alimentaires diverses sont également proposées.

Parmi les virus entériques en question, l'attention s'est particulièrement portée sur les norovirus et le VHA, deux pathogènes considérés particulièrement préoccupants depuis plusieurs années par l'OMS et la FAO (World Health Organization & Food & Agriculture Organization of the United Nations, 2008). La recherche des norovirus des génogroupes GI et GII apparaît en effet légitime au vu de leur implication dans les TIAC, tandis que la recherche du VHA, bien que plus rarement présent dans les denrées alimentaires, est justifiée par les conséquences dramatiques que peuvent avoir les épidémies qui lui sont associées (Conaty *et al.*, 2000; Pinto *et al.*, 2009; Shieh *et al.*, 2007).

En 2013, la norme XP CEN ISO/TS 15216 (**Figure 27**) relative à l'extraction, à la détection et à la quantification des génomes des norovirus et du VHA par RT-PCR en temps réel dans les aliments a ainsi été diffusée sous un statut temporaire et expérimental et la parution du document définitif est programmée pour 2017. Les différents protocoles décrits dans cette norme sont brièvement résumés ci-dessous.

### III.2.1 Extraction des virus

Les virus étant présents dans les aliments en quantité faible mais suffisante pour infecter les consommateurs, leur extraction est une étape particulièrement critique qui doit être standardisée.

#### III.2.1.1 A partir des mollusques bivalves

L'analyse des mollusques bivalves est effectuée à partir de spécimens vivants ou congelés. La prise d'essai est au minimum de 10 coquillages. L'extraction des virus est réalisée uniquement à partir des hépatopancréas puisque c'est dans ce tissu que sont concentrés les virus filtrés par les mollusques (Metcalf *et al.*, 1980; Romalde *et al.*, 1994). Son analyse stricte permet ainsi de s'affranchir des inhibiteurs de (RT-)PCR présents dans les autres tissus. L'extraction des virus à partir des coquillages comporte les étapes suivantes :

- Ouverture des fruits de mer et dissection des hépatopancréas ;
- Mixage des hépatopancréas (2 g de tissus au total) ;
- Ajout du virus utilisé comme étalon interne (**voir chapitre III.2.1.5 – Etalon interne**) ;
- Digestion des tissus par ajout de protéinase K ;
- Centrifugation et collecte du surnageant ;
- Extraction des acides nucléiques à partir du surnageant.

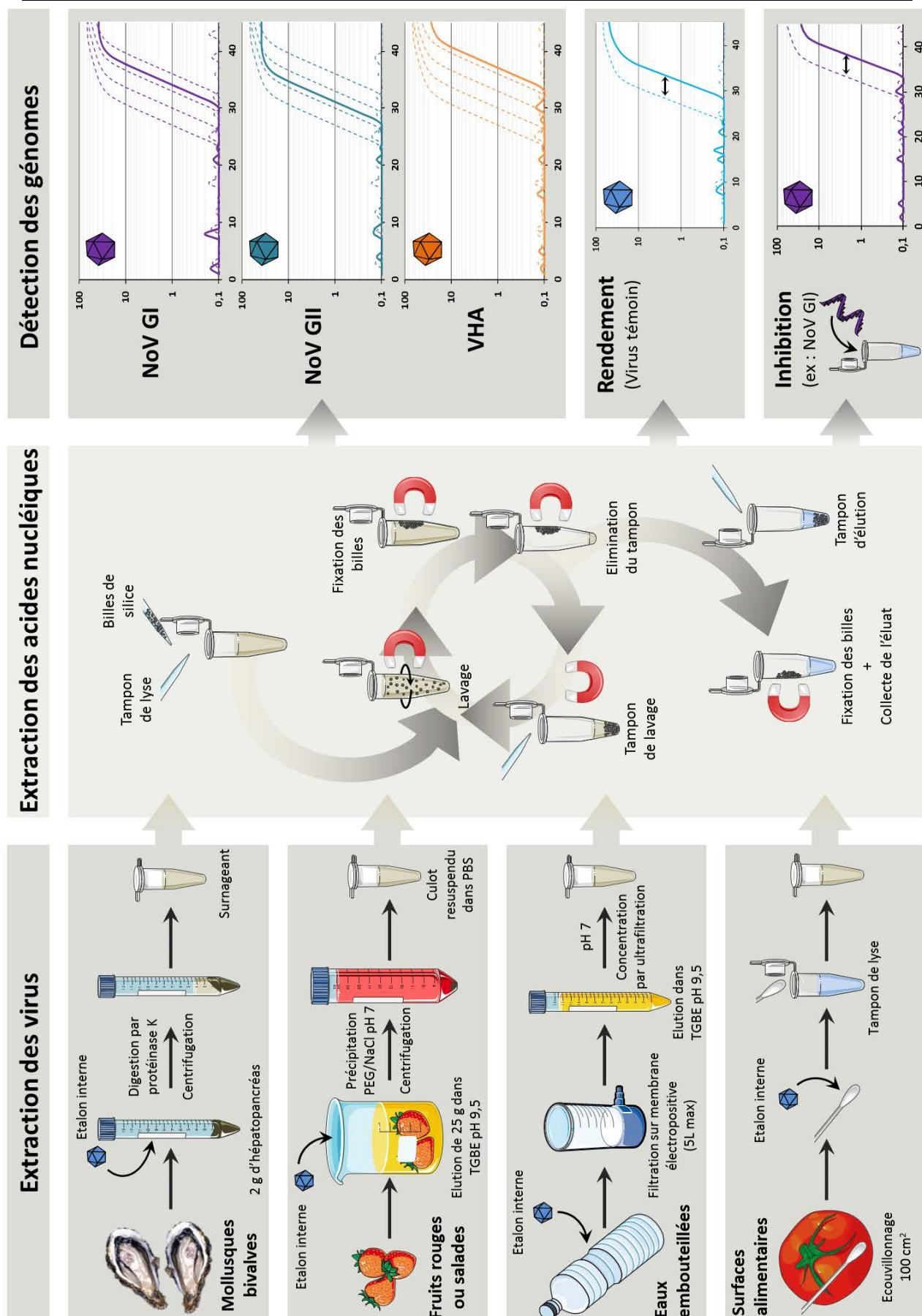


Figure 27 : Description de la norme ISO 15216 relative à la recherche du virus de l'hépatite A et des norovirus dans les aliments par RT-PCR en temps réel.

### **III.2.1.2 A partir des fruits rouges et salades**

L'analyse des fruits rouges ou des salades est effectuée à partir d'une prise d'essai de 25 g de produit frais ou congelé. La technique permettant l'extraction des virus comporte les étapes suivantes :

- Ajout du virus utilisé comme étalon interne ;
- Incubation dans une solution de TGBE pH 9,5 (+ pectinase dans le cas des fruits rouges) ;
- Centrifugation et collecte du surnageant ;
- Ajustement du pH à 7 et précipitation des virus par ajout de PEG/NaCl ;
- Centrifugation et élimination du surnageant ;
- Resuspension du culot dans du PBS ;
- [Uniquement pour les fruits rouges : purification par chloroforme/butanol, centrifugation et collecte de la phase aqueuse] ;
- Extraction des acides nucléiques.

### **III.2.1.3 A partir des eaux embouteillées**

L'analyse des eaux embouteillées est effectuée pour des volumes de 5 L maximum. Elle comporte les étapes suivantes :

- Ajout du virus utilisé comme étalon interne ;
- Filtration à travers une membrane chargée positivement ;
- Elution des virus présents sur le filtre dans une solution de TGBE pH 9,5 ;
- Ajustement du pH à 7 ;
- Concentration par ultrafiltration ;
- Extraction des acides nucléiques.

### **III.2.1.4 A partir des surfaces alimentaires**

L'analyse peut être effectuée sur différents types de surfaces dures, qu'il s'agisse de surfaces alimentaires ou non. Le prélèvement est effectué à l'aide d'un écouvillon sur une surface de 100 cm<sup>2</sup> maximum. L'extraction comporte les étapes suivantes :

- Prélèvement de la surface en utilisant un écouvillon imbibé de PBS ;
- Ajout du virus utilisé comme étalon interne sur l'écouvillon ;
- Immersion de l'écouvillon dans un tampon de lyse ;
- Extraction des acides nucléiques.

### III.2.1.5 Etalon interne

Lors de l'analyse, la succession des nombreuses étapes nécessaires à l'extraction des virus puis à celle des acides nucléiques conduit à la perte d'une grande quantité de virus. Afin d'évaluer cette perte, un virus témoin est ajouté en quantité connue dans l'échantillon avant traitement (**Figure 27**) et sa recherche permettra de calculer un rendement d'extraction.

D'après la norme ISO 15216, le virus utilisé comme étalon interne doit être cultivable, non enveloppé, posséder un génome à ARN simple brin de polarité positive ainsi que des caractéristiques morphologiques et physicochimiques proches de celles des virus recherchés. Il doit cependant être suffisamment différent pour ne pas interférer lors de la détection des génomes et doit également être initialement absent des matrices analysées. Sa détection doit être effectuée en utilisant une méthode fiable utilisant des amorces et une sonde déjà publiées dans la littérature. Par ailleurs, les virus inoculés doivent être issus d'un stock viral dilué au moins 10 fois dans un tampon approprié afin d'y limiter la présence d'inhibiteurs de (RT-)PCR.

Bien que plusieurs virus présentent des caractéristiques compatibles avec cette utilisation, la norme ISO 15216 propose l'emploi du Mengovirus comme étalon interne.

### III.2.2 Extraction des acides nucléiques

L'un des objectifs de cette étape est de purifier les acides nucléiques afin d'éliminer au maximum les inhibiteurs de (RT-)PCR présents dans l'échantillon. Elle permet également de concentrer les acides nucléiques afin d'en faciliter la détection.

L'extraction des acides nucléiques doit être réalisée en utilisant une méthode appropriée dérivée de la technique proposée par Boom *et al.* (1990). Pour ce faire, la norme ISO 15216 propose l'utilisation du kit NucliSens® commercialisé par BioMérieux. La lyse des capsides virales est d'abord réalisée dans un tampon contenant un agent chaotropique (*i.e.* thiocyanate de guanidine) et les acides nucléiques libérés sont ensuite piégés par des particules de silice magnétique (**Figure 27**). Après leur fixation sur un système aimanté, les particules de silice sont lavées par différents tampons afin de purifier les acides nucléiques. L'élution des acides nucléiques est ensuite réalisée par chauffage dans un tampon adapté.

### III.2.3 Quantification des génomes par RT-PCR en temps réel

#### III.2.3.1 Détection des génomes de norovirus et du virus de l'hépatite A

Les norovirus et le virus de l'hépatite A étant des virus à ARN, une étape de transcription inverse est d'abord nécessaire avant de pouvoir détecter leurs génomes par amplification. Le suivi de la norme ISO 15216 impose l'utilisation de réactifs permettant d'effectuer la réaction de RT-PCR en temps réel et en une seule étape. La réalisation successive de la rétrotranscription des ARN puis de l'amplification des ADNc dans le même puits limite en effet le risque de contamination des échantillons en réduisant les étapes de pipetage. De la même façon, le recours à la détection en temps réel réduit le risque de contamination par manipulation de l'échantillon après amplification des génomes. Cette technique semble également plus simple à standardiser. La norme ISO 15216 suggère l'utilisation du kit RNA Ultrasense™ One-Step qRT-PCR (Thermofisher) et propose également des amorces et sondes d'hydrolyse garantissant une sensibilité suffisante et l'absence de réaction croisée (**Tableau VI**).

**Tableau VI : Amorces et sondes utilisées pour la détection du virus de l'hépatite A et des norovirus du génogroupe GI et GII dans les matrices alimentaires, d'après la norme ISO 15216.**

Cible	Amorces/ Sondes	Séquence	Référence
VHA	HAV68 (F)	TCA CCG CCG TTT GCC TAG	(Costafreda <i>et al.</i> , 2006)
	HAV240 (R)	GGA GAG CCC TGG AAG AAA G	(Costafreda <i>et al.</i> , 2006)
	HAV150(-) (S)	FAM-CCT GAA CCT GCA GGA ATT AA-MGBNFQ	(Costafreda <i>et al.</i> , 2006)
NoV	QNIF4 (F)	CGC TGG ATG CGN TTC CAT	(Da Silva <i>et al.</i> , 2007)
GI	NV1LCR (R)	CCT TAG ACG CCA TCA TCA TTT AC	(Svraka <i>et al.</i> , 2007)
	*NVGG1p (S)	FAM-TGG ACA GGA GAY CGC RAT CT-TAMRA	(Svraka <i>et al.</i> , 2007)
NoV	*TM9 (S)	FAM-TGG ACA GGA GAT CGC-MGBNFQ	(Hoehne & Schreier, 2006)
	QNIF2 (F)	ATG TTC AGR TGG ATG AGR TTC TCW GA	(Loisy <i>et al.</i> , 2005)
	COG2R (R)	TCG ACG CCA TCT TCA TTC ACA	(Kageyama <i>et al.</i> , 2003)
GII	QNIFs (S)	FAM-AGC ACG TGG GAG GGC GAT CG-TAMRA	(Loisy <i>et al.</i> , 2005)

F = Amorce sens, R = Amorce antisens, S = Sonde

\*Deux constructions différentes sont proposées pour la sonde d'hydrolyse permettant la détection des norovirus du génogroupe GI.

Afin de maximiser la sensibilité de la technique, la détection des génomes des différents virus est réalisée séparément. Leur quantification est assurée par la réalisation en parallèle d'une série de dilution de plasmides d'ADN double brin portant la séquence d'intérêt, permettant ainsi la réalisation d'une courbe étalon.

Enfin, pour rendre la quantification la plus précise possible, les résultats obtenus lors de l'analyse des échantillons d'ARN dilués au 10<sup>ème</sup> doivent être considérés si besoin, afin de réduire le biais lié à la présence d'inhibiteurs de (RT-)PCR.

### **III.2.3.2 Détermination du rendement d'extraction**

L'estimation du rendement d'extraction des virus et des acides nucléiques est permise grâce au virus témoin ajouté aux échantillons en début d'analyse. Pour ce faire, la même quantité de virus témoin est extraite en parallèle, afin d'obtenir un signal en PCR correspondant à un rendement de 100 %. La quantité de virus témoin retrouvée dans les extraits est alors comparée à cette valeur.

La norme ISO 15216 impose un rendement d'extraction supérieur à 1 % pour considérer un résultat acceptable. Cela correspond à une différence maximale de 6,64 entre les Cq, dans le cas d'une gamme étalon ayant une pente idéale de -3,32. Si le rendement est insuffisant, l'échantillon doit être à nouveau analysé.

### **III.2.3.3 Inhibition**

Pour chaque virus ciblé, l'ajout puis la détection d'une quantité connue d'ARN portant la séquence d'intérêt dans l'échantillon à analyser ainsi que dans une matrice exempte d'inhibiteurs de (RT-)PCR permet d'évaluer l'influence de ces derniers.

Le résultat est considéré acceptable si le pourcentage d'inhibition dans l'échantillon est inférieur à 75 %, c'est-à-dire qu'une différence de moins de 2 Cq est observée par rapport au témoin, toujours en considérant une gamme étalon ayant une pente de -3,32. Dans le cas contraire, le taux d'inhibition doit être estimé pour l'échantillon dilué au 10<sup>ème</sup>. Si l'inhibition est encore supérieure à 75 %, le résultat n'est dans ce cas pas valide et l'échantillon doit être à nouveau soumis à essai.

### III.3 Interprétation des résultats

Les quantités de génomes détectées dans les échantillons sont exprimées en copies de génome (cg)/mL, cg/g ou cg/cm<sup>2</sup> en fonction du type de matrice analysée. Ces concentrations ne sont pas ajustées par rapport aux rendements et aux taux d'inhibition mesurés, ces deux informations étant utilisées uniquement comme paramètres d'assurance qualité.

Si la norme ISO 15216 permet donc de détecter et de mesurer les quantités de génomes de norovirus présentes dans différents types de matrices, son application pour évaluer la qualité microbiologique des fruits de mer ou des autres denrées alimentaires demeure cependant discutable puisque certains arguments suggèrent que la détection des génomes viraux pourrait sous-estimer le danger ou qu'à l'inverse elle pourrait le surestimer.

#### III.3.1 Sous-estimation du danger viral

Les techniques de biologie moléculaire sont considérées comme particulièrement sensibles pour rechercher des microorganismes puisqu'elles permettent théoriquement de détecter la présence d'une unique copie de génome. Cette sensibilité doit cependant être relativisée par rapport au volume d'échantillon engagé dans l'analyse. En effet, si l'on suit la norme ISO 15216 pour l'analyse des coquillages, les différentes étapes de préparation des échantillons conduisent à une limite de détection (LOD), c'est-à-dire à une concentration minimale de génome dans l'échantillon assurant la présence d'au moins 1 cg dans un puits de PCR, de l'ordre de 10<sup>2</sup> cg/2 g de tissus digestifs. De la même manière, la limite de quantification (LOQ), qui correspond cette fois à la dilution la plus faible de la gamme étalon donnant un résultat positif (*i.e.* généralement 10 cg par puits de PCR) est alors proche de 10<sup>3</sup> cg/2 g de tissus. En pratique, il apparaît que la LOD et la LOQ sont très largement supérieures à ces valeurs théoriques puisqu'elles sont directement impactées par les rendements d'extraction qui sont par exemple de l'ordre de 15 à 20 % lors de l'analyse de fruits de mer (Hartard *et al.*, 2016; Loutreul *et al.*, 2014) mais aussi par la présence d'inhibiteurs de (RT-)PCR.

Si l'on considère alors les paramètres les moins favorables en accord avec la norme, c'est-à-dire un rendement d'extraction de 1 % et un taux d'inhibition de 75 %, la LOD et la LOQ sont dans ce cas respectivement supérieures à 10<sup>4</sup> et 10<sup>5</sup> cg/2 g de tissus digestifs. La sensibilité de la méthode apparaît dès lors perfectible si ces valeurs sont comparées à la dose minimale infectieuse de 18 particules annoncée pour les norovirus (Teunis *et al.*, 2008).

En deuxième lieu, le risque de ne pas détecter les génomes éventuellement présents dans des matrices alimentaires dépend également de l'échantillonnage. Alors que le fait d'extrapoler les résultats obtenus par l'analyse d'une faible fraction d'un échantillon est un biais commun à toutes les méthodes analytiques, cette limite est particulièrement importante en biologie moléculaire et en cas d'analyses d'échantillons faiblement contaminés ou qui le sont de manière hétérogène (Butot *et al.*, 2014; European Food Safety Authority, 2012). D'un point de vue statistique, l'analyse de 10 coquillages provenant d'un lot dans lequel 25 % des spécimens sont contaminés par des norovirus présents à une concentration moyenne de 100 cg/g de tissu conduit par exemple à leur détection dans seulement 39 % des cas, et cela toujours en considérant la LOD théorique, c'est-à-dire non corrigée par le rendement d'extraction ou la présence d'inhibiteurs (**Tableau VII**).

**Tableau VII : Probabilité de détecter des génomes de norovirus dans des lots de coquillages en fonction de leur prévalence et de leur concentration, d'après l'EFSA, 2012.**

Fréquence de positifs dans le lot	Concentration moyenne en génomes (cg/ g de tissus digestifs)				
	1	100	200	500	1 000
1 %	0,1 %	4,0 %	6,3 %	8,9 %	9,5 %
2 %	0,1 %	7,6 %	12 %	17 %	18 %
5 %	0,2 %	17 %	26 %	37 %	40 %
10 %	0,3 %	27 %	43 %	61 %	65 %
25 %	0,5 %	39 %	62 %	88 %	94 %
50 %	0,5 %	41 %	66 %	93 %	99 %
75 %	0,5 %	41 %	66 %	93 %	100 %
95 %	0,5 %	41 %	66 %	93 %	100 %

Enfin, l'utilisation de la norme ISO 15216 pour estimer le danger viral impose de vérifier constamment que les amorces et sondes utilisées pour la détection des génomes soient capables de reconnaître l'ensemble des souches des virus ciblés. Si le VHA présente peu de variabilités génétiques, l'émergence régulière des nouveaux variants de norovirus exige donc un contrôle épidémiologique accru.

### III.3.2 Surestimation du danger viral

Alors que certaines limites méthodologiques suggèrent donc que l'application de la norme ISO 15216 pourrait sous-estimer le danger viral lié à la présence des norovirus dans les fruits de mer, d'autres arguments supposent au contraire qu'elle pourrait le surestimer. La norme ISO 15216 permet en effet de rechercher les virus dans les matrices alimentaires en ciblant leurs génomes. Or, si dans un échantillon clinique la présence du génome d'un virus est nécessairement associée à la présence de particules infectieuses, ce n'est pas toujours le cas en ce qui concerne les échantillons environnementaux.

Il est en effet largement démontré aujourd'hui que le génome des virus présente une bien meilleure stabilité que leur caractère infectieux dans l'environnement et qu'ainsi, seule une infime proportion des génomes détectés correspond réellement à des virus infectieux (Choi & Jiang, 2005; Gassilloud *et al.*, 2003; Hartard *et al.*, 2015; Ogorzaly *et al.*, 2010).

Par ailleurs, il est important de souligner que certains traitements d'inactivation comme les rayonnements UV agissent en causant des dommages au niveau du génome des virus sans pour autant affecter leur capacité d'adhésion à leurs récepteurs (Wigginton *et al.*, 2012). De ce fait, la bioaccumulation dans les fruits de mer de norovirus non infectieux semble possible et ces particules demeurent alors détectables par les techniques de biologie moléculaire puisque ces dernières ne ciblent qu'un court fragment du génome (Campos & Lees, 2014; Simonet & Gantzer, 2006).

En conséquence, des génomes de norovirus sont fréquemment retrouvés dans les fruits de mer puisque selon les études, 5 à 76 % des lots commerciaux analysés sont positifs pour leur recherche (Boudaud & Gantzer, 2015; Costantini *et al.*, 2006; European Food Safety Authority, 2012; Loisy *et al.*, 2005; Lowther *et al.*, 2012b). Il semble alors difficile d'interpréter ces résultats en termes de danger pour le consommateur et rappelons d'ailleurs que malgré cette forte prévalence des génomes, le nombre de TIAC en lien avec la consommation de fruits de mer reste relativement faible.

### III.3.3 Mise en place d'un seuil de risque

Afin de mieux hiérarchiser le danger lié à la présence de norovirus dans les fruits de mer et face à la forte prévalence de leur génome, la mise en place de valeurs seuils telles qu'elles sont par exemple établies par la législation pour la recherche d'*E. coli* est actuellement proposée.

Le groupe scientifique de l'EFSA a ainsi recommandé aux gestionnaires de risques d'établir une limite acceptable quant à la présence des génomes de norovirus dans les coquillages (European Food Safety Authority, 2012) et dans ce but, un programme de surveillance comprenant l'analyse de 4 000 lots d'huîtres sera prochainement mis en place à l'échelle européenne (European Food Safety Authority, 2016). Ces analyses auront pour objectifs d'estimer la prévalence de ces pathogènes et ainsi d'évaluer l'exposition des consommateurs et les conséquences de la mise en place de différentes seuils microbiologiques concernant la présence de leur génome (European Food Safety Authority, 2012).

Cette approche apparaît d'ores et déjà discutable. En effet, bien qu'une relation soit parfois observée entre la quantité de génomes de norovirus détectée dans des lots de fruits de mer et leur implication dans des TIAC (Doré *et al.*, 2010; Lowther *et al.*, 2012a), des concentrations très fortes (*i.e.*  $>10^4$  cg/g) sont parfois détectées dans des lots n'ayant pas provoqué de TIAC, et inversement, certaines études n'ont retrouvé que peu, voire aucun génome dans des échantillons à l'origine de TIAC (European Food Safety Authority, 2012; Lowther *et al.*, 2010).

Par ailleurs, en admettant que la mise en place d'un tel seuil permette de déterminer si un aliment est dangereux ou non pour le consommateur, il est important de souligner qu'il est extrêmement difficile de quantifier avec précision les génomes dans les matrices alimentaires. Il apparaît en effet que les concentrations en génomes dans les fruits de mer à l'origine de TIAC sont fréquemment comprises entre la LOD et la LOQ (European Food Safety Authority, 2012; Lowther *et al.*, 2012a) et donc que dans la plupart des cas, ces échantillons sont non quantifiables au regard des exigences décrites par la norme ISO 15216.

Enfin, même si l'on considère uniquement les concentrations supérieures à la LOQ, elles correspondent alors à la présence de 10 à 100 cg par puits de PCR. Or, en se référant au guide de bonnes pratiques MIQE des techniques de qPCR, une variabilité importante est observée lors de la détection de telles quantités de génome (Bustin *et al.*, 2009), empêchant les techniques de qPCR conventionnelles de fournir un résultat précis et reproductible.

Dans ce dernier cas de figure, le recours aux récentes techniques de Digital PCR pourrait constituer une alternative intéressante, en apportant une réelle plus-value grâce à une quantification plus précise des génomes (Coudray-Meunier *et al.*, 2015; Polo *et al.*, 2016).

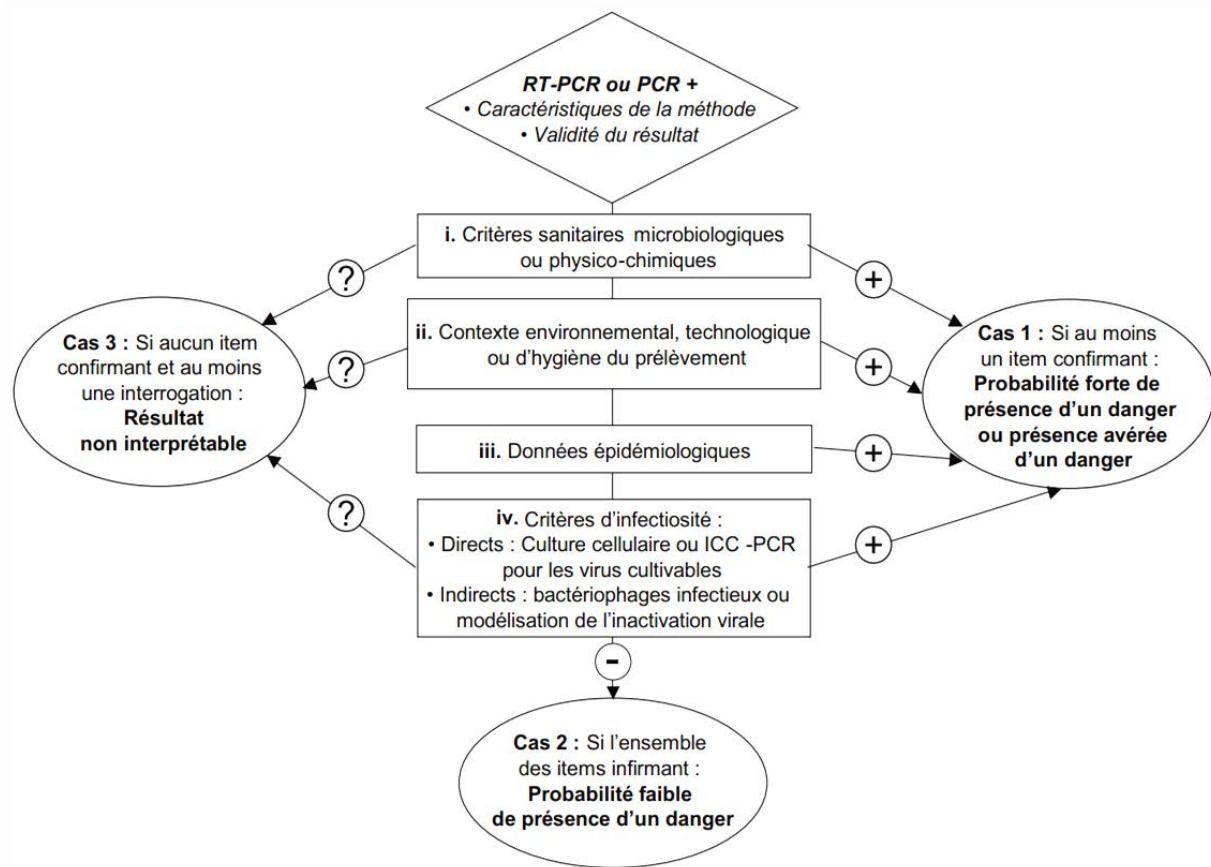
### III.3.4 Pondération du danger lié à la présence de génomes de norovirus dans les mollusques bivalves

La difficulté à évaluer le danger en se basant uniquement sur la présence de génomes viraux dans les matrices alimentaires était déjà bien connue avant la mise en place de la norme ISO 15216 (Gassilloud *et al.*, 2003). Au début des années 2000, une étude avait par exemple révélé que 33 % des eaux embouteillées étaient positives pour la recherche de génomes de norovirus (Beuret *et al.*, 2002, 2000). Malgré ce constat inquiétant, qui fut d'ailleurs aussi bien relayé dans la communauté scientifique que dans la presse mondiale, aucune épidémie en lien avec la consommation de ces eaux n'a pu être identifiée.

Dans ce cas de figure, l'une des perspectives permettant de mieux gérer le danger potentiel lié à la présence de génomes de virus entériques pathogènes dans les matrices alimentaires est la prise en compte d'un certain nombre de paramètres complémentaires (**Figure 28**).

Un logigramme paru en 2007 propose par exemple d'améliorer la gestion du danger viral en tenant compte de certains critères microbiologiques, physico-chimiques, technologiques ou encore épidémiologiques (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments, 2007). Il s'agit alors, lorsque du génome viral est détecté dans une matrice, de tenir compte de la présence concomitante d'indicateurs bactériens de pollution fécale, de considérer certains paramètres pouvant traduire un défaut du traitement des eaux ou le débordement d'une station d'épuration, et enfin d'intégrer dans la réflexion l'existence de foyers épidémiques ou encore la présence d'autres virus dont le caractère infectieux est facilement mesurable dans la matrice analysée.

Aujourd'hui encore, à défaut de méthodes permettant de distinguer un virus infectieux d'un virus non infectieux lorsque du génome viral est détecté dans un échantillon, une approche multiparamétrique telle qu'elle a été proposée il y a maintenant 10 ans semble toujours être la meilleure stratégie pour évaluer la contamination des aliments.



**Figure 28 : Logigramme permettant l'interprétation d'un résultat positif lors de la détection du génome d'un virus pathogène dans une matrice alimentaire par les techniques de biologie moléculaire, d'après l'AFSSA, 2007. Cas 1 :** En cas d'arguments en faveur d'une contamination microbienne récente, d'un contexte environnemental, technologique ou épidémique particulier ou de la présence avérée de virus infectieux, la probabilité du danger lié à la présence du génome d'un virus pathogène est forte. **Cas 2 :** En cas d'arguments démontrant l'absence d'une situation à risque, la probabilité de danger est apparemment faible. Cette situation est rarement observée puisque les données épidémiologiques et les informations concernant un défaut de traitement des eaux ne sont souvent disponibles que de manière rétrospective. **Cas 3 :** En l'absence d'arguments complémentaires, la détection du génome d'un virus pathogène dans une matrice alimentaire ne permet en aucun cas de conclure quant au danger associé. Cette situation est la plus fréquemment rencontrée.



# CONCLUSION

---

La transmission de microorganismes pathogènes à l'Homme suite à la consommation de coquillages est documentée depuis plus d'un siècle. Parmi eux, les huîtres sont particulièrement impliquées dans la survenue de maladies alimentaires car elles sont généralement consommées crues et dans ce cas, le pathogène le plus souvent en cause est le norovirus, agent responsable de la majorité des cas de gastroentérites virales à travers le monde.

En Europe, la qualité microbiologique des fruits de mer est évaluée par la recherche d'*Escherichia coli*, une bactérie indicatrice de pollution fécale. Or, si la présence d'*E. coli* dans un aliment ne fait aucun doute quant au danger qui résulterait de sa consommation, l'absence de cet indicateur n'est pas toujours gage de sûreté, en particulier en cas de présence de virus entériques pathogènes. Ainsi, face aux limites largement décrites aujourd'hui concernant l'utilisation des indicateurs bactériens pour évaluer le danger lié à la présence de virus pathogènes dans les denrées alimentaires et notamment dans les fruits de mer, la recherche directe des norovirus est actuellement envisagée par la mise en place de la norme ISO 15216.

Les norovirus n'étant pas cultivables en routine, la norme ISO 15216 s'appuie exclusivement sur des techniques de biologie moléculaire qui permettent de rechercher un microorganisme en détectant son génome. Cette approche est relativement rapide, spécifique et la norme ISO 15216 permettra de standardiser la recherche des génomes de norovirus dans les denrées alimentaires, ce qui aurait pu être compromis par le nombre important de protocoles qui ont vu le jour ces dernières années.

Utilisée de manière rétrospective, la norme ISO 15216 promet de nombreux intérêts. Les techniques moléculaires permettent en effet une identification rapide des pathogènes et constituent donc des outils d'investigation performants pour rechercher l'étiologie des maladies alimentaires. Couplée au séquençage, la détection des génomes de norovirus permet alors de déterminer l'origine exacte d'une épidémie, en comparant les séquences des virus isolés chez les malades à ceux retrouvés dans les denrées incriminées.

Utilisée de manière prospective, les bénéfices apportés par la norme ISO 15216 dans le but d'évaluer le danger pour les consommateurs semblent cependant plus discutables. En effet, la détection des génomes ne pouvant dans l'état actuel des connaissances en aucun cas témoigner de l'intégrité structurale et donc du caractère infectieux des virus correspondants, l'application de la norme ISO 15216 pourrait surestimer le danger viral, hypothèse largement appuyée par la forte prévalence des génomes de norovirus dans les coquillages.

A l'inverse, si l'absence de génome garantie toujours l'absence de virus infectieux, la question est de savoir si la technique proposée ici est suffisamment sensible pour l'affirmer. Il apparaît en pratique que si l'on tient compte des dilutions engendrées par la préparation des échantillons mais aussi des rendements des techniques d'extraction et de la présence d'inhibiteurs de (RT-)PCR, l'application de la norme ISO 15216 ne permet pas de détecter les quantités les plus faibles de virus capables d'infecter l'Homme.

Face à ces arguments, il semble donc à l'heure actuelle extrêmement aléatoire de vouloir relier la détection de génomes viraux à la présence des virus infectieux correspondants dans les denrées alimentaires. Aussi, d'autres approches sont parfois envisagées pour améliorer la gestion du danger viral.

Une première alternative qui permettrait de limiter la surestimation du danger consiste à utiliser des approches moléculaires qui seraient capables de détecter exclusivement les particules virales infectieuses, et cela, en évaluant l'intégrité de leur capsid et de leur génome (Knight *et al.*, 2012). Il apparaît par exemple que la détection d'un fragment de génome suffisamment long permet de refléter plus efficacement le caractère infectieux des virus (Pecson *et al.*, 2011 ; Simonet & Gantzer, 2006). Dans cette même idée, un prétraitement des particules virales associant protéinase K et RNase afin de dégrader les capsides endommagées et les ARN exposés permettrait de détecter uniquement les génomes initialement présents dans les virus non altérés (Nowak *et al.*, 2011 ; Nuanualsuwan & Cliver, 2002). Enfin, l'utilisation d'agents intercalants de type propidium monoazide (PMA) ou éthidium monoazide (EMA) est également proposée. Ces composés sont en effet capables de se lier au génome viral lorsque celui-ci est accessible (*i.e.* capsid altérée) et dans ce cas, ils empêchent la réaction de (RT-)PCR de se dérouler (Fuster *et al.*, 2016 ; Mclellan *et al.*, 2016). Là encore, la détection correspondrait alors uniquement aux virus les plus intègres.

De manière générale, si ces méthodes permettent de réduire plus ou moins efficacement le fossé décrit entre la présence de génome viral et celle des particules infectieuses, elles ne permettent pas de s'affranchir des limites liées à la faible concentration de ces pathogènes dans les matrices alimentaires.

La seconde stratégie actuellement envisagée consiste à identifier des indicateurs plus performants qu'*E. coli* pour apprécier le danger viral. Parmi eux, les bactériophages fécaux sont particulièrement étudiés. Ces microorganismes de nature virale se multiplient dans le tractus digestif des animaux à sang chaud en infectant certaines bactéries de la flore intestinale ; ils sont alors excrétés via les selles et les eaux usées en quantité abondante dans le milieu naturel et peuvent donc être proposés comme indicateurs de contamination fécale.

Parmi eux, les bactériophages ARN F-spécifiques présentent un intérêt majeur puisque leur structure, proche de celle des virus entériques pathogènes, leur assure un comportement similaire dans l'environnement que ce soit en termes de stabilité (Jofre *et al.*, 2016) ou de bioaccumulation dans les coquillages (Burkhardt & Calci, 2000, Flannery *et al.*, 2013 ; Hartard *et al.*, 2017, 2016). Etant facilement cultivables, ces derniers pourraient alors constituer un critère intéressant pour évaluer le danger viral. Enfin, les bactériophages ARN F-spécifiques sont divisés en 4 génogroupes dont la prévalence est différente chez l'Homme et chez l'animal (Cole *et al.*, 2003 ; Hartard *et al.*, 2015 ; Harwood *et al.*, 2013). La recherche spécifique de certains génogroupes pourrait alors permettre d'identifier les contaminations fécales d'origine humaine, ce qui constitue un paramètre sanitaire essentiel au vu de la spécificité d'espèce des virus entériques pathogènes.



# REFERENCES

---

- Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments, 2007. Bilan des connaissances relatives au virus transmissibles à l'Homme par voie orale.
- Ahmed, S.M., Hall, A.J., Robinson, A.E., Verhoef, L., Premkumar, P., Parashar, U.D., Koopmans, M., Lopman, B.A., 2014. Global prevalence of norovirus in cases of gastroenteritis: A systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect. Dis.* 14, 725–730.
- Aldridge, R.W., Hayward, A.C., Field, N., Warren-Gash, C., Smith, C., Pebody, R., Fleming, D., McCracken, S., 2016. Are school absences correlated with influenza surveillance data in England? Results from decipher my data - A research project conducted through scientific engagement with schools. *PLoS One* 11, 1–12.
- Ando, T., Jin, Q., Gentsch, J.R., Monroe, S.S., Noel, J.S., Dowell, S.F., Cicirello, H.G., Kohn, M.A., Glass, R.I., 1995. Epidemiologic applications of novel molecular methods to detect and differentiate small round structured viruses (Norwalk-like viruses). *J. Med. Virol.* 47, 145–152.
- Ando, T., Noel, J.S., Fankhauser, R.L., 2000. Genetic classification of "Norwalk-like viruses". *J. Infect. Dis.* 181 Suppl, S336–S348.
- Arness, M.K., Feighner, B.H., Canham, M.L., Taylor, D.N., Monroe, S.S., Cieslak, T.J., Hoedebecke, E.L., Polyak, C.S., Cuthie, J.C., Fankhauser, R.L., Humphrey, C.D., Barker, T.L., Jenkins, C.D., Skillman, D.R., 2000. Norwalk-like viral gastroenteritis outbreak in U.S. Army trainees. *Emerg. Infect. Dis.* 6, 204–207.
- Atmar, R.L., 2010. Noroviruses: State of the Art. *Food Environ. Virol.* 2, 117–126.
- Atmar, R.L., Bernstein, D.I., Harro, C.D., Al-Ibrahim, M.S., Chen, W.H., Ferreira, J., Estes, M.K., Graham, D.Y., Opekun, A.R., Richardson, C., Mendelman, P.M., 2011. Norovirus Vaccine against Experimental Human Norwalk Virus Illness. *N. Engl. J. Med.* 365, 2178–2187.
- Atmar, R.L., Neill, F.H., Woodley, C.M., Manger, R., Shay Fout, G., Burkhardt, W., Leja, L., McGovern, E.R., Le Guyader, F., Metcalf, T.G., Estes, M.K., 1996. Collaborative evaluation of a method for the detection of Norwalk virus in shellfish tissues by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 254–258.
- Atmar, R.L., Opekun, A.R., Gilger, M.A., Estes, M.K., Crawford, S.E., Neill, F.H., Graham, D.Y., 2008. Norwalk virus shedding after experimental human infection. *Emerg. Infect. Dis.* 14, 1553–1557.
- Baeher, F., Bogaerts, H., Goodwin, R., 2016. Vaccines against norovirus: state of the art trials in children and adults. *Clin. Microbiol. Infect.* 22, S136–S139.
- Baker, K., Morris, J., McCarthy, N., Saldana, L., Lowther, J., Collinson, A., Young, M., 2011. An outbreak of norovirus infection linked to oyster consumption at a UK restaurant, February 2010. *J. Public Health (Bangkok)*. 33, 205–211.

- Bartsch, S.M., Lopman, B.A., Ozawa, S., Hall, A.J., Lee, B.Y., 2016. Global economic burden of norovirus gastroenteritis. *PLoS One* 11, 1–16.
- Beller, M., Ellis, A., Lee, S.H., Drebot, M.A., Jenkerson, S.A., Funk, E., Sobsey, M.D., Simmons, O.D., Monroe, S.S., Ando, T., Noel, J., Petric, M., Middaugh, J.P., Spika, J.S., 1997. Outbreak of viral gastroenteritis due to a contaminated well. International consequences. *JAMA* 278, 563–568.
- Belliot, G., Lopman, B.A., Ambert-Balay, K., Pothier, P., 2014. The burden of norovirus gastroenteritis: An important foodborne and healthcare-related infection. *Clin. Microbiol. Infect.* 20, 724–730.
- Belliot, G., Sosnovtsev, S. V., Chang, K.-O., Babu, V., Uche, U., Arnold, J.J., Cameron, C.E., 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., Mitra, T., Hammer, C., Garfield, M., 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.
- Bellou, M., Kokkinos, P., Vantarakis, A., 2013. Shellfish-Borne Viral Outbreaks: A Systematic Review. *Food Environ. Virol.* 5, 13–23.
- Berger, C.N., Sodha, S. V., Shaw, R.K., Griffin, P.M., Pink, D., Hand, P., Frankel, G., 2010. Fresh fruit and vegetables as vehicles for the transmission of human pathogens. *Environ. Microbiol.* 12, 2385–2397.
- Bernard, H., Faber, M., Wilking, H., Haller, S., Höhle, M., Schielke, A., Ducomble, T., Siffczyk, C., Merbecks, S., Fricke, G., Hamouda, O., Stark, K., Werber, D., Outbreak Investigation Team, 2014. Large multistate outbreak of norovirus gastroenteritis associated with frozen strawberries, Germany, 2012. *Euro Surveill* 19, pii=20719.
- Bernstein, D.I., Atmar, R.L., Lyon, G.M., Treanor, J.J., Chen, W.H., Jiang, X., Vinjé, J., Gregoricus, N., Frenck, R.W., Moe, C.L., Al-Ibrahim, M.S., Barrett, J., Ferreira, J., Estes, M.K., Graham, D.Y., Goodwin, R., Borkowski, A., Clemens, R., Mendelman, P.M., 2015. Norovirus vaccine against experimental human GII.4 virus illness: A challenge study in healthy adults. *J. Infect. Dis.* 211, 870–878.
- Bert, F., Scaioli, G., Gualano, M.R., Passi, S., Specchia, M.L., Cadeddu, C., Viglianchino, C., Siliquini, R., 2014. Norovirus Outbreaks on Commercial Cruise Ships: A Systematic Review and New Targets for the Public Health Agenda. *Food Environ. Virol.* 6, 67–74.
- Best, M., Neuhauser, D., 2008. Kaoru Ishikawa: from fishbones to world peace. *Qual Saf Heal. Care* 17, 150–152.
- Beuret, C., Kohler, D., Baumgartner, A., Lüthi, T.M., 2002. Norwalk-like virus sequences in mineral waters: One-year monitoring of three brands. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 1925–1931.
- Beuret, C., Kohler, D., Lüthi, T., 2000. Norwalk-like virus sequences detected by reverse transcription-polymerase chain reaction in mineral waters imported into or bottled in Switzerland. *J. Food Prot.* 63, 1576–1582.
- Bhatia, H.M., Sanghvi, L.D., 1962. Rare Blood Groups and Consanguinity: «Bombay» Phenotype. *Vox Sang.* 7, 245–248.

- Bhende, Y.M., Deshpande, C.K., Bhatia, H.M., Sanger, R., Race, R.R., Morgan, W.T.J., Watkins, W.M., 1952. A “new” blood group character related to the ABO system. *Lancet* (London, England) 1, 903–904.
- Binnicker, M.J., 2015. Multiplex molecular panels for diagnosis of gastrointestinal infection: Performance, result interpretation, and cost-effectiveness. *J. Clin. Microbiol.* 53, 3723–3728.
- Bitler, E.J., Matthews, J.E., Dickey, B.W., Eisenberg, J.N.S., Leon, J.S., 2013. Norovirus outbreaks: a systematic review of commonly implicated transmission routes and vehicles. *Epidemiol. Infect.* 141, 1563–1571.
- Blacklow, N.R., Cukor, G., Bedigian, M.K., Echeverria, P., Greenberg, H.B., Schreiber, D.S., Trier, J.S., 1979. Immune response and prevalence of antibody to Norwalk enteritis virus as determined by radioimmunoassay. *J. Clin. Microbiol.* 10, 903–909.
- Bok, K., Abente, E.J., Realpe-Quintero, M., Mitra, T., Sosnovtsev, S. V., Kapikian, A.Z., Green, K.Y., 2009a. Evolutionary dynamics of GII.4 noroviruses over a 34-year period. *J. Virol.* 83, 11890–11901.
- Bok, K., Green, K., 2012. Norovirus gastroenteritis in immunocompromised patients. *N. Engl. J. Med.* 366, 1831–1837.
- Bok, K., Prikhodko, V.G., Green, K.Y., Sosnovtsev, S. V., 2009b. Apoptosis in murine norovirus-infected RAW264.7 cells is associated with downregulation of survivin. *J. Virol.* 83, 3647–3656.
- Boom, R., Sol, C.J., Salimans, M.M., Jansen, C.L., Wertheim-van Dillen, P.M., van der Noordaa, J., 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J. Clin. Microbiol.* 28, 495–503.
- Boudaud, N., Gantzer, C., 2015. Évaluation du danger viral dans les matrices alimentaires. *Bull. épidémiologique, santé Anim. Aliment.* 68, 26–30.
- Boxman, I.L.A., Verhoef, L., Vennema, H., Ngu, S.L., Friesema, I.H.M., Whiteside, C., Lees, D., Koopmans, M., 2016. International linkage of two food-borne hepatitis A clusters through traceback of mussels, the Netherlands, 2012. *Euro Surveill.* 21, pii=30113.
- Bradley, W., 1943. Epidemic nausea and vomiting. *Br. Med. J.* 309–312.
- Brown, J.R., Gilmour, K., Breuer, J., 2016. Norovirus Infections Occur in B-Cell–Deficient Patients. *Clin. Infect. Dis.* 62, 1136–1138.
- Bruins, M.J., Wolfhagen, M.J.H.M., Schirm, J., Ruijs, G.J.H.M., 2010. Evaluation of a rapid immunochromatographic test for the detection of norovirus in stool samples. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 29, 741–743.
- Bucardo, F., Nordgren, J., Carlsson, B., Kindberg, E., Paniagua, M., Möllby, R., Svensson, L., 2010. Asymptomatic norovirus infections in Nicaraguan children and its association with viral properties and histo-blood group antigens. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 29, 934–939.
- Buesa, J., Collado, B., Lopez-Andujar, P., Abu-Mallouh, R., Rodriguez Diaz, J., Garcia Diaz, A., Prat, J., Guix, S., Llovet, T., Prats, G., Bosch, A., 2002. Molecular Epidemiology of Caliciviruses Causing Outbreaks and Sporadic Cases of Acute Gastroenteritis in Spain. *J. Clin. Microbiol.* 40, 2854–2859.
- Bull, R.A., Eden, J.-S., Rawlinson, W.D., White, P.A., 2010. Rapid Evolution of Pandemic Noroviruses of the GII.4 Lineage. *PLoS Pathog.* 6, e1000831.

- Bull, R. A, Tu, E.T. V, McIver, C.J., Rawlinson, W.D., White, P. a, 2006. Emergence of a New Norovirus Genotype II.4 Variant Associated with Global Outbreaks of Gastroenteritis. *J. Clin. Microbiol.* 44, 327–333.
- Burkhardt, W., Calci, K.R., 2000. Selective Accumulation May Account for Shellfish-Associated Viral Illness. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 1375–1378.
- Burton-MacLeod, J.A., Kane, E.M., Beard, R.S., Hadley, L.A., Glass, R.I., Ando, T., 2004. Evaluation and comparison of two commercial enzyme-linked immunosorbent assay kits for detection of antigenically diverse human noroviruses in stool samples. *J. Clin. Microbiol.* 42, 2587–2595.
- Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J.A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M.W., Shipley, G.L., Vandesompele, J., Wittwer, C.T., 2009. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clin. Chem.* 55, 611–622.
- Butot, S., Zuber, S., Baert, L., 2014. Sample preparation prior to molecular amplification: Complexities and opportunities. *Curr. Opin. Virol.* 4, 66–70.
- Cadel Six, S., De Bruyser, M., Vignaud, M., Dao, T.T., Messio, S., Pairaud, S., Hennekinne, J.A., Pihier, N., Brisabois, A., 2012. Toxi-infections alimentaires collectives à *Bacillus cereus* : bilan de la caractérisation des souches de 2006 à 2010. *Bull. Epidemiol. Hebd.* 45–49.
- Campos, C.J.A., Lees, D.N., 2014. Environmental Transmission of Human Noroviruses in Shellfish Waters. *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 3552–3561.
- Cannon, J.L., Papafragkou, E., Park, G.W., Osborne, J., Jaykus, L.-A., Vinjé, J., 2006. Surrogates for the Study of Norovirus Stability and Inactivation in the Environment: A Comparison of Murine Norovirus and Feline Calicivirus. *J. Food Prot.* 69, 2761–2765.
- Carlsson, B., Kindberg, E., Buesa, J., Rydell, G.E., Lidón, M.F., Montava, R., Mallouh, R.A., Grahn, A., Rodríguez-Díaz, J., Bellido, J., Arnedo, A., Larson, G., Svensson, L., 2009. The G428A Nonsense Mutation in FUT2 Provides Strong but Not Absolute Protection against Symptomatic GII.4 Norovirus Infection. *PLoS One* 4, e5593.
- Carrique-Mas, J., Andersson, Y., Petersén, B., Hedlund, K.O., Sjögren, N., Giesecke, J., 2003. A norwalk-like virus waterborne community outbreak in a Swedish village during peak holiday season. *Epidemiol. Infect.* 131, 737–744.
- CDC, 2011. Updated norovirus outbreak management and disease prevention guidelines. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 60, 1–18.
- CDC, 2002a. Outbreak of Acute Gastroenteritis Associated with Norwalk-Like Viruses Among British Military Personnel - Afghanistan, May 2002. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 51, 477–479.
- CDC, 2002b. Outbreaks of Gastroenteritis Associated with Noroviruses on Cruise Ships - United States, 2002. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 51, 1112–1115.
- Chakravarty, S., Hutson, A.M., Estes, M.K., Prasad, B.V.V., 2005. Evolutionary trace residues in noroviruses: importance in receptor binding, antigenicity, virion assembly, and strain diversity. *J. Virol.* 79, 554–568.
- Chan, C.V., Chan, C.D., Ma, C., Chan, H., 2011. Norovirus as cause of benign convulsion associated with gastro-enteritis. *J. Paediatr. Child Health* 47, 373–377.

- Chan, M.C.-W., Ho, W.-S., Sung, J.J.-Y., 2011. In Vitro whole-virus binding of a norovirus genogroup II genotype 4 strain to cells of the lamina propria and Brunner's glands in the human duodenum. *J. Virol.* 85, 8427–8430.
- Chan, M.C.W., Lee, N., Hung, T.-N., Kwok, K., Cheung, K., Tin, E.K.Y., Lai, R.W.M., Nelson, E.A.S., Leung, T.F., Chan, P.K.S., 2015. Rapid emergence and predominance of a broadly recognizing and fast-evolving norovirus GII.17 variant in late 2014. *Nat. Commun.* 6, 10061.
- Chang, K.-O., Sosnovtsev, S. V., Belliot, G., King, A.D., Green, K.Y., 2006. Stable expression of a Norwalk virus RNA replicon in a human hepatoma cell line. *Virology* 353, 463–473.
- Charles, K.J., Shore, J., Sellwood, J., Laverick, M., Hart, A., Pedley, S., 2009. Assessment of the stability of human viruses and coliphage in groundwater by PCR and infectivity methods. *J. Appl. Microbiol.* 106, 1827–1837.
- Chaudhry, S.A., Verma, N., Koren, G., 2015. Hepatitis E infection during pregnancy. *Can. Fam. Physician* 61, 607–608.
- Chaudhry, Y., Nayak, A., Bordeleau, M.E., Tanaka, J., Pelletier, J., Belsham, G.J., Roberts, L.O., Goodfellow, I.G., 2006. Caliciviruses differ in their functional requirements for eIF4F components. *J. Biol. Chem.* 281, 25315–25325.
- Chen, H., Qian, F., Xu, J., Chan, M., Shen, Z., Zai, S., Shan, M., Cai, J., Zhang, W., He, J., Liu, Y., Zhang, J., Yuan, Z., Zhu, Z., Hu, Y., 2015. A novel norovirus GII.17 lineage contributed to adult gastroenteritis in Shanghai, China, during the winter of 2014–2015. *Emerg. Microbes Infect.* 4, e67.
- Chimonas, M.A.R., Vaughan, G.H., Andre, Z., Ames, J.T., Tarling, G.A., Beard, S., Widdowson, M.A., Cramer, E., 2008. Passenger behaviors associated with norovirus infection on board a cruise ship - Alaska, May to June 2004. *J. Travel Med.* 15, 177–183.
- Choi, S., Jiang, S.C., 2005. Real-time PCR quantification of human adenoviruses in urban rivers indicates genome prevalence but low infectivity. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 7426–7433.
- Cole, D., Long, S.C., Sobsey, M.D., 2003. Evaluation of F+ RNA and DNA Coliphages as Source-Specific Indicators of Fecal Contamination in Surface Waters. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 6507–6514.
- Collège des Universitaires de Maladies Infectieuses et Tropicales, 2016. E. PILLY, *Maladies Infectieuses et Tropicales*.
- Colson, P., Borentain, P., Queyriaux, B., Kaba, M., Moal, V., Gallian, P., Heyries, L., Raoult, D., Gerolami, R., 2010. Pig liver sausage as a source of hepatitis E virus transmission to humans. *J. Infect. Dis.* 202, 825–34.
- Commission Européenne, 2015. Règlement (UE) 2015/2285 de la commission du 30 janvier 2015 modifiant l'annexe II du règlement (CE) n° 854/2004 du Parlement européen et du Conseil fixant les règles spécifiques d'organisation des contrôles officiels concernant les produits d'origine ani. *J. Off. Union Eur.* L323, 2–4.
- Compton, J., 1991. Nucleic acid sequence-based amplification. *Nature* 350, 91–92.
- Conaty, S., Bird, P., Bell, G., Kraa, E., Grohmann, G., McAnulty, J.M., 2000. Hepatitis A in New South Wales, Australia from consumption of oysters: the first reported outbreak. *Epidemiol. Infect.* 124, 121–130.

- Cook, N., Knight, A., Richards, G.P., 2016. Persistence and Elimination of Human Norovirus in Food and on Food Contact Surfaces: A Critical Review. *J. Food Prot.* 79, 1273–1294.
- Costafreda, M.I., Bosch, A., Pintó, R.M., 2006. Development, evaluation, and standardization of a real-time TaqMan reverse transcription-PCR assay for quantification of hepatitis A virus in clinical and shellfish samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 3846–3855.
- Costantini, V., Loisy, F., Joens, L., Le Guyader, F.S., Saif, L.J., 2006. Human and Animal Enteric Caliciviruses in Oysters from Different Coastal Regions of the United States. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 1800–1809.
- Coudray-Meunier, C., Fraisse, A., Martin-Latil, S., Guillier, L., Delannoy, S., Fach, P., Perelle, S., 2015. A comparative study of digital RT-PCR and RT-qPCR for quantification of Hepatitis A virus and Norovirus in lettuce and water samples. *Int. J. Food Microbiol.* 201, 17–26.
- Couturier, E., Letort, M., Roque, A., Dussaix, E., Delarocque-astagneau, E., 2007. s Hépatite aiguë A en France en 2006 Première année de surveillance par la déclaration obligatoire. *Bull. épidémiologique Hebd. - InVS* 29–30, 253–268.
- Cubitt, W.D., Green, K.Y., Payment, P., 1998. Prevalence of Antibodies to the Hawaii Strain of Human Calicivirus as Measured by a Recombinant Protein Based Immunoassay 139, 135–139.
- Da Silva, A.K., Le Saux, J.C., Parnaudeau, S., Pommeupuy, M., Elimelech, M., Le Guyader, F.S., 2007. Evaluation of removal of noroviruses during wastewater treatment, using real-time reverse transcription-PCR: Different behaviors of genogroups I and II. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 7891–7897.
- Dancho, B.A., Chen, H., Kingsley, D.H., 2012. Discrimination between infectious and non-infectious human norovirus using porcine gastric mucin. *Int. J. Food Microbiol.* 155, 222–226.
- Daniels, N.A., Bergmire-Sweat, D.A., Schwab, K.J., Hendricks, K.A., Reddy, S., Rowe, S.M., Fankhauser, R.L., Monroe, S.S., Atmar, R.L., Glass, R.I., Mead, P., 2000. A Foodborne Outbreak of Gastroenteritis Associated with Norwalk-like Viruses: First Molecular Traceback to Deli Sandwiches Contaminated during Preparation. *J. Infect. Dis.* 181, 1467–1470.
- Daughenbaugh, K.F., Wobus, C.E., Hardy, M.E., 2006. VPg of murine norovirus binds translation initiation factors in infected cells. *Virol. J.* 3, 33.
- Dave, J., Sefton, A., 2015. Enteric fever and its impact on returning travellers. *Int. Health* 7, 163–168.
- de Bruin, E., Duizer, E., Vennema, H., Koopmans, M.P.G., 2006. Diagnosis of Norovirus outbreaks by commercial ELISA or RT-PCR. *J. Virol. Methods* 137, 259–264.
- de Graaf, M., van Beek, J., Vennema, H., Podkolzin, A., Hewitt, J., Bucardo, F., Templeton, K., Mans, J., Nordgren, J., Reuter, G., Lynch, M., Rasmussen, L., Iritani, N., Chan, M., Martella, V., Ambert-Balay, K., Vinjé, J., White, P., Koopmans, M., 2015. Emergence of a novel GII.17 norovirus – End of the GII.4 era? *Euro Surveill.* 20, 21178.
- de Laval, F., Nivoix, P., Pommier de Santi, V., Caballe, D., Garnotel, E., Maslin, J., 2011. Severe Norovirus Outbreak Among Soldiers in the Field: Foodborne Followed by Person-to-Person Transmission. *Clin. Infect. Dis.* 53, 399–400.

- De Leon, R., Matsui, S.M., Baric, R.S., Herrmann, J.E., Blacklow, N.R., Greenberg, H.B., Sobsey, M.D., 1992. Detection of Norwalk Virus in Stool Specimens by Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction and Nonradioactive Oligoprobes. *J Clin Microbiol* 30, 3151–3157.
- de Wit, M.A.S., Widdowson, M.A., Vennema, H., de Bruin, E., Fernandes, T., Koopmans, M., 2007. Large outbreak of norovirus: The baker who should have known better. *J. Infect.* 55, 188–193.
- Debbink, K., Lindesmith, L.C., Donaldson, E.F., Baric, R.S., 2012. Norovirus Immunity and the Great Escape. *PLoS Pathog.* 8, e1002921.
- Deiman, B., van Aarle, P., Sillekens, P., 2002. Characteristics and applications of nucleic acid sequence-based amplification (NASBA). *Mol. Biotechnol.* 20, 163–179.
- Delacour, H., Dubrous, P., Koeck, J., 2010. Noroviruses : A Challenge for Military Forces. *J. R. Army Med. Corps* 156, 251–254.
- Delmas, G., Jourdan-Da Silva, N., Pihier, N., Weill, F., Vaillant, V., de Valk, H., 2010. Les toxi-infections alimentaires collectives en France, en 2006 et 2008. *Bull. Epidémiol. Hebdo.* 31–32, 344–348.
- Delmas, G., Vaillant, V., Jourdan, N., Le Hello, S., Weill, F., de Valk, H., 2011. Les fièvres typhoïdes et paratyphoïdes en France entre 2004 et 2009. *Bull. Epidemiol. Hebd.* 2, 9–12.
- Di Girolamo, R., Liston, J., Matches, J., 1977. Ionic bonding, the mechanism of viral uptake by shellfish mucus. *Appl. Environ. Microbiol.* 33, 19–25.
- Di Martino, B., Di Profio, F., Melegari, I., Sarchese, V., Cafiero, M.A., Robetto, S., Aste, G., Lanave, G., Marsilio, F., Martella, V., 2016. A novel feline norovirus in diarrheic cats. *Infect. Genet. Evol.* 38, 132–137.
- DiCaprio, E., Purgianto, A., Ma, Y., Hughes, J., Dai, X., Li, J., 2015. Attachment and localization of human norovirus and animal caliciviruses in fresh produce. *Int. J. Food Microbiol.* 211, 101–108.
- Domingo, E., Holland, J., 1997. RNA Virus Mutations. *Annu. Rev. Microbiol.* 51, 151–178.
- Donaldson, E.F., Lindesmith, L.C., Lobue, A.D., Baric, R.S., 2010. Viral shape-shifting: norovirus evasion of the human immune system. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 231–241.
- Doré, B., Keaveney, S., Flannery, J., Rajko-Nenow, P., 2010. Management of health risks associated with oysters harvested from a norovirus contaminated area, Ireland, February-March 2010. *Euro Surveill* 15, pii=19567.
- Duizer, E., 2004. Laboratory efforts to cultivate noroviruses. *J. Gen. Virol.* 85, 79–87.
- Duizer, E., Bijkerk, P., Rockx, B., de Groot, A., Twisk, F., Koopmans, M., 2004. Inactivation of Caliciviruses. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 4538–4543.
- Duizer, E., Koopmans, M., 2013. Norovirus, in: Motarjemi, Y. (Ed.), *Encyclopedia of Food Safety*. p. 223.

- Duong, V.T., Phat, V.V., Tuyen, H.T., Dung, T.T.N., Trung, P.D., Minh, P. Van, Tu, L.T.P., Campbell, J.I., Le Phuc, H., Ha, T.T.T., Ngoc, N.M., Huong, N.T.T., Tam, P.T.T., Huong, D.T., Xang, N. Van, Dong, N., Phuong, L.T., Hung, N. Van, Phu, B.D., Phuc, T.M., Thwaites, G.E., Vi, L.L., Rabaa, M.A., Thompson, C.N., Baker, S., 2016. Evaluation of Luminex xTAG Gastrointestinal Pathogen Panel Assay for Detection of Multiple Diarrheal Pathogens in Fecal Samples in Vietnam. *J. Clin. Microbiol.* 54, 1094–1100.
- Eden, J.S., Bull, R.A., Tu, E., McIver, C.J., Lyon, M.J., Marshall, J.A., Smith, D.W., Musto, J., Rawlinson, W.D., White, P.A., 2010. Norovirus GII.4 variant 2006b caused epidemics of acute gastroenteritis in Australia during 2007 and 2008. *J. Clin. Virol.* 49, 265–271.
- Eden, J.S., Hewitt, J., Lim, K.L., Boni, M.F., Merif, J., Greening, G., Ratcliff, R.M., Holmes, E.C., Tanaka, M.M., Rawlinson, W.D., White, P.A., 2014. The emergence and evolution of the novel epidemic norovirus GII.4 variant Sydney 2012. *Virology* 450–451, 106–113.
- Einöder-Moreno, M., Lange, H., Grepp, M., Osborg, E., Vainio, K., Vold, L., 2016. Non-heat-treated frozen raspberries the most likely vehicle of a norovirus outbreak in Oslo, Norway, November 2013. *Epidemiol. Infect.* 144, 2765–2772.
- Esseili, M.A., Wang, Q., Saif, L.J., 2012. Binding of human GII.4 norovirus virus-like particles to carbohydrates of romaine lettuce leaf cell wall materials. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 786–794.
- Ethelberg, S., Lisby, M., Böttiger, B., Schultz, A.C., Villif, A., Jensen, T., Olsen, K.E., Scheutz, F., Kjelsø, C., Müller, L., 2010. Outbreaks of gastroenteritis linked to lettuce, Denmark, January 2010. *Euro Surveill.* 15, pii=19484.
- Ettayebi, K., Crawford, S.E., Murakami, K., Broughman, J.R., Karandikar, U., Tenge, V.R., Neill, F.H., Blutt, S.E., Zeng, X.-L., Qu, L., Kou, B., Opekun, A.R., Burrin, D., Graham, D.Y., Ramani, S., Atmar, R.L., Estes, M.K., 2016. Replication of human noroviruses in stem cell-derived human enteroids. *Science* 353, 1387–1393.
- European Food Safety Authority, 2016. Technical specifications for a European baseline survey of norovirus in oysters. *EFSA J.* 14, 4414.
- European Food Safety Authority, 2015. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2014. *EFSA J.* 13, 4329.
- European Food Safety Authority, 2012. Scientific Opinion on Norovirus (NoV) in oysters: methods, limits and control options. *EFSA J.* 10, 2500.
- European Food Safety Authority, 2011. Scientific Opinion on an update on the present knowledge on the occurrence and control of foodborne viruses. *EFSA J.* 9, 2190–2285.
- European Food Safety Authority, 2010. Analysis of the baseline survey on the prevalence of *Campylobacter* in broiler batches and of *Campylobacter* and *Salmonella* on broiler carcasses in the EU, 2008 - Part A: *Campylobacter* and *Salmonella* prevalence estimates. *EFSA J.* 8, 1503.
- Farkas, T., Singh, A., Le Guyader, F.S., La Rosa, G., Saif, L., McNeal, M., 2015. Multiplex real-time RT-PCR for the simultaneous detection and quantification of GI, GII and GIV noroviruses. *J. Virol. Methods* 223, 109–114.
- Fatica, M.K., Schneider, K.R., 2011. *Salmonella* and produce: Survival in the plant environment and implications in food safety. *Virulence* 2, 573–579.

- Flannery, J., Keaveney, S., Rajko-Nenow, P., O'Flaherty, V., Doré, W., 2013. Norovirus and FRNA bacteriophage determined by RT-qPCR and infectious FRNA bacteriophage in wastewater and oysters. *Water Res.* 47, 5222–5231.
- Formiga-Cruz, M., Tofino-Quesada, G., Bofill-Mas, S., Lees, D.N., Henshilwood, K., Allard, A.K., Conden-Hansson, A.-C., Hernroth, B.E., Vantarakis, A., Tsibouxi, A., Papapetropoulou, M., Furones, M.D., Girones, R., 2002. Distribution of Human Virus Contamination in Shellfish from Different Growing Areas in Greece, Spain, Sweden, and the United Kingdom. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 5990–5998.
- Frange, P., Touzot, F., Debré, M., Héritier, S., Leruez-Ville, M., Cros, G., Rouzioux, C., Blanche, S., Fischer, A., Avettand-Fenoël, V., 2012. Prevalence and clinical impact of norovirus fecal shedding in children with inherited immune deficiencies. *J. Infect. Dis.* 206, 1269–1274.
- Freeland, A.L., Vaughan, G.H., Banerjee, S.N., 2016. Acute Gastroenteritis on Cruise Ships — United States, 2008–2014. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 65, 1–5.
- Friedman, D.S., Heisey-Grove, D., Argyros, F., Berl, E., Nsubuga, J., Stiles, T., Fontana, J., Beard, R.S., Monroe, S., McGrath, M.E., Sutherby, H., Dicker, R.C., DeMaria, A., Matyas, B.T., 2005. An outbreak of norovirus gastroenteritis associated with wedding cakes. *Epidemiol. Infect.* 133, 1057–1063.
- Fu, J., Ai, J., Jin, M., Jiang, C., Zhang, J., Shi, C., Lin, Q., Yuan, Z., Qi, X., Bao, C., Tang, F., Zhu, Y., 2015. Emergence of a new GII.17 norovirus variant in patients with acute gastroenteritis in Jiangsu, China, September 2014 to March 2015. *Euro Surveill.* 20, pii=21157.
- Fujinaga, Y., 2010. Interaction of Botulinum Toxin with the Epithelial Barrier. *J. Biomed. Biotechnol.* 2010, 1–9.
- Fukuda, S., Takao, S., Kuwayama, M., Shimazu, Y., Miyazaki, K., 2006. Rapid Detection of Norovirus from Fecal Specimens by Real-Time Reverse Transcription-Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay. *J. Clin. Microbiol.* 44, 1376–1381.
- Furman, L.M., Maaty, W.S., Petersen, L.K., Ettayebi, K., Hardy, M.E., Bothner, B., 2009. Cysteine protease activation and apoptosis in Murine norovirus infection. *Virol. J.* 6, 139.
- Fuster, N., Pintó, R.M., Fuentes, C., Beguiristain, N., Bosch, A., Guix, S., 2016. Propidium monoazide RTqPCR assays for the assessment of hepatitis A inactivation and for a better estimation of the health risk of contaminated waters. *Water Res.* 101, 226–232.
- Gallay, A., De Valk, H., Cournot, M., Ladeuil, B., Hemery, C., Castor, C., Bon, F., Mégraud, F., Le Cann, P., Desenclos, J.C., 2006. A large multi-pathogen waterborne community outbreak linked to faecal contamination of a groundwater system, France, 2000. *Clin. Microbiol. Infect.* 12, 561–570.
- Gallimore, C.I., Cheesbrough, J.S., Lamden, K., Bingham, C., Gray, J.J., 2005. Multiple norovirus genotypes characterised from an oyster-associated outbreak of gastroenteritis. *Int. J. Food Microbiol.* 103, 323–330.
- Gao, X., Esseili, M.A., Lu, Z., Saif, L.J., Wang, Q., 2016. Recognition of Histo-Blood Group Antigen-Like Carbohydrates in Lettuce by Human GII.4 Norovirus. *Appl. Environ. Microbiol.* 82, 2966–2974.

- Gao, Z., Liu, B., Huo, D., Yan, H., Jia, L., Du, Y., Qian, H., Yang, Y., Wang, X., Li, J., Wang, Q., 2015. Increased norovirus activity was associated with a novel norovirus GII.17 variant in Beijing, China during winter 2014–2015. *BMC Infect. Dis.* 15, 574.
- Garcia, C., DuPont, H.L., Long, K.Z., Santos, J.I., Ko, G., 2006. Asymptomatic norovirus infection in Mexican children. *J. Clin. Microbiol.* 44, 2997–3000.
- Gassilloud, B., Schwartzbrod, L., Gantzer, C., 2003. Presence of Viral Genomes in Mineral Water: a Sufficient Condition To Assume Infectious Risk? *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 3965–3969.
- Gerondopoulos, A., Jackson, T., Monaghan, P., Doyle, N., Roberts, L.O., 2010. Murine norovirus-1 cell entry is mediated through a non-clathrin-, non-caveolae-, dynamin- and cholesterol-dependent pathway. *J. Gen. Virol.* 91, 1428–1438.
- Glass, P.J., White, L.J., Ball, J.M., Leparc-Goffart, I., Hardy, M.E., Estes, M.K., 2000. Norwalk virus open reading frame 3 encodes a minor structural protein. *J. Virol.* 74, 6581–6591.
- Glass, P.J., Zeng, C.Q., Estes, M.K., 2003. Two Nonoverlapping Domains on the Norwalk Virus Open Reading Frame 3 (ORF3) Protein Are Involved in the Formation of the Phosphorylated 35K Protein and in ORF3-Capsid Protein Interactions. *J. Virol.* 77, 3569–3577.
- Glass, R.I., Parashar, U.D., Estes, M.K., 2009. Norovirus Gastroenteritis. *N. Engl. J. Med.* 361, 1776–1785.
- Glasset, B., Herbin, S., Guillier, L., Vignaud, M., Grout, J., Pairaud, S., Michel, V., Hennekinne, J., Ramarao, N., Brisabois, A., 2016. *Bacillus cereus* -induced food-borne outbreaks in France, 2007 to 2014: epidemiology and genetic characterisation. *Euro Surveill* 21, pii=30413.
- Gonzalez-Hernandez, M.B., Liu, T., Blanco, L.P., Auble, H., Payne, H.C., Wobus, C.E., 2013. Murine Norovirus Transcytosis across an In Vitro Polarized Murine Intestinal Epithelial Monolayer Is Mediated by M-Like Cells. *J. Virol.* 87, 12685–12693.
- Gonzalez-Hernandez, M.B., Liu, T., Payne, H.C., Stencel-Baerenwald, J.E., Ikizler, M., Yagita, H., Dermody, T.S., Williams, I.R., Wobus, C.E., 2014. Efficient Norovirus and Reovirus Replication in the Mouse Intestine Requires Microfold (M) Cells. *J. Virol.* 88, 6934–6943.
- Gopinath, S., Carden, S., Monack, D., 2012. Shedding light on *Salmonella* carriers. *Trends Microbiol.* 20, 320–327.
- Gordon, I., Ingraham, H.S., Korns, R.F., 1947. Transmission of epidemic gastroenteritis to human volunteers by oral administration of fecal filtrates. *J. Exp. Med.* 86, 409–422.
- Gossner, C.M., Severi, E., 2014. Three simultaneous, food-borne, multi-country outbreaks of hepatitis A virus infection reported in EPIS-FWD in 2013: what does it mean for the European Union? *Euro Surveill.* 19, pii=20941.
- Grabowski, N.T., Klein, G., 2015. Microbiology and Food-borne Pathogens in Honey. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* Jul 15.
- Gray, J.D., 1939. Epidemic nausea and vomiting. *Br. Med. J.* 209–211.

- Gray, J.J., Kohli, E., Ruggeri, F.M., Vennema, H., Sanchez-Fauquier, A., Schreier, E., Gallimore, C.I., Iturriiza-Gomara, M., Giraudon, H., Pothier, P., Di Bartolo, I., Inglese, N., de Bruin, E., van der Veer, B., Moreno, S., Montero, V., de Llano, M.C., Hohne, M., Diedrich, S.M., 2007. European Multicenter Evaluation of Commercial Enzyme Immunoassays for Detecting Norovirus Antigen in Fecal Samples. *Clin. Vaccine Immunol.* 14, 1349–1355.
- Green, J., Norcott, J.P., Lewis, D., Arnold, C., Brown, D.W.G., 1993. Norwalk-like viruses: Demonstration of genomic diversity by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 31, 3007–3012.
- Green, K.Y., 2016. Noroviruses and B Cells. *Clin. Infect. Dis.* 62, 1139–1140.
- Green, S.M., Lambden, P.R., Owen Caul, E., Ashley, C.R., Clarke, I.N., 1995. Capsid diversity in small round-structured viruses: molecular characterization of an antigenically distinct human enteric calicivirus. *Virus Res.* 37, 271–283.
- Grima, A., Gatt, A., Zahra, G., Gamin, A., 2009. Outbreak of Norovirus Infection in a Nursing Home for the Elderly in Malta, November-December 2008. *Euro Surveill.* 14, 4–6.
- Guix, S., Asanaka, M., Katayama, K., Crawford, S.E., Neill, F.H., Atmar, R.L., Estes, M.K., 2007. Norwalk virus RNA is infectious in mammalian cells. *J. Virol.* 81, 12238–12248.
- Hall, A.J., Lopman, B.A., Payne, D.C., Patel, M.M., Gastañaduy, P.A., Vinjé, J., Parashar, U.D., 2013. Norovirus Disease in the United States. *Emerg. Infect. Dis.* 19, 1198–1205.
- Hall, A.J., Rosenthal, M., Gregoricus, N., Greene, S.A., Ferguson, J., Henao, O.L., Vinjé, J., Lopman, B.A., Parashar, U.D., Widdowson, M.A., 2011. Incidence of acute gastroenteritis and role of norovirus, Georgia, USA, 2004-2005. *Emerg. Infect. Dis.* 17, 1381–1388.
- Halliday, M.L., Kang, L.-Y., Zhou, T.-K., Hu, M.-D., Pan, Q.-C., Fu, T.-Y., Huang, Y.-S., Hu, S.-L., 1991. An Epidemic of Hepatitis A Attributable to the Ingestion of Raw Clams in Shanghai, China. *J. Infect. Dis.* 164, 852–859.
- Han, M.G., Smiley, J.R., Thomas, C., Saif, L.J., 2004. Genetic recombination between two genotypes of genogroup III bovine noroviruses (BoNVs) and capsid sequence diversity among BoNVs and Nebraska-like bovine enteric caliciviruses. *J. Clin. Microbiol.* 42, 5214–5224.
- Hansen, S., Stamm-Balderjahn, S., Zuschneid, I., Behnke, M., Rüden, H., Vonberg, R.-P., Gastmeier, P., 2007. Closure of medical departments during nosocomial outbreaks: data from a systematic analysis of the literature. *J. Hosp. Infect.* 65, 348–353.
- Hardy, M.E., 2005. Norovirus protein structure and function. *FEMS Microbiol. Lett.* 253, 1–8.
- Harrington, P.R., Lindesmith, L., Yount, B., Moe, C.L., Baric, R.S., 2002. Binding of Norwalk virus-like particles to ABH histo-blood group antigens is blocked by antisera from infected human volunteers or experimentally vaccinated mice. *J. Virol.* 76, 12335–12343.
- Harrington, P.R., Vinjé, J., Moe, C.L., Baric, S., Vinje, J., Baric, R.S., 2004. Norovirus Capture with Histo-Blood Group Antigens Reveals Novel Virus-Ligand Interactions Norovirus Capture with Histo-Blood Group Antigens Reveals Novel Virus-Ligand Interactions 78, 3035–3045.

- Hartard, C., Banas, S., Loutreul, J., Rincé, A., Benoit, F., Boudaud, N., Gantzer, C., 2016. Relevance of F-Specific RNA Bacteriophages in Assessing Human Norovirus Risk in Shellfish and Environmental Waters. *Appl. Environ. Microbiol.* 82, 5709–5719.
- Hartard, C., Banas, S., Rivet, R., Boudaud, N., Gantzer, C., 2017. Rapid and sensitive method to assess human viral pollution in shellfish using infectious F-specific RNA bacteriophages: Application to marketed products. *Food Microbiol.* 63, 248–254.
- Hartard, C., Rivet, R., Banas, S., Gantzer, C., 2015. Occurrence of and Sequence Variation among F-Specific RNA Bacteriophage Subgroups in Feces and Wastewater of Urban and Animal Origins. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 6505–6515.
- Harwood, V.J., Boehm, A.B., Sassoubre, L.M., Vijayavel, K., Stewart, J.R., Fong, T.T., Caprais, M.P., Converse, R.R., Diston, D., Ebdon, J., Fuhrman, J.A., Gourmelon, M., Gentry-Shields, J., Griffith, J.F., Kashian, D.R., Noble, R.T., Taylor, H., Wicki, M., 2013. Performance of viruses and bacteriophages for fecal source determination in a multi-laboratory, comparative study. *Water Res.* 47, 6929–6943.
- Harwood, V.J., Levine, A.D., Scott, T.M., Chivukula, V., Lukasik, J., Farrah, S.R., Rose, J.B., 2005. Validity of the Indicator Organism Paradigm for Pathogen Reduction in Reclaimed Water and Public Health Protection. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 3163–3170.
- Havelaar, A.H., Kirk, M.D., Torgerson, P.R., Gibb, H.J., Hald, T., Lake, R.J., Praet, N., Bellinger, D.C., de Silva, N.R., Gargouri, N., Speybroeck, N., Cawthorne, A., Mathers, C., Stein, C., Angulo, F.J., Devleesschauwer, B., 2015. World Health Organization Global Estimates and Regional Comparisons of the Burden of Foodborne Disease in 2010. *PLOS Med.* 12, e1001923.
- Havelaar, A.H., van Olphen, M., Drost, Y.C., 1993. F-specific RNA bacteriophages are adequate model organisms for enteric viruses in fresh water. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 2956–2962.
- Hedlund, K.O., Rubilar-Abreu, E., Svensson, L., 2000. Epidemiology of Calicivirus Infections in Sweden , 1994 – 1998. *J. Infect. Dis.* 181, S275-280.
- Hennessy, T.W., Hedberg, C.W., Slutsker, L., White, K.E., Besser-Wiek, J.M., Moen, M.E., Feldman, J., Coleman, W.W., Edmonson, L.M., MacDonald, K.L., Osterholm, M.T., 1996. A National Outbreak of *Salmonella enteritidis* Infections from Ice Cream. *N. Engl. J. Med.* 334, 1281–1286.
- Herbert, T.P., Brierley, I., Brown, T.D.K., 1997. Identification of a protein linked to the genomic and subgenomic mRNAs of feline calicivirus and its role in translation. *J. Gen. Virol.* 78, 1033–1040.
- Herbst-Kralovetz, M.M., Radtke, A.L., Lay, M.K., Hjelm, B.E., Bolick, A.N., Sarker, S.S., Atmar, R.L., Kingsley, D.H., Arntzen, C.J., Estes, M.K., Nickerson, C.A., 2013. Lack of norovirus replication and histo-blood group antigen expression in 3-dimensional intestinal epithelial cells. *Emerg. Infect. Dis.* 19, 431–438.
- Herod, M.R., Prince, C.A., Skilton, R.J., Ward, V.K., Cooper, J.B., Clarke, I.N., 2014. Structure-based design and functional studies of novel noroviral 3C protease chimaeras offer insights into substrate specificity. *Biochem. J.* 464, 461–472.
- Hinkula, J., Ball, J.M., Lofgren, S., Estes, M.K., Svensson, L., 1995. Antibody Prevalence and Immunoglobulin IgG Subclass Pattern to Norwalk Virus in Sweden. *J. Med. Virol.* 47, 52–57.

- Hoa Tran, T.N., Trainor, E., Nakagomi, T., Cunliffe, N.A., Nakagomi, O., 2013. Molecular epidemiology of noroviruses associated with acute sporadic gastroenteritis in children: Global distribution of genogroups, genotypes and GII.4 variants. *J. Clin. Virol.* 56, 185–193.
- Hoebe, C.J.P.A., Vennema, H., de Roda Husman, A.M., van Duynhoven, Y.T.H.P., 2004. Norovirus outbreak among primary schoolchildren who had played in a recreational water fountain. *J. Infect. Dis.* 189, 699–705.
- Hoefnagel, J., van de Weerd, D.H., Schaefer, O., Koene, R., 2012. A norovirus outbreak triggered by copper intoxication on a coach trip from the Netherlands to Germany, April 2010. *Euro Surveill.* 17, pii=20104.
- Hoehne, M., Schreier, E., 2006. Detection of Norovirus genogroup I and II by multiplex real-time RT-PCR using a 3'-minor groove binder-DNA probe. *BMC Infect. Dis.* 6, 69.
- Hoffmann, S., Batz, M.B., Morris Jr., J.G., 2012. Annual Cost of Illness and Quality-Adjusted Life Year Losses in the United States Due to 14 Foodborne Pathogens. *J. Food Prot.* 75, 1292–1302.
- Högbom, M., Jäger, K., Robel, I., Unge, T., Rohayem, J., 2009. The active form of the norovirus RNA-dependent RNA polymerase is a homodimer with cooperative activity. *J. Gen. Virol.* 90, 281–291.
- Hsu, C.C., Riley, L.K., Livingston, R.S., 2007. Molecular characterization of three novel murine noroviruses. *Virus Genes* 34, 147–155.
- Huang, P., Farkas, T., Marionneau, S., Zhong, W., Ruvoën-Clouet, N., Morrow, A.L., Altaye, M., Pickering, L.K., Newburg, D.S., LePendu, J., Jiang, X., 2003. Noroviruses bind to human ABO, Lewis, and secretor histo-blood group antigens: identification of 4 distinct strain-specific patterns. *J. Infect. Dis.* 188, 19–31.
- Huang, P., Farkas, T., Zhong, W., Tan, M., Thornton, S., Morrow, A.L., Jiang, X., Harbor, P., 2005. Norovirus and Histo-Blood Group Antigens: Demonstration of a Wide Spectrum of Strain Specificities and Classification of Two Major Binding Groups among Multiple Binding Patterns 79, 6714–6722.
- Hue, O., Le Bouquin, S., Laisney, M., Allain, V., Lalande, F., 2008. Enquête sur la contamination de *Campylobacter* spp. des carcasses de poulets de chair en France en 2008 et les facteurs associés. *Bull. épidémiologique, santé Anim. Aliment.* 41, 9–11.
- Hutson, A.M., Airaud, F., LePendu, J., Estes, M.K., Atmar, R.L., 2005. Norwalk virus infection associates with secretor status genotyped from sera. *J. Med. Virol.* 77, 116–120.
- Hutson, A.M., Atmar, R.L., Graham, D.Y., Estes, M.K., 2002. Norwalk Virus Infection and Disease Is Associated with ABO Histo–Blood Group Type. *J. Infect. Dis.* 185, 1335–1337.
- Huynen, P., Mauroy, A., Martin, C., Savadogo, L.G.B., Boreux, R., Thiry, E., Melin, P., De Mol, P., 2013. Molecular epidemiology of norovirus infections in symptomatic and asymptomatic children from Bobo Dioulasso, Burkina Faso. *J. Clin. Virol.* 58, 515–521.
- Hyde, J.L., Mackenzie, J.M., 2010. Subcellular localization of the MNV-1 ORF1 proteins and their potential roles in the formation of the MNV-1 replication complex. *Virology* 406, 138–148.

- Hyde, J.L., Sosnovtsev, S. V., Green, K.Y., Wobus, C., Virgin, H.W., Mackenzie, J.M., 2009. Mouse Norovirus Replication Is Associated with Virus-Induced Vesicle Clusters Originating from Membranes Derived from the Secretory Pathway. *J. Virol.* 83, 9709–9719.
- Hymas, W., Atkinson, A., Stevenson, J., Hillyard, D., 2007. Use of modified oligonucleotides to compensate for sequence polymorphisms in the real-time detection of norovirus. *J. Virol. Methods* 142, 10–14.
- Ike, A.C., Brockmann, S.O., Hartelt, K., Marschang, R.E., Contzen, M., Oehme, R.M., 2006. Molecular epidemiology of norovirus in outbreaks of gastroenteritis in Southwest Germany from 2001 to 2004. *J. Clin. Microbiol.* 44, 1262–1267.
- InVS, 2015. Surveillance des toxi-infections alimentaires collectives. Données la déclaration obligatoire, 2014.
- InVS, 2003. Nouveau dispositif de notification anonymisée des maladies infectieuses à déclaration obligatoire. *Bull. Epidemiol. Hebd.* 12–13, 69–76.
- Ito, S., Takeshita, S., Nezu, A., Aihara, Y., Usuku, S., Noguchi, Y., Yokota, S., 2006. Norovirus-Associated Encephalopathy. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 25, 651–652.
- Jacobsen, K.H., Wiersma, S.T., 2010. Hepatitis A virus seroprevalence by age and world region, 1990 and 2005. *Vaccine* 28, 6653–6657.
- Jeong, A.Y., Jeong, H.S., Lee, J.S., Park, Y.C., Lee, S.H., Hwang, I.G., Kim, Y.J., Kim, Y.J., Jo, M.Y., Jung, S., Kim, K., Cheon, D.S., 2013. Occurrence of norovirus infections in asymptomatic food handlers in South Korea. *J. Clin. Microbiol.* 51, 598–600.
- Jiang, X., Graham, D.Y., Wang, K.N., Estes, M.K., Xi, J.N., Graham, D.Y., Wang, K.N., Estes, M.K., 1990. Norwalk virus genome cloning and characterization. *Science* 250, 1580–1583.
- Jiang, X., Wang, J., Graham, D.Y., Estes, M.K., 1992a. Detection of Norwalk virus in stool by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 30, 2529–2534.
- Jiang, X., Wang, M., Graham, D.Y., Estes, M.K., 1992b. Expression, self-assembly, and antigenicity of the Norwalk virus capsid protein. *J. Virol.* 66, 6527–6532.
- Jiang, X., Wang, M., Wang, K., Estes, M.K., 1993. Sequence and Genomic organization of Norwalk Virus. *Virology* 195, 51–61.
- Jiang, X., Wilton, N., Zhong, W.M., Farkas, T., Huang, P.W., Barrett, E., Guerrero, M., Ruiz-Palacios, G., Green, K.Y., Green, J., Hale, A.D., Estes, M.K., Pickering, L.K., Matson, D.O., 2000. Diagnosis of Human Caliciviruses by Use of Enzyme Immunoassays. *J. Infect. Dis.* 181, S349–S359.
- Jing, Y., Qian, Y., Huo, Y., Wang, L., Jiang, X., 2000. Seroprevalence Against Norwalk-Like Human Caliciviruses in Beijing , China 101, 97–101.
- Jofre, J., Lucena, F., Blanch, A., Muniesa, M., 2016. Coliphages as Model Organisms in the Characterization and Management of Water Resources. *Water* 8, 199.
- Johnson, P.C., Mathewson, J.J., DuPont, H.L., Greenberg, H.B., 1990. Multiple-challenge study of host susceptibility to norwalk gastroenteritis in US adults. *J. Infect. Dis.* 161, 18–21.

- Johnston, C.P., Qiu, H., Ticehurst, J.R., Dickson, C., Rosenbaum, P., Lawson, P., Stokes, A.B., Lowenstein, C.J., Kaminsky, M., Cosgrove, S.E., Green, K.Y., Perl, T.M., 2007. Outbreak management and implications of a nosocomial norovirus outbreak. *Clin. Infect. Dis.* 45, 534–540.
- Jones, M.K., Grau, K.R., Costantini, V., Kolawole, A.O., de Graaf, M., Freiden, P., Graves, C.L., Koopmans, M., Wallet, S.M., Tibbetts, S.A., Schultz-Cherry, S., Wobus, C.E., Vinjé, J., Karst, S.M., 2015. Human norovirus culture in B cells. *Nat. Protoc.* 10, 1939–1947.
- 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., Vinje, J., Tibbetts, S.A., Wallet, S.M., Karst, S.M., 2014. Enteric bacteria promote human and mouse norovirus infection of B cells. *Science* 346, 755–759.
- Kageyama, T., Kojima, S., Shinohara, M., Uchida, K., Fukushi, S., Hoshino, F.B., Takeda, N., Katayama, K., 2003. Broadly Reactive and Highly Sensitive Assay for Norwalk-Like Viruses Based on Real-Time Quantitative Reverse Transcription-PCR. *J. Clin. Microbiol.* 41, 1548–1557.
- Kaiser, W.J., Chaudhry, Y., Sosnovtsev, S. V, Goodfellow, I.G., 2006. Analysis of protein-protein interactions in the feline calicivirus replication complex. *J. Gen. Virol.* 87, 363–8.
- Kamar, N., Bendall, R., Legrand-Abravanel, F., Xia, N.-S., Ijaz, S., Izopet, J., Dalton, H.R., 2012. Hepatitis E. *Lancet* 379, 2477–2488.
- Kanai, T., Yotsumoto, S., Momoi, M.Y., 2010. Norovirus-associated renal acute renal failure with nephrotic syndrome. *Pediatr. Int.* 52, 23–25.
- Kapikian, A.Z., Wyatt, R.G., Dolin, R., Thornhill, T.S., Kalica, A.R., Chanock, R.M., 1972. Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *J. Virol.* 10, 1075–1081.
- Kaplan, J.E., Feldman, R., Campbell, D.S., Lookabaugh, C., Gary, G.W., 1982a. The frequency of a Norwalk-like pattern of illness in outbreaks of acute gastroenteritis. *Am. J. Public Health* 72, 1329–1332.
- Kaplan, J.E., Goodman, R.A., Schonberger, L.B., Lippy, E.C., Gary, G.W., 1982b. Gastroenteritis due to Norwalk virus: an outbreak associated with a municipal water system. *J Infect Dis* 146, 190–197.
- Karst, S.M., 2016. The influence of commensal bacteria on infection with enteric viruses. *Nat Rev Micro* advance on, 197–204.
- Karst, S.M., 2015. Identification of a novel cellular target and a co-factor for norovirus infection – B cells and commensal bacteria. *Gut Microbes* 6, 266–271.
- Karst, S.M., 2010. Pathogenesis of Noroviruses, Emerging RNA Viruses. *Viruses* 2, 748–781.
- Karst, S.M., 2003. STAT1-Dependent Innate Immunity to a Norwalk-Like Virus. *Science* 299, 1575–1578.
- Karst, S.M., Tibbetts, S.A., 2016. Recent advances in understanding norovirus pathogenesis. *J. Med. Virol.* 30, 4799–4804.
- Karst, S.M., Wobus, C.E., 2015. A Working Model of How Noroviruses Infect the Intestine. *PLOS Pathog.* 11, e1004626.

- Karst, S.M., Wobus, C.E., Goodfellow, I.G., Green, K.Y., Virgin, H.W., 2014. Advances in norovirus biology. *Cell Host Microbe* 15, 668–680.
- Kele, B., Lengyel, G., Deak, J., 2011. Comparison of an ELISA and two reverse transcription polymerase chain reaction methods for norovirus detection. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 70, 475–478.
- Keswick, B.H., Satterwhite, T.K., Johnson, P.C., DuPont, H.L., Secor, S.L., Bitsura, J.A., Gary, G.W., Hoff, J.C., 1985. Inactivation of Norwalk virus in drinking water by chlorine. *Appl. Environ. Microbiol.* 50, 261–264.
- Khan, A.S., Moe, C.L., Glass, R.I., Monroe, S.S., Estes, M.K., Chapman, L.E., Jiang, X., Humphrey, C., Pon, E., Iskander, J.K., Schonberger, L.B., 1994. Norwalk virus-associated gastroenteritis traced to ice consumption aboard a cruise ship in Hawaii: Comparison and application of molecular method- based assays. *J. Clin. Microbiol.* 32, 318–322.
- King, A.M.Q., Adams, M.J., Carstens, E.B., Lefkowitz, E.J., 2012. Virus Taxonomy. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, Elsevier. ed. San Diego.
- Kirby, A., Gurgel, R.Q., Dove, W., Vieira, S.C.F., Cunliffe, N.A., Cuevas, L.E., 2010. An evaluation of the RIDASCREEN and IDEIA enzyme immunoassays and the RIDAQUICK immunochromatographic test for the detection of norovirus in faecal specimens. *J. Clin. Virol.* 49, 254–257.
- Kirby, A., Iturriza-Gomara, M., 2012. Norovirus diagnostics: options, applications and interpretations. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 10, 423–433.
- Kirking, H.L., Cortes, J., Burrer, S., Hall, A.J., Cohen, N.J., Lipman, H., Kim, C., Daly, E.R., Fishbein, D.B., 2010. Likely transmission of norovirus on an airplane, October 2008. *Clin. Infect. Dis.* 50, 1216–1221.
- Ko, S.-M., Kim, J.-O., Oh, M.-J., Kim, D., 2011. Effects of an Oxidative Agent and Lectins on the Binding Inhibition of Recombinant Hepatitis A Virus Proteins to Oyster Digestive Tissues. *J. Food Prot.* 74, 157–160.
- Koda, Y., Soejima, M., Kimura, H., 2001. The polymorphisms of fucosyltransferases. *Leg. Med.* 3, 2–14.
- Koopmans, M., Duizer, E., 2004. Foodborne viruses: an emerging problem. *Int. J. Food Microbiol.* 90, 23–41.
- Koopmans, M., von Bonsdorff, C.H., Vinjé, J., de Medici, D., Monroe, S., 2002. Foodborne viruses. *FEMS Microbiol. Rev.* 26, 187–205.
- Kornylo, K., Kim, D.K., Widdowson, M.A., Turabelidze, G., Averhoff, F.M., 2009. Risk of norovirus transmission during air travel. *J. Travel Med.* 16, 349–351.
- Kroneman, A., Vega, E., Vennema, H., Vinjé, J., White, P.A., Hansman, G., Green, K., Martella, V., Katayama, K., Koopmans, M., 2013. Proposal for a unified norovirus nomenclature and genotyping. *Arch. Virol.* 158, 2059–2068.
- Kumar, A., Beniwal, M., Kar, P., Sharma, J.B., Murthy, N.S., 2004. Hepatitis E in pregnancy. *Int. J. Gynecol. Obstet.* 85, 240–244.
- Lambden, P.R., Caul, E.O., Ashley, C.R., Clarke, I.N., 1993. Sequence and genome organization of a human small round-structured (Norwalk-like) virus. *Science* 259, 516–519.

- Lanata, C.F., Fischer-Walker, C.L., Olascoaga, A.C., Torres, C.X., Aryee, M.J., Black, R.E., 2013. Global Causes of Diarrheal Disease Mortality in Children <5 Years of Age: A Systematic Review. *PLoS One* 8, e72788.
- Lay, M.K., Atmar, R.L., Guix, S., Bharadwaj, U., He, H., Neill, F.H., Sastry, K.J., Yao, Q., Estes, M.K., 2010. Norwalk virus does not replicate in human macrophages or dendritic cells derived from the peripheral blood of susceptible humans. *Virology* 406, 1–11.
- Le Guyader, F., Neill, F.H., Estes, M.K., Monroe, S.S., Ando, T., Atmar, R.L., 1996. Detection and analysis of a small round-structured virus strain in oysters implicated in an outbreak of acute gastroenteritis. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 4268–4272.
- Le Guyader, F.S., Bon, F., DeMedici, D., Parnaudeau, S., Bertone, A., Crudeli, S., Doyle, A., Zidane, M., Suffredini, E., Kohli, E., Maddalo, F., Monini, M., Gallay, A., Pommepuy, M., Pothier, P., Ruggeri, F.M., 2006a. Detection of multiple noroviruses associated with an international gastroenteritis outbreak linked to oyster consumption. *J. Clin. Microbiol.* 44, 3878–3882.
- Le Guyader, F.S., Le Saux, J.-C., Ambert-Balay, K., Krol, J., Serais, O., Parnaudeau, S., Giraudon, H., Delmas, G., Pommepuy, M., Pothier, P., Atmar, R.L., 2008. Aichi Virus, Norovirus, Astrovirus, Enterovirus, and Rotavirus Involved in Clinical Cases from a French Oyster-Related Gastroenteritis Outbreak. *J. Clin. Microbiol.* 46, 4011–4017.
- Le Guyader, F.S., Loisy, F., Atmar, R.L., Hutson, A.M., Estes, M.K., Ruvoën-Clouet, N., Pommepuy, M., Le Pendu, J., 2006b. Norwalk Virus-specific Binding to Oyster Digestive Tissues. *Emerg. Infect. Dis.* 12, 931–936.
- Le Guyader, F.S., Mittelholzer, C., Haugarreau, L., Hedlund, K.O., Alsterlund, R., Pommepuy, M., Svensson, L., 2004. Detection of noroviruses in raspberries associated with a gastroenteritis outbreak. *Int. J. Food Microbiol.* 97, 179–186.
- Le Pendu, J., Ruvoën-Clouet, N., Kindberg, E., Svensson, L., 2006. Mendelian resistance to human norovirus infections. *Semin. Immunol.* 18, 375–386.
- Leclerc, H., Mossel, D.A.A., 1989. *Microbiologie : le tube digestif, l'eau et les aliments*, Doin. ed.
- Lecuit, M., 2007. Human listeriosis and animal models. *Microbes Infect.* 9, 1216–1225.
- Lee, R.M., Lessler, J., Lee, R.A., Rudolph, K.E., Reich, N.G., Perl, T.M., Cummings, D.A., 2013. Incubation periods of viral gastroenteritis: a systematic review. *BMC Infect. Dis.* 13, 446.
- Lees, D., 2010. International standardisation of a method for detection of human pathogenic viruses in molluscan shellfish. *Food Environ. Virol.* 2, 146–155.
- Lees, D., 2000. Viruses and bivalve shellfish. *Int. J. Food Microbiol.* 59, 81–116.
- Lees, D.N., Henshilwood, K., Green, J., Gallimore, C.I., Brown, D.W., 1995. Detection of small round structured viruses in shellfish by reverse transcription-PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 4418–4424.
- Lei, S., Samuel, H., Twitchell, E., Bui, T., Ramesh, A., Wen, K., Weiss, M., Li, G., Yang, X., Jiang, X., Yuan, L., 2016. *Enterobacter cloacae* inhibits human norovirus infectivity in gnotobiotic pigs. *Sci. Rep.* 6, 25017.

- Leuenberger, S., Widdowson, M.A., Feilchenfeldt, J., Egger, R., Streuli, R.A., 2007. Norovirus outbreak in a district general hospital - New strain identified. *Swiss Med. Wkly.* 137, 57–61.
- Lewis, D., Ando, T., Humphrey, C.D., Monroe, S.S., Glass, R.I., 1995. Use of solid-phase immune electron microscopy for classification of Norwalk-like viruses into six antigenic groups from 10 outbreaks of gastroenteritis in the United States. *J. Clin. Microbiol.* 33, 501–504.
- Li, D., Baert, L., Van Coillie, E., Uyttendaele, M., 2011. Critical studies on binding-based RT-PCR detection of infectious Noroviruses. *J. Virol. Methods* 177, 153–159.
- Lindesmith, L., Moe, C., LePendu, J., Frelinger, J.A., Treanor, J., Baric, R.S., 2005. Cellular and Humoral Immunity following Snow Mountain Virus Challenge. *J. Virol.* 79, 2900–2909.
- Lindesmith, L., Moe, C., Marionneau, S., Ruvoen, N., Jiang, X., Lindblad, L., Stewart, P., LePendu, J., Baric, R., Lindesmith, L., Moe, C., Marionneau, S., Ruvoen, N., Jiang, X., Lindblad, L., Stewart, P., LePendu, J., Baric, R., 2003. Human susceptibility and resistance to Norwalk virus infection. *Nat Med* 9, 548–553.
- Lindesmith, L.C., Donaldson, E.F., LoBue, A.D., Cannon, J.L., Zheng, D.-P., Vinje, J., Baric, R.S., 2008. Mechanisms of GII.4 Norovirus Persistence in Human Populations. *PLoS Med.* 5, e31.
- Loisy, F., Atmar, R.L., Guillou, P., Le Cann, P., Pommepuy, M., Le Guyader, F.S., 2005. Real-time RT-PCR for norovirus screening in shellfish. *J. Virol. Methods* 123, 1–7.
- Lopman, B.A., Steele, D., Kirkwood, C.D., Parashar, U.D., 2016. The Vast and Varied Global Burden of Norovirus: Prospects for Prevention and Control. *PLOS Med.* 13, e1001999.
- Lopman, B., Atmar, R., Baric, R., Estes, M., Green, K., Glass, R., Hall, A., Iturriza-Gomara, M., Kang, C., Lee, B., Parashar, U., Riddle, M., Vinjé, J., 2015. Global burden of norovirus and prospects for vaccine development. *CDC*. 1–46.
- Lopman, B., Reacher, M., van Duijnhoven, Y., Hanon, F.-X., Brown, D., Koopmans, M., 2003. Viral Gastroenteritis Outbreaks in Europe, 1995–2000. *Emerg. Infect. Dis.* 9, 90–96.
- Lopman, B., Vennema, H., Kohli, E., Pothier, P., Sanchez, A., Negredo, A., Buesa, J., Schreier, E., Reacher, M., Brown, D., Gray, J., Iturriza, M., Gallimore, C., Bottiger, B., Hedlund, K.-O., Torvén, M., von Bonsdorff, C.-H., Maunula, L., Poljsak-Prijatelj, M., Zimsek, J., Reuter, G., Szücs, G., Melegh, B., Svensson, L., van Duijnhoven, Y., Koopmans, M., 2004. Increase in viral gastroenteritis outbreaks in Europe and epidemic spread of new norovirus variant. *Lancet* 363, 682–688.
- Loutreul, J., Cazeaux, C., Levert, D., Nicolas, A., Vautier, S., Le Sauvage, A.L., Perelle, S., Morin, T., 2014. Prevalence of Human Noroviruses in Frozen Marketed Shellfish, Red Fruits and Fresh Vegetables. *Food Environ. Virol.* 6, 157–168.
- Lowther, J.A., Avant, J.M., Gyzynski, K., Rangdale, R.E., Lees, D.N., 2010. Comparison between quantitative real-time reverse transcription PCR results for norovirus in oysters and self-reported gastroenteric illness in restaurant customers. *J. Food Prot.* 73, 305–311.
- Lowther, J.A., Gustar, N.E., Hartnell, R.E., Lees, D.N., 2012a. Comparison of Norovirus RNA Levels in Outbreak-Related Oysters with Background Environmental Levels. *J. Food Prot.* 75, 389–393.

- Lowther, J.A., Gustar, N.E., Powell, A.L., Hartnell, R.E., Lees, D.N., 2012b. Two-Year Systematic Study To Assess Norovirus Contamination in Oysters from Commercial Harvesting Areas in the United Kingdom. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 5812–5817.
- Lu, J., Sun, L., Fang, L., Yang, F., Mo, Y., Lao, J., Zheng, H., Tan, X., Lin, H., Rutherford, S., Guo, L., Ke, C., Hui, L., 2015. Gastroenteritis outbreaks caused by norovirus GII.17, Guangdong Province, China, 2014–2015. *Emerg. Infect. Dis.* 21, 1240–1242.
- Luo, J., Xu, Z., Nie, K., Ding, X., Guan, L., Wang, J., Xian, Y., Wu, X., Ma, X., 2014. Visual Detection of Norovirus Genogroup II by Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification with Hydroxynaphthol Blue Dye. *Food Environ. Virol.* 6, 196–201.
- Lysén, M., Thorhagen, M., Brytting, M., Hjertqvist, M., Andersson, Y., Hedlund, K.O., 2009. Genetic diversity among food-borne and waterborne norovirus strains causing outbreaks in Sweden. *J. Clin. Microbiol.* 47, 2411–2418.
- Maalouf, H., Schaeffer, J., Parnaudeau, S., Le Pendu, J., Atmar, R.L., Crawford, S.E., Le Guyader, F.S., 2011. Strain-dependent norovirus bioaccumulation in oysters. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 3189–3196.
- Maalouf, H., Zakhour, M., Le Pendu, J., Le Saux, J.-C., Atmar, R.L., Le Guyader, F.S., 2010. Distribution in Tissue and Seasonal Variation of Norovirus Genogroup I and II Ligands in Oysters. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 5621–5630.
- Mabbott, N.A., Donaldson, D.S., Ohno, H., Williams, I.R., Mahajan, A., 2013. Microfold (M) cells: important immunosurveillance posts in the intestinal epithelium. *Mucosal Immunol.* 6, 666–677.
- Malek, M., Barzilay, E., Kramer, A., Camp, B., Jaykus, L.-A., Escudero-Abarca, B., Derrick, G., White, P., Gerba, C., Higgins, C., Vinje, J., Glass, R., Lynch, M., Widdowson, M.-A., 2009. Outbreak of norovirus infection among river rafters associated with packaged delicatessen meat, Grand Canyon, 2005. *Clin. Infect. Dis.* 48, 31–37.
- Marionneau, S., Cailleau-Thomas, A., Rocher, J., Le Moullac-Vaidye, B., Ruvoën, N., Clément, 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.
- Marionneau, S., Ruvoën, N., Le Moullac-Vaidye, B., Clement, M., Cailleau-Thomas, A., Ruiz-Palacois, G., Huang, P., Jiang, X., Le Pendu, J., 2002. Norwalk virus binds to histo-blood group antigens present on gastroduodenal epithelial cells of secretor individuals. *Gastroenterology* 122, 1967–1977.
- Marks, P., Vipond, I., Carlisle, D., Deakin, D., Fey, R., Caul, E., 2000. Evidence for airborne transmission of Norwalk-like virus (NLV) in a hotel restaurant. *Epidemiol. Infect.* 124, 481–487.
- Marques Mendanha de Oliveira, D., Souza, M., Souza Fiaccadori, F., César Pereira Santos, H., das Dôres de Paula Cardoso, D., 2014. Monitoring of Calicivirus among day-care children: Evidence of asymptomatic viral excretion and first report of GI.7 norovirus and GI.3 sapovirus in Brazil. *J. Med. Virol.* 86, 1569–1575.
- Martella, V., Campolo, M., Lorusso, E., Cavicchio, P., Camero, M., Bellacicco, A.L., Decaro, N., Elia, G., Greco, G., Corrente, M., Desario, C., Arista, S., Banyai, K., Koopmans, M., Buonavoglia, C., 2007. Norovirus in captive lion cub (*Panthera leo*). *Emerg. Infect. Dis.* 13, 1071–1073.

- Martella, V., Decaro, N., Lorusso, E., Radogna, A., Moschidou, P., Amorisco, F., Lucente, M.S., Desario, C., Mari, V., Elia, G., Banyai, K., Carmichael, L.E., Buonavoglia, C., 2009. Genetic heterogeneity and recombination in canine noroviruses. *J. Virol.* 83, 11391–11396.
- Matsui, S.M., Greenberg, H.B., 1990. Immunity to Calicivirus Infection 331–335.
- Matsushima, Y., Ishikawa, M., Shimizu, T., Komane, A., Kasuo, S., Shinohara, M., Nagasawa, K., Kimura, H., Ryo, A., Okabe, N., Haga, K., Doan, Y.H., Katayama, K., Shimizu, H., 2015. Genetic analyses of GII.17 norovirus strains in diarrheal disease outbreaks from december 2014 to march 2015 in Japan reveal a novel polymerase sequence and amino acid substitutions in the capsid region. *Euro Surveill.* 20, pii=.
- Mattison, K., Shukla, A., Cook, A., Pollari, F., Friendship, R., Kelton, D., Bidawid, S., Farber, J.M., 2007. Human noroviruses in swine and cattle. *Emerg. Infect. Dis.* 13, 1184–1188.
- Mattner, F., Mattner, L., Borck, H.U., Gastmeier, P., 2005. Evaluation of the Impact of the Source (Patient Versus Staff) on Nosocomial Norovirus Outbreak Severity. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 26, 268–272.
- Maunula, L., Kalso, S., Von Bonsdorff, C.H., Pönkä, A., 2004. Wading pool water contaminated with both noroviruses and astroviruses as the source of a gastroenteritis outbreak. *Epidemiol. Infect.* 132, 737–743.
- Maunula, L., Roivainen, M., Keränen, M., Mäkelä, S., Söderberg, K., Summa, M., von Bonsdorff, C.H., Lappalainen, M., Korhonen, T., Kuusi, M., Niskanen, T., 2009. Detection of human norovirus from frozen raspberries in a cluster of gastroenteritis outbreaks. *Euro Surveill.* 14, pii=17435.
- Mayet, A., Andréo, V., Bédubourg, G., Victorion, S., Plantec, J.Y., Soullié, B., Meynard, J.B., Dedieu, J.J., Polvèche, P.Y., Migliani, R., 2011. Food-borne outbreak of norovirus infection in a French military parachuting unit, april 2011. *Euro Surveill.* 16, pii=19930.
- Mazuet, C., Bouvet, P., King, L.A., Popoff, M., 2011. Le botulisme humain en France, 2007–2009. *Bull. Epidémiol. Hebdo.* 6, 49–63.
- Mazuet, C., King, L.A., Bouvet, P., Legeay, C., Sautereau, J., Popoff, M.R., 2014. Le botulisme humain en France, 2010/2012. *Bull. Epidemiol. Hebd.* 6, 106–114.
- McLellan, N.L., Lee, H., Associate, M.B.H., 2016. Evaluation of propidium monoazide and long-amplicon qPCR as an infectivity assay for coliphage. *J. Virol. Methods* 238, 48–55.
- Medici, M.C., Abelli, L.A., Dodi, I., Dettori, G., Chezzi, C., 2010. Norovirus RNA in the blood of a child with gastroenteritis and convulsions-A case report. *J. Clin. Virol.* 48, 147–149.
- Medici, M.C., Tummolo, F., Calderaro, A., Chironna, M., Giammanco, G.M., De Grazia, S., Arcangeletti, M.C., De Conto, F., Chezzi, C., Martella, V., 2015. Identification of the novel Kawasaki 2014 GII.17 human norovirus strain in Italy, 2015. *Euro Surveill.* 20, pii=30010.
- Mesquita, J.R., Barclay, L., Nascimento, M.S.J., Vinjé, J., 2010. Novel Norovirus in Dogs with Diarrhea. *Emerg. Infect. Dis.* 16, 980–982.
- Metcalf, T.G., Moulton, E., Eckerson, D., 1980. Improved method and test strategy for recovery of enteric viruses from shellfish. *Appl. Environ. Microbiol.* 39, 141–152.
- Miller, I., Gunson, R., Carman, W.F., 2002. Norwalk like virus by light cycler PCR. *J. Clin. Virol.* 25, 231–232.

- Ministère de la santé et des solidarités, 2005. Décret n° 2005-1395 du 10 novembre 2005 modifiant la liste des maladies faisant l'objet d'une transmission obligatoire de données individuelles à l'autorité sanitaire. *J. Off. République Française*. 263, 17704.
- Ministère des affaires sociales et de l'emploi, 1986. Décret n° 86-770 du 10 juin 1986 fixant la liste des maladies dont la déclaration est obligatoire en application de l'article L. 11 du code de la santé publique. *J. Off. République Française*. 7409–7410.
- Miura, T., Sano, D., Suenaga, A., Yoshimura, T., Fuzawa, M., Nakagomi, T., Nakagomi, O., Okabe, S., 2013. Histo-Blood Group Antigen-Like Substances of Human Enteric Bacteria as Specific Adsorbents for Human Noroviruses. *J. Virol.* 87, 9441–9451.
- Moe, C.L., Gentsch, J., Ando, T., Grohmann, G., Monroe, S.S., Jiang, X., Wang, J., Estes, M.K., Seto, Y., Humphrey, C., Stine, S., Glass, R.I., 1994. Application of PCR to detect Norwalk virus in fecal specimens from outbreaks of gastroenteritis. *J. Clin. Microbiol.* 32, 642–648.
- Mohamed, N., Belák, S., Hedlund, K.O., Blomberg, J., 2006. Experience from the development of a diagnostic single tube real-time PCR for human caliciviruses, Norovirus genogroups I and II. *J. Virol. Methods* 132, 69–76.
- Mossong, J., Decruyenaere, F., Moris, G., Ragimbeau, C., Olinger, C.M., Johler, S., Perrin, M., Hau, P., Weicherding, P., 2015. Investigation of a staphylococcal food poisoning outbreak combining case-control, traditional typing and whole genome sequencing methods, Luxembourg, June 2014. *Euro Surveill.* 20, pii=30059.
- Mounts, A.W., Ando, T., Koopmans, M., Bresee, J.S., Noel, J., Glass, R.I., 2000. Cold Weather Seasonality of Gastroenteritis Associated with Norwalk-like Viruses. *J. Infect. Dis.* 181, S284–S287.
- Müller, L., Rasmussen, L.D., Jensen, T., Schultz, A.C., Kjelsø, C., Barnadas, C., Sigsgaard, K., Larsen, A.R., Jensen, C.W., Jeppesen, S., Uhrbrand, K., Hove, N., Mølbak, K., Ethelberg, S., 2016. Series of Norovirus Outbreaks Caused by Consumption of Green Coral Lettuce, Denmark, April 2016. *PLoS Curr.* 8, 1–15.
- Müller, L., Schultz, A.C., Fonager, J., Jensen, T., Lisby, M., Hindsdal, K., Krusell, L., Eshøj, A., Møller, L.T., Porsbo, L.J., Böttiger, B.E., Kuhn, K., Engberg, J., Ethelberg, S., 2015. Separate norovirus outbreaks linked to one source of imported frozen raspberries by molecular analysis, Denmark, 2010–2011. *Epidemiol. Infect.* 143, 2299–2307.
- Mumphrey, S.M., Changotra, H., Moore, T.N., Heimann-Nichols, E.R., Wobus, C.E., Reilly, M.J., Moghadamfahli, M., Shukla, D., Karst, S.M., 2007. Murine Norovirus 1 Infection Is Associated with Histopathological Changes in Immunocompetent Hosts, but Clinical Disease Is Prevented by STAT1-Dependent Interferon Responses. *J. Virol.* 81, 3251–3263.
- Murata, T., Katsushima, N., Mizuta, K., Muraki, Y., Hongo, S., Matsuzaki, Y., 2007. Prolonged Norovirus Shedding in Infants < 6 Months of Age With Gastroenteritis. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 26, 46–49.
- Naphine, S., Lever, R.A., Powell, M.L., Jackson, R.J., Brown, T.D.K., Brierley, I., 2009. Expression of the VP2 Protein of Murine Norovirus by a Translation Termination-Reinitiation Strategy. *PLoS One* 4, e8390.

- Navidad, J.F., Griswold, D.J., Gradus, M.S., Bhattacharyya, S., 2013. Evaluation of luminex xTAG gastrointestinal pathogen analyte-specific reagents for high-throughput, simultaneous detection of bacteria, viruses, and parasites of clinical and public health importance. *J. Clin. Microbiol.* 51, 3018–3024.
- Nichols, G.L., Richardson, J.F., Sheppard, S.K., Lane, C., Sarran, C., 2012. *Campylobacter* epidemiology: a descriptive study reviewing 1 million cases in England and Wales between 1989 and 2011. *BMJ Open* 2, e001179.
- Noel, J.S., Fankhauser, R.L., Ando, T., Monroe, S.S., Glass, R.I., 1999. Identification of a Distinct Common Strain of “Norwalk-like Viruses” Having a Global Distribution. *J. Infect. Dis.* 179, 1334–1344.
- Nomura, K., Murai, H., Nakahashi, T., Mashiba, S., Watoh, Y., Takahashi, T., Morimoto, S., 2008. Outbreak of Norovirus Gastroenteritis in Elderly Evacuees After the 2007 Noto Peninsula Earthquake in Japan. *J. Am. Geriatr. Soc.* 56, 361–363.
- Nordgren, J., Nitiema, L.W., Ouermi, D., Simpore, J., Svensson, L., 2013. Host Genetic Factors Affect Susceptibility to Norovirus Infections in Burkina Faso. *PLoS One* 8, e69557.
- Nowak, P., Topping, J.R., Fotheringham, V., Gallimore, C.I., Gray, J.J., Iturriza-Gómara, M., Knight, A.I., 2011. Measurement of the virolysis of human GII.4 norovirus in response to disinfectants and sanitisers. *J. Virol. Methods* 174, 7–11.
- Nuanualsuwan, S., Cliver, D.O., 2002. Pretreatment to avoid positive RT-PCR results with inactivated viruses. *J. Virol. Methods* 104, 217–225.
- Ogorzaly, L., Bertrand, I., Paris, M., Maul, A., Gantzer, C., 2010. Occurrence, Survival, and Persistence of Human Adenoviruses and F-Specific RNA Phages in Raw Groundwater. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 8019–8025.
- Oliver, S.L., Dastjerdi, A.M., Wong, S., El-Attar, L., Gallimore, C., Brown, D.W.G., Green, J., Bridger, J.C., 2003. Molecular Characterization of Bovine Enteric Caliciviruses: a Distinct Third Genogroup of Noroviruses (Norwalk-Like Viruses) Unlikely To Be of Risk to Humans. *J. Virol.* 77, 2789–2798.
- Olofsson, S., Bergström, T., 2005. Glycoconjugate glycans as viral receptors. *Ann. Med.* 37, 154–172.
- Oriol, R., Le Pendu, J., Sparkes, R.S., Sparkes, M.C., Crist, M., Gale, R.P., Terasaki, P.I., Bernoco, M., 1981. Insights into the Expression of ABH and Lewis Antigens through Human Bone Marrow Transplantation. *Am. J. Hum. Genet.* 33, 551–560.
- Pang, X., Lee, B., Chui, L., Preiksaitis, J.K., Monroe, S.S., 2004. Evaluation and Validation of Real-Time Reverse Transcription-PCR Assay Using the LightCycler System for Detection and Quantitation of Norovirus. *J. Clin. Microbiol.* 42, 4679–4685.
- Pang, X.L., Preiksaitis, J.K., Lee, B., 2005. Multiplex real time RT-PCR for the detection and quantitation of norovirus genogroups I and II in patients with acute gastroenteritis. *J. Clin. Virol.* 33, 168–171.
- Pang, X.L., Preiksaitis, J.K., Lee, B.E., 2014. Enhanced enteric virus detection in sporadic gastroenteritis using a multi-target real-time PCR panel: A one-year study. *J. Med. Virol.* 86, 1594–1601.

- Papafragkou, E., Hewitt, J., Park, G.W., Greening, G., Vinjé, J., 2013. Challenges of Culturing Human Norovirus in Three-Dimensional Organoid Intestinal Cell Culture Models. *PLoS One* 8, e63485.
- Paricio, C., Bey, K.J., Teyssier, G., Ughetto, A., Ros, A., Rayet, I., Lavocat, M.P., 2006. Toxi-infection botulique chez un nouveau-né. *Arch. Pédiatrie* 13, 146–148.
- Parker, S.P., Cubitt, W.D., Jiang, X., 1995. Enzyme Immunoassay Using Baculovirus-Expressed Human Calicivirus (Mexico) for the Measurement of IgG Responses and Determining Its Seroprevalence in London, UK. *J. Virol. Methods* 46, 194–200.
- Parlement Européen, 2005. Règlement (CE) N° 2073/2005 de la commission du 15 novembre 2005 concernant les critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires. *J. Off. Union Eur.* L338, 1–34.
- Parlement Européen, 2004. Règlement (CE) N° 854/2004 du parlement Européen et du conseil du 29 avril 2004 fixant les règles spécifiques d'organisation des contrôles officiels concernant les produits d'origine animale destinés à la consommation humaine. *J. Off. Union Eur.* L226, 83–127.
- Parra, G.I., Green, K.Y., 2015. Genome of Emerging Norovirus GII.17, United States, 2014. *Emerg. Infect. Dis.* 21, 1477–1479.
- Parrino, T.A., Schreiber, D.S., Trier, J.S., Kapikian, A.Z., Blacklow, N.R., 1977. Clinical Immunity in Acute Gastroenteritis Caused by Norwalk Agent. *N. Engl. J. Med.* 297, 86–89.
- Parshionikar, S.U., Willian-True, S., Fout, G.S., Robbins, D.E., Seys, S.A., Cassady, J.D., Harris, R., 2003. Waterborne Outbreak of Gastroenteritis Associated with a Norovirus. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 5263–5268.
- Patel, M.M., Hall, A.J., Vinjé, J., Parashar, U.D., 2009. Noroviruses: A comprehensive review. *J. Clin. Virol.* 44, 1–8.
- Patel, M.M., Widdowson, M.A., Glass, R.I., Akazawa, K., Vinjé, J., Parashar, U.D., 2008. Systematic literature review of role of noroviruses in sporadic gastroenteritis. *Emerg. Infect. Dis.* 14, 1224–1231.
- Patterson, S.S., Smith, M.W., Casper, E.T., Huffman, D., Stark, L., Fries, D., Paul, J.H., 2006. A nucleic acid sequence-based amplification assay for real-time detection of norovirus genogroup II. *J. Appl. Microbiol.* 101, 956–963.
- Pavio, N., Lunazzi, A., Barnaud, E., Bouquet, J., Rogée, S., 2010a. Hépatite E: nouvelles connaissances du côté animal. *Bull. Epidemiol. Hebd.* 19–21.
- Pavio, N., Meng, X.-J., Renou, C., 2010b. Zoonotic hepatitis E: animal reservoirs and emerging risks. *Vet. Res.* 41, 46.
- Pecson, B.M., Ackermann, M., Kohn, T., 2011. Framework for using quantitative PCR as a nonculture based method to estimate virus infectivity. *Environ. Sci. Technol.* 45, 2257–2263.
- Pether, J.V.S., Caul, E.O., 1983. An outbreak of food-borne gastroenteritis in two hospitals associated with a Norwalk-like virus. *J. Hyg. (Lond).* 91, 343–350.
- Petit, L., Gibert, M., Popoff, M.R., 1999. *Clostridium perfringens*: toxinotype and genotype. *Trends Microbiol.* 7, 104–110.

- Pfeiffer, J.K., Virgin, H.W., 2016. Transkingdom control of viral infection and immunity in the mammalian intestine. *Science* 351, aad5872-aad5872.
- Pfister, T., Wimmer, E., 2001. Polypeptide p41 of a Norwalk-Like Virus Is a Nucleic Acid-Independent Nucleoside Triphosphatase. *J. Virol.* 75, 1611–1619.
- Phillips, G., Tam, C.C., Rodrigues, L.C., Lopman, B., 2010. Prevalence and characteristics of asymptomatic norovirus infection in the community in England. *Epidemiol. Infect.* 138, 1454–1458.
- Pignault, A., Cluzan, S., Dehaumont, P., Hubert, B., 1991. Les toxi-infections alimentaires collectives en 1990. *Bull. Epidemiol. Hebd.* 25, 99–106.
- Pillsbury, A., Chiew, M., Bates, J., Sheppeard, V., 2013. An outbreak of staphylococcal food poisoning in a commercially catered buffet. *Commun. Dis. Intell. Q. Rep.* 37, E144-148.
- Pinto, R.M., Costafreda, M.I., Bosch, A., 2009. Risk Assessment in Shellfish-Borne Outbreaks of Hepatitis A. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 7350–7355.
- Pires, S.M., Vieira, A.R., Hald, T., Cole, D., 2014. Source Attribution of Human Salmonellosis: An Overview of Methods and Estimates. *Foodborne Pathog. Dis.* 11, 667–676.
- Platts-Mills, J.A., Kosek, M., 2014. Update on the burden of *Campylobacter* in developing countries. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 27, 444–450.
- Podewils, L.J., Zanardi Blevins, L., Hagenbuch, M., Itani, D., Burns, A., Otto, C., Blanton, L., Adams, S., Monroe, S.S., Beach, M.J., Widdowson, M., 2007. Outbreak of norovirus illness associated with a swimming pool. *Epidemiol. Infect.* 135, 827–833.
- Polo, D., Schaeffer, J., Fournet, N., Le Saux, J.-C., Parnaudeau, S., McLeod, C., Le Guyader, F.S., 2016. Digital PCR for Quantifying Norovirus in Oysters Implicated in Outbreaks, France. *Emerg. Infect. Dis.* 22, 2189–2191.
- Prasad, B. V, Hardy, M.E., Dokland, T., Bella, J., Rossmann, M.G., Estes, M.K., 1999. X-ray crystallographic structure of the Norwalk virus capsid. *Science* 286, 287–290.
- Prasad, B. V, Rothnagel, R., Jiang, X., Estes, M.K., 1994. Three-dimensional structure of baculovirus-expressed Norwalk virus capsids. *J. Virol.* 68, 5117–5125.
- Rackoff, L.A., Bok, K., Green, K.Y., Kapikian, A.Z., 2013. Epidemiology and Evolution of Rotaviruses and Noroviruses from an Archival WHO Global Study in Children (1976–79) with Implications for Vaccine Design. *PLoS One* 8, e59394.
- Rasko, D. a, Wang, G., Monteiro, M. a, Palcic, M.M., Taylor, D.E., 2000. Synthesis of mono- and di-fucosylated type I Lewis blood group antigens by *Helicobacter pylori*. *Eur. J. Biochem.* 267, 6059–6066.
- Ravn, V., Dabelsteen, E., 2000. Tissue distribution of histo-blood group antigens. *Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.* 108, 1–28.
- Reddington, K., Tuite, N., Minogue, E., Barry, T., 2014. A current overview of commercially available nucleic acid diagnostics approaches to detect and identify human gastroenteritis pathogens. *Biomol. Detect. Quantif.* 1, 3–7.
- Reuter, G., Krisztalovics, K., Vennema, H., Koopmans, M., Szucs, G., 2005. Evidence of the etiological predominance of norovirus in gastroenteritis outbreaks--emerging new-variant and recombinant noroviruses in Hungary. *J. Med. Virol.* 76, 598–607.

- Richards, G.P., 1988. Microbial purification of shellfish: a review of depuration and relaying. *J. Food Prot.* 51, 218–251.
- Riddle, M.S., Walker, R.I., 2016. Status of vaccine research and development for norovirus. *Vaccine* 34, 2895–2899.
- Robilotti, E., Deresinski, S., Pinsky, B.A., 2015. Norovirus. *Clin. Microbiol. Rev.* 28, 134–164.
- Rockx, B., de Wit, M., Vennema, H., Vinjé, J., de Bruin, E., van Duynhoven, Y., Koopmans, M., 2002. Natural History of Human Calicivirus Infection: A Prospective Cohort Study. *Clin. Infect. Dis.* 35, 246–253.
- Rohayem, J., Robel, I., Jager, K., Scheffler, U., Rudolph, W., 2006. Protein-Primed and De Novo Initiation of RNA Synthesis by Norovirus 3Dpol. *J. Virol.* 80, 7060–7069.
- Rolfe, K.J., Parmar, S., Mururi, D., Wreggitt, T.G., Jalal, H., Zhang, H., Curran, M.D., 2007. An internally controlled, one-step, real-time RT-PCR assay for norovirus detection and genogrouping. *J. Clin. Virol.* 39, 318–321.
- Romalde, J.L., Estes, M.K., Szücs, G., Atmar, R.L., Woodley, C.M., Metcalf, T.G., 1994. In situ detection of hepatitis A virus in cell cultures and shellfish tissues. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 1921–1926.
- Rönnqvist, M., Aho, E., Mikkelä, A., Ranta, J., Tuominen, P., Rättö, M., Maunula, L., 2014. Norovirus transmission between hands, gloves, utensils, and fresh produce during simulated food handling. *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 5403–5410.
- Ruivoën-Clouet, N., Ganiere, J.P., Andre-Fontaine, G., Blanchard, D., Le Pendu, J., 2000. Binding of Rabbit Hemorrhagic Disease Virus to Antigens of the ABH Histo-Blood Group Family. *J. Virol.* 74, 11950–11954.
- Ruivoën, N., Le Pendu, J., 2013. Sensibilité génétique aux infections à norovirus. *Pathol. Biol.* 61, 28–35.
- Sahin, O., Kassem, I.I., Shen, Z., Lin, J., Rajashekara, G., Zhang, Q., 2015. Campylobacter in Poultry: Ecology and Potential Interventions. *Avian Dis.* 59, 185–200.
- Sánchez-Vargas, F.M., Abu-El-Haija, M.A., Gómez-Duarte, O.G., 2011. *Salmonella* infections: An update on epidemiology, management, and prevention. *Travel Med. Infect. Dis.* 9, 263–277.
- Sanders, J.W., Putnam, S.D., Frankart, C., Frenck, R.W., Monteville, M.R., Riddle, M.S., Rockabrand, D.M., Sharp, T.W., Tribble, D.R., 2005. Impact of illness and non-combat injury during operations Iraqi freedom and enduring freedom (Afghanistan). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 73, 713–719.
- Sarnesto, A., Köhlin, T., Hindsgaul, O., Thurin, J., Blaszczyk-Thurin, M., 1992. Purification of the secretor-type beta-galactoside alpha 1-2-fucosyltransferase from human serum. *J. Biol. Chem.* 267, 2737–2744.
- Sarnesto, A., Köhlin, T., Thurin, J., Blaszczyk-Thurin, M., 1990. Purification of H gene-encoded beta-galactoside alpha 1-2 fucosyltransferase from human serum. *J. Biol. Chem.* 265, 15067–15075.
- Sartorius, B., Andersson, Y., Velicko, I., De Jong, B., Löfdahl, M., Hedlund, K.-O., Allestam, G., Wångsell, C., Bergstedt, O., Horal, P., Ulleryd, P., Soderstrom, A., 2007. Outbreak of norovirus in Västra Götaland associated with recreational activities at two lakes during August 2004. *Scand. J. Infect. Dis.* 39, 323–331.

- Sasaki, Y., Kai, A., Hayashi, Y., Shinkai, T., Noguchi, Y., Hasegawa, M., Sadamasu, K., Mori, K., Tabei, Y., Nagashima, M., Morozumi, S., Yamamoto, T., 2006. Multiple Viral Infections and Genomic Divergence among Noroviruses during an Outbreak of Acute Gastroenteritis. *J. Clin. Microbiol.* 44, 790–797.
- Scallan, E., Hoekstra, R.M., Angulo, F.J., Tauxe, R. V., Widdowson, M.-A., Roy, S.L., Jones, J.L., Griffin, P.M., 2011. Foodborne Illness Acquired in the United States—Major Pathogens. *Emerg. Infect. Dis.* 17, 7–15.
- Schwab, K.J., Neill, F.H., Estes, M.K., Metcalf, T.G., Atmar, R.L., 1998. Distribution of Norwalk virus within shellfish following bioaccumulation and subsequent depuration by detection using RT-PCR. *J. Food Prot.* 61, 1674–80.
- Schwartz, S., Vergoulidou, M., Schreier, E., Loddenkemper, C., Reinwald, M., Schmidt-Hieber, M., Flegel, W.A., Thiel, E., Schneider, T., 2011. Norovirus gastroenteritis causes severe and lethal complications after chemotherapy and hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 117, 5850–5856.
- Schwarz, H.P., Dorner, F., 2003. Karl Landsteiner and his major contributions to haematology. *Br. J. Haematol.* 121, 556–565.
- Seitz, S.R., Leon, J.S., Schwab, K.J., Lyon, G.M., Dowd, M., McDaniels, M., Abdulhafid, G., Fernandez, M.L., Lindesmith, L.C., Baric, R.S., Moe, C.L., 2011. Norovirus infectivity in humans and persistence in water. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 6884–6888.
- Severi, E., Verhoef, L., Thornton, L., Guzman-Herrador, B., Faber, M., Sundqvist, L., Rimhanen-Finne, R., Roque-Afonso, A., Ngu, S., Allerberger, F., Baumann-Popczyk, A., Muller, L., Parmakova, K., Alfonsi, V., Tavoschi, L., Vennema, H., Fitzgerald, M., Myrmel, M., Gertler, M., Ederth, J., Kontio, M., Vanbockstael, C., Mandal, S., Sadkowska-Todys, M., Tosti, M., Schimmer, B., O'Gorman, J., Stene-Johansen, K., Wenzel, J., Jones, G., Balogun, K., Ciccaglione, A., O'Connor, L., Vold, L., Takkinen, J., Rizzo, C., 2015. Large and prolonged food-borne multistate hepatitis A outbreak in Europe associated with consumption of frozen berries, 2013 to 2014. *Euro Surveill.* 20, pii=21192.
- Shieh, M.T., WuDunn, D., Montgomery, R.I., Esko, J.D., Spear, P.G., 1992. Cell surface receptors for herpes simplex virus are heparan sulfate proteoglycans. *J. Cell Biol.* 116, 1273–1281.
- Shieh, Y.C., Khudyakov, Y.E., Xia, G., Ganova-Raeva, L.M., Khambaty, F.M., Woods, J.W., Veazey, J.E., Motes, M.L., Glatzer, M.B., Bialek, S.R., Fiore, A.E., 2007. Molecular confirmation of oysters as the vector for hepatitis A in a 2005 multistate outbreak. *J. Food Prot.* 70, 145–150.
- Siebenga, J.J., Beersma, M.F.C., Vennema, H., van Biezen, P., Hartwig, N.J., Koopmans, M., 2008. High Prevalence of Prolonged Norovirus Shedding and Illness among Hospitalized Patients: A Model for In Vivo Molecular Evolution. *J. Infect. Dis.* 198, 994–1001.
- Siebenga, J.J., Vennema, H., Zheng, D.-P., Vinjé, J., Lee, B.E., Pang, X.-L., Ho, E.C.M., Lim, W., Choudekar, A., Broor, S., Halperin, T., Rasool, N.B.G., Hewitt, J., Greening, G.E., Jin, M., Duan, Z.-J., Lucero, Y., O'Ryan, M., Hoehne, M., Schreier, E., Ratcliff, R.M., White, P.A., Iritani, N., Reuter, G., Koopmans, M., 2009. Norovirus Illness Is a Global Problem: Emergence and Spread of Norovirus GII.4 Variants, 2001–2007. *J. Infect. Dis.* 200, 802–812.

- Simmonds, P., Karakasiliotis, I., Bailey, D., Chaudhry, Y., Evans, D.J., Goodfellow, I.G., 2008. Bioinformatic and functional analysis of RNA secondary structure elements among different genera of human and animal caliciviruses. *Nucleic Acids Res.* 36, 2530–2546.
- Simonet, J., Gantzer, C., 2006. Inactivation of poliovirus 1 and F-specific RNA phages and degradation of their genomes by UV irradiation at 254 nanometers. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 7671–7677.
- Solano, R., Alseda, M., Godoy, P., Sanz, M., Bartolome, R., Manzanares-Laya, S., Dominguez, A., Cayla, J.A., 2014. Person-to-person transmission of norovirus resulting in an outbreak of acute gastroenteritis at a summer camp. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 26, 1160–1166.
- Sommer, C., Mueller, W., Resch, B., 2009. Two nosocomial norovirus outbreaks in the neonatal intensive and intermediate care unit. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 28, 1133–1136.
- Son, N.T., Fleet, G.H., 1980. Behavior of pathogenic bacteria in the oyster, *Crassostrea commercialis*, during depuration, re-laying, and storage. *Appl. Environ. Microbiol.* 40, 994–1002.
- Soper, G.A., 1907. The work of a chronic typhoid germ distributor. *J Am Med Assoc* 48, 2019–2022.
- Sosnovtsev, S. V., Prikhod'ko, E.A., Belliot, G., Cohen, J.I., Green, K.Y., 2003. Feline calicivirus replication induces apoptosis in cultured cells. *Virus Res.* 94, 1–10.
- Sosnovtsev, S. V., Belliot, G., Chang, K.-O., Onwudiwe, O., Green, K.Y., 2005. Feline Calicivirus VP2 Is Essential for the Production of Infectious Virions. *J. Virol.* 79, 4012–4024.
- Sosnovtsev, S. V., Belliot, G., Chang, K.-O., Prikhodko, V.G., Thackray, L.B., Wobus, C.E., Karst, S.M., Virgin, H.W., Green, K.Y., 2006. Cleavage map and proteolytic processing of the murine norovirus nonstructural polyprotein in infected cells. *J. Virol.* 80, 7816–7831.
- Straub, T.M., Bartholomew, R.A., Valdez, C.O., Valentine, N.B., Dohnalkova, A., Ozanich, R.M., Bruckner-Lea, C.J., Call, D.R., 2011. Human Norovirus Infection of Caco-2 Cells Grown as a 3-Dimensional Tissue Structure. *J. Water Health* 9, 225–240.
- Straub, T.M., Hutchison, J.R., Bartholomew, R.A., Valdez, C.O., Valentine, N.B., Dohnalkova, A., Ozanich, R.M., Bruckner-Lea, C.J., 2013. Defining cell culture conditions to improve human norovirus infectivity assays. *Water Sci. Technol.* 67, 863–868.
- Stuart, A.D., Brown, T.D.K., 2006. Entry of Feline Calicivirus Is Dependent on Clathrin-Mediated Endocytosis and Acidification in Endosomes. *J. Virol.* 80, 7500–7509.
- Subba-Reddy, C. V., Yunus, M.A., Goodfellow, I.G., Kao, C.C., 2012. Norovirus RNA Synthesis Is Modulated by an Interaction between the Viral RNA-Dependent RNA Polymerase and the Major Capsid Protein, VP1. *J. Virol.* 86, 10138–10149.
- Subba-Reddy, C. V., Goodfellow, I., Kao, C.C., 2011. VPg-Primed RNA Synthesis of Norovirus RNA-Dependent RNA Polymerases by Using a Novel Cell-Based Assay. *J. Virol.* 85, 13027–13037.

- Sugieda, M., Nakajima, S., 2002. Viruses detected in the caecum contents of healthy pigs representing a new genetic cluster in genogroup II of the genus "Norwalk-like viruses." *Virus Res.* 87, 165–172.
- Sugimoto, T., Ogawa, N., Aoyama, M., Sakaguchi, M., Isshiki, K., Kanasaki, M., Uzu, T., Nishio, Y., Eguchi, Y., Kashiwagi, A., 2007. Haemolytic uraemic syndrome complicated with norovirus-associated gastroenteritis. *Nephrol. Dial. Transplant.* 22, 2098–2099.
- Suzuki, Y., Ito, T., Suzuki, T., Holland, R.E., Chambers, T.M., Kiso, M., Ishida, H., Kawaoka, Y., 2000. Sialic Acid Species as a Determinant of the Host Range of Influenza A Viruses. *J. Virol.* 74, 11825–11831.
- Svraka, S., Duizer, E., Vennema, H., De Bruin, E., Van Der Veer, B., Dorresteijn, B., Koopmans, M., 2007. Etiological role of viruses in outbreaks of acute gastroenteritis in The Netherlands from 1994 through 2005. *J. Clin. Microbiol.* 45, 1389–1394.
- Tam, C.C., Rodrigues, L.C., Viviani, L., Dodds, J.P., Evans, M.R., Hunter, P.R., Gray, J.J., Letley, L.H., Rait, G., Tompkins, D.S., O'Brien, S.J., 2012. Longitudinal study of infectious intestinal disease in the UK (IID2 study): incidence in the community and presenting to general practice. *Gut* 61, 69–77.
- Tan, M., Jiang, X., 2010. Norovirus Gastroenteritis, Carbohydrate Receptors, and Animal Models. *PLoS Pathog.* 6, e1000983.
- Tan, M., Jiang, X., 2005a. The P Domain of Norovirus Capsid Protein Forms a Subviral Particle That Binds to Histo-Blood Group Antigen Receptors. *J. Virol.* 79, 14017–14030.
- Tan, M., Jiang, X., 2005b. Norovirus and its histo-blood group antigen receptors: An answer to a historical puzzle. *Trends Microbiol.* 13, 285–293.
- Tan, M., Jin, M., Xie, H., Duan, Z., Jiang, X., Fang, Z., 2008. Outbreak studies of a GII-3 and a GII-4 norovirus revealed an association between HBGA phenotypes and viral infection. *J. Med. Virol.* 80, 1296–1301.
- Taube, S., Kurth, A., Schreier, E., 2005. Generation of recombinant Norovirus-like particles (VLP) in the human endothelial kidney cell line 293T. *Arch. Virol.* 150, 1425–1431.
- Taube, S., Perry, J.W., Yetming, K., Patel, S.P., Auble, H., Shu, L., Nawar, H.F., Lee, C.H., Connell, T.D., Shayman, J.A., Wobus, C.E., 2009. Ganglioside-Linked Terminal Sialic Acid Moieties on Murine Macrophages Function as Attachment Receptors for Murine Noroviruses. *J. Virol.* 83, 4092–4101.
- Teunis, P.F.M., Moe, C.L., Liu, P., Miller, S.E., Lindesmith, L., Baric, R.S., Le Pendu, J., Calderon, R.L., 2008. Norwalk virus: How infectious is it? *J. Med. Virol.* 80, 1468–1476.
- Thorne, L.G., Goodfellow, I.G., 2014. Norovirus gene expression and replication. *J. Gen. Virol.* 95, 278–291.
- Thorven, M., Grahn, A., Hedlund, K., Johansson, H., Wahlfred, C., 2005. A Homozygous Nonsense Mutation (428G-A) in the Human Secretor (FUT2) Gene Provides Resistance to Symptomatic Norovirus (GGII) Infections 79, 15351–15355.
- Tian, P., Bates, A.H., Jensen, H.M., Mandrell, R.E., 2006. Norovirus binds to blood group A-like antigens in oyster gastrointestinal cells. *Lett. Appl. Microbiol.* 43, 645–651.
- Tian, P., Engelbrektson, A.L., Jiang, X., Zhong, W., Mandrell, R.E., 2007. Norovirus recognizes histo-blood group antigens on gastrointestinal cells of clams, mussels, and oysters: a possible mechanism of bioaccumulation. *J. Food Prot.* 70, 2140–2147.

- Troeger, H., Loddenkemper, C., Schneider, T., Schreier, E., Epple, H.-J., Zeitz, M., Fromm, M., Schulzke, J.-D., 2009. Structural and functional changes of the duodenum in human norovirus infection. *Gut* 58, 1070–1077.
- Tung-Thompson, G., Libera, D.A., Koch, K.L., de los Reyes, F.L., Jaykus, L.-A., 2015. Aerosolization of a Human Norovirus Surrogate, Bacteriophage MS2, during Simulated Vomiting. *PLoS One* 10, e0134277.
- Turcios, R.M., Widdowson, M.-A., Sulka, A.C., Mead, P.S., Glass, R.I., 2006. Reevaluation of epidemiological criteria for identifying outbreaks of acute gastroenteritis due to norovirus: United States, 1998–2000. *Clin. Infect. Dis.* 42, 964–969.
- Uchino, K., Miyoshi, T., Matsuo, M., Ikeda, Y., Yoshida, Y., Teranaka, Y., Sugimoto, M., Sasaki, Y., Shibata, H., Fujii, F., Tanaka, T., 2006. Combined genogroup I and II norovirus infection at a nursery. *Jpn. J. Infect. Dis.* 59, 270–272.
- Ueki, Y., Shoji, M., Suto, A., Tanabe, T., Okimura, Y., Kikuchi, Y., Saito, N., Sano, D., Omura, T., 2007. Persistence of caliciviruses in artificially contaminated oysters during depuration. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 5698–5701.
- van Beek, J., Ambert-Balay, K., Botteldoorn, N., Eden, J.S., Fonager, J., Hewitt, J., Iritani, N., Kroneman, A., Vennema, H., Vinjé, J., White, P.A., Koopmans, M., 2013. Indications for worldwide increased norovirus activity associated with emergence of a new variant of genotype II.4, late 2012. *Euro Surveill.* 18, pii=20345.
- van Duynhoven, Y.T.H.P., de Jager, C.M., Kortbeek, L.M., Vennema, H., Koopmans, M.P.G., van Leusden, F., van der Poel, W.H.M., van den Broek, M.J.M., 2005. A one-year intensified study of outbreaks of gastroenteritis in The Netherlands. *Epidemiol. Infect.* 133, 9–21.
- Vega, E., Barclay, L., Gregoricus, N., Shirley, S.H., Lee, D., Vinjé, J., 2014. Genotypic and Epidemiologic Trends of Norovirus Outbreaks in the United States, 2009 to 2013. *J. Clin. Microbiol.* 52, 147–155.
- Vega, E., Barclay, L., Gregoricus, N., Williams, K., Lee, D., Vinjé, J., 2011. Novel surveillance network for norovirus gastroenteritis outbreaks, United States. *Emerg. Infect. Dis.* 17, 1389–1395.
- Verhoef, L., Boxman, I.L., Duizer, E., Rutjes, S.A., Vennema, H., Friesema, I.H., de Roda Husman, A.M., Koopmans, M., 2008a. Multiple exposures during a norovirus outbreak on a river-cruise sailing through Europe, 2006. *Euro Surveill.* 13, pii=18899.
- Verhoef, L., Duizer, E., Vennema, H., Siebenga, J., Swaan, C., Isken, L., Koopmans, M., Balay, K., Pothier, P., McKeown, P., van Dijk, G., Capdepon, P., Delmas, G., 2008b. Import of norovirus infections in the Netherlands and Ireland following pilgrimages to Lourdes, 2008 – preliminary report. *Euro Surveill.* 13, pii=19025.
- Vinjé, J., 2015. Advances in Laboratory Methods for Detection and Typing of Norovirus. *J. Clin. Microbiol.* 53, 373–381.
- Vinjé, J., Altena, S.A., Koopmans, M.P.G., 1997. The Incidence and Genetic Variability of Small Round-Structured Viruses in Outbreaks of Gastroenteritis in The Netherlands. *J. Infect. Dis.* 176, 1374–1378.
- Vongpunsawad, S., Venkataram Prasad, B. V., Estes, M.K., 2013. Norwalk Virus Minor Capsid Protein VP2 Associates within the VP1 Shell Domain. *J. Virol.* 87, 4818–4825.

- Wadl, M., Scherer, K., Nielsen, S., Diedrich, S., Ellerbroek, L., Frank, C., Gatzler, R., Hoehne, M., Johne, R., Klein, G., Koch, J., Schulenburg, J., Thielbein, U., Stark, K., Bernard, H., 2010. Food-borne norovirus-outbreak at a military base, Germany, 2009. *BMC Infect. Dis.* 10, 30.
- Wang, D., Tian, P., 2014. Inactivation conditions for human norovirus measured by an in situ capture-qRT-PCR method. *Int. J. Food Microbiol.* 172, 76–82.
- Wang, Q.H., Myung, G.H., Cheetham, S., Souza, M., Funk, J.A., Saif, L.J., 2005. Porcine noroviruses related to human noroviruses. *Emerg. Infect. Dis.* 11, 1874–1881.
- Wassenaar, T.M., 1997. Toxin production by *Campylobacter* spp. *Clin. Microbiol. Rev.* 10, 466–476.
- Wells, S.E., Hillner, P.E., Vale, R.D., Sachs, A.B., 1998. Circularization of mRNA by Eukaryotic Translation Initiation Factors. *Mol. Cell* 2, 135–140.
- Wertheim, H.F.L., Melles, D.C., Vos, M.C., van Leeuwen, W., van Belkum, A., Verbrugh, H.A., Nouwen, J.L., 2005. The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *Lancet Infect. Dis.* 5, 751–762.
- Westrell, T., Dusch, V., Ethelberg, S., Harris, J., Hjertqvist, M., Jourdan-da Silva, N., Koller, A., Lenglet, A., Lisby, M., Vold, L., 2010. Norovirus outbreaks linked to oyster consumption in the United Kingdom, Norway, France, Sweden and Denmark, 2010. *Euro Surveill.* 15, pii=19524.
- White, P.A., 2014. Evolution of norovirus. *Clin. Microbiol. Infect.* 20, 741–745.
- White, P.A., Hansman, G.S., Li, A., Dable, J., Isaacs, M., Ferson, M., McIver, C.J., Rawlinson, W.D., 2002. Norwalk-like virus 95/96-US strain is a major cause of gastroenteritis outbreaks in Australia. *J. Med. Virol.* 68, 113–118.
- Widdowson, M.-A., Cramer, E.H., Hadley, L., Bresee, J.S., Beard, R.S., Bulens, S.N., Charles, M., Chege, W., Isakbaeva, E., Wright, J.G., Mintz, E., Forney, D., Massey, J., Glass, R.I., Monroe, S.S., 2004. Outbreaks of acute gastroenteritis on cruise ships and on land: identification of a predominant circulating strain of norovirus - United States, 2002. *J. Infect. Dis.* 190, 27–36.
- Widdowson, M.-A., Sulka, A., Bulens, S.N., Beard, R.S., Chaves, S.S., Hammond, R., Salehi, E.D.P., Swanson, E., Totaro, J., Woron, R., Mead, P.S., Bresee, J.S., Monroe, S.S., Glass, R.I., 2005. Norovirus and foodborne disease, United States, 1991–2000. *Emerg. Infect. Dis.* 11, 95–102.
- Wigginton, K.R., Pecson, B.M., Sigstam, T., Bosshard, F., Kohn, T., 2012. Virus inactivation mechanisms: Impact of disinfectants on virus function and structural integrity. *Environ. Sci. Technol.* 46, 12069–12078.
- Wobus, C.E., Karst, S.M., Thackray, L.B., Chang, K.-O., Sosnovtsev, S. V., Belliot, G., Krug, A., Mackenzie, J.M., Green, K.Y., Virgin, H.W., 2004. Replication of Norovirus in Cell Culture Reveals a Tropism for Dendritic Cells and Macrophages. *PLoS Biol.* 2, e432.
- World Health Organization, 2015. Les maladies virales d'origine alimentaire dans la région européenne - WHO Estimates of the Global Burden of Foodborne Diseases.
- World Health Organization, Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2008. Viruses in food : scientific advice to support risk management activities.

- Wyatt, R.G., Dolin, R., Blacklow, N.R., DuPont, H.L., Buscho, R.F., Thornhill, T.S., Kapikian, A.Z., Chanock, R.M., 1974. Comparison of Three Agents of Acute Infectious Nonbacterial Gastroenteritis by Cross-Challenge in Volunteers. *J. Infect. Dis.* 129, 709–714.
- Yaren, O., Bradley, K.M., Moussatche, P., Hoshika, S., Yang, Z., Zhu, S., Karst, S.M., Benner, S.A., 2016. A norovirus detection architecture based on isothermal amplification and expanded genetic systems. *J. Virol. Methods* 237, 64–71.
- Yen, C., Wikswo, M.E., Lopman, B.A., Vinje, J., Parashar, U.D., Hall, A.J., 2011. Impact of an Emergent Norovirus Variant in 2009 on Norovirus Outbreak Activity in the United States. *Clin. Infect. Dis.* 53, 568–571.
- Yu, J.H., Kim, N.Y., Lee, E.J., Jeon, I.S., 2011. Norovirus infections in asymptomatic food handlers in elementary schools without norovirus outbreaks in some regions of Incheon, Korea. *J. Korean Med. Sci.* 26, 734–739.
- Zahorsky, J., 1929. Hyperemesis Hiemis or the winter vomiting disease. *Arch. Pediatr. Adolesc. Med.* 46, 391–395.
- Zenda, T., Miyamoto, M., Kaneko, S., 2011. Norovirus gastroenteritis accompanied by marked elevation of transaminases. *Hiroshima J. Med. Sci.* 60, 41–43.
- Zhang, X., Wei, M., Pan, H., Lin, Z., Wang, K., Weng, Z., Zhu, Y., Xin, L., Zhang, J., Li, S., Xia, N., Zhao, Q., 2014. Robust manufacturing and comprehensive characterization of recombinant hepatitis E virus-like particles in Hecolin®. *Vaccine* 32, 4039–4050.
- Zheng, D.-P., Ando, T., Fankhauser, R.L., Beard, R.S., Glass, R.I., Monroe, S.S., 2006. Norovirus classification and proposed strain nomenclature. *Virology* 346, 312–323.
- Zomer, T.P., De Jong, B., Kühlmann-Berenzon, S., Nyrén, O., Svenungsson, B., Hedlund, K.O., Ancker, C., Wahl, T., Andersson, Y., 2010. A foodborne norovirus outbreak at a manufacturing company. *Epidemiol. Infect.* 138, 501–506.

## DEMANDE D'IMPRIMATUR

Date de soutenance : 29 juin 2017

DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR  
EN PHARMACIE

présenté par : Cédric HARTARD

Sujet : Toxi-infections alimentaires collectives : Apport de la norme ISO 15216 pour évaluer le risque lié à la présence de norovirus humains dans les fruits de mer

Jury :

Président : Pr Christophe GANTZER, PU

Directeur : Dr Sandrine BANAS, MCU

Juges : Dr Nicolas BOUDAUD

Pr Sophie GANGLOFF, Pharmacien, PU

Dr Nadine PETITPAIN, Pharmacien, PH

Vu,

Nancy, le 22 mai 2017

Le Président du Jury

Directeur de Thèse

Pr Christophe GANTZER

Dr Sandrine BANAS



Vu et approuvé,

Nancy, le 23.05.17

Doyen de la Faculté de Pharmacie  
de l'Université de Lorraine,

Vu,

Nancy, le 13 JUIN 2017

Le Président de l'Université de Lorraine,



Pierre MUTZENHARDT

N° d'enregistrement : 997A

TITRE

# Toxi-infections alimentaires collectives : Apport de la norme ISO 15216 pour évaluer le risque lié à la présence de norovirus humains dans les fruits de mer

Thèse soutenue le 29 juin 2017

par Cédric HARTARD

RESUME :

En Europe, le danger lié à la présence des norovirus dans les aliments est estimé de manière indirecte, par la recherche d'indicateurs bactériens de contamination fécale comme *Escherichia coli*. Il est évident que la présence d'*E. coli* dans les denrées alimentaires est synonyme de danger pour la santé des consommateurs. A l'inverse, son absence n'est pas toujours gage de sûreté puisque des toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) liées à la consommation d'aliments (e.g. fruits de mer, produits maraîchers) respectant la législation en vigueur sont parfois observées. Ce phénomène s'explique par le fait qu'*E. coli* soit moins résistant que les virus dans l'environnement et également plus sensible aux traitements visant à éliminer les microorganismes des matrices alimentaires. Afin de pallier les limites des indicateurs bactériens, la détection directe des virus pathogènes dans ce type de matrices est logiquement proposée.

Dans ce but, la norme ISO 15216 devrait être mise en place en 2017 afin notamment de standardiser la recherche des norovirus dans les fruits de mer. Ces virus n'étant à l'heure actuelle pas cultivables en routine, la norme ISO 15216 s'appuie sur des techniques moléculaires qui permettent la détection de leur génome.

Bien que rapide et spécifique, la détection des génomes de pathogènes demeure cependant complexe lorsqu'il s'agit d'interpréter les résultats en matière de danger pour le consommateur. En effet, la détection de génome ne peut en aucun cas témoigner de l'intégrité du virus correspondant et donc de son caractère infectieux. Ainsi, la recherche des génomes de norovirus dans les coquillages et de manière plus générale dans les matrices alimentaires pourrait conduire à une surestimation du danger.

A l'inverse, si l'absence de génome viral est quant à elle obligatoirement synonyme d'absence de particules virales infectieuses, la difficulté repose ici sur le fait que la sensibilité de la technique proposée ne semble pas suffisante pour détecter la quantité minimale de norovirus capable d'infecter l'Homme. Dans ce cas, l'application de la norme ISO 15216 pourrait sous-estimer le danger viral.

Face à ces arguments, il semble donc extrêmement délicat dans l'état actuel des connaissances de vouloir relier la détection de génome viral dans les denrées alimentaires à un risque infectieux pour l'Homme.

MOTS CLES : Norovirus, Pollution virale, Toxi-infections alimentaires collectives

Directeur de thèse	Intitulé du laboratoire	Nature
Dr Sandrine BANAS	LCPME UMR 7564 CNRS – Université de Lorraine  (Laboratoire de Chimie Physique et Microbiologie pour l'Environnement)	Expérimentale <input type="checkbox"/> Bibliographique <input checked="" type="checkbox"/> Thème 2 et 5

<b>Thèmes</b>	1 – Sciences fondamentales 3 – Médicament <b>5 - Biologie</b>	2 – Hygiène/Environnement 4 – Alimentation – Nutrition 6 – Pratique professionnelle
---------------	---	---