

Rôle de l'environnement marin, et en particulier des coquillages, sur la sélection de souches humaines ou animales de norovirus pathogènes pour l'homme - Coquenpath

Dr Le Pendu J. (Directeur de recherche), Dr. Zakhour M. et Dr. Ruvöen-Clouet N., (chercheurs), UMR S892, INSERM, Université de Nantes, <Jacques.Le-Pendu@univ-nantes.fr>;

Dr Le Guyader S. F. (Directeur de recherche), Haugarreau L., Dr Maalouf H., Dr Ollivier J., Le Saux J-C., (Chercheurs), Laboratoire Microbiologie-LNR, IFREMER, sleguyad@ifremer.fr;

Dr. Pommepeuy M, Coordinatrice du projet, Laboratoire Microbiologie-LNR, IFREMER, monique.pommepeuy@ifremer.fr;

Dr. Poncet D. (Directeur de recherche), Chapilienne A., (Chercheur), UPR CNRS, UsC-INRA, Gif sur Yvette, didier.poncet@vms.cnrs-gif.fr;

Dr. Thébault A., (Chercheur), ANSES, Maisons Alfort. <a.thebault@anses.fr>

Objectifs

L'objectif général du projet est de comprendre le rôle du milieu marin, et en particulier des coquillages, sur la sélection des souches de norovirus humaines ou animales, et sur leur pathogénicité potentielle pour l'homme. Pour ce faire le projet explore quatre aspects :

- la caractérisation des souches de norovirus animales (bovines et porcines), l'analyse génomique, la construction de particules pseudo-virales (VLP),
- La détection dans l'environnement : prévalence et niveau de contamination des norovirus humains et animaux dans des échantillons d'eaux (rejet de station d'épuration, rivières ou rejets d'origine agricole proches des sites d'élevage) et de coquillages.
- La capacité de fixation de ces virus, grâce aux VLPs développées, sur des glycannes des tissus humains, animaux et de coquillages.
- La transmission à l'homme, évaluée au terme de cette étude par une approche d'appréciation qualitative du risque.

L'objectif final du projet est d'évaluer le potentiel zoonotique des norovirus dans le cadre d'une contamination multiple de coquillages pris ici comme exemple d'une exposition humaine.

Situation du sujet

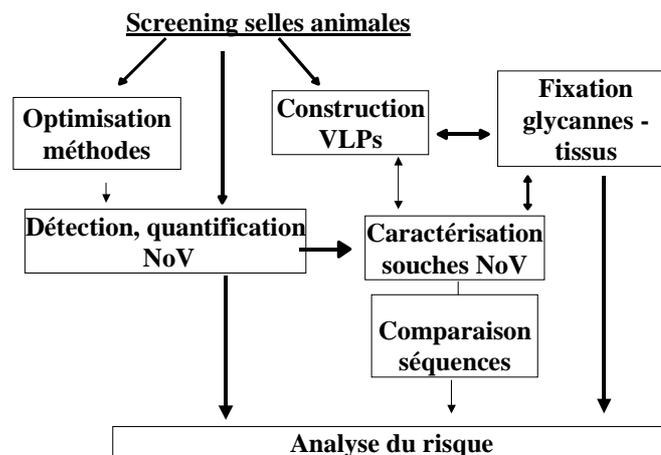
Des événements récents ont montré l'importance du potentiel zoonotique des virus, par voie directe mais aussi *via* des aliments potentiellement infectés ou contaminés. L'émergence de pathogènes au travers d'un passage inter-espèce correspond à des événements rares, mais un très haut taux de mutation augmente leur probabilité d'occurrence comme en témoigne la sur-représentation des virus à ARN simple brin parmi les exemples connus de saut d'espèce. Bien que les mécanismes moléculaires nécessaires au franchissement de la barrière d'espèce soient très divers, la présence de récepteurs cellulaires compatibles représente une étape cruciale et plusieurs exemples de franchissement de la barrière d'espèce ont montré le rôle déterminant de mutations permettant aux virus de reconnaître leur récepteur sur les cellules de la nouvelle espèce cible. Dans ces conditions, le risque de transmission inter-espèce sera d'autant plus élevé que les récepteurs sont phylogénétiquement conservés.

Les coquillages ont été sélectionnés comme modèle d'aliment pouvant favoriser le potentiel zoonotique des norovirus. En effet, ces virus, responsable de gastro-entérites

chez l'homme ou les animaux sont excrétés en grande quantité dans les fèces. Virus non enveloppés, donc très résistants, leur persistance dans le milieu extérieur est importante. Certains sites de production de coquillages sont situés dans des zones littorales contaminées sporadiquement, lors des pluies, par des rejets d'élevages intensifs de porcs ou de bovins (Bretagne). Les similitudes de séquences des norovirus bovins et porcins avec les souches humaines suggèrent que ces animaux pourraient, par dérive génétique de ces souches, constituer un réservoir pour l'homme. Dans la famille des *Caliciviridae*, malgré l'importante distance génétique qui les sépare, les norovirus humains et le virus de la maladie hémorragique du lapin (RHDV) partagent la capacité de se fixer sur des glycanes très semblables de la famille des antigènes de groupes sanguins tissulaires. Identiquement, nous avons montré que la souche prototype des norovirus humains, le virus de Norwalk se fixe sur des sucres apparentés aux antigènes tissulaires de groupes sanguins humains sur les tissus du tube digestif de l'huître, suggérant un rôle sélectif de ce coquillage dans la concentration d'un pathogène humain. Notre hypothèse de travail était que l'huître pourrait sélectionner des souches virales d'origine animale capables de reconnaître des récepteurs glycaniques, phylogénétiquement conservés entre les bovidés, les suidés et l'homme.

Matériel et Méthodes

La méthodologie retenue est présentée ci-dessous.



Le travail a consisté à :

1. **Rechercher les NoV** dans des échantillons de fèces d'animaux. Cette étude permet de caractériser les souches circulant dans les cheptels régionaux, d'optimiser nos méthodes de détection et de construire des Virus Like Particles (VLPs).
2. Utiliser des **VLPs** pour les études sur l'adhérence des souches à des tissus animaux (porcins, bovins) et de coquillages, et sur des salives humaines.
3. **Evaluer la prévalence** des souches dans l'environnement : analyser et quantifier la contamination des coquillages et évaluer la possibilité de contamination par des rejets humains et animaux.
4. Initier une étude **d'évaluation des risques**, basée sur les données obtenues dans les régions d'élevage agricole intensif proches des zones de production conchylicole.

La zone d'application a été celle de deux bassins versants du Finistère disposant de nombreux rejets d'élevages bovins ou porcins, et débouchant en mer sur des zones d'élevage conchylicoles (Estuaires de l'Aber Benoît et de Daoulas). Des prélèvements dans les eaux et les coquillages ont été réalisés au niveau des points les plus sensibles vis à vis des rejets potentiels pendant la durée de l'étude. Une large base d'échantillons composée de selles (103 selles de porcs et 136 selles de bovins), ainsi que de différents prélèvements réalisés dans des établissements agricoles (lisiers, fumier, eaux de lagunage) a été constituée. La durée d'échantillonnage a concerné deux périodes hivernales avec renforcement pendant les périodes clés : présence de gastro-entérites dans la population, diarrhées dans les cheptels, situations climatiques défavorables à la qualité sanitaire de la zone conchylicole.

Principaux résultats scientifiques

L'étude conduite dans ce projet Coquenpath a permis aux différentes équipes impliquées d'acquérir et de valoriser nombre d'informations. L'objectif initial a été atteint et a mis en évidence les possibilités de transmission de norovirus entre les quatre espèces sélectionnées. Brièvement les acquis sont :

- **Une meilleure maîtrise de l'outil VLPs.** A la fin de cette étude, différents VLPs ou chimères sont disponibles ou en cours d'obtention : production de VLP de norovirus bovin NB2, identification du récepteur, étude de la structure cristallographique de ces VLPs en complexe avec leurs récepteurs. Ce travail a donné lieu à des présentations et publications. [Zakhour *et al.*, 2009], (Decouche V *et al.*, communications à des congrès)
- **Concernant l'étude du transfert de souches inter espèces,** l'analyse des glycanes des différentes espèces et de l'étude de leur relation avec les capsides représentatives des principaux génogroupes indique que la reconnaissance des différents hôtes ne peut se faire dans toutes les directions (figure ci dessous).

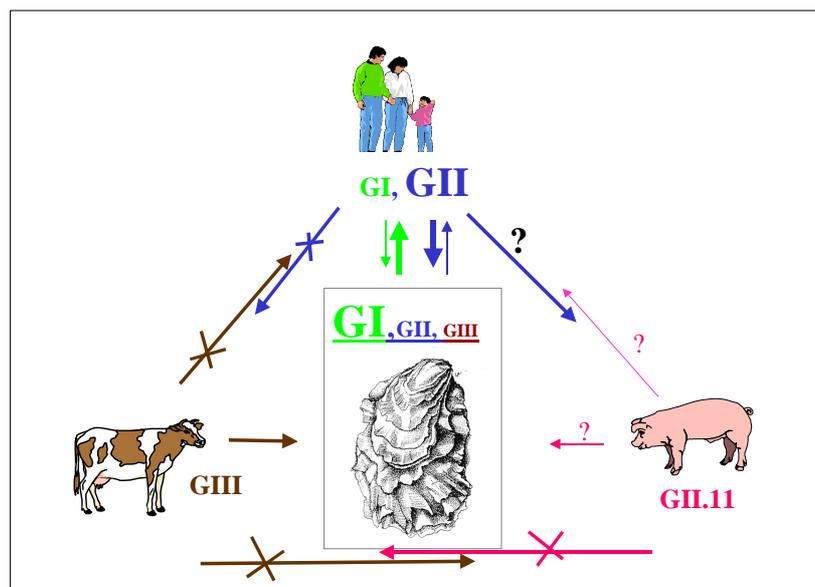


Figure montrant les possibilités d'échange des norovirus entre les espèces étudiées (résultats de l'étude Coquenpath).

Ainsi les huîtres peuvent concentrer spécifiquement les souches de norovirus humains du génogroupe I (GI). Cette reconnaissance existe également pour les souches de norovirus du génogroupe II (GII) mais avec une efficacité différente selon les souches. Ces résultats sont cohérents avec les données épidémiologiques impliquant les souches de norovirus GI dans des épidémies liées aux coquillages, alors que les norovirus GII circulent en grand nombre dans la population et l'environnement en période épidémique. Cette étude a montré par ailleurs que l'huître ne devrait pas accumuler spécifiquement les norovirus bovins du génogroupe III (GIII). Par ailleurs, la reconnaissance des porcs sous dépendance du polymorphisme de *Fut1* par les souches humaines, pourrait contribuer au passage inter-espèce. En revanche, il semble difficile pour une souche humaine d'infecter un bovin et réciproquement une souche bovine ne devrait pas infecter l'homme ou le porc [Maalouf *et al.*, 2010; Zakhour *et al.*, 2009].

- Concernant **la circulation des norovirus dans l'environnement** divers échantillons ont été analysés. Tout d'abord dans les élevages (bovins et porcins), nous avons montré que des souches de norovirus bovin étaient présentes dans 18% des selles (n=136) alors que le nombre de selles porcines analysées (n=103) n'a pas permis de mettre en évidence du norovirus porcins. Ceci est vraisemblablement dû au fait que le portage est très faible au niveau régional, européen et au Japon. L'étude environnementale s'est ensuite portée sur deux régions du Finistère caractérisés par une agriculture intensive (élevages porcins et bovins), et un urbanisme côtier et où des eaux conchylicoles et des huîtres sont régulièrement contaminés en *E. coli*. Les résultats obtenus dans les échantillons d'eaux de rivières reflètent l'épidémiologie avec l'absence de norovirus porcins, mais la présence de norovirus humains (GI, GII) et bovins (GIII). Dans ces eaux soumises à différents rejets d'origine fécale humaine ou animale, les concentrations en norovirus varient selon les génogroupes avec de plus faibles valeurs en norovirus GI, comparativement aux deux autres génogroupes détectés (GII et GIII). Cependant, dans les coquillages les concentrations trouvées pour les trois génogroupes sont assez semblables, confirmant la sélection spécifique du génogroupe I par l'huître. En moyenne l'efficacité de bio-accumulation pour ce génogroupe dans l'huître est très supérieure à celle observée pour les deux autres génogroupes et correspond à l'expression d'un ligand glycanique du tube digestif de l'huître [Maalouf *et al.*, 2010; Zakhour *et al.*, 2010].

- **L'analyse quantitative de risque** a été réalisée sur les deux génogroupes GI et GII, considérant que les norovirus GIII ne peuvent être transmis à l'homme. Cette analyse concerne le risque de gastro-entérites au cours de l'année, eu égard à la contamination des huîtres, dans une population de forts consommateurs de produits de la mer. Les résultats, compte tenu de la très forte infectiosité du virus, montrent que le risque d'infection est faible, mais jamais nul. Cette première approche d'analyse de risque montre que, compte tenu de la limite de détection et du pouvoir infectieux des norovirus, un suivi virologique des coquillages ne peut suffire à lui seul à garantir l'absence de risque pour le consommateur.

Principales publications obtenues

- Bosch A., Le Guyader F.S. 2010. Viruses in shellfish (editorial). *Food Environ.Virol.*, 2: 115-116.
- da Silva A.K., Le Guyader F.S., Le Saux J-C., Pommepuy M., Elimelech M. 2008. Norovirus removal and particle association in a waste stabilization pond. *Environ. Sci. Technol.* 42: 9151-9157.
- Le Guyader F.S., Parnaudeau S., Schaeffer J., Bosch A., Loisy F., Pommepuy M., Atmar R.L. 2009. Detection and Quantification of Noroviruses in Shellfish. *Appl. Environ. Microbiol.* 75: 618-624.
- Le Guyader F.S., Le Saux J-C., Delmas G., Krol J., Ambert-Balay K. 2009. Virus Aichi, norovirus, astrovirus, entérovirus et rotavirus impliqués dans des cas de gastro-entérites suite à la consommation d'huître. *Virologie* 13:1-3.
- Le Guyader F.S., Pommepuy M., Atmar R.L. 2009. Monitoring viral contamination in shellfish growing areas. In: New technologies in aquaculture: improving production efficiency, quality and environment management. G. Burnell, G. Allan (Eds), Woodhead Publishing, Cambridge, p542-569.
- Le Guyader F.S., Krol J., Ambert-balay K., Ruvoen-Clouet N., Desaubliaux B., Parnaudeau S., Le Saux J-C., Ponge A., Pothier P., Atmar R. L. Le Pendu J. 2010. Comprehensive analysis of a norovirus-gastroenteritis outbreak, from the environment to the consumer. *J. Clin. Microbiol.*, 48: 915-920.
- Le Guyader FS., Pommepuy M., Loisy-Hamon F. 2010. Virus entériques humains et aliments. *An. Inst. Past.* 52, 8-11.
- Maalouf H., Pommepuy M., Le Guyader F.S. 2010. Environmental conditions leading to shellfish contamination and related outbreaks. *Food Environ. Virol.* 2:136-145.
- Maalouf H., Zakhour M. Le Pendu J., Le Saux J-C, Atmar R. L., Le Guyader F. S. 2010. Norovirus genogroups I and II ligands in oysters: tissue distribution and seasonal variations. *Appl. Environ. Microbiol.*, 76:5621-5630.
- Richards G.P., McLeod C. Le Guyader F.S. 2010. Processing strategies to inactivate enteric viruses in shellfish: limitations of surrogate viruses and molecular methods. *Food Environ. Virol.* 183-193.
- Rydell, G.E., Nilsson, J., Rodriguez, J., Ruvoën-Clouet, N., Svensson, L., Le Pendu, J., Larson, G. 2009. Human noroviruses recognize Sialyl-Lewis x neoglycoprotein. *Glycobiology*, 19 : 309-320.
- Silva, L.M., Carvalho, A.S., Guillon, P., Seixas, S., Azevedo, M., Almeida, R., Ruvoën-Clouet, N., Reis, C.A., Le Pendu, J., Rocha, J., David, L. 2010. FUT2 (fucosyltransferase 2) genetic variation and impact on functionality assessed by in vivo studies. *Glycoconj. J.*, 27 : 61-68.
- Vilarino ML, Le Guyader FS, Polo D., Schaeffer J., Krol J., Romalde JL. 2009. Assessment of human enteric viruses in cultured and wild bivalve molluscs. *Intern. Microbiol.* 11: 145-152.
- Zakhour M., Maalouf H., Di Bartolo H., Haugarreau L., Le Guyader F.S., Ruvoen-Clouet N., Le Saux J-C., Ruggeri F., Pommepuy M., Le Pendu J. 2010. Bovine norovirus ligand, environmental contamination and potential cross-species transmission via oyster. *Appl. Environ. Microbiol.* 76: sous presse.
- Zakhour M, N Ruvoen-Clouet, A Charpillienne, B Langpap, D Poncet, T Peters, N Bovin, J Le Pendu. 2009. The aGal Epitope of the Histo-Blood Group Antigen Family Is a Ligand for Bovine Norovirus Newbury2 Expected to Prevent Cross-Species Transmission. *PLoS Pathogens* V 5. Issue 7 e1000504

Perspectives

Les résultats obtenus dans ce projet ouvrent diverses perspectives:

- L'approche innovante de l'utilisation des VLPs pour évaluer la transmission de virus inter-espèces, sera poursuivie selon la construction des VLPs ou souches disponibles. La caractérisation des ligands de souches porcines sera un point important à poursuivre de façon à déterminer s'ils sont partagés avec l'huître, la vache et l'homme.
- Nous avons entrepris l'étude du désassemblage et du ré-assemblage des capsides de norovirus en collaboration avec S. Bressanelli (labo VMS) et G. Tresset du Laboratoire de Physique des Solides Université Paris-Sud CNRS UMR 8502). En effet, l'homogénéité de la taille des VLP de norovirus NB2 et des chimères NB2-1 s'est révélée différente d'une production à l'autre en particulier en fonction du pH. Ce travail pourra aboutir à des applications biotechnologiques (vecteur VLP), ou à une connaissance fondamentale de l'assemblage de capside à partir d'une seule protéine. Des premiers cristaux de VLP NB2 ont également été obtenus. La structure tridimensionnelle de la partie P des protéines de capside de NB1, NB2 et de sapovirus PEC sera déterminée par cristallographie
- Les études dans l'environnement devraient être reconduites sur d'autres sites, en particulier pour les norovirus porcins pour confirmer le faible impact de ce virus. L'impact de la spécificité de fixation des différents génogroupes en terme de persistance de la contamination sera un paramètre important à développer. Par ailleurs cette approche pourrait constituer également une nouvelle voie pour l'étude de la purification des coquillages.
- L'analyse de risque, première analyse de ce type réalisée en France, nécessitera d'être reconduite et optimisée afin d'améliorer en particulier, la précision des paramètres de la dose-réponse. Une analyse de sensibilité complémentaire permettrait également de hiérarchiser les sources d'incertitude.

Les retombées prévisibles et les perspectives de valorisation

Ce travail répond à une inquiétude sociétale forte concernant la sécurité des aliments et le risque zoonotique lié aux pratiques agricoles et aquacoles. Il permet de montrer que le passage de virus animaux vers l'homme *via* les coquillages est, en l'état actuel de notre recherche, probablement négligeable. Ces résultats sont importants en terme de gestion du risque sanitaire, puisque les coquillages sont élevés dans des zones côtières soumises à des pressions agricoles importantes. Par exemple en Bretagne la zone côtière est en zone d'excédent agricole, et les lisiers dans certains cas, peuvent être épandus dans la zone littorale à proximité des zones d'élevage conchylicole (Finistère nord).

Par ailleurs la démonstration de l'adhésion des virus aux tissus d'huîtres souligne le rôle de vecteur de cette espèce (*Crassostrea gigas*) vers l'homme, en particulier pour certains virus entériques humains, le norovirus GI. Ces résultats permettent de comprendre d'une part, la difficulté à purifier ces coquillages avec des techniques traditionnelles et, d'autre part, pourquoi ce virus est couramment impliqué dans des toxi-infections alimentaires collectives. Les conséquences économiques sont importantes, et ces résultats soulignent la nécessité de limiter les apports polluants dans les zones

dévolues à la conchyliculture, et de mettre en place des systèmes de surveillance et d'alerte de façon à prévenir le risque lors d'apports de virus à la côte (pluies, épidémies dans la population).

Enfin ces résultats orientent nos recherches vers d'autres coquillages (moules, coques, palourdes), et d'autres types d'huîtres (*Crassostrea gigas* triploïdes, *ostrea edulis*..). Tous les coquillages ont-ils ce type de tissus et de comportement dans l'adhésion des virus entériques humains ? Ces travaux permettront d'affiner l'analyse du risque coquillages qui a été initiée dans cette étude. Par ailleurs, des réflexions sont en cours pour déterminer si de nouvelles technologies (hautes pressions, UV, lumière pulsée, molécules chimiques.. etc.) pourraient être appliquées lors de la purification des coquillages pour améliorer les performances et éliminer ces virus.

Les résultats obtenus permettent, en outre, au travers de l'optimisation des méthodes de surveillance virale des coquillages, de soutenir le développement économique ou tout au moins la pérennisation de la filière ostréicole française, leader européen et quatrième producteur mondial. Enfin, l'analyse de risque apporte une première réponse sanitaire aux conflits d'usages concernant les conséquences des pressions anthropiques sur la bande littorale.