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-theses-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.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

Ecole Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE

Mention : « Science de la Vie et de la Santé »

par **Manon CHASSAING**

Étude de l'interaction des norovirus avec les antigènes tissulaires de groupes sanguins humains au cours de l'inactivation virale

Le 18 février 2021

Membres du jury :

Rapporteurs :

M. Pierre Renault	Directeur de recherche, INRAE, Avignon
Mme Sylvie Perelle	Directrice de recherche, ANSES, Maisons-Alfort

Examinateurs :

Mme Mélissa Palos Ladeiro	Maître de conférences, SEBIO UMR 102, Reims
M. Alexis de Rougemont	Professeur, CNR des virus des gastro-entérites, Dijon
M. Christophe Gantzer	Professeur, LCPME UMR 7564, CNRS, Nancy, directeur de thèse
M. Nicolas Boudaud	Responsable Projets Virologie, ACTALIA, St Lô, co-directeur de thèse

Membre invité

M. Didier Majou	Directeur de l'ACTIA, ACTIA, Paris

LCPME (Laboratoire de Chimie Physique et Microbiologie pour les Matériaux et l'Environnement),
UMR 7564 CNRS / Université de Lorraine, Nancy – Equipe Microbiologie Environnementale

Remerciements

Aux directeurs,

Je souhaite remercier Alain Walcarius et Bernard Picoche pour m'avoir accueillie au sein du laboratoire LCPME et de l'entreprise ACTALIA pour la réalisation de ma thèse.

A mes encadrants,

Je souhaite remercier Christophe Gantzer et Nicolas Boudaud, mon directeur et co-directeur, pour m'avoir proposé ce projet de thèse. C'est avec votre aide et vos conseils que j'ai pu ouvrir mon esprit scientifique. C'est avec votre implication et votre soutien que j'ai pu découvrir de nouvelles pistes et comprendre le monde de la recherche. J'espère un jour devenir aussi douée, et peut-être meilleure, que vous. Merci beaucoup pour ces trois années qui furent très enrichissantes pour moi.

Aux membres de mon jury de thèse,

Je souhaite remercier Pierre Renault et Sylvie Perelle pour avoir accepté de rapporter ce manuscrit et pour leurs commentaires constructifs et pertinents.

Je tiens également à remercier Melissa Palos Ladeiro et Alexis de Rougemont de me faire l'honneur de faire partie des examinateurs de ma thèse.

Je voudrais ensuite remercier Didier Majou pour sa présence, son soutien et de m'avoir accompagnée tout au long cette thèse.

Aux intervenants externes,

Sylvie Migot, pour l'obtention d'images et les mesures de taille en microscopie à transmission électronique.

Céline Caillet, pour les mesures de taille au Nanozetasizer.

A mes collègues scientifiques d'ACTALIA,

Julie et Maëlle, qui ont toujours été présentes et disponibles pour répondre à mes différentes questions tout au long de ces trois ans.

Aux membres de l'équipe microbiologie environnementale,

Julie, qui a toujours eu d'excellentes idées pour mettre un peu de vie au laboratoire : les midis pizza, le secret santa... Garde ton sourire et ta bonne humeur mais également les petits potins qui font les ragots du midi !!

Guillaume, parfois un collègue, parfois un ami, mais toujours dans la bienveillance. Les discussions scientifiques ou du beau temps autour d'une bière vont me manquer. Ton expertise scientifique a réussi à me faire évoluer et progresser. Toujours plein de curiosité et de remarques pertinentes.

Laura, avec qui j'ai partagé l'organisation du journal club du LCPME, ce qui n'a pas toujours été une mince affaire.

Veronica, qui a réussi à gagner un Macbook pro avec un clavier allemand grâce à des kits d'extraction !

Anaïs, qui m'a toujours intriguée avec ses biofilms sur différents supports.

Charlène, qui n'aime pas le chocolat et qui ramène ses lapins en chocolat de Pâque dans la salle de pause.

Maryse, qui nous a fait goûter aux bananes plantains frites.

Séverine, qui a été capable d'inonder une pièce et en même temps de prendre feu, tu auras marqué les esprits !

Hélène, qui a toujours été là pour m'aider au niveau technique et logistique.

Isabelle, dont les discussions « yaourt » sont toujours les bienvenues même après mon départ. Et maintenant je sais faire des yaourts à la vanille !

Christophe M. et son habitude de demander de faire des gâteaux. Heureusement qu'il n'y avait que les anniversaires… et les fêtes… et les publications… et les évènements extra… Enfin pour tout ! Comment ne pas finir comme Bibendum ?

Xavier, pour ses très bonnes mirabelles. J'espère pouvoir te donner un pot de confiture ! (C'est bon, c'est fait !)

Laurence, pour ton aide concernant l'utilisation du chlore.

Alice, qui m'a fait découvrir « Ciel mon doctorat ! » et qui peut faire la tortue dans les couloirs du laboratoire !

Pauline, Romain, Cédric, qui êtes partis avant la fin de ma thèse mais dont votre présence m'a permis de m'intégrer totalement dans l'équipe et de prendre mes marques.

David, mon voisin de bureau, pour sa précieuse aide technique.

Sylvie et Sandrine, pour leur gentillesse et leur disponibilité, surtout quand il s'agit de récupérer les viennoiseries pour le journal club !

A tous ceux qui n'ont pas été cités, mais qui de près ou de loin ont contribué à la réalisation de ce travail.

A ma famille,

Mes parents, sans qui tout ça ne serait jamais arrivé. Sans eux, je ne serai jamais venue à Nancy, rencontrer tous ces gens merveilleux et terminer sur le bouquet final de mes études qui est la thèse. Je les remercie pour leur soutien et leur amour dans les moments difficiles, que ce travail soit le témoignage de ma gratitude. Merci d'avoir cru en moi. Je vous aime !

Claude et Pierre, qui, malgré la distance ont toujours su être présents pour me soutenir (et râler pour me dire que je ne les appelle pas assez souvent !).

Annie, qui m'a fait découvrir le monde de la recherche et plus précisément les virus. Je pense que sans ton aide et ton soutien je ne serais pas allée aussi loin !

Fred et Béa, merci pour votre gentillesse et votre soutien.

A mes amis,

Marine, mon premier modèle du thésard rencontré pendant mon stage de master qui m'a marqué avec ses « t'inquiète paupiette, ça va bien se passer » ! Et effectivement ça s'est bien passé !

Honorine, la thèse ce n'est pas toujours facile mais quand on veut, on arrive toujours à ses fins.

Diego, Chacha et Fred, mes amis de l'escalade, qui m'ont soutenue dans les moments de faiblesse.

Emmanuelle et Angélique, mes amies d'enfance qui m'ont supportée et remise dans le droit chemin de la prise de confiance.

Tous les autres qui sont à Nancy et un peu partout en France, Emilie, Katleen, Charlène, Paul, Elise, Caroline, … qui m'ont permis d'évacuer le stress de la thèse.

Enfin, le meilleur pour la fin, toujours ! Je te remercie Matthieu pour avoir su me redonner confiance en moi dans mes moments de doute, pour ta compréhension, ta gentillesse et pour ton amour indéfectible. Merci pour tout ce que tu m'as apporté !

Merci à tous, car sans vous cette thèse n'aurait pas été celle que j'ai vécue !

Table des matières

Liste des Figures ..... ***iii***
Liste des Tables ..... ***iv***
Liste des abréviations ..... ***v***
Introduction ***1***
Objectifs ***5***
Étude bibliographique ***9***
I. Norovirus 11
1. Historique 11
2. Structure des norovirus 11
a) Organisation du génome 12
b) Protéines virales 12
i. Protéines non structurales 12
ii. Protéines structurales 13
c) Classification et génotypes 14
3. Culture cellulaire / Réplication 16
4. Propriétés antigéniques 19
5. Propriétés physico-chimiques 20
6. Infection à norovirus 21
a) Mode de transmission 21
b) Manifestations cliniques 23
c) Pathogénicité 23
d) Prévalence dans les aliments 24
e) Méthodes de détection 28
i. Microscopie électronique 28
ii. Techniques de biologie moléculaire 29
iii. Techniques immunologiques 29
iv. Les biocapteurs 30
v. Les ligands utilisés pour la détection des NoV 31
7. Épidémiologie 33
a) Contexte épidémiologique et impact économique 33
b) Caractéristiques épidémiologiques 33
c) Epidémiologie moléculaire 34

8. Contexte réglementaire et normatif 35
II. Les antigènes tissulaires de groupes sanguins (HBGA) 37
1. Définition 37
a) Biosynthèse des antigènes H 39
b) Biosynthèse des antigènes A et B 40
c) Biosynthèse des antigènes Lewis 40
2. Interactions entre les norovirus humains et les HBGA 41
3. Rôle des HBGA dans la réplication des norovirus 43
a) Au niveau cellulaire 43
b) Le microbiote intestinal 46
4. Implications des HBGA dans la transmission par les aliments et l'environnement .. 47
III. Influence des facteurs inactivant physiologiques sur les norovirus 51
1. Influence du pH 51
2. Influence de la bile et des sels biliaires 52
3. Influence des enzymes protéolytiques 52
a) Trypsine et chymotrypsine 53
b) Pepsine 53
IV. Utilisation de l'interaction des norovirus avec les HBGA pour mieux caractériser l'inactivation virale et mieux comprendre la transmission *via* l'eau et les aliments. 55
1. Interaction des norovirus avec les HBGA : une preuve du caractère infectieux ? 55
2. Interactions des norovirus avec les HBGA : rôle dans la transmission 58
Résultats ***..... 61***
I. Rôle protecteur des Norovirus par les HBGA vis-à-vis des facteurs inactivant retrouvés chez l'Homme 64
II. Evolution de l'interaction entre les norovirus et les HBGA au cours de l'inactivation virale ……..80
1. Évolution des interactions avec les HBGA au cours du vieillissement naturel 80
2. Évolution des interactions avec les HBGA au cours d'un traitement thermique 81
3. Évolution des interactions avec les HBGA au cours d'un traitement oxydant 94
Discussion et perspectives ***..... 131***
Références bibliographiques ***..... 145***
Annexes ***..... 167***

Liste des Figures

Figure 1 : Première observation du virus de Norwalk par immuno-électro-microscopie, d'après Kapikian *et al.* (1972)..... 11
Figure 2 : Schéma de la structure du génome des NoV, composé de trois ORF. 12
Figure 3 : Structure et assemblage de la protéine de capside VP1, d'après Hutson *et al.* (2004)……...14
Figure 4: Classification des NoV basée sur les séquences en acides aminés de la protéine de capside VP1, adaptée de Chhabra *et al.* (2019)..... 15
Figure 5 : Cycle de réplication des NoV, d'après De Graaf *et al.* (2016)..... 18
Figure 6: Transmission des NoV, d'après Lopman *et al.* (2012)..... 21
Figure 7: Évolution des épidémies à NoV GII.4 entre 2000 et 2015 d'après de Rougemont, SFM, (2019). 35
Figure 8 : Voies de biosynthèse des différents HBGA, d'après Ruvoën et Le Pendu, 2013. . 38
Figure 9 : Modèle d'infection par les NoV en fonction du caractère sécréteur ou non sécréteur des individus, d'après Lindesmith *et al.* (2003). 39
Figure 10 : Représentation schématique des interactions entre différentes souches des NoV et les HBGA, adapté de Tan et Jiang (2010)..... 42
Figure 11 : Mécanismes de persistance, d'après Donaldson *et al.* (2008). 45
Figure 12 : Bioaccumulation des NoV dans les huîtres, d'après Le Guyader *et al.*, 2012. 49

Liste des Tables

Tableau 1 : Prévalence en génome de NoV dans les coquillages, les végétaux et les fruits pour des échantillonnages représentatifs (n > 120) entre 2007 et 2018. ……..…..25

Tableau 2: Comparaison des différentes méthodes de détection des NoV, d'après Liu et Moore (2020). ……...…….…..28

Tableau 3 : Comparaison des différents ligands utilisés pour détecter les NoV, d'après Liu et Moore (2020). …….…..32

Tableau 4 : Détermination des LOD théoriques et pratiques de la détection du génome des NoV en fonction des matrices. **……..……..……..**36

Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messager
BP	Poche réceptrice (ou *Binding pocket*)
CaCV	Canine calicivirus
CDC	*Centers for disease control and prevention*
cg	copies de génome
Ct	Concentration multipliée par le temps de contact
DLS	Diffusion dynamique de la lumière (ou *Dynamic light scattering*)
EFSA	*European food safety authority*
ELISA	*Enzyme-linked immunosorbent assay*
EMA	Ethidium monoazide
Enzyme A	N-acétylgalactosaminyltransférase
Enzyme B	α-D-galactosyltransférase
Enzyme FUT1/2	α-1-2-L-fucosyltransférase
Enzyme FUT3	α 1,3-4-L-fucosyltransférase
Enzyme ST	Sialyltransférase
FCV	Calicivirus félin
Fuc	Fucose
Gal	Galactose
GalNAc	N-acétylgalactosamine
GlcNAc	N-acétylglucosamine
HClO	Acide hypochloreux
HBGA	Antigènes tissulaires de groupes sanguins (ou *Histo-blood group antigens*)
HID_{50}	Dose infectieuse humaine entraînant des signes cliniques chez 50 % des sujets inoculés
HPP	Traitement à haute pression (ou *High pressure processing*)
ISO	*International organization of standardization*

kDa	Kilo dalton
LOD	Limite de détection
MET	Microscopie électronique à transmission
MNV	Norovirus murin
NoV	Norovirus
ONOOH	Peroxynitrite
ORF	Cadre de lecture ouvert (ou *Open reading frame*)
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	*Polymerase chain reaction*
PGM	Mucines gastriques porcines (ou *Porcine gastric mucin*)
pI	Point isoélectrique
PMA	Propidium monoazide
PV	Poliovirus
qPCR	PCR en temps réel
RdRp	ARN polymérase ARN-dépendante
RHDV	*Rabbit haemoragic disease virus*
RT	Reverse transcription
SDS-PAGE	Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium (ou *Sodium-dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis*)
TFL	Temps nécessaire pour réduire d'un $\log_{10}$ (ou *Time to first* $\log_{10}$)
TIAC	Toxi-infection alimentaire collective
Tm	Point de fusion (ou *Melting temperature*)
TV	Tulane virus
UFC	Unité formant colonie
UFP	Unité formant plage
UV	Ultra-violet
VHA	Virus de l'hépatite A
VLP	Pseudo particule-virale (ou *Virus-like particle*)
VPg	*Viral protein genome-linked*
VP1	Protéine de capside majoritaire
VP2	Protéine de capside minoritaire

Introduction

Les gastro-entérites, épidémiques et sporadiques, constituent une des principales causes de morbidité et de mortalité chez l'Homme, comptant notamment plus de 1,8 million de morts chez les enfants de moins de 5 ans dans le monde (Bryce *et al.*, 2005). Les causes de gastro-entérites peuvent impliquer une grande variété de bactéries (*e.g. Salmonella, Shigella, Campylobacter, Escherichia coli, Yersinia* et *Vibrio cholerae*), de parasites (*e.g. Giarda, Cryptosporidium,* amibes) et de virus entériques (*e.g.* rotavirus, norovirus, astrovirus, adénovirus).

Parmi les virus entériques, les norovirus humains (NoV) constituent la principale cause de gastro-entérite chez l'Homme avec chaque année plus de 700 millions de cas et 200 000 morts (Kirk *et al.*, 2015). Ils sont aussi responsables de toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) et sont d'ailleurs identifiés comme étant la principale cause de contamination aux Etats-Unis (CDC, 2018). En France, les TIAC à NoV sont principalement liées à la consommation de coquillages (EFSA, 2019a; Vaillant *et al.*, 2012).

La transmission des NoV peut avoir lieu soit de façon directe (*i.e.* de personne à personne) soit de façon indirecte (*i.e.* par la consommation d'eau ou d'aliments contaminés). Elle est favorisée par la grande stabilité des particules virales dans l'environnement où elles peuvent persister dans les eaux, sur des surfaces inertes, ou dans des matrices alimentaires même après congélation. Ce virus est particulièrement contagieux car une très faible quantité de particules virales est suffisante pour infecter un nouvel individu. Enfin, les NoV, par leur capacité d'évolution très importante, peuvent échapper à l'immunité collective et ainsi se propager plus facilement au sein d'une même population.

Les principaux aliments et boissons contaminés par les NoV sont l'eau, les mollusques bivalves vivants comme les huîtres ou les moules, certains légumes comme les salades et les fruits à baies. Cependant, si les mollusques bivalves sont principalement contaminés sur les zones de production influencées par une pollution fécale d'origine humaine (*e.g.* rejets de stations d'épuration), les végétaux ont plus de risque d'être contaminés par de l'eau souillée ou par le manuportage.

Des méthodes normalisées de détection et de quantification du génome des NoV dans les aliments à risque (salades, fruits rouges, mollusques bivalves, eaux embouteillées, surfaces alimentaires) ont été publiées à partir de 2013 (ISO 15216-1, 2017; ISO 15216-2, 2019). Le principal point faible de cette norme ISO 15216 concerne l'absence d'information sur le caractère infectieux des virus détectés dans les échantillons et donc de son incapacité à pouvoir

discriminer les virus infectieux des virus non infectieux dans les aliments et l'eau. L'utilisation désormais routinière de cette norme ISO conduit donc à une surestimation du danger viral et donc à un retrait potentiellement injustifié de lots du marché par application du principe de précaution. Les données de la littérature soulignent que la prévalence en génome de NoV dans les huîtres est loin d'être négligeable puisqu'elle est proche de 10 % en France mais elle peut aller jusqu'à plus de 70 % dans d'autres pays européens (*i.e.* Grande Bretagne) (Boudaud et Gantzer, 2015). A partir d'un échantillonnage représentatif (n = 4309), une étude européenne a montré une prévalence de 34,5 % en génome de NoV dans les huîtres au niveau des zones de production et de 10,8 % au niveau des centres d'expédition (EFSA, 2019a).
Pour mieux appréhender le danger à NoV dans les aliments, il serait souhaitable de ne détecter, par cette norme ISO, que le génome des NoV réellement infectieux capables de conduire à des symptômes de gastro-entérites aiguës chez l'Homme. Une manière de le faire serait de ne sélectionner que les virus capables de reconnaître leur récepteur cellulaire au niveau de la cellule hôte car il s'agit de la première étape du cycle de vie des virus.

La reconnaissance du récepteur cellulaire de la cellule hôte par le virus démontre l'intégrité de sa capside. Ainsi la détection du génome d'un virus capable de le reconnaître spécifiquement permettrait de limiter la surestimation du danger viral dans les aliments vulnérables en s'affranchissant des particules virales n'ayant plus de capside intègre.

Le récepteur cellulaire des NoV n'est pas encore identifié avec certitude mais il a été largement montré que l'interaction avec des antigènes tissulaires de groupes sanguins humains (HBGA ou *histo blood group antigens*) peut participer au cycle infectieux des NoV chez l'Homme. Les HBGA sont des sucres complexes, retrouvés à la surface des érythrocytes et des cellules épithéliales des muqueuses de l'intestin de l'Homme. Ils peuvent aussi être présents sous forme libre dans certains fluides biologiques comme la salive ou le lait (Marionneau *et al.*, 2002). À ce jour, les HBGA sont considérés comme des facteurs d'attachement facilitant l'infection des NoV au niveau du site de réplication cellulaire situé dans l'intestin grêle (Ettayebi *et al.*, 2016; Haga *et al.*, 2020; Ruvoën et Le Pendu, 2013).

Objectifs

L'objectif de ce travail est d'étudier l'interaction des NoV avec les HBGA au cours du cycle de vie du virus comprenant des étapes chez l'Homme et dans l'environnement. D'une part, il s'agit de définir si les HBGA peuvent jouer un rôle protecteur des NoV au cours de leur transit vers le système digestif de l'Homme. Les HBGA étant retrouvés sous forme libre dans la salive de la majorité des individus, l'interaction avec les NoV pourrait ainsi les protéger de l'effet potentiellement délétère des enzymes protéolytiques, des sels biliaires et du pH acide lors de leur passage dans le tractus gastro-intestinal, avant d'atteindre le site de l'infection situé au niveau de l'intestin grêle (*i.e.* entérocytes). D'autre part, il s'agit de définir l'évolution de la capacité d'interaction des NoV avec les HBGA au cours de différents processus d'inactivation virale dans l'environnement (*e.g.* vieillissement naturel, chaleur, oxydants).

Ce travail s'articulera en quatre parties. La première partie, sous forme d'une revue bibliographique, présentera le contexte scientifique dans lequel ces travaux de thèse ont été réalisés. La deuxième partie présentera une synthèse des résultats obtenus dans 3 publications scientifiques (2 parues et 1 soumise en janvier 2021). La troisième partie sera dédiée à la discussion de ces résultats, en particulier l'intérêt d'utiliser les HBGA pour discriminer les NoV infectieux et non infectieux dans les coquillages bivalves vivants, et plus largement dans les aliments à risque.

.

Étude bibliographique

I. Norovirus

1. Historique

En 1929, Zahorsky fut le premier à décrire le syndrome d'« Hyperemesis hemis » ou « *The winter vomiting disease* » caractérisé par l'apparition soudaine de diarrhées et de vomissements avec une prévalence plus élevée durant les mois les plus froids (Zahorsky, 1929). En 1968, une épidémie de gastro-entérites aiguës associant diarrhées et vomissements se déclara dans une école primaire à Norwalk (Ohio, USA). Après plusieurs années de recherche, ce n'est qu'en 1972 que Kapikian *et al.* ont décrit pour la première fois l'agent pathogène responsable de ces gastro-entérites aiguës après la découverte de particules virales de 27 nm par immuno-électro-microscopie dans des selles humaines (Kapikian *et al.*, 1972). (**Figure 1**).

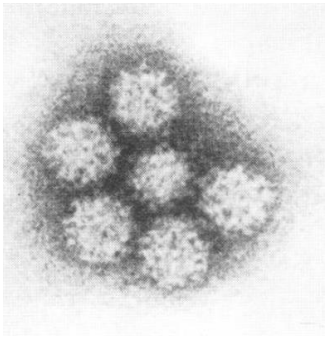


Figure 1 : **Première observation du virus de Norwalk par immuno-électro-microscopie, d'après Kapikian *et al*. (1972).**

En 1982, quatre critères ont été sélectionnés pour identifier une épidémie de gastro-entérite aiguë à NoV : i) vomissement chez plus de la moitié des personnes affectées, ii) une durée d'incubation comprise entre 24 et 48 h, iii) des symptômes présents pendant 12 à 60 h et, iv) absence de bactéries pathogènes dans les selles de personnes infectées (Kaplan *et al.*, 1982).

En 1990, le séquençage complet du génome du virus isolé à Norwalk a permis le développement d'outils moléculaires qui ont facilité les compréhensions moléculaire, immunologique et épidémiologique des NoV (Xi *et al.*, 1990).

2. Structure des norovirus

Les NoV appartiennent à la famille des *Caliciviridae* (King *et al.*, 2012). Ils sont constitués d'une capside protéique icosaédrique non enveloppée d'environ 40 nm de diamètre dans laquelle se trouve un acide ribonucléique (ARN).

a) Organisation du génome

Les NoV possèdent un génome à ARN simple brin de polarité positive d'environ 7 500 nucléotides. A l'extrémité 5', l'ARN est lié de manière covalente à une protéine de 16 kilodaltons (kDa) appelée VPg et qui joue le rôle de coiffe. Tandis qu'à l'extrémité 3', l'ARN présente une queue poly A. Le génome des NoV est divisé en trois cadres ouverts de lecture (ORF ou *open reading frame*) bordés en 5' et 3' d'une région non codante (**Figure 2**) (Jiang *et al.*, 1993; Lambden *et al.*, 1993). L'ORF1 code pour une polyprotéine comprenant toutes les protéines non structurales et qui est clivée de manière autocatalytique pour produire les protéines non structurales. L'ORF2 code pour la protéine de capside majoritaire, VP1 (~60 kDa). L'ORF3 code pour la protéine de capside minoritaire, VP2, dont une de ses fonctions serait de réguler l'expression et la stabilité de VP1. La taille de VP2 peut varier d'un génotype à un autre (Bertolotti-Ciarlet *et al.*, 2003; Seah *et al.*, 1999).

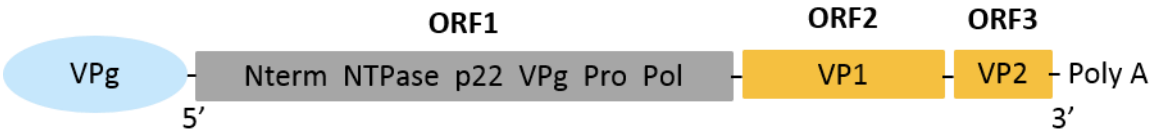


Figure 2 : Schéma de la structure du génome des NoV, composé de trois ORF. L'ORF1 code pour une polyprotéine qui fournira après clivage 6 protéines non structurales : NS1/2 (Nterm), NS3 (NTPase), NS4 (p22), NS5 (VPg), NS6 (Pro) et NS7 (Pol). Les ORF2 et ORF3 codent respectivement pour les protéines VP1 et VP2.

Le génome des NoV se comporte, de par sa structure et sa composition, comme un ARN messager (ARNm), c'est-à-dire qu'une fois dans la cellule hôte, la machinerie cellulaire de la cellule infectée sera exploitée pour traduire directement l'ARN en protéines virales.

b) Protéines virales

i. Protéines non structurales

Les protéines non structurales sont codées par l'ORF1 qui après clivage fournira 6 protéines non structurales :

- La protéine NS1/NS2(N-term ou p48) qui aurait un rôle important dans le cycle réplicatif en participant au développement du complexe de réplication virale et en entravant le

fonctionnement normal des voies de signalisation cellulaire et l'activation de la réponse immunitaire (Ettayebi et Hardy, 2003; Hyde et Mackenzie, 2010; Lateef *et al.*, 2017).

- La protéine NS3 (p41 ou 2C-like), une NTPase avec un potentiel rôle d'hélicase (Li *et al.*, 2018; Pfister et Wimmer, 2001).
- La protéine NS4 (p22ou 3A-like) qui interagit avec le cytosquelette et le complexe de réplication (Hyde et Mackenzie, 2010).
- La protéine NS5 (VPg), protéine de coiffe de l'ARN à l'extrémité 5', celle-ci est nécessaire à la réplication et à la traduction de l'ARN (Belliot *et al.*, 2008; Chaudhry *et al.*, 2006).
- la protéine NS6 (Pro ou 3C-like), cystéine-protéase qui permet le clivage de la polyprotéine non structurale (Belliot *et al.*, 2003; Sosnovtsev *et al.*, 2006).
- La protéine NS7 (RdRp ou Pol), c'est une ARN polymérase ARN-dépendante qui est responsable de la réplication du génome (Deval *et al.*, 2017).

ii. Protéines structurales

Les deux protéines structurales sont codées par l'ORF2 et l'ORF3 et correspondent, respectivement, aux protéines de capside VP1 (~530 acides aminés) et VP2 (~212 acides aminés). Bien que la capside virale des NoV ait pendant longtemps été décrite comme une structure icosaédrique de symétrie T=3 composée de 180 monomères de VP1, de récentes données ont montré qu'il existait un polymorphisme structurel entre et au sein des génogroupes (*i.e.* T=1, T=3 et T=4) et que le nombre de monomères de VP1 pouvait aller jusqu'à 240 (Jung *et al.*, 2019). Les monomères de VP1 peuvent avoir quatre conformations différentes (A, B, C et D) pouvant être organisés en dimères avec deux conformations spécifiques : A/B et C/C ou A/B et C/D respectivement pour les formes icosaédriques T=3 et T=4 (Devant *et al.*, 2019; Jung *et al.*, 2019; Prasad *et al.*, 1999). La protéine VP1 est divisée en plusieurs domaines (**Figure 3**) :

- Le domaine N, constituant la partie N-terminale, est retrouvé à l'intérieur de la capside.
- Le domaine S (coque ou *shell*), essentiel à la formation de la capside, correspond à la région la plus conservée.
- Le domaine P (protubérance ou *protruding*) correspond au domaine variable de la capside. Il s'associe naturellement avec un autre domaine P d'une autre protéine VP1, formant des dimères. Dans le dimère, les domaines P forment une arche et constituent la partie externe de la capside. Ce domaine P est lui-même divisé en deux sous-domaines :

- Le sous-domaine P1 qui est plutôt conservé.
- Le sous-domaine P2, inséré dans le sous-domaine P1, correspond à la région hypervariable de la capside. Le sous-domaine P2 est localisé à la surface externe de la capside et est impliqué dans la reconnaissance des HBGA par les NoV (Cao *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2011; Hansman *et al.*, 2011; Shanker *et al.*, 2011; Singh *et al.*, 2015).

La protéine VP2 est représentée en faible quantité dans la particule virale avec une ou deux copies uniquement. Sa fonction précise est encore inconnue à ce jour. Selon certains auteurs, elle pourrait jouer un rôle dans la stabilité de la capside (Bertolotti-Ciarlet *et al.*, 2003; Lin *et al.*, *2014)*. Des expériences de mutagenèse ont aussi montré qu'elle serait essentielle pour l'obtention de particules virales infectieuses (Sosnovtsev *et al.*, 2005; Vongpunsawad *et al.*, 2013).

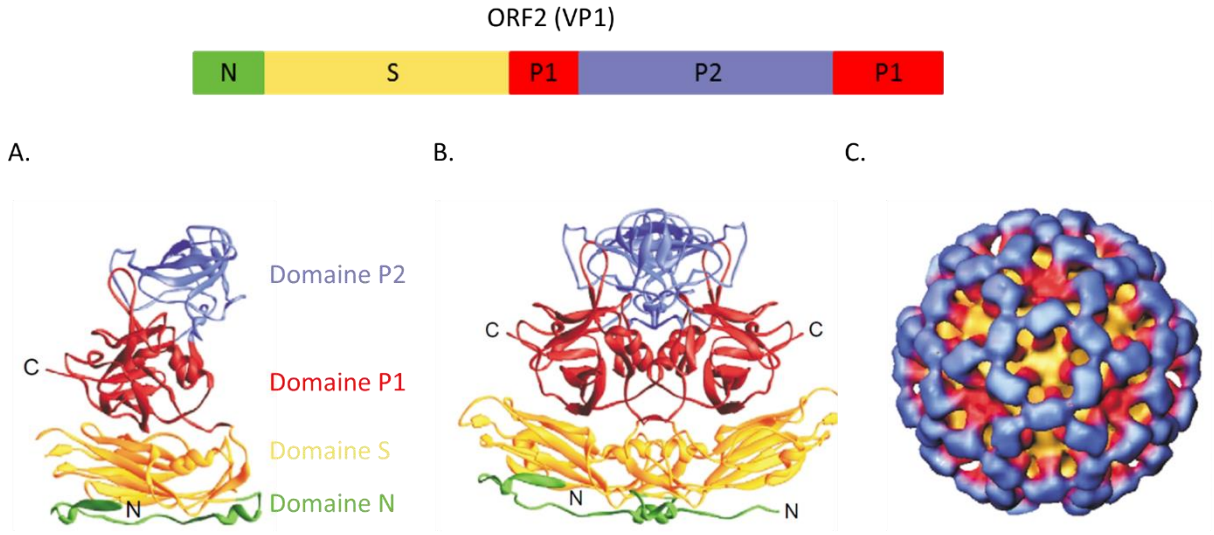


Figure 3 : Structure et assemblage de la protéine de capside VP1, d'après Hutson *et al.* (2004). A. La protéine VP1 est divisée en trois domaines : le domaine N terminal (en vert), le domaine S (coque ou *shell* ; en jaune), et le domaine P (protubérance ou *protruding*). Le domaine P est constitué du sous-domaine P1 conservé (en rouge) composé environ de 168 acides aminés et du sous-domaine P2 hypervariable (en violet) composé environ de 127 acides aminés. B. Les protéines VP1 sont associées sous forme de dimères. C. La capside virale entièrement formée.

c) Classification et génotypes

Les NoV sont caractérisés par une grande diversité génétique et antigénique (Zheng *et al.*, 2006). Ces variabilités ont conduit à la définition de plusieurs génogroupes et génotypes. La

classification se base sur des critères génétiques. Selon les séquences en acides aminés de la protéine VP1, une hiérarchisation du genre *Norovirus* à trois niveaux a été décrite comprenant le génogroupe, le génotype et la souche. Ainsi, 10 génogroupes (GI à GX) et deux génogroupes non assignés (GNA) se distinguent avec 49 génotypes au total (**Figure 4**) (Chhabra *et al.*, 2019). D'après l'étude Zheng *et al.* (2006) sur l'analyse des séquences en acides aminés de la protéine VP1, celle-ci a montré différents niveaux de variabilité pour les NoV figurant dans un même génogroupe (44,9 % à 61,4 %), dans un même génotype (14,3 % à 43,8 %) et au sein d'une même souche (0% à 14,1%).

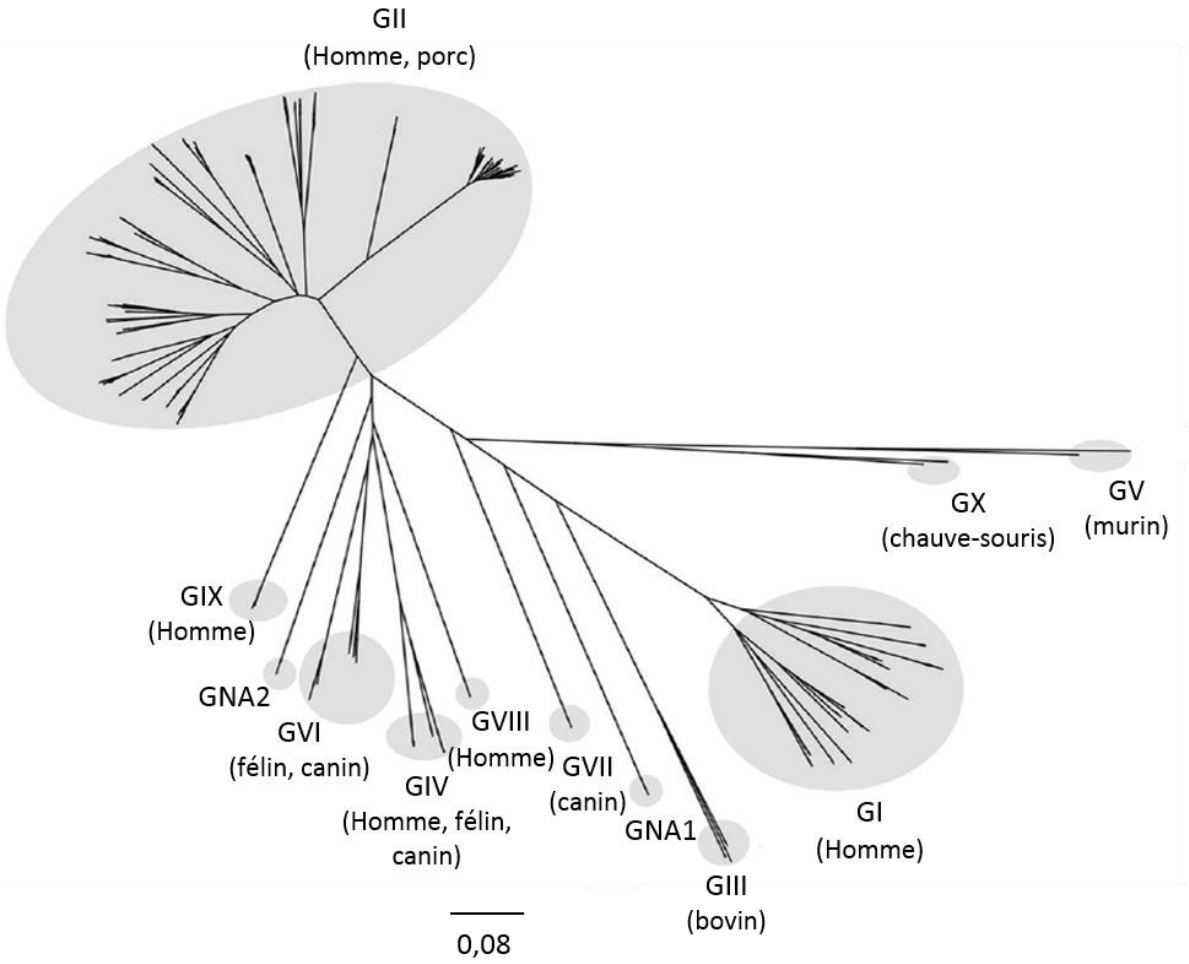


Figure 4: Classification des NoV basée sur les séquences en acides aminés de la protéine de capside VP1, adaptée de Chhabra *et al.* (2019). Deux génogroupes n'ont pas été assignés (NA).

Les génogroupes GI, GII et GIV sont impliqués dans les infections chez l'Homme mais les génogroupes I et II, comprenant respectivement au moins 9 et 25 génotypes, sont les plus importants dans les épidémies humaines avec une prédominance pour les souches du génotype

GII.4 (Vinjé, 2015; White, 2014). Trois génotypes du génogroupe GII (GII.11, GII.18 et GII.19) ont été détectés uniquement chez le porc (Mattison *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2005). Le génogroupe GIII regroupe trois génotypes détectés chez les bovins (Chhabra *et al.*, 2019; Han *et al.*, 2004; Oliver *et al.*, 2003). Le génogroupe GIV est pathogène chez les félins, les canins et l'Homme (Di Martino *et al.*, 2016; Ford-Siltz *et al.*, 2019; Martella *et al.*, 2007). Les NoV du génogroupe GV ont plutôt une origine murine (Hsu *et al.*, 2007; Karst *et al.*, 2003), tandis que le génogroupe GVI a plutôt une origine féline ou canine (Ford-Siltz *et al.*, 2019; Mesquita *et al.*, 2010). Quatre nouveaux génogroupes ont été identifiés correspondant au génogroupe GVII retrouvé chez les canins, les génogroupes GVIII et GIX (reclassifié du génotype GII.15) chez l'Homme, et le GX chez la chauve-souris (Vinjé, 2015; Wu *et al.*, 2016).

3. Culture cellulaire / Réplication

La réplication et la culture *in vitro* des NoV dans des systèmes cellulaires sont restées pendant très longtemps infructueuses (Duizer *et al.*, 2004b; Lay *et al.*, 2010). Ce n'est que très récemment que différentes approches ont permis la réplication in vitro de certains génotypes de NoV, en utilisant des lymphocytes B, des entéroïdes ou encore des larves de poissons zèbres (Ettayebi *et al.*, 2016; Jones *et al.*, 2015; Van Dycke *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2017). D'autres systèmes utilisant des cellules rénales viennent d'être proposés (Jeong *et al.*, 2020; Todd et Tripp, 2020a). Cependant, ces différentes méthodes sont lourdes, complexes et coûteuses à mettre en œuvre. D'autre part, ces méthodes ne permettent qu'une réplication faible à modérée des NoV, oscillant généralement entre 1 à 3 $\log_{10}$. Les niveaux de réplication sont mesurés par les techniques de biologie moléculaire, ce qui ne permet pas de déterminer la quantité de NoV réellement infectieux générés par ces différentes approches. Enfin, les différentes méthodes précédemment décrites pour détecter les NoV infectieux sont très peu sensibles. En plus d'être encore très délicates et limitées à certains laboratoires spécialisés, ces méthodes resteront malheureusement inapplicables pour des analyses de routine pour détecter les NoV infectieux dans des aliments ou de l'eau. Toutefois, l'utilisation de cette approche sera d'une grande utilité pour valider les outils de gestion les plus appropriés ainsi que pour étudier les mécanismes de survie, de tropisme cellulaire ou encore de pathogénicité des NoV dans les années à venir.

Néanmoins, à l'aide de virus modèles cultivables ainsi que l'utilisation de pseudo particules virales (VLP ou *virus-like particle*), certaines étapes du cycle de réplication des NoV ont pu être définies. Les NoV pénètrent par voie orale pour atteindre l'intestin grêle, qui est le site d'infection. Contrairement à la majorité des virus entériques qui infectent majoritairement les

entérocytes, il est possible que les NoV aient un double tropisme pour les cellules intestinales (*i.e.* entérocytes) et les cellules immunitaires (cellules dendritiques, lymphocytes B, macrophages) (Bartnicki *et al.*, 2017; Karst et Tibbetts, 2016; Wobus, 2018).

Lorsque les NoV atteignent leur cellule hôte, ces derniers vont reconnaître des ligands spécifiques. Pour de nombreux virus enveloppés et non enveloppés, les oligosaccharides présents sur les glycoprotéines ou les glycolipides à la surface des cellules ont été identifiés comme des récepteurs fonctionnels. C'est le cas notamment du NoV murin (MNV), qui se fixe aux acides sialiques terminaux des gangliosides présents à la surface des macrophages (Taube *et al.*, 2009). Contrairement aux MNV, les NoV sont capables de reconnaître spécifiquement les HBGA. Ces sucres complexes sont aujourd'hui considérés comme des facteurs d'attachement facilitant l'infection des NoV dans la cellule hôte (Ettayebi *et al.*, 2016; Hutson *et al.*, 2002; Marionneau *et al.*, 2002). Les HGBA seront plus largement décrits dans le chapitre II car ils sont au cœur de ces travaux de thèse. En parallèle, il a aussi été montré que l'infection pourrait être médiée par des exosomes (*i.e.* vésicules extracellulaires dont la taille varie de 50 à 150 nm) transportant des particules virales ou l'ARN des NoV. Les exosomes, stables dans les fluides, pourraient permettre aux NoV de ne pas être détectés immunologiquement et de se regrouper, augmentant ainsi la probabilité d'infection (Koga *et al.*, 2011; Santiana *et al.*, 2018; Todd et Tripp, 2020b).

Une fois la particule virale internalisée, l'ARN génomique est injecté dans le cytoplasme de la cellule hôte. Pour les virus possédant un ARN de polarité positive comme les NoV, le génome viral va se comporter comme un ARNm. Il sera directement traduit en protéines en utilisant la machinerie cellulaire de l'hôte (**Figure 5**). La traduction de l'ORF1 permet la synthèse de la polyprotéine et l'obtention des 6 protéines non structurales. L'ARN polymérase ainsi obtenue initie la synthèse du brin antisens (-) à l'extrémité 3'. L'initiation de la réplication de l'ARN est enclenchée et la protéine VPg fixée en 5' semble être nécessaire dans ce processus (Chaudhry *et al.*, 2006; Goodfellow *et al.*, 2005; Guix *et al.*, 2007). Le brin antisens (-) formé sert de matrice pour la production d'ARN génomique (+) et d'ARN subgénomique (+). Les brins d'ARN subgénomique sont produits en grande quantité pour permettre la synthèse des protéines structurales VP1 et VP2 (Thorne et Goodfellow, 2014).

Concernant les mécanismes de l'assemblage viral, de l'encapsidation et la libération des nouveaux virions (*e.g.* particules infectieuses), peu de données ont été décrites dans la littérature. Cependant, l'encapsidation du génome viral pourrait être favorisée soit par

l'interaction de l'ARN avec la protéine de capside VP2, soit par l'interaction entre la protéine VPg et les protéines de capside VP1 (Kaiser *et al.*, 2006; Thorne et Goodfellow, 2014).

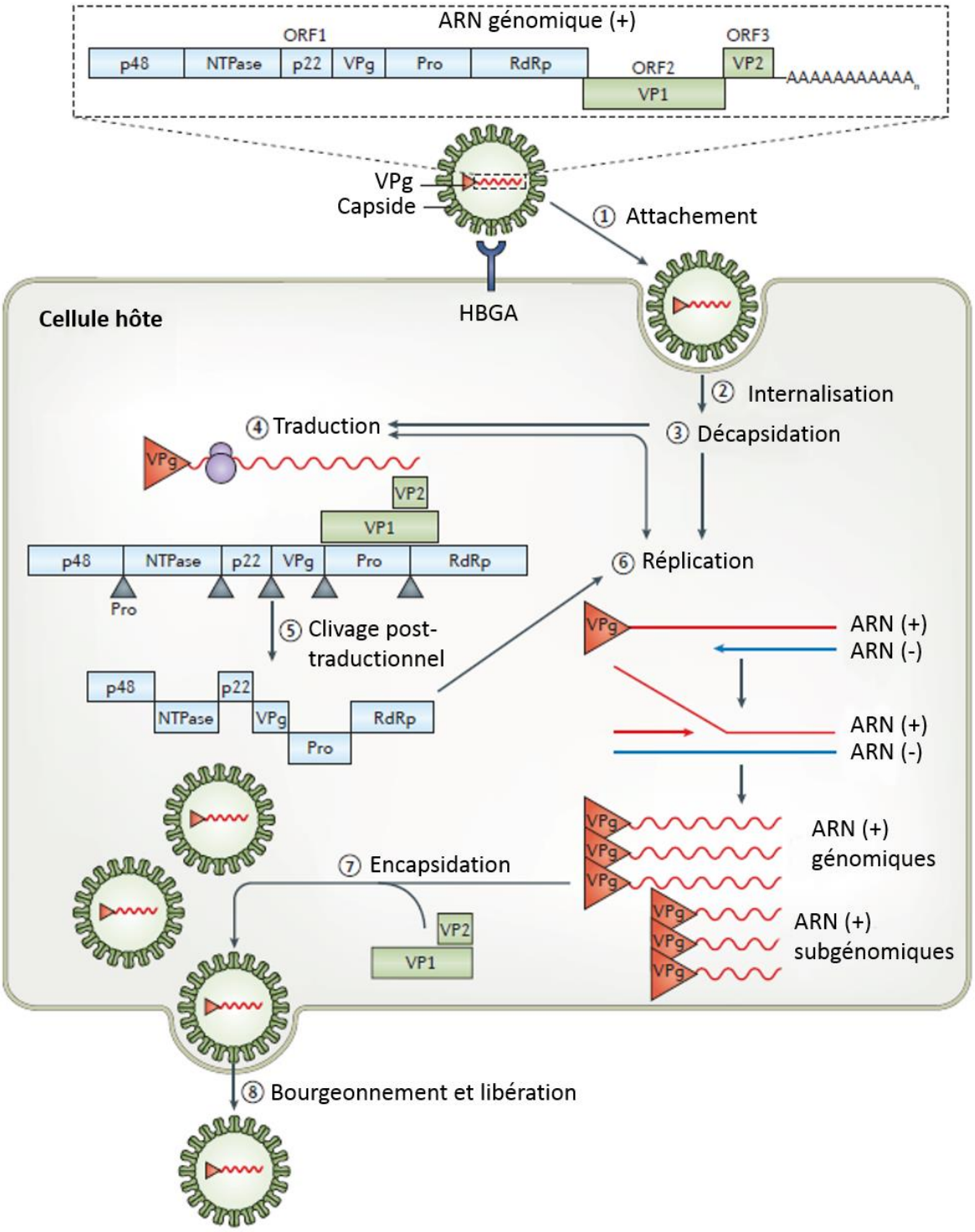


Figure 5 : Cycle de réplication des NoV, d'après De Graaf *et al.* (2016). 1. La capside des NoV se fixe à sa cellule hôte par le biais d'interactions entre VP1 et les HBGA de l'hôte. 2/3. L'internalisation et la décapsidation du virus dans la cellule hôte sont des étapes mal

connues. 4. Le génome des NoV est ensuite traduit en une polyprotéine et en protéines structurales VP1 et VP2 par la machinerie cellulaire de la cellule hôte. 5. La polyprotéine est clivée en protéines non structurales qui seront nécessaires à la réplication du génome viral. 6. La réplication du génome (ARN génomiques et subgénomiques) est assurée par l'ARN polymérase ARN dépendant à partir d'un brin d'ARN (-) complémentaire de l'ARN génomique. 7. Les génomes répliqués sont encapsidés pour produire de nouveaux virions. 8. Les virions sont libérés de la cellule hôte.

4. Propriétés antigéniques

Les antigènes de capsides des NoV sont portés par la zone hypervariable du sous-domaine P2 de la protéine VP1. En l'absence de méthode de culture *in vitro* robuste, le sérotypage par des techniques de neutralisation est impossible. Pour combler ce manque et accroître les connaissances des propriétés antigéniques des NoV, l'utilisation de pseudo particules virales (*i.e.* VLP) ou des particules P (*i.e.* particules constituées uniquement des domaines P) a permis de lever certains verrous.

Les VLP sont obtenues à l'aide de techniques de biologie moléculaire combinées à un système d'expression (*i.e.* baculovirus, levure, plante transgénique) (Jiang *et al.*, 1992; Tacket *et al.*, 2000; Xia *et al.*, 2007). Elles sont produites par l'expression de la protéine majeure de capside VP1 avec ou sans la protéine mineure de capside VP2. Les protéines ainsi obtenues s'auto-assemblent pour former des VLP qui expriment des propriétés morphologiques, antigéniques et biochimiques similaires à celles des NoV (Green *et al.*, 1993; Jiang *et al.*, 1992). C'est la raison pour laquelle les VLP sont fréquemment utilisées comme modèle pour étudier le comportement des NoV. Les VLP permettent aussi l'étude structurale de la capside, la production d'anticorps monoclonaux spécifiques des NoV avec le développement de tests de diagnostic ou de vaccins, ainsi que l'étude de l'interaction des NoV avec leurs ligands. Enfin, les VLP peuvent être produites en grande quantité et peuvent être concentrées et purifiées par des méthodes utilisant des gradients de sucrose ou de chlorure de césium par ultracentrifugation (Rougemont *et al.*, 2011).

De la même manière que les VLP, les particules P sont obtenues en combinant des techniques de biologie moléculaire et un système d'expression (*i.e. E. coli*, levures). Cependant, seuls les domaines P sont exprimés. Lorsque les domaines P sont exprimés, ils vont s'assembler en dimères puis former un complexe formant une particule (Tan *et al.*, 2008a, 2004). Ces particules peuvent être constituées de 12 ou 24 monomères de P qui s'organisent respectivement en 6 et

12 dimères identiques pour former un complexe (*i.e.* la particule P) (Tan et Jiang, 2012, 2005). Le mécanisme d'assemblage des dimères est similaire à celui des VLP, dans lequel le sous-domaine P1 sert de support tandis que le sous-domaine P2 est présent à la surface externe de la particule P (Tan *et al.*, 2008a).

5. Propriétés physico-chimiques

Les NoV possèdent une densité de flottaison qui varie de 1,38 à 1,41 g/cm^3 dans le chlorure de césium et les VLP ont une densité de flottaison de 1,31 à 1,32 g/cm^3 (Belliot *et al.*, 2001; Kapikian *et al.*, 1973).

Les virus peuvent s'agréger en milieu liquide en fonction du pH, de la force ionique du milieu et du type de sel cationique présent. Ainsi, une charge globale négative de surface de la particule virale est observée lorsque le pH du milieu est supérieur au point isoélectrique (pI, pH pour lequel la charge globale de la particule est nulle). Inversement, une charge globale positive de surface de la particule virale est observée lorsque le pH du milieu est inférieur au pI. Le pI des NoV a été déterminé expérimentalement à l'aide de mesures de la charge électrique des particules virales (*i.e.* vitesse de migration du virus soumis à un champ électrique) dans différentes conditions ioniques (*i.e.* pH). Ainsi, le pI a été estimé allant de 4,2 à 6,9 (Goodridge *et al.*, 2004; Samandoulgou *et al.*, 2015). Il est donc possible de faire agréger les NoV en baissant le pH pour se rapprocher de leur point isoélectrique.

D'autre part, l'hydrophobie de surface des virus joue également un rôle important dans l'adhésion et/ou l'agrégation des particules virales (Dika *et al.*, 2015; Langlet *et al.*, 2008). L'hydrophobie correspond à des interactions de plus faibles distances qui peuvent avoir lieu quand les charges électrostatiques de la particule virale sont faibles (*e.g.* milieu avec un pH proche du pI du virus ou avec une force ionique entraînant une neutralisation des charges). L'adhésion peut être également impactée par l'hydrophobie apportée ou non par les chaînes radicales des acides aminés constituant le domaine P de la protéineVP1 (Samandoulgou *et al.*, 2015).

6. Infection à norovirus

a) Mode de transmission

Les NoV circulent chez l'Homme et dans l'environnement. La transmission chez l'Homme se fait principalement par la voie féco-orale (**Figure 6**). Trois types de transmission sont connus : directe (*e.g.* de personne à personne), indirecte (*e.g.* surfaces, eaux souillées, aliments contaminés) et aérienne (*e.g.* vomissures). La transmission de personne à personne est celle qui est la plus décrite dans les épidémies à NoV (Lopman *et al.*, 2003; Yen *et al.*, 2011). Parmi toutes les épidémies à NoV reportées entre 2001 et 2006, 88 % sont suspectées d'être dues à une transmission de personne à personne (Kroneman *et al.*, 2008). La transmission *via* les aliments est aussi largement décrite où les NoV sont la première cause de toxi-infection alimentaire collective (TIAC) aux Etats-Unis (CDC, 2018; Vega *et al.*, 2013). Ce mode de transmission serait suspecté dans 12 % des épidémies à NoV (Kroneman *et al.*, 2008).

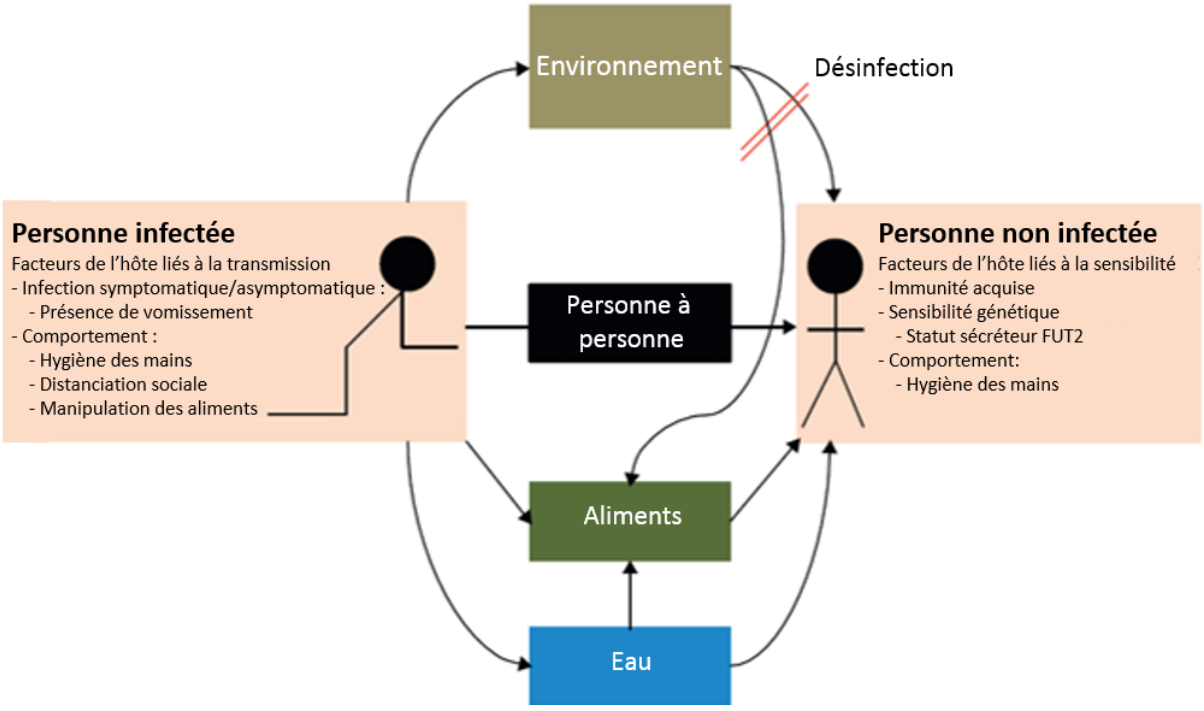


Figure 6: Transmission des NoV, d'après Lopman *et al.* (2012). Les caractéristiques et les comportements de l'hôte infecté et des personnes potentiellement sensibles peuvent accentuer ou atténuer le risque de transmission.

De nombreux facteurs peuvent favoriser la transmission des NoV :

- Réservoir humain : l'incidence d'une infection par les NoV est variable, pouvant aller de 5 % à 16 % par an par an chez les personnes de tous les âges (en Angleterre et aux Etats-Unis) (Hall *et al.*, 2011; Phillips *et al.*, 2010). De plus, il faut savoir que les individus asymptomatiques peuvent jouer un rôle important dans le maintien et la circulation des NoV. En effet, une étude portant sur les infections asymptomatiques à NoV a estimé que la prévalence globale était de 7 %. En Europe, elle serait de 4 % (Qi *et al.*, 2018).
- Forte excrétion de NoV dans les selles des patients contaminés : le pic d'excrétion peut varier entre 10^5 et 10^9 copies de génome (cg) par gramme de selles (Atmar *et al.*, 2008).
- Excrétion prolongée des NoV dans les selles : la durée d'excrétion peut varier entre une et huit semaines après l'apparition des premiers symptômes de gastro-entérites aiguës (Atmar *et al.*, 2008).
- Dose infectieuse pour l'Homme : la dose nécessaire pour infecter 50 % des individus humains (HID_{50}) a été estimée entre 18 et 2 800 cg pour le NoV GI.1 (Atmar *et al.*, 2014; Teunis *et al.*, 2008). Récemment, une méta-analyse a estimé que le risque d'infection moyen pour des individus sécréteurs d'HGBA était de 0,28 et de 0,076 pour une cg de NoV GI et GII, respectivement (Teunis *et al.*, 2020). Pour des individus non sécréteurs d'HBGA, le risque d'infection moyen était de 0,00007 et 0,015 pour une cg de NoV GI et GII, respectivement (Teunis *et al.*, 2020).
- Stabilité relative des NoV dans l'environnement : les particules de NoV sont des virus nus qui peuvent rester infectieux jusqu'à 61 jours dans de l'eau souterraine à température ambiante. Quant au génome des NoV, il est resté détectable pendant plus de 3 ans dans les eaux souterraines (Seitz *et al.*, 2011).
- Résistance potentielle aux traitements de désinfection : pendant longtemps les traitements d'inactivation des NoV ont été évalués par la quantification du génome. Cependant de récentes études ont démontré que la présence du génome après inactivation était fortement persistante en comparaison avec des virus modèles (Knight *et al.*, 2016). L'utilisation de ces divers virus modèles plus ou moins représentatifs du comportement des NoV a permis de montrer que les particules infectieuses pouvaient persister malgré les diverses stratégies de désinfection (Hirneisen *et al.*, 2010; Hoelzer *et al.*, 2013). Cependant, le type, la concentration et le temps des traitement utilisés peuvent avoir un impact variable sur la sensibilité des virus.
- Hygiène du personnel et manutention des aliments : les surfaces des équipements et les aliments peuvent être contaminés par des matières fécales ou des vomissures provenant

d'individus symptomatiques ou asymptomatiques (Boxman *et al.*, 2011; de Wit *et al.*, 2007).

b) Manifestations cliniques

Les NoV peuvent infecter des personnes de tout âge (Grytdal *et al.*, 2016; Phillips *et al.*, 2010). Bien que des épidémies à NoV soient décrites toute l'année, elles sont plus importantes pendant les périodes hivernales (Mounts *et al.*, 2000). La période d'incubation des NoV est estimée entre 24 à 48 h et les symptômes peuvent être caractérisés par une apparition de nausées, de fièvres, de vomissements, de crampes abdominales, de douleurs musculaires (ou myalgies) et de diarrhées non sanglantes (de Graaf *et al.*, 2016). Les symptômes disparaissent généralement en 2 à 3 jours (Atmar *et al.*, 2008).

Des formes cliniques plus graves peuvent se déclencher chez les personnes immunodéprimées, les personnes âgées et les nourrissons. Ils peuvent présenter une évolution de la maladie plus persistante avec une déshydratation, une perte de poids significative, une diarrhée chronique pendant plusieurs mois, une insuffisance rénale (Bok et Green, 2012; Goller *et al.*, 2004; Koo *et al.*, 2010; Murata *et al.*, 2007; Schwartz *et al.*, 2011; van Asten *et al.*, 2012). Le taux de mortalité lié à l'infection par les NoV est considéré comme étant relativement faible (Kirk *et al.*, 2015). Des atteintes sanguines ou hépatiques ont également été décrites de manière sporadique (Armbrust *et al.*, 2009; Ho *et al.*, 2020; Ito *et al.*, 2006; Kanai *et al.*, 2010; Sugimoto *et al.*, 2007; Zenda *et al.*, 2011). Des entérocolites nécrosantes (*e.g.* ulcérations et nécroses étendues de l'iléon et du côlon) chez les nouveau-nés ont aussi été rapportées (Medici *et al.*, 2010; Turcios-Ruiz *et al.*, 2008).

c) Pathogénicité

Des études chez des volontaires sains ont apporté beaucoup d'informations sur la sensibilité de l'hôte et sur la réponse immunitaire associée à une infection à NoV. Plusieurs études ont montré qu'environ 40 à 50 % des volontaires sains n'ont jamais été infectés par les NoV et seulement 50 à 60 % d'entre eux ont développé des symptômes (Parrino *et al.*, 1977; Wyatt *et al.*, 1974). Ces chiffres sont aujourd'hui expliqués par les HBGA et le caractère sécréteur ou non sécréteur des individus. Ces aspects seront plus largement développés dans le chapitre II (Harrington *et al.*, 2002; Marionneau *et al.*, 2002).

La réponse immunitaire visant les NoV est de courte durée, comprise entre 6 à 14 semaines (Parrino *et al.*, 1977). Cependant, une immunité partielle peut être envisagée par la diminution progressive de la durée des symptômes avec l'âge (Rockx *et al.*, 2002). D'autre part, l'immunité acquise pour un génogroupe et/ou un génotype donné de NoV ne permet pas d'avoir une protection efficace contre un autre génogroupe et/ou génotype (Wyatt *et al.*, 1974).

d) Prévalence dans les aliments

En Europe, les NoV oscillent entre la 1ère et la 4ème cause d'épidémie alimentaire avec *Salmonella*, les toxines bactériennes et *Campylobacter* selon les années (EFSA, 2018, 2016, 2015). Lorsque la prévalence du génome viral des NoV est étudiée dans les aliments à risque, celle-ci est retrouvée dans des proportions très variables. Elle se situerait entre 9 % et 71,6 % pour les huîtres, 2,9 et 16 % pour les fruits rouges, et enfin 0 et 74,8 % pour la laitue (**Tableau 1**). Dans les eaux embouteillées, peu de données sont décrites dans la littérature. Au début des années 2 000, une étude analysant plusieurs marques d'eaux minérales a insiqué une prévalence des NoV à 33 % des NoV (Beuret *et al.*, 2002) mais les résultats ont ensuite été attribués à des contaminations introduites par le laboratoire (Sanchez *et al.*, 2005). Par la suite, sur 640 échantillons provenant de 36 marques d'eaux minérales différentes, aucune détection de NoV n'a été démontrée (Lamothe *et al.*, 2003). Néanmoins, il n'est pas à exclure que les NoV puissent être responsables d'épidémies suite à la consommation d'eau embouteillée (Blanco *et al.*, 2017). Ces données permettent de montrer que la détection du génome peut être très variable et que cette méthode n'est pas qualifiée pour définir le seuil du risque infectieux des NoV.

Tableau 1 : Prévalence en génome de NoV dans les coquillages, les végétaux et les fruits pour des échantillonnages représentatifs (n > 120) entre 2007 et 2018.

Caractéristiques de l'échantillonage					Nombre d'échantillons		Prévalence	Références
Aliments	Espèce / variété	Lieu de prélèvement	Origine	Date	Analysés	positifs	(%)	
Coquillages	Huîtres	Marché, supermarché	France	2010 – 2011	387	35	9,0	(Schaeffer *et al.*, 2013)
	Moules	Zone de production, produits importés	Espagne, Grèce, Finlande	2010	153	26	17,0	(Diez-Valcarce *et al.*, 2012)
	Huîtres, moules, palourdes	Zone de production	Italie	2008 - 2012	336	173	51,1	(Suffredini *et al.*, 2014)
	Moules, palourdes, coques	Zone de production	Espagne	2011 – 2012	168	97	57,7	(Polo *et al.*, 2015)
	Huîtres, moules, couteaux, palourdes, amandes de mer	Zone de production, restauration, détaillant	Italie	2007 – 2010	163	94	57,7	(Pepe *et al.*, 2012)
	Huîtres	Zone de production	Grande Bretagne	2007 – 2010	873	625	71,6	(Lowther *et al.*, 2012)
	Huîtres	Zone de production	Chine	2017 - 2018	356	60	16,9	(Zhang *et al.*, 2021)
	Huîtres	Zone de production, marché, restauration	Chine	2016	480	96	20,7	(Tan *et al.*, 2018)
	Huîtres	Zone de production	Europe	2016 - 2018	2 180	831	34,5	(EFSA, 2019a)
	Huîtres	Centre d'expédition	Europe		2 129	226	10,8	(EFSA, 2019a)

	Moules, palourdes, huîtres	Zone de production	Italie	2013 – 2015	253	36	14,2	(La Bella *et al.*, 2017)
	Moules, palourdes, huîtres	Marché, ravitaillement école	Corée du Sud	2011	152	42	13,8	(Seo *et al.*, 2014)
Fruits rouges	Framboises, fraises	Industries alimentaires	France	2009 – 2010	150	10	6,7	(Baert *et al.*, 2011)
	Framboises, fraises, mûres (produits congelés)	Producteurs industriels	Serbie, Chili, Bulgarie, Pologne, France, Espagne, Maroc, Turquie	2009 – 2010	200	32	16,0	(Loutreul *et al.*, 2014)
	Fraises, myrtilles, framboises, canneberges, mûres et cassis (fraîches et congelées)	Supermarché, centre d'expédition	Chine	2016-2017	2 477	190	7,7	(Gao *et al.*, 2019)
	Framboises (fraîches et congelées)	Grossiste, supermarché, marché, petit détaillant	Grande Bretagne	2015-2016	584	17	2,9	(Cook *et al.*, 2019)
Salades	Laitues (matières premières et produits de 4ème gamme*)	Producteurs industriels	Espagne	2010 – 2012	120	6	5,0	(Pérez-Rodríguez *et al.*, 2014)

Laitues, chicorées,mâches (matières premières)	Producteurs industriels	Espagne, Italie, Belgique, France, Tunisie	2011	210	26	12,4	(Loutreul *et al.*, 2014)
Laitues,roquettes, radiccios	Supermarché	Canada	2009 - 2010	641	181	28,2	(Baert *et al.*, 2011)
Laitues	Grossiste, supermarché, marché, petit détaillant	Grande Bretagne	2015 - 2016	568	30	5,3	(Cook *et al.*, 2019)
Salades composées, carottes, roquettes, valériannes, épinards, laitues (iceberg et romaines) (produits de 4ème gamme)	Supermarché	Italie	2014 - 2015	911	0	-	(Terio *et al.*, 2017)
Salades composées, carottes, valérianes, roquettes, épinards, laitues (romaines et Icebergs), endives, chicorées	Centre d'expédition	Italie	2017 - 2018	135	101	74,8	(Terio *et al.*, 2020)
Laitues	Zone de production	Delta du Nil	2008 - 2009	144	35	24,3	(El-Senousy *et al.*, 2013)

Produit de 4ème gamme : légumes et fruits frais, crus, lavés, épluchés et coupés conditionnés sous air ambiant ou atmosphère modifiée ou encore sous vide, en sachet ou en barquette.

e) Méthodes de détection

Il existe aujourd'hui de nombreuses méthodes pour rechercher les NoV. Les NoV ont été découverts grâce à la microscopie mais rapidement, des techniques cherchant à détecter le génome viral ou les antigènes de surfaces des protéines de capside ont été mises au point pour avoir des résultats plus sensibles et plus rapides. Sur la base de différents critères, une comparaison des différents types de méthodes de détection des NoV est résumée dans le **Tableau 2**.

Tableau 2: Comparaison des différentes méthodes de détection des NoV, d'après Liu et Moore (2020).

Méthodes	Prix	Temps	Sensibilité	Spécificité	Limite de détection
Microscopie électronique	Élevé	15 min	Faible	Faible	10^5 -10^7 particules virales/mL de selle
RT-PCR en temps réel	Élevé	40 min - 3 h (avec acides nucléiques pré-extraits)	Élevée	Élevée	Environ 10-100 cg/g d'échantillon
Dosage immuno-enzymatique	Moyen	60-90 min	31,6-92,0 %	65,3-100,0 %	10^4-10^6 particules virales/mL de selle
Immuno-chrom-matographie	Moyen	15 min	17,0-83,0 %	87,5-100,0 %	ND
Biocapteur	Élevé	Court (variable)	Élevée	Élevée	Faible

ND : Non déterminé

i. Microscopie électronique

La microscopie a été la première méthode permettant la détection des virus entériques tels que les NoV. Cette méthode présente l'avantage de visualiser directement les particules virales. Elle peut ainsi distinguer les particules intactes de celles qui ont été « lésées » ou qui sont vides. Cependant, c'est une technique qui est coûteuse, nécessite un opérateur expérimenté passant beaucoup de temps par échantillon et qui est très faiblement sensible.

Pour ces différentes raisons, elle n'est pas utilisée dans les laboratoires de diagnostic. La limite de détection de cette méthode varie entre 10^5 et 10^7 particules virales (Rabenau *et al.*, 2003; Vinjé, 2015). Cette technique n'est donc pas possible pour la détection de pathogènes dans les aliments et l'environnement car leur concentration est souvent très faible. Pour ces différentes raisons, la microscopie a été peu à peu remplacée par les techniques de biologie moléculaire.

ii. Techniques de biologie moléculaire

Ce n'est qu'à partir de 1990 que les techniques d'amplification du génome ont commencé à être utilisées (Xi *et al.*, 1990). Aujourd'hui, ces techniques, aussi appelées « Amplification en chaîne par polymérase » (PCR ou *polymerase chain reaction*) sont largement utilisées pour la détection de virus entériques notamment dans les aliments et l'environnement où leur concentration est relativement faible. Les NoV, par leur génome à ARN simple brin, sont le plus souvent détectés par une reverse transcription-PCR en point final (RT-PCR) ou en temps réel (RT-qPCR). En raison de l'hétérogénéité du génome des NoV à l'échelle du génogroupe, la détection des génogroupes GI et GII est effectuée avec un couple d'amorces et de sondes spécifiques. Aujourd'hui, les amorces et les sondes les plus récentes ciblent une région très conservée de la jonction entre l'ORF1 et l'ORF2 pour les deux génogroupes (da Silva *et al.*, 2007; Kageyama *et al.*, 2003; Loisy *et al.*, 2005; Svraka *et al.*, 2007).

Ces techniques sont de plus en plus utilisées car elles sont rapides, sensibles et spécifiques. Elles peuvent également estimer de manière quantitative ou semi-quantitative la concentration en cg virale présente dans un échantillon. Cependant, le défaut majeur de cette technique est son incapacité à définir le caractère infectieux du pathogène recherché. Ainsi, la présence de génome dans l'environnement, l'eau et les aliments ne peut pas être corrélée à la présence de particules infectieuses. D'autre part, malgré sa forte sensibilité, la détection du génome peut être impactée par la présence de composés inhibiteurs de PCR mais également par le faible volume de l'échantillon analysé (*i.e.* 10 à 100 µL).

iii. Techniques immunologiques

Les techniques immunologiques prennent principalement en compte la recherche d'épitopes antigéniques. Ces techniques sont proposées sous forme de test immuno-enzymatiques ou immuno-chromatographiques. Les tests immuno-enzymatiques permettent de visualiser une réaction antigène-anticorps grâce à une réaction colorée produite par l'action d'une enzyme,

préalablement fixée à l'anticorps, sur un substrat ajouté. Les tests immuno-chromatographiques, souvent en bandelette, associent une méthode de séparation (*i.e.* chromatographie) avec une méthode d'immunologie (*i.e.* formation d'un complexe immun entre un antigène et un anticorps).

Ces deux techniques sont reconnues pour être rapides et très spécifiques 65,3 à 100 %. Les NoV sont très divers et variables au niveau antigénique, ce qui rend complexe le développement d'anticorps robustes dirigés contre des épitopes antigéniques communs aux deux génogroupes. Les anticorps existants, produits à l'aide de VLP, sont cependant capables de reconnaître un large panel de NoV. En revanche, si elles sont très spécifiques, leur sensibilité leur fait défaut. En raison de ce faible niveau de sensibilité, elles sont souvent réalisées lors de dépistages rapides d'échantillons fécaux prélevés lors d'épidémies de gastro-entérites. Il a été montré que des résultats obtenus par des techniques immuno-enzymatiques ne corrélaient pas systématique à ceux obtenus par RT-qPCR (Costantini *et al.*, 2010). De plus, ces techniques ne détectent pas tous les génotypes, et peuvent ainsi entraîner des faux négatifs (Ambert-Balay et Pothier, 2013; Bruggink *et al.*, 2011; Kele *et al.*, 2011).

iv. Les biocapteurs

Les biocapteurs ont suscité beaucoup d'intérêt au cours des dernières années et ils ont été de plus en plus étudiés concernant la détection des NoV. Un biocapteur se définit comme un dispositif analytique qui permet de convertir une réponse biologique (*i.e.* reconnaissance de l'analyte recherché) en un signal électrique. Globalement, le composant de détection (*e.g.* enzyme, anticorps, antigène, acides nucléiques) reconnaît spécifiquement la cible recherchée par une réaction ou une interaction physique ou chimique et le transducteur traduit les changements induits en un signal quantifiable (*i.e.* électrique ou lumineux) (Saylan *et al.*, 2019).

Les biocapteurs sont reconnus pour avoir une sensibilité et spécificité élevée ainsi que de donner des résultats rapidement (Saylan *et al.*, 2019). En revanche, leur utilisation peut inclure la présence d'un équipement coûteux. Il est également possible que l'adhésion des cibles recherchées soit freinée par une modification de la conformation des ligands natifs utilisés (Liu et Moore, 2020).

v. Les ligands utilisés pour la détection des NoV

Les ligands sont des molécules capables d'adhérer aux NoV. Actuellement il en existe différents types (*e.g.* anticorps monoclonaux et polyclonaux, les aptamères, les mucines gastriques porcines (PGM ou *porcine gastric mucin*), les HBGA). L'objectif de leur utilisation est de cibler les NoV encore capables de s'y fixer. Ainsi, seules les capsides qui n'en sont plus capables sont éliminées. Une comparaison de ces différents ligands a été réalisée et est présentée dans le **Tableau 3**.

Ces différents ligands sont capables de se fixer aux NoV de façon spécifique (Huang *et al.*, 2005; Moore *et al.*, 2015; Tian *et al.*, 2005). L'utilisation combinée de l'adhésion des NoV aux ligands et d'une RT-qPCR permet d'augmenter la sensibilité de la méthode en comparaison à une méthode immuno-enzymatique. Cependant leur utilisation est limitée car chacun de ces ligands ne reconnaît pas toutes les souches de NoV de façon universelle (Blanca I. Escudero-Abarca *et al.*, 2014; Kirby et Iturriza-Gómara, 2012; Shirato, 2011; Tian *et al.*, 2010). Dans notre étude, seuls les HBGA seront présentés plus en détail.

.

Tableau 3 : Comparaison des différents ligands utilisés pour détecter les NoV, d'après Liu et Moore (2020).

Ligands	Prix	Composition	Spécificité	Sensibilité	Avantages	Inconvénients
Anticorps Monoclonal	Variable	Protéines	Élevée	Moyenne	Facilité d'utilisation	Origine animal, couteux, thermosensible, adhésion irréversible, courte durée de vie
Aptamères	5-14 €/nmol	ADN simple brin	Élevée	Moyenne	Synthèse chimique ; thermostable, peu coûteux et longue conservation	Sensible au nucléases, chronophage, peut adhérer des molécules de structures similaires, échantillon fortement purifié
PGM	3,28 €/g	HBGA type A, H, Lewis, acides sialiques et autres carbohydrates Protéines (20 %)	Faible	Élevée	Peu coûteux, facilement disponible	Adhésion possible avec d'autre micro-organismes
HBGA	222€/mg	ABH et Lewis	Faible	Élevée	Facilement disponible	Adhésion possible avec d'autre micro-organismes

7. Épidémiologie

a) Contexte épidémiologique et impact économique

Sur 175 études de 2008 à 2014, les NoV ont été responsables d'environ 18 % du total des gastro-entérites aiguës rapportées (Ahmed *et al.*, 2014) et peuvent causer jusqu'à 200 000 morts par an dans le monde (Kirk *et al.*, 2015; Pires *et al.*, 2015).

Aux États-Unis, les NoV sont responsables de plus de 20 millions de cas annuels. Ils conduisent à près de 2 millions de consultations médicales, 100 000 hospitalisations et entre 600 et 900 décès par an (Burke *et al.*, 2020; Hall *et al.*, 2013). En Europe, les NoV sont responsables d'environ 58 millions de cas annuels et peuvent causer jusqu'à 1 800 morts par an (Bartsch *et al.*, 2016).

À l'échelle mondiale, les NoV ont généré un total d'environ 4,2 milliards de dollars en termes de coûts directs sur le système de santé et d'environ 60,3 milliards de dollars en termes de coûts indirects et sociaux par an. Les pays tous revenus confondus ont eu des conséquences économiques notables dues aux NoV, soulignant la nécessité d'anticiper sur la gestion et l'occurrence des épidémies liées à ce virus entérique (Bartsch *et al.*, 2016). Aux USA, le coût des épidémies alimentaires à NoV est estimé à environ 2 milliards de dollars par an et le coût des hospitalisations est estimé à environ 493 millions de dollars par an (Hoffmann *et al.*, 2012; Lopman *et al.*, 2011).

b) Caractéristiques épidémiologiques

Les NoV constituent la cause la plus fréquente de gastro-entérites aiguës épidémiques ainsi que de gastro-entérites aiguës sporadiques à travers tous les âges (de Wit *et al.*, 2001; Fischer Walker *et al.*, 2012; Scallan *et al.*, 2011).

Les gastro-entérites aiguës épidémiques se définissent comme étant des cas qui se développent et se propagent très rapidement au sein de la population. Elles peuvent être d'origine alimentaire ou hydrique. En général, le NoV GII est le plus prévalent parmi les épidémies à travers le monde (Lopman *et al.*, 2004). En fonction des mesures d'hygiène mises en œuvre, il a été rapporté que chaque contamination primaire pouvait entraîner entre 2 et 14 nouveaux cas secondaires (Heijne *et al.*, 2009).

Les gastro-entérites aiguës sporadiques se définissent comme des cas qui se produisent de manière irrégulière et isolée. Il a été montré que les NoV représentaient environ 12% des cas de gastro-entérites sporadiques chez les enfants de moins de cinq ans (Patel *et al.*, 2008). Le NoV GII est aussi le plus prévalent, responsable en moyenne de 96 % des infections sporadiques à NoV, chez les enfants de moins de 18 ans (Hoa Tran *et al.*, 2013). Parmi tous les âges confondus, les NoV représentent entre 5 et 36 % des cas de gastro-entérites sporadiques (Buesa *et al.*, 2002; Patel *et al.*, 2008; Tam *et al.*, 2012).

c) Epidémiologie moléculaire

Parmi les différents génogroupes existants, le génogroupe GII est responsable à lui seul de près de 90 % des cas d'infection à NoV chez l'Homme. Plus précisément, le génotype GII.4 serait responsable de 70 % du total des infections liées aux NoV (Beek *et al.*, 2018; Vega *et al.*, 2013). Étonnamment, il a été remarqué que le taux d'infection lié aux NoV GII.4 était plus faible que pour les autres génotypes (Noda, 2008). Cependant, les différentes analyses au niveau génomique concernant l'évolution des NoV ont décrit que le génotype GII.4 subissait une dérive antigénique ou un échappement immunitaire, entraînant l'apparition de nouveaux variants tous les 2 ou 3 ans (Siebenga *et al.*, 2009). Ce phénomène serait favorisé par un taux d'erreur non négligeable de l'ARN polymérase lors de la réplication du génome dans la cellule hôte, conduisant ainsi à l'apparition de mutations plus fréquentes (Bull *et al.*, 2010). Une étude a déterminé que la protéine de capside VP1 du génotype GII.4 a évolué avec un taux d'environ 10^{-3} substitutions par nucléotide et par an (Bok *et al.*, 2009).

Durant les deux dernières décennies, si certains variant de GII.4 n'ont circulé que dans des régions géographiques limitées (Kamel *et al.*, 2009; Motomura *et al.*, 2010), d'autres ont pu se propager à l'échelle mondiale (**Figure 7**). Aujourd'hui, on peut leur attribuer au moins six pandémies majeures. Celles-ci comprennent la souche US95/96, qui a provoqué une pandémie à la fin des années 1990 (Noel *et al.*, 1999; White *et al.*, 2002), Farmington Hills 2002 (Lopman *et al.*, 2004; Widdowson *et al.*, 2004), Hunter 2004 (Bull *et al.*, 2006), Den Haag 2006b (Eden *et al.*, 2010; Tu *et al.*, 2008), New Orléans 2010 (Yen *et al.*, 2011) et plus récemment, Sydney 2012 (Eden *et al.*, 2014). Il est intéressant de noter que les quatre premières pandémies ont évolué par le biais de mutations dans le domaine P (Bull *et al.*, 2010; Donaldson *et al.*, 2010) alors que les plus récentes (*i.e.* Nouvelle Orléans 2010 et Sydney 2012) ont à la fois une variation antigénique au niveau de la capside mais également une recombinaison inter- et intra-génotype GII.4 au niveau de la jonction ORF1-ORF2 (Eden *et al.*, 2013).

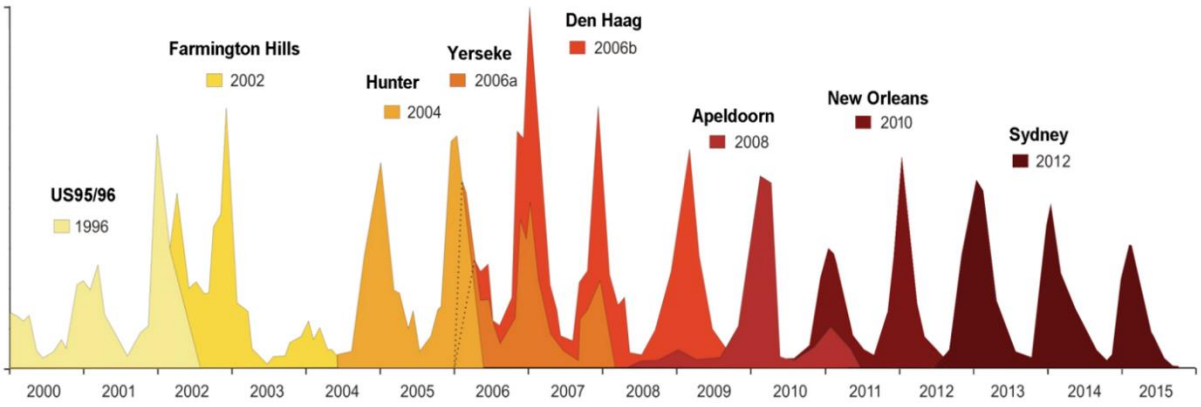


Figure 7: Évolution des épidémies à NoV GII.4 entre 2000 et 2015 d'après de Rougemont, SFM, (2019)

8. Contexte réglementaire et normatif

En France et en Europe, aucun critère réglementaire n'est établi concernant la gestion des NoV dans les aliments. Depuis 2013, une instruction technique existe en France concernant la gestion du risque à NoV en lien avec la consommation de coquillages (DGAL, 2019). Cette instruction technique présente les mesures de prévention en zone de production de coquillages et les actions spécifiques à mener en cas de survenue de TIAC à NoV. Les mesures de prévention intègrent des niveaux d'alerte basés sur la pluviométrie, les dysfonctionnements des systèmes d'assainissement et le niveau d'*E. coli* dans le cadre de la surveillance REMI (REseau de contrôle MIcrobiologique).

Depuis 2013, des méthodes normalisées existent concernant la recherche qualitative et quantitative du génome des NoV (GI et GII) dans les aliments à risque (ISO 15216-1, 2017; ISO 15216-2, 2019). Le choix d'une détection du génome viral par RT-qPCR est lié au fait qu'aucune méthode robuste utilisable en routine n'est actuellement disponible pour détecter les NoV infectieux. Cependant, le principal point faible de cette norme ISO 15216 concerne l'absence d'informations sur le caractère infectieux des NoV lorsque leur génome est détecté dans les aliments ou l'eau. Il est en effet largement admis par la communauté scientifique que le génome viral détecté ou quantifié par RT-PCR peut être le reflet de la présence de particules virales infectieuses, mais aussi de particules virales non infectieuses (capsides altérées, non intègres) et/ou de génome viral libre.

Ce biais majeur a pour conséquence d'entraîner le retrait potentiellement injustifié de lots du marché par application du principe de précaution dès lors que du génome de NoV est détecté

dans un échantillon, alors même que le risque sanitaire pour le consommateur n'est pas prouvé. Un résultat positif ne peut donc en aucun cas témoigner de l'intégrité de la capside, ni même de celle du génome, et ne renseigne donc pas sur le caractère infectieux du virus. Il faut aussi souligner que l'absence de détection de génome de NoV dans les aliments vulnérables ne garantit pas l'absence de NoV infectieux. En effet, le risque de faux négatifs lié à la sensibilité de cette méthode ISO a lui aussi été largement démontré (rendements d'extraction faibles, inhibition de la réaction de RT-qPCR). Cela se traduit d'ailleurs souvent par l'incapacité à détecter du génome viral dans des aliments suspectés dans des TIAC à NoV. La limite de détection (LOD) théorique (rendement de 100 % et 0 % d'inhibition) et pratique (rendement de 1 et 10 % avec un taux d'inhibition de 75 %, les paramètres les moins favorables énoncés par la norme) ont été décrites dans le **Tableau 4**. Les LOD pratiques en fonction du rendement d'extraction et de l'inhibition pour chacune des matrices sont environ 10 à 100 fois plus élevées que la dose infectieuse (*i.e.* 18 à 2 800). L'utilisation de cette norme ISO en routine pour la gestion du danger à NoV prête donc à discussion puisqu'elle ne garantit ni l'absence ni la présence de virus infectieux.

Tableau 4 : Détermination des LOD théoriques et pratiques de la détection du génome des NoV en fonction des matrices.

		Critère		Végétaux (25g)	Coquillages (2g GD)	Eaux (≤ 2L)
		Rendement (%)	Inhibition (%)			
LOD	Théorique	100	0	20	80 à 100	20
	Pratique	10	75	800	3 200 – 4 000	800
		1	75	8 000	32 000 - 40 000	8 000

GD : Glandes digestives

II. Les antigènes tissulaires de groupes sanguins (HBGA)

Pour de nombreux virus, enveloppés et non enveloppés, des sucres complexes présents à la surface de certaines cellules ont été identifiés comme étant des récepteurs fonctionnels. C'est le cas de l'héparane sulfate pour l'Herpès simplex virus ou des acides sialiques pour le virus de la grippe (*i.e.* virus influenza) (Shieh *et al.*, 1992; Suzuki *et al.*, 2000). Pour les NoV, le récepteur cellulaire n'a pas été caractérisé à ce jour. Cependant, des études récentes ont démontré que les HBGA étaient des facteurs d'attachement facilitant l'infection des NoV dans la cellule hôte (Hutson *et al.*, 2005; Lindesmith *et al.*, 2003). En effet, ces HBGA sont capables de se lier spécifiquement aux NoV mais leur rôle dans les étapes de l'infection est encore inconnu. Ils sont ainsi considérés comme des ligands spécifiques et/ou des (co)-récepteurs aux NoV.

1. Définition

Les HBGA sont des carbohydrates complexes résultant de l'addition successive de différents monosaccharides (*i.e.* galactose (Gal), fucose (Fuc), et N-acétylgalactosamine (GalNAc)), sur la partie terminale de chaînes précurseurs. Ces derniers correspondent à des disaccharides liés à des protéines ou des lipides à la surface des globules rouges et des cellules épithéliales ou sous forme libre dans des fluides biologiques comme le lait ou la salive (Huang *et al.*, 2005; Marionneau *et al.*, 2002). Chez l'Homme, il existe plusieurs types de chaînes précurseurs avec un galactose en position terminale (Marionneau *et al.*, 2001). Parmi celles-ci, il en existe deux majoritaires : i) le type 1 (Galβ1-3GlcNAcβ1-R) principalement retrouvé à la surface des tissus dérivés de l'endoderme (*e.g.* épithélium digestif, urinaire et respiratoire) et dans les fluides corporels et, ii) le type 2 (Galβ1-4GlcNAcβ1-R) majoritairement retrouvé dans les tissus dérivés de l'écto- et mésoderme incluant les cellules de la peau et les érythrocytes (Oriol *et al.*, 1986). L'addition des différents monosaccharides nécessaire à la synthèse des différents HBGA est réalisée par l'action de différentes glycosyltransférases (**Figure 8**). Trois gènes de glycosyltransférases sont particulièrement importants : les gènes *FUT2*, *FUT3* et *ABO* codant respectivement pour les enzymes α-1-2-L-fucosyltransférases (FUT2), α 1,3-4-L-fucosyltransférase (FUT3), et enfin α-N-acétylgalactosaminyltransférase (A) et α-D-galactosyltransférase (B). Les individus présentant l'enzyme FUT2 sont de phénotype sécréteur, tandis que les individus qui en sont dépourvus sont de phénotype non sécréteur. De

même, la présence de l'enzyme FUT3 permet de distinguer les individus Lewis positifs des négatifs. La synthèse des HBGA dépend donc du polymorphisme des *loci ABO*, *FUT2* et *FUT3*.

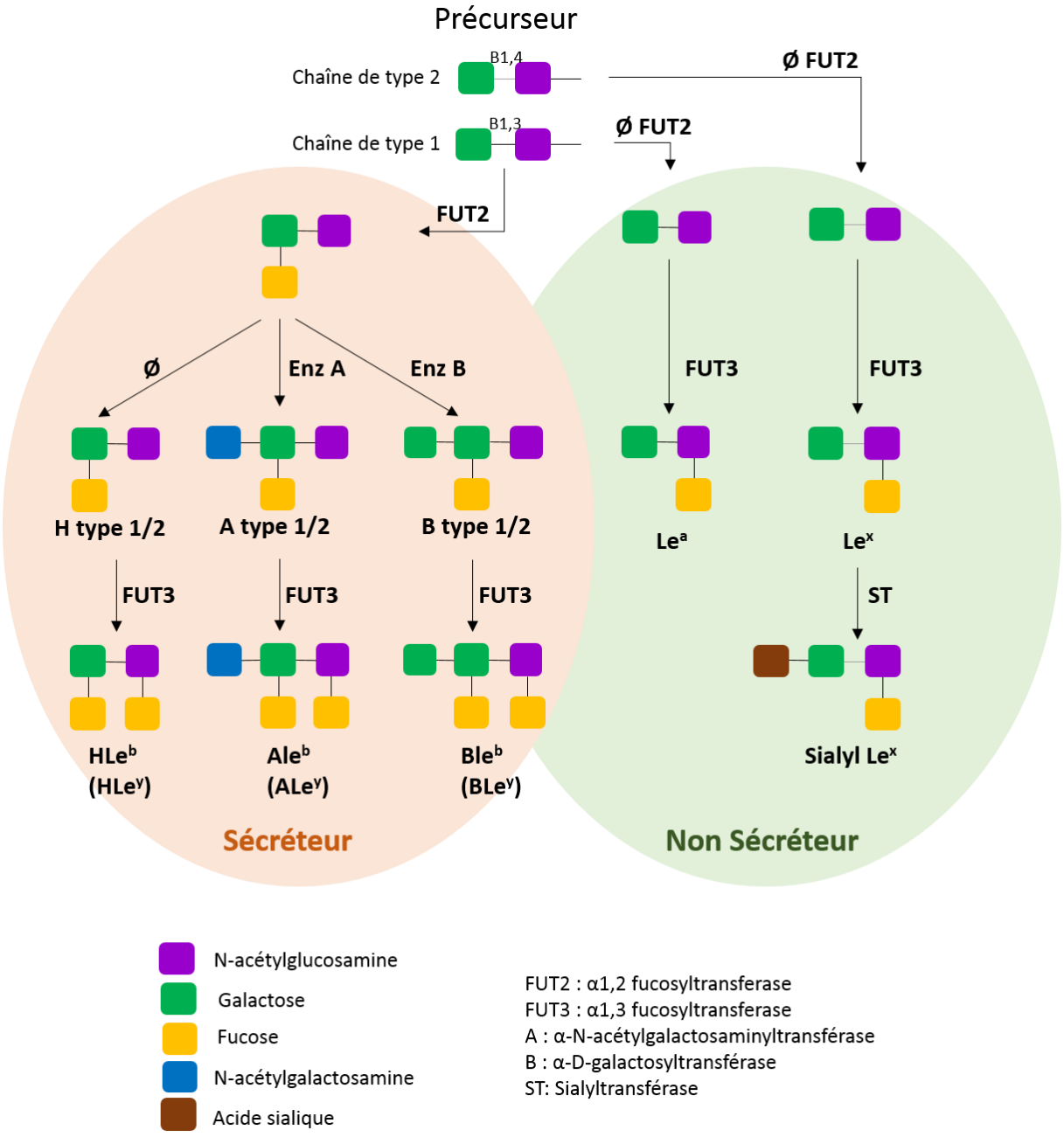


Figure 8 : Voies de biosynthèse des différents HBGA, d'après Ruvoën et Le Pendu, 2013. Les HBGA sont synthétisés par l'addition successive de différents monosaccharides sur les précurseurs de types 1 et 2 grâce à l'action de différentes glycosyltransférases codées par les gènes *FUT2*, *ABO* et *FUT3*. Les antigènes obtenus à partir du précurseur de type 2 sont définis entre parenthèses. Les individus présentant au moins un allèle fonctionnel FUT2 sont des individus avec le phénotype « sécréteur », représentés sur le fond orange. Les individus sécréteurs peuvent donc avoir à la surface de leurs cellules épithéliales les antigènes, A, B, H, Le^b et Le^y. Les individus ne possédant par l'enzyme FUT2, considérés comme « non sécréteurs » sont représentés sur le fond vert. Ces derniers peuvent donc

avoir les antigènes Le^a ou Le^x. Par l'action d'une sialyltransférase (ST), un acide sialique peut être rajouté sur le Le^x pour former l'antigène SLe^x.

L'implication de ces HBGA et de leurs enzymes, les glycosyltransférases (*i.e.* FUT2 et FUT3), chez l'Homme est importante car il pourrait s'agir d'un des facteurs de résistance ou de sensibilité aux NoV **(Figure 9)**. En effet, les individus sécréteurs semblent plus sensibles aux NoV que les populations non sécréteurs (Ettayebi *et al.*, 2016; Hutson *et al.*, 2005; Lindesmith *et al.*, 2003; Tan et Jiang, 2014).

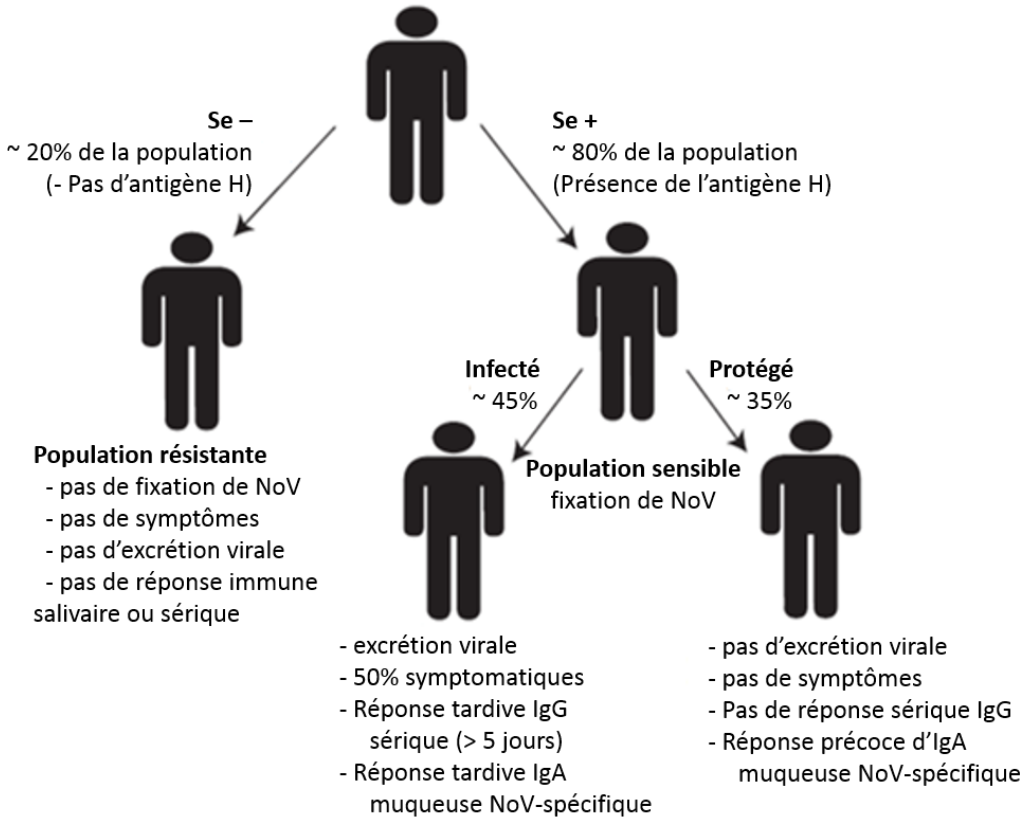


Figure 9 : Modèle d'infection par les NoV en fonction du caractère sécréteur ou non sécréteur des individus, d'après Lindesmith *et al.* (2003). Les pourcentages des individus non sécréteurs (Se-), sécréteurs (Se+) infectés et protégés sont probablement influencés par l'âge, l'ethnie et les précédentes expositions aux NoV.

a) Biosynthèse des antigènes H

L'antigène H des HBGA est obtenu par l'addition d'un Fuc en position α1,2 sur le Gal terminal de la chaîne précurseur. Chez l'Homme, deux α1,2-fucosyltransférases participent à la synthèse

de ces antigènes (Le Pendu *et al.*, 1985). Elles sont codées par les gènes *FUT1* (H) et *FUT2* (Se) selon le type de la chaîne précurseur (Kelly *et al.*, 1995; Rajan *et al.*, 1989). Chacun de ces deux gènes possède deux allèles, l'un dominant (H ou Se) et l'autre récessif qui est non fonctionnel (h et se). L'expression des antigènes H sur les érythrocytes et sur l'endothélium vasculaire est sous la dépendance de l'enzyme codée par le gène *FUT1* alors que leur expression sur les cellules épithéliales et les sécrétions est majoritairement dépendante de l'enzyme codée par le gène *FUT2* (Mollicone *et al.*, 1995). Une fois l'antigène H ajouté aux différents précurseurs (type 1 ou 2), il devient le substrat des glycosyltransférases A et B codées par le gène *ABO*.

Les individus présentant au moins un allèle FUT2 fonctionnel (Se/Se, Se/se) se définissent par le phénotype « sécréteur ». En revanche, l'absence de gène *FUT2* fonctionnel définit quant à lui le phénotype « non sécréteur », conduisant à l'absence d'expression des antigènes A, B, H, et Lewis (Marionneau *et al.*, 2001). Environ 80 % et 20 % de la population caucasienne présentent le phénotype sécréteur et non sécréteur, respectivement (Koda *et al.*, 2001).

b) Biosynthèse des antigènes A et B

Les gènes *A* et *B* sont co-dominants. Ainsi, ils sont capables de s'exprimer en même temps chez un individu. Les antigènes A et B sont respectivement obtenus par l'ajout d'un GalNAc ou d'un second Gal sur le Gal de l'antigène H à l'aide, respectivement, de l'enzyme A et B (Marionneau *et al.*, 2001). Ces deux enzymes sont codées par les allèles A et B du gène *ABO*, respectivement (Hakomori, 1999). En l'absence de ces enzymes, seul l'antigène H sera exprimé à la surface des érythrocytes, à la surface des cellules épithéliales et dans la salive à condition qu'ils soient sécréteurs.

c) Biosynthèse des antigènes Lewis

Enfin, l'α1,3-4-fucosyltransferases codée par le gène *FUT3* (LE), est capable d'ajouter, en α1,3 ou α1,4, un Fuc sur le N-acétylglucosamine (GlcNAc) des chaînes précurseurs, donnant naissance aux antigènes Lewis (Marionneau *et al.*, 2001). Ce gène existe également sous la forme de deux allèles, l'allèle LE dominant et l'allèle le récessif. En l'absence de FUT2 active chez les individus non sécréteurs, l'ajout du Fuc sur les précurseurs de type 1 ou 2 donne les antigènes Le^a et Le^x, respectivement. Chez les individus sécréteurs, l'ajout d'un Fuc au niveau de l'antigène H, A ou B sur les précurseurs de type 1 ou 2, conduit à la formation des antigènes

Le^b et Le^y, respectivement. Certains auteurs ont aussi décrit l'antigène Le^x sialylé (SLe^x) correspondant à l'antigène Le^x avec un acide sialique supplémentaire au niveau du Gal de la chaîne précurseur de type 1 (Marionneau *et al.*, 2001). Ainsi, les individus possédant au moins un allèle dominant (LE/LE, LE/le), auront les antigènes $Le^{b/y}$ ou $Le^{a/x}$, et seront de phénotype Lewis positif. En revanche, les individus possédant le double allèle récessif seront dépourvus de $Le^{b/y}$ ou $Le^{a/x}$ et seront donc de phénotype Lewis négatif.

Le phénotype ABH et Lewis de chaque individu dépend ainsi du polymorphisme combiné aux trois loci *ABO, FUT2* et *FUT3* (Marionneau *et al.*, 2001).

2. Interactions entre les norovirus humains et les HBGA

L'étude de l'interaction des NoV avec les HBGA a commencé lorsque des chercheurs ont découvert que le virus responsable de la maladie hémorragique du lapin (RHDV ou *rabbit haemorrhagic disease virus*), également membre de la famille des *Caliciviridae*, se fixait aux antigènes de type H présents à la surface des cellules épithéliales (Ruvoën-Clouet *et al.*, 2000). Par la suite, il a été démontré que les NoV étaient capables d'agglutiner les érythrocytes humains exprimant l'antigène H mais aussi d'interagir avec les HBGA présents sous forme libre dans la salive ou au niveau des cellules du tractus intestinal humain (Hutson *et al.*, 2002; Marionneau *et al.*, 2002). En plus de faciliter l'infection par les NoV chez les individus sécréteurs (Ettayebi *et al.*, 2016; Hutson *et al.*, 2005; Lindesmith *et al.*, 2003), ces nouvelles découvertes ont entraîné de nombreuses recherches afin de mieux comprendre la relation entre les NoV et les HBGA.

Les interactions entre les NoV et les HBGA peuvent être classées selon l'affinité des NoV pour les HBGA (**Figure 10**). Le groupe « A/B binding », dans lequel les NoV ont une affinité particulière pour les antigènes A et/ou B et/ou H mais pas les antigènes de Lewis (*e.g.* GII.4 VA387, GII.4 GrV, GI.1 Norwalk, GI.2 C59, GII.5 MOH, GII.3 PiV, GII.3 MxV, GII.2 BUDS et GII.1 HV). Le groupe « Lewis binding » dans lequel les NoV ont une affinité particulière pour les antigènes de Lewis ou H mais pas pour les épitopes A et B (*e.g.* GII.9 VA207, GII.10 Boxer et GII.21 OIF) (Huang *et al.*, 2005). Enfin, le troisième groupe « no binding » dans lequel certains NoV n'ont aucune affinité avec les HBGA (*e.g.* GII.1 Noda485, GII.14 Kashiwa47 et GI.3 DSV) (Huang *et al.*, 2005; Shirato *et al.*, 2008). Il est important de garder à l'esprit que la classification proposée par Huang *et al.* (2005) n'est pas liée au génogroupe ni au génotype des

NoV car des représentants appartenant aux deux génogroupes peuvent appartenir à chacun de ces trois groupes.

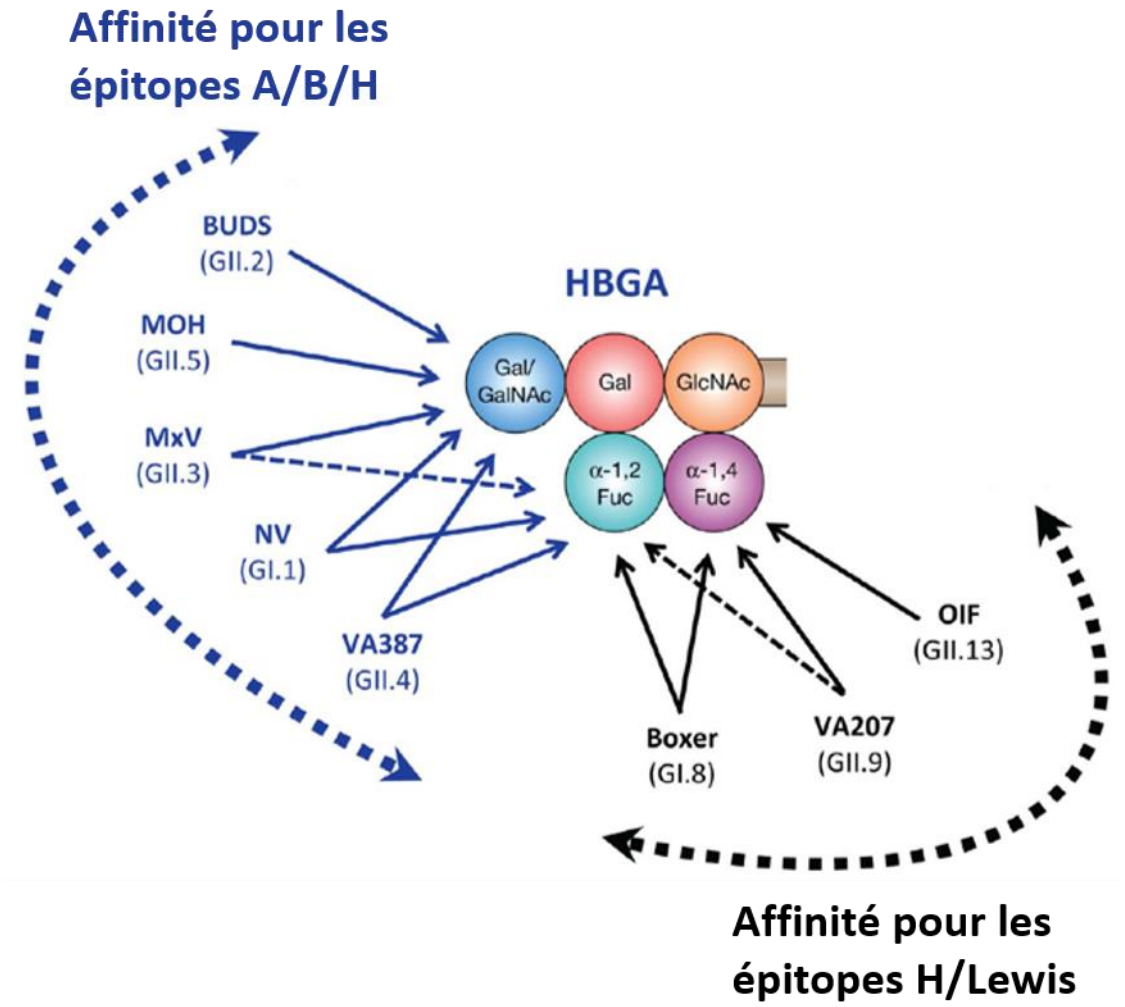


Figure 10 : Représentation schématique des interactions entre différentes souches des NoV et les HBGA, adapté de Tan et Jiang (2010). Les flèches indiquent les interactions entre les NoV et les résidus spécifiques des HBGA. Les flèches en pointillées indiquent une interaction plus faible. Les cinq cercles de différentes couleurs représentent les saccharides composants les différents HBGA (H, A, B, Le^b ou Le^y).

L'étude de ces interactions a principalement été réalisée par des techniques de cristallographie avec l'utilisation de VLP ou des particules P ou encore des dimères de P seul. Plusieurs études ont montré que le(s) site(s) de fixation, également appelé(s) « poche réceptrice » (BP ou *binding pocket*), des NoV aux HBGA étaient localisé(s) au niveau du sous-domaine P2 de la capside de VP1 (Tan *et al.*, 2003). D'autre part, il a été démontré pour le NoV GI.1 et le NoV GII.4 que cette BP était située, respectivement, sur un seul monomère ou sur deux monomères de la protéine de capside VP1 (Bu *et al.*, 2008; Cao *et al.*, 2007; Choi *et al.*, 2008; Tan *et al.*, 2009).

Cette BP est généralement constituée de i) quatre (pour les NoV GI) ou cinq (pour les NoV GII) acides aminés fortement conservés (ces derniers jouant un rôle central dans l'interaction des NoV avec les HBGA) et, ii) d'une région périphérique plus variable qui interagit avec un ou deux saccharides spécifiques des HBGA pour stabiliser ou supporter cette interaction spécifique (Tan et Jiang, 2014). Ainsi, l'association entre une séquence conservée et une séquence variable régit la reconnaissance spécifique et diverse des HBGA avec les différents génotypes de NoV. Des mutations au niveau du sous-domaine P2 de la protéine VP1, autour ou dans la BP, peuvent sensiblement modifier la capacité de fixation des NoV aux HBGA (Tan *et al.*, 2009).

Ainsi, les NoV GI.1 ont été décrits comme interagissant avec les antigènes A et H. La BP se lie de façon spécifique à l'antigène A par l'intermédiaire de 6 acides aminés (Ser380, Pro378, Ser377, Asp327, His329, Trp375) et à l'antigène H par le biais de 7 acides aminés (Pro378, Ser377, Asp327, His329, Asp344, Gln342, Trp375) (Bu *et al.*, 2008; Choi *et al.*, 2008). La liaison des NoV GI.1 aux HBGA est également influencée par trois autres acides aminés situés près du site de liaison (Ser338, Ala430 et Tyr431) (Tan *et al.*, 2009). Les saccharides principalement impliqués dans ces interactions sont le GalNAc pour l'antigène A et le Gal pour l'antigène H.

Le génotype GII.4, quant à lui, possède 7 acides aminés conservés : Ser343, Thr344, Arg345, Asp374 pour le premier monomère et les résidus Ser441, Gly442 et Tyr443 pour le deuxième (Cao *et al.*, 2007; Lindesmith *et al.*, 2008). Contrairement au GI.1, le saccharide qui est au cœur de l'interaction des antigènes A, B ou H serait le Fuc. D'autres résidus, notamment les acides aminés Ala346, Ser441, Lys348, Asp391, présents en périphérie de la BP seraient important pour la reconnaissance du Gal de l'antigène B et du GalNAc de l'antigène A (Tan *et al.*, 2009, 2008b).

3. Rôle des HBGA dans la réplication des norovirus

a) Au niveau cellulaire

De nombreuses études *in vitro* et *in vivo* ont présenté le rôle important des HBGA dans l'infection des NoV au niveau de la cellule hôte (Ettayebi *et al.*, 2016; Harrington *et al.*, 2002; Hutson *et al.*, 2002; Lindesmith *et al.*, 2003; Marionneau *et al.*, 2002; Rockx *et al.*, 2005). Le rôle et la fonction de l'interaction entre les NoV et les HBGA doivent être clarifiés car les connaissances actuelles peuvent conduire à deux hypothèses distinctes. D'une part, les HBGA peuvent jouer un rôle de récepteur ou de co-récepteur favorisant la libération du génome dans

la cellule. D'autre part, cette interaction peut être un moyen permettant de faciliter l'accès au site d'infection.

Lorsque l'infection à NoV est investiguée chez des volontaires sains dans le cadre d'études cliniques, la présence d'HBGA favorise l'infection des NoV dans la cellule hôte. Ceci est particulièrement vrai pour les individus sécréteurs (Hutson *et al.*, 2002; Lindesmith *et al.*, 2003). Il est aussi admis que les individus non sécréteurs sont moins sensibles à l'infection par les NoV que les individus sécréteurs. Cependant, les individus non sécréteurs peuvent être infectés par des NoV, comme les génotypes GII.2, GII.4 et GII.7 (Lindesmith *et al.*, 2020; Nordgren *et al.*, 2013). De plus, certains individus sécréteurs du groupe sanguin B semblent avoir une meilleure protection contre l'infection à NoV GI (Hutson *et al.*, 2002; Thorven *et al.*, 2005) mais pas contre les NoV GII (Halperin *et al.*, 2008; Nordgren *et al.*, 2013; Rockx *et al.*, 2005).

La réplication *in vitro* des NoV n'est devenue possible que récemment. Cela est désormais possible pour un petit nombre de génotypes (Ettayebi *et al.*, 2016; Jones *et al.*, 2014; Todd et Tripp, 2020a; Van Dycke *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2017). Il est bien admis que les HBGA sont aujourd'hui considérés comme des facteurs d'attachement facilitant la réplication des NoV *in vitro* (Le Pendu et Ruvoën-Clouet, 2020; Nordgren et Svensson, 2019; Ramani et Giri, 2019). Ceci est particulièrement vrai pour certains génotypes de NoV GII.4, GII.3, GII.17 et GI.1 en utilisant le modèle des entéroïdes des organoïdes (entérocytes, cellules caliciformes, cellules entéro-endocrines et des cellules de Paneth) (Ettayebi *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2017). Ils ont été générés à partir de tissus d'individus sécréteurs et de non sécréteurs dans le but d'étudier la reconnaissance des HBGA à la surface des cellules par les NoV et si les cellules pouvaient tolérer l'infection. Si le GII.3 a été montré comme étant capable d'infecter les tissus de sécréteurs et non sécréteurs, cela n'a pas été le cas du GII.4 dont l'infection n'a été possible que chez des tissus d'individus sécréteurs (Ettayebi *et al.*, 2016). D'autre part, leur implication dans l'adhésion et l'infection des lymphocytes B a également été possible en présence d'HBGA exogènes (*i.e.* bactéries commensales exprimant des pseudo-HBGA) (Jones *et al.*, 2014).

Il est tout de même important de garder à l'esprit que certaines souches de NoV sont incapables de se fixer aux HBGA (*i.e.* GII.1, GI.3 et GII.14) (Shirato, 2011). L'infection est tout de même possible puisque pour GII.1 la liaison et l'internalisation au niveau des cellules intestinales ne nécessitent pas la présence d'HBGA (Murakami *et al.*, 2013). D'autre part, il a été même montré qu'il était possible de n'avoir aucune relation entre le phénotype ABO des HBGA et la

sensibilité aux NoV car aucune différence significative n'a été observée entre les individus ayant différents phénotypes (*i.e.* ABO) (Halperin *et al.*, 2008). Il est donc tout à fait possible que la présence des HBGA ne soit pas une condition exclusive pour la réplication des NoV.

L'implication de ces antigènes tissulaires dans la résistance ou la sensibilité des individus face aux NoV est régulièrement mise en avant. Deux mécanismes de persistance des NoV ont été décrits (**Figure 11**). Le premier concerne l'adaptation et les changements dans et autour de la BP au niveau de la capside virale, permettant des modifications fines au niveau de la structure de la capside. Ce mécanisme conduit ainsi à modifier les interactions entre les divers HBGA et les divers génotypes de NoV pour persister en ciblant des populations uniques pour l'infection. Ceci amène au second mécanisme, la variation antigénique, suggérant que les NoV pourraient utiliser un mécanisme de « remplacement » des récepteurs pour échapper à l'immunité collective préexistante. Les changements opérés au niveau du domaine P2 de la protéine de capside VP1 semblent être en corrélation avec cette variation antigénique (Donaldson *et al.*, 2008; Lindesmith *et al.*, 2008).

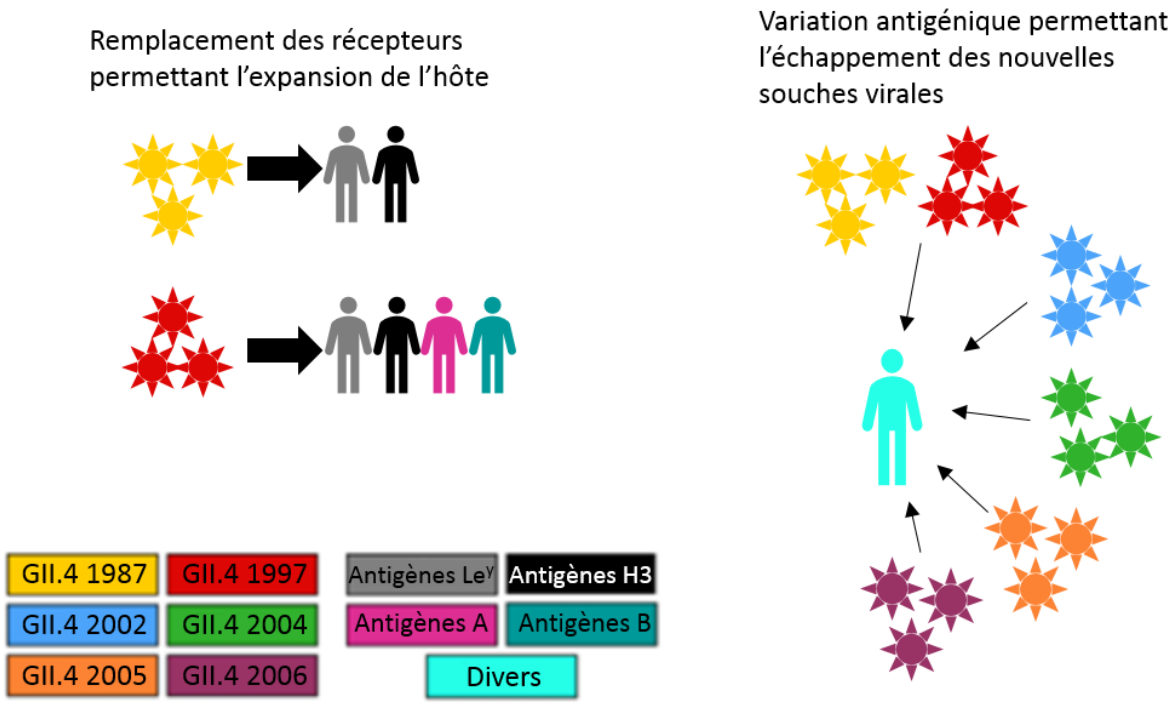


Figure 11 : Mécanismes de persistance, d'après Donaldson *et al.* (2008). Les NoV GII.4 persistent dans la population humaine par deux mécanismes. Le premier est l'adaptation, stimulée par l'immunité collective, permettant aux souches de NoV de modifier leurs spectres d'interactions avec les HBGA. Le deuxième est la variation antigénique permettant aux souches de NoV d'échapper à l'immunité collective. Ainsi, différentes souches de NoV pourront infecter une même population.

b) Le microbiote intestinal

Certains auteurs ont décrit que la flore bactérienne pouvait être impliquée dans l'infection à NoV chez l'Homme (Monedero *et al.*, 2018). Comme pour le rotavirus, l'infection à NoV se produit dans l'intestin grêle, et plus précisément dans l'iléon et le jéjunum. Dans ces segments de l'intestin grêle, des teneurs élevées en bactéries sont retrouvées (10^7 à 10^8 unités formant colonies (UFC)/mL avec principalement des espèces de *Bacteroides, Lactobacillus* et *Ruminicoccus*, et 10^3 à 10^6 UFC/mL avec principalement des espèces de *Streptococcus, Veillonella, Prevotella* et *Fusobacterium*). Pour cette raison, les interactions entre les bactéries et les NoV ont été étudiées. Rubio del Campo *et al.* (2014) ont par exemple testés onze souches bactériennes probiotiques et non probiotiques, dont au moins 30 % d'entre elles étaient capables de se lier aux particules P de NoV GI.1 et GII.4. Ces mêmes auteurs ont émis l'hypothèse que les bactéries à Gram positif pouvaient avoir un potentiel d'adhésion plus élevé aux particules P compte tenu de leur teneur élevée en peptidoglycane et en acides téichoïques (Rubio-del-Campo *et al.*, 2014). En s'appuyant sur ces hypothèses, Jones *et al.* (2014) ont montré que la présence d'*Enterobacter cloacae*, possédant des pseudo-antigènes H à sa surface, favorisait la réplication des NoV GII.4 dans les lymphocytes B (Jones *et al.*, 2014).

Certaines bactéries du microbiote intestinal humain peuvent exprimer à leur surface des HBGA ou des « pseudo-HBGA ». De nombreux mécanismes ont été décrits concernant l'implication des bactéries intestinales pour favoriser ou prévenir l'infection à NoV chez l'Homme (Monedero *et al.*, 2018). D'une part, les mécanismes susceptibles de favoriser l'infection sont les suivants : i) certaines bactéries de l'intestin pourraient favoriser l'adhésion des NoV aux cellules hôtes et, ii) l'expression de pseudo-HBGA à la surface des bactéries favoriserait l'adhésion des NoV puis le passage à travers les cellules intestinales (*i.e.* cellule M) avant d'atteindre la cellule hôte (Karst et Wobus, 2015). D'autre part, les mécanismes proposés impliquant des bactéries qui peuvent prévenir l'infection à NoV sont les suivants : i) compétition entre les HBGA présents à la surface des cellules et ceux présents sur les bactéries commensales et pathogènes, ii) élimination dans les selles des NoV adhérés aux pseudo-HBGA présents à la surface des bactéries (*i.e. E. coli*), iii) expression d'enzymes qui éliminent les HBGA (*i.e.* fucosidase), iv) l'immunorégulation (*i.e.* production d'anticorps spécifiques, de cytokines ou régulation des populations de lymphocytes) et enfin v) synthèse de molécules qui peuvent réduire l'infection (*i.e.* mucines, des espèces réactives de l'oxygène (ROS), peptides antimicrobiens) (Monedero *et al.*, 2018).

Le rôle du microbiote intestinal nécessite d'être approfondi car les travaux conduits par Jones *et al.* (2014) ont montré que *E. clocae* facilitait la réplication *in vitro* des NoV dans les lymphocytes B tandis que Lei *et al.*, 2016 ont montré que cette même bactérie inhibait l'infection *in vivo* des NoV. D'autre part, il a été décrit que lors d'une co-infection avec les NoV, la bactérie *Helicobacter pylori* favoriserait l'expression de l'enzyme α-1-2-L-fucosyltransférase FUT1 (enzyme qui, chez l'Homme, est responsable de la synthèse de la substance H au niveau des érythrocytes) à la surface des cellules épithéliales, générant des sites d'adhésion pour les NoV GII.4, même en l'absence d'allèle fonctionnel de FUT2 (Ruvoën-Clouet *et al.*, 2014). Ainsi des individus de phénotype non sécréteurs et résistants aux NoV GII.4 pourraient devenir sensibles à ce génotype.

4. Implications des HBGA dans la transmission par les aliments et l'environnement

Aujourd'hui, les interactions spécifiques entre les NoV et les HBGA ont été largement décrites chez l'Homme. D'autres études mettent en évidence des ligands qui se lient aux NoV avec une affinité comparable à celle des HBGA ou, à l'inverse, inhibent potentiellement la liaison, laissant supposer que ces ligands pourraient occuper ou occlure la même BP présente à la surface du sous-domaine P2 de la capside. Un grand nombre de molécules ont été actuellement identifiées. Almand *et al.* (2017) ont examiné toutes les molécules pouvant avoir une interaction avec les NoV et les ont classées en quatre groupes : i) molécules chimiques simples, ii) composants biologiques humains complexes, iii) ligands d'origine alimentaire et, iv) pseudo-HBGA présents à la surface des bactéries (Almand *et al.*, 2017). Certains de ces groupes de molécules chimiques et de ligands, aussi appelés « pseudo-HBGA », sont couramment retrouvés dans les aliments et l'environnement.

Dans le groupe des molécules chimiques, le citrate est intéressant car il est très fréquent dans certains fruits comme le citron. Une étude a montré la capacité du citrate à réduire ou à inhiber la capacité des NoV à se lier aux HBGA (Koromyslova *et al.*, 2015). Le citrate imite l'anneau pyranoside du fucose des HBGA. Il peut se lier de façon spécifique au niveau de la capside des NoV GII.10. L'inhibition de la liaison du domaine P2 aux HBGA et la présence d'une affinité de liaison comparable à celle des HBGA, soulignent que des sites de liaison similaires sont impliqués (Hansman *et al.*, 2012). Cependant, à des concentrations élevées en citrate, les VLP sont déstabilisées et ont des diamètres plus importants (de 42-44 à 46-49 nm de diamètre) et pourraient avoir leur morphologie altérée (Koromyslova *et al.*, 2015). Ainsi, il est possible que

ces modifications structurelles induites par le citrate, au lieu d'inhiber directement la liaison aux HBGA, rendent la BP plus accessible à des molécules moins spécifiques ou à des molécules dont leur conformation empêchait initialement leur adhésion aux VLP.

Dans le groupe des ligands alimentaires, les coquillages, les fruits et les légumes présentent des carbohydrates similaires aux HBGA.

Les huîtres sont impliquées dans un grand nombre d'épidémies à NoV en raison des phénomènes de pollution fécale d'origine humaine qui peuvent influencer les zones de production conchylicoles (*e.g.* dysfonctionnement des stations d'épuration des eaux usées urbaines, lessivages des sols agricoles amendés par des boues d'épuration urbaines) (Doré *et al.*, 2010; Rajko-Nenow *et al.*, 2013). Les NoV sont capables de se fixer aux différents tissus des huîtres, des palourdes et des moules (*i.e.* hépatopancréas, branchies et manteau) (Maalouf *et al.*, 2010; Tian *et al.*, 2007 ; Le Guyader *et al.*, 2006a; Tian *et al.*, 2006). Certains génogroupes sont plus facilement accumulés dans les huîtres que d'autres. C'est le cas notamment des GI (**Figure 12**). Alors que les NoV GII.4 peuvent être retrouvés dans les différents tissus, les NoV GI.1 sont majoritairement retrouvés dans les tissus digestifs et très peu aux branchies et aux manteaux. Les huîtres, les moules et les palourdes possèdent des pseudo-HBGA similaires au type A des HBGA humains (présence du GalNAc). Cependant, seules les huîtres possèdent les pseudo-HBGA de type H. La présence d'acide sialique a également été déterminée (Tian *et al.*, 2007) Leur accumulation se fait donc par la présence de pseudo HBGA de typa A de type H (*e.g.* GI.1) mais également d'acides sialiques (*e.g.* GII.4).

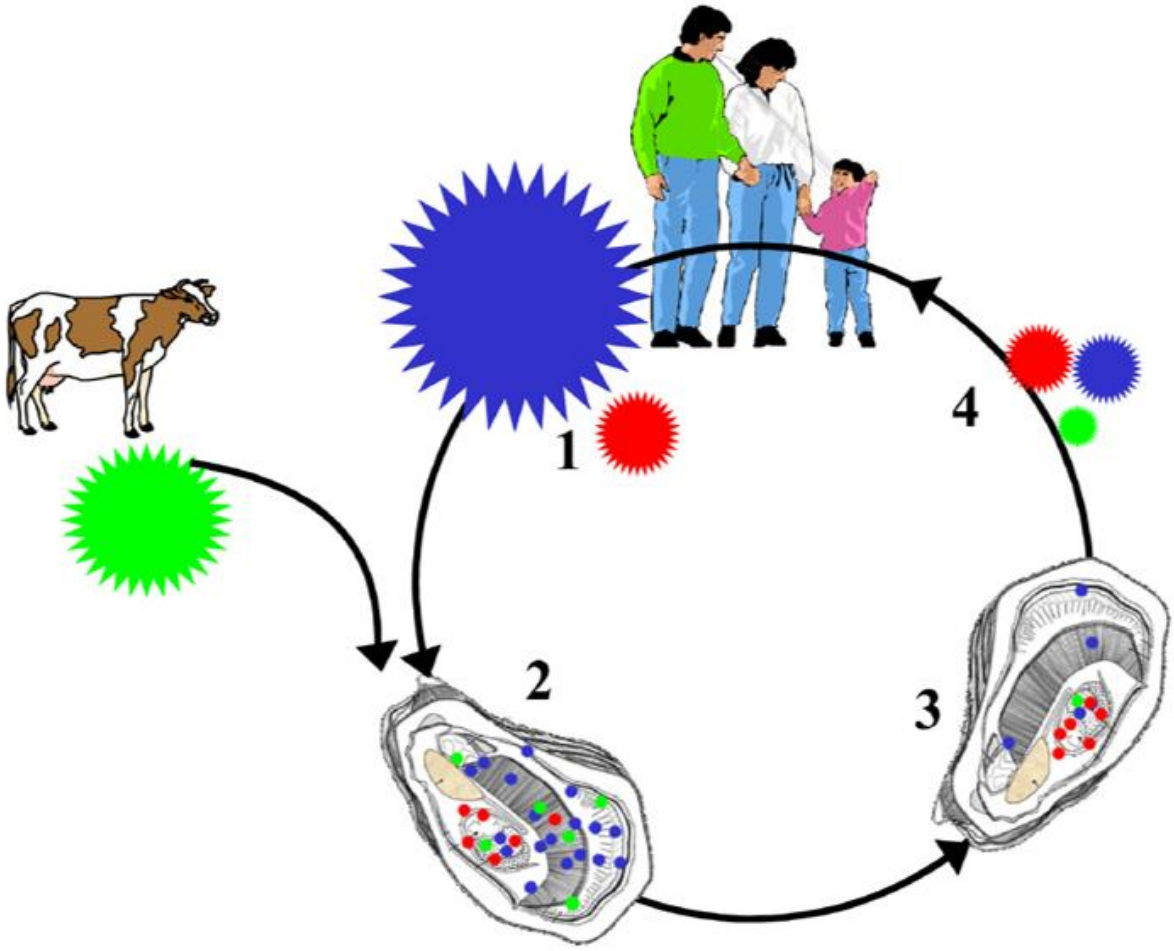


Figure 12 : Bioaccumulation des NoV dans les huîtres, d'après Le Guyader *et al.*, 2012. 1. Forte excrétion dans l'environnement de NoV GII (représentés en bleu) et de quantité beaucoup plus faible de NoV GI (représentés en rouge) causé par la prédominance des NoV GII dans les épidémies humaines. Le NoV GIII est représenté en vert. 2. Les virus rejetés dans l'eau de mer sont filtrés par les huîtres. Les particules de NoV GI sont très rapidement dirigées vers l'hépatopancréas alors que les particules de GII sont retrouvées dans l'hépatopancréas, le manteau ou les branchies probablement grâce à la présence d'acide sialique. 3 : Les NoV GI et GII sont accumulés dans l'intestin *via* un pseudo HBGA de type A. 4 : La fréquence d'infection causée par GI et GII serait similaire en raison de l'accumulation sélective et de la rétention de particules virales GI. Concernant les NoV GIII, l'infection est peu probable car peu de particules persistent et les Hommes n'expriment pas le ligand correspondant.

Les fruits et légumes, bien que différents des huîtres, peuvent également contenir des carbohydrates de type pseudo-HBGA. Les carbohydrates représentent jusqu'à 90 % du poids sec de la paroi cellulaire végétale (Esseili *et al.*, 2012). Ces pseudo-HBGA sont principalement présents dans la fraction d'hémicellulose de la laitue et seul l'antigène de type H a été détecté. De plus, il a été montré que les VLP de NoV GII.4 reconnaissent les fragments de Fuc des carbohydrates présents dans les feuilles de laitues (Gao *et al.*, 2016). Les fruits, tels que les

framboises, les fraises ou les mûres et bien d'autres encore, ont été analysés pour étudier la capacité d'adhésion des NoV sur de telles matrices. Les résultats ont prouvé que les NoV sont capables de s'y fixer (Li *et al.*, 2012). La présence de ces pseudo-HBGA à la surface de certains fruits et légumes pourrait en partie expliquer l'élimination difficile des NoV lors des étapes classiques de lavage et de rinçage.

Toutes ces données mettent en avant que les interactions des pseudo-HBGA avec les NoV peuvent jouer un rôle potentiel dans la transmission des NoV par les aliments et l'environnement.

III. Influence des facteurs inactivant physiologiques sur les norovirus

Les NoV peuvent être transmis par la voie féco-orale chez l'Homme. Ils pénètrent donc par la voie orale et transitent par le système digestif pour finalement atteindre l'intestin où le virus trouvera sa cellule hôte. Lors de la migration dans le tractus digestif, les NoV sont confrontés à des variations de pH et exposés à différentes enzymes protéolytiques (*i.e.* pepsine, trypsine, chymotrypsine) nécessaires à la dégradation des aliments.

1. Influence du pH

Peu de données sont disponibles concernant la résistance des NoV en fonction du pH. Il a été observé que les NoV traités à pH 2,7 pendant 3 h étaient toujours capables de provoquer une infection chez des volontaires humains (Dolin *et al.*, 1972). De plus, après incubation pendant 4 semaines dans des moules Greenshell à pH 3,8, aucune réduction des génomes de NoV n'a été mise en évidence (Hewitt et Greening, 2004). Pour mieux comprendre la survie des NoV, de nombreuses études ont utilisé des virus modèles comme le calicivirus félin (FCV), le MNV, le virus tulane (TV) ou les VLP. Brièvement, les résultats ont montré qu'une exposition de 30 min à un pH acide allant de 2,0 à 4,0 conduisait à une réduction de 0 à 2 $\log_{10}$ (Cannon *et al.*, 2006; Hirneisen et Kniel, 2013), à l'exception du FCV qui semblait être plus sensible que les autres (Cannon *et al.*, 2006; Hewitt et Greening, 2004; Whitehead et McCue, 2010). Concernant les VLP, plusieurs études ont été réalisées sur des gammes de pH variant de pH 2,0 à 10,0. Globalement, il a été mis en évidence que les VLP de GII sont stables quel que soit le pH étudié (*i.e.* 2,0 à 10,0) alors que les VLP GI sont déstructurées entre pH 8,0 et 9,0 (Lin *et al.*, 2014; Pogan *et al.*, 2018a).

Le pH d'une suspension, ou de son environnement, peut également influer sur la charge et la taille des particules virales (Samandoulgou *et al.*, 2015). En général, la charge nette des VLP de NoV GI.1 et GII.4 est entre -40 et 40 mV. Les charges les plus positives ont été atteintes à pH 3,0 (*i.e.* ~28 mV), tandis que les charges les plus négatives ont été atteintes à pH 7,0 (*i.e.* ~-35 mV). La taille des VLP GI.1 est d'environ 37 nm à pH 3,0 mais les agrégats peuvent atteindre jusqu'à 2 050 nm à pH 4,0 et 1 850 nm à pH 5,0. Les VLP sont à nouveau sous formes dispersées à pH 6,0, 7,0 et 8,0 avec des tailles respectivement de 40, 38 et 25 nm. La tendance des GII.4 était similaire sauf que les agrégats formés à pH 4 et 5 étaient plus petits que les VLP GI.1.

2. Influence de la bile et des sels biliaires

La bile est composée d'eau, de sels biliaires, de bilirubine, de cholestérol, de phospholipides et d'électrolytes (Na^+, K^+, Ca^{2+}, HCO^{3-}, Cl^-). La bile contient des acides biliaires primaires et secondaires correspondant majoritairement à l'acide cholique (AC), l'acide chenodéoxycholique (ACDC) et l'acide déoxycholique (ADC).

Récemment, les sels biliaires ont été décrits comme d'importants cofacteurs pour la réplication des NoV *in vitro* (Ettayebi *et al.*, 2016; Kilic *et al.*, 2018). Ils avaient déjà été présentés comme étant essentiels pour la réplication d'un autre *Caliciviridae*, le sapovirus porcin (Chang *et al.*, 2004). La réplication *in vitro* des NoV GI.1, GII.2, GII.3 et GII.17 a été possible, et favorisée pour le GII.4, en présence d'extrait de bile, et ce, de manière dose-dépendante (Ettayebi *et al.*, 2016). Étonnamment, cela pourrait être également origine-dépendante car pour les NoV GII.2, seule la bile humaine a favorisé l'infection chez des individus non sécréteurs (Lindesmith *et al.*, 2020). Il a été démontré par la suite que les sels biliaires pouvaient également améliorer l'infection des MNV *in vitro* (Nelson *et al.*, 2018). Certains sels biliaires (*i.e.* acide glycochenodeoxycholique et acide lithocholique) sont capables de se lier à la BP de certains génotypes de NoV (*i.e.* GII.1, GII.10, et GII.19) mais pas à d'autres (GI.1, GII.3, GII.4, et GII.17) (Kilic *et al.*, 2018). L'adhésion des sels biliaires a été décrite comme étant une étape critique pour stabiliser le domaine P et placer les acides aminés de la BP dans une configuration optimale pour l'adhésion des HBGA (Kilic *et al.*, 2018). Les sels biliaires provoqueraient une rotation de 90°C et un effondrement du domaine P des MNV au niveau du domaine S, augmentant ainsi le nombre de sites de liaisons disponibles (Sherman *et al.*, 2019). En revanche, les sels biliaires n'affecteraient pas la conformation des HBGA (Creutznacher *et al.*, 2020). Les sels biliaires peuvent cependant induire des réponses cellulaires spécifiques promouvant la réplication des NoV GII.3 dans les entéroïdes par une amélioration de l'endocytose, une acidification, et une augmentation du taux de céramides. Ces derniers sont des sphingolipides, transformés à partir de sphingomyéline lors de l'acidification du milieu, et à lui seul, il serait suffisant pour favoriser la réplication des NoV GII.3 (Murakami *et al.*, 2020).

3. Influence des enzymes protéolytiques

Les enzymes protéolytiques sont contenues dans le suc gastrique ou pancréatique et jouent un rôle important dans la digestion intestinale des protéines. Le rôle qu'elles ont en commun est

d'hydrolyser les protéines alimentaires en peptides pour faciliter leur absorption par les cellules intestinales.

a) Trypsine et chymotrypsine

La trypsine et la chymotrypsine sont des endoprotéases à serine (*i.e.* le site actif possède un résidu de sérine qui joue un rôle important dans la catalyse). Elles sont actives à un pH compris entre 7,0 et 9,0 et peuvent être retrouvées dans le duodénum et le jéjunum. La trypsine peut hydrolyser des liaisons peptidiques situées après un résidu d'arginine ou de lysine alors que la chymotrypsine hydrolyse l'extrémité C des liaisons peptidiques telles que la tyrosine, le tryptophane, la leucine, la méthionine et la phénylalanine.

La trypsine et la chymotrypsine ont été décrites comme pouvant favoriser la réplication *in vitro* de certain virus (*e.g.* virus influenza, rotavirus, réovirus) (Clark *et al.*, 1981; Klenk *et al.*, 1975; Spendlove et Schaffer, 1965). Les mécanismes de l'amélioration de cette infection ne sont pas connus. Cependant, des hypothèses concernant des mécanismes possibles ont été émises : i) effet sur les cellules qui influence l'attachement ou la pénétration des virus, ii) digestion des inhibiteurs viraux comme les interférons et les anticorps, iii) dispersion des agrégats viraux, iv) effet qui aurait lieu à un moment donné de l'étape de réplication. Les résultats de Clark *et al.* (1981) indiquent que la trypsine améliore l'infectiosité du rotavirus en permettant à une plus grande fraction du virus de se décoller de la cellule infectée.

Dans cette même idée, la trypsine a été également décrite comme pouvant favoriser l'adhésion des VLP de NoV GII.3 et GII.6 aux HBGA (Huo *et al.*, 2017; Zheng *et al.*, 2017).

b) Pepsine

La pepsine, qui provient du pepsinogène, est une endoprotéase active à un pH compris entre 1,0 et 3,0. Elle peut être présente dans l'estomac et catalyse l'hydrolyse du C-terminal des liaisons peptidiques spécifiques telles que la phénylalanine, la leucine, la tyrosine et le tryptophane. Elle est totalement dénaturée à un pH supérieur à 6,0.

Récemment, il a été montré que les FCV pouvaient survivre dans des milieux mimant les fluides gastriques à des pH compris entre 1,5 à 4,5 et avec une concentration en pepsine de 13,3 $mg.L^{-1}$ (Booth et Frost, 2020). Cependant, une perte de 0,9, 1,5 et 2,5 log_{10} est observée pour les milieux gastriques, respectivement à pH 3,5, 2,5 et 1,5. Le génome des NoV GI.1 et GII.4 résiste

à des conditions gastriques similaires (*i.e.* pH 2,5, pepsine à 13,3 $mg.L^{-1}$) (Tung-Thompson *et al.*, 2015).

IV. Utilisation de l'interaction des norovirus avec les HBGA pour mieux caractériser l'inactivation virale et mieux comprendre la transmission *via* l'eau et les aliments.

Cette partie correspond à une revue bibliographique publiée dans Food Microbiology (Chassaing *et al.*, 2020a). Cette publication est donnée en annexe 1. Cette revue a pour ambition de définir i) si les HBGA peuvent être utilisés comme un ligand discriminant les particules infectieuses et non infectieuses après inactivation par différents traitements d'inactivation (*e.g.* chaleur, chlore, pression, ultra-violet (UV)) et, ii) si l'interaction avec les pseudo-HBGA présents dans les aliments et l'environnement peuvent influencer la transmission des NoV.

1. Interaction des norovirus avec les HBGA : une preuve du caractère infectieux ?

Dans l'environnement et dans les aliments, les NoV doivent faire face à de nombreux facteurs inactivant physiques (*i.e.* chaleur, pression, UV) ou chimiques (*i.e.* oxydants). Les seuls moyens de déterminer si un virus est toujours infectieux sont la culture cellulaire *in vitro* et l'inoculation à un animal sensible. Depuis peu, certains systèmes de culture *in vitro* de certains génotypes de NoV sont décrits mais la sensibilité et la robustesse de ces approches nécessitent encore d'être améliorées. Ces différentes cultures sont en effet toujours suivies d'une quantification du génome viral pour montrer une réplication des NoV *in vitro* (Ettayebi *et al.*, 2016; Todd et Tripp, 2020a; Van Dycke *et al.*, 2019). En d'autres termes, ces méthodes ne permettent pas de quantifier avec précision le nombre de particules infectieuses présentes dans l'échantillon à analyser.

Compte tenu des limites actuelles de la détection de génome de NoV par la norme 15216 (ISO 15216-1, 2017, ISO 15216-2, 2019) pour discriminer les virus infectieux et non infectieux dans les aliments à risque (cf I. 8. Contextes réglementaire et normatif), de nouvelles approches sont devenues indispensables pour préciser le caractère infectieux des NoV dans les aliments et pour conclure sur un risque avéré pour le consommateur. L'étude de l'intégrité de la capside par la reconnaissance des HBGA par les NoV pourrait être une solution pertinente. Certains auteurs ont déjà suggéré que l'utilisation des HBGA pourrait indiquer l'état intègre ou non intègre de la capside virale après des traitements d'inactivation, et ainsi avoir une meilleure estimation du danger viral dans les aliments (Afolayan *et al.*, 2016; Dancho *et al.*, 2012; Moore *et al.*, 2017).

Pour évaluer l'intérêt de ce type d'approche utilisant les HBGA avant la détection du génome viral, l'inactivation de différents virus modèles cultivables des NoV (*i.e.* MNV, FCV, calicivirus canin (CaCV), TV, virus de l'hépatite A (VHA) et le poliovirus (PV)) par différents traitements, a été comparée à la dégradation du génome des NoV selon deux approches (Chassaing *et al.*, 2020a). La première approche repose sur la quantification directe du génome viral par RT-qPCR. La deuxième approche repose sur la quantification du génome viral par RT-qPCR précédée par une étape de fixation aux HBGA. Différents traitements d'inactivations ont été étudiés : la chaleur, l'hypochlorite de sodium, les hautes pressions et les UV-C.

L'inactivation du génome des NoV et des modèles viraux cultivables a été étudiée pour des températures et des temps de contact différents. Ainsi, les temps nécessaires pour réduire d'un $\log_{10}$ (TFL) en jour ont pu être calculés. Les résultats obtenus ont permis de confirmer que l'inactivation des virus modèles augmente avec l'augmentation de la température. De manière non surprenante, les génomes de NoV sont fortement persistants par comparaison aux particules infectieuses. Une étape de sélection des particules virales par adhésion spécifique aux HBGA semble réduire la surestimation du nombre potentiel de virus infectieux. Ceci est particulièrement vrai à température élevée. Pour des températures supérieures à 70°C, des modifications majeures correspondant à une dégradation complète de la capside sont observées. A l'inverse, en dessous de 60°C, les mécanismes d'inactivations semblaient être dus à des modifications mineures au niveau de la capside virale sans pour autant modifier la capacité du virus à interagir avec les HBGA. En résumé, pour des traitements thermiques induisant des modifications significatives au niveau de la capside virale pouvant aller jusqu'à la déstructuration (> 70°C), l'adhésion aux HBGA peut réduire la sous-estimation de l'efficacité virucide du traitement. En revanche, pour des températures induisant des modifications plus faibles (< 70°C), le nombre de particules virales réellement infectieuses est largement surestimé avec une approche utilisant les HBGA comme critère sélectif.

L'hypochlorite de sodium, utilisé notamment pour le lavage des salades destinées au marché de la 4ème gamme mais aussi dans les traitements de potabilisation de l'eau, a été étudié pour préciser son impact sur des virus modèles (*i.e.* MNV, TV et FCV) et sur les NoV. Brièvement, il a été montré que l'effet de l'hypochlorite de sodium est dépendant de nombreux facteurs expérimentaux et méthodologiques mis en œuvre dans les études publiées. Par exemple, la mesure du chlore résiduel et le niveau de purification des particules virales influencent l'efficacité de ce traitement. Après adhésion aux HBGA, la quantité de génome de NoV est plus faible que celle estimée directement après ce traitement de désinfection, indiquant que

l'adhésion aux HBGA réduit la sous-estimation de l'efficacité virucide de ce traitement de désinfection. Ceci est principalement observé pour les plus fortes doses d'hypochlorite de sodium. Celui-ci semble dégrader aussi bien la capside que le génome viral (Brié *et al.*, 2017; Wigginton *et al.*, 2012b). Cependant, même à de fortes concentrations en hypochlorite de sodium , certains auteurs ont pu observer des capsides intègres par microscopie électronique à transmission (MET) (Bastin *et al.*, 2020; Loison *et al.*, 2016). En utilisant des bactériophages fécaux comme le MS2 ou Qβ, il a été montré que les dommages sur les protéines de capside étaient principalement localisés sur des cystéines, des méthionines, des tyrosines et des tryptophanes (Bastin *et al.*, 2020) (Annexe 1 : Chassaing *et al.* 2020a). En résumé, la réduction de la sous-estimation de l'efficacité de ce traitement oxydatif en utilisant la reconnaissance aux HBGA peut être expliquée par la déstructuration de la capside virale et/ou des dommages oxydatifs au niveau de la BP des NoV.

Les traitements à hautes pressions (HPP ou *high pressure processing*), sont des alternatives utilisées pour le traitement des aliments sensibles aux traitements thermiques ou oxydatifs (*i.e.* altération de la qualité nutritionnelle, organoleptique, sensorielle). L'inactivation des virus modèles infectieux (*i.e.* MNV, TV et FCV) se fait de manière dose-dépendante. L'inactivation des virus infectieux peut aller jusqu'à 7,4 et 6,0 $\log_{10}$ pour une pression de 450 et 700 MPa à 0-4°C et 20-25°C, respectivement. Les génomes de NoV ont été décrits comme étant plus persistants avec une réduction inférieure à 1 $\log_{10}$ lors de l'application d'une pression de 450 MPa. Les résultats montrent également qu'il existe une différence entre les génotypes GI.1 et GII.4 dans la résistance de la capside virale au traitement à la pression. Comme montré pour les traitements thermiques et celui utilisant l'hypochlorite de sodium, la reconnaissance des HBGA avant la détection du génome limite la sous-estimation de l'efficacité de ce traitement. Comme pour les traitements thermiques, il semblerait exister un seuil critique. En effet, la réduction de la sous-estimation serait visible pour des hautes pressions supérieures à 200-250 MPa et 450-500 MPa pour les deux températures (0-4°C et 20-25°C) pour les NoV GII.4 et GI.1, respectivement. L'inactivation virale induite par les hautes pressions hydrostatiques semblerait être causée par des dégâts sur la capside virale, en particulier une dissociation ou une dénaturation des protéines de capside (Bosch *et al.*, 2018; Kingsley, 2013; Kingsley *et al.*, 2002; Lou *et al.*, 2011) (Annexe 1 : Chassaing *et al.* 2020a). En résumé, l'utilisation des HBGA avant la détection du génome réduirait la surestimation des NoV infectieux GII.4 et GI.1 pour des pressions au-dessus de 250 MPa et 450-500 MPa, respectivement. Cependant, cette surestimation ne serait pas réduite pour des traitements à des pressions plus faibles.

Les UV sont fréquemment utilisés pour la désinfection de l'eau, des surfaces et des aliments (Food and Drug Administration, 2011). Les virus modèles infectieux sont sensibles aux UV (*e.g.* taux de réduction de 6,0 log_{10} pour une dose de moins de 200 mJ/cm²), alors que des réductions inférieures à 1,0 log_{10} sont observées pour le génome des NoV pour des doses de 1 000 mJ/cm². Après adhésion aux HBGA avant détection du génome viral, les données bibliographiques ne montrent pas une réduction de la surestimation des particules infectieuses des NoV détectées après ce traitement. Les UV peuvent entraîner une modification du génome viral par l'apparition de liaisons covalentes entre les bases adjacentes du génome ou entre les acides nucléiques et les protéines virales (Shetlar, 1980; Simonet et Gantzer, 2006; Wigginton *et al.*, 2010, 2012a, 2012b). En résumé, l'utilisation des HBGA avant la détection du génome viral ne permet pas de réduire la sous-estimation de l'efficacité de ce traitement de désinfection. Les dommages causés par les UV au niveau du génome ne seraient donc pas suffisants pour empêcher l'adhésion des capsides de NoV aux HBGA ou la détection du génome par RT-qPCR.

En conclusion, quel que soit le traitement utilisé pour inactiver les NoV, la seule détection du génome viral peut notablement sous-estimer l'efficacité virucide d'un traitement d'inactivation. L'adhésion des NoV aux HBGA avant la détection du génome viral réduit cette sous-estimation mais seulement pour des concentrations ou des doses qui impliquent des altérations significatives au niveau de la capside virale (> 70°C pour la chaleur, > 450-500 MPa pour les hautes pressions). Pour les autres traitements, l'utilisation des HBGA avant la détection du génome ne réduit pas la surestimation de la quantité de virus réellement infectieux après inactivation. Dans le cas de l'hypochlorite de sodium, l'adhésion aux HBGA semble limiter cette surestimation, mais des recherches plus approfondies avec des expériences plus harmonisées seraient nécessaires pour mieux évaluer l'impact de ce traitement sur l'intégrité de la capside.

2. Interactions des norovirus avec les HBGA : rôle dans la transmission

La transmission des NoV par l'environnement et les aliments est définie par leur capacité de survie mais aussi par la capacité d'adhésion de ces particules virales sur les matrices. L'adhésion des virus sur des matrices inertes est principalement expliquée par des liaisons non spécifiques telles que des interactions électrostatiques ou hydrophobes (Gerba et Betancourt, 2017; Vega *et al.*, 2008). Aujourd'hui, il est possible de penser que des liaisons spécifiques peuvent également jouer un rôle important dans la transmission des NoV. Comme décrit précédemment, des pseudo-HBGA sont retrouvés dans l'environnement et les aliments

(Almand *et al.*, 2017) et plusieurs études montrent que les NoV peuvent se lier à ces pseudo-HBGA (Gao *et al.*, 2016; Le Guyader *et al.*, 2006a; Li *et al.*, 2012; Rubio-del-Campo *et al.*, 2014). Si les liaisons spécifiques des NoV aux aliments et l'environnement *via* les pseudo-HBGA sont plus significatives que les liaisons non spécifiques, alors les génotypes de NoV capables de reconnaitre ces carbohydrates pourraient en théorie être plus fréquemment retrouvés dans les aliments responsables d'épidémies.

Pour valider ou réfuter cette hypothèse, les données de la littérature ont été analysées en comparant la détection des NoV dans les matrices alimentaires en fonction de leur capacité de reconnaissance des HBGA. Les données ont été collectées en prenant soin de séparer d'une part les études de prévalence et d'autre part les études basées sur les épidémies alimentaires. Pour les études de prévalence en génome de NoV, les coquillages représentent 86,3 % des données tandis que les fruits et les végétaux représentent 13,6 % des données. Globalement, les NoV sont plus faiblement génotypés dans les fruits et les végétaux que dans les coquillages mais les proportions de NoV GI et de GII sont similaires à ce qui a déjà été décrit (*i.e.* 5,0 % à 24,3 %) (Brassard *et al.*, 2012; De Keuckelaere *et al.*, 2015; El-Senousy *et al.*, 2013; Loutreul *et al.*, 2014; Pérez-Rodríguez *et al.*, 2014; Stals *et al.*, 2011). Les génotypes de NoV les plus fréquemment détectés dans les coquillages sont les génotypes GI.2, GI.3, GI.4, GII.2, GII.4, GII.6, et GII.17). Pour les études reposant sur les épidémies alimentaires à NoV, la proportion de coquillages, de fruits, de végétaux et des autres matrices alimentaires étaient respectivement de 53 %, 16 %, 14 %, et 17 %. Pour chaque matrice alimentaire, la fréquence de détection de chaque génotype en fonction de la matrice a été déterminée. Les génotypes les plus fréquemment détectés dans les différentes matrices alimentaires sont les GI.2, GI.4, GII.3, GII.4, GII.6 et GII.7.

Enfin, pour mieux comprendre si certaines matrices alimentaires pouvaient influencer la transmission des NoV, les génotypes de NoV retrouvés dans les études de prévalence et dans les épidémies alimentaires ont été comparés à ceux décrits comme étant responsables de gastro-entérites entre les années 2000 et 2016 chez l'Homme (Chan *et al.*, 2015; Ferreira *et al.*, 2010; Kumthip *et al.*, 2018; Vega *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2012). Le génotype le plus fréquemment détecté dans les coquillages et dans les aliments responsables de gastro-entérites est le NoV GII.4, avec une prévalence chez l'Homme variant de 63,4 à 87,9 %. Le NoV GI.4 est le deuxième génotype le plus fréquemment détecté, mais avec une faible prévalence chez l'Homme (*i.e.* 0,3 à 1,1 %). D'autres génotypes tels que le GII.7, GII.6, GI.2, et GII.3 sont aussi

fréquemment détectés dans les matrices alimentaires mais avec des prévalences variables allant de 0,3 à 15% selon le génotype.

Ainsi, certains génotypes sont aussi fréquemment retrouvés dans les matrices alimentaires que chez l'Homme. En revanche certains sont plus fréquemment détectés dans les matrices alimentaires qu'ils ne sont retrouvés chez l'Homme. Ceci pourrait traduire une sélection préférentielle de certains sérotypes de NoV dans certains aliments, basée sur leur capacité d'adhésion et de survie. L'influence des pseudo-HBGA présents dans les aliments et l'environnement pourrait donc participer à cette sélection des NoV. Il a été démontré dans cette revue bibliographique que les six génotypes les plus fréquemment détectés dans les aliments appartenaient au groupe « A/B binding » décrit par Huang *et al.* (2005). Cependant, d'autres génotypes (*i.e.* GI.3, GII.1, GII.12), plus rarement détectés dans les aliments mais fortement prévalent chez l'Homme appartiennent aussi à ce groupe « A/B binding ».

En conclusion, la sélection de génotypes de NoV dans l'environnement *via* leur capacité d'interaction avec les pseudo-HBGA, ne semble pas clairement établie. Cet aspect mériterait d'être approfondi pour confirmer ou réfuter cette hypothèse.

Résultats

Les résultats présentés dans cette partie visent d'une part à définir si les HBGA peuvent jouer un rôle protecteur des NoV vis-à-vis de facteurs inactivant rencontrés lors du transit vers le système digestif (pH, enzymes protéolytiques) et d'autre part à préciser l'évolution de la capacité d'interaction des NoV avec les HBGA au cours de processus d'inactivation virale dans l'environnement (*e.g.* vieillissement naturel, chaleur, oxydants). Les résultats s'articulent ainsi en deux parties distinctes.

La première partie vise à déterminer dans quelle mesure l'interaction avec les HBGA salivaires humains peut protéger les NoV des facteurs inactivant rencontrés dans le système digestif de l'hôte (enzymes protéolytiques, sels biliaires et pH acide). Cette partie fait l'objet d'une publication dans *Scientific Reports* (Chassaing *et al.*, 2020b).

La deuxième partie vise à suivre la capacité d'interaction des NoV avec les HBGA au cours de l'inactivation en fonction du temps, de traitements thermiques et de traitements de désinfection. Ainsi, l'objectif est de définir si cette interaction peut être un critère pertinent pour témoigner du caractère infectieux du virus. Ce type d'information pourrait servir à la discrimination des virus infectieux et non infectieux. Cette partie a fait l'objet de deux publications. La première a été publiée dans *Scientific Reports* (Robin *et al.*, 2019) et la seconde sera soumise en janvier 2021 dans *Frontiers in Microbiology*.

I. Rôle protecteur des Norovirus par les HBGA vis-à-vis des facteurs inactivant retrouvés chez l'Homme

Les NoV sont transmis par voie féco-orale. Ils pénètrent donc par voie orale et transitent par le système digestif avant d'atteindre l'intestin où le virus pourra se répliquer dans sa cellule hôte. Dans le tractus digestif, les NoV sont confrontés à des variations de pH et sont exposés à différentes enzymes protéolytiques (*i.e.* pepsine, trypsine, chymotrypsine) présentes pour la dégradation des aliments. Ces facteurs physiologiques peuvent potentiellement perturber la capside du NoV et la capacité des particules virales à infecter la cellule hôte. La reconnaissance et la fixation des HBGA salivaires par les NoV pourraient alors être une étape importante pour faciliter la survie des particules virales lors de la traversée du tractus digestif avant d'atteindre la cellule hôte. Dans ce contexte, l'impact du pH et de différentes enzymes protéolytiques (*i.e.* trypsine, chymotrypsine, pepsine) a été évalué sur des VLP de NoV GII.4 et directement sur des NoV GII.4 purifiés à partir de selles humaines. Cette étude s'est tout d'abord portée sur l'intégrité des capsides des VLP et des NoV GII.4 selon les différents facteurs puis sur le potentiel effet protecteur des HBGA vis-à-vis des NoV soumis à ces mêmes facteurs.

Les effets du pH acide et de trois enzymes protéolytiques (*i.e.* pepsine, trypsine et chymotrypsine) sur la capside des VLP GII.4 et la protéine VP1 ont été évalué à 37°C pendant 4 h en utilisant différentes approches méthodologiques complémentaires : MET, diffusion dynamique de la lumière (DLS ou *dynamic light scattering*), détermination du Tm (*i.e.* point de fusion : température nécessaire pour dénaturer 50 % des particules virales) *via* une sonde fluorescente (SYPRO Orange), et par SDS-PAGE en conditions dénaturantes. Aucun effet du pH acide à 2,0 ou 3,0 n'a été observé par MET alors qu'à un pH de 1,3, plus aucune VLP n'était visible. La pepsine à 1 500 unités.mL^{-1} a réduit également la quantité de VLP de 70 à 2 particules observables par champ par MET. La trypsine et la chymotrypsine ont aussi réduit la quantité de VLP de 70 à 10 puis à 2 et de 70 à 14 puis à 1 particule à 0, 0,1 et 100 mg.mL^{-1}, respectivement. La taille moyenne des particules variait également en fonction des traitements. Elle était inférieure à 6,4 nm après traitement par la trypsine ou la chymotrypsine à 100 mg.mL^{-1}. Alors qu'à pH 1,3, elle a augmenté jusqu'à 215,4 nm. Pour les autres conditions testées, la taille oscillait entre 41,2 et 59,9 nm par DLS. Le Tm des VLP a été mesuré à 72,1°C pour la condition témoin (*i.e.* pH 8,0). Le pH 2,0 et 3,0 n'a pas eu d'impact sur le Tm des particules virales alors qu'à pH 1,3, le Tm n'était plus mesurable (*i.e.* absence de signal). Lorsque les VLP étaient traitées par 0,1 mg.mL^{-1} de trypsine ou de chymotrypsine, le Tm chutait

respectivement à 57,4 et 60,8°C. Pour les traitements à plus fortes concentrations en enzymes protéolytiques, les Tm n'ont pas pu être estimés en raison de la trop forte proportion de protéines ajoutées. Les effets de chaque traitement sur les protéines VP1 ont ensuite été évalués en examinant les modifications par SDS-PAGE en conditions dénaturantes. Des profils similaires ont été observés entre les VLP à pH 7,4 et pH 3,0. A pH 2,0, les VLP étaient très légèrement dénaturées. A pH 1,3, elles étaient totalement dénaturées avec un profil similaire que lorsqu'elles étaient chauffées à 95°C pendant 10 min. La pepsine, quant à elle, a clivé totalement les VLP mais aussi les protéines VP1 sous forme libre (*i.e.* après prétraitement des VLP à 95°C pendant 10 min). La trypsine à 0,1 $mg.mL^{-1}$ a digéré complètement les protéines VP1 sous forme libre et partiellement lorsqu'elles étaient sous forme de VLP. Lorsque la concentration en trypsine a augmenté à 100 $mg.mL^{-1}$, les protéines VP1 étaient totalement digérées quelle que soit leur forme. De son côté, la chymotrypsine à 0,1 $mg.mL^{-1}$ a digéré partiellement les protéines VP1 sous forme de VLP et totalement lorsque la concentration était à 100 $mg.mL^{-1}$. En résumé, le pH 3,0 n'a eu aucun effet sur la structure des VLP GII.4 et des protéines VP1. La trypsine ou la chymotrypsine à 0,1 $mg.mL^{-1}$ et le pH inférieur à 2,0 ont eu des effets partiels sur la structure des VLP. Enfin, la pepsine à 1 500 $unités.mL^{-1}$, la trypsine ou la chymotrypsine à 100 $mg.mL^{-1}$ ont induit des perturbations significative des VLP et une digestion des protéines VP1.

Pour des raisons de quantité et de pureté des particules virales, les méthodes utilisées pour les VLP GII.4 n'ont pas pu être appliquées pour les NoV GII.4. Ainsi, pour distinguer les particules virales structurées de celles qui ne l'étaient plus, le génome des NoV a été systématiquement quantifié par RT-qPCR précédé d'un traitement par la RNase (*i.e.* dégradation du génome libre) quelle que soit la condition étudiée. Contrairement aux VLP, le pH acide et les trois mêmes enzymes protéolytiques testées à 37°C pendant 4 h n'ont eu aucun effet sur les NoV. Pour aller plus loin et vérifier que les NoV n'avaient pas subi de dommages partiels au niveau de la capside après traitements par le pH acide et les enzymes protéolytiques, la stabilité thermique des NoV a été étudiée. Dans ces conditions de traitements, les NoV étaient soumis à différents gradients de température allant de 60 à 85°C. A pH 8,0, le Tm des NoV était proche de 75°C. Pour les NoV traités aux pH acides ou par des enzymes protéolytiques, les Tm variaient de 70 à 80°C. Cependant, quel que soit le traitement employé, il n'a pas été observé d'effets délétères sur les capsides des NoV. En résumé, aucun traitement, que ce soit par le pH acide ou par des enzymes protéolytiques, n'a conduit à une diminution des valeurs de Tm et donc à une fragilisation des capsides virales.

Le rôle protecteur de la liaison des HBGA aux NoV après traitement par les mêmes enzymes protéolytiques n'a été étudié que sur les VLP GII.4 car aucun effet n'a été observé sur les NoV. Tout d'abord, la salive humaine contenant les HBGA qui présentait la plus grande affinité avec les VLP GII.4 a été sélectionnée (*i.e.* HBGA salivaires de type Ale^+). Ensuite, les VLP GII.4 ont été pré-incubées avec ces HBGA salivaires de type Ale^+ pendant 1 h à 37°C avant traitement par les enzymes protéolytiques (*i.e.* pepsine, trypsine et chymotrypsine) pendant 4 h à 37°C. Dans le but de déterminer si la liaison des NoV aux HBGA de type Ale^+ avait un effet protecteur, les protéines VP1 sous forme de VLP ont été analysées par SDS-PAGE en conditions dénaturantes. La présence d'une potentielle protection serait reflétée par une absence ou une plus faible digestion des protéines VP1 en présence d'HBGA. Les profils de digestion obtenus par SDS-PAGE, pour toutes les enzymes, étaient similaires avec et sans HBGA. En résumé, les VLP GII.4 étaient sensibles à tous les traitements testés et la liaison préalable des NoV aux HBGA n'avait pas eu d'effet protecteur sur la stabilité des capsides des VLP GII.4.

En conclusion, les VLP GII.4 semblent plus sensibles que les NoV GII.4 aux pH acides et aux enzymes protéolytiques retrouvées dans le tractus digestif. Par des approches méthodologiques complémentaires, il a été montré que l'interaction avec les HBGA ne protégeait pas les NoV GII.4 vis-à-vis de ces facteurs d'inactivation.

www.nature.com/scientificreports

scientific reports

Check for updates

OPEN

The effect of proteolytic enzymes and pH on GII.4 norovirus, during both interactions and non-interaction with Histo-Blood Group Antigens

Manon Chassaing[1,2], Maëlle Robin[1], Julie Loutreul[1], Didier Majou[3], Gaël Belliot[4,5], Alexis de Rougemont[4,5], Nicolas Boudaud[1] & Christophe Gantzer[2]✉

Human noroviruses (HuNoVs) are the leading cause of acute gastroenteritis worldwide. Histo-Blood Groups Antigens (HBGAs) have been described as attachment factors, promoting HuNoV infection. However, their role has not yet been elucidated. This study aims to evaluate the ability of HBGAs to protect HuNoVs against various factors naturally found in the human digestive system. The effects of acid pH and proteolytic enzymes (pepsin, trypsin, and chymotrypsin) on GII.4 virus-like particles (VLPs) and GII.4 HuNoVs were studied, both during interactions and non-interaction with HBGAs. The results showed that GII.4 VLPs and GII.4 HuNoVs behaved differently following the treatments. GII.4 VLPs were disrupted at a pH of less than 2.0 and in the presence of proteolytic enzymes (1,500 units/mL pepsin, 100 mg/mL trypsin, and 100 mg/mL chymotrypsin). VLPs were also partially damaged by lower concentrations of trypsin and chymotrypsin (0.1 mg/mL). Conversely, the capsids of GII.4 HuNoVs were not compromised by such treatments, since their genomes were not accessible to RNase. HBGAs were found to offer GII.4 VLPs no protection against an acid pH or proteolytic enzymes.

Human noroviruses (HuNoVs) are a leading cause of acute gastroenteritis worldwide, with more than 700 million cases reported annually[1]. HuNoVs are transmitted through the faecal-oral route, and are among the main causes of viral foodborne outbreaks in both Europe and the United States of America (USA)[2,3].

Noroviruses belong to the *Caliciviridae* family and can be divided into 10 genogroups (G): GI, GII, and GIV are responsible for most diseases in humans. In the GII genogroup, genotype 4 (GII.4) HuNoVs are the most prevalent type[4–7]. The capsid of about 30 nm have a major protein (VP1) and a minor protein (VP2). The external P2 subdomain of VP1 expresses the hypervariable region of the capsid. The capsid includes a single stranded RNA genome (~7.5 kilobases). VP1 can spontaneously assemble into virus-like particles (VLPs).

There is currently no available routine method for the detection of infectious HuNoVs in foodstuffs and the environment, although some innovative approaches to the in vitro replication of a few HuNoV genotypes have been described[8–10]. Reverse transcription–polymerase chain reaction (RT-qPCR) techniques are therefore currently used to detect and quantify HuNoVs in humans, foodstuffs, and the environment, in accordance with the ISO 15216 standard[11,12].

It has been clearly demonstrated that HuNoVs interact with Histo-Blood Group Antigens (HBGAs) in humans[13–15], and also with HBGA-like carbohydrates present in food, bacteria, and the environment[16]. HBGAs are complex carbohydrates resulting from the successive addition of monosaccharides to a precursor. The biosynthesis of HBGAs is governed by the ABO and *FUT2* and *FUT3* fucosyl-transferase gene families[17,18]. They can be found on red blood cells and mucosal epithelial cells. They can also be present as free antigens in biological fluids, such as saliva or milk[17,19]. The expression of active *FUT2* defines secretor status, while non-active *FUT2* defines non-secretor status[15,17]. Interactions between HuNoVs and HBGAs are highly specific, with multiple

[1]Food Safety Department, Actalia, 50000 Saint-Lô, France. [2]University of Lorraine, CNRS, LCPME, 54000 Nancy, France. [3]ACTIA, 75231 Paris Cedex 05, France. [4]Laboratory of Virology, National Reference Centre for Gastroenteritis Viruses, University Hospital of Dijon, 21000 Dijon, France. [5]UMR PAM A 02.102 Procédés Alimentaires et Microbiologiques, Université de Bourgogne Franche-Comté/AgroSup Dijon, 21000 Dijon, France. ✉email: christophe.gantzer@univ-lorraine.fr

binding patterns and various affinities[18,20]. The binding of HuNoVs to HBGAs takes place in the P2 subdomain, which is composed of four or five highly conserved amino acids and a number of more variable amino acids[21,22]. Several studies have described HBGAs as attachment factors for several HuNoV strains that promote infection in humans, but it is still unclear whether they act as (co)-receptors or facilitate access to the infection site[8,15].

Upon entry into the human body via oral ingestion, HuNoVs may (or may not) interact with salivary HBGAs, before passing through the gastrointestinal tract via the stomach. Thus, various factors may alter the structure of virions (i.e. infectious particles), especially the acid pH of the stomach and proteolytic enzymes in the gastrointestinal tract.

There is little data available on the resistance of HuNoVs as a function of pH. It has been observed that HuNoVs treated at pH 2.7 for 3 h were able to cause infection in human volunteers[23]. No reduction in HuNoV genomes was observed in Greenshell mussels at pH 3.8 following a 4-week incubation period[24]. To gain a better understanding of HuNoV survival, many studies have used cultivable infectious HuNoV surrogates, such as feline calicivirus (FCV), murine norovirus (MNV), tulane virus (TV), and VLPs. The combined results showed that a 30 min exposure to an acid pH ranging from 2.0 to 4.0 led to a 0–2 $\log_{10}$ reduction in these surrogates[25,26], with the exception of FCV, which appeared to be more sensitive than the others[24,26,27]. The effect of pH on VLPs has been thoroughly reviewed and differences at the genogroup level have been highlighted, given that GII seemed more resistant to basic pH in the 8–10 range than GI[28,29].

Other factors that can affect the structure of virions include proteolytic enzymes, whose effect is dependent on the nature of each enzyme. Pepsin enzymes, which are active at pH 1.0–3.0, may be present in the stomach and can hydrolyse the C-terminal of specific peptide bonds, such as phenylalanine, leucine, tyrosine, and tryptophan. Trypsin and chymotrypsin enzymes, which are active at pH 7.0–9.0, can be found in the duodenum and jejunum. Trypsin can hydrolyse peptide bonds located after an arginine or lysine residue, while chymotrypsin hydrolyses the C-terminal of peptide bonds, such as tyrosine, tryptophan, leucine, methionine, and phenylalanine. The different positive and negative effects of these enzymes on viruses have been described. Trypsin seems to promote HBGA-binding to the viral capsid of GII.3 and GII.6 VLPs[30,31], while VP1 cleavage could be observed in the same genotypes[30–32]. Chymotrypsin and pepsin seemed to promote the infectivity of reovirus, while a reduction below 1 $\log_{10}$ in GI.1 and GII.4 HuNoV genomes could be observed after 42 days in a buffer mimicking the conditions of gastric fluid[33,34]. To our knowledge, no data are available regarding the influence of HBGA-binding on the potential protection or degradation of the viral capsid towards these inactivating factors found in the human digestive system.

The aim of this study was (1) to evaluate the effects of acid pH, pepsin, chymotrypsin, and trypsin on GII.4 VLPs and HuNoVs and, (2) investigate the potential protective effect of HBGA-binding on these viral particles, using the same parameters. The resulting effects on VLPs were analysed by examining capsid integrity as reflected in the overall structure of the particles (using transmission electron microscopy: TEM); measurements of particle size (using dynamic light scattering: DLS); protein mass modifications (using sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide denaturing gel electrophoresis: SDS-PAGE); and conformational changes to the capsid (using a fluorescent hydrophobic probe: SYPRO Orange). The resulting effects on HuNoVs were evaluated using RNase treatment followed by RT-qPCR to estimate the number of genome copies (gc) from fully intact capsids[35].

Results

Effects of acid pH and proteolytic enzymes on GII.4 VLPs. The effects of acid pH and proteolytic enzyme (pepsin, trypsin, and chymotrypsin) treatments at 37 °C for 4 h on the overall structure of GII.4 VLPs and the VP1 protein were evaluated.

The overall structure of GII.4 VLPs was analysed using TEM, DLS, and SYPRO Orange probe. The study of conformational changes to the capsid using SYPRO Orange probe provided information about the melting temperatures (Tm values) of the particles. The results obtained by TEM are shown in Fig. 1. A magnification of ×15,000 was used to estimate the number of particles, while a magnification of ×27,500 was used to obtain a more precise estimation of capsid structure. Observations of the native GII.4 VLPs at pH 8.0 (i.e. control) showed a mean of around 70 particles per field. Two different sizes (20 and 35 nm) could be distinguished, expressing heterogeneous morphology. Particles of 20 and 35 nm are composed of 60 and 180 copies of VP1 respectively, and can be described as morphologically and antigenically similar[36]. Applying a pH of 3.0 or 2.0 did not change the mean number of particles per field, particle size, or morphology. At pH 1.3, the number of GII.4 VLPs decreased significantly, with no particles observed per field (unpaired sample *t*-test, $p < 0.005$) (Fig. 1A). Treatment with 1,500 units/mL pepsin at pH 2.0 also significantly reduced the number of GII.4 VLPs to a mean of two particles per field (unpaired sample *t*-test, $p < 0.005$) (Fig. 1B). After treatments with trypsin and chymotrypsin, the number of VLPs estimated by TEM decreased in a dose-dependent manner. With trypsin at pH 8.0, the mean numbers of particles per field were 70, 10, and 2 at 0, 0.1, and 100 mg/mL, respectively (unpaired sample *t*-test, $p < 0.005$). With chymotrypsin at pH 8.0, the mean numbers of particles per field were 70, 14, and 1 at 0, 0.1, and 100 mg/mL, respectively (unpaired sample *t*-test, $p < 0.005$). The mean size of particles was not modified after proteolytic enzyme treatments. All these results are summarized in Table 1, including results relating to the mean size of VLPs, measured by DLS, and the Tm values, determined using SYPRO Orange probe. For the pepsin treatment, only TEM was applied to define modifications on VLPs. The control shown in Table1 was valid for all conditions because there were no significant differences between them (unpaired sample *t*-test, $p > 0.3$). Interestingly, the mean size of particles either increased or decreased using DLS, depending on test conditions. The mean particle size was less than 6.4 nm after treatments with 100 mg/mL trypsin and chymotrypsin, and greater than 215.4 nm at pH 1.3. It ranged from 41.2 to 59.9 nm under the other conditions tested. This suggests that either GII.4 VLPs or their capsid proteins were unstructured or aggregated following proteolytic digestion (100 mg/mL) and at pH 1.3, respectively. The different mean sizes of isolated VLPs given by TEM and DLS are

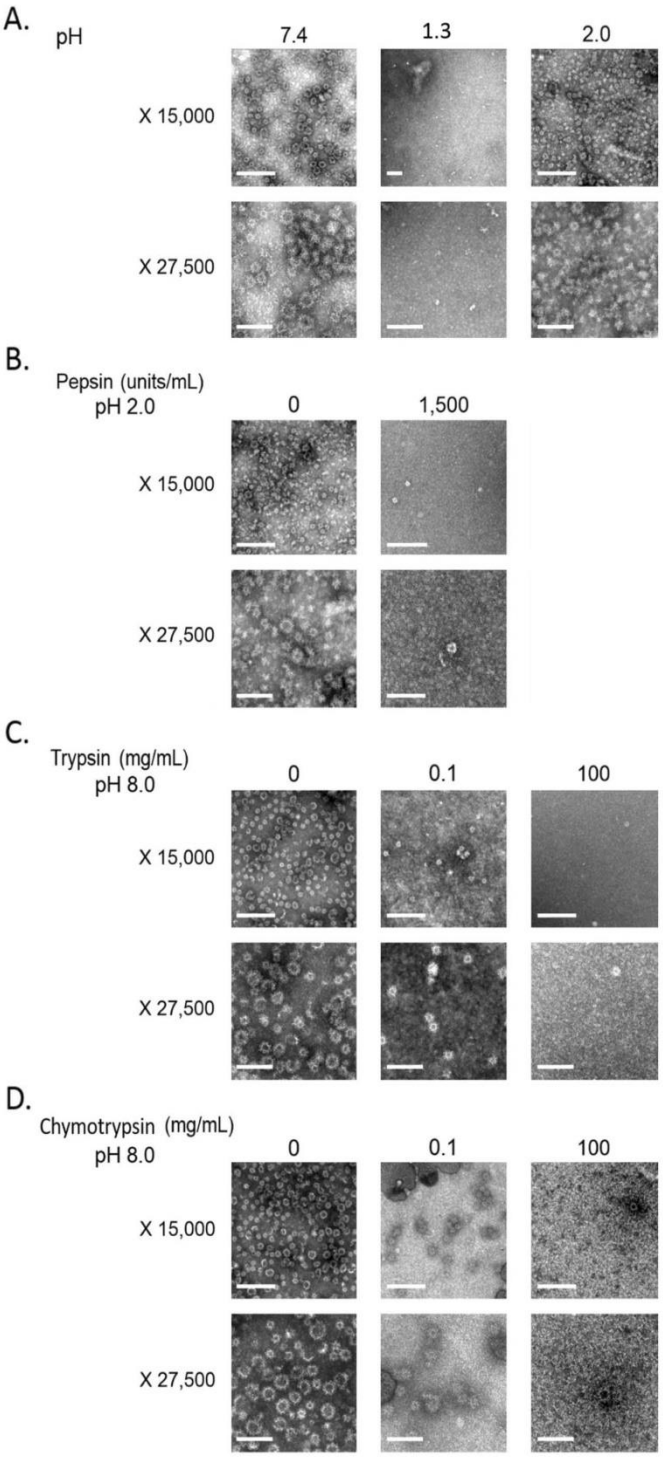


Figure 1. TEM observations of native and acid pH- or proteolytic enzyme-treated GII.4 VLP capsids after negative staining. **A.** GII.4 VLPs after exposure to pH 7.4, 1.3, and 2.0. **B.** GII.4 VLPs after exposure to 0 and 1,500 units/mL pepsin at pH 2.0. **C.** GII.4 VLPs after exposure to trypsin (0, 0.1, and 100 mg/mL) at pH 8.0. **D.** GII.4 VLPs after exposure to chymotrypsin (0, 0.1, and 100 mg/mL) at pH 8.0. The scale bar (solid line, bottom left corner) is 0.2 µm and 100 nm for X 15,000 and X 27,500 magnifications, respectively.

Acid pH and proteolytic enzyme treatments		GII.4 VLPs			
		Number of particles (mean/field)	Mean size (nm)		Tm (°C)
		TEM	TEM	DLS	SYPRO
Control* 37 °C pH 8.0		70 ± 20	22.6 ± 7.7	50.3 ± 4.5	72.1 + / 0.3
Trypsin, pH 8.0 (mg/mL)	0.1	$10^{\$} \pm 6$	20.0 ± 3.2	51.1 ± 9.7	$57.4^{\$} \pm 1.3$
	100	$2^{\$} \pm 1$	21.0 ± 1.6	$6.4^{\$} \pm 6.6$	NA*
Chymotrypsin, pH 8.0 (mg/mL)	0.1	$14^{\$} \pm 3$	19.7 ± 2.3	41.2 ± 7.5	$60.8^{\$} \pm 1.0$
	100	$1^{\$} \pm 1$	21.0 ± 3.9	$3.9^{\$} \pm 0.3$	NA*
pH	1.3	$0^{\$a}$	NA***	$215.4^{\$} \pm 33.5$	NA**
	2.0	58 ± 6	20.7 ± 4.7	42.1 ± 4.0	72.1 ± 0.2
	3.0	72 ± 10	23.4 ± 6.4	59.9 ± 5.0	72.0 ± 0.2

Table 1. Number, size, and Tm of GII.4 VLPs after proteolytic enzyme treatments. The number, size, and Tm of GII.4 VLPs were determined using TEM, DLS, and SYPRO Orange probe, respectively. *The control was valid for each condition tested. NA*: not measured because of the high protein content. NA**: not measured because of the absence of the fluorescence signal. NA***: not measured because of the absence of particles. [a]0 means that no particle between 15 and 25 nm were observed. [$]Unpaired Student's *t*-test, $p < 0.005$.

due to the fact that DLS measures the hydrodynamic diameter of the viral particles in aqueous media while TEM measures the physical diameter of the capsid after drying. On the other hand, when aggregation take place, DLS cannot detect particles over 6 µm and may be more sensitive to detect low numbers of particles between 200 nm and 6 µm compared to TEM. Tm value of the native VLPs at pH 8.0 was measured at 72.1 °C. No difference in the Tm values of the VLPs was observed at pH 2.0 or 3.0. The Tm value strongly decreased after the 0.1 mg/mL enzymatic treatments (unpaired sample *t*-test, $p < 0.005$), which means that proteolytic enzymes impacted the capsid structure, making it more vulnerable to heat. Tm values could not be estimated following the 100 mg/mL enzymatic treatments because of the high protein content caused by the addition of the enzymes.

The effects of each treatment on VP1 proteins were evaluated by examining modifications using SDS-PAGE under denaturing conditions. The results are shown in Fig. 2. At pH 7.4, the profile of native GII.4 VLPs displayed bands with a molecular weight (MW) of above 100 kDa (Fig. 2A). VP1s were expected to have a MW of around 60 kDa. A slightly reduced MW of around 57 kDa was also expected in VP1 lacking the N-terminal (Nt) region[37]. Applying a heat treatment of 95 °C to native VLPs for 10 min allowed the two expected VP1 bands to be observed using SDS-PAGE analysis. This suggests that, under denaturing conditions, SDS-PAGE disturbed the migration of VP1 to the expected MWs because of the incomplete dissociation of VP1 multimers and/or the conservation of some secondary structures. We will henceforth refer to such bands as "VP1 multimers." Thus, the effects of different treatments, on GII.4 VLPs, both separately and in combination with heat treatment (referred to as "Heating at 95 °C" in Fig. 2) were investigated and then submitted to SDS-PAGE analysis. Different pH conditions were tested, with the following results: (i) similar profiles were obtained for native VLPs at pH 7.4 (i.e. the control) and VLPs treated at pH 3.0, and included the presence of "VP1 multimers"; (ii) a slight presence of VP1 and "VP1 multimers" was detected in VLPs treated at pH 2.0; and (iii) VP1 alone was observed in VLPs treated at pH 1.3. This indicates that heating or an acid pH of less than 2.0 dissociated or removed the "VP1 multimers".

The effects of proteolytic enzymes (pepsin, trypsin, and chymotrypsin) on both the isolated form of VP1 protein and the form assembled into VLPs were investigated. As described above, the effect on isolated VP1 was studied by heating at 95 °C for 10 min prior to proteolytic enzyme treatments (referred to as "Pre-heated" in Fig. 2). The pepsin treatment resulted in the digestion of VP1, both isolated and assembled into VLPs (Fig. 2B). The bands observed at around 37 kDa correspond to pepsin with a MW of 34.6 kDa, which did not interfere with VP1. No digestion of VP1 was observed following the use of heat-inactivated pepsin (see Supplementary Information Fig. S1). The 0.1 mg/mL trypsin treatment completely digested the isolated VP1 and partially altered the VP1 assembled into VLPs (Fig. 2C). Increasing trypsin concentration to 100 mg/mL led to the complete digestion of VP1, whether isolated or assembled into VLPs (Fig. 2D). No digestion of VP1 was observed when using heat-inactivated trypsin (see Supplementary Information Fig. S1). Trypsin also appeared in the SDS-PAGE analysis, at a MW of 23.8 kDa. The 0.1 mg/mL chymotrypsin treatment also partially altered VP1 that were assembled into VLPs (Fig. 2E). Increasing chymotrypsin concentration to 100 mg/mL also led to a complete digestion of VP1, whether isolated or assembled into VLPs (Fig. 2F). Chymotrypsin was present at a MW of 27.8 kDa.

The combined results of all the treatments tested suggest the following conclusions: (i) treatments at pH 3.0 had no effect on the structure of VLP/VP1; (ii) treatments with 0.1 mg/mL trypsin or 0.1 mg/mL chymotrypsin or at a pH of less than 2.0 had partial effects; (iii) treatments with 1,500 units/mL pepsin, 100 mg/mL trypsin, or 100 mg/mL chymotrypsin induced VP1 digestion and VLP disruption.

The effects of acid pH and proteolytic enzymes on GII.4 HuNoVs. None of the methods used on GII.4 VLPs were applicable to GII.4 HuNoVs because the quantity and purity of particles were much greater in VLPs than in HuNoVs. The DLS, SYPRO Orange probe, and SDS-PAGE methods were not sensitive enough to allow us to study the behaviour of HuNoVs when treated with an acid pH and proteolytic enzymes. We therefore drew on the results obtained from GII.4 VLPs, to determine whether proteolytic enzymes and acid pH could disrupt HuNoVs. The difference between disrupted and structured particles was determined based on the number of HuNoV gc from fully intact capsids. Thus, the HuNoV genome was systematically quantified using RNase

treatment followed by RT-qPCR before and after proteolytic enzyme and acid pH treatments. However, it cannot be ruled out that degradation takes place at the level of the capsid without making the RNA accessible to RNases. Therefore, the thermal stability of HuNoVs was evaluated using the same approach, to determine whether the viral particles were disrupted by such treatments. Minor degradations may impact thermal stability.

The effects of all these treatments on HuNoVs are shown in Fig. 3. In contrast with their effects on VLPs, there was no evidence that any of these treatments diminished the integrity of HuNoVs, when compared with native HuNoVs at pH 8.0 (Mann–Whitney U test, $p > 0.01$).

As previously demonstrated with GII.4 VLPs, the thermal stability of HuNoVs could further explain the partial damage to capsids induced by proteolytic enzymes and their effects on the Tm values needed to disassemble the HuNoV capsid. HuNoV gc from fully intact capsids were therefore quantified at different temperature gradients, to evaluate the effects of acid pH and proteolytic enzyme treatments. The $\log_{10}$ (C/C_0) values were determined by dividing the mean GII.4 HuNoV gc values after each proteolytic enzyme or acid pH treatment, following treatment at temperatures of 60–85 °C, by the mean GII.4 HuNoV gc values obtained after the same enzymatic treatment and treatment at 60 °C. The results are shown in Fig. 4. At pH 8.0, the native HuNoV capsids appeared to be highly disassembled at a Tm value of close to 75 °C. The Tm values of HuNoVs treated with proteolytic enzymes (chymotrypsin, trypsin, and pepsin) varied from 70 °C–80 °C. At 75 °C, the decay rates of GII.4 HuNoV gc treated with acid pH or proteolytic enzymes were significantly lower than those of native GII.4 HuNoVs at pH 8.0 (unpaired sample *t*-test, $p < 0.005$). Above this temperature, three profiles could be identified: (i) a decay rate similar to that of the native HuNoVs at pH 8.0 following treatment with 0.1 mg/mL chymotrypsin and 100 mg/mL trypsin (unpaired sample *t*-test or Mann–Whitney U test, $p > 0.1$); (ii) a decay rate lower than that of the native HuNoVs at pH 8.0 following both pH 1.3 treatment alone and pepsin treatment at pH 1.3 (unpaired sample *t*-test or Mann–Whitney U test, $p < 0.002$); and (iii) no decay rate for HuNoVs treated with 100 mg/mL chymotrypsin (unpaired sample *t*-test or Mann–Whitney U test, $p < 0.002$). It could, therefore, be concluded that the various treatments had no deleterious effects on the HuNoV capsids. Some of the treatments even seemed to play a protective role, which may be explained by their high enzyme content or by the aggregation of the capsid proteins, rendering the viral genome inaccessible to RNase.

In conclusion: none of the proteolytic enzymes or acid pH treatments led to a decrease in the Tm values needed to disassemble the GII.4 HuNoV capsids.

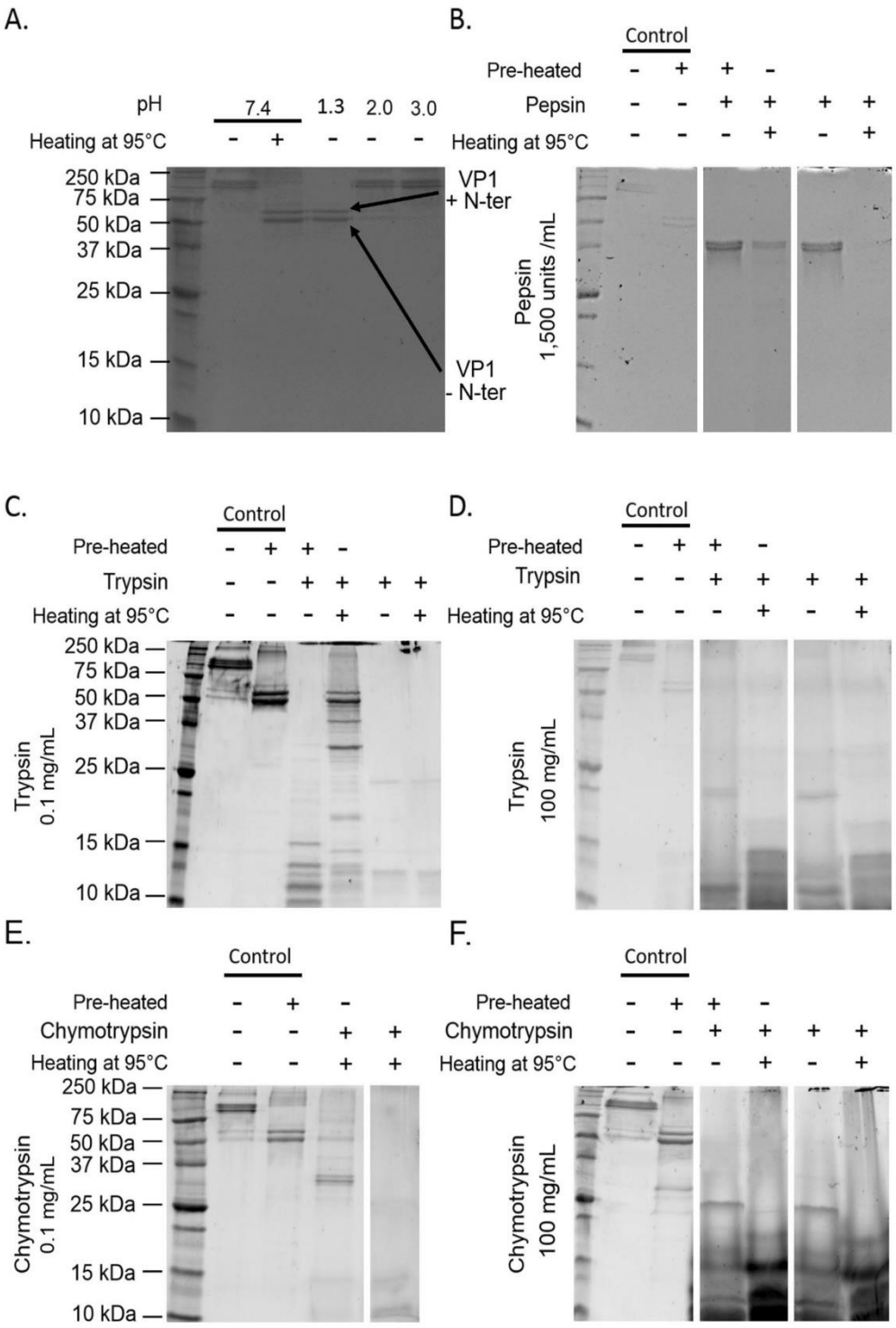
Protective effect of HBGAs against proteolytic enzymes. HBGA-binding's potential protective effects on the viral capsid against proteolytic enzymes have only been evaluated for GII.4 VLPs, since these effects had no observable impact on HuNoVs. First, the HBGA-binding profile of GII.4 VLPs in 15 saliva samples was determined using the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) approach (see Supplementary Information Fig. S2). The human saliva with the greatest relative affinity for GII.4 VLPs was selected and correlated with type ALe^+ ("E" in Supplementary Information Fig. S2). Second, GII.4 VLPs were incubated with the ALe^+ saliva prior to proteolytic enzyme treatments using pepsin, trypsin, or chymotrypsin. To determine whether HBGA-binding would have a protective effect on VLPs against these enzymes, SDS-PAGE analysis was used to investigate the stability of VP1. It can be assumed that HBGA-binding prevents the action of the enzymes if the relative intensities of VP1 bands of native VLPs and VLPs treated using the proteolytic enzymes are similar. The results of the SDS-PAGE analyses are shown in Fig. 5. Saliva containing HBGAs is rich in proteins, making some of the results difficult to interpret, particularly when VP1 was confused with unknown salivary proteins of the same MW (~58–59 kDa). At 0.1 mg/mL trypsin and chymotrypsin, the relative intensity of VP1 decreased in the same way as in the control group, without HBGA-binding. Moreover, at 1,500 units/mL pepsin, 100 mg/mL trypsin, or 100 mg/mL chymotrypsin, VP1 completely disappeared in the same way as it did in the control group, without HBGA-binding. These results mean that the specific binding interactions between GII.4 VLPs and HBGAs did not prevent enzymatic digestion of the viral capsids. We conclude that GII.4 VLPs were sensitive to all treatments and that HBGA-binding to VLPs does not have a protective effect on capsid stability under the conditions tested.

Discussion

The role of HBGAs in HuNoV infection is still not perfectly understood, and progress is required to improve knowledge of their potential role. In research to date, HBGAs have been described to be involved in HuNoV infection[15,38,39]. While HBGAs were recently shown to be critical for infection of some HuNoV strains in the human intestinal enteroids system[40], there is no evidence that HBGAs are the putative cellular receptor for HuNoVs.

Over the past decade, HBGAs have only been considered as co-receptors or co-factors promoting infection in host cells because of the hypotheses that HuNoV genotypes could (i) bind to cells (e.g. lamina propria, Brunner's gland, and epithelial cells) independently of the presence of HBGAs[41,42], (ii) cause acute gastroenteritis outbreaks regardless of the Lewis or ABO phenotypes of secretor individuals[43] and (iii) infect non-secretor individuals[44,45]. To obtain a better understanding of the role of HBGAs in the entire host-cell infection process in humans, the protective role of these complex carbohydrates in the presence of various factors naturally found in the human digestive system was studied. The effects of acid pH and three proteolytic enzymes (pepsin, trypsin, and chymotrypsin) on capsid integrity in HuNoVs were investigated because interactions in the stomach and small intestine can occur before the virus reaches the primary target of infection and replication.

First, the effects of acid pH and of the three proteolytic enzymes described above on native GII.4 VLPs and GII.4 HuNoVs were tested. Complete disassembly of GII.4 VLPs—but not GII.4 HuNoVs—into VP1 was observed at an acid pH of less than 2.0. Capsid stability clearly differed between VLPs and HuNoVs belonging to the same genotype. The lesser stability of GII.4 VLPs compared to GII.4 HuNoVs was also demonstrated,


A.
pH
7.4
1.3
2.0
3.0
Heating at 95°C
- + - - -
250 kDa
75 kDa
50 kDa
37 kDa
25 kDa
15 kDa
10 kDa
VP1
+ N-ter
VP1
- N-ter
B.
Control
Pre-heated - + + -
Pepsin - - + + + +
Heating at 95°C - - - + - +
Pepsin
1,500 units /mL
C.
Control
Pre-heated - + + -
Trypsin - - + + + +
Heating at 95°C - - - + - +
Trypsin
0.1 mg/mL
D.
Control
Pre-heated - + + -
Trypsin - - + + + +
Heating at 95°C - - - + - +
Trypsin
100 mg/mL
E.
Control
Pre-heated - + -
Chymotrypsin - - + +
Heating at 95°C - - + +
Chymotrypsin
0.1 mg/mL
F.
Control
Pre-heated - + + -
Chymotrypsin - - + + + +
Heating at 95°C - - - + - +
Chymotrypsin
100 mg/mL

◂**Figure 2.** SDS-PAGE analyses of native and acid pH- or proteolytic enzyme-treated GII.4 VLPs. **A.** GII.4 VLPs after exposure to different acid pH conditions (7.4, 1.3, 2.0, and 3.0). **B.** GII.4 VLPs after exposure to 1,500 units/mL pepsin at pH 2.0. **C.** GII.4 VLPs after exposure to 0.1 mg/mL trypsin at pH 8.0. **D.** GII.4 VLPs after exposure to 100 mg/mL trypsin at pH 8.0. **E.** GII.4 VLPs after exposure to 0.1 mg/mL chymotrypsin at pH 8.0. **F.** GII.4 VLPs after exposure to 100 mg/mL chymotrypsin at pH 8.0. The term "Pre-heated" means that the VLPs were previously heated at 95 °C for 10 min to obtain VP1 prior to proteolytic enzyme treatments. The term "Heating at 95 °C" means that the VLPs or VP1 were heated at 95 °C for 10 min prior to SDS-PAGE analysis, to dissociate VLPs and remove secondary VP1 structures. The "+" and "-" signs indicate whether or not the treatment was applied. No sign means that there were no VLPs present. White spaces indicate the different parts of the same gels. Each condition was tested in triplicate.

following natural ageing at 20 °C[46]. This difference could have been due to the absence of VP2 and/or the lack of interactions between the viral genome and VP1[28,47]. These interactions have been reported to promote capsid stability in other viruses, such as F-specific RNA bacteriophages (MS2 and GA) as well as Triatoma virus (TrV), a picorna-like virus with a single-stranded positive-sense RNA genome and an icosahedral T = 3 structure similar to that of HuNoVs[48,49].

The effects of pepsin, trypsin, and chymotrypsin were studied under optimal conditions. The optimal conditions for pepsin were a concentration of 1,500 units/mL in gastric fluid buffer, at a pH of 2.0 for VLPs and 1.3 for HuNoVs[50]. The optimal conditions for trypsin and chymotrypsin were 0.1 or 100 mg/mL at pH 8.0 in ammonium bicarbonate buffer[51]. Digestion of VP1 was observed after treatment with the three proteolytic enzymes, indicating the accessibility of cleavage sites. According to the ExPASy PeptideMass tool, 34 peptides, with MWs of 0.5–1.5 kDa should be obtained after pepsin treatment at pH 2.0. With trypsin and chymotrypsin, 28 peptides (of 0.5–5.1 kDa) and 48 peptides (of 0.5–2.1 kDa) respectively are expected following enzymatic digestion. Under the conditions tested, degradation of VP1 was confirmed by SDS-PAGE analyses, following proteolytic enzyme treatments. As expected, the VP1 obtained from native VLPs was totally digested after preheating to 95 °C. Nevertheless, VP1 was not completely cleaved when enzymatic digestion was performed using GII.4 VLPs, particularly at lower doses of proteolytic enzymes (i.e. 0.1 mg/mL). Some intact particles were detected by TEM observations, and some VP1 at a MW of 57 and 60 kDa was detected by SDS-PAGE analysis. Our results demonstrated that VP1 is more sensitive to enzymatic digestion in its isolated form than when assembled into GII.4 VLPs, as previously described in the case of GI.1 VLPs[52]. One peptide of 32 kDa was found in GI.1 VLPs and two peptides of 31 and 26 kDa in GII.3 and GII.6 VLPs respectively following trypsin treatments of 16–500 µg/mL[30–32,52]. Although complete digestion of VP1 at 62.5 °C and 500 µg/mL trypsin was observed using SDS-PAGE analysis, some authors could still observe VLPs using TEM[31,32]. The structure and stability of the HuNoV capsid therefore seems to be genotype dependent. It has recently been demonstrated that GII.4 VLPs have T = 4 icosahedral symmetry, whereas GI.1 and GI.7 VLPs have T = 3 icosahedral symmetry[53]. Thus, the intra- and inter-VP1 interactions of VP1 assembled into VLPs differ between HuNoV genotypes. This may explain why VP1 could be easily dissociated from VLPs in SDS-PAGE under denaturing conditions in some genotypes (i.e. GII.3 and GII.6) but not completely in GII.4 HuNoVs. The persistence of non-covalent multimers of VP1 at MWs above 100 kDa, which were only dissociated after heating at 95 °C or at an acid pH of less than 2.0 in our study, provides further evidence of the specificity of capsid structure at genotype level. Our results demonstrate that enzymatic cleavage of VP1 does not always reflect disruption of GII.4 VLPs because of the incomplete digestion of VP1 when assembled into VLPs. Complete disruption of GII.4 VLPs was obtained after treatments with trypsin and chymotrypsin concentrations higher than 100 mg/mL and pepsin concentrations higher than 1,500 units/mL.

While different degrees of enzymatic digestion were detected in GII.4 VP1 and VLPs, different behaviours were observed in native GII.4 HuNoVs following pepsin, trypsin, and chymotrypsin treatments. VLPs are described as structurally, antigenically, and morphologically similar to intact HuNoV particles[54]. Unlike GII.4 VLPs, in which evidence of partial or complete disruption was found following proteolytic enzyme treatments, no complete dissociation of GII.4 HuNoVs was obtained under the same conditions, regardless of the concentration of enzymes used. With the aim of evaluating whether these enzymes really could disrupt GII.4 HuNoV capsids, the thermal stability of the viral particles following gradual increases in temperature after proteolytic enzyme treatments was investigated. This provided several insights. Decay rates were similar in native GII.4 HuNoVs and GII.4 HuNoVs treated with 0.1 mg/mL chymotrypsin and 100 mg/mL trypsin after heating at all temperatures in the range except 75 °C; while in those treated with both a pH of 1.3 alone and with a pH of 1.3 and pepsin combined, less reduction in GII.4 HuNoV genomes was observed after heating to 75 °C and 85 °C. Conversely, no reduction in GII.4 HuNoV genomes was detected following 100 mg/mL chymotrypsin treatment over the whole heat treatment range, indicating the potential stability of the HuNoV capsids. These results suggest that chymotrypsin content was high enough to (i) provide a protective effect against heat degradation; and (ii) prevent HuNoV genomes from being accessible to RNases. The protective effect of a high chymotrypsin concentration could also be produced by treating HuNoVs with an acid pH and pepsin. This could be explained by the aggregation of viral particles which can maintain the integrity of particles[47]. Be that as it may, our results clearly indicate that GII.4 HuNoVs are more resistant to an acid pH and proteolytic enzyme digestion than GII.4 VLPs.

Second, the protective effect of HBGA-binding on GII.4 VLP capsids was investigated by using human saliva prior to proteolytic enzyme treatments. No similar investigation was conducted using GII.4 HuNoVs because there was no evidence of complete dissociation of the viral particles, induced by the same enzymes. At low doses of trypsin and chymotrypsin (0.1 mg/mL), SDS-PAGE analysis detected no difference between samples with and without HBGA-binding to VLPs. At higher doses of trypsin or chymotrypsin (100 mg/mL), and at 1,500 units/mL pepsin, VLPs were totally disrupted even in the presence of HBGAs. Thus, we found no evidence that ALe$^+$

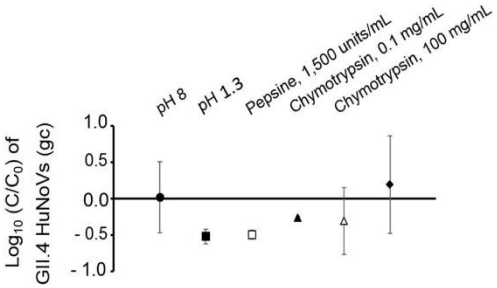


Figure 3. Decay of GII.4 HuNoVs after exposure to acid pH and proteolytic enzyme treatments. GII.4 HuNoV gc from fully intact capsids were quantified using RNase treatment followed by RNA amplification by RT-qPCR. The filled-in circle (●) represents native GII.4 HuNoV gc at pH 8.0. The filled-in square (■) and outlined square (□) represent GII.4 HuNoV gc treated at pH 1.3 alone and at pH 1.3 with 1,500 units/mL pepsin, respectively. The filled-in triangle (▲), outlined triangle (Δ) and filled-in diamond (♦) represent GII.4 HuNoV gc after treatment at pH 8.0 with 0.1 mg/mL chymotrypsin, 100 mg/mL chymotrypsin, and 100 mg/mL trypsin, respectively. Each treatment was applied for 4 h at 37 °C. The log (C/C_0) values were calculated by dividing the mean GII.4 HuNoV gc values following treatment by the mean native GII.4 HuNoV gc values at pH 8.0. Each data point is an average of at least two replicates. Error bars indicate standard deviations. The Mann–Whitney U test was used to compare groups[64].

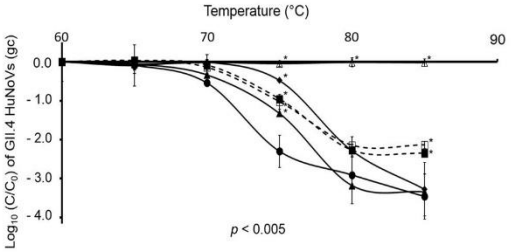


Figure 4. Decay of GII.4 HuNoV genomes after exposure to an acid pH and proteolytic enzyme treatments followed by heat treatment. GII.4 HuNoV gc from fully intact capsids were quantified using RNase treatment followed by RNA amplification by RT-qPCR. The filled-in circles (●, solid line) represent GII.4 HuNoVs at pH 8.0. The filled-in squares (■, dotted line) and outlined squares (□, dotted line) represent GII.4 HuNoV gc treated at pH 1.3 alone and at pH 1.3 with 1,500 units/mL pepsin, respectively. The filled-in triangles (▲, solid line), outlined triangles (Δ, solid line) and filled-in diamonds (♦, solid line) represent GII.4 HuNoV gc at pH 8.0 after 0.1 mg/mL chymotrypsin, 100 mg/mL chymotrypsin, and 100 mg/mL trypsin, respectively. The acid pH and proteolytic enzyme treatments were applied for 4 h at 37 °C and followed by heat treatment at different temperatures. The log (C/C_0) values were calculated by dividing the mean GII.4 HuNoV gc values after treatment by the mean GII.4 HuNoV gc values obtained at 60 °C. Each data point is an average of at least two replicates and error bars indicate standard deviations. An unpaired Student's *t*-test and the Mann–Whitney U test were used to compare treated groups to the untreated one[64].

human saliva provided a protective effect on capsid integrity in GII.4 VLPs against these proteolytic enzymes. Several assumptions can be drawn on the basis of these observations. The first is that the cleavage sites of pepsin, trypsin, and chymotrypsin are not located in the regions surrounding the HBGA-binding site in subdomain P2 of VP1. The second is that the steric hindrance caused by HBGAs was not sufficient to prevent capsid digestion by these proteolytic enzymes. However, it is important to bear in mind some methodological constraints on investigating the potential influence of HBGA-binding on the maintenance of capsid integrity. For example, it was difficult to use SYPRO Orange probe to study the Tm values of VLPs. The abundance of proteins in human saliva and the addition of the proteolytic enzymes increased the background noise and hindered the reliable determination of Tm values. Given that proteolytic enzymes and an acid pH of less than 2.0 can disrupt VLPs, the present study demonstrated, for the first time as far as we know, that human saliva containing HBGAs does not influence the stability of the capsid when exposed to factors naturally found in the human digestive system. However, that bile salts or divalent cations could promote capsid stability has not been ruled out. There is ample evidence that they enhance the replication of HuNoVs using human intestinal enteroids but also potentially improve HBGA-binding to HuNoVs[8,55,56]. The protective effect of human gut microbiota could also be involved because it has recently been shown that some enteric bacteria (e.g. *Enterobacter cloacae*) bind HuNoVs through the H-like carbohydrates present on the bacterial surface[57,58].

Finally, we demonstrated the differences between the behaviours of GII.4 VLPs and GII.4 HuNoVs when exposed to different treatments (acid pH and proteolytic enzyme treatments). There was no evidence of a protective effect of HBGAs on GII.4 VLPs. Further research is required to elucidate how HBGA-binding contributes to capsid stability and to human infections.

Materials and methods

Purification of GII.4 VLPs and GII.4 HuNoVs. GII.4 VLPs (Cairo 4 strain, a 2007 Osaka variant) were obtained using the baculovirus-expressed VP1 system and purified using a discontinuous sucrose gradient, as previously described by De Rougemont[59]. The quantity of proteins was determined using a NanoDrop 2000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). GII.4 VLPs were prepared at a final concentration of 1 mg/mL with a TNC buffer (10 mM Tris-HCl, 140 mM NaCl, 10 mM $CaCl_2$, pH 7.4). Aliquots were stored at − 80 °C, and extemporaneously thawed as needed.

The GII.4 HuNoVs were genotyped from human stools[60], kindly provided by the University Hospital of Nancy, France. The purification, extraction, and genome quantification of GII.4 HuNoVs were performed using the methods described previously[46] (see Supplementary Information Method). The purified HuNoV suspensions were stored in darkness at +4 °C at a final concentration of 10^7 gc/mL until needed. The total protein content of the HuNoV suspensions was measured using a NanoDrop 2000 spectrophotometer at a final concentration of 350 µg/mL.

Acid pH and proteolytic enzyme treatments of GII.4 VLPs and GII.4 HuNoVs. Suspensions of GII.4 VLPs were diluted in simulated gastric fluid buffer (25 mM $NaHCO_3$, 12 mM KCl, 40 mM NaCl, 6 mM $CaCl_2$)[50] at pH values ranging from 1.3 to 3.0 or in ammonium bicarbonate buffer (50 mM NH_4HCO_3, pH 8.0). GII.4 VLPs were prepared at a final concentration of 300 µg/mL. For the acid pH treatments, 4 µL of the simulated gastric fluid buffer were added to 10 µL of GII.4 VLPs at 300 µg/mL. For the proteolytic enzyme treatments, 10 µL of GII.4 VLPs at 300 µg/mL was treated with 4 µL of proteolytic enzymes at 37 °C for 4 h. Pepsin (Promega, 02195367) was used at a concentration of 1,500 units/mL (i.e. 600 µg/mL) in simulated gastric fluid buffer at pH 2.0 for VLPs and pH 1.3 for HuNoVs. Trypsin (Sigma, T4799) and chymotrypsin (Fisher Scientific, 10568362) were used at concentrations of 0.1 and 100 mg/mL in ammonium bicarbonate buffer.

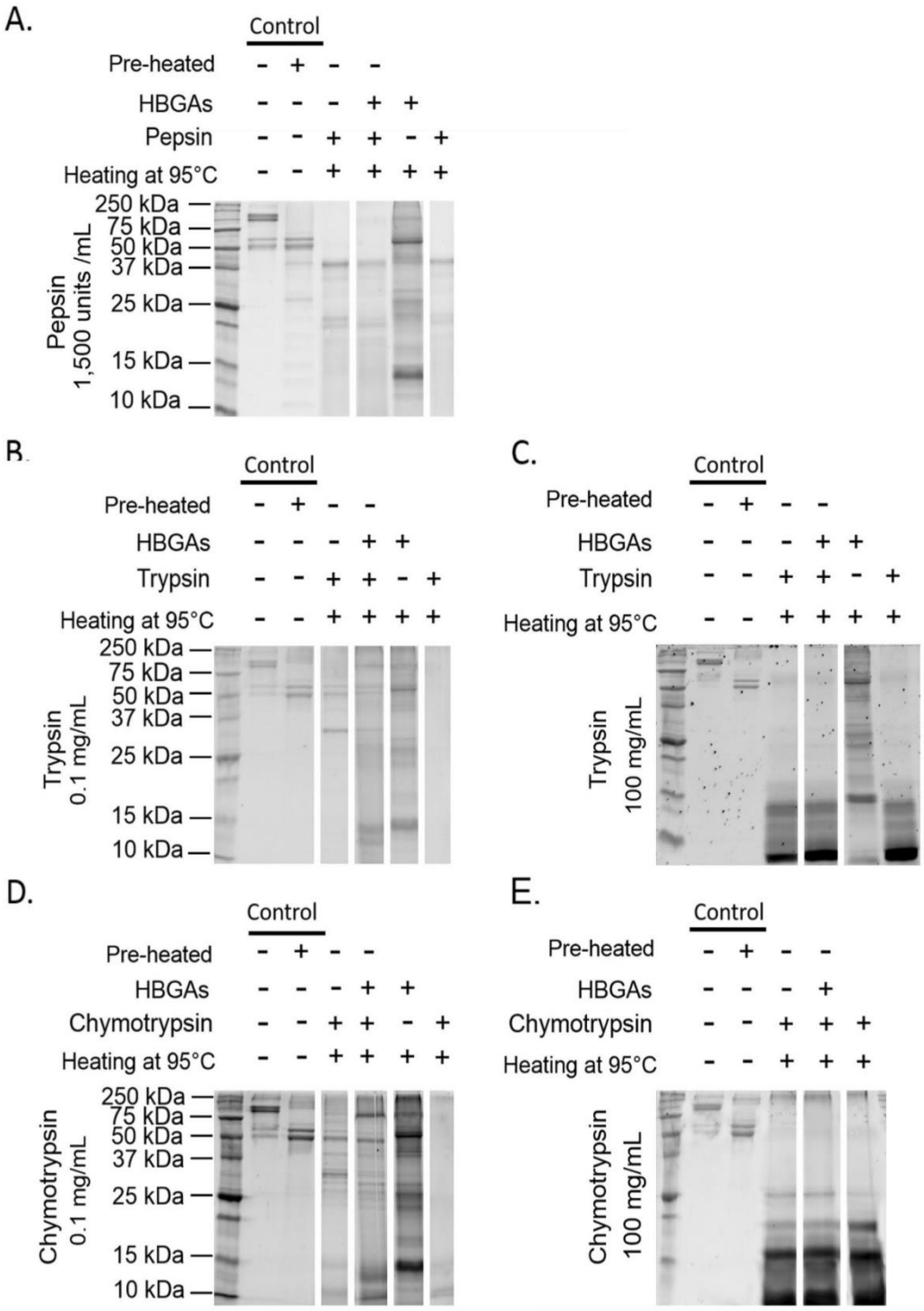
The protocol developed for proteolytic enzyme treatments on GII.4 VLPs was used on the purified GII.4 HuNoVs. To estimate the quantity of potentially fully intact capsids, the purified GII.4 HuNoV suspensions were treated with RNase A (Thermofisher, EN0531) as described by Brié et al., with some modifications[61]. An internal control was added to the GII.4 HuNoV suspensions to confirm the action of RNase. Briefly, 10 µL of MS2 bacteriophage RNA genome at a concentration of 10^6 gc/mL was added to 10 µL of GII.4 HuNoV suspension. Then, 8 µL of the proteolytic enzyme (pepsin, trypsin, or chymotrypsin) was added and the mixture was incubated at 37 °C for 4 h. RNase was added to achieve a final concentration of 100 µg/mL. The results were considered valid if the RNA genomes of MS2 bacteriophages was not detected by RT-qPCR (see Supplementary Information Method). The number of HuNoV gc in the native suspension was quantified using RT-qPCR at pH 8.0 and 37 °C (C_0) and following acid pH or proteolytic enzyme treatments at 37 °C (C). The experiments involving GII.4 VLPs and GII.4 HuNoVs were at minimum duplicated, under the same conditions.

TEM for GII.4 VLPs. TEM was used to observe GII.4 VLPs both with and without acid pH or proteolytic enzyme treatments, after negative staining with phosphotungstic acid, as previously described[46]. TEM is considered to provide a semi-quantitative estimation of the number of particles. Pictures at a magnification of ×15,000 were obtained, to provide a representative field permitting an estimation of the number of particles, and at a magnification of ×27,500 to provide a more precise overview of the morphology and size of particles. When assessing each acid pH, proteolytic enzyme treatment, and magnification factor, at least 4 representative pictures were taken into account. The mean number of particles was determined by visual inspection and the size was measured using ImageJ software (Java 1.8.0).

DLS for GII.4 VLPs. Only the GII.4 VLPs treated with 0.1 mg/mL and 100 mg/mL trypsin and chymotrypsin were studied using this method. At the end of the proteolytic enzyme treatments, the reaction was diluted by the addition of 1 mL of 0.1× PBS (13.7 mM NaCl, 0.27 mM KCl, 1.0 mM Na_2HPO_4, 0.18 mM KH_2PO_4, pH 7.4). Size measurements were made using a Zetasizer Nano ZS instrument (Malvern Instruments), as described by Brié et al.[61]. Diameter measurements of GII.4 VLPs were obtained using at least two independent experiments and each hydrodynamic diameter measurement was performed in triplicate.

Differential scanning fluorimetry for GII.4 VLPs and GII.4 HuNoVs. The thermal stability of GII.4 VLPs was studied as previously described[62], with slight modifications. Tubes were filled with 5 µL of 150 mM Tris-HCl pH 8.0, 5 µL of VLPs, with or without acid pH or proteolytic enzyme treatments, and 13 µL of distilled water. Finally, 2 µL of 62X SYPRO Orange solution were added. The tubes were prepared on ice and a control prepared under the same conditions was added to each experiment. Equilibration was performed and fluorescence intensity recorded as previously described[62]. This allowed the Tm values that corresponded to the temperatures at which viral hydrophobic domains became accessible to the hydrophobic probe to be determined. For each condition tested, the Tm values of GII.4 VLPs were obtained in triplicate.

The method used on GII.4 VLPs could not be applied to GII.4 HuNoVs because the viral content of the purified stools was insufficient. A new procedure was therefore implemented to determine the temperature needed to disassemble the GII.4 HuNoV capsids. Following proteolytic enzyme treatments, the samples were placed in a Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) apparatus and heated at different temperatures


A.
Control
Pre-heated
HBGAs
Pepsin
Heating at 95°C
250 kDa
75 kDa
50 kDa
37 kDa
25 kDa
15 kDa
10 kDa
Pepsin
1,500 units /mL
B.
Control
Pre-heated
HBGAs
Trypsin
Heating at 95°C
250 kDa
75 kDa
50 kDa
37 kDa
25 kDa
15 kDa
10 kDa
Trypsin
0.1 mg/mL
C.
Control
Pre-heated
HBGAs
Trypsin
Heating at 95°C
Trypsin
100 mg/mL
D.
Control
Pre-heated
HBGAs
Chymotrypsin
Heating at 95°C
250 kDa
75 kDa
50 kDa
37 kDa
25 kDa
15 kDa
10 kDa
Chymotrypsin
0.1 mg/mL
E.
Control
Pre-heated
HBGAs
Chymotrypsin
Heating at 95°C
Chymotrypsin
100 mg/mL

◂**Figure 5.** SDS-PAGE analyses of native and acid pH- or proteolytic enzyme-treated GII.4 VLPs with salivary HBGAs. **A** GII.4 VLPs with ALe$^+$ after exposure to 1,500 units/mL pepsin at pH 2.0. **B** GII.4 VLPs with ALe$^+$ after exposure to 0.1 mg/mL trypsin at pH 8.0. **C** GII.4 VLPs with ALe$^+$ after exposure to 100 mg/mL trypsin at pH 8.0. **D** GII.4 VLPs with ALe$^+$ after exposure to 0.1 mg/mL chymotrypsin at pH 8.0. **E** GII.4 VLPs with ALe$^+$ after exposure to 100 mg/mL chymotrypsin at pH 8.0. The term "Pre-heated" means that the VLPs were previously heated at 95 °C for 10 min to obtain VP1 prior to the proteolytic enzyme treatments. The term "Heating at 95 °C" means that the VLPs were heated at 95 °C for 10 min just before SDS-PAGE analysis, to dissociate VLPs and remove secondary VP1 structures. The "+" and "−" signs indicate whether or not the treatment was applied. No sign means that no VLPs or HBGAs were present. White spaces indicate the different parts of the same gels. Each condition was tested in triplicate.

(i.e. 37 °C, 60 °C, 65 °C, 70 °C, 75 °C, 80 °C, and 85 °C) for 10 min. RNase A treatment was then applied to a final concentration of 100 µg/mL. Finally, the viral genomes of MS2 bacteriophages and GII.4 HuNoVs were extracted and quantified using RT-qPCR as described above and in the Supplementary Information. The quantity of HuNoV gc was determined in the initial viral suspensions, following treatment at 60 °C (C_0), and at the different temperatures tested using the same treatment (C). For each sample, at least two analyses of HuNoVs were performed.

SDS-PAGE for GII.4 VLPs. GII.4 VLPs treated with an acid pH or proteolytic enzymes were analysed using SDS-PAGE. The effects of enzymatic treatments on VP1 and VLPs were studied. VP1 was obtained from VLPs by heating them in a thermomixer (Thermomixer comfort; Eppendorf, Hamburg, Germany) at 95 °C for 10 min, then placing them on ice.

Following the proteolytic enzyme treatments, GII.4 VLPs were heated for 10 min at 95 °C in order to compare the effects of the treatments on VP1 and VLPs.

GII.4 VLPs were then denatured using SDS and dithiothreitol (DTT) conditions, as previously described, with slight modifications[62]. Aliquots of 20 µL of each denatured sample were loaded onto a discontinuous polyacrylamide gel (4% staking gel, 13% resolving gel). Standard size markers, protein migration, and gel staining were used under the same conditions as previously described[62]. Analyses of each sample were performed in triplicate.

Salivary HBGA types. Saliva samples from healthy adult volunteers were collected. The saliva samples used in this study were previously described, with the approval of the Nantes University Hospital Review Board (study number BRD02/2-P)[59], and informed consent was obtained from all donors. All the experiments using saliva were performed in accordance with the relevant guidelines and regulations. The human saliva was boiled and centrifuged, as previously described[46]. Supernatants were stored at −20 °C until use. The presence of A, B, and O blood group antigens and Lewis antigens in saliva samples at a dilution of 1:1000 in 1× PBS was determined by ELISA, as previously described[63].

Binding of GII.4 VLPs to saliva samples: HBGA-binding ELISA. HBGA-binding ELISA was performed using the method previously described[46], with slight modifications. The modifications involved a negative control. Briefly, saliva samples were treated with 100 mM sodium periodate (prepared in a 50 mM sodium acetate buffer at pH 5) for 40 min at room temperature, and then incubated for 10 min with 1% glycine in 1× PBS.

Optical density values were obtained at 450 nm (OD_{450}) and the results were analysed as previously described[46]. All the samples were analysed in duplicate. Results, expressed in percentages, were calculated by taking the strongest adhesion of GII.4 VLPs as a reference.

Interaction with human saliva prior to proteolytic enzyme treatments. Ten µL of native GII.4 VLPs diluted to 300 µg/mL in a buffer of proteolytic enzyme were incubated with 10 µL of ALe$^+$ saliva sample at 37 °C for 1 h. Then, 8 µL of proteolytic enzymes (i.e. 1,500 units/mL pepsin, 0.1 or 100 mg/mL trypsin, 0.1 or 100 mg/mL chymotrypsin) were added and the samples were stored at 37 °C for 4 h. All results were analysed in triplicate, using SDS-PAGE.

Statistical analysis. All statistical analyses were performed using R statistical software (Rx64 v.3.5.3)[64]. A Shapiro–Wilk test with an alpha level of 0.01 was run, to test the normality of the data. Student's paired and unpaired t-tests were used for dependent and independent data respectively, following a normal distribution. Wilcoxon signed-rank and Mann–Whitney U tests were used for dependent and independent data respectively with non-normal distribution. In all tests, the significance level was set to 0.01.

Data availability

All data analysed in this study are included in this manuscript and the accompanying supplementary information file.

Received: 22 July 2020; Accepted: 6 October 2020
Published online: 21 October 2020

References

1. Kirk, M. D. *et al.* World health organization estimates of the global and regional disease burden of 22 foodborne bacterial, protozoal, and viral diseases, 2010: A data synthesis. *PLoS Med.* **12**, e1001921 (2015).
2. CDC. Surveillance for foodborne disease outbreaks, United States, 2016, Annual Report (2018).
3. European Food Safety Authority (EFSA). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016. EFSA J.15 (2017).
4. Kroneman, A. *et al.* Analysis of integrated virological and epidemiological reports of norovirus outbreaks collected within the foodborne viruses in Europe Network from 1 July 2001 to 30 June 2006. *J. Clin. Microbiol.* **46**, 2959–2965 (2008).
5. Wang, Y.-H. *et al.* Molecular epidemiology of noroviruses in children and adults with acute gastroenteritis in Wuhan, China, 2007–2010. *Arch. Virol.* **157**, 2417–2424 (2012).
6. Vega, E. *et al.* Genotypic and epidemiologic trends of norovirus outbreaks in the United States, 2009–2013. *J. Clin. Microbiol.* **52**, 147–155 (2013).
7. Yu, Y. *et al.* Genetic diversity and distribution of human norovirus in China (1999–2011). *BioMed Res. Int.* **2014**, 1–13 (2014).
8. Ettayebi, K. *et al.* Replication of human noroviruses in stem cell-derived human enteroids. *Science* **353**, 1387–1393 (2016).
9. Van Dycke, J. *et al.* A robust human norovirus replication model in zebrafish larvae. *PLoS Pathog.* **15**, e1008009 (2019).
10. Todd, K. V. & Tripp, R. A. Vero cells as a mammalian cell substrate for human norovirus. *Viruses* **12**, 439 (2020).
11. ISO 15216-1. Microbiology of the food chain—Horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus using real-time RTPCR—Part 1: Method for quantification (2017).
12. ISO 15216-2. Microbiology of the food chain—Horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus using real-time RT-PCR—Part 2: Method for detection (2019).
13. Hutson, A. *et al.* Norwalk virus infection and disease is associated with ABO histo-blood group type. *J. Infect. Dis.* **185**, 1335–1337 (2002).
14. Lindesmith, L. *et al.* Human susceptibility and resistance to Norwalk virus infection. *Nat. Med.* **9**, 548–553 (2003).
15. Marionneau, S. *et al.* Norwalk virus binds to histo-blood group antigens present on gastroduodenal epithelial cells of secretor individuals. *Gastroenterology* **122**, 1967–1977 (2002).
16. Almand, E. A., Moore, M. D. & Jaykus, L.-A. Norovirus binding to ligands beyond histo-blood group antigens. *Front. Microbiol.* **8**, 2549 (2017).
17. Marionneau, S. *et al.* 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 (2001).
18. Huang, P. *et al.* Norovirus and histo-blood group antigens: Demonstration of a wide spectrum of strain specificities and classification of two major binding groups among multiple binding patterns. *J. Virol.* **79**, 6714–6722 (2005).
19. Ruvoën-Clouet, N., Belliot, G. & Pendu, J. L. Noroviruses and histo-blood groups: The impact of common host genetic polymorphisms on virus transmission and evolution. *Rev. Med. Virol.* **23**, 355–366 (2013).
20. Shirato, H. Norovirus and histo-blood group antigens. *Jpn. J. Infect. Dis.* **64**, 95–103 (2011).
21. Tan, M. & Jiang, X. Histo-blood group antigens: A common niche for norovirus and rotavirus. *Expert Rev. Mol. Med.* **16**, e5 (2014).
22. Venkataram Prasad, B. *et al.* Structural basis of glycan interaction in gastroenteric viral pathogens. *Curr. Opin. Virol.* **7**, 119–127 (2014).
23. Dolin, R. *et al.* Biological properties of Norwalk agent of acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med. Soc. Exp. Biol. Med. N. Y. N. Y.* **140**, 578–583 (1972).
24. Hewitt, J. & Greening, G. E. Survival and persistence of norovirus, hepatitis A virus, and feline calicivirus in marinated mussels. *J. Food Prot.* **67**, 1743–1750 (2004).
25. Hirneisen, K. A. & Kniel, K. E. Comparing human norovirus surrogates: Murine norovirus and tulane virus. *J. Food Prot.* **76**, 139–143 (2013).
26. Cannon, J. L. *et al.* 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 (2006).
27. Whitehead, K. & McCue, K. A. Virucidal efficacy of disinfectant actives against feline calicivirus, a surrogate for norovirus, in a short contact time. *Am. J. Infect. Control* **38**, 26–30 (2010).
28. Pogan, R., Dülfer, J. & Uetrecht, C. Norovirus assembly and stability. *Curr. Opin. Virol.* **31**, 59–65 (2018).
29. Ausar, S. F. *et al.* Conformational stability and disassembly of Norwalk virus-like particles. *J. Biol. Chem.* **281**, 19478–19488 (2006).
30. Huo, Y. *et al.* Enzymatic cleavage promotes disassembly of GII.3 norovirus virus like particles and its binding to salivary histo-blood group antigens. *Virus Res.* **240**, 18–24 (2017).
31. Zheng, L. *et al.* Comprehensive characterization of a major capsid protein derived from a documented GII.6 norovirus strain. *Arch. Virol.* **162**, 3863–3868 (2017).
32. Kumar, S. *et al.* Presence of a surface-exposed loop facilitates trypsinization of particles of sinsiro virus, a genogroup II.3 norovirus. *J. Virol.* **81**, 1119–1128 (2007).
33. Spendlove, R. S. & Schaffer, F. L. Enzymatic enhancement of infectivity of reovirus. *J. Bacteriol.* **89**, 597–602 (1965).
34. Tung-Thompson, G. *et al.* Persistence of human norovirus RT-qPCR signals in simulated gastric fluid. *Food Environ. Virol.* **7**, 32–40 (2015).
35. Manuel, C. S. *et al.* Destruction of the capsid and genome of GII.4 human norovirus occurs during exposure to metal alloys containing copper. *Appl. Environ. Microbiol.* **81**, 4940–4946 (2015).
36. White, L. J. *et al.* Biochemical characterization of a smaller form of recombinant Norwalk virus capsids assembled in insect cells. *J. Virol.* **71**, 8066–8072 (1997).
37. Huo, Y. *et al.* Production of norovirus VLPs to size homogeneity. *Virus Res.* **204**, 1–5 (2015).
38. Halperin, T. *et al.* No association between histo-blood group antigens and susceptibility to clinical infections with genogroup II norovirus. *J. Infect. Dis.* **197**, 63–65 (2008).
39. Harrington, P. R. *et al.* 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 (2002).
40. Haga, K. *et al.* Genetic manipulation of human intestinal enteroids demonstrates the necessity of a functional fucosyltransferase 2 gene for secretor-dependent human norovirus infection. *mBio* https://doi.org/10.1128/mBio.00251-20 (2020).
41. Chan, M.C.-W. *et al.* 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 (2011).
42. Murakami, K. *et al.* Norovirus binding to intestinal epithelial cells is independent of histo-blood group antigens. *PLoS ONE* **8**, e66534 (2013).
43. Nordgren, J. *et al.* Norovirus gastroenteritis outbreak with a secretor-independent susceptibility pattern, Sweden. *Emerg. Infect. Dis.* **16**, 81–87 (2010).
44. Carlsson, B. *et al.* The G428A nonsense mutation in FUT2 provides strong but not absolute protection against symptomatic GII.4 norovirus infection. *PLoS ONE* **4**, e5593 (2009).
45. Karangwa, C. K. *et al.* Sequential gastroenteritis outbreaks in a single year caused by norovirus genotypes GII.2 and GII.6 in an institutional setting. *Open Forum Infect. Dis.* https://doi.org/10.1093/ofid/ofx236 (2017).

46. Robin, M. *et al.* Effect of natural ageing and heat treatments on GII.4 norovirus binding to histo-blood group antigens. *Sci. Rep.* **9**, 1–11 (2019).
47. da Silva, A. K. *et al.* Adsorption and aggregation properties of norovirus GI and GII virus-like particles demonstrate differing responses to solution chemistry. *Environ. Sci. Technol.* **45**, 520–526 (2011).
48. Dykeman, E. C. *et al.* Packaging signals in two single-stranded RNA viruses imply a conserved assembly mechanism and geometry of the packaged genome. *J. Mol. Biol.* **425**, 3235–3249 (2013).
49. Snijder, J. *et al.* Probing the biophysical interplay between a viral genome and its capsid. *Nat. Chem.* **5**, 502–509 (2013).
50. Bertrand, I. *et al.* Quantification of Giardia transcripts during in vitro excystation: Interest for the estimation of cyst viability. *Water Res.* **43**, 2728–2738 (2009).
51. Borgström, B. *et al.* Studies of intestinal digestion and absorption in the human. *J. Clin. Invest.* **36**, 1521–1536 (1957).
52. Hardy, M. E. *et al.* Specific proteolytic cleavage of recombinant Norwalk virus capsid protein. *J. Virol.* **69**, 1693–1698 (1995).
53. Jung, J. *et al.* High-resolution cryo-EM structures of outbreak strain human norovirus shells reveal size variations. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **116**, 12828–12832 (2019).
54. Green, K. Y. *et al.* Comparison of the reactivities of baculovirus-expressed recombinant Norwalk virus capsid antigen with those of the native Norwalk virus antigen in serologic assays and some epidemiologic observations. *J. Clin. Microbiol.* **31**, 2185–2191 (1993).
55. Kilic, T. *et al.* Structural basis for human norovirus capsid binding to bile acids. *J. Virol.* **93**, e01581-e1618 (2018).
56. Graziano, V. R. *et al.* Norovirus attachment and entry. *Viruses* **11**, 495 (2019).
57. Almand, E. A. *et al.* Characterization of human norovirus binding to gut-associated bacterial ligands. *BMC Res. Notes* **12**, 607 (2019).
58. Miura, T. *et al.* Histo-blood group antigen-like substances of human enteric bacteria as specific adsorbents for human noroviruses. *J. Virol.* **87**, 9441–9451 (2013).
59. de Rougemont, A. *et al.* Qualitative and quantitative analysis of the binding of GII.4 norovirus variants onto human blood group antigens. *J. Virol.* **85**, 4057–4070 (2011).
60. Ayouni, S. *et al.* Relationship between GII.3 norovirus infections and blood group antigens in young children in Tunisia. *Clin. Microbiol. Infect.* **21**, 874.e1-874.e8 (2015).
61. Brié, A. The effect of heat on the physicochemical properties of bacteriophage MS2. *Food Environ. Virol.* **8**, 251–261 (2016).
62. Loison, P. *et al.* Impact of reducing and oxidizing agents on the infectivity of Qβ phage and the overall structure of its capsid. *FEMS Microbiol. Ecol.* https://doi.org/10.1093/femsec/fiw153 (2016).
63. Huang, P. *et al.* 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 (2003).
64. R Core Team. *R: A language and environment for statistical computing* (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, 2019).

Acknowledgements
The results of this study were obtained under the aegis of OxyVir, a project funded by the European Maritime and Fisheries Fund (EMFF). This study was also supported by the ACTIA VIROcontrol Joint Technological Unit.

Author contributions
C.G. and N.B. designed the study. M.C. and M.R. performed the experiments. M.C. and C.G. analysed the data. M.C., N.B., D.M., and C.G. wrote the manuscript. M.C. and C.G. prepared the figures. All authors reviewed the manuscript.

Competing interests
The authors declare no competing interests.

Additional information
Supplementary information is available for this paper at https://doi.org/10.1038/s41598-020-74728-z.

Correspondence and requests for materials should be addressed to C.G.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/.

© The Author(s) 2020

II. Évolution de l'interaction entre les norovirus et les HBGA au cours de l'inactivation virale

1. Évolution des interactions avec les HBGA au cours du vieillissement naturel

L'objectif consistait ici à étudier l'effet du vieillissement naturel sur la capacité de fixation des VLP GII.4 et des NoV GII.4 par les HBGA salivaires mais aussi sur l'intégrité de la capside.

L'effet du vieillissement naturel des VLP GII.4 sur la capacité d'adhésion spécifiques aux HBGA salivaires de type OLe^+ (*i.e.* salive pour laquelle la plus grande affinité avec les VLP GII.4 a été obtenue) a été étudié à 20°C pendant 105 jours à deux forces ioniques différentes (*i.e.* PBS à 10 mM et 150 mM). Pour tous les essais, un témoin négatif a été introduit en utilisant des HBGA traités au periodate de sodium (*i.e.* clivage des cycles osidiques des HBGA). L'adhésion des VLP aux HBGA a été déterminée par des méthodes de type *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA). Une diminution progressive de la capacité de fixation des HBGA par les VLP a été observée au cours du temps avec une perte totale de reconnaissance après 63 et 70 jours à faible (PBS à 10 mM) et forte (PBS 150 mM) force ionique, respectivement. Ces résultats soulignaient que le vieillissement naturel induisait des modifications au niveau de la capside, en affectant notamment l'intégrité de la BP. Une différence de la magnitude de l'adhésion a été observée en fonction de la force ionique pour les 63 premiers jours. Elle était en effet plus importante lorsque la force ionique était à 150 mM. En normalisant les résultats pour les deux forces ioniques (*i.e.* rapport entre les VLP non traitées et celles ayant subi un vieillissement à un instant *t*), la réduction de l'interaction entre les VLP GII.4 et les HBGA était similaire au cours du vieillissement naturel à 20°C. Ainsi, la force ionique semble influencer la magnitude de l'adhésion sans impacter la spécificité de l'adhésion.

L'effet du vieillissement naturel à 20°C sur la capacité de reconnaissance des HBGA par des NoV GII.4 complets et purifiés à partir de selles humaines fraîches a été suivi pendant 294 jours à faible force ionique (*i.e.* PBS à 10 mM). Les NoV GII.4 ont été quantifiés par RT-qPCR après un traitement à la RNase A pour éliminer le génome « libre » ou accessible à cette enzyme. Sans adhésion préalable des NoV aux HBGA, aucune différence significative n'a été observée entre la quantité de génome de NoV retrouvée au temps 0 et après 294 jours. Ce résultat suggère une persistance de l'intégrité de la capside virale car les génomes de NoV n'ont pas été dégradés par la RNase A. Après adhésion préalable des NoV aux HBGA, aucune différence significative n'a été observée jusqu'à 154 jours de vieillissement naturel puisque la quantité de génome

quantifiée oscillait entre 4,5 à 5,2 log_{10}. En revanche, entre 154 et 294 jours de vieillissement, une réduction de 1,2 log_{10} dans la capacité d'adhésion des HBGA aux NoV était observée.

En conclusion, les VLP GII.4 sont plus sensibles au vieillissement naturel que les NoV GII.4 car le temps nécessaire pour obtenir une réduction de 2,0 log_{10} (T_{99}) dans l'adhésion des HBGA aux NoV a été estimé entre 63 et 77 jours pour les VLP et à 333 jours pour les NoV. Considérant le rôle potentiel de co-récepteur, l'interaction avec les HBGA pourrait témoigner à minima de l'intégrité de la capside virale. Brièvement, les résultats ont mis en évidence que la fixation spécifique des NoV aux HBGA permettait de sélectionner les virus possédant encore des capsides structurées. Cependant, cette approche présente certaines limites lorsque les traitements induisent des modifications mineures au niveau de la capside, suggérant que la perte de la fixation des HBGA par les capsides ne puisse pas toujours être corrélée à la perte du caractère infectieux des NoV

2. Évolution des interactions avec les HBGA au cours d'un traitement thermique

Les VLP GII.4 ont été traitées à différentes températures (*i.e.* 50°C, 60°C et 72°C) pendant 30 min. L'interaction des VLP avec les HBGA salivaires de type OLe^+ a été évaluée par ELISA. La structure globale des VLP a été évaluée par MET. Aucune réduction dans l'adhésion des HBGA n'a été observée après un traitement à 50°C et 60°C pendant 30 min. En revanche à 72°C, la fixation des HBGA aux VLP était réduite de manière significative après 3 min. Aucune adhésion n'était observée après 10 min de traitement. Ces résultats ont été confirmés par MET puisque les VLP étaient toujours observables après traitements à 50°C et à 60°C pendant 10 min. Tandis qu'après un traitement à 72°C pendant 10 min, plus aucune VLP n'était visible.

Dans les mêmes conditions que les VLP GII.4, les NoV GII.4 complets et purifiés à partir de selles humaines fraîches ont été traités à la chaleur (*i.e.* 50°C, 60°C, et 72°C) pendant 30 min. Contrairement aux VLP, les NoV ont été quantifiés par RT-qPCR après un traitement à la RNase. Les résultats entre les VLP et les NoV étaient similaires car aucune différence notable n'était observée concernant la capacité d'adhésion des HBGA par les NoV traités à 50°C et 60°C pendant 30 min. En revanche, pour les NoV traités à 72°C, une réduction significative de l'adhésion aux HBGA était observée après 2 min de traitement pour aller jusqu'à une perte totale de reconnaissance au-delà de 3 min de traitement.

En conclusion, ces résultats laissent suggérer l'existence d'une température critique comprise entre 60°C et 72°C pour laquelle la capside virale serait altérée ou dénaturée. En dessous de cette température critique, des modifications mineures de la capside peuvent avoir lieu sans impacter l'interaction avec les HBGA ni l'aspect des particules au MET. Enfin, ces nouvelles données sont cohérentes avec les données de la littérature.

www.nature.com/scientificreports

SCIENTIFIC REPORTS
nature research

OPEN

Effect of natural ageing and heat treatments on GII.4 norovirus binding to Histo-Blood Group Antigens

Maëlle Robin[1], Manon Chassaing[1,2], Julie Loutreul[1], Alexis de Rougemont[3,4], Gaël Belliot[3,4], Didier Majou[5], Christophe Gantzer[2] & Nicolas Boudaud[1]*

Human noroviruses (HuNoVs) are the leading cause of viral foodborne outbreaks worldwide. To date, no available methods can be routinely used to detect infectious HuNoVs in foodstuffs. HuNoVs recognize Histo-Blood Group Antigens (HBGAs) through the binding pocket (BP) of capsid protein VP1, which promotes infection in the host cell. In this context, the suitability of human HBGA-binding assays to evaluate the BP integrity of HuNoVs was studied on GII.4 virus-like particles (VLPs) and GII.4 HuNoVs during natural ageing at 20 °C and heat treatments. Our results demonstrate that this approach may reduce the over-estimation of potential infectious HuNoVs resulting from solely using the genome detection, even though some limitations have been identified. The specificity of HBGA-binding to the BP is clearly dependent on the HGBA type (as previously evidenced) and the ionic strength of the media without disturbing such interactions. This study also provides new arguments regarding the ability of VLPs to mimic HuNoV behavior during inactivation treatments. The BP stability of VLPs was at least 4.3 fold lower than that of HuNoVs at 20 °C, whereas capsids of both particles were disrupted at 72 °C. Thus, VLPs are relevant surrogates of HuNoVs for inactivation treatments inducing significant changes in the capsid structure.

Human noroviruses (HuNoVs), responsible for acute gastroenteritis, are the leading cause of viral foodborne outbreaks in Europe and USA each year[1,2]. HuNoVs, which belong to the family *Caliciviridae*, are mainly genogroup I (GI) and II (GII) NoVs which are subdivided into several genotypes[3]. Genogroup II, genotype 4 (GII.4) NoV is the most prevalent, and has been causing for about 70% of outbreaks since 2002[4]. Infected individuals release high concentrations of HuNoVs in their feces, ranging from 10^6 to 10^9 genome copies (gc)/gram of stools over a 4- to 8-week period[5]. The infectious dose for HuNoVs has not been clearly defined yet. For Norwalk virus (NV), the 50% human infectious dose (HID_{50}) was estimated between 18 and 2,800 genomic equivalents for secretor individuals and by considering the viral aggregation[6,7]. Thus, high viral shedding in the environment combined with a relatively low HID_{50} contributes to promote HuNoV transmission to the human population. HuNoVs are transmitted through the fecal-oral route, either directly by close contact with infected people or indirectly through consumption of contaminated water and food[8].

HuNoVs are non-enveloped viruses (about 40 nm in diameter) with a capsid of icosahedral symmetry, and a single-stranded positive-sense RNA (~7,500 nucleotides) containing three open reading frames (ORFs). ORF1 encodes non-structural proteins while ORF2 and ORF3 encode for the major (VP1) and the minor (VP2) capsid proteins, respectively. The capsid is composed of 180 copies of VP1 assembled into 90 dimers and few copies of VP2. VP1 is organized into two domains, the shell domain (S) and the protruding domain (P) which is subdivided into P1 and P2 subdomains[9].

The occurrence of HuNoV foodborne outbreaks underlines that these viruses can remain infectious for a substantial time in the environment[10–12]. The food vehicles most commonly involved in HuNoV foodborne outbreaks

[1]Actalia, Food Safety Department, F-50000, Saint-Lô, France. [2]LCPME, UMR 7564 CNRS, University of Lorraine, F-54601, Villers-lès-Nancy, France. [3]National Reference Center for Gastroenteritis Viruses, Laboratory of Virology, University Hospital of Dijon, Dijon, F-21000, France. [4]UMR PAM A 02.102 Food and Microbiological Processes, University of Bourgogne Franche-Comté/AgroSup Dijon, Dijon, F-21000, France. [5]ACTIA, F-75231, Paris Cedex 05, Cedex, France. *email: n.boudaud@actalia.eu

are raw and minimally processed foods (e.g. bivalve molluscan shellfish, fresh vegetables, drinking water). Even though no regulation exists in Europe for the management of HuNoVs, their detection in foodstuffs put on the market is on the rise for the last few years. This trend is related to the publication of the ISO 15216-1 standard in 2013, allowing the genome detection of HuNoVs in vulnerable foodstuffs[13]. Based on representative sampling, the prevalence of HuNoV genomes ranges from 9.0% to 71.6% in shellfish and from 5.0% to 28.2% in fresh produce[14]. Although its interest is unquestionable for viral outbreak investigations, the routine use of this ISO standard[13] for surveillance in foodstuffs has limitations due to its inability to discriminate infectious from non-infectious particles when HuNoV genomes are detected[15]. This drawback is related to the fact that HuNoVs cannot be routinely cultivated in laboratories, despite recent advances for the *in vitro* replication of few strains of HuNoVs using human intestinal enteroids[16]. From our point of view, it is important to underline that even if the cellular models of HuNoVs were mastered by control laboratories over the coming years, this approach would not be suitable for routine food testing owing to its complexity, high cost, and time-consumption.

In this context, it becomes necessary to develop a suitable molecular method for discriminating infectious from non-infectious HuNoVs in food and water in order to (*i*) enable better management of the viral hazard and (*ii*) improve the effectiveness of risk management strategies in industries. To solve this critical issue, numerous strategies have been implemented over the past two decades. Firstly, a number of cultivable enteric viruses were used as HuNoV surrogates to assess the virucidal effect of disinfection treatments applied in food and water industries. Among HuNoV surrogates, feline calicivirus, murine NoV (MNV), Tulane virus (TV), and F-specific RNA bacteriophages (FRNAPH) are commonly used[8,17,18]. VLPs of HuNoVs are also used as well[8,19,20]. They are morphologically and immunologically similar to the native virions[21,22].

Secondly, several methods have been proposed to discriminate infectious from non-infectious HuNoVs such as (*i*) the detection of the whole genome[23], (*ii*) the use of enzymatic pre-treatments or intercalating dyes before genome detection[24,25], and (*iii*) the detection of oxidative damages on the capsid[26]. The use of receptor binding to assess the capsid integrity is another promising approach[27–29]. Several studies have demonstrated that Histo-Blood Group Antigens (HBGAs) display a role of receptors or co-factors for HuNoVs which promote the infection in host cells[30–33]. HBGAs are complex carbohydrates linked to glycolipids or glycoproteins found on the red blood cells and mucosal epithelial cells. They can also be present as free antigens in biological fluids such as saliva[34]. The biosynthesis of HBGAs is governed by the ABO and the fucosyl-transferase *FUT2* and *FUT3* gene families[34,35]. The expression of active or non-active *FUT2* defines the secretor or non-secretor status, respectively[32,35].

The HuNoV-binding site to HBGAs is located in a region of the P2 subdomain of VP1 called "binding pocket" (BP)[36]. Interactions between HuNoVs and HBGAs have been described to be very specific with multiple binding patterns and variable relative affinities[34,37,38]. Thus, the human susceptibility to HuNoV infection is dependent on both polymorphic HBGA expression and HuNoV genotype[30,33,39,40]. According to these findings, some authors have made the assumption that only HuNoV particles able to bind the HBGAs would infect host cells, and thus potentially allowing discrimination infectious from non-infectious particles[41].

The aim of this study was to investigate the ability of GII.4 VLPs to mimic the HuNoV behavior and the suitability of the HBGA-binding assays to avoid the over-estimation of potential infectious HuNoV number given by genome detection during natural ageing at 20 °C over time and heat treatments (50 °C, 60 °C, and 72 °C) by using the most prevalent HuNoV genotype worldwide (i.e. GII.4). First, the capsid integrity of GII.4 VLPs was studied during these inactivation treatments using receptor-binding enzyme linked immunosorbent assays (ELISA) and transmission electronic microscopy (TEM). The influence of the ionic strength of the medium on VLP binding to HBGAs was explored to assess the VLP stability and the nature of interactions between VLPs and HBGAs. Then, the HBGA-binding capacity of intact GII.4 HuNoVs extracted from human stools was evaluated using HBGA-binding followed by RNA amplification by quantitative RT-PCR (RT-qPCR) under the same conditions as those used with GII.4 VLPs. Finally, we compared the representativeness of using VLPs as HuNoV surrogates for a same genotype during inactivation treatments. We also discussed the benefits of using HBGA-binding assays to assess the capsid integrity and the suitability of this strategy to indicate the infectivity of HuNoVs after inactivation treatments.

Results

Binding profile of GII.4 VLPs to saliva samples. HBGA types were determined for the 27 human saliva samples by ELISA and were distributed as follows: non-secretor phenotypes (5/27; 18.5%), A Lewis-negative (ALe^-) (1/27; 3.70%), A Lewis-positive (ALe^+) (8/27; 29.6%), BLe^- (1/27; 3.70%), BLe^+ (4/27; 14.8%), and OLe^+ (8/27; 29.6%). OLe^- type was not found in the tested saliva samples. This distribution is consistent with the prevalence of 20% of non-secretor individuals in the Caucasian population[37].

The binding profile of GII.4 VLPs to all saliva samples was performed using HBGA-binding ELISA (see Supplementary Fig. S1). Based on the optical density (OD_{450}) values obtained under the same conditions, VLPs recognized all HBGAs from secretor individuals (22/27; 81.5%). Conversely, no VLP binding was observed for the five non-secretor saliva samples (positive/negative (P/N) ratio < 2). These results are consistent with published data[22,37]. Nevertheless, variable relative affinities were highlighted regarding interactions between VLPs and saliva samples from secretor individuals. This could be explained by the amount of HBGAs in each saliva[37]. The extent of VLP binding was particularly high for one secretor saliva corresponding to OLe^+ type ($OD_{450} = 0.625$ at 1 µg/mL of GII.4 VLPs). Consequently, this sole saliva sample was used for all experiments performed in this study to evaluate the effect of natural ageing at 20 °C and heat treatments (50 °C, 60 °C, and 72 °C) on the NoV binding capacity.

Sensitivity and linearity of the HBGA-binding ELISA. The sensitivity and the linearity of the HBGA-binding ELISA method was investigated using OLe^+ saliva and various concentrations of GII.4 VLPs ranging from 0.05 and 10.0 µg/mL in 10 mM and 150 mM PBS solutions (see Supplementary Fig. S2). The limit

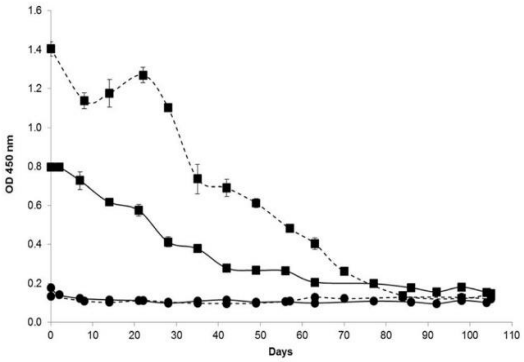


Figure 1. GII.4 VLP binding to OLe$^+$ saliva after exposure to natural ageing at 20 °C under low (10 mM PBS) and high (150 mM PBS) ionic strength conditions. The OD_{450} values of purified GII.4 VLPs were obtained by HBGA-binding ELISA in 10 mM solution (solid line) and 150 mM PBS solution (dashed line). Squares (■) and circles (●) represent the VLP binding to untreated and sodium periodate-treated OLe$^+$ human saliva, respectively. Each data point represents the mean OD_{450} values of four replicates and error bars indicate standard deviations. Paired and unpaired Student's *t*-test was used to compare groups.

of detection (LOD) was estimated at 0.10 µg/mL of GII.4 VLPs because the P/N ratio was lower than 2 below this threshold value under the two ionic strength conditions. The relationship between OD_{450} and the VLP concentration was not linear in the whole range especially above a threshold value corresponding at 1.00 µg/mL, due to the concentration of anti-GII.4 VLP monoclonal antibody (MAb) which becomes limiting. In tested conditions for natural ageing and heat treatments (10.0 µg/mL of GII.4 VLPs), the first $\log_{10}$ reduction of HBGA-binding does not have a substantial impact on the OD_{450} values. Conversely, the first 2 $\log_{10}$ reductions lead to a decrease of OD_{450} values until the LOD. So, we considered that 2 $\log_{10}$ reductions (T_{99}) were obtained when OD_{450} values were equal to the LOD.

Effect of natural ageing at 20 °C and heat treatments on the GII.4 VLP binding to human HBGAs and on the capsid integrity. The effect of natural ageing at 20 °C over 105 days under two ionic strength conditions (10 mM and 150 mM PBS solutions) on GII.4 VLP binding to OLe$^+$ saliva is shown in Fig. 1. For each assay, a sodium periodate treatment on OLe$^+$ saliva was added as a negative control to check the specificity of VLP-HBGA interactions. For all trials, no VLP binding was observed after sodium periodate treatment ($OD_{450} < 0.200$) due to the oxidative cleavage of saccharide rings[42]. According to the OD_{450} values, a progressive reduction in VLP binding to OLe$^+$ saliva was observed over time until reaching a complete loss of binding capacity after 63 and 70 days under low (10 mM PBS) and high (150 mM PBS) ionic strength conditions, respectively (P/N ratio < 2). From these days, the LOD was reached, consequently, 2 $\log_{10}$ reductions of the OD_{450} values were obtained. Under the high ionic strength condition, no significant difference was observed after 70 days between untreated and sodium periodate-treated samples (paired sample *t*-test, $p > 0.26$). Under the low ionic strength condition, after 63 days, differences between untreated and sodium periodate-treated saliva samples appeared at the limit of significance (paired sample *t*-test, $p < 0.0021$). Based on the GII.4 VLP binding profiles, natural ageing at 20 °C affects gradually the BP integrity. However, changes in the magnitude of the binding profile were highlighted as a function of the ionic strength. For the first 63 days, the relative affinity of the VLP binding was significantly higher at high ionic strength compared to low ionic strength (unpaired sample *t*-test, $p < 10^{-4}$). Between 70 and 98 days, the VLP binding was low and statistically different between the two ionic strength conditions (unpaired sample *t*-test, $p < 10^{-3}$). After 105 days, no statistically significant difference was observed between the two ionic strength conditions (unpaired sample *t*-test, $p > 0.25$).

To better evaluate the influence of the ionic strength on GII.4 VLP binding to OLe$^+$ saliva, the OD_t/OD_0 ratio was determined in 10 mM and 150 mM PBS solutions (Fig. 2). Similar trends were observed regarding the reduction in VLP binding during natural ageing at 20 °C. No significant difference was observed between the two ionic strength conditions after 14, 35, 56, and 63 days (unpaired sample *t*-test, $p > 0.07$). For the others points, significant differences appeared (unpaired sample *t*-test, $p < 0.01$). The ionic strength of the medium seems to influence the magnitude of the binding profile but without disturbing the specificity of VLP-HBGA interactions. Consequently, the binding profiles of GII.4 VLPs to OLe$^+$ saliva after inactivation by heating were only performed under the high ionic strength condition.

The $\log_{10}$ reductions in GII.4 VLP binding to OLe$^+$ saliva after exposure to heat treatments (50 °C, 60 °C, and 72 °C) for 30 min were represented by the log (OD_t/OD_0) at 450 nm (Fig. 3). A sodium periodate treatment was also introduced as a negative control for all assays (data not shown). No significant reduction in the VLP binding was observed after heating at 50 °C and 60 °C for 30 min (paired sample *t*-test, $p > 0.05$). The behavior of VLP binding was not statistically different for these two heat treatments (unpaired sample *t*-test, $p > 0.2$). Because of the non-linear relationship between OD_{450} values and GII.4 VLP concentration, it is only possible to consider that after 30 min at 50 °C and 60 °C, the reduction of the VLP binding to OLe$^+$ saliva is lower than 1 $\log_{10}$. Conversely, a significant reduction in the VLP binding was observed at 72 °C for the first 3 min until reaching a complete loss

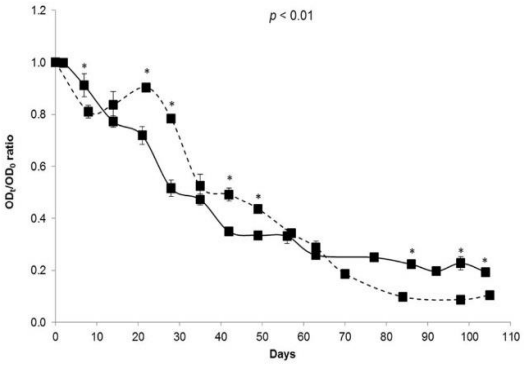


Figure 2. Decay of GII.4 VLP binding to OLe$^+$ saliva after exposure to natural ageing at 20 °C under low and high ionic strength conditions. The solid and dashed lines represent purified GII.4 VLP binding to untreated saliva under low (10 mM PBS) and high (150 mM PBS) ionic strength conditions, respectively. The OD$_t$/OD$_0$ ratio was determined by dividing the mean OD$_{450}$ values obtained by HBGA-binding ELISA at each time point (OD$_t$) by the mean OD$_{450}$ values obtained at day 0 (OD$_0$). Each data point represents the mean OD$_{450}$ values of four replicates and error bars indicate standard deviations. Unpaired Student's *t*-test was used to compare the two groups.

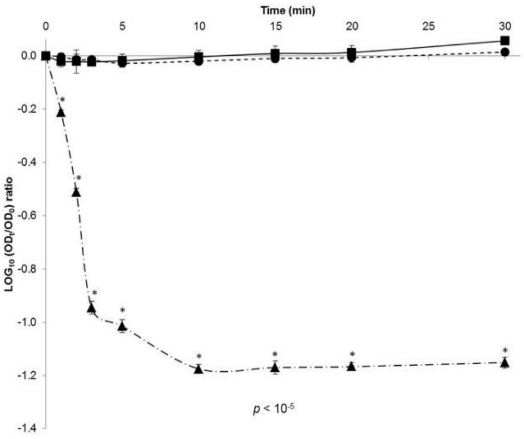


Figure 3. Decay of GII.4 VLP binding to OLe$^+$ saliva after exposure to heat treatments under high ionic strength condition (150 mM PBS). Squares (■, solid line), circles (●, dotted line), and triangles (▲, dot-and-dash line) represent purified GII.4 VLP binding to untreated OLe$^+$ human saliva after heating at 50 °C, 60 °C, and 72 °C for 30 min, respectively. The log (OD$_t$/OD$_0$) values were determined by dividing the mean OD$_{450}$ values obtained by HBGA-binding ELISA at each time point (OD$_t$) by the mean OD$_{450}$ values obtained at time 0 (OD$_0$). Each data point corresponds to the mean OD$_{450}$ values of triplicates and error bars indicate standard deviations. Paired and unpaired Student's *t*-test was used to compare groups.

of the OD$_{450nm}$ detection after 10 min (paired sample *t*-test, $p < 10^{-5}$). After 2 min at 72 °C, 2 log$_{10}$ reductions were achieved because OD$_{450}$ values were equal to the LOD. According to the log$_{10}$ reduction profiles, temperatures below 60 °C for 30 min affect slightly the BP integrity whereas 72 °C can be considered as a critical temperature which disturbs the BP from the early stage of treatment.

TEM observations were performed to evaluate the influence of heat treatments on the overall structure of GII.4 VLPs (Fig. 4). Similar structures were observed for native and treated VLPs after heating at 50 °C and 60 °C for 10 min, supporting structural integrity of the capsid. Conversely, no VLP was observed after heating at 72 °C for 10 min, suggesting disruption and/or denaturation of the capsid. Two different sizes (15 and 40 nm) of GII.4 VLP populations were distinguished at 50 °C and 60 °C. Particles of 15 and 40 nm are respectively formed of 60 and 180 copies of VP1 which are described to be morphologically and antigenically similar[43]. According to these data, TEM results are consistent with the log$_{10}$ reduction profiles of the VLP binding after heat treatments.

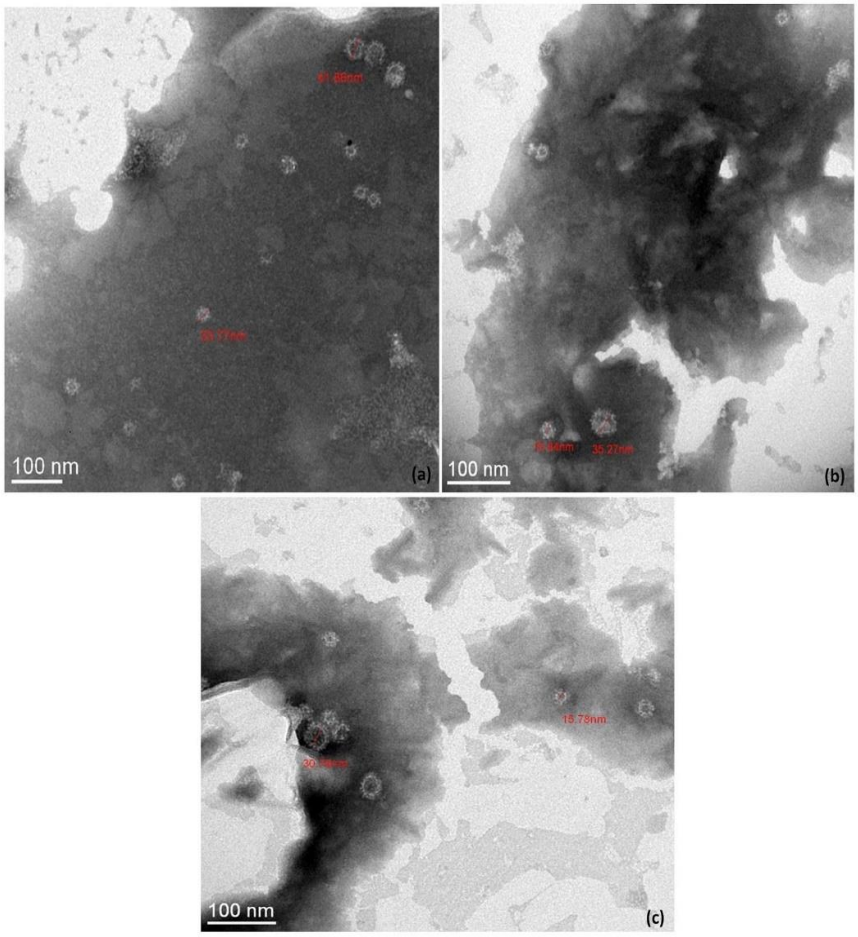


Figure 4. TEM observations of native and heat-treated GII.4 VLP capsids after negative staining. (**a**) Native GII.4 VLPs, **(b)** GII.4 VLPs after exposure at 50 °C for 10 min, and **(c)** GII.4 VLPs after exposure at 60 °C for 10 min. No GII.4 VLP was observed by TEM after heating at 72 °C for 10 min. The scale bar is at the bottom left of each picture.

Effect of natural ageing at 20 °C and heat treatments on the GII.4 HuNoV binding to human HBGAs and on the viral genome. The decay curves of the GII.4 HuNoV genomes treated with ribonuclease A (RNase A) and the binding capacity of viral particles to OLe^+ saliva with or without sodium periodate treatment after exposure to natural ageing at 20 °C for 294 days in 10 mM PBS solution are shown in Fig. 5. No significant reduction in the RNase-treated genomes of HuNoVs was observed during the whole treatment ($<1.2\ \log_{10}$) (paired sample *t*-test, $p > 0.05$) suggesting the persistence of potentially intact capsids because the genomes were not accessible to RNase A. Based on linear regression, the T_{90} was estimated at 294 days. During the whole treatment, a fraction of purified HuNoVs (mainly ranging between the LOD and the limit of quantification (LOQ) of the method) were able to bind to OLe^+ saliva treated with sodium periodate, suggesting non-specific interactions between capsids and denatured HBGAs. Concerning GII.4 HuNoV binding to untreated OLe^+ saliva, no significant variation was observed for the first 154 days with genome detection rates ranging from 4.50 to 5.20 $\log_{10}$ (paired sample *t*-test, $p > 0.05$). A 1.2 $\log_{10}$ reduction in the binding capacity was shown between day 154 and day 294, achieving almost the LOQ determined at 1,000 gc/mL (paired sample *t*-test, $p < 0.03$). Based on linear regression over the whole time period, the T_{90} was estimated at 166 days.

As performed for GII.4 VLPs under the same conditions, the $\log_{10}$ reductions in GII.4 HuNoV binding to OLe^+ saliva after exposure to heat treatments (50 °C, 60 °C, and 72 °C) for 30 min were determined using the log (C/C_0) (Fig. 6). A sodium periodate treatment was also added as a negative control for all assays (data not shown). No significant reduction in the binding capacity was observed after heating at 50 °C and 60 °C for 30 min (paired sample *t*-test, $p > 0.05$). Conversely, a statistically significant reduction was shown at 72 °C after 2 min until a complete loss of the genome detection after 3 min (paired sample *t*-test, $p < 10^{-3}$). As described for VLPs, temperatures below 60 °C for 30 min affect slightly the BP, whereas 72 °C seems to impair the BP integrity. Interestingly,

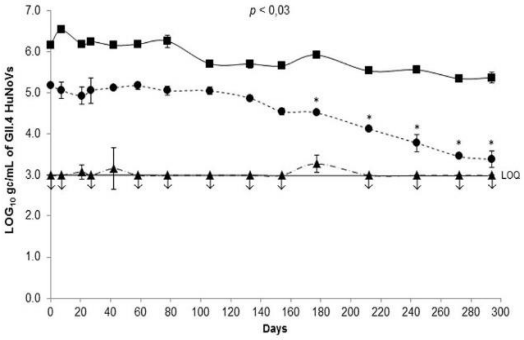


Figure 5. Persistence of GII.4 HuNoV genomes and GII.4 HuNoV binding to OLe$^+$ saliva after exposure to natural ageing at 20 °C under low ionic strength condition (10 mM PBS). Quantification of purified GII.4 HuNoV gc was obtained by HBGA-binding assays followed by RNA amplification by RT-qPCR. Squares (■, solid line) represent GII.4 HuNoV gc/mL treated with RNase. Circles (●, dotted line) and triangles (▲, dot-and-dash line) represent GII.4 HuNoV gc/mL quantified after capsid binding to untreated and sodium periodate-treated OLe$^+$ human saliva, respectively. Each data point is an average of two replicates and error bars indicate standard deviations. Arrows (↓) represent data below the LOQ but above the LOD. The LOD and LOQ were respectively 200 and 1,000 gc/mL of purified GII.4 HuNoVs. Paired Student's *t*-test was used to compare groups.

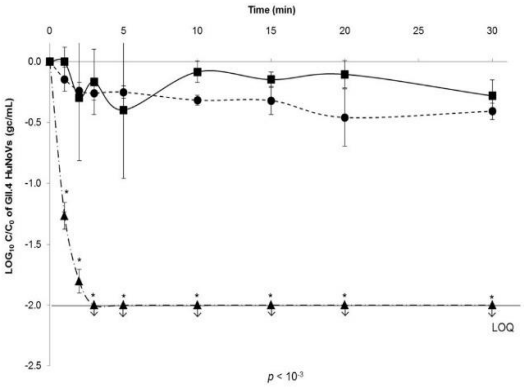


Figure 6. Decay of GII.4 HuNoV binding to OLe$^+$ saliva after exposure to heat treatments under high ionic strength condition (150 mM PBS). Squares (■, solid line), circles (●, dotted line), and triangles (▲, dot-and-dash line) represent purified GII.4 HuNoV binding to untreated OLe$^+$ human saliva after heating at 50 °C, 60 °C, and 72 °C for 30 min, respectively. The log (C/C_0) values were calculated by dividing the mean GII.4 HuNoV gc/mL values obtained by HBGA-binding assays followed by RNA amplification by RT-qPCR at each time point (C_t) by the mean GII.4 HuNoV gc/mL values obtained at time 0 (C_0). Each data point is an average of three replicates and error bars indicate standard deviations. Arrows (↓) represent data below the LOQ but above the LOD. The LOD and LOQ were 200 and 1,000 gc/mL of purified GII.4 HuNoVs, respectively. Paired Student's *t*-test was used to compare groups.

the behavior of viral capsids of GII.4 VLPs and HuNoVs seems to be similar after heat treatments in the tested conditions (Figs 3 and 6). Depending on the contact time, a critical temperature above which the viral capsid is disrupted, could be given between 60 °C and 72 °C.

Comparison of the loss of GII.4 VLP and HuNoV binding to OLe$^+$ saliva after inactivation treatments. Because of the absence of linear relationship between OD_{450} values and the content of GII.4 VLPs, the time to reach the first 2 $\log_{10}$ reductions of HBGA-binding (T_{99}) was used to compare the loss of GII.4 VLP and HuNoV binding to OLe$^+$ saliva after natural ageing at 20 °C and heating at 72 °C (Table 1). For VLPs, T_{99} values were estimated between T_0 (10 µg/mL) and the first time point when the LOD was reached (0.1 µg/mL). For HuNoVs, T_{99} values were derived from the slope of the linear regression analysis. After natural ageing at 20 °C, the T_{99} value of HuNoVs (333 days) is at least 4.3 fold higher than that of VLPs (ranging between 63 and 77 days) under the low ionic strength condition, demonstrating a different behavior of GII.4 VLPs and HuNoVs.

Inactivation treatments	T_{99} values (days)	
	GII.4 VLPs	GII.4 HuNoVs
72 °C (150 mM PBS)	[0.001–0.002]	0.002
Natural ageing (10 mM PBS)	[63–77]	333
Natural ageing (150 mM PBS)	[70–84]	ND

Table 1. Time to achieve 2 $\log_{10}$ reductions of HBGA-binding (T_{99}) for GII.4 VLPs and HuNoVs after inactivation treatments. For GII.4 VLPs, T_{99} values were estimated between T_0 (10 µg/mL) and the first time point when the LOD was reached (0.1 µg/mL) for the inactivation treatments that led to at least 2 $\log_{10}$ reductions. For GII.4 HuNoVs, T_{99} values were derived from the slope of the linear regression analysis during the whole duration of inactivation treatments, excepted after heating at 72 °C for which the linear relationship was comprised between 0 and 2 min. ND: non determined.

Considering the similarity of the T_{99} values of VLPs at 10 mM and 150 mM PBS solutions, this result reinforces the fact that the ionic strength of the medium does not disturb the specificity of VLP-HBGA interactions. After heating at 72 °C, the T_{99} values were similar for GII.4 HuNoVs and VLPs and estimated at 0.002 days and ranging between 0.001 and 0.002 days, respectively.

Discussion

For the past two decades, many studies have tried to develop the most reliable strategy to distinguish infectious from non-infectious HuNoVs in foodstuffs and in the environment with the aim to improve the management of HuNoV hazard but also to better assess the effectiveness of inactivation treatments. These efforts have increased even more since the publication of the ISO 15216-1 standard[13] in 2013 because of its inability to provide information about HuNoV infectivity when their genome is detected in vulnerable foodstuffs in prospective approaches such as surveys. Among all those proposed, the strategy based on the receptor/co-factor (HBGAs) binding to the BP to assess the capsid integrity of HuNoVs appeared promising[28,41]. The first objective of this study was to evaluate the ability of VLPs to mimic the behavior of HuNoVs for a same genotype (i.e. GII.4) during inactivation treatments. The second objective was to highlight the benefits/limitations of HuNoV binding to human HBGAs to potentially discriminate infectious from non-infectious particles or to prove the capsid integrity.

Our study provides new arguments to discuss whether VLPs might be suitable models to represent the behavior of HuNoVs. GII.4 VLPs are only self-assemblies of VP1 that also involve electrostatic or hydrophobic interactions in the environment[44]. Such interactions are strongly affected by the ionic strength of the medium. The results indicate that VLPs are only weakly affected by the ionic strength range of 10 to 150 mM at pH 7.4 over a long period of time at 20 °C, as observed for other complete viruses[45,46]. In the same way, the capsids of GII.4 VLPs and HuNoVs are both disrupted after heating at 72 °C, as it was observed for GII.4 VLPs at 68 °C by Moore *et al.*[41]. Ausar *et al.*[19] have also shown that the native quaternary structure of NV is maintained until 60 °C but irreversible capsid disruptions occur above 65 °C. Structural changes in the capsid proteins and/or loss of binding affinity to host cells could occur above a critical temperature, as demonstrated for MS2 phage at 72 °C[47].

Depending on the contact time, a critical temperature range of 60 °C to 72 °C leading to the disruption of the capsid may be proposed for VLPs as well as for HuNoVs. Surprisingly, the exact same critical temperature range has also been suggested for MNV[48]. Further research should be conducted to determine the critical contact time in the 60–72 °C temperature range.

On the other hand, our study also underlines major behavioral differences between GII.4 VLPs and HuNoVs. One difference is the size of the particles because part of VLPs have a smaller size (15 nm) than that expected for HuNoVs of about 40 nm[43]. But the main critical difference may be the stability of VLPs at 20 °C, which is at least 4.3 fold lower than that of HuNoVs. As highlighted by the T_{99} values, the reduction in VLP binding to human HBGAs was substantially more rapid than for HuNoVs under the same conditions. To our knowledge, no study has described the effect of natural ageing at 20 °C on the BP integrity of HuNoVs. Some differences may also exist at higher temperatures (above 50 °C) but the duration of treatment was not sufficient to draw any conclusions. Our results are consistent with the literature data regarding the effect of heat on GII.4 VLPs[27,28]. Hence, lesser stability of VLPs can be noted, at least in the BP region. It may be related to the absence of the viral genome or the VP2 protein which may play a role on HuNoV stability[44,49]. Dika *et al.*[50] have shown that MS2 VLPs, which lack the genome and the maturation protein, have a capsid that expresses a different charge from that of the native particle, thus suggesting a different capsid organization. To summarize, GII.4 VLPs may be suitable for mimicking the behavior of HuNoVs with the exception of particle size and stability of BP below 72 °C. Thus, VLPs can be considered as relevant surrogates of HuNoVs when inactivation treatments induce significant changes in the capsid integrity, as described for some disinfectants[20,51] and high-pressure processing[29].

Bearing in mind the aforementioned limitations of VLPs, it is possible to discuss the relevance of HBGA-binding assays to reduce the over-estimation of the number of potential infectious HuNoVs given by the genome detection method. Substantial advantages of HBGA-binding approach can be suggested. Interactions between HuNoVs and HBGAs are very specific for numerous genotypes of HuNoVs. Although their role is not clearly defined in the host-cell infection process, HuNoV-HBGA interactions could be correlated with infectivity in inactivation assays[18]. HBGA-binding to the BP provides evidence of the presence of HuNoV capsids as it was confirmed by the lack of action of RNase A on the viral genome, suggesting persistence of potentially intact capsids. Conversely, this approach has several limitations that should be highlighted. The first point concerns methodological aspects. The specificity of HuNoV-HBGA interactions is dependent not only on the HBGA type

(as previously demonstrated[39]), but also on the ionic strength of the media even though it does not disturb these interactions. The impact of the ionic strength is critical when comparing two different environmental media. Different interactions may be explained by the global charge of the viral particle. Considering the isoelectric point of GII.4 VLPs estimated to be between pH 5 and 6[44], the global charge of the particles at pH 7.4 is negative under the tested conditions. By increasing the ionic strength, the electric double layer of viral particles could be compressed leading to a decrease in repulsive electrostatic interactions and an increase in hydrophobic interactions between VLPs and HBGAs. Dika *et al.*[52] pointed out this complex interplay by showing the adhesion features of different viral surrogates (i.e. FRNAPH) to abiotic surfaces as a function of ionic strength.

The second point is related to a more rapid reduction in the number of HuNoVs able to bind to human HBGAs (T_{90} estimated at 166 days) compared to the whole encapsidated HuNoVs at 20 °C (T_{90} estimated at 294 days). This result indicates that at least two kinds of HuNoV particles are present, both having a capsid (as shown by the resistance to RNase A) and a genome but only one being capable of binding to HBGAs. Even though there is no evidence that the latter are really infectious, the use of HBGA-binding assays may reduce the over-estimation resulting from solely using the genome detection method. Our results are consistent with a previous study describing the persistence of GII HuNoV genomes in drinking water at 21 °C since the T_{90} was estimated at 298 days using a non-linear model[10]. Seitz *et al.*[53] have also shown that the NV remained infectious in groundwater at room temperature in the dark for 61 days and the capsid remained intact for at least 427 days. Finally, HuNoV capsids may specifically bind to HBGAs when inactivated particles have a structural integrity of the capsid but an altered genome, or an intact genome with capsid damage(s) located in surrounding regions of the BP.

For a full evaluation of the HBGA-binding strategy, experimental data are required to correlate the loss of HuNoV binding to human HBGAs with the loss of infectivity after inactivation treatments when cellular models for the *in vitro* replication of HuNoVs will be available for routine application. The use of human HBGAs to evaluate the capsid integrity of HuNoVs according to the inactivation treatments needs more comprehensive studies for improving our understanding focused on HuNoV-HBGA interactions and the structural changes in the capsid proteins. Further researches are underway to explore the molecular modifications occurred on the BP but also on the overall capsid during these inactivation treatments.

Materials and Methods

Preparation of GII.4 VLP and GII.4 HuNoV samples. GII.4 VLPs (Cairo4 strain, a 2007-Osaka variant) were kindly provided by the National Reference Center for Gastroenteritis Viruses (NRCgev, Dijon, France). Production and purification of GII.4 VLPs were performed using the baculovirus-expressed VP1 system, as described previously[37,54]. For all experiments, purified GII.4 VLPs were prepared at a final concentration of 100 µg/mL in TNC buffer using the NanoDrop 2000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). The working suspensions were kept at 4 °C before use.

GII.4 HuNoVs from human stools were genotyped[55] and kindly provided by the NRCgev (Dijon, France). The purification of GII.4 HuNoVs was performed using a method described previously[56], with significant modifications. Briefly, 1 g of fecal suspensions of GII.4 HuNoVs was added to 10 mL of 150 mM PBS solution at pH 7.4. Samples were clarified by addition of 1/3 (v/v) of chloroform, vortexed for 60 sec and centrifuged at 2,500 × *g* for 5 min. Supernatant was submitted to a second clarification step as described previously. The clarified samples were purified by dialysis using Float-A-Lyzer G2 with Biotech Cellulose Ester membranes (MWCO: 100 kD, volume: 1 mL, Spectra/Por®, Spectrum Laboratories, CA, USA). The membranes were dialyzed in a tank containing 10 L of 10 mM PBS at 4 °C overnight with gentle stirring. Dialysate samples were recovered and filtered using a 0.22 µm cellulose acetate membrane. After each step, the loss of HuNoV genomes was controlled. The viral genomes from 100 µL of purified HuNoV suspensions were extracted directly using the NucliSENS® easyMAG® kit (bioMérieux, Marcy-l'Etoile, France). The HuNoV genomes were detected using an RNA UltraSense One-Step quantitative RT-PCR system (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), according to the ISO 15216-1 standard recommendations[13]. Cq values were determined using CFX Maestro software (BioRad, Hercules, CA, USA). Quantification of HuNoV gc was performed using a standard curve of plasmids with a concentration range of 5 to 10^5 gc/reaction mixture. Until use, the purified HuNoV suspensions were stored at 4 °C in the dark at a final concentration of 2.10^6 gc/mL.

Preparation and determination of HBGA types in human saliva. Saliva samples from 27 healthy adult volunteers were collected in 50 mL sterile polypropylene tubes. The saliva samples used in this study were described previously following approval by the Nantes University Hospital Review Board (study number BRD02/2-P)[37], and informed consent was obtained from all donors. All experiments using saliva were performed in accordance with relevant guidelines and regulations. After harvesting, saliva samples were boiled at 100 °C for 5 min and then centrifuged at 10,000 × *g* for 5 min. Supernatants were stored at −20 °C until use. The presence of A, B, O blood group antigens and Lewis antigens in saliva samples at a dilution of 1:1,000 in 150 mM PBS was determined by ELISA, as described previously[22].

Natural ageing at 20 °C of GII.4 VLPs and HuNoVs. One mL of 10 µg/mL purified GII.4 VLPs in 10 mM and 150 mM PBS solutions and 1 mL of 2.10^6 gc/mL of purified GII.4 HuNoVs in 10 mM PBS solution were exposed to natural ageing at 20 °C. This treatment, corresponding to the application of circadian cycles with a 24 h rotation of natural light and obscurity between October 2018 and July 2019, was evaluated over 105 days and 294 days for VLPs and HuNoVs, respectively. To that end, 20 separate 1 mL aliquots of VLPs and HuNoVs were placed in 2 mL Protein LoBind tubes. These aliquots were derived from a unique stock solution of 20 mL of VLPs and HuNoVs. For each sample, four and two analyses were performed for VLPs and HuNoVs, respectively.

Heat treatments of GII.4 VLPs and HuNoVs. One mL of 10 µg/mL purified GII.4 VLPs and 1 mL of 2.10^5 gc/mL of purified GII.4 HuNoVs in 150 mM PBS solution were separately exposed at 50 °C, 60 °C, and 72 °C for 30 min. Before adding 100 µL of 100 µg/mL GII.4 VLPs or 2.10^6 gc/mL of GII.4 HuNoVs in borosilicate 4.9 glass tubes (thickness: 0.4 mm, diameter: 12 mm, Fiolax, Schott AG, Mitterteich, Germany), 900 µL of 150 mM PBS solution was pre-warmed in a glycol bath GR150 S5 (Grant Instruments, Cambridge, UK) to minimize the effect of the temperature rise. After heating, treated samples were immediately placed on ice to stop the reaction. The temperature was monitored in the glycol bath but also in a control tube containing 1 mL of 150 mM PBS solution using temperature probes (SSA-TF, E-Val™ Pro, ELLAB, Hillerød, Denmark) coupled to a data logger (Valsuite™ Basic software, ELLAB, Hillerød, Denmark). Experiments were performed in triplicate for VLPs and HuNoVs under the same conditions.

GII.4 VLP binding to saliva samples: HBGA-binding ELISA. HBGA-binding ELISA was performed using the method described previously[22], with minor adjustments. Briefly, 100 µL of supernatant of saliva samples of known HBGA types were coated in 96-well microtiter plates at a dilution of 1:1,000 in 150 mM PBS at 4 °C overnight. Negative controls were systematically added using saliva-coated wells treated with sodium periodate as described previously[42], with slight modifications. After blocking with 200 µL of 5% non-fat dried milk at 37 °C for 2 h, 100 µL of native and treated GII.4 VLPs diluted in PBS solutions was incubated at 37 °C for 1 h. The VLP binding to the saliva samples was detected with anti-GII.4 VLP MAbs kindly provided by the NRCgev (Dijon, France) at a 1:10,000 dilution in 150 mM PBS for 1 h at 37 °C, followed by the addition of horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-mouse IgG (Chemicon, Merck Millipore, Burlington, MA, USA) at a dilution of 1:30,000 in 150 mM PBS for 1 h at 37 °C. Between each step, the wells were washed three times with 200 µL of 150 mM PBS containing 0.05% Tween 20 using a microplate washer (Elx50, BioTeK Instruments, Winooski, VT, USA). The enzyme activity was detected using the TMB kit (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA). After incubation for 15 min at room temperature, the reaction was stopped by adding 100 µL of 1 M sulfuric acid. The OD values of the enzyme activity were read at 450 nm with an enzyme immunoassay spectrum reader (Elx800, BioTeK Instruments, Winooski, VT, USA). All samples were analyzed in duplicate. Inconsistent results were rejected if the gap between OD_{450} value duplicates was above 0.1. To give confidence, the P/N ratio was calculated by dividing the mean OD_{450} values of the sample by the mean OD_{450} values of the negative control. When P/N ratio was above 2, results were considered positive. When P/N ratio was below 2, results were considered negative[57].

The sensitivity and the linearity of the HBGA-binding ELISA method were determined using the supernatant of OLe^+ saliva sample and various contents of GII.4 VLPs (ranging from 0.05 and 10.0 µg/mL) diluted in 10 mM and 150 mM PBS solutions. The experiments were performed in four replicates.

GII.4 HuNoV binding to saliva samples: HBGA-binding assays followed by RNA amplification by RT-qPCR. This method was performed using a combination of approaches described previously[22,56]. Briefly, supernatant of OLe^+ saliva sample was coated in 96-well microtiter plates as described above. Negative controls were also added using the same saliva sample treated with sodium periodate. After blocking with non-fat dried milk, 100 µL of native and treated GII.4 HuNoV suspensions, previously treated by RNase A[58], was incubated at 37 °C for 1 h. Between each step, the wells were washed three times as described above. The bound capsid proteins of HuNoVs were lysed directly in the wells using 150 µL of a buffer containing 5 M of guanidium thiocyanate for 10 min at room temperature. For each condition (native or treated HuNoVs, negative controls), 10 wells were pooled on the same 96-well microtiter plate to analyze 1 mL of purified HuNoVs. The viral genomes were purified and detected as described previously. The HuNoV genomes were also detected after RNase A treatment. The LOD was determined at 200 gc/mL and the LOQ was determined at 1,000 gc/mL.

TEM observations. GII.4 VLPs exposed to heating were observed by TEM after negative staining with phosphotungstic acid. Briefly, 10 µL of heated GII.4 VLPs were absorbed to carbon coated copper grids by incubating at room temperature for 3 min. The excess was eliminated and the copper grids were negatively stained with 2% phosphotungstic acid by incubating at room temperature for 1 min. The stained copper grids were air dried for 3 min and then observed by TEM.

Statistical analysis. All statistical analyses were performed using R statistical software (Rx64 v.3.5.3). The Shapiro-Wilk test was performed to check normality of the data with alpha level of 0.05. If data set followed a normal distribution ($p > 0.05$), parametric tests were applied. A paired or unpaired sample Student's *t*-test was performed for dependent or independent data following a normal distribution, respectively. Non-parametric tests were used for data sets having a non-normal distribution ($p < 0.05$). For dependent or independent data with non-normal distribution, a Wilcoxon signed-rank test or a Mann-Whitney U test was applied. For all tests, the significance level was set to 0.05.

Data availability

All data analyzed in this study are included in this published article and also its Supplementary Information files.

Received: 6 August 2019; Accepted: 7 October 2019;
Published online: 25 October 2019

References

1. European Food Safety Authority (EFSA). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017. EFSA J. 16 (2018).
2. CDC. https://www.cdc.gov/norovirus/trends-outbreaks/index.html (2018).
3. Zheng, D.-P. *et al.* Norovirus classification and proposed strain nomenclature. *Virology* **346**, 312–323 (2006).
4. van Beek, J. *et al.* Molecular surveillance of norovirus, 2005–16: an epidemiological analysis of data collected from the NoroNet network. *Lancet Infect. Dis.* **18**, 545–553 (2018).
5. Atmar, R. L. *et al.* Norwalk virus shedding after experimental human infection. *Emerg. Infect. Dis.* **14**, 1553–1557 (2008).
6. Atmar, R. L. *et al.* Determination of the 50% human infectious dose for Norwalk virus. *J. Infect. Dis.* **209**, 1016–1022 (2014).
7. Teunis, P. F. M. *et al.* Norwalk virus: how infectious is it? *J. Med. Virol.* **80**, 1468–1476 (2008).
8. Hirneisen, K. A. *et al.* Viral Inactivation in Foods: A Review of Traditional and Novel Food-Processing Technologies. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **9**, 3–20 (2010).
9. Donaldson, E. F., Lindesmith, L. C., Lobue, A. D. & Baric, R. S. Viral shape-shifting: norovirus evasion of the human immune system. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**, 231–241 (2010).
10. Kauppinen, A. & Miettinen, I. T. Persistence of Norovirus GII Genome in Drinking Water and Wastewater at Different Temperatures. *Pathog. Basel Switz.* **6** (2017).
11. Bellou, M., Kokkinos, P. & Vantarakis, A. Shellfish-borne viral outbreaks: a systematic review. *Food Environ. Virol.* **5**, 13–23 (2013).
12. Blanco, A. *et al.* Norovirus in Bottled Water Associated with Gastroenteritis Outbreak, Spain, 2016. *Emerg. Infect. Dis.* **23**, 1531–1534 (2017).
13. ISO. Microbiology of the food chain - Horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus using real-time RT-PCR - Part 1: Method for quantification (2017).
14. Boudaud, N. & Gantzer, C. Viral Hazard Assessment in food matrices. *Bull Epidemiol Santé Anim Aliment* **68**, 26–30 (2015).
15. Hartard, C. *et al.* F-Specific RNA Bacteriophages, Especially Members of Subgroup II, Should Be Reconsidered as Good Indicators of Viral Pollution of Oysters. *Appl. Environ. Microbiol.* **84** (2018).
16. Ettayebi, K. *et al.* Replication of human noroviruses in stem cell-derived human enteroids. *Science* **353**, 1387–1393 (2016).
17. Bosch, A. *et al.* Foodborne viruses: Detection, risk assessment, and control options in food processing. *Int. J. Food Microbiol.* **285**, 110–128 (2018).
18. Manuel, C. S., Moore, M. D. & Jaykus, L.-A. Predicting human norovirus infectivity - Recent advances and continued challenges. *Food Microbiol.* **76**, 337–345 (2018).
19. Ausar, S. F., Foubert, T. R., Hudson, M. H., Vedvick, T. S. & Middaugh, C. R. Conformational stability and disassembly of Norwalk virus-like particles. Effect of pH and temperature. *J. Biol. Chem.* **281**, 19478–19488 (2006).
20. Sato, J. *et al.* Effects of disinfectants against norovirus virus-like particles predict norovirus inactivation. *Microbiol. Immunol.* **60**, 609–616 (2016).
21. Jiang, X., Wang, M., Graham, D. Y. & Estes, M. K. Expression, self-assembly, and antigenicity of the Norwalk virus capsid protein. *J. Virol.* **66**, 6527–6532 (1992).
22. Huang, P. *et al.* 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 (2003).
23. Kostela, J. *et al.* Amplification by long RT-PCR of near full-length norovirus genomes. *J. Virol. Methods* **149**, 226–230 (2008).
24. Nuanualsuwan, S. & Cliver, D. O. Pretreatment to avoid positive RT-PCR results with inactivated viruses. *J. Virol. Methods* **104**, 217–225 (2002).
25. Oristo, S., Lee, H.-J. & Maunula, L. Performance of pre-RT-qPCR treatments to discriminate infectious human rotaviruses and noroviruses from heat-inactivated viruses: applications of PMA/PMAxx, benzonase and RNase. *J. Appl. Microbiol.* **124**, 1008–1016 (2018).
26. Sano, D., Pintó, R. M., Omura, T. & Bosch, A. Detection of oxidative damages on viral capsid protein for evaluating structural integrity and infectivity of human norovirus. *Environ. Sci. Technol.* **44**, 808–812 (2010).
27. Moore, M. D. & Jaykus, L.-A. A plate-based histo-blood group antigen binding assay for evaluation of human norovirus receptor binding ability. *Anal. Biochem.* **533**, 56–59 (2017).
28. Li, D. *et al.* Evaluation of methods measuring the capsid integrity and/or functions of noroviruses by heat inactivation. *J. Virol. Methods* **181**, 1–5 (2012).
29. Lou, F. *et al.* High-pressure inactivation of human norovirus virus-like particles provides evidence that the capsid of human norovirus is highly pressure resistant. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**, 5320–5327 (2012).
30. Lindesmith, L. *et al.* Human susceptibility and resistance to Norwalk virus infection. *Nat. Med.* **9**, 548–553 (2003).
31. Hutson, A. M., Atmar, R. L., Graham, D. Y. & Estes, M. K. Norwalk virus infection and disease is associated with ABO histo-blood group type. *J. Infect. Dis.* **185**, 1335–1337 (2002).
32. Marionneau, S. *et al.* Norwalk virus binds to histo-blood group antigens present on gastroduodenal epithelial cells of secretor individuals. *Gastroenterology* **122**, 1967–1977 (2002).
33. Rockx, B. H. G., Vennema, H., Hoebe, C. J. P. A., Duizer, E. & Koopmans, M. P. G. Association of histo-blood group antigens and susceptibility to norovirus infections. *J. Infect. Dis.* **191**, 749–754 (2005).
34. Huang, P. *et al.* Norovirus and histo-blood group antigens: demonstration of a wide spectrum of strain specificities and classification of two major binding groups among multiple binding patterns. *J. Virol.* **79**, 6714–6722 (2005).
35. Marionneau, S. *et al.* 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 (2001).
36. Tan, M. *et al.* Mutations within the P2 domain of norovirus capsid affect binding to human histo-blood group antigens: evidence for a binding pocket. *J. Virol.* **77**, 12562–12571 (2003).
37. de Rougemont, A. *et al.* Qualitative and quantitative analysis of the binding of GII.4 norovirus variants onto human blood group antigens. *J. Virol.* **85**, 4057–4070 (2011).
38. Shirato, H. *et al.* Noroviruses distinguish between type 1 and type 2 histo-blood group antigens for binding. *J. Virol.* **82**, 10756–10767 (2008).
39. Tan, M. & Jiang, X. Histo-blood group antigens: a common niche for norovirus and rotavirus. *Expert Rev. Mol. Med.* **16**, e5 (2014).
40. Nordgren, J. & Svensson, L. Genetic Susceptibility to Human Norovirus Infection: An Update. *Viruses* **11** (2019).
41. Moore, M. D., Mertens, B. S. & Jaykus, L.-A. Alternative *In Vitro* Methods for the Determination of Viral Capsid Structural Integrity. *J. Vis. Exp. JoVE*, https://doi.org/10.3791/56444 (2017).
42. Maalouf, H. *et al.* Distribution in tissue and seasonal variation of norovirus genogroup I and II ligands in oysters. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**, 5621–5630 (2010).
43. White, L. J., Hardy, M. E. & Estes, M. K. Biochemical characterization of a smaller form of recombinant Norwalk virus capsids assembled in insect cells. *J. Virol.* **71**, 8066–8072 (1997).
44. Da Silva, A. K., Kavanagh, O. V., Estes, M. K. & Elimelech, M. Adsorption and aggregation properties of norovirus GI and GII virus-like particles demonstrate differing responses to solution chemistry. *Environ. Sci. Technol.* **45**, 520–526 (2011).
45. Moore, R. S., Taylor, D. H., Sturman, L. S., Reddy, M. M. & Fuhs, G. W. Poliovirus adsorption by 34 minerals and soils. *Appl. Environ. Microbiol.* **42**, 963–975 (1981).

46. Gantzer, C., Quignon, F. & Schwartzbrod, L. Poliovirus-1 adsorption onto and desorption from montmorillonite in seawater. *Survival of the adsorbed virus. Environ. Technol.* **15**, 271–278 (1994).
47. Wigginton, K. R., Pecson, B. M., Sigstam, T., Bosshard, F. & Kohn, T. Virus inactivation mechanisms: impact of disinfectants on virus function and structural integrity. *Environ. Sci. Technol.* **46**, 12069–12078 (2012).
48. Brié, A. *et al.* The Effect of Heat and Free Chlorine Treatments on the Surface Properties of Murine Norovirus. *Food Environ. Virol.* **9**, 149–158 (2017).
49. Pogan, R., Dülfer, J. & Uetrecht, C. Norovirus assembly and stability. *Curr. Opin. Virol.* **31**, 59–65 (2018).
50. Dika, C., Duval, J. F. L., Ly-Chatain, H. M., Merlin, C. & Gantzer, C. Impact of internal RNA on aggregation and electrokinetics of viruses: comparison between MS2 phage and corresponding virus-like particles. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**, 4939–4948 (2011).
51. Manuel, C. S., Moore, M. D. & Jaykus, L.-A. Efficacy of a disinfectant containing silver dihydrogen citrate against GI.6 and GII.4 human norovirus. *J. Appl. Microbiol.* **122**, 78–86 (2017).
52. Dika, C., Chatain-Ly, M. H., Francius, G., Duval, J. F. L. & Gantzer, C. Non-DLVO adhesion of F-specific RNA bacteriophages to abiotic surfaces: Importance of surface roughness, hydrophobic and electrostatic interactions. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* **435** (2013).
53. Seitz, S. R. *et al.* Norovirus infectivity in humans and persistence in water. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**, 6884–6888 (2011).
54. Kamel, A. H. *et al.* Predominance and circulation of enteric viruses in the region of Greater Cairo, Egypt. *J. Clin. Microbiol.* **47**, 1037–1045 (2009).
55. Ayouni, S. *et al.* Relationship between GII.3 norovirus infections and blood group antigens in young children in Tunisia. *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **21**(874), e1–8 (2015).
56. Langlet, J., Kaas, L. & Greening, G. Binding-Based RT-qPCR Assay to Assess Binding Patterns of Noroviruses to Shellfish. *Food Environ. Virol.* https://doi.org/10.1007/s12560-015-9180-x (2015).
57. Maalouf, H. *et al.* Strain-dependent norovirus bioaccumulation in oysters. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**, 3189–3196 (2011).
58. Brié, A., Bertrand, I., Meo, M., Boudaud, N. & Gantzer, C. The Effect of Heat on the Physicochemical Properties of Bacteriophage MS2. *Food Environ. Virol.* **8**, 251–261 (2016).

Acknowledgements
The results of this study were obtained within the scope of OxyVir, a project funded by the "Fonds Européen pour les Affaires Maritimes et la Pêche" (FEAMP). This study was also supported by the Joint Technological Unit ACTIA VIROcontrol and the "Conseil Régional de Normandie".

Author contributions
N.B., C.G., and G.B. designed the study. M.R., M.C., and J.L. performed the experiments. M.R., M.C., G.B., A.R., and C.G. analyzed the data. M.R., C.G., and N.B. wrote the manuscript. M.R. and M.C. prepared figures. All authors reviewed the manuscript.

Competing interests
The authors declare no competing interests.

Additional information
Supplementary information is available for this paper at https://doi.org/10.1038/s41598-019-51750-4.

Correspondence and requests for materials should be addressed to N.B.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/.

© The Author(s) 2019

3. Évolution des interactions avec les HBGA au cours d'un traitement oxydant

Des VLP GII.4 et des NoV GII.4 complets et purifiés à partir de selles humaines ont été traités avec deux oxydants : l'acide hypochloreux (HClO) et le peroxynitrite (ONOOH). Ces oxydants ont été décrits comme étant capables de modifier les protéines de capsides de virus modèles cultivables des NoV mais aussi d'autres virus entériques (Nuanualsuwan et Cliver, 2003; Padalko *et al.*, 2004; Wigginton *et al.*, 2012b). La perte du caractère infectieux des virus a été corrélée avec des modifications moléculaires (protéines et génome viral). Il a été décrit que certains acides aminés spécifiques (*i.e.* cystéines, méthionines, tyrosines et tryptophanes) des protéines de capside pouvaient être modifiés par ces oxydants. L'inactivation virale par ces oxydants pourrait être liée à la présence de ces acides aminés sensibles qui sont modifiés directement ou qui facilitent la création de liaisons covalentes entre les protéines de capside mais également entre ces protéines et l'ARN viral (Bastin *et al.*, 2020; Hawkins *et al.*, 2003, 2002; Hawkins et Davies, 2002; Padalko *et al.*, 2004; Sano *et al.*, 2010; Sigstam *et al.*, 2013; Wigginton *et al.*, 2012b). Dans ce contexte, l'impact du HClO et du ONOOH sur l'intégrité des capsides virales et la capacité d'interaction des VLP et des NoV GII.4 avec les HBGA salivaires de type Ale^+ a été évalué.

Les effets du HClO et du ONOOH sur la structure globale des VLP ont été évalués par MET et DLS. L'étude de la structure des VLP s'appuyait sur deux critères : la taille et la quantité des particules. Trois concentrations ont été testées pour chacun des deux oxydants à 20°C (953, 4 766 et 9 531 µM pendant 10 min pour HClO ; 33, 267 et 1 333 µM pour ONOOH). Par DLS, la taille des particules a augmenté de manière dose-dépendante passant de 49,9 nm à 68,3 et 79,8 nm en présence de 9 531 µM d'HClO et de1 333 µM d'ONOOH, respectivement. Par MET, deux populations ont été identifiées. Environ 60 % des VLP avaient une taille centrée autour de 23 nm et 40 % autour de 34 nm. Au cours du traitement oxydatif, le nombre de particules diminuait légèrement mais ce n'est que pour les concentrations de HClO à 9 531 µM et de ONOOH à 1 333 µM que le nombre diminue drastiquement, passant de 45-60 à moins de 5 particules observables par champ. En résumé, les VLP étaient sensibles à une concentration critique de 9 531 µM pour le HClO et de 1 333 µM pour le ONOOH en provoquant une déstructuration des VLP. Alors que pour des concentrations d'oxydants plus faibles, leur action sur les VLP était moins évidente avec les deux méthodes testées.

Les effets du HClO et du ONOOH sur la protéine VP1 des VLP ont été définis par SDS-PAGE en conditions dénaturantes. Pour les VLP natives non traitées, les protéines des monomères de

VP1 sont apparues à leurs masses attendues entre 57 et 60 kDa (avec ou sans la partie N-terminale). Des dimères (entre 75 et 100 kDa) et des multimères de VP1 (250 kDa) ont également été observés. Après oxydation des VLP, le profil de migration de VP1 changeait de manière dose-dépendante jusqu'à 9 531 µM de HClO. L'intensité des bandes de dimères de VP1 diminuait alors que celle des monomères de VP1 augmentait sensiblement. L'intensité des multimères de VP1 augmentait quant à elle modérément. Pour des concentrations supérieures à 9 531 µM de HClO, les intensités de toutes les bandes comprises entre 50 et 250 kDa diminuaient sans l'apparition de nouvelles bandes. Après traitement par ONOOH, le profil était similaire mais avec de petites différences. Comme pour les VLP traitées par HClO, l'intensité des multimères de VP1 augmentait de manière dose-dépendante avec la concentration d'ONOOH jusqu'à 1 333 µM. De manière plus modérée qu'avec le HClO, l'intensité des monomères de VP1 augmentait également alors que celle des dimères de VP1 diminuait. En résumé, le traitement au HClO semble favoriser principalement la libération des monomères de VP1 et, de façon moindre, la formation de multimères de VP1, alors que le traitement au ONOOH semble favoriser de façon prédominante la production de multimères de VP1.

L'adhésion des VLP GII.4 aux HBGA salivaires de type ALe^+ a été évaluée par ELISA. Le traitement des VLP avec des concentrations croissantes de HClO ou de ONOOH réduisait la quantité de VLP capables de se fixer spécifiquement aux HBGA. En particulier, un traitement par 9 531 µM de HClO induisait une incapacité à se lier aux HBGA pour plus de 90 % des VLP. Par comparaison à nos précédents résultats, cette concentration de HClO correspond à celle qui induisait une forte modification des protéines VP1 par SDS-PAGE mais aussi une déstructuration des VLP par MET. Concernant le ONOOH, une diminution significative de l'adhésion des VLP aux HBGA était observée à partir de 267 µM. C'est notamment à 1 333 µM en ONOOH que plus de 90 % des VLP devenaient incapables de se fixer aux HBGA. En résumé, la perte d'adhésion des VLP aux HBGA après traitement par HClO semble liée à la déstructuration de la capside (*i.e.* séparation des dimères en monomères). Alors que pour le traitement par ONOOH, la perte d'adhésion aux HBGA par les VLP diminue avant la déstructuration de la capside.

Les effets du HClO et du ONOOH sur la structure de la protéine VP1 des NoV GII.4 ont été évalués par SDS-PAGE. Les NoV GII.4 utilisés dans cette étude présentaient un profil de migration des protéines différent de celui des VLP GII.4 dans les mêmes conditions. En effet, les protéines de capside migraient principalement à ~ 250 kDa et à une intensité moindre à 150 et 100 kDa. Dans le cas des NoV, les concentrations en HClO ont été diminuées pour observer

un signal exploitable par SDS-PAGE. Elles étaient comprises entre 2 et 57 µM. Ces concentrations en HClO diminuaient l'intensité des bandes protéiques les plus représentatives (250, 150 et 100 kDa) et augmentaient en parallèle l'intensité des monomères de VP1 à ~ 60 kDa. À 57 µM de HClO, l'intensité de toutes les bandes protéiques de NoV GII.4 diminuait. Le traitement par ONOOH modifiait plus modérément le profil de migration des protéines VP1 des NoV. Des concentrations de ONOOH allant de 0 à 33 µM changeaient peu l'intensité de chaque bande protéique (*i.e.* 250, 150 et 100 kDa). Ce n'est qu'à partir d'une concentration à 267 µM que les effets du ONOOH étaient visibles, en réduisant l'intensité des bandes protéiques. Aucun monomère de VP1 n'a été observé dans ces conditions testées.

L'intégrité de la structure et la capacité d'adhésion des NoV GII.4 aux HBGA salivaires de type ALe^+ en fonction des différents traitements oxydants ont été évaluées par RT-qPCR après un traitement à la RNase. C'est à partir de 10 µM que le traitement par HClO diminuait de manière significative la quantité de NoV encapsidés. C'est également à partir de cette concentration que la capacité des NoV à interagir avec les HBGA a commencé à diminuer. Une concentration à 19 µM HClO induisait une dissociation complète des multimères de VP1. En revanche, pour le traitement ONOOH, quelle que soit la concentration utilisée, aucune réduction du génome n'a été observée avant ou après fixation préalable des HBGA. En résumé, l'action du HClO et du ONOOH sur les NoV était différente. Le traitement par HClO peut abolir l'interaction des HBGA avec les NoV par la dissociation des dimères VP1 à partir d'une concentration critique de 19 µM. Le traitement par ONOOH a des effets plus obscurs sur les protéines de VP1 et sur l'interaction avec les HBGA, même pour une concentration qui était capable de dissocier les VLP.

En conclusion, l'action du HClO sur la capside des NoV semble avoir lieu au moins au niveau des interactions entre les monomères VP1 sans affecter la BP de la capside. Certaines liaisons covalentes entre les protéines VP1 ont également lieu mais dans une moindre mesure. Les particules virales sont significativement modifiées à partir d'une concentration critique en HClO de 9 531 et 19 µM pour les VLP et les NoV GII.4, respectivement, entraînant une libération des monomères de VP1 en conditions dénaturantes. Au-delà de la concentration critique, les protéines de VP1 sont dégradées ou fortement agrégées. Enfin, l'action du ONOOH au niveau de la capside des NoV est plus faible que pour les VLP, en particulier en ce qui concerne la dissociation de la capside et son interaction avec les HBGA.

Article soumis en janvier 2021 dans *Frontiers in Microbiology*

Hypochlorous acid and Peroxynitrite alter Human norovirus GII.4 capsid structure and their capacity to bind Histo Blood Group Antigens

M. Chassaing[1,2], G. Bastin[2], M. Robin[1], D. Majou[3], Gaël Belliot[4,5], Alexis de Rougemont[4,5], N. Boudaud[1] and C. Gantzer[2*]

[1] Actalia, Food Safety Department, F-50000, Saint-Lô, France

[2] University of Lorraine, CNRS, LCPME, F-54000 Nancy, France

[3] ACTIA, F-75231, Paris Cedex 05, France

[4] National Reference Centre for Gastroenteritis Viruses, Laboratory of Virology, University Hospital of Dijon, F-21000, France

[5] UMR PAM A 02.102 Procédés Alimentaires et Microbiologiques, Université de Bourgogne Franche-Comté/AgroSup Dijon, F-21000, France

Running Title: "Oxidants alter norovirus protein capsids"

*** Correspondence:** Christophe Gantzer, christophe.gantzer@univ-lorraine.fr

Key words: Norovirus, Virus-like particles, VP1 protein, Histo-Blood Group Antigens, Hypochlorous acid, Peroxynitrite.

Abstract

Human noroviruses (HuNoVs) are one of the leading causes of acute gastroenteritis worldwide. HuNoVs are also frequently detected in water and foodstuffs. Hypochlorous acid (HClO) and peroxynitrite (ONOOH) are two oxidants classically encountered by HuNoVs during their natural life cycle in human or in the environment. In this study, we define the effect of these two oxidants on GII.4 HuNoVs and virus-like particles (VLPs). The impact on the capsid structure, the major capsid protein VP1, and the ability of viral capsid to specifically bind to Histo-Blood Group Antigens (HBGAs), were analyzed after oxidative treatments. HBGA are attachment factors which promote HuNoV infection in the host cell. Overall, our results indicate that HClO acts mainly on the VP1 dimer interactions and, to a lesser extent, on the formation of cross-links between capsid proteins. The dissociation of GII.4 VLP and GII.4 HuNoV capsid appeared up to a critical concentration leading to a loss of the HBGA-binding. ONOOH mainly

produced cross-links between VP1 but can also dissociate VLPs depending on the concentration applied. Nevertheless, ONOOH has lower effect on complete particles of HuNoVs.

INTRODUCTION

Human noroviruses (HuNoVs), responsible for acute gastroenteritis, are the leading cause of viral foodborne outbreaks worldwide (Kirk et al., 2015). HuNoVs are a group of genetically diversified viruses belonging to the Caliciviridae family with mainly two genogroups, GI and GII (Chhabra et al., 2019). Genogroup II, genotype 4 (GII.4) HuNoV is the most prevalent for human infection since it caused ~70% of outbreaks since 2002 (Beek et al., 2018). HuNoV genome is constituted by a single-stranded positive-sense RNA genome of ~ 7,500 nucleotides. The icosahedral capsid is formed by a major capsid protein (VP1) and a minor capsid protein (VP2). Depending on the genotypes, the size of HuNoV particles is ranging between 38 to 49 nm (Jung et al., 2019; Prasad et al., 1999). VP1 is constituted of shell (S) domains and protruding (P) domains linked by a flexible hinge which are respectively involved in the formation of the icosahedral capsid and, the prominent protrusion bearing the antigenic features involved in the host cell interactions (Prasad et al., 1999). More specifically, the P domain is further subdivided into two subdomains: P1 emerging from the S domain and, P2 located at the outermost surface of the capsid (Jung et al., 2019; Prasad et al., 1999). P2 subdomain from VP1 dimer forms a binding pocket (BP) allowing the specific adhesion to Histo-Blood Group Antigens (HBGAs) (Bu et al., 2008; Cao et al., 2007; Tan et al., 2004, 2003) which have been described to promote the HuNoV infection in the host cell (Ettayebi et al., 2016; Hutson et al., 2005; Lindesmith et al., 2003).

HBGAs are complex fucose-containing carbohydrates found on the surface of red blood cells and mucosal epithelial cells. They can also be found as cell-free antigens in biological fluids such as saliva (Huang et al., 2005). The composition and the steric hindrance of HBGAs may vary as a function of the individuals (Marionneau et al., 2001). Such characteristics can change its binding capacity to HuNoV BP and thus the susceptibility of a human host to be infected by HuNoVs. The BP of the GI.1 and GII.4 HuNoVs is composed by four or five highly conserved amino acids, respectively, and by a variable peripheral region (Tan and Jiang, 2014). Thus, the individual susceptibility of a human to be infected relies on both the type of HBGAs and HuNoV genotypes (Lindesmith et al., 2003; Nordgren and Svensson, 2019; Rockx et al., 2005; Tan and Jiang, 2014). Any modifications of amino acids of the BP may theoretically change the affinity with HBGAs and therefore the infection process in the host cell.

HuNoV infectivity in the environment is difficult to define since the lack of available cell culture systems usable in routine. Stem cell-derived human enteroids or zebrafish larvae which have been recently proposed for the in vitro replication of HuNoVs are still highly complex (Ettayebi et al., 2016; Van Dycke et al., 2019). Thereby, the loss of HuNoV infectivity is poorly documented. Even for culturable enteric viruses, the molecular mechanisms of viral inactivation are also poorly understood (Wigginton et al., 2012; Wigginton and Kohn, 2012). In this context, the detection of HuNoVs in foodstuffs and in the environment is exclusively based on molecular methods. However, these approaches cannot be used for the determination of the infectious risk because viral genome is higher resistant than viral infectivity, especially after inactivation treatments (Gassilloud et al., 2003; Polo et al., 2018). Instead of performing a direct genome quantification by reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR), some authors suggest to evaluate the capsid integrity using the HBGA-binding to the BP in order to select infectious HuNoVs (Dancho et al., 2012). To validate such approach, basic knowledges about alteration of protein capsid under inactivating conditions are needed.

Oxidation is one of the gold standard procedures to inactivate enteric viruses including HuNoVs. HuNoVs are transmitted through the fecal-oral route. Thus, viral particles can encounter oxidants during their life cycle. In the human host, infectious HuNoVs can be inactivated by peroxynitrite (ONOOH) and hypochlorous acid (HClO) which are produced by the immune system (Nature's own powerful, non-toxic disinfectant, 2018; Padalko et al., 2004). In the environment, HuNoVs can be inactivated in water by disinfection treatment where HClO is frequently used. Some studies have reported that ONOOH and HClO can modify the capsid proteins of HuNoV surrogates and other enteric viruses in vivo (Padalko et al., 2004; Wigginton et al., 2012). They are well-known to inactivate enteric viruses but molecular mechanisms are still unknown.

The aim of this work was to evaluate the effect of ONOOH and HClO on the HuNoV capsid. The capsid structure, the integrity of VP1 and, the HBGA-binding to HuNoVs were investigated. Complete GII.4 HuNoV particles coming from purified human stools and GII.4 virus-like particles (VLPs) were used. The capsid structure of HuNoVs was defined by transmission electron microscopy (TEM) and dynamic light scattering (DLS). Integrity of VP1 was defined by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Finally, HBGA-binding to the viral capsid was evaluated for oxidized and non-oxidized particles using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) approach followed by RT-qPCR.

MATERIALS AND METHODS

Production and purification of GII.4 VLPs

Experiments have been performed using GII.4 VLPs (Cairo4strain, a 2007-Osaka variant). The production and purification of GII.4 VLPs were carried out using the baculovirus-expressed VP1 system, as described previously (Rougemont et al., 2011). The concentration of GII.4 VLPs was determined using NanoDrop 2000 spectrophotometer (Nanodrop, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) at 280 nm. The size and purity of VLPs were controlled by TEM and atomic force microscopy (AFM). Purified GII.4 VLPs were diluted at a final concentration of 1 $mg.mL^{-1}$ in TNC buffer (10 mM Tris-HCl, 140 mM NaCl and 10 mM $CaCl_2$, pH 7.4) prior storage at -80°C. Aliquots were thawed extemporaneously before experiments and GII.4 VLPs were diluted in TNC buffer at pH 7.4 at a final concentration of 200 $\mu g.mL^{-1}$.

Purification and concentration of GII.4 HuNoVs

Human feces containing GII.4 HuNoVs were kindly provided by the CHRU of Nancy, France. The genotype of HuNoVs was confirmed as described previously (Ayouni et al., 2015). GII.4 HuNoVs were purified and concentrated as follow. Briefly, 1 g of fecal suspension of GII.4 HuNoVs (10^9 genome copies (gc).g^{-1} of stool) was added to 3 mL of 1X PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4, 1.8 mM KH_2PO_4, pH 7.4) solution. GII.4 HuNoVs were clarified by addition of 1 mL of chloroform, vortexed for 60 sec and centrifuged at 2,500 g for 5 min. The supernatant was submitted to a second clarification step in the same conditions. The recovered samples were then filtered through a 0.22 µm filtration unit (Stericup Millipore Express Plus, Merck Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, Germany). Finally, the suspension was purified by ultracentrifugation using a gradient of cesium chloride (CsCl). GII.4 HuNoV suspension (~ 800 µL) was introduced in a 5 mL tube (Science Services, S9032). Then, 4.2 mL of CsCl prepared with 1X PBS for a final density of 1.44 was added underneath. The whole was then ultracentrifugated (OptimaXE-90, rotor SW40 Ti, Beckman Coulter, Brea, Californie, USA) for 18 h at 160,000 g at 4°C. The fraction corresponding to a density of CsCl of 1.40 was then collected using 25G 5/8" needle. CsCl was then removed by two successive dialyses using Float-A-Lyzer G2 with Biotech Cellulose Ester membranes (MWCO: 100 kDa, volume: 1 mL, Spectra/Por®, Spectrum Laboratories, CA, USA). The dialysis membranes were prepared following manufacturer's instructions. Dialysis then were performed (the first for 7 h, the second was 18 h) in a pre-autoclaved tank containing 10 L of 0.1X PBS at 4°C with gentle

stirring. The recovered samples were then filtered through a 0.22 µm filtration unit (Stericup Millipore Express Plus, Merck Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, Germany).

Extraction and quantification of the genome of GII.4 HuNoV were performed using methods described previously (Robin et al., 2019). Suspensions of GII.4 HuNoV were stored at 4°C in the dark at a final concentration of 3.10^8 gc.mL^{-1} in 0.1X PBS. The protein concentrations of GII.4 HuNoV suspensions was estimated at a final concentration of 44 µg.mL^{-1} using NanoDrop 2000 spectrophotometer (Nanodrop, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), at 280 nm. Suspensions of purified and concentrated GII.4 HuNoVs were used in a 2-month duration.

Oxidation of GII.4 VLPs and GII.4 HuNoVs by HClO and ONOOH

Twenty µL (1v) of GII.4 VLP and 1v of purified GII.4 HuNoV solutions were used for oxidation treatments by HClO and ONOOH. Experiments were performed for VLPs and HuNoVs under the same conditions, using a protocol described previously (Bastin et al., 2020). For HClO treatment, 1v of GII.4 VLPs or HuNoVs was buffered in 1v of 1 M KH_2PO_4 at pH 6.5. Then 1v of HClO was added. The reaction was incubated for 10 min at 20°C +/- 2°C and the reaction was quenched by addition of 1v of 100 mM sodium thiosulfate. The final concentrations of free chlorine were 2; 10; 19; 57; 191; 477; 953; 1,906; 4,766; 9,531; 14,297 and 19,062 µM for a contact time of 10 min at 20°C +/- 2°C. The concentration x time (CT) equivalents were 1; 5; 10; 30; 100; 250; 500; 1,000; 2,500; 5,000; 7,500 and 10,000 mg.min.L^{-1}. For concentration from 191 up to 9,531 µM, no residual free chlorine was detectable after 10 min with GII.4 VLPs. For concentration below 57 µM, residual free chlorine was not be measured because of low volumes used during experiments. HClO concentrations in the results section of the manuscript are given in µM units. HClO stock solution (5 %, Fisher Scientific, 10573094) was diluted in pure water to obtain a 4 g.L^{-1} of HClO. This "working solution" was kept at 4°C in the dark. For each experiment, free chlorine concentration of the working solution was controlled according to the ISO 7393-2 (ISO 7393-2, 2017) procedure using the N, N-diethyl-p-phenylenediamine (DPD, Fisher Scientific, 10741325).

For ONOOH treatment, 1v of GII.4 VLPs or HuNoVs was buffered with 1v of 1 M KH_2PO_4 at pH 7.4. Then 1v of ONOOH (Interchim, 81565) diluted in 0.3 M NaOH was added and the reaction occurred at 20°C +/- 2°C at neutral pH. The final concentrations of ONOOH were 5, 10, 33, 267, and 1,333 µM. The reaction of ONOOH is known to occur within second at neutral pH. Thus, residual ONOOH was not measured after treatment. ONOOH stock solution

was stored at -80°C and the concentration was measured using spectrophotometric absorption at 302 nm following manufacturer's instructions.

Native and oxidized samples of GII.4 VLPs were then analyzed by TEM, DLS, SDS-PAGE, MALDI-TOF Mass spectrometry (MS), and by HBGA-binding assays. Native and oxidized samples of GII.4 HuNoVs were analyzed by SDS-PAGE and by HBGA-binding assays. TEM, DLS and MS have not been applied for HuNoVs because the sensitivity of these approaches was not in compliance with the content of the purified suspensions used in this study.

TEM observations

Ten µL of GII.4 VLPs were observed by TEM without and with oxidation treatments after negative staining with phosphotungstic acid as described previously (Loison et al., 2016). The number of GII.4 VLPs was estimated using 8 representative pictures per field at a magnification of X 15,000, for each condition. The size of GII.4 VLPs was quantified through 8 representative pictures per field at a magnification of X 27,500 using ImageJ software, for each condition (Schindelin et al., 2012). This procedure was applied in two independent experiments in separate days for each oxidant and each concentration.

DLS

GII.4 VLPs treated or not with HClO and ONOOH were studied by DLS. At the end of the oxidative treatment, 1 mL of 0.1X PBS at pH 7.4 was added and each sample was filtered on 0.22 µm cellulose acetate membrane (Stericup Millipore Express Plus, Merck Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) before analysis. The hydrodynamic diameter of GII.4 VLPs was measured using the Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments), as described previously (Brié et al., 2016). Diameter measurements were obtained by means of two independent experiments with triplicate measures for each sample.

SDS-PAGE analysis

GII.4 VLPs and GII.4 HuNoVs treated or not with HClO or ONOOH were analyzed by SDS-PAGE. They were denatured as described previously with minor adjustments (Loison et al., 2016). Briefly, 15 µL of GII.4 VLPs or GII.4 HuNoVs were denatured with 5 µL of 5X Laemmli buffer (2.5 M Tris pH 6.8, 25% (w/v) SDS, 2.5% (w/v) bromophenol blue, 1 M

dithiothreitol (DTT), 70% (v/v) glycerol, distilled water for a final volume of 10 mL). Then, denatured samples were loaded on a discontinuous polyacrylamide gel (4% stacking gel, 10% resolving gel), including a standard size marker (Precision Plus protein Unstained Standards, Biorad, Hercules, CA, USA). Protein migration at 130 V were applied in a Mini-Protean 3 cell set up (Biorad) in a tris-glycine buffer. Gel staining was performed using Oriole fluorescent stain (Biorad) for 60 min and then observed using a Gel Doc system (Loison et al., 2016). The intensity of bands was measured with the ImageJ software (Schindelin et al., 2012). Specifically, each protein band was measured using the same surface area, and wherein the intensity of a protein band was determined as following: Maximum background light intensity - Mean light intensity. The intensity of each protein band was defined for untreated samples (I_0) and oxidized samples (I). The ratio I/I_0 was used to control the evolution of intensities. The intensities were obtained by means of three independent experiments in separate days.

MALDI-TOF Mass spectrometry (MS)

After separation of GII.4 VLP proteins by SDS-PAGE, the protein bands were excised under UV lamp at 253 nm using a scalpel and analyzed by mass spectrometry (MALDI-TOF) to confirm the identity of VP1 protein. Bands were then placed onto clean glass plates to be diced into ~1 mm^3. Scalpel blade was carefully cleaned between processing of each protein band. After each of the following steps, the excesses of solution were discarded. The diced pieces of gel were decolored with 150 µL of destaining solution (*i.e.* 50% Acetonitrile (ACN), 50% 50 mM NH_4CO_3 pH 8.0), vortexed during 1 min and incubated 30 min at room temperature. The solution was then replaced with 100% ACN for 10 min at room temperature for dehydration purposes. A reduction treatment was realized with a 10 mM DTT solution for 30 min at 37°C with gentle shaking, to reduce or break potential disulfide bonds. Then, 150 mM iodoacetamide solution was added to alkylate cysteines and prevent potential disulfide bond formation, it was incubated for 30 min in the dark at room temperature. Two more destaining steps were applied for 15 min respectively, followed by a dehydration step incubated for 10 min at room temperature. The dehydration solution is then discarded, and the dehydrated sampled were air-dried at room temperature to ensure removing all the ACN. Afterward, 50 µL of 50 mM NH_4CO_3 pH 8.0 containing 1 µg of trypsin (T6567 Merck) were added. The samples were incubated on ice for 1 h. Excess of trypsin was removed and replaced by 50 mM NH_4CO_3 pH 8.0 in volume sufficient to cover the cubes of gel, Samples were placed at 37°C for 18 h. Tryptic peptides were extracted by vortexing for ~1 min and by centrifugation at 12 rpm for 5 min with

a bench centrifuge. The solution was then transferred to a new tube and stored at 4°C until being analyzed by MALDI-TOF-MS. The matrices and MALDI-TOF MS methods were as used previously (Bastin et al., 2020).

Specific capsid proteins peptide mass fingerprints were determined by mass spectrometry MALDI-TOF MS. Theoretical masses were obtained by theoretical digestion of capsid proteins of VP1 (protein of GII.4.VLP) using the online software: "PeptideMass" from "ExPaSy", acrylamide adduct and up to one missed cleavage was considered. An inaccuracy of mass up to 20 ppm was tolerated. The sequence of VP1 used as a reference was from the following accession numbers: "GenBank: AIV43156.2". Masses that were found in the blank (SDS-PAGE gel stained with Oriole free of proteins signal following the same protocol of extraction and trypsin digestion) and across proteins samples were disregarded as they would be peptide of autolyze of trypsin or human contaminants. Two independent experiments were performed.

Saliva collection and HBGA extraction

Saliva samples from 15 healthy adult volunteers were collected following the procedures approved by the Nantes University Hospital Review Board (study number BRD02/2-P) (Rougemont et al., 2011). Consent was obtained from all donors and all experiments were performed in accordance with relevant guidelines and regulations. After being collected, human saliva were boiled at 100°C for 5 min and then centrifuged at 10,000 g for 5 min. Supernatants containing HBGAs were stored at – 20°C until use. The presence of A, B and O blood group antigens and Lewis antigens in all samples were determined by ELISA, as described previously (Huang et al., 2005).

HBGA-binding assays

HBGA-binding assays to GII.4 VLPs and GII.4 HuNoVs treated or untreated with HClO or ONOOH were performed using the methods previously described (Chassaing et al., 2020b; Robin et al., 2019). For GII.4 VLPs, 100 µL of native or HClO/ONOOH treated particles, diluted at 0.1, 0.5, and 1.0 $\mu g.mL^{-1}$, were analyzed. HBGA-binding assays were carried out by ELISA including positive and negative controls. For HuNoVs, 100 µL of native and oxidized suspensions at 10^6 gc, pre-treated with RNase A, were analyzed. HBGA-binding to viral capsid was quantified by RNA amplification by RT-qPCR after extraction and purification of the viral genome, including positive and negative controls. The A Lewis-positive (ALe^+) saliva were

used for GII.4 VLPs and HuNoVs since of the highest relative affinity among 8 human saliva tested within our experimental conditions (Chassaing et al., 2020b). Sodium periodate treatment on human saliva was systematically introduced as a negative control. Results were obtained by means of three independent experiments with duplicate measures for each sample.

RNase treatment

All GII.4 HuNoV samples were submitted to RNase treatment in order to eliminate capsid-free RNA genome, as described previously (Brié et al., 2016). To validate the efficacy of the RNase, 20 µL of 10^6 gc.mL^{-1} of MS2 phage capsid free-RNA genome was added in each sample as an internal control. RNase A (Thermo Fischer Scientific, EN0531) was added to a final concentration of 100 µg.mL^{-1}. The reaction was incubated for 1 h at 37°C. The genomes of MS2 phage and GII.4 HuNoV were then extracted and quantified using their specific RT-qPCR primers and probes and procedures (ISO 15216-1, 2017; Ogorzaly and Gantzer, 2006). A complete loss of the detection of the genome of MS2 phage by RT-qPCR was attended to validate results.

Statistical analysis

All statistical analyses were performed using R statistical software (Rx64 v.3.5.3) (R Core Team, 2019). The Shapiro-Wilk test was performed to check the normality of the data with alpha level of 0.05. A paired or unpaired sample Student's t-test was performed for dependent or independent data following a normal distribution, respectively. For dependent or independent data with non-normal distribution, a Wilcoxon signed-rank test or a Mann-Whitney U test was applied. In all tests, the significance level was set to 0.05

RESULTS

Effects of HClO and ONOOH on the GII.4 VLP structure

Effects of HClO and ONOOH on the GII.4 VLP structure were based on two criteria: the size and the number of particles. Three concentrations were tested for each oxidant (953; 4,766 and 9,531 µM for 10 min for HClO; 33, 267 and 1,333 µM for ONOOH) at 20°C +/- 2°C.

DLS allows to measure the hydrodynamic diameter of the particles. The mean size of the native GII.4 VLPs in the control suspension was 49.9 ± 3.2 nm (**Table 1**). Treatment by HClO and

ONOOH slightly increased the size of VLPs in suspension. The size increased significantly to 68.3 and 79,8 nm when the concentration of HClO and ONOOH reached 9,531 µM and 1,333 µM, respectively (*i.e.* $p < 0.01$). The polydispersity index (PdI), which could define the size distribution (i.e. monodisperse for value below 0.1 and polydisperse for value above 0.1) was not significantly modified by treatments. The mean value was about 0.251. Such value of PdI witnesses of a polydisperse VLP suspension. Nevertheless, quality control of size measurement was validated as pdI was less than 0.7 (Malvern Instruments Limited, 2011). Another quality control value is based on Y intercept (*i.e.* signal-to-noise ratio) which should be over 0.6 (Malvern Instruments Limited, 2011). It was about 0.76 ± 0.04 for the control, and gradually decreased with the increase of the concentration of oxidative treatments. For the critical concentrations at 9,531 µM of HClO and 1,333 µM of ONOOH, the Y intercept was below 0.6 describing a degradation of the signal.

TEM observations allows to determine the size measurements as well as an estimation of the numbers of VLPs (**Figure 1**). Two types of particles were identified for the native VLPs in the control at the magnification of X 27,500: a population centered around 23 ± 3 nm and another around 34 ± 6 nm. The small ones represented about 60% of the total VLPs in the control. At the magnification of X 15,000, some 45 to 60 VLPs were observed per field. Treatments by both oxidants slightly decreased the number of VLPs for intermediate concentrations since about 20 to 40 particles per field were still counted. For the critical concentrations at 9,531 µM of HClO and 1,333 µM of ONOOH, the number of VLPs drastically decreased (below 5 VLPs per field).

Together, DLS and TEM analyses highlighted that GII.4 VLPs in suspension is polydispersed with small and larger particles. Critical concentrations at 9,531 µM of HClO and 1,333 µM of ONOOH led to significant disruption of VLPs. For lower concentrations of both oxidants, modifications of the size particle or the numbers of VLPs were not obvious.

Effects of HClO and ONOOH on the major capsid protein (VP1) of GII.4 VLPs

Effects of HClO and ONOOH on VP1 of VLPs were evaluated by SDS-PAGE. Denaturing conditions using DTT, urea and SDS were applied to promote dissociation into VP1 monomers. Notably, native VP1 monomers appeared at their expected masses of 57 and 60 kDa (Huo et al., 2015; Rougemont et al., 2011) (**Figure 2**). Both sizes of VP1 have being described previously by the presence or the absence of the N-terminal amino acid sequence (Huo et al., 2015). Three main bands were observed between 75 to 100 kDa (**Figure 2**). They contained

VP1 as confirmed by MALDI-TOF MS (**Supplementary Figure S1**). Therefore, they may correspond to different kinds of VP1 dimers containing or not the N-terminal sequence (Someya et al., 2011). Finally, a single weak band at ~ 250 kDa was also identified by MALDI-TOF MS to be VP1 (**Figure 2** and **Supplementary Figure S1**). This corresponds probably to multimer forms. Heating at 95°C for 10 min before SDS-PAGE migration can confirm the presence of VP1 in those multimers (**Supplementary Figure S2**). Only the two excepted masses of VP1 at 57 and 60 kDa were observed under such conditions and the intensity of the protein bands have been increased by comparison to the control.

Together, these data demonstrated that SDS-PAGE analysis in denaturing conditions was not sufficient to completely dissociate VLPs into VP1 monomers. VP1 dimers are mainly observed and some VP1 multimers were still present.

Expectedly, HClO and ONOOH treatments changed the SDS-PAGE profiles of VP1 in denaturing conditions (**Figure 2A and 2B**). In a dose response manner until reaching a concentration at 9,531 µM of HClO, the intensity of the VP1 dimers at ~ 75-100 kDa decreased. Simultaneously, VP1 monomers at ~ 50-60 kDa strongly increased, and VP1 multimers at ~ 250 kDa moderately increased (**Figure 2A**). This result suggests that HClO affects the distribution of monomers, dimers and multimers of VP1 in denaturing conditions, and thus the sensitivity of VLPs depending of the concentration of oxidants. SDS-PAGE in denaturing conditions led to disrupt highly stable interactions of VP1 dimers (Someya et al., 2011; Tan et al., 2004) by generating VP1 monomers and, to a less extend, VP1 multimers when native VLPs were treated by HClO below 9,531 µM. For HClO treatment above 9,531 µM, the intensity of all protein bands ranging between 50 and 250 kDa decreased without formation of new bands. Cleavage into small peptides with high size distribution or high aggregation implying that aggregates stay in the starting well may be occurred. For VLPs treated by ONOOH, the SDS-PAGE profiles were similar but with small differences. Profiles were similar because the intensity of VP1 multimers at ~ 250 kDa increased in a dose-dependent manner with the concentration of ONOOH until 1,333 µM (**Figure 2B**). VP1 monomers, at ~ 50-60 kDa, also increased but to a less extend. Conversely, the intensity of VP1 dimers, at ~ 75-100 kDa, decreased progressively with the increase of the ONOOH concentration. Profiles were slightly different because the formation of VP1 multimers were higher than the formation of VP1 monomers when VLPs were treated by ONOOH, by comparison to HClO treatment.

Effects of HClO and ONOOH on the HBGA-binding toGII.4 VLPs

HBGA-binding to GII.4 VLPs was evaluated by ELISA. The specific interactions between ALe^+ and VLPs were confirmed using sodium periodate which induce oxidative cleavages of these complex carbohydrates (*i.e*. negative control) (Maalouf et al., 2010) (**Supplementary Figure S3**). Using 2- and 10-fold dilutions of VLPs, a progressive reduction in VLP binding to HBGAs since the OD_{450} was closed to 1.0 and 0.3, respectively. This means that a decrease of OD_{450} from 1.7 to 0.3 for GII.4 VLPs at 1.0 and 0.1 $\mu g.mL^{-1}$, respectively, led to a reduction of at least 90% regarding the capacity of HBGA-binding to viral particles. Based on this, only VLPs at 1.0 and 0.5 $\mu g.mL^{-1}$ were used in order to be in the dynamic range. For GII.4 VLPs, only VP1 dimers which form the BP were able to interact with HBGAs. Expectedly, a progressive reduction in VLP binding to ALe^+ saliva was evidenced with the increase of the concentration of either HClO or ONOOH (**Figure 3**). Moreover, HClO at 9,531 µM induced a loss of HBGA-binding to VLPs above 90% since the OD/OD_0 ratio was below the limit of detection (**Figure 3A**). Interestingly, this concentration of HClO was the same as that induced major changes of the SDS-PAGE profiles of VP1 in denaturing conditions (**Figure 2A**), but also a significant loss of the number of VLPs using TEM (**Figure 1A**). ONOOH at 267 and 1,333 µM also significantly decreased the capacity of HBGA-binding to VLPs. At 1,333 µM of ONOOH, more than 90% of VLPs were not able to bind to ALe^+ saliva. Important changes of the SDS-PAGE profiles in denaturing conditions and a significant loss of the number of VLPs using TEM were also observed for ONOOH at this concentration (**Figures 1B** and **2B**). Overall, these data showed that GII.4 VLPs loss their capacity to interact with HBGAs for concentration of HClO at 9,531 µM, corresponding to the loss of the VLP structure. As observed from the concentration at 267 µM of ONOOH, the loss of HBGA-binding to VLPs was disrupted before the loss of capsid structure.

Effects of HClO and ONOOH on the capsid proteins ofGII.4 HuNoVs

To validate the results obtained for GII.4 VLPs, SDS-PAGE analysis was performed on GII.4 HuNoVs before and after oxidative treatments. Purified GII.4 HuNoVs from human stools displayed a different SDS-PAGE profile in denaturing conditions compared to GII.4 VLPs after HClO treatment performed in the same conditions (**Supplementary Figure S4**). For GII.4 HuNoVs, only protein bands at ~ 100, 150 and 250 kDa were observable. Unlike ONOOH

treatment for which the concentrations used for GII.4 HuNoVs were comparable to those used for GII.4 VLPs, the concentrations of HClO have been decreased in order to observe protein bands by SDS-PAGE. The same concentrations of HClO than the ones used for VLPs involved a total absence of protein bands observable by SDS-PAGE (data not shown). The tested concentrations of HClO were therefore ranging between 2 and 57 µM. Such treatments decreased progressively the intensity of the most representative protein bands (~ 100, 150 and 250 kDa), and conversely increased the intensity of the VP1 monomers at ~ 60 kDa (**Figure 4A**). Conversely to VLPs, protein bands of HuNoVs could not be confirmed by MALDI-TOF MS because of the low quantity of capsid proteins. For HClO at 57 µM, the intensity of the protein bands of GII.4 HuNoVs have notably decreased compared to the native HuNoVs in the control. This data suggests that the capsid proteins of GII.4 HuNoVs were i) more sensitive to HClO treatment than GII.4 VLPs, ii) highly disrupted above a critical concentration at 19 µM and, iii) less stable under VP1 dimers after HClO treatment. ONOOH treatments changed more moderately the SDS-PAGE profile of GII.4 HuNoVs between 5 and 1,333 µM (**Figure 4B**). Notably, 0 to 33 µM ONOOH did not change the relative intensity of each protein band at ~ 250, ~ 150 and ~ 100 kDa. At 267 and 1,333 µM, the I/I_0 ratio of the overall protein band intensities started to decrease from 1 of the control to ~ 0.8 and ~ 0.7, respectively. No VP1 monomers were observed.

Effects of HClO and ONOOH on the HBGA-binding to GII.4 HuNoVs

Changes in the capacity of HBGA-binding to the capsid of GII.4 HuNoVs after oxidative treatments were finally evaluated using the ALe^+ saliva. HClO treatment significantly decreased the ability of GII.4 HuNoVs to interact with HBGAs in a dose-dependent manner (**Figure 5A**). HBGA-binding to HuNoVs was significantly affected from 10 to 19 µM since more than 90 to 99% (*i.e.* 1.0 to 2.1 $\log_{10}$) of viral particles were not capable to bind to ALe^+ saliva (**Figure 5A**). The latest concentration corresponds to the complete dissociation of capsid proteins of GII.4 HuNoVs as observed by SDS-PAGE in denaturing conditions (**Figure 4A**). Using a direct quantification of the viral genome, $\log_{10}$ reductions of HuNoVs were slightly higher than those observed after HBGA-binding assays prior genome quantification after HClO treatment at 19 µM. As described previously (Chassaing et al., 2020a; Robin et al., 2019), HBGA-binding assays can reduce the over-estimation of the number of intact HuNoV capsids compared to the direct genome detection method after disinfection treatment such as heat, free chlorine or natural ageing. ONOOH treatments did not reduced the HBGA-binding to GII.4

HuNoVs even for the highest concentration at 1,333 µM able to dissociate the capsid proteins of GII.4 VLPs (**Figure 5B**). No reduction of HuNoVs was observed after direct genome quantification in the whole range of ONOOH treatment.

HClO and ONOOH show different impacts to HuNoVs. The first oxidative treatment may abolish interaction with HBGAs because of the dissociation of capsid proteins, especially VP1 dimers, when the critical concentration at 19 µM was reached. This critical concentration is much lower for GII.4 HuNoVs compared to the GII.4 VLPs in the same conditions. The second oxidative treatment have no clear effect on GII.4 HuNoVs in terms of capsid protein dissociation or HBGA-binding to the capsids, including concentration inducing dissociation of VLP capsids

DISCUSSION

This study was performed to define the mechanisms of alteration of the HuNoV capsids after HClO and ONOOH treatments. Both GII.4 VLPs and HuNoVs were investigated using different and complementary approaches.

The size of purified GII.4 VLPs used in our study was comprised between 23 ± 3 nm and 34 ± 6 nm using TEM. This size heterogeneity of particles was explained by the absence or the presence of the N-terminal sequence in VP1, as described previously (Huo et al., 2015). However, both kind of particles express similar antigenicity properties (Jiang et al., 1995; White et al., 1997). The small and larger VLPs represent T=1 (60 VP1 subunits) and T=3 (180 VP1 subunits) icosahedral symmetry, respectively (White et al., 1997). Complete GII.4 HuNoVs, corresponding to viral particles coming from purified human stools and treated by RNase, were also studied. HuNoVs have certainly a T=3 symmetry including VP1 and VP2. The analysis of VLPs by SDS-PAGE in denaturing conditions evidenced that VP1 dimers were the major form with, to a less extend, monomers and multimers. This was previously observed in such conditions (Someya et al., 2011) and VP1 dimers were highly stable in denaturing conditions including urea (Tan et al., 2004). The P domain of VP1 is essential for dimer formation and only VP1 dimers of GII.4 VLPs were able to interact with HBGAs since residues interacting with such ligands were on both monomers (Bu et al., 2008; Cao et al., 2007). Multimers of VP1, observed by SDS-PAGE at ~250 kDa, could be intermediate state residues obtained before the assembly of VLP capsid (Tresset et al., 2013). Only multimers were observed for complete HuNoVs in the same conditions, suggesting the higher stability of HuNoV capsids compared to VLPs.

The effects of HClO treatment on GII.4 HuNoV capsids were refined in this study. The CT values usually applied in disinfection processes for water and food were about 10 and 40 mg.min.L^{-1} in France, respectively (Boudaud et al., 2012; Legifrance, 2006). The CT values required to have a 1.0-2.0 log_{10} reductions of viral inactivation varies between 0.1 and 300 mg.min.L^{-1} for HuNoV surrogates such as canine calicivirus (CaCV), murine norovirus (MNV) and hepatitis A virus (HAV) (Abad et al., 1994; Corrêa et al., 2012; Duizer et al., 2004; Dunkin et al., 2017; Li et al., 2002). Brie et al. (2017) showed a 4.0 log_{10} reduction for MNV using a CT value of 750 mg.min.L^{-1}. The CT values applied to HuNoVs in our study were ranging between 1.0 and 10,000 mg.min.L^{-1} covering the whole spectrum of activity used worldwide. Different mechanisms about the degradation of HuNoV capsids were described after HClO treatments depending on the CT values.

The first step was the modification of amino acid residues directly or indirectly involved in VP1 dimer stabilization without significant disruption of VLPs. It was observed from the concentrations of HClO at 953 µM (CT value of 500 mg.min.L^{-1}) until a critical concentration at 9,531 µM (CT value of 5,000 mg.min.L^{-1}) with an increase of the size particles in a dose dependent manner. Previous studies suggest that both hydrogen bonds and hydrophobic interactions were important to stabilize VP1 dimers (Bu et al., 2008; Cao et al., 2007). It was described for a GII.4 HuNoV strain (VA387) 57 residues from each VP1 subunit having a solvent accessible surface buried upon dimerization (Cao et *al.*, 2007). Among them was found the methionine, cysteine, histidine, tryptophan, tyrosine and lysine amino acid residues, which are known to be highly sensitive to HClO.

For higher concentrations of HClO at 4,766 µM (CT value of 2;500 mg.min.L^{-1}), cross-links appeared between VP1 which increase the presence of VP1 multimers at 250 kDa by SDS-PAGE. The cross-link formation between VP1 monomers have been described previously (Bastin et al., 2020; Meunier et al., 2004), and was involved in the inactivation mechanisms of Coxsackievirus (Padalko et al., 2004).

For the critical concentration of HClO at 9,531 µM (CT value of 5,000 mg.min.L^{-1}), VLPs were completely disrupted as shown by TEM and SDS-PAGE analysis. This CT value is higher than the 500 mg.min.L^{-1} used in a previous study working on GI.4 VLP genotype (Sato et al., 2016) to observe the same effects. In our work, the 9,531 µM of HClO concentration leading to the disruption to VLPs, led also to a significant reduction of the interaction with HBGAs. It shows that the binding pocket of VP1 dimers which interact with HBGAs is not significantly modified by HClO at lower concentrations. Knowing the fact that VP1 dimers were required to specifically interact with HBGAs, the alteration of dimer easily explain the loss of HBGA-

binding to the viral capsid. Finally, concentration of HClO above 9,531 µM highly alter VP1. Sato et al. (2016) also showed consistent results by SDS-PAGE by demonstrating that the intensity of VP1 monomers firstly increase and then decrease with the increasing of the HClO concentration.

For complete HuNoVs, concentration of HClO was drastically decreased compared to those used on VLPs in order to have significant intensities of protein bands using SDS-PAGE analysis. Our results underlined higher sensitivity of complete HuNoVs compared to VLPs against HClO treatment. Whereas concentrations between 191 and 9,531 µM (CT values of = 100-5,000 mg.min.L^{-1}) was applied for VLPs, concentrations between 2 and 57 µM (CT values of = 1-30 mg.min.L^{-1}) were more relevant for complete HuNoVs. This can be easily explained by the higher initial protein concentration of VLPs (200 µg.mL^{-1}) compared to HuNoVs (44 µg.mL^{-1}). The choice to have higher concentration of VLPs was motivated by the high content of proteins required by the DLS, TEM, and MS approaches. Our results showed modifications of purified and complete HuNoV capsids in the whole range of CT values. As described previously, CT values ranging between 1 and 5 mg.min.L^{-1} led to a reduction of 1.0 to 2.0 log_{10} of genomes for purified HuNoVs (Kitajima et al., 2010; Sano et al., 2010; Shin and Sobsey, 2008). Conversely, reduction of 0.4 log_{10} of genome for non-purified HuNoVs was observed using CT values of 2,500 mg.min.L^{-1} (Tung et al., 2013). It was also shown on feline calicivirus (FCV), that the more viruses were purified, the more they were sensitive to HClO (Urakami et al., 2007). Thus, the matrix effect during the oxidative treatment has obviously an important role on virus inactivation. Either way, whether with GII.4 VLPs or with complete GII.4 HuNoVs an increase of VP1 monomers was observed with the increase of HClO. In addition, the instability of the VP1 dimers correlated with the abolition of the interaction with HBGAs. Wang and Tian, (2014) showed a 2.3 log_{10} reduction of HBGA-binding to GII.4 HuNoVs using CT values of 80 mg.min.L^{-1}. Kingsley et al. (2014) evidenced a 1.5 and 4.0 log_{10} reduction of HBGA-binding to GI.1 HuNoVs for CT values of 33 and 173 mg.min.L^{-1}, respectively. Based on our results, we may suppose VP1 dimers of GII.4 and GI.1 HuNoVs may be disrupted at such concentrations used by these authors.

The effect of ONOOH treatment on GII.4 HuNoV capsids was also refined in this study. As the reaction of ONOOH is known to be very fast, CT values were not calculated. It is a physiological oxidant or could be produced by dielectric barrier discharge (DBD) plasma torch (Yamashiro et al., 2018). Concentrations of ONOOH found to inactivate 1.0 to 2 log_{10} of virus surrogates were 2,000 µM for FCV and 800 µM for Qβ and MS2 phages (Bastin et al., 2020; Yamashiro et al., 2018). Again, different steps of the degradation of HuNoV capsids were

observed after ONOOH treatment. For lower concentrations from 5 until 267 µM, an increase of VP1 cross-links have been identified. Dissociation of VLPs could not be observed in such range of concentration. At the same time, significant decrease of the HBGA-binding to viral capsid was observed from 267 µM. Direct or indirect changes in the BP could therefore be suggested. ONOOH oxidize preferentially cysteine and methionine but also some tyrosine and tryptophan (Alvarez and Radi, 2003; Hawkins et al., 2003). Interestingly, the BP of GII.4 HuNoV is composed by seven amino acids (*i.e.* Ser343, Thr344, Arg345, Asp374, Ser441, Gly442 and Tyr443) which are conserved among the GII.4 genotypes (Tan and Jiang, 2014). At the critical concentration of 1,333 µM of ONOOH, VLPs were dissociated. Other regions seem therefore be altered because VP1 dimers became less stable. These results obtained for VLPs were not validated for complete HuNoVs since they express a higher resistance to ONOOH regarding the behaviour of capsid proteins and HBGA-binding in the same conditions. In conclusion, the effect of HClO on HuNoV capsids seems to take place at least on the interactions between VP1 monomers but did not affect the BP. Some cross-links between VP1 also take place to a lesser extent. In conclusion, the action of HClO on GII.4 VLP and GII.4 HuNoV capsid proteins seems to take place on the dimer interactions. Both are sensitives to a critical concentration of 9,531 and 19 µM for GII.4 VLPs and GII.4 HuNoVs, respectively, leading to release mainly VP1 monomers and to a lesser extent, formation of some cross-links forming multimers. For both particles, the dissociation of VP1 dimers abolish the interaction with HBGAs. The action of ONOOH was different whether it was applied to GII.4 VLPs or GII.4 HuNoVs. ONOOH treatment has lower effect on GII.4 HuNoV capsids than for GII.4 VLP especially on the dissociation of VP1dimers and on the interaction with HBGAs, even at a concentration capable of dissociating GII.4 VLPs.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

C.G. and N.B. designed the study. M.C. performed the experiments. G.B. performed MALDI-TOF experiments and analysed results. M.C., G.B. and C.G. analysed the data. M.C., G.B., N.B. and C.G. wrote the manuscript. M.C., G.B. and C.G. prepared the figures. All authors reviewed the manuscript.

FUNDING

The results of this study were obtained within the scope of OxyVir, a project funded by the "Fonds Européen pour les Affaires Maritimes et la Pêche" (FEAMP). This study was also supported by the Joint Technological Unit ACTIA VIROcontrol.

REFERENCES

Abad, F.X., Pintó, R.M., Diez, J.M., Bosch, A., 1994. Disinfection of human enteric viruses in water by copper and silver in combination with low levels of chlorine. Appl. Environ. Microbiol. 60, 2377–2383.

Alvarez, B., Radi, R., 2003. Peroxynitrite reactivity with amino acids and proteins. Amino Acids 25, 295–311. doi:10.1007/s00726-003-0018-8

Ayouni, S., Estienney, M., Sdiri-Loulizi, K., Ambert-Balay, K., de Rougemont, A., Aho, S., Hammami, S., Aouni, M., Guédiche, M.N., Pothier, P., Belliot, G., 2015. Relationship between GII.3 norovirus infections and blood group antigens in young children in Tunisia. Clin. Microbiol. Infect. 21, 874.e1-874.e8. doi:10.1016/j.cmi.2015.05.015

Bastin, G., Loison, P., Vernex-Loset, L., Dupire, F., Challant, J., Majou, D., Boudaud, N., Krier, G., Gantzer, C., 2020. Structural organizations of Qβ and MS2 phages affect capsid protein modifications by oxidants hypochlorous acid and peroxynitrite. Front. Microbiol. 11, 1157. doi:10.3389/fmicb.2020.01157

Beek, J. van, Graaf, M. de, Al-Hello, H., Allen, D.J., Ambert-Balay, K., Botteldoorn, N., Brytting, M., Buesa, J., Cabrerizo, M., Chan, M., Cloak, F., Bartolo, I.D., Guix, S., Hewitt, J., Iritani, N., Jin, M., Johne, R., Lederer, I., Mans, J., Martella, V., Maunula, L., McAllister, G., Niendorf, S., Niesters, H.G., Podkolzin, A.T., Poljsak-Prijatelj, M., Rasmussen, L.D., Reuter, G., Tuite, G., Kroneman, A., Vennema, H., Koopmans, M.P.G., 2018. Molecular surveillance of norovirus, 2005–16: an epidemiological analysis of data collected from the NoroNet network. Lancet Infect. Dis. 18, 545–553. doi:10.1016/S1473-3099(18)30059-8

Boudaud, N., Machinal, C., David, F., Fréval-Le Bourdonnec, A., Jossent, J., Bakanga, F., Arnal, C., Jaffrezic, M.P., Oberti, S., Gantzer, C., 2012. Removal of MS2, Qβ and GA bacteriophages during drinking water treatment at pilot scale. Water Res. 46, 2651–2664. doi.org/10.1016/j.watres.2012.02.020

Brié, A., Bertrand, I., Meo, M., Boudaud, N., Gantzer, C., 2016. The effect of heat on the physicochemical properties of bacteriophage MS2. Food Environ. Virol. 8, 251–261. doi:10.1007/s12560-016-9248-2

Brié, A., Razafimahefa, R., Loutreul, J., Robert, A., Gantzer, C., Boudaud, N., Bertrand, I., 2017. The effect of heat and free chlorine treatments on the surface properties of murine norovirus. Food Environ. Virol. 9, 149–158. doi:10.1007/s12560-016-9271-3

Bu, W., Mamedova, A., Tan, M., Xia, M., Jiang, X., Hegde, R.S., 2008. Structural basis for the receptor binding specificity of Norwalk virus. J. Virol. 82, 5340–5347. doi:10.1128/JVI.00135-08

Cao, S., Lou, Z., Tan, M., Chen, Y., Liu, Y., Zhang, Z., Zhang, X.C., Jiang, X., Li, X., Rao, Z., 2007. Structural basis for the recognition of blood group trisaccharides by norovirus. J. Virol. 81, 5949–5957. doi:10.1128/JVI.00219-07

Chassaing, M., Boudaud, N., Belliot, G., Estienney, M., Majou, D., de Rougemont, A., Gantzer, C., 2020. Interaction between norovirus and Histo-Blood Group Antigens: A key to understanding virus transmission and inactivation through treatments? Food Microbiol. 92, 103594. doi.org/10.1016/j.fm.2020.103594

Chassaing, M., Robin, M., Loutreul, J., Majou, D., Belliot, G., de Rougemont, A., Boudaud, N., Gantzer, C., 2020. The effect of proteolytic enzymes and pH on GII.4 norovirus, during both interactions and non-interaction with histo-blood group antigens. Sci. Rep. 10, 17926. doi:10.1038/s41598-020-74728-z

Chhabra, P., de Graaf, M., Parra, G.I., Chan, M.C.-W., Green, K., Martella, V., Wang, Q., White, P.A., Katayama, K., Vennema, H., Koopmans, M.P.G., Vinjé, J., 2019. Updated classification of norovirus genogroups and genotypes. J. Gen. Virol. 100, 1393–1406. doi:10.1099/jgv.0.001318

Corrêa, A. de A., Carratala, A., Barardi, C.R.M., Calvo, M., Girones, R., Bofill-Mas, S., 2012. Comparative inactivation of murine norovirus, human adenovirus, and human JC polyomavirus by chlorine in seawater. Appl. Environ. Microbiol. 78, 6450–6457. doi:10.1128/AEM.01059-12

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. doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.02.010

Duizer, E., Bijkerk, P., Rockx, B., de Groot, A., Twisk, F., Koopmans, M., 2004. Inactivation of caliciviruses. Appl. Environ. Microbiol. 70, 4538–4543. doi:10.1128/AEM.70.8.4538-4543.2004

Dunkin, N., Weng, S., Jacangelo, J.G., Schwab, K.J., 2017. Inactivation of human norovirus genogroups I and II and surrogates by free chlorine in postharvest leafy green Wash Water. Appl. Environ. Microbiol. 83, e01457-17. doi:10.1128/AEM.01457-17

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. doi:10.1126/science.aaf5211

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. doi:10.1128/AEM.69.7.3965-3969.2003

Hawkins, C.L., Pattison, D.I., Davies, M.J., 2003. Hypochlorite-induced oxidation of amino acids, peptides and proteins. Amino Acids 25, 259–274. doi:10.1007/s00726-003-0016-x

Huang, P., Farkas, T., Zhong, W., Tan, M., Thornton, S., Morrow, A.L., Jiang, X., 2005. Norovirus and histo-blood group antigens: Demonstration of a wide spectrum of strain specificities and classification of two major binding groups among multiple binding patterns. J. Virol. 79, 6714–6722. doi:10.1128/JVI.79.11.6714-6722.2005

Huo, Y., Wan, X., Wang, Z., Meng, S., Shen, S., 2015. Production of norovirus VLPs to size homogeneity. Virus Res. 204, 1–5. doi:10.1016/j.virusres.2015.04.009

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. doi:10.1002/jmv.20423

ISO 7393-2, 1985. Water quality - Determination of free chlorine and total chlorine - Part 2: Colorimetric method using N,N-diethyl-1,4-phenylenediamine, for routine control purposes.

ISO 15216-1. Microbiology of the food chain - Horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus using real-time RTPCR - Part 1: Method for quantification (2017).

Jung, J., Grant, T., Thomas, D.R., Diehnelt, C.W., Grigorieff, N., Joshua-Tor, L., 2019. High-resolution cryo-EM structures of outbreak strain human norovirus shells reveal size variations. Proc. Natl. Acad. Sci. 116, 12828–12832. doi:10.1073/pnas.1903562116

Kingsley, D.H., Vincent, E.M., Meade, G.K., Watson, C.L., Fan, X., 2014. Inactivation of human norovirus using chemical sanitizers. Int. J. Food Microbiol. 171, 94–99. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2013.11.018

Kirk, M.D., Pires, S.M., Black, R.E., Caipo, M., Crump, J.A., Devleesschauwer, B., Döpfer, D., Fazil, A., Fischer-Walker, C.L., Hald, T., Hall, A.J., Keddy, K.H., Lake, R.J., Lanata, C.F., Torgerson, P.R., Havelaar, A.H., Angulo, F.J., 2015. World Health Organization estimates of the global and regional disease burden of 22 foodborne bacterial, protozoal, and viral diseases, 2010: A data synthesis. PLOS Med. 12, e1001921. doi:10.1371/journal.pmed.1001921

Kitajima, M., Tohya, Y., Matsubara, K., Haramoto, E., Utagawa, E., Katayama, H., 2010. Chlorine inactivation of human norovirus, murine norovirus and poliovirus in drinking water. Lett. Appl. Microbiol. 51, 119–121. doi:10.1111/j.1472-765X.2010.02869.x

Legifrance, 2006 Arrêté du 19 octobre 2006 relatif à l'emploi d'auxiliaires technologiques dans la fabrication de certaines denrées alimentaires. https://www.legifrance.gouv.fr/loda/id/LEGITEXT000020667468/2020-12-09/ (accessed 12.9.20)

Li, J.W., Xin, Z.T., Wang, X.W., Zheng, J.L., Chao, F.H., 2002. Mechanisms of inactivation of hepatitis A virus by chlorine. Appl. Environ. Microbiol. 68, 4951–4955. doi:10.1128/AEM.68.10.4951-4955.2002

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. doi:10.1038/nm860

Loison, P., Majou, D., Gelhaye, E., Boudaud, N., Gantzer, C., 2016. Impact of reducing and oxidizing agents on the infectivity of Qβ phage and the overall structure of its capsid. FEMS Microbiol. Ecol. 92. doi:10.1093/femsec/fiw153

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. doi:10.1128/AEM.00148-10

Malvern Instruments Limited, 2011. Dynamic light scattering common terms defined. http://www.biophysics.bioc.cam.ac.uk/wp-content/uploads/2011/02/DLS_Terms_defined_Malvern.pdf.

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. doi:10.1016/S0300-9084(01)01321-9

Meunier, S., Strable, E., Finn, M.G., 2004. Crosslinking of and coupling to viral capsid proteins by tyrosine oxidation. Chem. Biol. 11, 319–326. doi:10.1016/j.chembiol.2004.02.019

Nature's own powerful, non-toxic disinfectant, 2018. Br. Dent. J. 224, 553–553. doi:10.1038/sj.bdj.2018.302

Nordgren, J., Svensson, L., 2019. Genetic susceptibility to human norovirus infection: An update. Viruses 11. doi:10.3390/v11030226

Ogorzaly, L., Gantzer, C., 2006. Development of real-time RT-PCR methods for specific detection of F-specific RNA bacteriophage genogroups: Application to urban raw wastewater. J. Virol. Methods 138, 131–139. doi:10.1016/j.jviromet.2006.08.004

Padalko, E., Ohnishi, T., Matsushita, K., Sun, H., Fox-Talbot, K., Bao, C., Baldwin, W.M., Lowenstein, C.J., 2004. Peroxynitrite inhibition of Coxsackievirus infection by prevention of viral RNA entry. Proc. Natl. Acad. Sci. 101, 11731–11736. doi:10.1073/pnas.0400518101

Polo, D., Schaeffer, J., Teunis, P., Buchet, V., Guyader, L., S, F., 2018. Infectivity and RNA persistence of a norovirus surrogate, the tulane virus, in oysters. Front. Microbiol. 9, 716. doi:10.3389/fmicb.2018.00716

Prasad, B.V.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. doi:10.1126/science.286.5438.287

R Core Team, 2019. R: A language and environment for statistical computing. R Found. Stat. Comput. Vienna, Austria.

Robin, M., Chassaing, M., Loutreul, J., Rougemont, A. de, Belliot, G., Majou, D., Gantzer, C., Boudaud, N., 2019. Effect of natural ageing and heat treatments on GII.4 norovirus binding to histo-blood group antigens. Sci. Rep. 9, 1–11. doi:10.1038/s41598-019-51750-4

Rockx, B.H.G., Vennema, H., Hoebe, C.J.P.A., Duizer, E., Koopmans, M.P.G., 2005. Association of histo–blood group antigens and susceptibility to norovirus infections. J. Infect. Dis. 191, 749–754. doi:10.1086/427779

Rougemont, A. de, Ruvoen-Clouet, N., Simon, B., Estienney, M., Elie-Caille, C., Aho, S., Pothier, P., Pendu, J.L., Boireau, W., Belliot, G., 2011. Qualitative and quantitative analysis of the binding of GII.4 norovirus variants onto human blood group antigens. J. Virol. 85, 4057–4070. doi:10.1128/JVI.02077-10

Sano, D., Pintó, R.M., Omura, T., Bosch, A., 2010. Detection of oxidative damages on viral capsid protein for evaluating structural integrity and infectivity of human norovirus. Environ. Sci. Technol. 44, 808–812. doi:10.1021/es9018964

Sato, J., Miki, M., Kubota, H., Hitomi, J., Tokuda, H., Todaka-Takai, R., Katayama, K., 2016. Effects of disinfectants against norovirus virus-like particles predict norovirus inactivation: Effects of disinfectants on NoV VLPs. Microbiol. Immunol. 60, 609–616. doi:10.1111/1348-0421.12435

Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J.-Y., White, D.J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., Cardona, A., 2012. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. Nat. Methods 9, 676–682. doi:10.1038/nmeth.2019

Shin, G.-A., Sobsey, M.D., 2008. Inactivation of norovirus by chlorine disinfection of water. Water Res. 42, 4562–4568. doi:10.1016/j.watres.2008.08.001

Someya, Y., Shirato, H., Hasegawa, K., Kumasaka, T., Takeda, N., 2011. Assembly of homogeneous norovirus-like particles accomplished by amino acid substitution. J. Gen. Virol. 92, 2320–2323. doi:10.1099/vir.0.033985-0

Tan, M., Hegde, R.S., Jiang, X., 2004. The P domain of norovirus capsid protein forms dimer and binds to histo-blood group antigen receptors. J. Virol. 78, 6233–6242. doi:10.1128/JVI.78.12.6233-6242.2004

Tan, M., Huang, P., Meller, J., Zhong, W., Farkas, T., Jiang, X., 2003. Mutations within the P2 domain of norovirus capsid affect binding to human histo-blood group antigens: Evidence for a binding pocket. J. Virol. 77, 12562–12571. doi:10.1128/JVI.77.23.12562-12571.2003

Tan, M., Jiang, X., 2014. Histo-blood group antigens: a common niche for norovirus and rotavirus. Expert Rev. Mol. Med. 16, e5. doi:10.1017/erm.2014.2

Tresset, G., Le Coeur, C., Bryche, J.-F., Tatou, M., Zeghal, M., Charpilienne, A., Poncet, D., Constantin, D., Bressanelli, S., 2013. Norovirus capsid proteins self-assemble through biphasic kinetics *via* long-lived stave-like intermediates. J. Am. Chem. Soc. 135, 15373–15381. doi:10.1021/ja403550f

Tung, G., Macinga, D., Arbogast, J., Jaykus, L.-A., 2013. Efficacy of commonly used disinfectants for inactivation of human noroviruses and their surrogates. J. Food Prot. 76, 1210–1217. doi:10.4315/0362-028X.JFP-12-532

Urakami, H., Ikarashi, K., Okamoto, K., Abe, Y., Ikarashi, T., Kono, T., Konagaya, Y., Tanaka, N., 2007. Chlorine sensitivity of feline calicivirus, a norovirus surrogate. Appl. Environ. Microbiol. 73, 5679–5682. doi:10.1128/AEM.00083-07

Van Dycke, J., Ny, A., Conceição-Neto, N., Maes, J., Hosmillo, M., Cuvry, A., Goodfellow, I., Nogueira, T.C., Verbeken, E., Matthijnssens, J., de Witte, P., Neyts, J., Rocha-Pereira, J., 2019. A robust human norovirus replication model in zebrafish larvae. PLoS Pathog. 15, e1008009. doi:10.1371/journal.ppat.1008009

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. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2013.11.027

White, L.J., Hardy, M.E., Estes, M.K., 1997. Biochemical characterization of a smaller form of recombinant Norwalk virus capsids assembled in insect cells. J. Virol. 71, 8066–8072.

Wigginton, K.R., Kohn, T., 2012. Virus disinfection mechanisms: the role of virus composition, structure, and function. Curr. Opin. Virol., Virus entry/Environmental virology 2, 84–89. doi:10.1016/j.coviro.2011.11.003

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. doi:10.1021/es3029473

Yamashiro, R., Misawa, T., Sakudo, A., 2018. Key role of singlet oxygen and peroxynitrite in viral RNA damage during virucidal effect of plasma torch on feline calicivirus. Sci. Rep. 8, 17947. doi:10.1038/s41598-018-36779-1

FIGURES

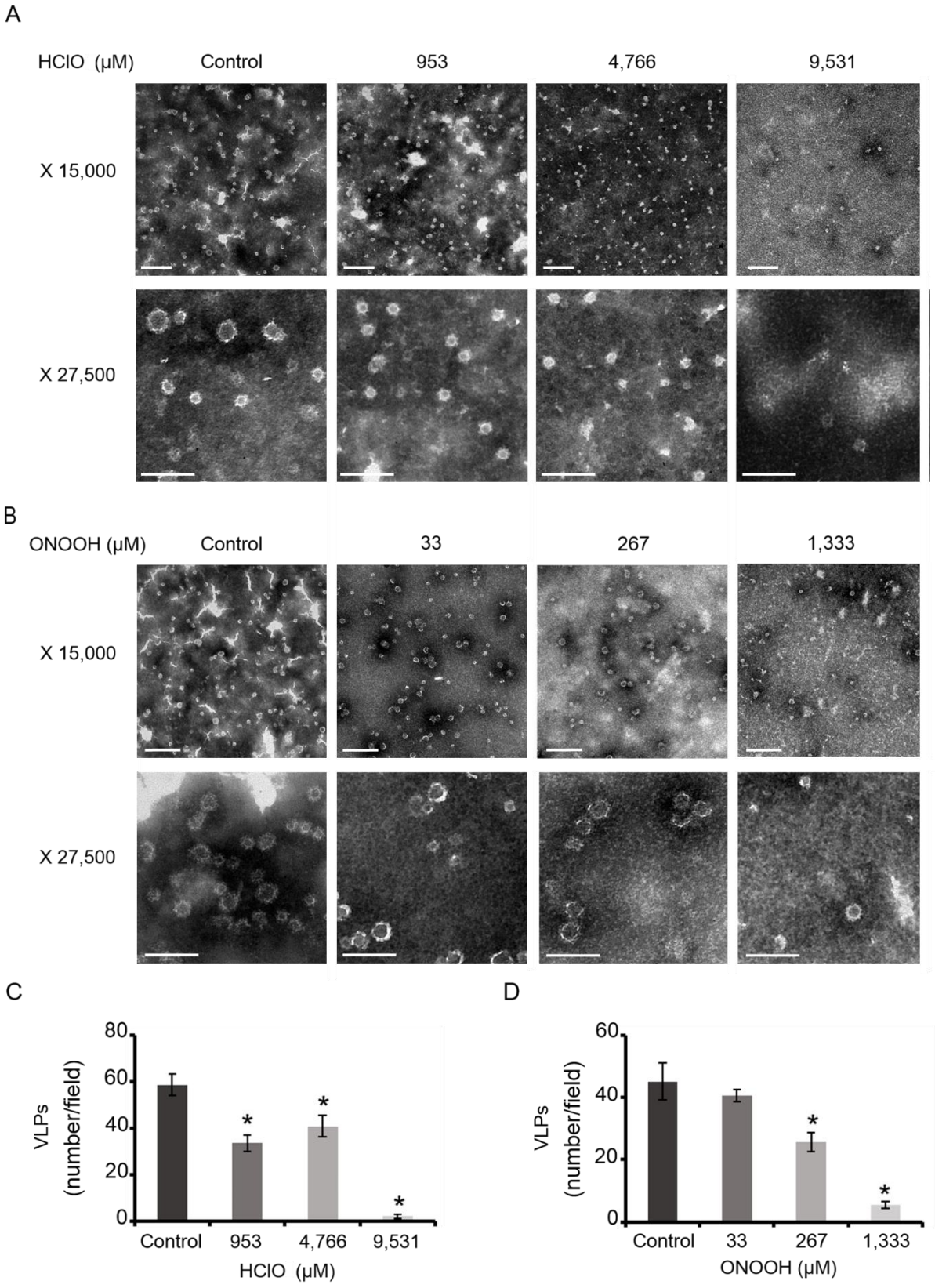

A
HClO (µM)
Control
953
4,766
9,531
X 15,000
X 27,500
B
ONOOH (µM)
Control
33
267
1,333
X 15,000
X 27,500
C
VLPs (number/field)
80
60
40
20
0
Control
953
4,766
9,531
HClO (µM)
D
VLPs (number/field)
60
40
20
0
Control
33
267
1,333
ONOOH (µM)

Figure 1: Morphology of GII.4 VLPs after oxidative treatments. Images captured by TEM at X 15,000 (white scale bar at 0.2 µm) and X 27,500 (white scale bar at 100 nm) of GII.4 VLPs treated without or with HClO **(A)** and treated without or with ONOOH **(B)**. Representative number of GII.4 VLPs per field observed by TEM at X 15,000 were indicated for native and oxidized particles at different concentrations of HClO **(C)** and ONOOH **(D)**. The number of GII.4 VLPs was determined from 8 representative fields which were obtained by 2 independent experiments in separated days. Error bars indicate standard deviations. *Unpaired Student's t-test and Mann-Whitney U test were used to compare groups with $p < 0.01$.

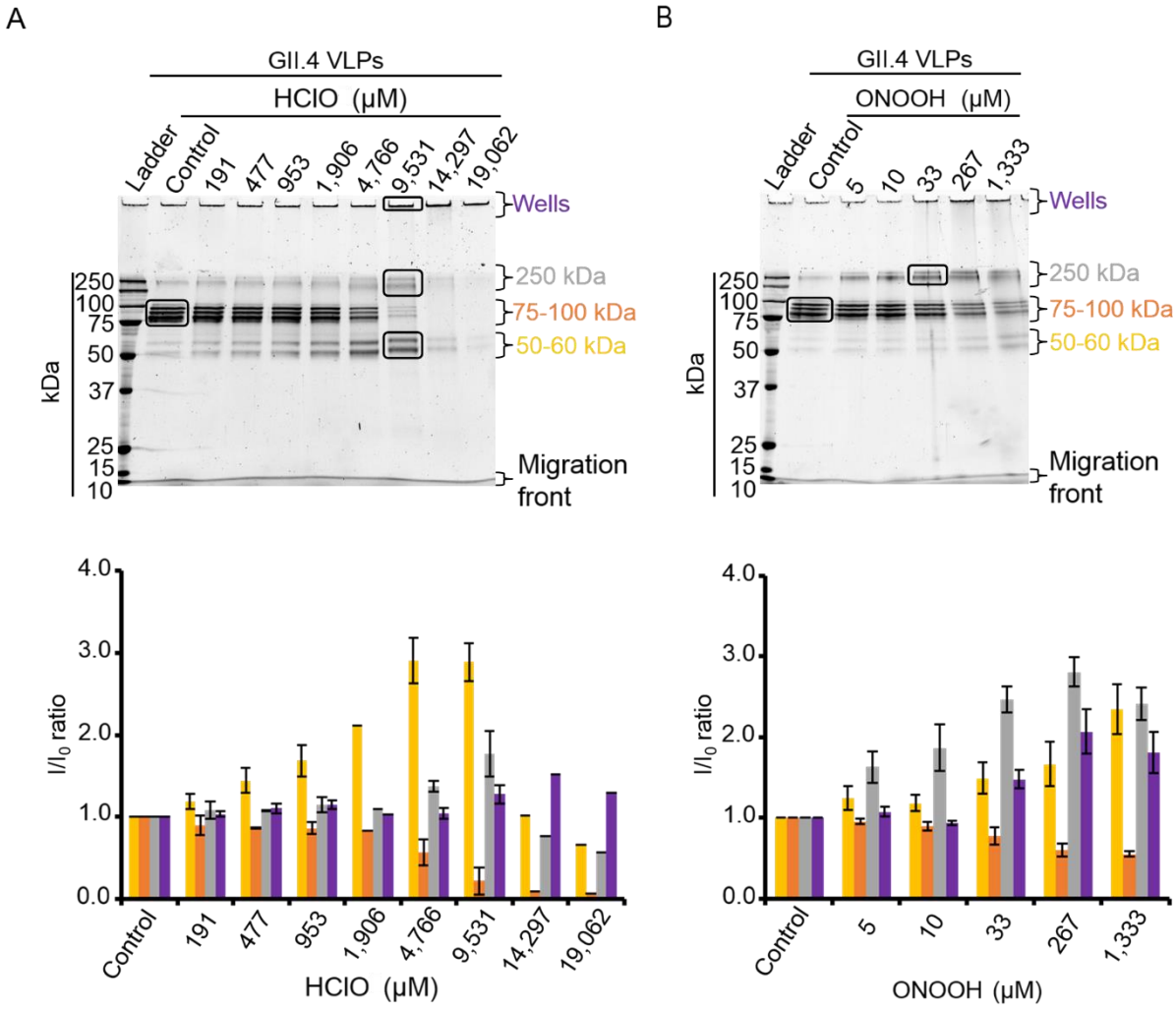


Figure 2: HClO and ONOOH modify the capsid proteins of GII.4 VLPs. GII.4 VLPs were analyzed by SDS-PAGE after treatments by HClO **(A)** or ONOOH **(B)**. The variation of the intensity of protein bands obtained by SDS-PAGE gel were measured for both oxidative

treatments (histograms placed below gels of respective conditions). The intensity of protein bands (I/I_0 ratio) was determined by dividing the mean intensity value of each band obtained at a specific molecular weight after oxidative treatment (I) by the mean intensity values of the same bands obtained in the control without treatment (I_0). Each data point is an average of three independent experiments in separated days (except for VLPs treated by HClO at a final concentration of 14,297 and 19,062 µM where one replicate was performed). The intensity of protein bands was separated in groups, as indicated by the color code on the right side of the gels (50-60 kDa, 75-100 kDa, 250 kDa, and wells in yellow, orange, grey and violet, respectively). Error bars indicate standard deviations. Black rectangles on SDS-PAGE gels correspond to the protein bands which were analyzed by MS.

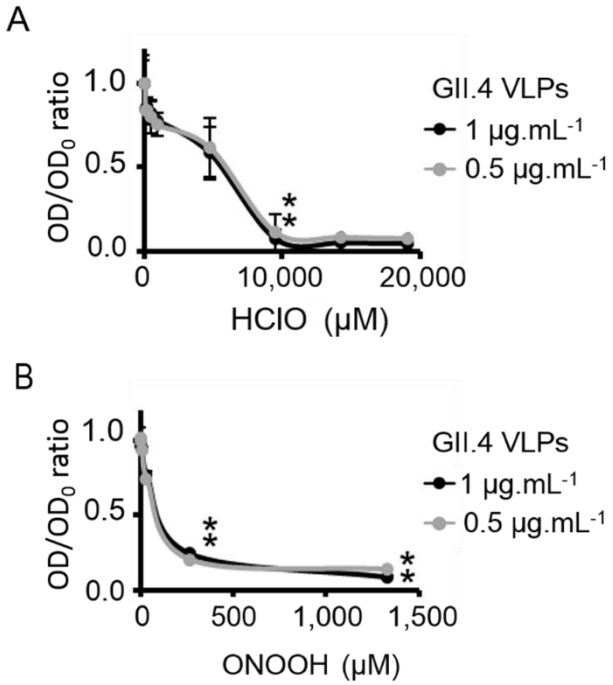


Figure 3: **HClO and ONOOH prevent the HBGA-binding to GII.4 VLPs.** HBGA-binding assays to GII.4 VLPs using ALe^+ saliva after HClO **(A)** and ONOOH **(B)** treatments were presented. The OD/OD_0 ratio values were determined by dividing the mean OD_{450} values obtained by HBGA-binding ELISA at each concentration of oxidant (OD) by the mean OD_{450} values obtained in the control without treatment (OD_0). Two concentrations of GII.4 VLPs were tested: 1 $\mu g.mL^{-1}$ (black circles and line) and 0.5 $\mu g.mL^{-1}$ (grey circles and line). Each data point corresponds to the mean OD_{450} values emanating from three independent experiments with duplicate measure carried out in separated days (except for VLPs treated by HClO at a

final concentration of 14,297 and 19,062 µM where one replicate was performed). Error bars indicate standard deviations. *Unpaired Student's t-test was used to compare groups with $p < 0.01$.

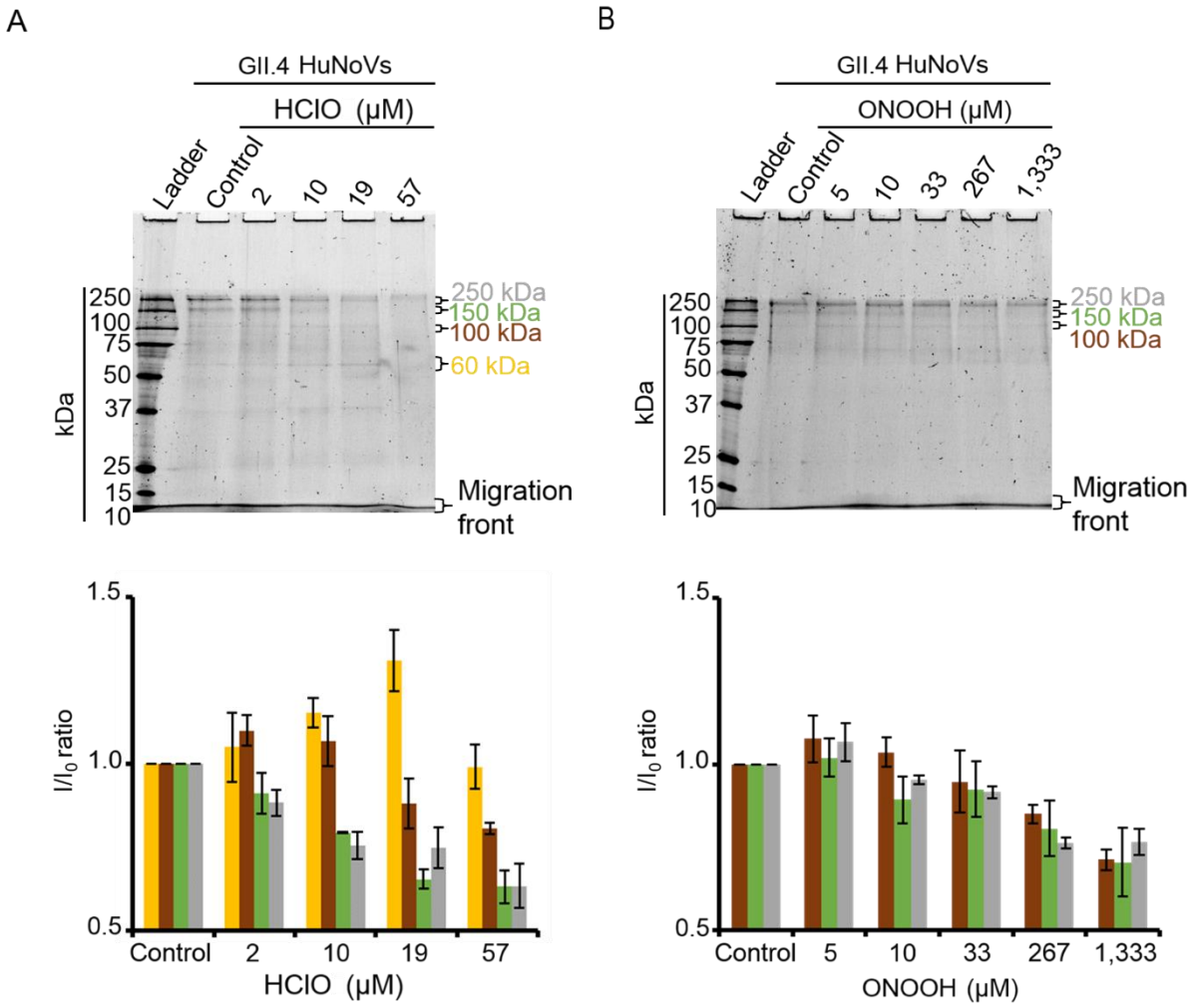


Figure 4: **HClO and ONOOH modify the capsid proteins of GII.4 HuNoVs**. GII.4 HuNoVs were analyzed by SDS-PAGE after treatments by HClO **(A)** or ONOOH **(B).** The variation of the intensity of protein bands obtained by SDS-PAGE gel were measured for both oxidative treatment (histograms placed below gels of respective conditions). The intensity of protein bands (I/I_0 ratio) was determined by dividing the mean intensity value of each band obtained at a specific molecular weight after oxidative treatment (I) by the mean intensity value of the same bands obtained in the control without oxidant (I_0). Each data point is an average of three independent experiments in separated days. The intensity of protein bands was separated in groups, as indicated by the color code on the right side of the gels (60 kDa, 100 kDa, 150 kDa,

and 250 kDa in yellow, brown, green and grey colors, respectively). Error bars indicate standard deviations.

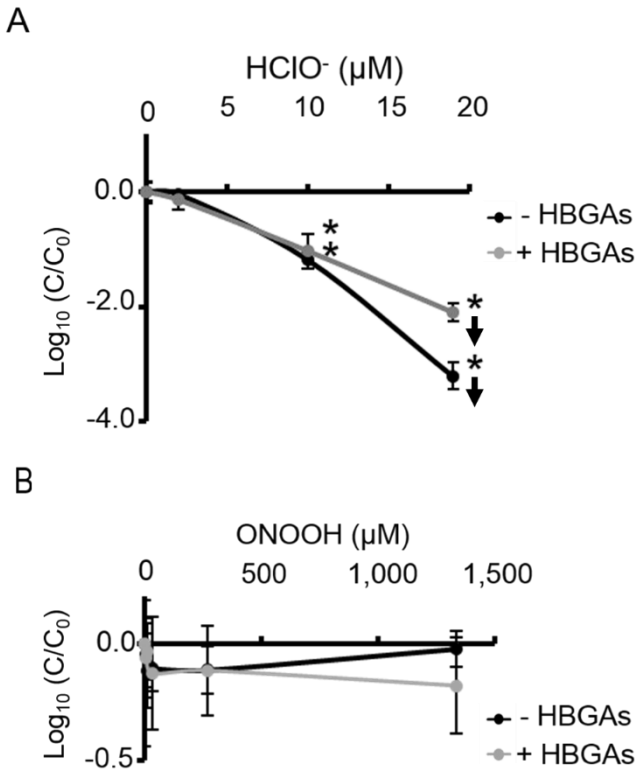


Figure 5: HClO and ONOOH decrease the HBGA-binding to complete GII.4 HuNoVs. HBGA-binding assays to encaspidated GII.4 HuNoVs using ALe^+ saliva after HClO **(A)** and ONOOH **(B)** treatments were presented. Complete HuNoVs correspond to viral particles treated by RNase at a final concentration of 100 µg.mL^{-1} for 1h at 37°C. Black line and grey line represent complete HuNoVs quantified by RT-qPCR and complete HuNoVs after HBGA-binding followed by RNA amplification by RT-qPCR, respectively. The log (C/C_0) values were calculated by dividing the mean GII.4 HuNoV gc values following oxidative treatment (C) by the mean GII.4 HuNoV gc values in the control without treatment (C_0). Each data point corresponds to the mean data values of duplicates of three independent experiments carried out in separated days. Error bars indicate standard deviations. Arrows (↓) mean data below the limite of quantification. *Unpaired Student's t-test and Mann-Whitney U test was used to compare groups with $p < 0.01$.

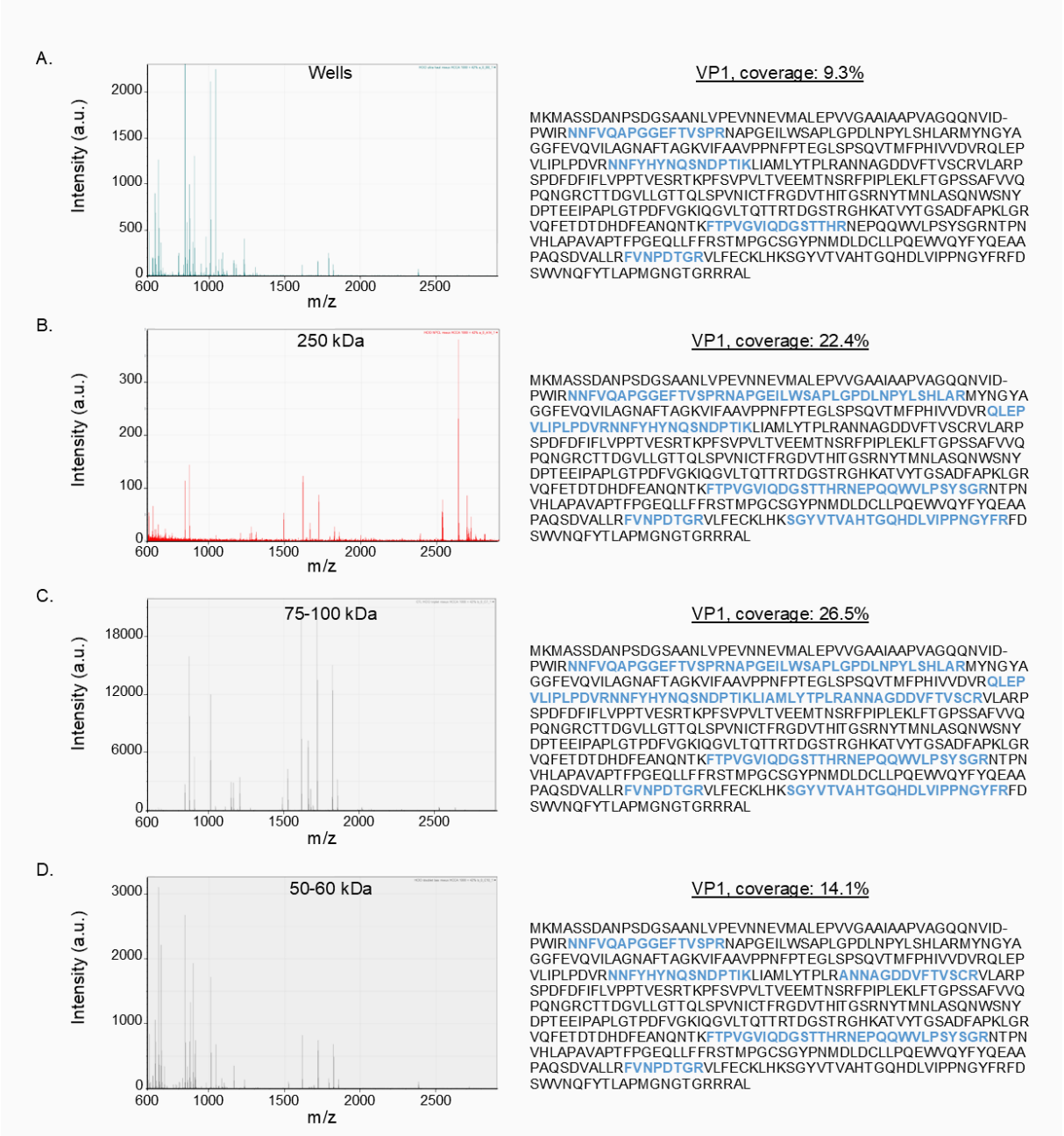
TABLE

Table 1: Size of GII.4 VLPs defined by DLS after oxidative treatments.

		HClO (µM)			ONOOH (µM)		
	Control	953	4,766	9,531	33	267	1,333
Size (nm)	49.9 +/- 3.2	53.7 +/- 2.3	56.1 +/- 2.4	68.3* +/- 1.4	64.9 +/- 4.6	72.9 +/- 9.4	79.8* +/-3.4
PdI[$]	0.297 +/- 0.08	0.297 +/- 0.05	0.194 +/- 0.02	0.200 +/- 0.05	0.301 +/- 0.02	0.255 +/- 0.02	0.261 +/- 0.03
Y[$$]	0.76 +/- 0.04	0.74 +/- 0.05	0.70 +/- 0.01	0.53 +/- 0.02	0.71 +/- 0.04	0.64 +/- 0.01	0.44 +/-0.04

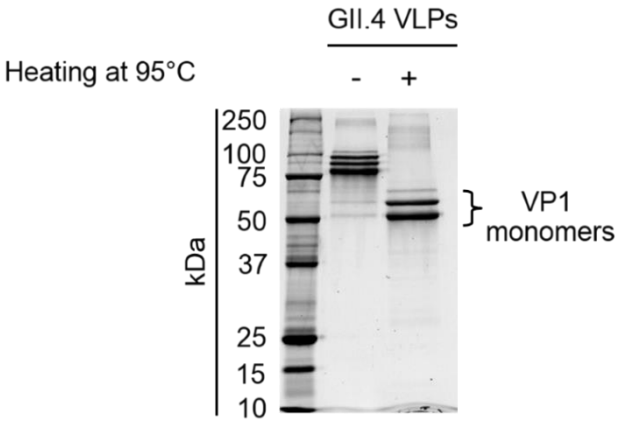
*Unpaired Student's t-test, $p < 0.01$. [$]Polydispersity index. [$$]Intercept value.

SUPPLEMENTAL MATERIALS

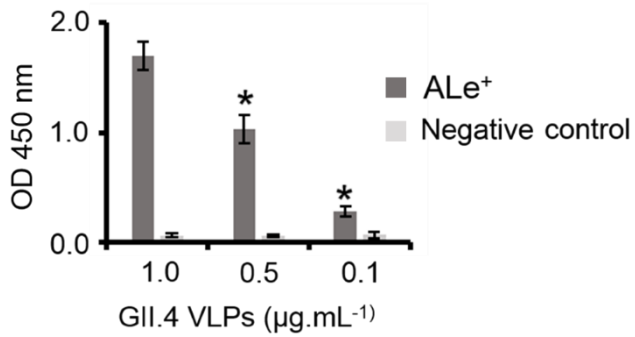


Supplementary Figure S1: MALDI-TOF MS of GII.4 VLP proteins from SDS-PAGE. The left panel displays the spectrum of GII.4 VLPs treated by 9,531 µM HClO, corresponding to the protein bands in the well of the stacking gel by SDS-PAGE after digestion by trypsin **(A)**. The left panel displays the spectrum of GII.4 VLPs treated by 9,531 µM HClO, corresponding to the protein bands at ~250 kDa by SDS-PAGE after digestion by trypsin **(B)**. The left panel displays the spectrum of native GII.4 VLPs, corresponding to the protein bands at ~75-100 kDa by SDS-PAGE and digested by trypsin **(C)**. The left panel displays the spectrum of GII.4 VLPs treated by 9,531 µM HClO, corresponding to the protein bands at ~50-60 kDa by SDS-PAGE

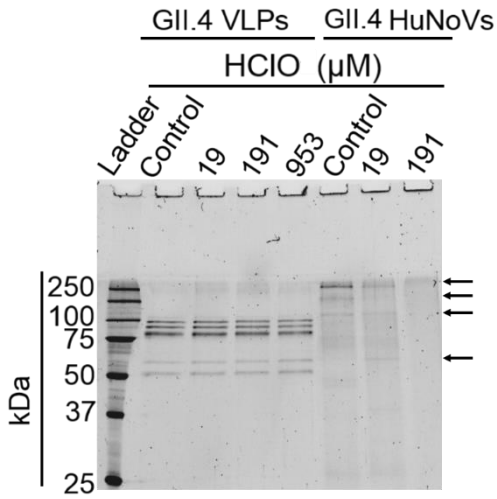
after digestion by trypsin **(D)**. All right panels display the amino acid sequence of theVP1 of GII.4 VLPs. Letters in blue and bold correspond to peptides recovered from the peptide mass fingerprint as obtained in the respective left panels. The data are representative of two independent experiments performed in separate days.



Supplementary Figure S2: Dissociation of VP1 dimers in monomers after heat treatment. "Heating at 95 °C" means that GII.4 VLPs were heated at 95 °C for 10 min before SDS-PAGE analysis. The "+" and "–" signs indicate whether the heat treatment was applied.



Supplementary Figure S3: Sensitivity of HBGA-binding assays to GII.4 VLPs using ALe$^+$ saliva. Each data point corresponds to the mean OD_{450} values of duplicates from three independent experiments carried out in separated days. Negative controls represent the HBGA-binding to GII.4 VLPs using ALe$^+$ saliva treated by sodium periodate. Error bars indicate standard deviations. *Unpaired Student's *t*-test was used to compare groups with $p < 0.001$.



Supplementary Figure S4: Different SDS-PAGE profiles between Capsid proteins of GII.4 HuNoVs and GII.4 VLPs after HClO treatment in the same conditions. GII.4 VLPs (20 µg.mL^{-1}) and GII.4 HuNoVs (44 µg.mL^{-1}) were analyzed by SDS-PAGE in denaturing conditions after treatment by HClO at 19 and 191 µM. The control corresponds to native GII.4 VLPs and GII.4 HuNoVs. Black arrows indicated the main protein bands of GII.4 HuNoVs observable by SDS-PAGE in denaturing conditions.

Discussion et perspectives

Depuis 2010, les virus entériques et plus particulièrement les NoV sont significativement impliqués dans les épidémies alimentaires en Europe et aux Etats-Unis (EFSA, 2019b ; CDC, 2018). De ce fait, il devient urgent de prévenir les épidémies en détectant les NoV pouvant en être responsables. La seule méthode permettant de définir la charge virale infectieuse est la culture cellulaire. En dépit des récents progrès sur la culture *in vitro* des NoV, ces dernières ne sont toujours pas applicables à des fins analytiques car elles sont encore trop longues, trop complexes et coûteuses (Ettayebi *et al*., 2016 ; Van Dycke *et al*., 2019). Pour compenser ce problème, la norme ISO 15216 basée sur la recherche du génome des NoV dans les aliments à risque a été éditée et est utilisée. Cependant, contrairement à la culture cellulaire, la recherche du génome viral ne permet pas de discriminer les NoV infectieux des NoV non infectieux. Ce principal point faible conduit à une surestimation du danger viral dans les aliments et peut entraîner le retrait potentiellement injustifié de lots du marché par application du principe de précaution.

Actuellement, il existe des méthodes plus ou moins robustes qui sont proposées pour dissocier les particules infectieuses et non infectieuses. La plupart d'entre elles sont basées sur la démonstration de l'intégrité du génome ou de la capside virale. L'intégrité du génome, évaluée par l'analyse totale du génome, induit une perte en termes de sensibilité de la RT-PCR. De plus, les dommages au niveau de la capside ne sont pas pris en compte (Manuel *et al.*, 2018; Rodríguez *et al.*, 2009). L'intégrité de la capside virale peut être évaluée par i) l'utilisation de pré-traitement enzymatique (*i.e.* RNase) ou d'agents intercalants (*i.e.* propidium monoazide (PMA) ou de l'ethidium monoazide (EMA)) avant détection du génome, ii) par la présence de dommages oxydatifs sur la capside et, iii) par la capacité de liaison avec un ligand spécifique comme les HBGA. Il est plus ou moins établi que la RNase ou les agents intercalants peuvent pénétrer les capsides fortement endommagées ou détruites en empêchant l'amplification du génome par RT-PCR. Cependant, le génome des particules virales avec des capsides faiblement endommagées ou agrégées ne semblent pas ou faiblement accessibles à ces agents (Escudero-Abarca *et al.*, 2014; Nuanualsuwan et Cliver, 2003, 2002). L'accumulation des groupes carbonyles sur les protéines de capside a également été corrélée avec la perte du caractère infectieux pour l'astrovirus et le MNV (Sano *et al.*, 2015, 2010). Cependant, ces groupements carbonyles ne seraient présents qu'après un traitement oxydant des virus. Enfin, certains ligands (*i.e.* anticorps, aptamères) sont utilisés en supposant que seuls les génomes des capsides intactes seront capturés, extraits et amplifiés. Malheureusement, les sites d'adhésion à ces ligands ne

correspondent pas toujours au site du récepteur cellulaire. Ainsi, des capsides faiblement dénaturées ou endommagées pourraient encore adhérer à ces ligands (Moore *et al.*, 2016).

La reconnaissance du récepteur cellulaire pourrait constituer un critère de différenciation entre un virus infectieux et un virus dont la capside n'est plus fonctionnelle. Cependant, cela doit être vérifié et validé. L'interaction entre les HBGA et les NoV a largement été montrée comme favorisant l'infection des NoV chez l'Homme. Cependant le rôle précis des HBGA est encore mal décrit dans la littérature. S'agit-il uniquement de (co)-récepteurs / (co)-facteurs cellulaires ou peuvent-ils aussi avoir un rôle de protection vis-à-vis des facteurs inactivant rencontrés dans le système digestif humain ?
Pour tenter de répondre cette question mais aussi pour préciser l'évolution de l'interaction avec les HBGA au cours de l'inactivation des NoV, l'intégrité de la capside a été étudiée par différentes méthodes complémentaires. La microscopie électronique a permis une observation qualitative de la structure globale de la capside. La DLS a apporté des informations supplémentaires sur la taille. La sonde SYPRO orange a permis de déterminer la température de dissociation des particules virales (*i.e.* Tm). L'intégrité de la protéine majoritaire de capside VP1, dans des conditions dénaturantes, a été évaluée par SDS-PAGE. Les HBGA ont été utilisés, par ELISA, pour définir si les NoV pouvaient s'y fixer spécifiquement au niveau de la BP. Enfin, les RNases ont été employées pour savoir si le génome des particules virales était accessible ou non. Toutes ces approches combinées apportent des informations complémentaires et précises sur l'intégrité de la capside. Dans notre étude, nous avons travaillé avec les NoV GII.4 car c'est le plus prévalent dans les épidémies à NoV à travers le monde (*i.e.* 70-80%) (Kroneman *et al.*, 2008; Vega *et al.*, 2013). Les NoV ont été récupérés et purifiés à partir de selles de patients symptomatiques mais également avec des VLP GII.4. Ces dernières ont l'avantage d'être produites en grande quantité, peuvent être purifiées et peuvent ainsi être analysables par toutes les méthodes citées ci-dessus (*i.e.* MET, DLS, SDS-PAGE, ELISA, et SYPRO Orange). De plus, les VLP présentent les mêmes caractéristiques morphologiques et antigéniques que les NoV (White *et al.*, 1997). Elles présentent enfin le même profil d'interaction avec les HBGA.

A partir de nos résultats, il est intéressant de discuter de deux points directement liés à nos objectifs. Le premier point qui sera discuté concerne la protection potentielle des NoV par les HBGA vis-à-vis de facteurs physiologiques inactivant retrouvés dans le système digestif humain (*i.e.* pH acide, enzymes protéolytiques). Le deuxième point concerne l'évolution des

interactions avec les HBGA au cours de l'inactivation virale (*i.e.* vieillissement naturel, chaleur, oxydants). Enfin, la manière dont ces résultats peuvent s'intégrer dans une réflexion de développement méthodologique pour discriminer les virus infectieux des non infectieux sera discutée.

Le pH et les enzymes protéolytiques peuvent avoir un effet délétère sur l'intégrité des capsides et dans ce cas, l'effet protecteur de la liaison des NoV aux HBGA peut être discuté. La possibilité de certains NoV à se fixer à des cellules (*i.e.* lamina propria, glande de brunner, et les cellules épithéliales) indépendamment de la présence des HBGA (Chan *et al.*, 2011; Murakami *et al.*, 2013), à provoquer des épidémies quels que soient les phénotypes Lewis ou ABO des individus sécréteurs (Nordgren *et al.*, 2010), et enfin à infecter des personnes non sécrétrices (Carlsson *et al.*, 2009; Karangwa *et al.*, 2017), laisse supposer que le rôle des HBGA ne peut pas être réduit à celui de (co)-récepteurs. Dans ce contexte, il est donc possible de proposer une hypothèse selon laquelle les HBGA salivaires protègeraient les NoV lors du passage dans le système gastro-intestinal. Pour vérifier cette hypothèse, l'interaction des HBGA avec les NoV GII.4 en présence de divers facteurs inactivant naturellement présents dans le système digestif humain a été investiguée.

Les effets du pH acide et de trois enzymes protéolytiques (*i.e.* pepsine, trypsine et chymotrypsine) sur l'intégrité de la capside ont été étudiés sur des VLP et les NoV GII.4. La stabilité de la capside diffère clairement entre les VLP et les NoV appartenant pourtant au même génotype.

Les dimères constituant les VLP étaient naturellement déstructurés en monomères VP1 lorsqu'elles étaient traitées à un pH acide inférieur à 2,0. La digestion totale des monomères VP1 a été observée après traitement avec la pepsine, la trypsine et la chymotrypsine, indiquant l'accessibilité des sites de clivage. Néanmoins, lorsque les monomères VP1 étaient assemblés en VLP, la digestion enzymatique n'était pas totale, en particulier à des doses plus faibles d'enzymes protéolytiques (*i.e.* 0,1 $mg.mL^{-1}$). Ainsi, la protéine VP1 était plus sensible à la digestion enzymatique sous sa forme isolée que lorsqu'elle était assemblée sous forme de VLP GII.4, comme décrit précédemment pour les VLP GI.1 (Hardy *et al.*, 1995). En revanche, après des traitements avec des concentrations de trypsine et de chymotrypsine supérieures à 100 $mg.mL^{-1}$ et des concentrations de pepsine supérieures à 1 500 $unités.mL^{-1}$, les VLP étaient totalement déstructurées et les VP1 digérées.

Contrairement aux VLP GII.4, aucune dissociation des NoV GII.4 n'a été obtenue dans les mêmes conditions, quelle que soit la concentration d'enzyme utilisée. Dans le but d'évaluer si ces enzymes pouvaient réellement perturber les capsides des NoV GII.4, la stabilité des NoV face à un gradient de température après traitements par ces mêmes enzymes protéolytiques, a été étudiée. Globalement, aucune différence par rapport aux capsides des particules virales natives non traitées n'a été observée. De façon intéressante, aucune réduction des génomes des NoV GII.4 n'a été détectée après un traitement à la chymotrypsine à 100 $mg.mL^{-1}$ sur toute la plage de traitement thermique, soulignant la stabilité potentielle de la capside des NoV. Au contraire le génome viral semblait être protégé pour les plus fortes concentrations en enzymes. Cet effet protecteur pourrait également être possible avec un pH acide et en présence de pepsine. Ce phénomène pourrait s'expliquer par l'agrégation des particules virales qui maintiendrait l'intégrité des particules (Samandoulgou *et al.*, 2015).

Enfin, l'effet protecteur des HBGA sur les capsides de VLP GII.4 a été étudié en utilisant une salive humaine Ale^+ de forte affinité avec la capside avant les traitements par les enzymes protéolytiques. Ne montrant aucune preuve de dissociation des NoV GII.4 par ces mêmes enzymes protéolytiques, aucun essai n'a été réalisé avec les HBGA. Globalement, quelles que soient l'enzyme ou la concentration étudiée, l'analyse SDS-PAGE n'a montré aucune différence entre les échantillons avec et sans liaison préalable des HBGA aux VLP. Ainsi, nous n'avons trouvé aucune preuve que les HBGA salivaires de type ALe^+ fournissaient un effet protecteur sur l'intégrité de la capside des VLP contre ces enzymes protéolytiques. Plusieurs hypothèses peuvent être émises sur la base de ces observations. La première est que les sites de clivage de la pepsine, de la trypsine et de la chymotrypsine ne sont pas situés dans les régions entourant le site de liaison aux HBGA dans le sous-domaine P2 de VP1. La seconde est que l'encombrement stérique causé par les HBGA n'était pas suffisant pour empêcher la digestion de la capside par ces enzymes protéolytiques.

En conclusion sur le potentiel rôle des HBGA dans le cycle d'infection des NoV chez l'Homme, nous avons démontré que les HBGA ne semblent pas être des agents protecteurs des VLP de NoV face aux pH acides et aux enzymes protéolytiques retrouvés au niveau du tractus digestif. Notre étude présente pour la première fois à notre connaissance, que la salive humaine contenant des HBGA n'influence pas la stabilité de la capside lorsqu'elle est exposée à des facteurs d'inactivation naturellement présents dans le système digestif humain. Cependant, il est possible que la présence de sels biliaires ou de cations divalents favorise la stabilité de la capside (Ettayebi *et al.*, 2016; Graziano *et al.*, 2019; Kilic *et al.*, 2018). Il ne faut pas non plus

oublier la présence du microbiote intestinal qui pourrait être impliqué dans la protection des NoV par le biais d'interaction aux pseudo-HBGA présents à la surface des bactéries (Almand *et al.*, 2019; Miura *et al.*, 2013).

Le deuxième point de discussion concerne l'évolution des interactions spécifiques entre les HBGA et la capside au cours de l'inactivation virale. Elle a été étudiée sur des VLP et des NoV GII.4 en fonction d'un vieillissement naturel, de la chaleur et des oxydants.

Dans le cas du vieillissement naturel à 20°C, à notre connaissance, aucune étude n'en a décrit les effets sur l'intégrité de la BP des NoV. Au cours de ce processus d'inactivation, les NoV ont perdu progressivement leur capacité d'adhésion aux HBGA, alors que leurs génomes étaient toujours détectés en suspension. Ce résultat suggère une modification de la capside au cours du temps. Ainsi, deux types de populations ayant un génome encapsidé ont été mises en évidence : celles qui étaient capables d'interagir avec les HBGA (T_{90} estimé à 166 jours) et celles qui ne l'étaient pas (T_{90} estimé à 294 jours). Par comparaison avec les VLP GII.4, la perte de la capacité d'adhésion aux HBGA était 4,3 plus rapide que celle des NoV. Ce résultat indique clairement que les VLP sont beaucoup moins stables que les NoV dans le temps à 20°C. L'absence de génome ou de la protéine VP2 semble influencer la stabilité des particules (Bertolotti-Ciarlet *et al.*, 2003; Dykeman *et al.*, 2013; Snijder *et al.*, 2013).

Lors du vieillissement naturel, l'influence de la force ionique à 10 mM et 150 mM à pH 7,4 a été évaluée. Globalement, la stabilité des VLP GII.4 était faiblement affectée pour les deux conditions testées. Dans certaines études, les VLP GII.4 sont conservées à haute force ionique (*i.e.* 0.5 M NaCl) alors que pour les VLP GI.1, celles-ci sont plus stables en eau désionisée (da Silva *et al.*, 2011). Cette différence de stabilité a été également décrite entre les VLP GI.1 et le GII.17. Le GII.17 serait stable à faible et forte force ionique (*i.e.* VLP majoritairement composées de 180 copies de VP1 à 50 ou 250 mM) à pH 7. Alors que le GI.1 serait plus stable à forte force ionique (*i.e.* 250 mM) qu'à faible force ionique (*i.e.* VLP majoritairement composées de 80 et 60 copies de VP1 à 50 mM) (Pogan *et al.*, 2018b). Cette différence de stabilité pourrait être due à une caractéristique de la capside qui entraîne également une stabilisation stérique. La force ionique peut également jouer un rôle dans l'adhésion du virus avec un support ou une autre molécule pouvant être dans notre cas les HBGA. En effet, nos résultats montrent une plus forte interaction du virus avec les HBGA à forte force ionique. Compte tenu du pI des VLP GII.4, estimé entre pH 4,2 à 6,9 (Goodridge *et al.*, 2004; Samandoulgou *et al.*, 2015), la charge globale des particules à pH 7,4 est négative dans les

conditions testées. En augmentant la force ionique, la double couche électrique de particules virales et la surface des HBGA pourraient être criblées par des contres ions, conduisant à une diminution des interactions électrostatiques répulsives et à une augmentation des interactions hydrophobes entre les VLP et les HBGA.

Lorsque les VLP et les NoV étaient soumis à un traitement thermique, leurs comportements étaient similaires avec une perte d'adhésion aux HBGA à 72°C, respectivement, au bout de 10 et 3 min. Cette perte d'adhésion était en lien avec une déstructuration des particules virales comme cela a été observée en microscopie électronique : les VLP étaient toujours visibles à 50 et 60°C mais à 72°C, plus aucune VLP n'était distinguable. Cette déstructuration des capsides a déjà été observée à 68°C (Moore *et al.*, 2017). Ausar *et al.* (2006) ont également montré que la structure quaternaire native des NoV GI.1 est maintenue jusqu'à 60°C mais des perturbations irréversibles de la capside se produisent au-dessus de 65°C. Des changements structurels dans les protéines de capside et/ou une perte d'affinité de liaison avec les cellules hôtes pourraient survenir au-dessus d'une température critique, comme démontré pour le virus modèle MS2 à 72°C (Wigginton *et al.*, 2012b). En fonction du temps de contact, une plage de température critique comprise entre de 60°C et 72°C conduisant à la rupture de la capside peut être proposée pour les VLP ainsi que pour les NoV. La même plage de température critique a également été suggérée pour le MNV (Brié *et al.*, 2017). Les données de la littérature associées à celles obtenues dans cette étude permettent de préciser le processus d'inactivation vis-à-vis de la chaleur. Des études réalisées sur le poliovirus tendent à montrer que l'exposition du virus à la chaleur entraîne une séparation d'une ou de plusieurs protéines de capside de la particule virale, causant une altération des propriétés physiques de la particule virale. Puis s'ensuit une libération de l'ARN viral (Breindl, 1971; Levy *et al.*, 2010) sans impact pour ce dernier (Pecson *et al.*, 2009; Wigginton *et al.*, 2012b). Cette séparation des protéines de capside pour les NoV pourrait donc raisonnablement se produire dans cette plage de température critique (*i.e.* entre 60 et 72°C) (Brié *et al.*, 2017, 2016; Robin *et al.*, 2019). Pour des températures inférieures, les mécanismes d'inactivation virale semblent être principalement dus à des modifications ou des altérations mineures de la capside, car le génome viral n'était pas accessible aux RNases.

Parmi les traitements d'inactivation, l'effet du HClO sur la capside des NoV a également été étudié. Pour les virus modèles de NoV (*i.e.* CaCV, MNV) ou encore le VHA, la concentration requise pour avoir une inactivation entre 1,0 et 2,0 $\log_{10}$ varie entre un Ct (concentration multipliée par le temps de contact) de 0,1 et 300 mg.min.L^{-1} (Corrêa *et al.*, 2012; Duizer *et al.*,

2004a; Dunkin *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2002). Brié *et al.* (2017) ont obtenu une réduction de 4,0 log_{10} pour le MNV avec un Ct d'environ 750 mg.min.L^{-1}. Dans notre étude, les valeurs de Ct appliquées aux NoV étaient comprises entre 1 et 10 000 mg.min.L^{-1}, permettant ainsi de couvrir l'ensemble du spectre d'activité de la désinfection par le chlore. Il a globalement été observé que pour des concentrations variant de 953 µM (*i.e.* Ct = 500 mg.min.L^{-1}) jusqu'à une concentration critique de 9 531 µM (*i.e.* Ct = 5 000 mg.min.L^{-1}), la taille des particules virales était augmentée de manière dose-dépendante. Les domaines P formant les dimères de VP1 sont connectés entre eux par une étroite interface stabilisée par des interactions hydrophobes et hydrogènes (Bu *et al.*, 2008; Cao *et al.*, 2007). Pour une espèce de VLP GII.4 (VA387), il y a un total de 57 résidus, présent sur chaque monomère, ayant une surface accessible aux solvants, bien qu'elle soit enfouie dans le dimère de VP1 (Cao *et al.*, 2007). Parmi eux, au moins 6 appartiennent aux résidus d'acides aminés connus comme étant hautement sensibles à HClO (*i.e.* méthionine, cystéine, histidine, tryptophane, tyrosine, lysine). D'autre part, aux alentours de 4 766 µM, des liaisons covalentes (ou des interactions fortes) entre les protéines VP1 semblaient apparaître, augmentant la présence de multimères de VP1 à haut poids moléculaire à environ 250 kDa. L'apparition de liaisons covalentes entre les monomères de VP1, suite à des traitements oxydatifs, a déjà été décrite (Bastin *et al.*, 2020; Meunier *et al.*, 2004). Ces liaisons covalentes peuvent être la raison d'une inactivation virale, comme c'est le cas pour le virus Coxsackie (Padalko *et al.*, 2004). Au-delà d'une concentration critique établie à 9 531 µM (Ct = 5 000 mg.min.L^{-1}), les VLP étaient déstructurées comme observées par MET et cette concentration était corrélée avec l'apparition majoritaire des monomères de VP1 en gel SDS-PAGE. Sato *et al.*, (2016) ont montré par SDS-PAGE des similitudes avec nos résultats dans la façon dont le signal des monomères de VP1 augmentait d'abord puis diminuait avec l'augmentation de la concentration en HClO. C'est d'ailleurs avec cette concentration de 9 531 µM en HClO que l'interaction de la capside des VLP GII.4 avec les HBGA a été significativement réduite dans nos travaux. Cela montre que la BP des dimères de VP1 qui interagissent spécifiquement avec les HBGA n'est pas significativement modifiée par HClO pour des concentrations plus faibles. Sachant que les dimères de VP1, pour le génotype GII.4, sont nécessaires pour interagir avec les HBGA, l'altération du dimère explique elle-même la perte de capacité d'interaction avec un tel ligand.

Concernant les NoV GII.4 complets, les études montrant des modifications de NoV dans notre gamme de Ct (*i.e.* 1 à 30 mg.min.L^{-1}) sont courantes pour des NoV hautement purifiés. Un Ct entre 1 et 5 mg.min.L^{-1} a donné une réduction de 1,0 à 2,0 log_{10} du génome des NoV GII.4

purifiés (Kitajima *et al.*, 2010; Sano *et al.*, 2010; Shin et Sobsey, 2008). Au contraire, le génome des NoV GII.4 non purifiés n'a été réduit que de 0,4 log_{10} pour un Ct de 2 500 mg.min.L^{-1} (Tung *et al.*, 2013). Il a également été démontré sur des FCV que plus les virus étaient purifiés, plus ils étaient sensibles au HClO (Urakami *et al.*, 2007). De ce fait, l'effet matrice pendant le traitement oxydatif a un rôle important lors de la désinfection. Le profil d'inactivation était similaire entre les VLP et les NoV : une augmentation des monomères de VP1 était observée avec une augmentation de la concentration en HClO. De plus, l'abolition de l'interaction spécifique avec les HBGA n'a été observée que lorsque les dimères de VP1 étaient instables. Wang et Tian (2014) ont montré une perte d'interaction de 2,3 log_{10} pour les HBGA pour un Ct de 80 mg.min.L^{-1} pour les NoV GII.4. Kingsley *et al.* (2014) ont, pour leur part, montré une réduction de de l'interaction des HBGA avec les capsides de NoV GI.1 de 1,5 log_{10} et 4,0 log_{10} pour des Ct de 33 et 173 mg.min.L^{-1} respectivement. À la lumière de nos résultats, nous pouvons supposer que les dimères de VP1 des NoV peuvent être perturbés à ces concentrations.

Enfin, l'effet du ONOOH sur les capsides des NoV a également été évalué. Les concentrations trouvées pour inactiver entre 1,0 et 2,0 log_{10} par le ONOOH étaient de 2 000 µM pour le FCV et de 800 µM pour les bactériophages Qβ et MS2 (Bastin *et al.*, 2020; Yamashiro *et al.*, 2018). Dans notre étude, la concentration la plus basse à 5 µM a permis d'augmenter la formation de liaisons covalentes entre les monomères de VP1 jusqu'à 267 µM. La dissociation des VLP n'a pas pu être observée dans une telle gamme de concentration. Cependant, c'est à 267 µM qu'une diminution significative de l'interaction des HBGA avec la capside virale a été observée. Le ONOOH oxyde en particulier la cystéine et la méthionine mais aussi la tyrosine et le tryptophane avec des cinétiques plus lentes (Alvarez et Radi, 2003; Hawkins *et al.*, 2003). Or, il est connu que la BP des NoV GII.4 est composée de sept acides aminés (*i.e.* Ser343, Thr344, Arg345, Asp374, Ser441, Gly442 et Tyr443) qui sont conservés parmi les génotypes GII.4 (Tan et Jiang, 2014). À une concentration critique de 1 333 µM en ONOOH, les VLP ont été dissociées. En revanche, contrairement à ce qui a pu être observé pour les VLP, le ONOOH a montré un faible effet sur les NoV GII.4. Il est possible qu'une telle particule exprime une résistance plus élevée vis-à-vis de ce traitement oxydatif au niveau de la protéine de capside ou au niveau de l'interaction avec les HBGA. En effet, certains auteurs ont plutôt observé une dégradation du génome pour le FCV après traitement par le ONOOH (Yamashiro *et al.*, 2018).

Aux vues des données de la littérature et de nos résultats sur l'impact du vieillissement naturel, de la chaleur et des oxydants sur les NoV, la détection directe du génome viral sous-estime très

clairement l'efficacité virucide des traitements. La sélection spécifique des NoV capables de reconnaître les HBGA pourrait réduire cette sous-estimation, mais uniquement pour des traitements induisant des changements importants au niveau de la capside (*i.e.* déstructuration des particules virales). Cette déstructuration a lieu principalement à une température critique (autour de 70°C) ou à une concentration en HClO critique (*i.e.* 9 531 et 19 µM, respectivement pour les VLP et les NoV). A l'inverse, cette méthode n'empêche pas la surestimation des NoV infectieux potentiels après traitement par des températures plus basses ou des concentrations en HClO plus faibles, ou encore après oxydation par le ONOOH. Si les tests d'adhésion des NoV aux HBGA suivis de la détection du génome semblent limiter cette surestimation après des processus d'inactivation, il apparait nécessaire de réaliser des recherches plus poussées en utilisant des expériences harmonisées pour mieux évaluer l'impact de ces traitements sur l'intégrité de la capside.

En conclusion, l'adhésion aux HBGA suivie de la détection du génome des NoV n'est pas une condition suffisante et ne peut être exclusive pour discriminer des particules faiblement impactées et donc potentiellement inactivées par un traitement.

En conclusion générale, notre étude apporte de nouvelles informations permettant de définir si les HBGA jouent un rôle protecteur des NoV lorsque ces derniers sont confrontés à des facteurs d'inactivation physiologiques retrouvés chez l'Homme (*i.e.* pH acide, enzymes protéolytiques) mais également de définir l'évolution des interactions entre les HBGA et les NoV au cours des traitements d'inactivation appliqués sur des aliments ou dans l'environnement (*i.e.* vieillissement naturel, chaleur, oxydants). Pour ce premier aspect, l'interaction spécifique avec les HBGA ne confère aucune protection des virus vis-à-vis du pH acide ou de la digestion avec des enzymes protéolytiques lors de leur passage dans le tractus digestif. Pour le deuxième aspect, l'interaction avec les HBGA permet d'éliminer le génome des particules dont la capside est totalement dégradée par application de fortes doses (*i.e.* chaleur ou HClO). Les NoV faiblement impactés au niveau de la capside sont encore capables de reconnaître les HBGA ce qui rend hasardeux d'affirmer que les NoV capables de reconnaître ces ligands sont infectieux. Toutes ces données, bibliographiques et expérimentales, indiquent clairement qu'une étape préalable de reconnaissance des HBGA par les capsides avant la détection du génome réduit la surestimation potentielle des NoV infectieux selon les traitements employés mais que cette approche n'est pas suffisante pour discriminer parfaitement les particules infectieuses de celles qui sont non infectieuses.

Pour aller plus loin dans nos recherches, il serait intéressant de réaliser les mêmes expériences sur des NoV GI. L'adhésion aux HBGA par les NoV GII.4, sur laquelle s'est portée toute cette étude, a été décrite comme étant reliée au dimère de VP1 (Tan *et al.*, 2009). Ainsi, une dissociation du dimère de VP1 peut entraîner une perte de l'interaction avec les HBGA mais il est aussi possible que cela se produise sans dissociation. Pour cette raison, il pourrait être intéressant de travailler avec les NoV GI.1 car contrairement au GII.4, ils sont capables de se lier spécifiquement aux HBGA par le biais d'un seul monomère de VP1 (Bu *e al.*, 2008; Tan *et al.*, 2009). D'autre part, les NoV GII.4 sont souvent transmis *via* les aliments et l'environnement ou de personne à personne alors que le NoV GI est plutôt transmis par voie hydrique (de Graaf *et al.*, 2016; Matthews *et al.*, 2012). Dans ces différentes études, de nombreuses différences ont été observées entre les génogroupes GI et GII. Travailler sur un modèle de NoV GI.1 permettrait de déterminer si le comportement de ces deux génogroupes est similaire ou différent selon les traitements d'inactivation employés. Ces nouvelles connaissances pourraient être enrichissantes dans la perspective de définir une méthode discriminant les NoV infectieux des NoV non infectieux.

D'un autre côté, comme pour toutes les méthodes testées précédemment avec pré-traitements ou avec l'utilisation de ligands, les HBGA ne constituent pas un critère pertinent pour préciser le caractère infectieux des NoV. Si toutes ces approches de détections directes ne sont pas robustes pour discriminer parfaitement les virus infectieux et non infectieux, il serait intéressant de s'orienter vers des approches indirectes. De nombreuses études ont évalué l'intérêt de certains indicateurs de contamination fécale pour évaluer le niveau de pollution virale et les risques associés. Les bactériophages ARN F-spécifiques ont été proposés comme des indicateurs viraux satisfaisants (Doré *et al.*, 2000; Flannery *et al.*, 2013; Leduc *et al.*, 2020; Lowther *et al.*, 2019; Hartard *et al.*, 2018; Hodgson *et al.*, 2017). Cependant, sans méthode de culture cellulaire adéquate pour les NoV, il a été impossible de conclure avec certitude sur un comportement similaire entre la survie des NoV et celle des bactériophages ARN F-spécifiques dans l'environnement et après des traitements d'inactivation. Avec les nouvelles approches de culture cellulaire qui sont de plus en plus décrites dans la littérature (Ettayebi *et al.*, 2016; Todd et Tripp, 2020a; Van Dycke *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2017), il serait maintenant possible de l'envisager. Ces méthodes dédiées à la réplication *in vitro* des NoV infectieux sont encore très complexes, chronophages et coûteuses. Cependant, s'il est démontré que le comportement des NoV est similaire à celui des bactériophages ARN F-spécifiques dans l'environnement et après des traitements d'inactivation, il serait alors possible par la suite de quantifier les bactériophages

infectieux par culture pour estimer la présence (ou non) de NoV infectieux. Les cultures phagiques ont en effet l'avantage d'être beaucoup plus simples à mettre en œuvre et les protocoles sont standardisés.

Références bibliographiques

Afolayan, O.T., *et al.*, 2016. Evaluation of a porcine gastric mucin and RNase A assay for the discrimination of infectious and non-infectious GI.1 and GII.4 norovirus following thermal, ethanol, or levulinic acid plus sodium dodecyl sulfate treatments. Food Environ Virol 8, 70–78.

Ahmed, S.M., *et al.*, 2014. Global prevalence of norovirus in cases of gastroenteritis: a systematic review and meta-analysis. The Lancet Infectious Diseases 14, 725–730.

Almand, E.A., *et al.*, 2019. Characterization of human norovirus binding to gut-associated bacterial ligands. BMC Res Notes. 12.

Almand, E.A., *et al.*, 2017. Norovirus binding to ligands beyond histo-blood group antigens. Front Microbiol 8, 2549.

Alvarez, B. et Radi, R., 2003. Peroxynitrite reactivity with amino acids and proteins. Amino Acids 25, 295–311.

Ambert-Balay, K. et Pothier, P., 2013. Evaluation of 4 immunochromatographic tests for rapid detection of norovirus in faecal samples. Journal of Clinical Virology 56, 278–282.

Armbrust, S., *et al.*, 2009. Norovirus infections in preterm infants: wide variety of clinical courses. BMC Res Notes 2, 96.

Atmar, R.L., *et al.*, 2008. Norwalk virus shedding after experimental human infection. Emerg Infect Dis 14, 1553–1557.

Atmar, R.L., *et al.*, 2014. Determination of the 50% human infectious dose for Norwalk virus. J Infect Dis 209, 1016–1022.

Ausar, S.F., *et al.*, 2006. Conformational stability and disassembly of Norwalk virus-like particles. J. Biol. Chem. 281, 19478–19488.

Baert, L., *et al.*, 2011. Review: Norovirus prevalence in Belgian, Canadian and French fresh produce: A threat to human health? International Journal of Food Microbiology 151, 261–269.

Bartnicki, E., *et al.*, 2017. Recent advances in understanding noroviruses. 6, 79.

Bartsch, S.M., *et al.*, 2016. Global economic burden of norovirus gastroenteritis. PLoS One 11, e0151219.

Bastin, G., *et al.*, 2020. Structural organizations of Qβ and MS2 phages affect capsid protein modifications by oxidants hypochlorous acid and peroxynitrite. Front. Microbiol. 11, 1157.

Beek, J. van, *et al.*, 2018. Molecular surveillance of norovirus, 2005–16: an epidemiological analysis of data collected from the NoroNet network. The Lancet Infectious Diseases 18, 545–553.

Belliot, G., *et al.*, 2001. Characterization of capsid genes, expressed in the baculovirus system, of three new genetically distinct strains of "Norwalk-like viruses." J Clin Microbiol 39, 4288–4295.

Belliot, G., *et al.*, 2008. Nucleotidylylation of the VPg protein of a human norovirus by its proteinase-polymerase precursor protein. Virology 374, 33–49.

Belliot, G., *et al.*, 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.

Bertolotti-Ciarlet, A., *et al.*, 2003. The 3′ end of Norwalk virus mRNA contains determinants that regulate the expression and stability of the viral capsid protein VP1: a novel function for the VP2 protein. J. Virol. 77, 11603–11615.

Beuret, C., *et al.*, 2002. Norwalk-like virus sequences in mineral waters: one-year monitoring of three brands. Appl Environ Microbiol 68, 1925–1931.

Blanco, A., *et al.*, 2017. Norovirus in bottled water associated with gastroenteritis outbreak, Spain, 2016. Emerging Infectious Diseases journal 23, 1531-1534.

Bok, K., *et al.*, 2009. Evolutionary dynamics of GII.4 noroviruses over a 34-year period. Journal of Virology 83, 11890–11901.

Bok, K. et Green, K.Y., 2012. Norovirus gastroenteritis in immunocompromised patients. New England Journal of Medicine 367, 2126–2132.

Booth, C.M. et Frost, G., 2020. Survival of a norovirus surrogate on surfaces in synthetic gastric fluid. Journal of Hospital Infection 105, 468–473.

Bosch, A., *et al.*, 2018. Foodborne viruses: Detection, risk assessment, and control options in food processing. International Journal of Food Microbiology 285, 110–128.

Boudaud, N. et Gantzer, C., 2015. Viral Hazard assessment in food matrices. Bull Epidemiol Santé Anim Aliment 68, 26–30.

Boxman, I.L.A., *et al.*, 2011. Year-round prevalence of norovirus in the environment of catering companies without a recently reported outbreak of gastroenteritis. Appl. Environ. Microbiol. 77, 2968–2974.

Brassard, J., *et al.*, 2012. Detection of human food-borne and zoonotic viruses on irrigated, field-grown strawberries. Appl Environ Microbiol 78, 3763–3766.

Breindl, M., 1971. The structure of heated poliovirus particles. Journal of General Virology 11, 147–156.

Brié, A., *et al.*, 2016. The effect of heat on the physicochemical properties of bacteriophage MS2. Food Environ Virol 8, 251–261.

Brié, A., *et al.*, 2017. The effect of heat and free chlorine treatments on the surface properties of murine norovirus. Food Environ Virol 9, 149–158.

Bruggink, L.D., *et al.*, 2011. Evaluation of the RIDA®QUICK immunochromatographic norovirus detection assay using specimens from Australian gastroenteritis incidents. Journal of Virological Methods 173, 121–126.

Bryce, J., *et al.*, 2005. WHO estimates of the causes of death in children. The Lancet 365, 1147–1152.

Bu, W., *et al.*, 2008. Structural basis for the receptor binding specificity of Norwalk virus. J. Virol. 82, 5340–5347.

Buesa, J., *et al.*, 2002. Molecular epidemiology of caliciviruses causing outbreaks and sporadic cases of acute gastroenteritis in Spain. J Clin Microbiol 40, 2854–2859.

Bull, R.A., *et al.*, 2010. Rapid evolution of pandemic noroviruses of the GII.4 lineage. PLOS Pathogens 6, e1000831.

Bull, R.A., *et al.*, 2006. Emergence of a new norovirus genotype II.4 variant associated with global outbreaks of gastroenteritis. Journal of Clinical Microbiology 44, 327–333.

Burke, R.M., *et al.*, 2020. Burden of norovirus in the United States, as estimated based on administrative data: updates for medically attended illness and mortality, 2001–2015. Clinical Infectious Diseases ciaa438.

Cannon, J.L., *et al.*, 2006. Surrogates for the study of norovirus stability and inactivation in the environment: A comparison of murine norovirus and feline calicivirus. Journal of Food Protection 69, 2761–2765.

Cao, S., *et al.*, 2007. Structural basis for the recognition of blood group trisaccharides by norovirus. J. Virol. 81, 5949–5957.

Carlsson, B., *et al.*, 2009. The G428A nonsense mutation in FUT2 provides strong but not absolute protection against symptomatic GII.4 norovirus infection. PLoS One 4, e5593.

CDC, 2018. Surveillance for foodborne disease outbreaks, United States, 2016, Annual Report.

Chan, M.C.-W., *et al.*, 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., *et al.*, 2015. Virus genotype distribution and virus burden in children and adults hospitalized for norovirus gastroenteritis, 2012–2014, Hong Kong. Sci Rep 5, 11507.

Chang, K.-O., *et al.*, 2004. Bile acids are essential for porcine enteric calicivirus replication in association with down-regulation of signal transducer and activator of transcription 1. Proceedings of the National Academy of Sciences 101, 8733–8738.

Chassaing, M., *et al.*, 2020a. Interaction between norovirus and histo-blood group antigens: A key to understanding virus transmission and inactivation through treatments? Food Microbiology 92, 103594.

Chassaing, *et al.*, 2020b. The effect of proteolytic enzymes and pH on GII.4 norovirus, during both interactions and non-interaction with histo-blood group antigens. Scientific Reports 10, 17926.

Chaudhry, Y., *et al.*, 2006. Caliciviruses differ in their functional requirements for eIF4F components. J. Biol. Chem. 281, 25315–25325.

Chen, Y., *et al.*, 2011. Crystallography of a lewis-binding norovirus, elucidation of strain-specificity to the polymorphic human histo-blood group antigens. PLOS Pathogens 7, e1002152.

Chhabra, P., *et al.*, 2019. Updated classification of norovirus genogroups and genotypes. Journal of General Virology 100, 1393–1406.

Choi, J.-M., *et al.*, 2008. Atomic resolution structural characterization of recognition of histo-blood group antigens by Norwalk virus. Proc Natl Acad Sci U S A 105, 9175–9180.

Clark, S.M., *et al.*, 1981. Trypsin enhancement of rotavirus infectivity: Mechanism of enhancement. Journal of Virology 39, 816–822.

Cook, N., *et al.*, 2019. Prevalence of norovirus in produce sold at retail in the United Kingdom. Food Microbiology 79, 85–89.

Corrêa, A. de A., *et al.*, 2012. Comparative inactivation of murine norovirus, human adenovirus, and human JC Polyomavirus by chlorine in seawater. Appl. Environ. Microbiol. 78, 6450–6457.

Costantini, V., *et al.*, 2010. Diagnostic accuracy and analytical sensitivity of IDEIA norovirus assay for routine screening of human norovirus. Journal of Clinical Microbiology 48, 2770–2778.

Creutznacher, R., *et al.*, 2020. Chemical-shift perturbations reflect bile acid binding to norovirus coat protein: Recognition comes in different flavors. ChemBioChem 20, 1-16.

da Silva, A.K., *et al.*, 2011. Adsorption and aggregation properties of norovirus GI and GII virus-like particles demonstrate differing responses to solution chemistry. Environ. Sci. Technol. 45, 520–526.

da Silva, A.K., *et al.*, 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., *et al.*, 2012. Discrimination between infectious and non-infectious human norovirus using porcine gastric mucin. International Journal of Food Microbiology 155, 222–226.

de Graaf, M., *et al.*, 2016. Human norovirus transmission and evolution in a changing world. Nature Reviews Microbiology 14, 421–433.

De Keuckelaere, *et al.*, 2015. Batch testing for noroviruses in frozen raspberries. International Journal of Food Microbiology 192, 43–50.

De Rougemont, A., 2019. Norovirus. SFM.

de Wit, M.A.S., *et al.*, 2001. Sensor, a population-based cohort study on gastroenteritis in the Netherlands: Incidence and etiology. American Journal of Epidemiology 154, 666–674.

de Wit, M.A.S., *et al.*, 2007. Large outbreak of norovirus: The baker who should have known better. Journal of Infection 55, 188–193.

Deval, J., *et al.*, 2017. Structure(s), function(s), and inhibition of the RNA-dependent RNA polymerase of noroviruses. Virus Research, Viral polymerases 234, 21–33.

Devant, J.M., *et al.*, 2019. Heterologous expression of human norovirus GII.4 VP1 leads to assembly of T=4 virus-like particles. Antiviral Research 168, 175–182.

DGAL, 2019. Gestion du risque norovirus en lien avec la consommation de coquillages. URL https://info.agriculture.gouv.fr/gedei/site/bo-agri/instruction-2019-855 (accessed 11.5.20).

Di Martino, B., *et al.*, 2016. A novel feline norovirus in diarrheic cats. Infection, Genetics and Evolution 38, 132–137.

Diez-Valcarce, *et al.*, 2012. Occurrence of human enteric viruses in commercial mussels at retail level in three European countries. Food Environ Virol 4, 73–80.

Dika, C., *et al.*, 2015. Isoelectric point is an inadequate descriptor of MS2, Phi X 174 and PRD1 phages adhesion on abiotic surfaces. Journal of Colloid and Interface Science 446, 327–334.

Dolin, R., *et al.*, 1972. Biological properties of Norwalk agent of acute infectious nonbacterial gastroenteritis. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 140, 578–583.

Donaldson, E.F., *et al.*, 2010. Viral shape-shifting: norovirus evasion of the human immune system. Nature Reviews Microbiology 8, 231–241.

Donaldson, E.F., *et al.*, 2008. Norovirus pathogenesis: mechanisms of persistence and immune evasion in human populations. Immunological Reviews 225, 190–211.

Doré, B., *et al.*, 2010. Management of health risks associated with oysters harvested from a norovirus contaminated area, Ireland, February–March 2010. Eurosurveillance 15, 19567.

Doré, W.J., *et al.*, 2000. Evaluation of F-Specific RNA bacteriophage as a candidate human enteric virus indicator for bivalve molluscan shellfish. Appl. Environ. Microbiol. 66, 1280–1285.

Duizer, E., *et al.*, 2004a. Inactivation of caliciviruses. Appl Environ Microbiol 70, 4538–4543.

Duizer, E., *et al.*, 2004b. Laboratory efforts to cultivate noroviruses. Journal of General Virology 85, 79–87.

Dunkin, N., *et al.*, 2017. Inactivation of human norovirus genogroups I and II and surrogates by free chlorine in postharvest leafy green wash water. Appl. Environ. Microbiol. 83, e01457-17.

Dykeman, E.C., *et al.*, 2013. Packaging signals in two single-stranded RNA viruses imply a conserved assembly mechanism and geometry of the packaged genome. Journal of Molecular Biology 425, 3235–3249.

Eden, J.-S., *et al.*, 2010. Norovirus GII.4 variant 2006b caused epidemics of acute gastroenteritis in Australia during 2007 and 2008. Journal of Clinical Virology 49, 265–271.

Eden, J.-S., *et al.*, 2014. The emergence and evolution of the novel epidemic norovirus GII.4 variant Sydney 2012. Virology 450–451, 106–113.

Eden, J.-S., *et al.*, 2013. Recombination within the pandemic norovirus GII.4 lineage. Journal of Virology 87, 6270–6282.

EFSA, 2019a. Analysis of the European baseline survey of norovirus in oysters. EFSA Journal 17, e05762.

EFSA, 2019b. The European Union One Health 2018 Zoonoses Report. EFSA Journal 17, 276

EFSA, 2018. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017. EFSA Journal 16, 5500.

EFSA, 2016. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015. EFSA Journal 14, e04634.

EFSA, 2015. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2014. EFSA Journal 13, 4329.

El-Senousy, *et al.*, 2013. Method validation for norovirus detection in naturally contaminated irrigation water and fresh produce. International Journal of Food Microbiology, FoodMicro 2012, 23rd International ICFMH Symposium, Global Issues in Food Microbiology 167, 74–79.

Escudero-Abarca, B.I., *et al.*, 2014. Molecular methods used to estimate thermal inactivation of a prototype human norovirus: More heat resistant than previously believed? Food Microbiology 41, 91–95.

Escudero-Abarca, B.I., *et al.*, 2014. Selection, characterization and application of nucleic acid aptamers for the capture and detection of human norovirus strains. PLOS ONE 9, e106805.

Esseili, M.A., *et al.*, 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.

Ettayebi, K., *et al.*, 2016. Replication of human noroviruses in stem cell-derived human enteroids. Science 353, 1387–1393.

Ettayebi, K. et Hardy, M.E., 2003. Norwalk virus nonstructural protein p48 forms a complex with the SNARE regulator VAP-A and prevents cell surface expression of vesicular stomatitis virus G protein. J. Virol. 77, 11790–11797.

Ferreira, M.S.R., *et al.*, 2010. Surveillance of norovirus infections in the state of Rio De Janeiro, Brazil 2005–2008. Journal of Medical Virology 82, 1442–1448.

Fischer Walker, C.L., *et al.*, 2012. Diarrhea incidence in low- and middle-income countries in 1990 and 2010: a systematic review. BMC Public Health 12, 220.

Flannery, J., *et al.*, 2013. Norovirus and FRNA bacteriophage determined by RT-qPCR and infectious FRNA bacteriophage in wastewater and oysters. Water Research 47, 5222–5231.

Food and Drug Administration, 2011. 21 CFR 179.39 - Ultraviolet radiation for the processing and treatment of food. URL https://www.govinfo.gov/app/details/CFR-2011-title21-vol3/CFR-2011-title21-vol3-sec179-39 (accessed 11.21.19).

Ford-Siltz, L.A., *et al.*, 2019. Genomics analyses of GIV and GVI noroviruses reveal the distinct clustering of human and animal viruses. Viruses 11, 204.

Gao, X., *et al.*, 2016. Recognition of histo-blood group antigen-like carbohydrates in lettuce by human GII.4 norovirus. Appl. Environ. Microbiol. 82, 2966–2974.

Gao, X., *et al.*, 2019. Surveillance of norovirus contamination in commercial fresh/frozen berries from Heilongjiang Province, China, using a TaqMan real-time RT-PCR assay. Food Microbiology 82, 119–126.

Gerba, C.P. et Betancourt, W.Q., 2017. Viral aggregation: Impact on virus behavior in the environment. Environ. Sci. Technol. 51, 7318–7325.

Goller, J.L., *et al.*, 2004. Long-term features of norovirus gastroenteritis in the elderly. Journal of Hospital Infection 58, 286–291.

Goodfellow, I., *et al.*, 2005. Calicivirus translation initiation requires an interaction between VPg and eIF4E. EMBO reports 6, 968–972.

Goodridge, L., *et al.*, 2004. Isoelectric point determination of norovirus virus-like particles by capillary isoelectric focusing with whole column imaging detection. Anal. Chem. 76, 48–52.

Graziano, V.R., *et al.*, 2019. Norovirus Attachment and Entry. Viruses 11, 495.

Green, K.Y., *et al.*, 1993. Comparison of the reactivities of baculovirus-expressed recombinant Norwalk virus capsid antigen with those of the native Norwalk virus antigen in serologic assays and some epidemiologic observations. J Clin Microbiol 31, 2185–2191.

Grytdal, S.P., *et al.*, 2016. Incidence of norovirus and other viral pathogens that cause acute gastroenteritis (AGE) among Kaiser permanente member populations in the United States, 2012–2013. PLoS One 11, e0148395.

Guix, S., *et al.*, 2007. Norwalk Virus RNA Is Infectious in Mammalian Cells. J. Virol. 81, 12238–12248.

Haga, K., 2020. Genetic manipulation of human intestinal enteroids demonstrates the necessity of a functional fucosyltransferase 2 gene for secretor-dependent human norovirus infection. mBio 11, e00251-20.

Hakomori, S., 1999. Antigen structure and genetic basis of histo-blood groups A, B and O: their changes associated with human cancer. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) 1473, 247–266.

Hall, A.J., *et al.*, 2013. Norovirus disease in the United States. Emerg Infect Dis 19, 1198–1205.

Hall, A.J., *et al.*, 2011. Incidence of acute gastroenteritis and role of norovirus, Georgia, USA, 2004–2005. Emerg Infect Dis 17, 1381–1388.

Halperin, T., *et al.*, 2008. No association between histo-blood group antigens and susceptibility to clinical infections with genogroup II norovirus. J Infect Dis 197, 63–65.

Han, M.G., *et al.*, 2004. Genetic recombination between two genotypes of genogroup III Bovine noroviruses (BoNVs) and capsid sequence diversity among BoNVs and Nebraska-like bovine enteric caliciviruses. Journal of Clinical Microbiology 42, 5214–5224.

Hansman, G.S., *et al.*, 2011. Crystal structures of GII.10 and GII.12 norovirus protruding domains in complex with histo-blood group antigens reveal details for a potential site of vulnerability. J. Virol. 85, 6687–6701.

Hansman, G.S., *et al.*, 2012. Structural basis for norovirus inhibition and fucose mimicry by citrate. J Virol 86, 284–292.

Hardy, M.E., *et al.*, 1995. Specific proteolytic cleavage of recombinant Norwalk virus capsid protein. J Virol 69, 1693–1698.

Harrington, P.R., *et al.*, 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.

Hartard, C., *et al.*, 2018. F-Specific RNA bacteriophages, especially members of subgroup II, should be reconsidered as good indicators of viral pollution of oysters. Appl. Environ. Microbiol 84, e01866-17.

Hawkins, C.L. et Davies, M.J., 2002. Hypochlorite-induced damage to DNA, RNA, and polynucleotides: Formation of chloramines and nitrogen-centered radicals. Chem. Res. Toxicol. 15, 83–92.

Hawkins, C.L., *et al.*, 2003. Hypochlorite-induced oxidation of amino acids, peptides and proteins. Amino Acids 25, 259–274.

Hawkins, C.L., *et al.*, 2002. Reaction of protein chloramines with DNA and nucleosides: evidence for the formation of radicals, protein–DNA cross-links and DNA fragmentation. Biochemical Journal 365, 605–615.

Heijne, J.C.M., *et al.*, 2009. Enhanced Hygiene Measures and Norovirus Transmission during an Outbreak. Emerg Infect Dis 15, 24–30.

Hewitt, J. et Greening, G.E., 2004. Survival and persistence of norovirus, hepatitis A virus, and feline calicivirus in marinated mussels. J Food Prot 67, 1743–1750.

Hirneisen, K.A., *et al.*, 2010. Viral inactivation in foods: A review of traditional and novel food processing technologies. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety 9, 3–20.

Hirneisen, K.A. et Kniel, K.E., 2013. Comparing human norovirus surrogates: Murine norovirus and tulane virus. Journal of Food Protection 76, 139–143.

Ho, C.L.T., *et al.*, 2020. Does norovirus induce acute hepatitis? AIMS Public Health 7, 148–157.

Hoa Tran, T.N., *et al.*, 2013. Molecular epidemiology of noroviruses associated with acute sporadic gastroenteritis in children: Global distribution of genogroups, genotypes and GII.4 variants. Journal of Clinical Virology 56, 269–277.

Hodgson, K.R., *et al.*, 2017. Bacteriophages as enteric viral indicators in bivalve mollusc management. Food Microbiol. 65, 284–293.

Hoelzer, K., *et al.*, 2013. Virus inactivation on hard surfaces or in suspension by chemical disinfectants: Systematic review and meta-analysis of norovirus surrogates. J Food Prot 76, 1006–1016.

Hoffmann, S., *et al.*, 2012. Annual cost of illness and quality-adjusted life year losses in the United States due to 14 foodborne pathogens. Journal of Food Protection 75, 1292–1302.

Hsu, C.C., *et al.*, 2007. Molecular characterization of three novel murine noroviruses. Virus Genes 34, 147–155.

Huang, P., *et al.*, 2005. Norovirus and histo-blood group antigens: Demonstration of a wide spectrum of strain specificities and classification of two major binding groups among multiple binding patterns. J. Virol. 79, 6714–6722.

Huo, Y., *et al.*, 2017. Enzymatic cleavage promotes disassembly of GII.3 norovirus virus like particles and its binding to salivary histo-blood group antigens. Virus Research 240, 18–24.

Hutson, A.M., *et al.*, 2005. Norwalk virus infection associates with secretor status genotyped from sera. J. Med. Virol. 77, 116–120.

Hutson, A.M., *et al.*, 2004. Norovirus disease: changing epidemiology and host susceptibility factors. Trends in Microbiology 12, 279–287.

Hutson, A.M., *et al.*, 2002. Norwalk virus infection and disease is associated with ABO histo-blood group type. J Infect Dis 185, 1335–1337.

Hyde, J.L. et 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.

ISO 15216-1, 2017. Microbiologie dans la chaîne alimentaire - Méthode horizontale pour la recherche des virus de l'hépatite A et norovirus par la technique RT-PCR en temps réel. Partie 1: Méthode de quantification

ISO 15216-2, 2019. Microbiologie dans la chaîne alimentaire -- Méthode horizontale pour la recherche des virus de l'hépatite A et norovirus par la technique RT-PCR en temps réel. Partie 2: Méthode de détection.

Ito, S., *et al.*, 2006. Norovirus-associated encephalopathy. The Pediatric Infectious Disease Journal 25, 651–652.

Jeong, E.-H., *et al.*, 2020. Human norovirus replication in temperature-optimized MDCK cells by forkhead box O1 inhibition. J. Microbiol. Biotechnol. 30.

Jiang, X., *et al.*, 1992. Expression, self-assembly, and antigenicity of the Norwalk virus capsid protein. J Virol 66, 6527–6532.

Jiang, X., *et al.*, 1993. Sequence and genomic organization of Norwalk virus. Virology 195, 51–61.

Jones, M.K., *et al.*, 2015. Human norovirus culture in B cells. Nature Protocols 10, 1939–1947.

Jones, M.K., *et al.*, 2014. Enteric bacteria promote human and mouse norovirus infection of B cells. Science 346, 755–759.

Jung, J., *et al.*, 2019. High-resolution cryo-EM structures of outbreak strain human norovirus shells reveal size variations. PNAS 116, 12828–12832.

Kageyama, T., *et al.*, 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., *et al.*, 2006. Analysis of protein–protein interactions in the feline calicivirus replication complex. Journal of General Virology, 87, 363–368.

Kamel, A.H., *et al.*, 2009. Predominance and circulation of enteric viruses in the region of Greater Cairo, Egypt. J Clin Microbiol 47, 1037–1045.

Kanai, T., *et al.*, 2010. Norovirus-associated renal acute renal failure with nephrotic syndrome. Pediatrics International 52, e23–e25.

Kapikian, A.Z., *et al.*, 1973. Density in cesium chloride of the 27 nm "8FIIa" particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis: determination by ultra-centrifugation and immune electron microscopy. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 142, 874–877.

Kapikian, A.Z., *et al.*, 1972. Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. J. Virol. 10, 1075–1081.

Kaplan, J.E., *et al.*, 1982. The frequency of a Norwalk-like pattern of illness in outbreaks of acute gastroenteritis. Am J Public Health 72, 1329–1332.

Karangwa, C.K., *et al.*, 2017. Sequential gastroenteritis outbreaks in a single year caused by norovirus genotypes GII.2 and GII.6 in an institutional setting. Open Forum Infectious Diseases 4, ofx236.

Karst, S.M.et Tibbetts, S.A., 2016. Recent advances in understanding norovirus pathogenesis. J Med Virol 88, 1837–1843.

Karst, S.M. et Wobus, C.E., 2015. A working model of how noroviruses infect the intestine. PLOS Pathogens 11, e1004626.

Karst, S.M., *et al.*, 2003. STAT1-dependent innate immunity to a Norwalk-like virus. Science 299, 1575–1578.

Kele, B., *et al.*, 2011. Comparison of an ELISA and two reverse transcription polymerase chain reaction methods for norovirus detection. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 70, 475–478.

Kelly, R.J., *et al.*, 1995. Sequence and expression of a candidate for the human secretor blood group α(1,2)fucosyltransferase gene (FUT2). J. Biol. Chem. 270, 4640–4649.

Kilic, T., *et al.*, 2018. Structural basis for human norovirus capsid binding to bile acids. Journal of Virology 93, e01581-18.

King, A.M., *et al.*, 2012. Virus taxonomy: Ninth report of the international committee on taxonomy of viruses. Elsevier 2012.

Kingsley, D.H., 2013. High pressure processing and its application to the challenge of virus-contaminated foods. Food Environ Virol 5, 1–12.

Kingsley, D.H., *et al.*, 2002. Inactivation of hepatitis A virus and a calicivirus by high hydrostatic pressure. Journal of Food Protection 65, 1605–1609.

Kingsley, D.H., *et al.*, 2014. Inactivation of human norovirus using chemical sanitizers. International Journal of Food Microbiology 171, 94–99.

Kirby, A. et Iturriza-Gómara, M., 2012. Norovirus diagnostics: options, applications and interpretations. Expert Review of Anti-infective Therapy 10, 423–433.

Kirk, M.D., *et al.*, 2015. World Health Organization estimates of the global and regional disease burden of 22 foodborne bacterial, protozoal, and viral diseases, 2010: A Data Synthesis. PLOS Medicine 12, e1001921.

Kitajima, M., *et al.*, 2010. Chlorine inactivation of human norovirus, murine norovirus and poliovirus in drinking water. Letters in Applied Microbiology 51, 119–121.

Klenk, H.-D., *et al.*, 1975. Activation of influenza A viruses by trypsin treatment. Virology 68, 426–439.

Knight, A., *et al.*, 2016. A systematic review of human norovirus survival reveals a greater persistence of human norovirus RT-qPCR signals compared to those of cultivable surrogate viruses. International Journal of Food Microbiology 216, 40–49.

Koda, Y., *et al.*, 2001. The polymorphisms of fucosyltransferases. Legal Medicine 3, 2–14.

Koga, Y., *et al.*, 2011. Exosome can prevent RNase from degrading microRNA in feces. J Gastrointest Oncol 2, 215–222.

Koo, H.L., *et al.*, 2010. Noroviruses: The leading cause of gastroenteritis worldwide. Discovery Medicine 10, 61–70.

Koromyslova, A.D., *et al.*, 2015. Treatment of norovirus particles with citrate. Virology 485, 199–204.

Kroneman, A., *et al.*, 2008. Analysis of integrated virological and epidemiological reports of norovirus outbreaks collected within the foodborne viruses in Europe network from 1 july 2001 to 30 june 2006. J. Clin. Microbiol. 46, 2959–2965.

Kumthip, K., *et al.*, 2018. Molecular epidemiology and genotype distributions of noroviruses and sapoviruses in Thailand 2000-2016: A review. Journal of Medical Virology 90, 617–624.

La Bella, G., *et al.*, 2017. Food-borne viruses in shellfish: Investigation on norovirus and HAV presence in Apulia (SE Italy). Food Environ Virol 9, 179–186.

Lambden, P.R., *et al.*, 1993. Sequence and genome organization of a human small round-structured (Norwalk-like) virus. Science 259, 516–519.

Langlet, J., *et al.*, 2008. Aggregation and surface properties of F-specific RNA phages: Implication for membrane filtration processes. Water Research 42, 2769–2777.

Lateef, Z., *et al.*, 2017. Transcriptomic analysis of human norovirus NS1-2 protein highlights a multifunctional role in murine monocytes. BMC Genomics 18, 39.

Lay, M.K., *et al.*, 2010. Norwalk virus does not replicate in human macrophages or dendritic cells derived from the peripheral blood of susceptible humans. Virology 406, 1–11.

Leduc, A., *et al.*, 2020. F-specific RNA bacteriophages model the behavior of human noroviruses during purification of oysters: the main mechanism is probably inactivation rather than release. Appl. Environ. Microbiol 86, e00526-20.

Le Guyader, F.S., *et al.*, 2012. Transmission of viruses through shellfish : When specific ligands come into play. Curr Opin Virol 2.

Le Guyader, F.S., *et al.*, 2006a. Norwalk virus–specific binding to oyster digestive tissues. Emerg Infect Dis 12, 931–936.

Le Pendu, J., *et al.*, 1985. The presence of at least two different H-blood-group-related beta-D-gal alpha-2-L-fucosyltransferases in human serum and the genetics of blood group H substances. Am J Hum Genet 37, 749–760.

Le Pendu, J. et Ruvoën-Clouet, N., 2020. Fondness for sugars of enteric viruses confronts them with human glycans genetic diversity. Hum Genet.

Lei, S., *et al.*, 2016. Enterobacter cloacae inhibits human norovirus infectivity in gnotobiotic pigs. Sci Rep 6, 25017.

Levy, H.C., *et al.*, 2010. Catching a virus in the act of RNA release: A novel poliovirus uncoating intermediate characterized by cryo-electron microscopy. J Virol 84, 4426–4441.

Li, D., 2012. Effects of a variety of food extracts and juices on the specific binding ability of norovirus GII.4 P particles. Journal of Food Protection 75, 1350–1354.

Li, J.W., *et al.*, 2002. Mechanisms of inactivation of hepatitis A virus by chlorine. Appl Environ Microbiol 68, 4951–4955.

Li, T.-F., *et al.*, 2018. Human Norovirus NS3 Has RNA Helicase and Chaperoning Activities. J. Virol. 92.

Lin, Y., *et al.*, 2014. Function of VP2 protein in the stability of the secondary structure of virus-like particles of genogroup II norovirus at different pH levels: Function of VP2 protein in the stability of NoV VLPs. J Microbiol. 52, 970–975.

Lindesmith, L., *et al.*, 2003. Human susceptibility and resistance to Norwalk virus infection. Nature Medicine 9, 548–553.

Lindesmith, L.C., *et al.*, 2020. Virus–host interactions between nonsecretors and human norovirus. cellular and molecular gastroenterology and hepatology.

Lindesmith, L.C., *et al.*, 2008. Mechanisms of GII.4 norovirus persistence in human populations. PLoS Med 5.

Liu, L. et Moore, M.D., 2020. A survey of analytical techniques for noroviruses. Foods 9.

Loison, P., *et al.*, 2016. Impact of reducing and oxidizing agents on the infectivity of Qβ phage and the overall structure of its capsid. FEMS Microbiol Ecol 92, fiw153.

Loisy, F., *et al.*, 2005. Real-time RT-PCR for norovirus screening in shellfish. Journal of Virological Methods 123, 1–7.

Lopman, B., 2012. Environmental transmission of norovirus gastroenteritis. Current Opinion in Virology, Virus entry/Environmental virology 2, 96–102.

Lopman, B., *et al.*, 2004. Increase in viral gastroenteritis outbreaks in Europe and epidemic spread of new norovirus variant. The Lancet 363, 682–688.

Lopman, B.A., 2003. Two Epidemiologic Patterns of Norovirus Outbreaks: Surveillance in England and Wales, 1992–2000. Emerg Infect Dis 9, 71–77.

Lopman, B.A., *et al.*, 2011. Increasing rates of gastroenteritis hospital discharges in US adults and the contribution of norovirus, 1996–2007. Clin Infect Dis 52, 466–474.

Lou, F., *et al.*, 2011. Inactivation of a human norovirus surrogate by high-pressure processing: effectiveness, mechanism, and potential application in the fresh produce industry. Appl. Environ. Microbiol. 77, 1862–1871.

Loutreul, J., *et al.*, 2014. Prevalence of human noroviruses in frozen marketed shellfish, red fruits and fresh vegetables. Food Environ Virol 6, 157–168.

Lowther, J.A., *et al.*, 2012. Comparison of norovirus RNA levels in outbreak-related oysters with background environmental levels. Journal of Food Protection 75, 389–393.

Lowther, J.A., *et al.*, 2019. Use of F-specific RNA bacteriophage to estimate infectious norovirus levels in oysters. Food Environ. Virol. 11, 247–258

Maalouf, H., *et al.*, 2010. Distribution in tissue and seasonal variation of norovirus genogroup I and II ligands in oysters. Appl Environ Microbiol 76, 5621–5630.

Manuel, C.S., *et al.*, 2018. Predicting human norovirus infectivity - Recent advances and continued challenges. Food Microbiology 76, 337–345.

Marionneau, S., *et al.*, 2001. ABH and Lewis histo-blood group antigens, a model for the meaning of oligosaccharide diversity in the face of a changing world. Biochimie 83, 565–573.

Marionneau, S., *et al.*, 2002. Norwalk virus binds to histo-blood group antigens present on gastroduodenal epithelial cells of secretor individuals. Gastroenterology 122, 1967–1977.

Martella, V., *et al.*, 2007. Norovirus in captive lion cub (Panthera leo). Emerg Infect Dis 13, 1071–1073.

Matthews, J.E., *et al.*, 2012. The epidemiology of published norovirus outbreaks: a systematic review of risk factors associated with attack rate and genogroup. Epidemiol Infect 140, 1161–1172.

Mattison, K., *et al.*, 2007. Human noroviruses in swine and cattle. Emerg Infect Dis 13, 1184–1188.

Medici, M.C., *et al.*, 2010. Norovirus RNA in the blood of a child with gastroenteritis and convulsions—A case report. Journal of Clinical Virology 48, 147–149.

Mesquita, J.R., *et al.*, 2010. Novel norovirus in dogs with diarrhea. Emerg Infect Dis 16, 980–982.

Meunier, S., *et al.*, 2004. Crosslinking of and coupling to viral capsid proteins by tyrosine oxidation. Chemistry & Biology 11, 319–326.

Miura, T., *et al.*, 2013. Histo-blood group antigen-like substances of human enteric bacteria as specific adsorbents for human noroviruses. J Virol 87, 9441–9451.

Mollicone, R., *et al.*, 1995. Molecular genetics of H, Se, Lewis and other fucosyltransferase genes. Transfusion Clinique et Biologique 2, 235–242.

Monedero, V., *et al.*, 2018. The interactions between host glycobiology, bacterial microbiota, and viruses in the gut. Viruses 10, 96.

Moore, M.D., *et al.*, 2016. Human norovirus aptamer exhibits high degree of target conformation-dependent binding similar to that of receptors and discriminates particle functionality. mSphere 1, e00298-16.

Moore, M.D., *et al.*, 2015. Generation and characterization of nucleic acid aptamers targeting the capsid P domain of a human norovirus GII.4 strain. Journal of Biotechnology 209, 41–49.

Moore, M.D., *et al.*, 2017. Alternative in vitro methods for the determination of viral capsid structural integrity. J Vis Exp.

Motomura, K., *et al.*, 2010. Divergent evolution of norovirus GII/4 by genome recombination from may 2006 to february 2009 in Japan. J Virol 84, 8085–8097.

Mounts, A.W., *et al.*, 2000. Cold weather seasonality of gastroenteritis associated with Norwalk-like viruses. J Infect Dis 181, S284–S287.

Murakami, K., *et al.*, 2013. Norovirus binding to intestinal epithelial cells is independent of histo-blood group antigens. PLOS ONE 8, e66534.

Murakami, K., *et al.*, 2020. Bile acids and ceramide overcome the entry restriction for GII.3 human norovirus replication in human intestinal enteroids. PNAS.

Murata, T., *et al.*, 2007. Prolonged norovirus shedding in infants ≤6 months of age with gastroenteritis. The Pediatric Infectious Disease Journal 26, 46–49.

Nelson, C.A., *et al.*, 2018. Structural basis for murine norovirus engagement of bile acids and the CD300lf receptor. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.

Noda, M., 2008. Statistical analysis of attack rate in norovirus foodborne outbreaks. International Journal of Food Microbiology 122, 216–220.

Noel, J.S., *et al.*, 1999. Identification of a distinct common strain of "Norwalk-like viruses" having a global distribution. J Infect Dis 179, 1334–1344.

Nordgren, J., *et al.*, 2010. Norovirus gastroenteritis outbreak with a secretor-independent susceptibility pattern, Sweden. Emerg Infect Dis 16, 81–87.

Nordgren, J., *et al.*, 2013. Host genetic factors affect susceptibility to norovirus infections in Burkina Faso. PLOS ONE 8, e69557.

Nordgren, J.et Svensson, L., 2019. Genetic susceptibility to human norovirus infection: An update. Viruses 11.

Nuanualsuwan, S. et Cliver, D.O., 2003. Capsid functions of inactivated human picornaviruses and feline calicivirus. Appl. Environ. Microbiol. 69, 350–357.

Nuanualsuwan, S. et Cliver, D.O., 2002. Pretreatment to avoid positive RT-PCR results with inactivated viruses. Journal of Virological Methods 104, 217–225.

Oliver, S.L., *et al.*, 2003. Molecular characterization of bovine enteric caliciviruses: A distinct third genogroup of noroviruses (Norwalk-like viruses) unlikely to be of risk to humans. Journal of Virology 77, 2789–2798.

Oriol, R., *et al.*, 1986. Genetics of ABO, H, Lewis, X and related antigens. Vox Sanguinis 51, 161–171.

Padalko, E., *et al.*, 2004. Peroxynitrite inhibition of coxsackievirus infection by prevention of viral RNA entry. PNAS 101, 11731–11736.

Parrino, T.A., *et al.*, 1977. Clinical immunity in acute gastroenteritis caused by Norwalk agent. New England Journal of Medicine 297, 86–89.

Patel, M.M., *et al.*, 2008. Systematic literature review of role of noroviruses in sporadic gastroenteritis. Emerg Infect Dis 14, 1224–1231.

Pecson, B.M., *et al.*, 2009. Quantitative PCR for determining the infectivity of bacteriophage MS2 upon inactivation by heat, UV-B radiation, and singlet oxygen: advantages and limitations of an enzymatic treatment to reduce false-positive results. Applied and Environmental Microbiology 75, 5544.

Pepe, T., *et al.*, 2012. Norovirus monitoring in bivalve molluscs harvested and commercialized in southern Italy. J Food Prot 75, 976–981.

Pérez-Rodríguez, F., *et al.*, 2014. Impact of the prevalence of different pathogens on the performance of sampling plans in lettuce products. International Journal of Food Microbiology 184, 69–73.

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

Phillips, G., *et al.*, 2010. Community incidence of norovirus-associated infectious intestinal disease in England: Improved estimates using viral load for norovirus diagnosis. Am J Epidemiol 171, 1014–1022.

Pires, S.M., *et al.*, 2015. Aetiology-specific estimates of the global and regional incidence and mortality of diarrhoeal diseases commonly transmitted through food. PLOS ONE 10, e0142927.

Pogan, R., *et al.*, 2018a. Norovirus assembly and stability. Current Opinion in Virology 31, 59–65.

Pogan, R., *et al.*, 2018b. Norovirus-like VP1 particles exhibit isolate dependent stability profiles. J. Phys.: Condens. Matter 30, 064006.

Polo, D., *et al.*, 2015. Detection and quantification of hepatitis A virus and norovirus in Spanish authorized shellfish harvesting areas. International Journal of Food Microbiology 193, 43–50.

Prasad, B.V.V., *et al.*, 1999. X-ray Crystallographic Structure of the Norwalk Virus Capsid. Science 286, 287–290.

Qi, R., *et al.*, 2018. Global prevalence of asymptomatic norovirus infection: A meta-analysis. EClinicalMedicine 2–3, 50–58.

Rabenau, H.F., *et al.*, 2003. Laboratory Diagnosis of Norovirus: Which Method Is the Best? INT 46, 232–238.

Rajan, V.P., *et al.*, 1989. A cloned human DNA restriction fragment determines expression of a GDP-L-fucose: beta-D-galactoside 2-alpha-L-fucosyltransferase in transfected cells. Evidence for isolation and transfer of the human H blood group locus. J. Biol. Chem. 264, 11158–11167.

Rajko-Nenow, P., *et al.*, 2013. Norovirus genotypes present in oyster and effluent from a wastewater treatment plant during the seasonal peak of infections in Ireland, 2010. Appl. Environ. Microbiol. 79, 2578–2587.

Ramani, S.et Giri, S., 2019. Influence of histo blood group antigen expression on susceptibility to enteric viruses and vaccines. Curr. Opin. Infect. Dis. 32, 445–452.

Robin, M., 2019. Effect of natural ageing and heat treatments on GII.4 norovirus binding to histo-blood group antigens. Sci Rep 9, 1–11.

Rockx, B., *et al.*, 2002. Natural history of human calicivirus infection: A prospective cohort study. Clin Infect Dis 35, 246–253.

Rockx, B.H.G., *et al.*, 2005. Association of histo–blood group antigens and susceptibility to norovirus infections. J Infect Dis 191, 749–754.

Rodríguez, R.A., *et al.*, 2009. Application of PCR-Based Methods To Assess the Infectivity of Enteric Viruses in Environmental Samples. Appl. Environ. Microbiol. 75, 297–307.

Rougemont, A. de, *et al.*, 2011. Qualitative and quantitative analysis of the binding of GII.4 norovirus variants onto human blood group antigens. Journal of Virology 85, 4057–4070.

Rubio-del-Campo, A., *et al.*, 2014. Noroviral P-particles as an in vitro model to assess the interactions of noroviruses with probiotics. PLoS One 9, e89586.

Ruvoën, N. et Le Pendu, J., 2013. Sensibilité génétique aux infections à norovirus. Pathologie Biologie, Fond génétique et maladies infectieuses 61, 28–35.

Ruvoën-Clouet, N., *et al.*, 2000. Binding of rabbit hemorrhagic disease virus to antigens of the ABH histo-blood group family. Journal of Virology 74, 11950–11954.

Ruvoën-Clouet, N., *et al.*, 2014. Increase in genogroup II.4 norovirus host spectrum by CagA-positive helicobacter pylori infection. J Infect Dis 210, 183–191.

Samandoulgou, I., *et al.*, 2015. Zeta potential and aggregation of virus-like particle of human norovirus and feline calicivirus under different physicochemical conditions. Food Environ Virol 7, 249–260.

Sanchez, G., *et al.*, 2005. Presence of norovirus sequences in bottled waters is questionable. Applied and Environmental Microbiology 71, 2203–2205.

Sano, D., *et al.*, 2015. Culture-independent evaluation of nonenveloped-virus infectivity reduced by free-chlorine disinfection. Appl Environ Microbiol 81, 2819–2826.

Sano, D., *et al.*, 2010. Detection of oxidative damages on viral capsid protein for evaluating structural integrity and infectivity of human norovirus. Environ. Sci. Technol. 44, 808–812.

Santiana, M., *et al.*, 2018. Vesicle-cloaked virus clusters are optimal units for inter-organismal Viral Transmission. Cell Host Microbe 24, 208-220.e8.

Sato, J., *et al.*, 2016. Effects of disinfectants against norovirus virus-like particles predict norovirus inactivation: Effects of disinfectants on NoV VLPs. Microbiol Immunol 60, 609–616.

Saylan, Y., *et al.*, 2019. An alternative medical diagnosis method: Biosensors for virus detection. Biosensors (Basel) 9, 65.

Scallan, E., *et al.*, 2011. Foodborne illness acquired in the United States—Major pathogens. Emerg Infect Dis 17, 7–15.

Schaeffer, J., *et al.*, 2013. Norovirus contamination on French marketed oysters. International Journal of Food Microbiology 166, 244–248.

Schwartz, S., *et al.*, 2011. Norovirus gastroenteritis causes severe and lethal complications after chemotherapy and hematopoietic stem cell transplantation. Blood 117, 5850–5856.

Seah, E.L., *et al.*, 1999. Variation in ORF3 of genogroup 2 Norwalk-like viruses. Arch. Virol. 144, 1007–1014.

Seitz, S.R., *et al.*, 2011. Norovirus infectivity in humans and persistence in water. Appl Environ Microbiol 77, 6884–6888.

Seo, D.J., *et al.*, 2014. Seasonal and regional prevalence of norovirus, hepatitis A virus, hepatitis E virus, and rotavirus in shellfish harvested from South Korea. Food Control 41, 178–184.

Shanker, S., *et al.*, 2011. Structural analysis of histo-blood group antigen binding specificity in a norovirus GII.4 epidemic variant: Implications for epochal evolution. J. Virol. 85, 8635–8645.

Sherman, M.B., *et al.*, 2019. Bile salts alter the mouse norovirus capsid conformation; possible implications for cell attachment and immune evasion. Journal of Virology JVI.00970-19.

Shetlar, M.D., 1980. Cross-linking of proteins to nucleic acids by ultraviolet light, in: Smith, K.C. (Ed.), Photochemical and Photobiological Reviews: Volume 5. Springer US, Boston, MA, pp. 105–197.

Shieh, M.T., *et al.*, 1992. Cell surface receptors for herpes simplex virus are heparan sulfate proteoglycans. J Cell Biol 116, 1273–1281.

Shin, G.-A. et Sobsey, M.D., 2008. Inactivation of norovirus by chlorine disinfection of water. Water Research 42, 4562–4568. 1

Shirato, H., 2011. Norovirus and histo-blood group antigens. Jpn. J. Infect. Dis. 64, 95–103.

Shirato, H., *et al.*, 2008. Noroviruses distinguish between type 1 and type 2 histo-blood group antigens for binding. J. Virol. 82, 10756–10767.

Siebenga, J.J., *et al.*, 2009. Norovirus illness is a global problem: emergence and spread of norovirus GII.4 variants, 2001-2007. J. Infect. Dis. 200, 802–812.

Sigstam, T., *et al.*, 2013. Subtle differences in virus composition affect disinfection kinetics and mechanisms. Appl. Environ. Microbiol. 79, 3455–3467.

Simonet, J. et 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.

Singh, B.K., *et al.*, 2015. Human noroviruses' fondness for histo-blood group antigens. J. Virol. 89, 2024–2040.

Snijder, J., *et al.*, 2013. Probing the biophysical interplay between a viral genome and its capsid. Nature Chem 5, 502–509.

Sosnovtsev, S.V., *et al.*, 2005. Feline calicivirus VP2 is essential for the production of infectious virions. Journal of Virology 79, 4012–4024.

Sosnovtsev, S.V., *et al.*, 2006. Cleavage map and proteolytic processing of the murine norovirus nonstructural polyprotein in infected cells. Journal of Virology 80, 7816–7831.

Spendlove, R.S. et Schaffer, F.L., 1965. Enzymatic enhancement of infectivity of reovirus. Journal of Bacteriology 89, 597–602.

Stals, A., *et al.*, 2011. Screening of fruit products for norovirus and the difficulty of interpreting positive PCR results. J. Food Prot. 74, 425–431.

Suffredini, E., *et al.*, 2014. Qualitative and quantitative assessment of viral contamination in bivalve molluscs harvested in Italy. International Journal of Food Microbiology 184, 21–26.

Sugimoto, T., *et al.*, 2007. Haemolytic uraemic syndrome complicated with norovirus-associated gastroenteritis. Nephrology Dialysis Transplantation 22, 2098–2099.

Suzuki, Y., *et al.*, 2000. Sialic acid species as a determinant of the host range of influenza A viruses. Journal of Virology 74, 11825–11831.

Svraka, S., *et al.*, 2007. Etiological role of viruses in outbreaks of acute gastroenteritis in the Netherlands from 1994 through 2005. J Clin Microbiol 45, 1389–1394.

Tacket, C.O., *et al.*, 2000. Human immune responses to a novel Norwalk virus vaccine delivered in transgenic potatoes. J Infect Dis 182, 302–305.

Tam, C.C., *et al.*, 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, D.M., *et al.*, 2018. Utility of droplet digital PCR assay for quantitative detection of norovirus in shellfish, from production to consumption in Guangxi, China. Biomedical and Environmental Sciences 31, 713–720.

Tan, M., *et al.*, 2008a. Noroviral P particle: Structure, function and applications in virus–host interaction. Virology 382, 115–123.

Tan, M., *et al.*, 2004. The P domain of norovirus capsid protein forms dimer and binds to histo-blood group antigen receptors. J. Virol. 78, 6233–6242.

Tan, M., *et al.*, 2003. Mutations within the P2 domain of norovirus capsid affect binding to human histo-blood group antigens: Evidence for a Binding Pocket. J. Virol. 77, 12562–12571.

Tan, M.et Jiang, X., 2014. Histo-blood group antigens: a common niche for norovirus and rotavirus. Expert Reviews in Molecular Medicine 16, e5.

Tan, M. et Jiang, X., 2012. Norovirus P particle: a subviral nanoparticle for vaccine development against norovirus, rotavirus and influenza virus. Nanomedicine (Lond) 7, 889–897.

Tan, M. et Jiang, X., 2010. Norovirus gastroenteritis, carbohydrate receptors, and animal models. PLoS Pathog 6, e1000983.

Tan, M. et Jiang, X., 2005. The P domain of norovirus capsid protein forms a subviral particle that binds to histo-blood group antigen receptors. J Virol 79, 14017–14030.

Tan, M., *et al.*, 2008b. Elucidation of strain-specific interaction of a GII-4 norovirus with HBGA receptors by site-directed mutagenesis study. Virology 379, 324–334.

Tan, M., *et al.*, 2009. Conservation of carbohydrate binding interfaces — evidence of human HBGA selection in norovirus evolution. PLOS ONE 4, e5058.

Taube, S., *et al.*, 2009. Ganglioside-linked terminal sialic acid moieties on murine macrophages function as attachment receptors for murine noroviruses. J Virol 83, 4092–4101.

Terio, V., *et al.*, 2017. Occurrence of hepatitis A and E and norovirus GI and GII in ready-to-eat vegetables in Italy. International Journal of Food Microbiology 249, 61–65.

Terio, V., *et al.*, 2020. Norovirus detection in ready-to-eat salads by propidium monoazide real time RT-PCR assay. Applied Sciences 10, 5176.

Teunis, P.F.M., *et al.*, 2020. Noroviruses are highly infectious but there is strong variation in host susceptibility and virus pathogenicity. Epidemics 32, 100401.

Teunis, P.F.M., *et al.*, 2008. Norwalk virus: How infectious is it? Journal of Medical Virology 80, 1468–1476.

Thorne, L.G. et Goodfellow, I.G., 2014. Norovirus gene expression and replication. Journal of General Virology, 95, 278–291.

Thorven, M., *et al.*, 2005. A homozygous nonsense mutation (428G→A) in the human secretor (FUT2) gene provides resistance to symptomatic norovirus (GGII) infections. J. Virol. 79, 15351–15355.

Tian, P., *et al.*, 2006. Norovirus binds to blood group A-like antigens in oyster gastrointestinal cells. Letters in Applied Microbiology 43, 645–651.

Tian, P., *et al.*, 2005. Porcine gastric mucin binds to recombinant norovirus particles and competitively inhibits their binding to histo-blood group antigens and Caco-2 cells. Letters in Applied Microbiology 41, 315–320.

Tian, P., *et al.*, 2007. Norovirus recognizes histo-blood group antigens on gastrointestinal cells of clams, mussels, and oysters: A possible mechanism of bioaccumulation. Journal of Food Protection 70, 2140–2147.

Tian, P., *et al.*, 2010. Specificity and kinetics of norovirus binding to magnetic bead-conjugated histo-blood group antigens: Concentrating noroviruses by HBGA-conjugated beads. Journal of Applied Microbiology 1753-1762.

Todd, K.V. et Tripp, R.A., 2020a. Vero cells as a mammalian cell substrate for human norovirus. Viruses 12, 439.

Todd, K.V. et Tripp, R.A., 2020b. Exosome-mediated human norovirus infection. PLoS One 15, e0237044.

Tu, E.T.-V., *et al.*, 2008. Epidemics of gastroenteritis during 2006 were associated with the spread of norovirus GII.4 variants 2006a and 2006b. Clinical Infectious Diseases 46, 413–420.

Tung, G., *et al.*, 2013. Efficacy of commonly used disinfectants for inactivation of human noroviruses and their surrogates. J. Food Prot. 76, 1210–1217.

Tung-Thompson, G., *et al.*, 2015. Persistence of human norovirus RT-qPCR signals in simulated gastric fluid. Food and Environmental Virology 7, 32–40.

Turcios-Ruiz, R.M., *et al.*, 2008. Outbreak of necrotizing enterocolitis caused by norovirus in a neonatal intensive care unit. The Journal of Pediatrics 153, 339–344.

Urakami, H., *et al.*, 2007. Chlorine sensitivity of feline calicivirus, a norovirus surrogate. AEM 73, 5679–5682.

Vaillant, V., *et al.*, 2012. Surveillance des risques biologiques liés à la consommation de coquillages en France. Bulletin Epidemiologique Hebdomadaire HS, 34–37.

van Asten, L., *et al.*, 2012. Mortality attributable to 9 common infections: Significant effect of influenza A, respiratory syncytial virus, influenza B, norovirus, and parainfluenza in elderly persons. The Journal of Infectious Diseases 206, 628–639.

Van Dycke, J., *et al.*, 2019. A robust human norovirus replication model in zebrafish larvae. PLoS Pathog 15, e1008009.

Vega, E., *et al.*, 2013. Genotypic and epidemiologic trends of norovirus outbreaks in the United States, 2009-2013. J. Clin. Microbiol. 52, 147–55.

Vega, E., *et al.*, 2008. Electrostatic forces control nonspecific virus attachment to lettuce. Journal of Food Protection 71, 522–529.

Vinjé, J., 2015. Advances in laboratory methods for detection and typing of norovirus. J Clin Microbiol 53, 373–381.

Vongpunsawad, S., *et al.*, 2013. Norwalk virus minor capsid protein VP2 associates within the VP1 shell domain. J. Virol. 87, 4818–4825.

Wang, D. et Tian, P., 2014. Inactivation conditions for human norovirus measured by an in situ capture-qRT-PCR method. International Journal of Food Microbiology 172, 76–82.

Wang, Q.-H., *et al.*, 2005. Porcine noroviruses related to human noroviruses. Emerg Infect Dis 11, 1874–1881.

Wang, Y.-H., *et al.*, 2012. Molecular epidemiology of noroviruses in children and adults with acute gastroenteritis in Wuhan, China, 2007-2010. Arch Virol 157, 2417–2424.

White, L.J., *et al.*, 1997. Biochemical characterization of a smaller form of recombinant Norwalk virus capsids assembled in insect cells. Journal of Virology 71, 8066–8072.

White, P.A., 2014. Evolution of norovirus. Clinical Microbiology and Infection 20, 741–745.

White, P.A., *et al.*, 2002. Norwalk-like virus 95/96-US strain is a major cause of gastroenteritis outbreaks in Australia. Journal of Medical Virology 68, 113–118.

Whitehead, K. et McCue, K.A., 2010. Virucidal efficacy of disinfectant actives against feline calicivirus, a surrogate for norovirus, in a short contact time. American Journal of Infection Control 38, 26–30.

Widdowson, M.-A., *et al.*, 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.

Wigginton, K., *et al.*, 2010. Oxidation of virus proteins during UV $_{254}$ and singlet oxygen mediated inactivation. Environ. Sci. Technol. 44, 5437–5443.

Wigginton, K.R., *et al.*, 2012a. UV radiation induces genome-mediated, site-specific cleavage in viral proteins. ChemBioChem 13, 837–845.

Wigginton, K.R., *et al.*, 2012b. Virus inactivation mechanisms: Impact of disinfectants on virus function and structural integrity. Environ. Sci. Technol. 46, 12069–12078.

Wobus, C.E., 2018. The dual tropism of noroviruses. J. Virol. JVI.01010-17.

Wu, Z., *et al.*, 2016. Deciphering the bat virome catalog to better understand the ecological diversity of bat viruses and the bat origin of emerging infectious diseases. ISME J 10, 609–620.

Wyatt, R.G., *et al.*, 1974. Comparison of three agents of acute infectious nonbacterial gastroenteritis by cross-challenge in volunteers. J Infect Dis 129, 709–714.

Xi, J.N., *et al.*, 1990. Norwalk virus genome cloning and characterization. Science 250, 1580–1583.

Xia, M., *et al.*, 2007. Norovirus capsid protein expressed in yeast forms virus-like particles and stimulates systemic and mucosal immunity in mice following an oral administration of raw yeast extracts. Journal of Medical Virology 79, 74–83.

Yamashiro, R., *et al.*, 2018. Key role of singlet oxygen and peroxynitrite in viral RNA damage during virucidal effect of plasma torch on feline calicivirus. Sci Rep 8, 17947.

Yen, C., *et al.*, 2011. Impact of an emergent norovirus variant in 2009 on norovirus outbreak activity in the United States. Clin Infect Dis 53, 568–571.

Zahorsky, J., 1929. Hyperemesis hemis or the winter vomiting disease. Arch Pediatr 46, 391–395.

Zenda, T., *et al.*, 2011. Norovirus gastroenteritis accompanied by marked elevation of transaminases. Hiroshima J. Med. Sci. 60, 41–43.

Zhang, D., *et al.*, 2017. Human intestinal organoids express histo-blood group antigens, bind norovirus VLPs, and support limited norovirus replication. Sci Rep 7, 12621.

Zhang, H., *et al.*, 2021. Surveillance of human norovirus in oysters collected from production area in Shandong Province, China during 2017–2018. Food Control 121, 107649.

Zheng, D.-P., *et al.*, 2006. Norovirus classification and proposed strain nomenclature. Virology 346, 312–323.

Zheng, L., *et al.*, 2017. Comprehensive characterization of a major capsid protein derived from a documented GII.6 norovirus strain. Arch Virol 162, 3863–3868.

Les références citées dans chacune des publications sont présentes à la fin de celles-ci

Annexes

Annexe 1 : Revue acceptée dans Food Microbiology le 02 Juillet 2020

Interaction between norovirus and Histo-Blood Group Antigens: a key to understanding virus transmission and inactivation through treatments?

M. Chassaing[1, 2], N. Boudaud[1], G. Belliot[3, 4], M. Estienney[3, 4], D. Majou[5], A. de Rougemont[3,4], C. Gantzer[2*]

[1] Actalia, Food Safety Department, F-50000, Saint-Lô, France.

[2] University of Lorraine, CNRS, LCPME, F-54000, Nancy, France.

[3] National Reference Center for Gastroenteritis Viruses, Laboratory of Virology, University Hospital of Dijon, F-21000, Dijon, France.

[4] UMR PAM A 02.102 Food and Microbiological Processes, University of Bourgogne Franche-Comté/AgroSup Dijon, F-21000, Dijon, France.

[5] ACTIA, F-75231, Paris Cedex 05, France

*Email: christophe.gantzer@univ-lorraine.fr

[1] Abbreviations

Abstract

Human noroviruses (HuNoVs) are a main cause of acute gastroenteritis worldwide. They are frequently involved in foodborne and waterborne outbreaks. Environmental transmission of the virus depends on two main factors: the ability of viral particles to remain infectious and their adhesion capacity onto different surfaces. Until recently, adhesion of viral particles to food matrices was mainly investigated by considering non-specific interactions (e.g. electrostatic, hydrophobic) and there was only limited information about infectious HuNoVs because of the absence of a reliable *in vitro* HuNoV cultivation system. Many HuNoV strains have now been described as having specific binding interactions with human Histo-Blood Group Antigens (HBGAs) and non-HBGA ligands found in food and the environment. Relevant approaches to the *in vitro* replication of HuNoVs were also proposed recently. On the basis of the available

[1] BP: Binding pocket; CaCV: Canine calicivirus; Ct: Concentration of chlorine x Time given in $mg.min.L^{-1}$; ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay; FCV: Feline calicivirus; FUT: Fucosyltransferase; GI: Genogroup I; GII: Genogroup II; HAV: Hepatitis A virus; HBGAs: Histo-Blood Group Antigens; HID_{50}: 50% human infectious dose; HIE: Human intestinal enteroids; HPP: High pressure processing; HuNoV: Human norovirus; ISO: International Organization for Standardization; MNV: Murine norovirus; ORFs: Open reading frames; PCR: Polymerase chain reaction; PFU: Plaque-forming unit; PGM: Porcine gastric mucin; PV: Poliovirus; RT-qPCR: Reverse-transcription quantitative PCR; RV: Rotavirus; $TCID_{50}$: 50% tissue culture infective dose; TEM: Transmission electron microscopy; TFL: Time to reduce the first log_{10}; TV: Tulane virus; UV: Ultraviolet; VLPs: Virus-like particles; WWTPs: Wastewater treatment plants.

literature data, this review discusses the opportunities to use this new knowledge to obtain a better understanding of HuNoV transmission to human populations and better evaluate the hazard posed by HuNoVs in foodstuffs and the environment.

Keywords: Norovirus; Histo-Blood Group Antigens; Infectivity; Foods; Virus transmission.

1. Introduction

Poliovirus (PV), discovered at the beginning of the 20th century, was the first enteric virus to be described that is transmitted through food and water. Cell culture of PV, as proposed by Enders and Wellers in 1949, allowed the development of the first vaccination strategies, the evaluation of the viral contamination of food and water, and the optimization of processing technologies to inactivate infectious particles. PV risk is currently under control worldwide. Some basic and applied improvements are currently required to manage other enteric viruses, especially human noroviruses (HuNoVs).

HuNoVs are a leading worldwide cause of acute gastroenteritis, of which more than 200,000 cases are reported annually (Kirk et al., 2015). HuNoVs are the most prevalent pathogens associated with foodborne or waterborne outbreaks reported in the USA (CDC 2018), and have been ranked in the top three in Europe for many years (EFSA, 2017). HuNoVs were discovered in 1972 (Kapikian et al., 1972), and the first reliable approaches to the *in vitro* replication of HuNoVs, using human intestinal enteroids (HIE) or zebrafish larvae, were recently published (Ettayebi et al., 2016; Todd and Tripp, 2020; Van Dycke et al., 2019). As with PV, these first approaches to the replication of HuNoVs are still highly complex and time-consuming, but are facilitating research intended to improve our understanding of virus-host interactions and of strategies for the mitigation of HuNoV transmission (Atmar et al., 2018).

The routine application of polymerase chain reaction (PCR) methods at the end of the 20th century supported improved epidemiological studies, greater understanding of the genetic evolution of HuNoV strains, and the development of diagnostic assays in humans (Ambert-Balay et al., 2005; Atmar et al., 2018; Beek et al., 2018; Bull et al., 2010; Gallimore et al., 2007). Because of the absence of a reliable *in vitro* HuNoV cultivation system that could be routinely used, reverse transcription quantitative PCR (RT-qPCR) approaches using a standard method (ISO 15216-1, 2017) were thought to be useful for the management of the risk of HuNoV in foodstuffs. However, the usefulness of this ISO standard for surveillance in vulnerable foodstuffs and water has limitations due to its inability to discriminate infectious from non-infectious HuNoVs once a viral genome has been detected. It has been widely

demonstrated that viral genomes persist for longer in the environment than infectious particles (Gassilloud et al., 2003; Hartard et al., 2015).

In this context, there is an urgent need to develop more reliable methods of estimating HuNoV infectivity in food and the environment and to better evaluate the efficacy of processing technologies that could be used by the food and water industries. Many strategies have been developed over the past two decades. The use of culturable viruses (e.g. feline calicivirus (FCV), murine norovirus (MNV), tulane virus (TV), or fecal coliphages) or virus-like particles (VLPs) as HuNoV surrogates has frequently been proposed, but their capacity to mimic the behavior of infectious HuNoVs has not been clearly demonstrated (Ausar et al., 2006; Bosch et al., 2018; Boudaud et al., 2012; Hirneisen et al., 2010; Manuel et al., 2018; Sato et al., 2016; US EPA, 2006; WHO, 2011). Molecular-based methods (e.g. detection of the whole genome, the use of enzymatic pre-treatments or intercalating dyes prior to genome detection, and detection of oxidative damages to the capsid) are regularly developed to evaluate the integrity of the genome and/or the viral capsid, but they have not been fully adapted for use (Kostela et al., 2008; Manuel et al., 2018; Nuanualsuwan and Cliver, 2002; Oristo et al., 2018; Sano et al., 2010).

The use of Histo-Blood Group Antigens (HBGAs) is another approach proposed for estimating the integrity of the HuNoV capsid (Li et al., 2012b; Lou et al., 2012; Manuel et al., 2018; Moore and Jaykus, 2017). HBGAs are complex carbohydrates linked to glycolipids or glycoproteins, found on red blood cells and mucosal epithelial cells, or present as free antigens in biological fluids, such as saliva (Huang et al., 2005). They have been described as putative attachment factors for several HuNoV strains and promote the infection of host cells (Ettayebi et al., 2016; Harrington et al., 2002; Hutson et al., 2002; Lindesmith et al., 2003; Marionneau et al., 2002; Rockx et al., 2005). A specific type of carbohydrate, called HBGA-like carbohydrates, which have the capacity to bind to HuNoVs, was also recently identified in certain vulnerable food products (e.g. lettuce, oysters) (Almand et al., 2017a).

Advances in knowledge of the structure of HuNoVs and HBGA-binding to HuNoVs have already been well described (Atmar et al., 2018; Shirato, 2011; Tan and Jiang, 2014, 2005). This review will therefore mainly focus on the ability of HBGA-binding to be used to i) select only infectious particles prior to genome detection and, ii) participate in the environmental transmission of HuNoVs. To do this, this review will consider the recent knowledge on the presence of HBGA-like carbohydrates in vulnerable foodstuffs. On the basis of the literature data, we compare the virus removal rates during processing technologies between infectious HuNoV surrogates, determined by cell culture; HuNoV genomes, directly quantified by RT-

qPCR; and HuNoV genome, after HBGA-binding assays. We then attempt to determine whether HuNoV interactions with the HBGA-like carbohydrates present in specific food items could influence the transmission of some HuNoV genotypes.

2. Human Norovirus

HuNoVs belong to the family *Caliciviridae* and the genus *Norovirus*. They are non-enveloped viruses (~40 nm in diameter) with an icosahedrally symmetrical capsid, and positive-sense single-stranded RNA (~7,500 nucleotides), containing three open reading frames (ORFs). ORF1 encodes non-structural proteins, while ORF2 and ORF3 encode for the major (VP1, 530 amino acids) and minor (VP2, 212 amino acids) capsid proteins, respectively. The capsid is composed of 180 copies of VP1 assembled into 90 dimers and a few copies of VP2. VP1 is organized into two domains, the shell domain (S) and the protruding domain (P) which is subdivided into P1 and P2 subdomains (Donaldson et al., 2010). P2 subdomain, which contains the putative receptor-binding sites, is highly variable and is located on the external surface of the capsid (**Fig. 1**). Thus, P2 subdomain has direct interactions with the local environment (Cao et al., 2007; Chen et al., 2011; Hansman et al., 2011; Shanker et al., 2011).

HuNoVs, mainly belonging to genogroup I (GI) and genogroup II (GII), are subdivided into at least 9 (GI.1–9) and 25 (GII.1–27) genotypes, respectively (Nordgren and Svensson, 2019). A recent study highlighted structural polymorphism and different particle sizes between and within HuNoV genogroups (Jung et al., 2019). GII.4 HuNoV is the most prevalent genotype, responsible for about 70% of total HuNoV outbreaks reported annually (Beek et al., 2018). HuNoVs exhibit high genetic and antigenic variabilities, as shown by the emergence of the last six pandemic strains since 1995 (Beek et al., 2013; Bull et al., 2010; Eden et al., 2014, 2010; Lopman et al., 2004; Vinjé et al., 1997; Yen et al., 2011). On the basis of the analysis of the amino acid sequence of VP1 in 164 HuNoV strains, Zheng et al. (2006) showed different levels of variability within the same species (e.g. 0–14.1% for Norwalk virus), the same genotype (e.g. 14.3–43.8% for GI.1 HuNoVs), and the same genogroup (e.g. 44.9–61.4% for GI HuNoVs). The evolution of the VP1 protein influences resistance to human infection because single amino acid changes in or peripheral to receptor-binding domains may i) change receptor-binding specificities (Rougemont et al., 2011) and/or ii) promote escape from the immune response (Donaldson et al., 2010). A complete overview of the antigenic variability of HuNoVs has been well described (White, 2014).

Human infection by HuNoVs can be diagnosed in clinical samples through the detection of i) VP1 proteins, using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) approaches; ii) viral

genomes, using RT-qPCR; or iii) whole virus particles, using transmission electron microscopy (TEM) (Rabenau et al., 2003). Although a correlation could be made between HuNoV genome detection and infectious particles from symptomatic individuals, these approaches have not yet proven sufficient to detect infectious HuNoVs in food and environmental matrices. In humans, the 50% human infectious dose (HID_{50}) of Norwalk virus (GI.1) has been estimated to have between 18 and 2,800 genomic equivalents, by considering the viral aggregation (Atmar et al., 2014; Teunis et al., 2008). This HID_{50} needs to be better defined, using more accurate methods, because the ratio of genomes to infectious particles may change over time or during disinfection treatments, thus making it impossible to link the number of genome copies to HID_{50} in food or the environment. Like culturable pathogenic enteric viruses such as poliovirus 1 (PV1) or rotavirus (RV), the HID_{50} ranges from 1 to 100 infectious particles, detected using the 50% tissue culture infective dose ($TCID_{50}$) or plaque-forming unit (PFU) methods (Minor et al., 1981; Ward et al., 1986). As with other enteric viruses, the HID_{50} estimated for norovirus seems to be low: from 1 to 100 infectious particles (Yezli and Otter, 2011).

Recent advances in HuNoV replication models, such as HIE (Ettayebi et al., 2016) and zebrafish larvae (Van Dycke et al., 2019), will probably lead to the development of a reliable method in the future, allowing a better estimation of the HID_{50} of HuNoVs and the detection of infectious HuNoVs in food, but significant improvements are still needed in terms of sensitivity, specificity, and accuracy.

3. HBGA-binding to HuNoVs

Numerous studies have described about HBGA-binding to HuNoVs. HBGAs are complex carbohydrates resulting from the sequential addition of different monosaccharide units to precursor structures present on cell surfaces. The biosynthesis of ABH and Lewis HBGAs (i.e. Le^a, Le^x, Le^b, Le^y, S Le^x, A, B, or H antigens) is governed by the ABO and fucosyl-transferase *FUT2* and *FUT3* gene families. The expression of active or non-active *FUT2* defines secretor or non-secretor status, respectively. This has been widely described in the literature (de Graaf et al., 2016; Marionneau et al., 2002, 2001; Tan and Jiang, 2014). The phenomenon of HBGA-binding to HuNoVs through the "binding pocket" (BP), which is located in a region of the P2 subdomain of VP1 has also been extensively reviewed (Donaldson et al., 2008; Ruvoën-Clouet et al., 2013; Shirato, 2011; Tan and Jiang, 2014, 2010). Polymorphic HBGA expression and the natural evolution of HuNoVs contribute to the diversity of HBGA-binding patterns (Shirato et al., 2008; Tan et al., 2009). Interactions between HuNoVs and HBGAs can be classified according to their relative affinities. Three distinct groups have been proposed by Huang et al

(2005), independent of HuNoV genogroup and genotype: the "A/B binding group," the "Lewis binding group," and the "no binding group."

Numerous *in vitro* and *in vivo* studies have shown the importance of HBGAs in HuNoV infection. The role of HBGA-binding during the process of host cell infection needs to be clarified. Current knowledge suggests two possibilities: i) HBGAs may act as a cellular receptor (or co-receptor), which participates in the release of the HuNoV genome into the host cell; or ii) HBGA-binding may facilitate its passage through the gastrointestinal tract up to the host cell. Many studies have provided evidence that human susceptibility to HuNoV infection is dependent on both polymorphic HBGA expression and HuNoV genotype (Hutson et al., 2002; Lindesmith et al., 2003; Nordgren and Svensson, 2019; Rockx et al., 2005; Tan and Jiang, 2014). It is widely acknowledged that non-secretor individuals are less susceptible to HuNoV infection than secretor individuals because most HuNoVs recognize ABO secretor antigens (Tan and Jiang, 2014). Conversely, other studies observed no correlation between HuNoV infection and ABO or secretor status (Ayouni et al., 2015; Larsson et al., 2006; Lindesmith et al., 2005; Sharma et al., 2019). Recently, host cell infection by HuNoVs using HIE demonstrated that the replication of GII.4 — but not GII.3 — strains is dependent on secretor status (Ettayebi et al., 2016). As described below, some HuNoV strains do not recognize any HBGA type (Huang et al., 2005), which reinforces the assumption that human susceptibility is mainly dependent on HuNoV genotype.

In any case, it has never been demonstrated that HBGA-binding to the BP allows genome entry into the host cell. It can therefore be concluded that the presence of HBGAs is not an exclusive requirement for HuNoV replication.

HBGAs or HBGA-like carbohydrates present on bacteria found in the human gut and their interactions with HuNoVs have been well described (Almand et al., 2019, 2017a, 2017b). Various mechanisms that may promote or prevent HuNoV infection in humans have been well highlighted by Monedero et al. (2018). One study evidenced that the gut bacterium *Enterobacter cloacae* bound HuNoVs through the H-like carbohydrate present on the bacterial surface (Miura et al., 2013). The role of *E. cloacae* for HuNoV replication needs to be clarified, since discrepancies have been reported between *in vivo* and *in vitro* studies (Jones et al., 2014; Lei et al., 2016). The ability of HuNoVs to bind to lactic acid bacteria present in the human microbiota through HBGA-like substances, has also been demonstrated (Rubio-del-Campo et al., 2014). The same authors made the assumption that surface carbohydrates on bacteria are responsible for HuNoV attachment.

Other factors found in the human gastrointestinal tract may also promote HBGA-binding to HuNoVs. It has been shown that bile enhanced the replication of HuNoV strains in HIE (Ettayebi et al., 2016), which is explained by a stabilization of the P domain that allows for better interaction with the fucose residue (Kilic et al., 2018). Trypsin could also promote HBGA-binding to HuNoVs (Huo et al., 2017, 2016). Current data from the literature suggests that HBGA-binding to HuNoVs is specific and highly diverse. HBGAs are currently considered to be putative attachment factors for several HuNoV strains that promote human infection. HuNoV replication in the host cell could be enhanced by other factors, such as bacterial microbiota, bile, or proteases, but some progress will be needed to improve our basic knowledge. However, it remains unclear to what extent HuNoV–HBGA interaction influences the infectivity of HuNoVs.

4. Interaction with HBGAs: proof of infectivity?

There is currently an urgent need to improve the management of HuNoV hazard in food and the environment. When considering the behavior of viruses outside the host cell, two main factors have to be taken into account: inactivation and adhesion capacity. With regard to inactivation: it is well known that infectious particles may be exposed to various inactivation factors in the environment or during food processing and water treatment and that these factors affect the integrity of viral particles but not the detection of the target viral genome and/or antigen. Therefore, characterization of virus infectivity is critical for better evaluation of HuNoV hazard in foodstuffs and the efficacy of the processing technologies used in the food and water industries.

There is already a lot of available data on the effects of inactivation factors (e.g. temperature, sanitizers, ultraviolet (UV) light, high pressure processing (HPP)) on several culturable viruses (e.g. PV, FCV, hepatitis A virus (HAV), MNV, TV, F-specific RNA phages, adenovirus) in different matrices (e.g. drinking water, wastewater, groundwater, oysters, berries, fresh vegetables). It is well known that viral genomes are more resistant to inactivation factors in the environment or processing technologies than infectious viruses. This has led to an overestimation of the HuNoV hazard in vulnerable foodstuffs, but also an underestimation of the virucidal impact of food processing and water treatments (Espinosa et al., 2008; Ogorzaly et al., 2010; Simonet and Gantzer, 2006b). The impact of different processing technologies on the reduction of HuNoV genomes and the discrepancy between the inactivation of infectious culturable HuNoV surrogates and the reduction of the corresponding viral genomes have been well reviewed (Bosch et al., 2018; DiCaprio et al., 2013; Hirneisen et al., 2010; Knight et al.,

2016; J. Li et al., 2012). Clinical trials have provided few data on the survival of infectious HuNoVs in groundwater at room temperature or after disinfection treatment (i.e. HPP) (Leon et al., 2011; Seitz et al., 2011).

Demonstration of cytopathic effects on host cell cultures is the most reliable method for the detection of infectious viruses. As described above, the *in vitro* replication of HuNoVs is now possible using HIE or zebrafish larvae (Ettayebi et al., 2016; Van Dycke et al., 2019). These approaches will undoubtedly improve knowledge (e.g. cellular biology, survival in the environment, and the validation of HuNoV indicators, for example), but they will probably not be suitable for routine food testing or for the assessment of disinfection treatments, owing to their complexity, high cost, low sensitivity, and time-consuming nature. In addition, extraction and concentration procedures for infectious viruses in foodstuffs are matrix dependent and yield variable recovery rates.

The detection and quantification of HuNoV genomes in food are currently performed using ISO 15216-2 (2019) and ISO 15216-1 (2017) standard methods, respectively. The prevalence of HuNoV genomes in commercial food products ranged from 9.0% and 71.6% for oysters, 6.7% and 16.0% for berries, and 5.0% and 28.2% for lettuce (Baert et al., 2011; EFSA, 2018; Loutreul et al., 2014; Lowther et al., 2012; Pérez-Rodríguez et al., 2014; Schaeffer et al., 2013). A recent analysis of the European baseline survey of HuNoVs in oysters showed that the prevalence of HuNoV genomes was estimated at 34.5% and 10.8% in European production areas and dispatch centers, respectively (EFSA, 2019).

Based on these prevalence data, new approaches are required for the specific detection of infectious HuNoVs in vulnerable foodstuffs and the environment. Measurements of the capsid integrity of HuNoVs, using HBGA-binding assays prior to genome detection, could be relevant. The benefits and drawbacks of this approach to predicting HuNoV infectivity have been comprehensively reviewed by Manuel et al. (2018). Some authors have suggested that HBGA-binding assays could indicate the extent of capsid damage in response to inactivation factors, and allow to better estimate HuNoV hazard in vulnerable foodstuffs, by discriminating infectious from non-infectious particles (Afolayan et al., 2016; Dancho et al., 2012; Moore et al., 2017). However, another study highlighted the fact that HuNoVs may specifically bind to HBGAs for particles with i) intact capsid with altered genome or, ii) intact genome with capsid damage(s) located in surrounding regions of the BP (Robin et al., 2019).

To more clearly define the potential relevance of HBGA-binding assays to the selection of infectious HuNoVs, this review has collected literature data related to the inactivation of culturable HuNoV surrogates (i.e. MNV, FCV, canine calicivirus (CaCV), TV, HAV, and PV)

and data related to the reduction in HuNoV genomes after four processing technologies (heat, chlorine, HPP, UV light). MNV, FCV, CaCV, and TV were selected because they belong to the *Caliciviridae* family. HAV and PV, belonging to the *Picornaviridae* family, were selected because of their high resistance to inactivation treatments, such as heat and UV light (Bertrand et al., 2012; Park et al., 2015). The use of these diverse surrogates gives us a better overview of how the behavior of HuNoVs is affected by different processing technologies. Data on reduction of HuNoV genomes were obtained from direct detection of viral genomes using RT-qPCR and from HBGA-binding assays, followed by genome detection (**Table 1**). Studies using porcine gastric mucin (PGM) before genome detection to evaluate the capsid integrity of HuNoVs after different treatments were also included because PGM (which contains A-like and Lewis-like HBGAs, and sialic acids) can bind to some GI and GII HuNoV strains (Tian et al., 2007b). All these data have been compared to determine whether HBGA-binding to HuNoVs followed by genome detection can be a reliable way of discriminating infectious from non-infectious particles.

4.1. Heat treatment

The inactivation of infectious HuNoV surrogates and reduction of HuNoV genomes have been examined in various foodstuffs and water, at different temperatures and with different exposure times. Bertrand et al. (2012) thoroughly reviewed the impact of heat treatment on virus inactivation in simple and complex matrices and described a specific regression model to determine the time (in days) to reduce the first $\log_{10}$ (TFL) as a function of temperature according to various parameters (virus species, detection method, matrix, low/high temperature). According to that review, the regression model was used to obtain the TFL values of infectious HuNoV surrogates (i.e. HAV, MNV, CaCV, and FCV) as a function of temperature, for temperatures ranging from 50°C to 80°C, in simple matrices (i.e. synthetic media, drinking water, groundwater). A second regression model was drawn up for HuNoV genomes in simple matrices, based on the TFL values used in that review and those determined by another, more recent studies (Bertrand et al., 2012; Escudero-Abarca et al., 2014). Both regression models of infectious HuNoV surrogates and HuNoV genomes directly quantified by RT-qPCR were compared to the TFL values of HuNoV genomes quantified after HBGA-binding assays calculated from data obtained by Robin et al. (2019) and Wang and Tian (2014) (**Fig. 2**).

As extensively described in the literature, heat-induced inactivation of infectious HuNoV surrogates is known to increase with temperature (Bertrand et al., 2012). Conversely, the decay

in TFL values of HuNoV genomes is systematically lower than that of the infectious HuNoV surrogates in the 50–80°C temperature range. This observation confirms the greater persistence of viral genome compared to infectious particles, thus reinforcing the proof that viral genome detection alone cannot predict the behavior of infectious particles after heating. However, quantifying HuNoV genomes after HBGA-binding assays reduces the overestimation of potential infectious HuNoVs provided by the direct detection of viral genome. This overestimation was higher than 1.8 log_{10} for temperatures below 65°C and remained below 1.0 log_{10} at 72°C. For infectious HuNoV surrogates, 20.6 and 1.3 additional minutes were required to reach a 1.0 log_{10} reduction in HuNoV genomes after HBGA-binding assays at 65°C and 72°C, respectively. RNAse treatments before genome detection by RTqPCR were often used for assessing capsid integrity (i.e. viral particles with damaged capsid allows entry of RNase and genomes of such particles are no more detected by RT-qPCR). Similar results were reported by Walker et al. (2019) when the assessment of the capsid integrity of GA bacteriophages, assessed using two different approaches (i.e. RNAse and PGM assays prior to genome detection), was compared with the corresponding number of infectious particles after heating. Neither method provided log_{10} reductions similar to those obtained from cultures of infectious GA bacteriophages at temperatures below 72°C held for 5 minutes.

It is widely acknowledged that heat treatments mainly cause damages to capsid integrity, rather than to the RNA genome. For GII.4 HuNoVs, the critical temperature leading to capsid disruption seems to be close to 70°C (Robin et al., 2019). At temperatures below 60°C, mechanisms of virus inactivation seem to be mainly due to minor modifications/alterations of the capsid, since the viral genome was not accessible to RNases (Brié et al., 2016).

In conclusion: HBGA-binding assays, followed by HuNoV genome detection can reduce underestimation of the virucidal efficacy of heat treatments that induce significant changes to the capsid structure (i.e. above 70°C). However, this approach does not prevent an overestimation of infectious HuNoVs following heat treatments ranging from 50°C to 70°C because of the minor changes of the capsid.

4.2. Chlorine treatment

Chlorinated water is widely used in many countries for washing fresh vegetables (e.g. salads, carrots) or berries (e.g. raspberries). Chlorine disinfection is also widely used in drinking water plants prior to distribution. The virucidal efficacy of chlorine disinfection has been evaluated in many studies over the years (Bosch et al., 2018; Knight et al., 2016). Log_{10} C/C_0 values of infectious HuNoV surrogates (i.e. MNV, TV, and FCV) and HuNoV genomes (whether or not

they are associated with HBGA-binding assays) as a function of chlorine doses in water or cell culture media were collected from the literature data. The results are shown in **Fig. 3**. C_0 corresponds to the value obtained at time 0 and C corresponds to the value obtained after chlorine disinfection for a given Ct value. Ct values were defined as the free chlorine concentration ($mg.L^{-1}$) multiplied by the contact time (in minutes).

As expected, chlorine-induced inactivation of infectious HuNoV surrogates increases with Ct value. More than 4.0 log_{10} inactivation was obtained for Ct values from 2.5 $mg.min.L^{-1}$ for MNV. Reductions in HuNoV genomes directly quantified by RT-qPCR as a function of Ct values were highly variable. The efficacy of chlorine disinfection on HuNoV genomes seems to be dependent on study design, and particularly on the methods used to measure free chlorine during the experiments and the purification of HuNoV particles before treatment. "Purified HuNoVs" from human stool samples were more sensitive to chlorine disinfection than "untreated HuNoVs" for the same Ct value. For example, a 3.6 log_{10} reduction in genomes of "purified HuNoVs" was obtained for a Ct value of 15 $mg.min.L^{-1}$, while a 0.4 log_{10} reduction in genomes of "untreated HuNoVs" was reached for a Ct value of 250 $mg.min.L^{-1}$ (Kitajima et al., 2010; Tung et al., 2013). The matrix effect promotes the persistence of HuNoVs during chlorine disinfection. The efficacy of decontamination depends on the amount of organic matter present in water, since this promotes the formation of chlorination by-products, but also the accessibility of viral particles to free chlorine (Bosch et al., 2018). As observed, after heating, HBGA-binding assays followed by HuNoV genome detection reduce the underestimation of the virucidal efficacy of chlorine disinfection provided by direct HuNoV genome detection. Free chlorine exerted a dose-dependent reduction in HuNoV genomes after HBGA-binding, as demonstrated by Wang and Tian (2014).

The mechanisms of virus inactivation induced by free chlorine have been shown to damage both the capsid and the genome (Brié et al., 2017; Wigginton et al., 2012b). Some authors showed that some particles may no longer recognize their receptors, while others are no longer able to inject their genomes into the host cell (Wigginton et al., 2012b). Both capsid disruption and RNA damages were observed by the same authors, even though the capsid structures of the viruses remained unbroken after high doses of chlorine (Brié et al., 2017; Loison et al., 2016). Another study showed a positive correlation between the reduction in infectious human astrovirus and the amount of oxidative damage to the viral capsid (i.e. carbonyl groups) after chlorine disinfection (Sano et al., 2010). The same authors suggest that the detection of carbonyl groups could be useful to estimate the reduction in HuNoV infectivity induced by oxidative

treatments. Using Qβ and MS2 bacteriophages, Bastin et al. (2020) have located oxidative damages to viral particles, and especially to cysteine, methionine, tyrosine, and tryptophan.
In conclusion: the reduction in the underestimation of HuNoV inactivation induced by chlorine disinfection using HBGA-binding assays prior to genome detection can be explained either by capsid disruption or by oxidative damages in the BP region. However, this approach has the drawback that it is unable to specifically select infectious HuNoVs, since oxidative damages can be incurred in the viral genome and/or capsid amino acids located in remote regions of the BP.

4.3. High pressure processing

For the past two decades, use of HPP has been a promising alternative for food products that cannot be treated using heat or chlorine disinfection. HPP compresses food suspended in liquid and then rapidly releases the pressure (Barbosa-Cánovas et al., 1998). The virucidal impact of HPP on contaminated foodstuffs has been thoroughly reviewed by Kingsley (2013). Using the literature data, the $\log_{10} C/C_0$ values of infectious HuNoV surrogates (i.e. MNV, TV, and FCV) and HuNoV genomes (whether associated with HBGA-binding assays or not) following 2 min of HPP in simple matrices (i.e. water or cell culture media) were collected. The results are shown in **Fig. 4** and **Fig. 5** for HPP at temperatures of 0–4°C and 20–25°C, respectively. As described previously (Bosch et al., 2018; Kingsley, 2013), the inactivation of infectious HuNoV surrogates increases with pressure applied, in a dose-dependent manner. HPP led to 0.1–7.4 $\log_{10}$ inactivation at 100–700 MPa and 0.7–6.0 $\log_{10}$ inactivation of infectious viruses at 150–450 MPa at 0–4°C and 20–25°C, respectively. We also noted a higher persistence of HuNoV genomes, since a reduction to below 1 $\log_{10}$ was achieved below 450 MPa at both temperature ranges. This was confirmed by a randomized clinical trial for the inactivation of infectious HuNoVs in artificially contaminated oysters (Leon et al., 2011). The same authors showed that GI.1 HuNoVs were completely inactivated at 600 MPa, but not at 400 MPa, after 5 minutes. The capability of HBGA-binding to GII.4 and GI.1 HuNoVs gradually decreased with increased HPP. There were clear differences between these two genotypes in the resistance of the viral capsid in response to HPP. Here again, by quantifying HuNoV genomes following HBGA-binding assays we can avoid the underestimation of the efficacy of HPP provided by estimating this based on direct detection of viral genome. This is particularly true of HPP above 200–250 MPa and 450–500 MPa in the two temperature ranges used for GII.4 HuNoVs and GI.1 HuNoVs, respectively. As previously described (Bosch et al., 2018), the inactivation of infectious viruses by HPP is influenced by the temperature, with greater efficacy in the 0–4°C

temperature range. The same authors emphasize that other factors, such as pH and salt concentrations within the foodstuffs, influence HPP performance in virus inactivation.

The mechanisms of virus inactivation induced by HPP mainly occur on the viral capsid, and involve the dissociation and denaturation of the capsid proteins (Bosch et al., 2018; Kingsley, 2013; Kingsley et al., 2002; Lou et al., 2011). Thus, alteration of the capsid proteins can prevent attachment to the cell receptors or genome injection into the host cell.

In conclusion: the use of HBGA-binding followed by genome detection decreases the overestimation of infectious GII.4 HuNoVs and GI.1 HuNoVs for HPP above 200–250 MPa and 450–500 MPa, respectively. But this approach does not appear to be suitable for predicting HuNoV infectivity in all situations, especially at low doses.

4.4. Ultraviolet light

UV light is frequently used as a sanitizer for drinking water, food contact surfaces, and liquid and solid food items (Food and Drug Administration, 2011). Many studies have been performed to assess the virucidal efficacy of UV light, particularly in water or buffer solutions (Bosch et al., 2018; Lee et al., 2008; Thurston-Enriquez et al., 2003). Log_{10} C/C_0 values of infectious HuNoV surrogates (i.e. MNV, HAV, TV, PV, and FCV) and HuNoV genomes (including a direct detection and after HBGA-binding assays) as a function of UV-C radiation between 220 nm and 254 nm were collected from the literature data (**Fig. 6**).

Infectious HuNoV surrogates are very sensitive to UV light, since less than 200 mJ/cm² is sufficient to reach 6.0 log_{10} inactivation. Conversely, HuNoV genomes are more persistent since a less than 3.0 log_{10} reduction was obtained after UV disinfection at 1,000 mJ/cm². No difference appears between HuNoV genomes directly quantified by RT-qPCR and HuNoV genomes quantified after HBGA-binding. Walker et al. (2019) compared the inactivation by UV light of infectious GA bacteriophages to that of HuNoVs, using two methods to determine capsid integrity (i.e. RNAse and PGM assays before genome quantification). The same authors showed that both methods could remove some of the non-infectious particles, but most of them were still detected by RT-qPCR, leading to an underestimation of the virucidal efficacy of UV treatment.

The mechanisms of virus inactivation induced by UV light have been widely investigated over the last four decades. Photons are absorbed by nucleic acids (i.e. RNA and DNA) and cause several types of damages involving either single bases, cross-links between adjacent bases, or cross-links between nucleic acids and proteins (Shetlar, 1980; Simonet and Gantzer, 2006a;

Wigginton et al., 2010, 2012b, 2012a). These cross-links can modify the integrity or conformation of the viral capsid (Bastin et al., 2020).

In conclusion: estimation of HuNoV inactivation by UV treatment through the use of HBGA-binding followed by genome detection does not provide any added value compared with direct detection of viral genomes. Damages to the capsid proteins or RNA genomes were not sufficient to prevent HBGA-binding and/or genome detection. Alternative approaches based on the measurement of genome integrity, such as detection of the whole genome or both ends of the genome could reduce the overestimation of infectious HuNoVs following UV treatments (Kostela et al., 2008; Li et al., 2002).

For all processing technologies (heat, chlorine, HPP, and UV light), direct genome detection very clearly underestimates the virucidal efficacy of treatments. The specific selection of HuNoV particles able to recognize HBGAs reduces this underestimation, but only for processing technologies inducing significant changes in capsid structure, such as heating above 70°C or HPP above 450–500 MPa. Conversely, this method does not prevent the overestimation of potential infectious HuNoVs after heating at lower temperatures, low dose HPP or UV treatments. Even though HBGA-binding assays followed by genome detection seem to limit this overestimation after chlorine disinfection, further investigation, using harmonized experiments, is required to better evaluate the impact of this treatment on capsid integrity.

5. HBGA-binding to HuNoVs: a factor promoting virus transmission

Virus transmission is not only affected by the inactivation of the virus but also by its adhesion to different surfaces. Virus adhesion is usually explained by non-specific (i.e. electrostatic or hydrophobic) interactions (Gerba and Betancourt, 2017; Vega et al., 2008). HBGA-binding to HuNoVs is specific, highly diverse, and may demonstrate the integrity of the BP on the capsid. Almand et al. (2017a) have classified non-HBGA ligands with specific binding interactions with HuNoV capsids into four groups: simple chemical components, complex human biological components, food ligands, and HBGA-like carbohydrates. All these groups are of interest to those seeking to better understand virus transmission through food and the environment, since they can bind to HuNoV capsids outside the host cell (Almand et al., 2017a; Etzold and Bode, 2014; Hansman et al., 2012; Koromyslova et al., 2015). With regard to foodstuffs, it has been demonstrated that HBGA-like carbohydrates found in the digestive tissues of oysters (i.e. A and H types, and sialic acids) promote the accumulation of HuNoVs in that specific organ (Le Guyader et al., 2006a; Maalouf et al., 2011, 2010; Tian et al., 2007a). Some food ligands were

also found on the surface of fresh vegetables and berries (i.e. A, H, and Lewis a types), and thus contribute to increase HuNoV adhesion (Esseili et al., 2012; Gao et al., 2016; Li et al., 2012a; Zhang et al., 2019). Finally, some HBGA-like carbohydrates present on bacteria found in the human gut (e.g. *E. cloacae*, lactic acid bacteria) can also participate in HuNoV transmission through food and the environment. Specific binding interactions between HuNoVs and environmental matrices, through HBGA-like carbohydrates, have been well described by Amarasiri and Sano (2019). In addition to non-specific interactions, these specific interactions with foodstuffs and bacteria can influence the attachment, behavior, and circulation of infectious HuNoVs in the environment.

If specific adhesions to foods, through HBGA-like carbohydrates, are significant compared to non-specific adhesions, HuNoVs able to interact with HBGAs should be more frequently detected in matrices responsible for viral foodborne outbreaks. This may be true of food contaminated by HuNoVs through the water cycle (e.g. fecal pollution of water, food that has come into contact with contaminated water) where adhesion capacity is important. In the case of contamination by HuNoVs through food handling operations, the most frequent mode of contamination, adhesion capacity probably has a minor impact because of the high degree of virus dissemination. It is highly difficult to classify food pollution origins by HuNoVs (i.e. from water cycle and others). For example, HuNoV outbreaks reported as person-to-person transmission events may have initially originated in food. Many HuNoV foodborne outbreaks are also due to food handling by infected people (Verhoef et al., 2015). Thus, it is of interest to compare the diversity of HuNoV genotypes detected in foodstuffs to that reported in infected human populations. This will potentially highlight a selection by foods based on their HBGA-binding profiles. However, it is important to underline that the relative HuNoV genotype prevalence in people and foods could differ between regions, based on a number of human host, societal, and cultural factors, so all comparisons should take that caveat into consideration.

GII.4 HuNoV is the most prevalent genotype worldwide, and has caused around 70% of outbreaks since 2002 (Beek et al., 2018). The ability of GII.4 HuNoVs to adapt to water/food transmission needs more comprehensive study, focusing on survival and/or adhesion properties in the environment (Mans, 2019; Matthews et al., 2012; Verhoef et al., 2010). At the genogroup level, it has been reported that waterborne outbreaks related to GI HuNoVs outnumbered those of GII HuNoVs (Matthews et al., 2012). At the genotype level, GI.2 and GI.4 HuNoVs were more frequently reported in foodborne than in human outbreaks from 1999 to 2004 (Verhoef et al., 2010). In studies of prevalence in foodstuffs, GI HuNoVs were more frequently detected in bivalve molluscan shellfish (46%) than in infected people (12%) (Verhoef et al., 2010).

Moreover, GI and GII HuNoVs were detected in 43% and 88%, respectively, of raw wastewaters from four municipal wastewater treatment plants (WWTPs) during winter months, and in 24% and 14%, respectively, of treated wastewaters (Silva et al., 2007). These same authors have suggested that WWTPs are less effective for the removal of GI HuNoVs than for that of GII HuNoVs.

Since HBGA-binding to HuNoVs is highly specific, with multiple binding patterns and variable relative affinities as a function of genotype, rather than at the genogroup level (Huang et al., 2005; Shirato et al., 2008), in 2019, literature data were analyzed to determine the presence of HuNoV genotypes in food matrices, whether or not they were implicated in foodborne outbreaks. The data were collected by separating prevalence studies from studies of foodborne outbreaks. For the first set of studies, the keywords "norovirus," "food," and "detection" were searched for, and a total of 441 records were found. Forty-three of these were selected, after the exclusion of non-relevant publications (e.g. those unrelated to food, and those dealing with viral detection in water or development of methods). Bivalve molluscan shellfish represented 86.3% of the total food matrices, compared with 13.6% for berries and vegetables. HuNoV genotypes are more rarely identified in berries and vegetables, but both GI and GII HuNoVs were found in similar proportions, ranging from 5% to 24.3% (Brassard et al., 2012; De Keuckelaere et al., 2015; El-Senousy et al., 2013; Loutreul et al., 2014; Pérez-Rodríguez et al., 2014; Stals et al., 2011). In the case of bivalve molluscan shellfish, 18 publications identified the HuNoV genotypes in their prevalence studies from 2003 to 2016. The data are represented in **Fig. 7**.

For the second set of studies dedicated to HuNoVs involved in foodborne outbreaks, the keywords "norovirus," "foodborne" and "outbreak" were searched for and a total of 432 records were found. Ninety of these, published between 1993 and 2019, were selected, after the exclusion of a large number of publications (i.e. those that dealt with transmission by food handlers, co-outbreaks with other pathogens, or waterborne outbreaks, or that did not contain information about the contaminated foodstuffs involved). Of the 90 publications, only 51 (56.7%) characterized the genotypes by sequencing. The proportions of bivalve molluscan shellfish, berries, vegetables, and other food items implicated in outbreaks in the selected publications were 53%, 16%, 14%, and 17%, respectively. The frequency of detection of each genotype for each food category is represented in **Fig. 8**.

Unlike the direct detection of HuNoVs in vulnerable foodstuffs using the ISO 15216 standard, which is limited to the genogroup, the determination of the genotype by sequencing is used in investigations of foodborne outbreaks when HuNoVs are detectable in leftover food. In the case of oysters, 23–25 different HuNoV genotypes were reported by Yu et al. (2015), based on

molecular epidemiology and temporal–geographical distribution from 1983 to 2014. The diversity of HuNoV genotypes reported in oysters could be explained by the dissemination of viral particles through the effluents of municipal WWTPs (or personal sanitation) located near shellfish production areas. In the case of berries and vegetables, water irrigation is considered a major source of viral contamination (Kokkinos et al., 2017). To better understand whether some food items could influence HuNoV transmission, HuNoV genotypes characterized by prevalence studies performed on bivalve molluscan shellfish (**Fig. 7**) and by several foodborne outbreak investigations (**Fig. 8**) were compared to those described in the literature as responsible for human gastroenteritis cases between 2000 and 2016 (Chan et al., 2015; Ferreira et al., 2010; Kumthip et al., 2018; Vega et al., 2013; Wang et al., 2012). As expected, GII.4 HuNoV is the most prevalent genotype reported in oysters in surveys and foodborne outbreak investigations. GI.4 HuNoV is the second most prevalent genotype reported in foodstuffs. Surprisingly, this genotype is not highly represented in cases of human infection, with a prevalence ranging from 0.3% to 1.1% (**Table 3**). GII.7, GII.6, GI.2, and GII.3 HuNoVs are also described as frequently detected in foodstuffs, but their occurrence in reported human cases is variable, ranging from 0.3% to 15% (**Table 3**).

To summarize: some genotypes, particularly GII.4, GII.3, and GII.6 HuNoVs, are frequently identified in both food and infected people. Conversely, other genotypes, such as GI.4, GI.2, and GII.7 HuNoVs, are frequently detected in food, but less often characterized in infected people. This could suggest the potential selection of certain HuNoV genotypes based on their adhesion capacities and/or survival in the environment and in humans. However, other reasons should not be overlooked, such as the detection of some less virulent strains in food, which would be less frequently isolated in clinical cases. Interestingly, we may observe that the six most prevalent genotypes in food, described above, belong to the A/B binding group described by Huang et al. (2005) (**Table 4**). However, GI.3, GII.1, and GII.12 HuNoVs belonging to the A/B binding group are less often described in foods but were frequently reported in human cases (**Table 3**). Thus, more comprehensive studies are required to improve knowledge of the potential selection of some HuNoV genotypes in food through non-HBGA ligands.

In conclusion: various non-HBGA ligands have been found in food or in the environment. It can therefore be assumed that specific binding interactions between HuNoVs and HBGA-like carbohydrates may have a direct influence on the adhesion capacity of HuNoVs to food matrices. This may occur directly, through ligands present in food items, or indirectly, through specific bacteria potentially present on food surfaces. These specific interactions in food and the environment are HuNoV genogroup- or genotype-dependent, but the selection of the

genogroup or genotype by non-HBGA binding capacity remains unclear and needs further investigation.

6. Conclusions

Molecular methods are currently widely used to detect HuNoV genomes in surveys of food or environmental matrices, but this strategy both overestimates the number of infectious HuNoVs in surveys and underestimates the virucidal efficacy of processing technologies. Several studies assume that HBGAs, putative attachment factors that promote HuNoV infection in host cells, could be suitable for selecting potential infectious particles. However, basic knowledge is required to better define the role of HBGAs during host cell infection before using HBGA-binding assays to potentially select infectious HuNoVs. This review highlighted the fact that HBGA-binding followed by genome detection can reduce the overestimation of infectious HuNoVs, but only for processing technologies that allow significant changes to the capsid structure (e.g. heating above 70°C or HPP above 450–500 MPa). Conversely, this approach is not suitable for estimating the virucidal efficacy of processing technologies (e.g. heating below 65–70°C, low dose HPP, UV light) that allow minor disruption of the capsid. Thus, HBGA-binding assays can only select the presence of intact BP located in the viral capsid, but cannot predict HuNoV infectivity.

In addition, a large number of non-HBGA ligands found in either food or the environment have now been identified. It is widely acknowledged that some HBGA-like carbohydrates promote the adhesion or accumulation of HuNoVs in food items, especially oysters and some fresh vegetables. Such interactions may enhance viral transmission through food and the environment. Epidemiological data indicate a trend toward the transmission of HuNoV genotypes, but the influence of specific binding interactions between HuNoVs and non-HBGA ligands on the behavior, survival, and circulation through the environment of viruses is still unclear and more comprehensive studies are needed.

Acknowledgements

The review was performed within the scope of OxyVir, a project funded by the "*Fonds Européen pour les Affaires Maritimes et la Pêche*" (FEAMP). This study was also supported by the Joint Technological Unit ACTIA VIROcontrol.

Funding

This research did not receive a specific grant from any funding agency in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

References

Afolayan, O.T., Webb, C.C., Cannon, J.L., 2016. Evaluation of a porcine gastric mucin and RNase A assay for the discrimination of infectious and non-infectious GI.1 and GII.4 norovirus following thermal, ethanol, or levulinic acid plus sodium dodecyl sulfate treatments. Food Environ. Virol. 8, 70–78. https://doi.org/10.1007/s12560-015-9219-z.

Almand, E.A., Moore, M.D., Jaykus, L.-A., 2019. Characterization of human norovirus binding to gut-associated bacterial ligands. BMC Res. Notes. 12, 607. https://doi.org/10.1186/s13104-019-4669-2.

Almand, E.A., Moore, M.D., Jaykus, L.-A., 2017a. Norovirus binding to ligands beyond histo-blood group antigens. Front. Microbiol. 8, 2549. https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02549.

Almand, E.A., Moore, M.D., Outlaw, J., Jaykus, L.-A., 2017b. Human norovirus binding to select bacteria representative of the human gut microbiota. Plos One 12, e0173124. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173124.

Amarasiri, M., Sano, D., 2019. Specific interactions between human norovirus and environmental matrices: effects on the virus ecology. Viruses 11, 224. https://doi.org/10.3390/v11030224.

Ambert-Balay, K., Bon, F., Guyader, F.L., Pothier, P., Kohli, E., 2005. Characterization of new recombinant noroviruses. J. Clin. Microbiol. 43, 5179–5186. https://doi.org/10.1128/JCM.43.10.5179-5186.2005.

Araud, E., Fuzawa, M., Shisler, J.L., Li, J., Nguyen, T.H., 2020. UV inactivation of rotavirus and tulane virus targets different components of the virions. Appl. Environ. Microbiol. 86, e02436-19. https://doi.org/10.1128/AEM.02436-19.

Atmar, R.L., Opekun, A.R., Gilger, M.A., Estes, M.K., Crawford, S.E., Neill, F.H., Ramani, S., Hill, H., Ferreira, J., Graham, D.Y., 2014. Determination of the 50% human infectious dose for norwalk virus. J. Infect. Dis. 209, 1016–1022. https://doi.org/10.1093/infdis/jit620.

Atmar, R.L., Ramani, S., Estes, M.K., 2018. Human noroviruses: recent advances in a 50-year history. Curr. Opin. Infect. Dis. 31, 422–432. https://doi.org/10.1097/QCO.0000000000000476.

Ausar, S.F., Foubert, T.R., Hudson, M.H., Vedvick, T.S., Middaugh, C.R., 2006. Conformational stability and disassembly of norwalk virus-like particles. J. Biol. Chem. 281, 19478–19488. https://doi.org/10.1074/jbc.M603313200.

Ayouni, S., Estienney, M., Sdiri-Loulizi, K., Ambert-Balay, K., de Rougemont, A., Aho, S., Hammami, S., Aouni, M., Guédiche, M.N., Pothier, P., Belliot, G., 2015. Relationship between GII.3 norovirus infections and blood group antigens in young children in Tunisia. Clin. Microbiol. Infect. 21, 874.e1-874.e8. https://doi.org/10.1016/j.cmi.2015.05.015.

Baert, L., Mattison, K., Loisy-Hamon, F., Harlow, J., Martyres, A., Lebeau, B., Stals, A., Van Coillie, E., Herman, L., Uyttendaele, M., 2011. Review: Norovirus prevalence in Belgian, Canadian and French fresh produce: A threat to human health? Int. J. Food Microbiol. 151, 261–269. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.09.013.

Barbosa-Cánovas, G.V., Pothakamury, U.R., Palou, E., Swanson, B.G., 1998. Nonthermal preservation of foods. Marcel Dekker. Inc, New York.

Bastin, G., Loison, P., Vernex-Loset, L., Dupire, F., Challant, J., Majou, D., Boudaud, N., Krier, G., Gantzer, C., 2020. Structural organizations of Qβ and MS2 phages affect capsid protein modifications by oxidants hypochlorous acid and peroxynitrite. Front. Microbiol. 11, 1157. https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01157.

Beek, J. van, Ambert-Balay, K., Botteldoorn, N., Eden, J.S., Fonager, J., Hewitt, J., Iritani, N., Kroneman, A., Vennema, H., Vinjé, J., White, P.A., Koopmans, M., on behalf of NoroNet. 2013. Indications for worldwide increased norovirus activity associated with emergence of a new variant of genotype II.4, late 2012. Euro Surveill. 18, 20345. https://doi.org/10.2807/ese.18.01.20345-en.

Beek, J. van, Graaf, M. de, Al-Hello, H., Allen, D.J., Ambert-Balay, K., Botteldoorn, N., Brytting, M., Buesa, J., Cabrerizo, M., Chan, M., Cloak, F., Bartolo, I.D., Guix, S., Hewitt, J., Iritani, N., Jin, M., Johne, R., Lederer, I., Mans, J., Martella, V., Maunula, L., McAllister, G., Niendorf, S., Niesters, H.G., Podkolzin, A.T., Poljsak-Prijatelj, M., Rasmussen, L.D., Reuter, G., Tuite, G., Kroneman, A., Vennema, H., Koopmans, M.P.G., 2018. Molecular surveillance of norovirus, 2005–16: an epidemiological analysis of data collected from the NoroNet network. Lancet Infect. Dis. 18, 545–553. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30059-8.

Bertrand, I., Schijven, J.F., Sánchez, G., Wyn-Jones, P., Ottoson, J., Morin, T., Muscillo, M., Verani, M., Nasser, A., de Roda Husman, A.M., Myrmel, M., Sellwood, J., Cook, N., Gantzer, C., 2012. The impact of temperature on the inactivation of enteric viruses in food and water: a review: Virus inactivation. J. Appl. Microbiol. 112, 1059–1074. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05267.x.

Bosch, A., Gkogka, E., Le Guyader, F.S., Loisy-Hamon, F., Lee, A., van Lieshout, L., Marthi, B., Myrmel, M., Sansom, A., Schultz, A.C., Winkler, A., Zuber, S., Phister, T., 2018. Foodborne viruses: Detection, risk assessment, and control options in food processing. Int. J. Food Microbiol. 285, 110–128. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.06.001.

Boudaud, N., Machinal, C., David, F., Fréval-Le Bourdonnec, A., Jossent, J., Bakanga, F., Arnal, C., Jaffrezic, M.P., Oberti, S., Gantzer, C., 2012. Removal of MS2, Qβ and GA bacteriophages during drinking water treatment at pilot scale. Water Res. 46, 2651–2664. https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.02.020.

Boxman, I.L.A., Tilburg, J.J.H.C., te Loeke, N. a. J.M., Vennema, H., de Boer, E., Koopmans, M., 2007. An Efficient and Rapid Method for Recovery of Norovirus from Food Associated with Outbreaks of Gastroenteritis. J. Food Prot. 70, 504–508. https://doi.org/10.4315/0362-028X-70.2.504

Boxman, I.L.A., Tilburg, J.J.H.C., te Loeke, N.A.J.M., Vennema, H., Jonker, K., de Boer, E., Koopmans, M., 2006. Detection of noroviruses in shellfish in the Netherlands. Int. J. Food Microbiol. 108, 391–396. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.01.002.

Brassard, J., Gagné, M.-J., Généreux, M., Côté, C., 2012. Detection of human food-borne and zoonotic viruses on irrigated, field-grown strawberries. Appl. Environ. Microbiol. 78, 3763–3766. https://doi.org/10.1128/AEM.00251-12.

Brié, A., Bertrand, I., Meo, M., Boudaud, N., Gantzer, C., 2016. The effect of heat on the physicochemical properties of bacteriophage MS2. Food Environ. Virol. 8, 251–261. https://doi.org/10.1007/s12560-016-9248-2.

Brié, A., Razafimahefa, R., Loutreul, J., Robert, A., Gantzer, C., Boudaud, N., Bertrand, I., 2017. The effect of heat and free chlorine treatments on the surface properties of murine norovirus. Food Environ. Virol. 9, 149–158. https://doi.org/10.1007/s12560-016-9271-3.

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. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000831.

Cao, S., Lou, Z., Tan, M., Chen, Y., Liu, Y., Zhang, Z., Zhang, X.C., Jiang, X., Li, X., Rao, Z., 2007. Structural basis for the recognition of blood group trisaccharides by norovirus. J. Virol. 81, 5949–5957. https://doi.org/10.1128/JVI.00219-07.

CDC, 2018. Surveillance for foodborne disease outbreaks, United States, 2016, Annual Report.

Chan, M.C.W., Leung, T.F., Chung, T.W.S., Kwok, A.K., Nelson, E.A.S., Lee, N., Chan, P.K.S., 2015. Virus genotype distribution and virus burden in children and adults hospitalized for norovirus gastroenteritis, 2012–2014, Hong Kong. Sci. Rep. 5, 11507. https://doi.org/10.1038/srep11507.

Chen, H., Hoover, D.G., Kingsley, D.H., 2005. Temperature and treatment time influence high hydrostatic pressure inactivation of feline calicivirus, a norovirus surrogate. J. Food Prot. 68, 2389–2394. https://doi.org/10.4315/0362-028X-68.11.2389.

Chen, Y., Tan, M., Xia, M., Hao, N., Zhang, X.C., Huang, P., Jiang, X., Li, X., Rao, Z., 2011. Crystallography of a lewis-binding norovirus, elucidation of strain-specificity to the polymorphic human histo-blood group antigens. Plos Pathog. 7, e1002152. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002152.

Cheng, P.K.C., Wong, D.K.K., Chung, T.W.H., Lim, W.W.L., 2005. Norovirus contamination found in oysters worldwide. J. Med. Virol. 76, 593–597. https://doi.org/10.1002/jmv.20402.

Cho, H.G., Lee, S.G., Lee, M.Y., Hur, E.S., Lee, J.S., Park, P.H., Park, Y.B., Yoon, M.H., Paik, S.Y., 2016. An outbreak of norovirus infection associated with fermented oyster consumption in South Korea, 2013. Epidemiol. Infect. 144, 2759–2764. https://doi.org/10.1017/S0950268816000170.

Corrêa, A. de A., Carratala, A., Barardi, C.R.M., Calvo, M., Girones, R., Bofill-Mas, S., 2012. Comparative inactivation of murine norovirus, human adenovirus, and human JC polyomavirus by chlorine in seawater. Appl. Environ. Microbiol. 78, 6450–6457. https://doi.org/10.1128/AEM.01059-12.

Costantini, V., Loisy, F., Joens, L., Le Guyader, F.S., Saif, L.J., 2006a. Human and animal enteric caliciviruses in oysters from different coastal regions of the United States. Appl. Environ. Microbiol. 72, 1800–1809. https://doi.org/10.1128/AEM.72.3.1800-1809.2006.

Cotterelle, B., Drougard, C., Rolland, J., Becamel, M., Boudon, M., Pinede, S., Traoré, O., Balay, K., Pothier, P., Espié, E., 2005. Outbreak of norovirus infection associated with

the consumption of frozen raspberries, France, March 2005. Wkly. Releases (1997–2007). 10, 2690. https://doi.org/10.2807/esw.10.17.02690-en.

Croci, L., Losio, M.N., Suffredini, E., Pavoni, E., Di Pasquale, S., Fallacara, F., Arcangeli, G., 2007. Assessment of human enteric viruses in shellfish from the northern Adriatic sea. Int. J. Food Microbiol. 114, 252–257. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.09.015.

Cromeans, T., Park, G.W., Costantini, V., Lee, D., Wang, Q., Farkas, T., Lee, A., Vinjé, J., 2014. Comprehensive comparison of cultivable norovirus surrogates in response to different inactivation and disinfection treatments. Appl. Environ. Microbiol. 80, 5743–5751. https://doi.org/10.1128/AEM.01532-14.

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. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.02.010.

David, S.T., McIntyre, L., MacDougall, L., Kelly, D., Liem, S., Schallié, K., McNabb, A., Houde, A., Mueller, P., Ward, P., Trottier, Y.-L., Brassard, J., 2007. An outbreak of norovirus caused by consumption of oysters from geographically dispersed harvest sites, British Columbia, Canada, 2004. Foodborne Pathog. Dis. 4, 349–358. https://doi.org/10.1089/fpd.2007.0015.

de Graaf, M., Beek, J. van, Koopmans, M.P.G., 2016. Human norovirus transmission and evolution in a changing world. Nat. Rev. Microbiol. 14, 421–433. https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.48.

De Keuckelaere, A., Li, D., Deliens, B., Stals, A., Uyttendaele, M., 2015. Batch testing for noroviruses in frozen raspberries. Int. J. Food Microbiol. 192, 43–50. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.09.024.

de 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. https://doi.org/10.1093/cid/cir380.

DiCaprio, E., Ma, Y., Hughes, J., Li, J., 2013. Epidemiology, prevention, and control of the number one foodborne illness: human norovirus. Infect. Dis. Clin. 27, 651–674. https://doi.org/10.1016/j.idc.2013.05.009.

DiCaprio, E., Ye, M., Chen, H., Li, J., 2019. Inactivation of human norovirus and tulane virus by high pressure processing in simple mediums and strawberry puree. Front. Sustain. Food Syst. 3, 26. https://doi.org/10.3389/fsufs.2019.00026.

Donaldson, E.F., Lindesmith, L.C., LoBue, A.D., Baric, R.S., 2010. Viral shape-shifting: norovirus evasion of the human immune system. Nat. Rev. Microbiol. 8, 231–241. https://doi.org/10.1038/nrmicro2296

Donaldson, E.F., Lindesmith, L.C., Lobue, A.D., Baric, R.S., 2008. Norovirus pathogenesis: mechanisms of persistence and immune evasion in human populations. Immunol. Rev. 225, 190–211. https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2008.00680.x.

Doyle, A., Barataud, D., Gallay, A., Thiolet, J.M., Guyaguer, S.L., Kohli, E., Vaillant, V., 2004. Norovirus foodborne outbreaks associated with the consumption of oysters from the Etang de Thau, France, December 2002. Euro Surveill. 9, 24–26. https://doi.org/10.2807/esm.09.03.00451-en.

Dunkin, N., Weng, S., Jacangelo, J.G., Schwab, K.J., 2017. Inactivation of human norovirus genogroups I and II and surrogates by free chlorine in postharvest leafy green wash water. Appl. Environ. Microbiol. 83, e01457-17. https://doi.org/10.1128/AEM.01457-17.

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. https://doi.org/10.1016/j.jcv.2010.09.001.

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. https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.12.005.

EFSA, 2019. Analysis of the European baseline survey of norovirus in oysters. EFSA J. 17, e05762. https://doi.org/10.2903/j.efsa.2019.5762

EFSA, 2018. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017. EFSA J. 16(12):5500. https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5500.

EFSA, 2017. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016. EFSA J. 15(12):5077. https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.5077.

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. https://doi.org/10.1017/S0950268816000194.

El-Senousy, W.M., Costafreda, M.I., Pintó, R.M., Bosch, A., 2013. Method validation for norovirus detection in naturally contaminated irrigation water and fresh produce. Int. J. Food Microbiol. 167, 74–79. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.06.023.

Escudero-Abarca, B.I., Rawsthorne, H., Goulter, R.M., Suh, S.H., Jaykus, L.A., 2014. Molecular methods used to estimate thermal inactivation of a prototype human norovirus: More heat resistant than previously believed? Food Microbiol. 41, 91–95. https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.01.009.

Espinosa, A.C., Mazari-Hiriart, M., Espinosa, R., Maruri-Avidal, L., Méndez, E., Arias, C.F., 2008. Infectivity and genome persistence of rotavirus and astrovirus in groundwater and surface water. Water Res. 42, 2618–2628. https://doi.org/10.1016/j.watres.2008.01.018.

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. https://doi.org/10.1128/AEM.07081-11.

Ettayebi, K., Crawford, S.E., Murakami, K., Broughman, J.R., Karandikar, U., Tenge, V.R., Neill, F.H., Blutt, S.E., Zeng, X.-L., Qu, L., Kou, B., Opekun, A.R., Burrin, D., Graham, D.Y., Ramani, S., Atmar, R.L., Estes, M.K., 2016. Replication of human noroviruses in stem cell-derived human enteroids. Science 353, 1387–1393. https://doi.org/10.1126/science.aaf5211.

Etzold, S., Bode, L., 2014. Glycan-dependent viral infection in infants and the role of human milk oligosaccharides. Curr. Opin. Virol 7, 101–107. https://doi.org/10.1016/j.coviro.2014.06.005.

Falkenhorst, G., Krusell, L., Lisby, M., Madsen, S.B., Böttiger, B.E., Mølbak, K., 2005. Imported frozen raspberries cause a series of norovirus outbreaks in Denmark, 2005. Wkly. Releases (1997–2007). 10, 2795. https://doi.org/10.2807/esw.10.38.02795-en.

Feliciano, L., Li, J., Lee, J., Pascall, M.A., 2012. Efficacies of sodium hypochlorite and quaternary ammonium sanitizers for reduction of norovirus and selected Bacteria during Ware-Washing Operations. PLoS ONE 7, e50273. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050273

Ferreira, M.S.R., Victoria, M., Carvalho-Costa, F.A., Vieira, C.B., Xavier, M.P.T.P., Fioretti, J.M., Andrade, J., Volotão, E.M., Rocha, M., Leite, J.P.G., Miagostovich, M.P., 2010. Surveillance of norovirus infections in the state of Rio de Janeiro, Brazil 2005–2008. J. Med. Virol. 82, 1442–1448. https://doi.org/10.1002/jmv.21831.

Fitzgerald, T.L., Merritt, T.D., Zammit, A., McLeod, C., Landinez, L., White, P.A., Munnoch, S.A., Durrheim, D.N., 2014. An outbreak of norovirus genogroup II associated with New South Wales oysters. Commun. Dis. Intell. Q. Rep. 38, E9-E15.

Food and Drug Administration, 2011. Ultraviolet radiation for the processing and treatment of food. - https://www.govinfo.gov/app/details/CFR-2011-title21-vol3/CFR-2011-title21-vol3-sec179-39 (accessed 21 November 2019).

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. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.02.003.

Gallimore, C.I., Iturriza-Gomara, M., Xerry, J., Adigwe, J., Gray, J.J., 2007. Inter-seasonal diversity of norovirus genotypes: Emergence and selection of virus variants. Arch. Virol. 152, 1295–1303. https://doi.org/10.1007/s00705-007-0954-9.

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. https://doi.org/10.1128/AEM.04096-15.

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. https://doi.org/10.1128/AEM.69.7.3965-3969.2003.

Gerba, C.P., Betancourt, W.Q., 2017. Viral aggregation: impact on virus behavior in the environment. Environ. Sci. Technol. 51, 7318–7325. https://doi.org/10.1021/acs.est.6b05835.

Glasscock, 2007. Multistate outbreak of norovirus gastroenteritis among attendees at a family reunion --- Grant County, West Virginia, October 2006. https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5627a1.htm (accessed 12 December 2019).

Hansman, G.S., Biertümpfel, C., Georgiev, I., McLellan, J.S., Chen, L., Zhou, T., Katayama, K., Kwong, P.D., 2011. Crystal structures of GII.10 and GII.12 norovirus protruding domains in complex with histo-blood group antigens reveal details for a potential site of vulnerability. J. Virol. 85, 6687–6701. https://doi.org/10.1128/JVI.00246-11.

Hansman, G.S., Oka, T., Li, T.-C., Nishio, O., Noda, M., Takeda, N., 2008. Detection of human enteric viruses in Japanese clams. J. Food Prot. 71, 1689–1695. https://doi.org/10.4315/0362-028X-71.8.1689.

Hansman, G.S., Shahzad-ul-Hussan, S., McLellan, J.S., Chuang, G.-Y., Georgiev, I., Shimoike, T., Katayama, K., Bewley, C.A., Kwong, P.D., 2012. Structural basis for norovirus inhibition and fucose mimicry by citrate. J. Virol. 86, 284–292. https://doi.org/10.1128/JVI.05909-11.

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. https://doi.org/10.1128/JVI.76.23.12335-12343.2002.

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. https://doi.org/10.1128/AEM.01905-15.

Hirneisen, K.A., Black, E.P., Cascarino, J.L., Fino, V.R., Hoover, D.G., Kniel, K.E., 2010. Viral inactivation in foods: a review of traditional and novel food-processing technologies. Compr. Rev. Food Sci. Food Saf. 9, 3–20. https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2009.00092.x.

Hirneisen, K.A., Kniel, K.E., 2013. Comparing human norovirus surrogates: murine norovirus and tulane virus. J. Food Prot. 76, 139–143. https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-12-216.

Höhne, M., Niendorf, S., Mas Marques, A., Bock, C.-T., 2015. Use of sequence analysis of the P2 domain for characterization of norovirus strains causing a large multistate outbreak of norovirus gastroenteritis in Germany 2012. Int. J. Med. Microbiol. 305, 612–618. https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2015.08.010.

Huang, J., Xu, X., Weng, Q., Hong, H., Guo, Z., He, S., Niu, J., 2013. Serial foodborne norovirus outbreaks associated with multiple genotypes. PLos One 8, e63327. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063327.

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. https://doi.org/10.1086/375742.

Huang, P., Farkas, T., Zhong, W., Tan, M., Thornton, S., Morrow, A.L., Jiang, X., 2005. Norovirus and histo-blood group antigens: demonstration of a wide spectrum of strain

specificities and classification of two major binding groups among multiple binding patterns. J. Virol. 79, 6714–6722. https://doi.org/10.1128/JVI.79.11.6714-6722.2005.

Huo, Y., Wan, X., Ling, T., Shen, S., 2016. Biological and immunological characterization of norovirus major capsid proteins from three different genotypes. Microb. Pathog. 90, 78–83. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2015.11.022.

Huo, Y., Wang, W., Zheng, L., Chen, X., Shen, S., Wang, M., 2017. Enzymatic cleavage promotes disassembly of GII.3 norovirus virus like particles and its binding to salivary histo-blood group antigens. Virus Res. 240, 18–24. https://doi.org/10.1016/j.virusres.2017.07.017.

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. https://doi.org/10.1086/339883.

Imamura, S., Haruna, M., Goshima, T., Kanezashi, H., Okada, T., Akimoto, K., 2016. Application of next-generation sequencing to evaluate the profile of noroviruses in pre- and post-depurated oysters. Foodborne Pathog. Dis. 13, 559–565. https://doi.org/10.1089/fpd.2016.2150.

Imamura, S., Kanezashi, H., Goshima, T., Haruna, M., Okada, T., Inagaki, N., Uema, M., Noda, M., Akimoto, K., 2017. Next-generation sequencing analysis of the diversity of human noroviruses in Japanese oysters. Foodborne Pathog. Dis. 14, 465–471. https://doi.org/10.1089/fpd.2017.2289.

Iritani, N., Kaida, A., Abe, N., Kubo, H., Sekiguchi, J.-I., Yamamoto, S.P., Goto, K., Tanaka, T., Noda, M., 2014. Detection and genetic characterization of human enteric viruses in oyster-associated gastroenteritis outbreaks between 2001 and 2012 in Osaka City, Japan. J. Med. Virol. 86, 2019–2025. https://doi.org/10.1002/jmv.23883.

ISO 15216-1 Microbiology of the food chain - Horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus using real-time RTPCR- Part 1: Method for quantification (2017).

ISO 15216-2 Microbiology of the food chain - Horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus using real-time RT-PCR - Part 2: Method for detection (2019).

Jin, M., Zhou, Y., Xie, H., Fu, J., He, Y., Zhang, S., Jing, H., Kong, X., Sun, X., Li, H., Zhang, Q., Li, K., Zhang, Y., Zhou, D., Xing, W., Liao, Q., Liu, N., Yu, H., Jiang, X., Tan, M., Duan, Z., 2016. Characterization of the new GII.17 norovirus variant that

emerged recently as the predominant strain in China. J. Gen. Virol. 97, 2620–2632. https://doi.org/10.1099/jgv.0.000582.

Jones, M.K., Watanabe, M., Zhu, S., Graves, C.L., Keyes, L.R., Grau, K.R., Gonzalez-Hernandez, M.B., Iovine, N.M., Wobus, C.E., Vinjé, J., 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. https://doi.org/10.1126/science.1257147.

Jung, J., Grant, T., Thomas, D.R., Diehnelt, C.W., Grigorieff, N., Joshua-Tor, L., 2019. High-resolution cryo-EM structures of outbreak strain human norovirus shells reveal size variations. Proc. Natl. Acad. Sci. 116, 12828–12832. https://doi.org/10.1073/pnas.1903562116.

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.

Kilic, T., Koromyslova, A., Hansman, G.S., 2018. Structural basis for human norovirus capsid binding to bile acids. J. Virol. 93, e01581-18. https://doi.org/10.1128/JVI.01581-18.

Kingsley, D.H., 2013. High pressure processing and its application to the challenge of virus-contaminated foods. Food Environ. Virol. 5, 1–12. https://doi.org/10.1007/s12560-012-9094-9.

Kingsley, D.H., Holliman, D.R., Calci, K.R., Chen, H., Flick, G.J., 2007. Inactivation of a norovirus by high-pressure processing. Appl. Environ. Microbiol. 73, 581–585. https://doi.org/10.1128/AEM.02117-06.

Kingsley, D.H., Hoover, D.G., Papafragkou, E., Richards, G.P., 2002. Inactivation of hepatitis A virus and a calicivirus by high hydrostatic pressure. J. Food Prot. 65, 1605–1609. https://doi.org/10.4315/0362-028X-65.10.1605.

Kingsley, D.H., Vincent, E.M., Meade, G.K., Watson, C.L., Fan, X., 2014. Inactivation of human norovirus using chemical sanitizers. Int. J. Food Microbiol. 171, 94–99. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.11.018.

Kirk, M.D., Pires, S.M., Black, R.E., Caipo, M., Crump, J.A., Devleesschauwer, B., Döpfer, D., Fazil, A., Fischer-Walker, C.L., Hald, T., Hall, A.J., Keddy, K.H., Lake, R.J., Lanata, C.F., Torgerson, P.R., Havelaar, A.H., Angulo, F.J., 2015. World health organization estimates of the global and regional disease burden of 22 foodborne bacterial, protozoal, and viral diseases, 2010: a data synthesis. Plos Med. 12, e1001921. https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001921.

Kitajima, M., Tohya, Y., Matsubara, K., Haramoto, E., Utagawa, E., Katayama, H., 2010. Chlorine inactivation of human norovirus, murine norovirus and poliovirus in drinking water. Lett. Appl. Microbiol. 51, 119–121. https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2010.02869.x.

Kittigul, L., Pombubpa, K., Sukonthalux, S., Rattanatham, T., Utrarachkij, F., 2011. Noroviruses in oysters from local markets and oyster farms in southern Thailand. Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health 42, 105-113.

Kittigul, L., Thamjaroen, A., Chiawchan, S., Chavalitshewinkoon-Petmitr, P., Pombubpa, K., Diraphat, P., 2016. Prevalence and molecular genotyping of noroviruses in market oysters, mussels, and cockles in Bangkok, Thailand. Food Environ. Virol. 8, 133–140. https://doi.org/10.1007/s12560-016-9228-6.

Knight, Angus, Haines, J., Stals, A., Li, D., Uyttendaele, M., Knight, Alastair, Jaykus, L.-A., 2016. A systematic review of human norovirus survival reveals a greater persistence of human norovirus RT-qPCR signals compared to those of cultivable surrogate viruses. Int. J. Food Microbiol. 216, 40–49. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.08.015.

Kobayashi, S., Natori, K., Takeda, N., Sakae, K., 2004. Immunomagnetic capture RT-PCR for detection of norovirus from foods implicated in a foodborne outbreak. Microbiol. Immunol. 48, 201–204. https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2004.tb03506.x.

Kokkinos, P., Kozyra, I., Lazic, S., Söderberg, K., Vasickova, P., Bouwknegt, M., Rutjes, S., Willems, K., Moloney, R., de Roda Husman, A.M., Kaupke, A., Legaki, E., D'Agostino, M., Cook, N., von Bonsdorff, C.-H., Rzeżutka, A., Petrovic, T., Maunula, L., Pavlik, I., Vantarakis, A., 2017. Virological quality of irrigation water in leafy green vegetables and berry fruits production chains. Food Environ. Virol. 9, 72–78. https://doi.org/10.1007/s12560-016-9264-2.

Koromyslova, A.D., Leuthold, M.M., Bowler, M.W., Hansman, G.S., 2015. The sweet quartet: binding of fucose to the norovirus capsid. Virology 483, 203–208. https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.04.006.

Kostela, J., Ayers, M., Nishikawa, J., McIntyre, L., Petric, M., Tellier, R., 2008. Amplification by long RT-PCR of near full-length norovirus genomes. J. Virol. Methods 149, 226–230. https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2008.02.001.

Kumthip, K., Khamrin, P., Maneekarn, N., 2018. Molecular epidemiology and genotype distributions of noroviruses and sapoviruses in Thailand 2000-2016: a review. J. Med. Virol. 90, 617–624. https://doi.org/10.1002/jmv.25019.

La Rosa, G., Della Libera, S., Iaconelli, M., Proroga, Y.T.R., De Medici, D., Martella, V., Suffredini, E., 2017. Detection of norovirus GII.17 Kawasaki 2014 in shellfish, marine water and underwater sewage discharges in Italy. Food Environ. Virol. 9, 326–333. https://doi.org/10.1007/s12560-017-9290-8.

Larsson, M.M., Rydell, G.E.P., Grahn, A., Rodríguez-Diaz, J., Åkerlind, B., Hutson, A.M., Estes, M.K., Larson, G., Svensson, L., 2006. Antibody prevalence and titer to norovirus (genogroup II) correlate with secretor (FUT2) but not with ABO phenotype or lewis (FUT3) genotype. J. Infect. Dis. 194, 1422–1427.

Le Guyader, F.S., Krol, J., Ambert-Balay, K., Ruvoen-Clouet, N., Desaubliaux, B., Parnaudeau, S., Le Saux, J.-C., Ponge, A., Pothier, P., Atmar, R.L., Le Pendu, J., 2010. Comprehensive analysis of a norovirus-associated gastroenteritis outbreak, from the environment to the consumer. J. Clin. Microbiol. 48, 915–920. https://doi.org/10.1128/JCM.01664-09.

Le Guyader, F.S., Loisy, F., Atmar, R.L., Hutson, A.M., Estes, M.K., Ruvoën-Clouet, N., Pommepuy, M., Le Pendu, J., 2006a. Norwalk virus–specific binding to oyster digestive tissues. Emerg. Infect. Dis. 12, 931–936. https://doi.org/10.3201/eid1206.051519.

Le Guyader, F.S., Neill, F.H., Dubois, E., Bon, F., Loisy, F., Kohli, E., Pommepuy, M., Atmar, R.L., 2003. A semiquantitative approach to estimate Norwalk-like virus contamination of oysters implicated in an outbreak. Int. J. Food Microbiol. 87, 107–112. https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00058-8.

Lee, J., Zoh, K., Ko, G., 2008. Inactivation and UV disinfection of murine norovirus with TiO2 under various environmental conditions. Appl. Environ. Microbiol. 74, 2111–2117. https://doi.org/10.1128/AEM.02442-07.

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. https://doi.org/10.1038/srep25017.

Leon, J.S., Kingsley, D.H., Montes, J.S., Richards, G.P., Lyon, G.M., Abdulhafid, G.M., Seitz, S.R., Fernandez, M.L., Teunis, P.F., Flick, G.J., Moe, C.L., 2011. Randomized, double-blinded clinical trial for human norovirus inactivation in oysters by high hydrostatic pressure processing. Appl. Environ. Microbiol. 77, 5476–5482. https://doi.org/10.1128/AEM.02801-10.

Li, D., Baert, L., Xia, M., Zhong, W., Jiang, X., Uyttendaele, M., 2012a. Effects of a variety of food Extracts and juices on the specific binding ability of norovirus GII.4 P

particles. J. Food Prot. 75, 1350–1354. https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-12-002.

Li, D., Baert, L., Xia, M., Zhong, W., Van Coillie, E., Jiang, X., Uyttendaele, M., 2012b. Evaluation of methods measuring the capsid integrity and/or functions of noroviruses by heat inactivation. J. Virol. Methods 181, 1–5. https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2012.01.001.

Li, J., Predmore, A., Divers, E., Lou, F., 2012. New interventions against human norovirus: progress, opportunities, and challenges. Annu. Rev. Food Sci. Technol. 3, 331–352. https://doi.org/10.1146/annurev-food-022811-101234.

Li, J.W., Xin, Z.T., Wang, X.W., Zheng, J.L., Chao, F.H., 2002. Mechanisms of inactivation of hepatitis A virus by chlorine. Appl. Environ. Microbiol. 68, 4951–4955. https://doi.org/10.1128/AEM.68.10.4951-4955.2002.

Li, X., Chen, H., 2015. Evaluation of the porcine gastric mucin binding assay for high-pressure-inactivation studies using murine norovirus and tulane virus. Appl. Environ. Microbiol. 81, 515–521. https://doi.org/10.1128/AEM.02971-14.

Li, X., Chen, H., Kingsley, D.H., 2013. The influence of temperature, pH, and water immersion on the high hydrostatic pressure inactivation of GI.1 and GII.4 human noroviruses. Int. J. Food Microbiol. 167, 138–143. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.08.020.

Li, X., Huang, R., Chen, H., 2017. Evaluation of assays to quantify infectious human norovirus for heat and high-pressure inactivation studies using tulane virus. Food Environ. Virol. 9, 314–325. https://doi.org/10.1007/s12560-017-9288-2.

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. https://doi.org/10.1128/JVI.79.5.2900-2909.2005.

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. https://doi.org/10.1038/nm860.

Lodo, K.L., Veitch, M.G., Green, M.L., 2014. An outbreak of norovirus linked to oysters in Tasmania 38, 16–19.

Loison, P., Majou, D., Gelhaye, E., Boudaud, N., Gantzer, C., 2016. Impact of reducing and oxidizing agents on the infectivity of Qβ phage and the overall structure of its capsid. FEMS Microbiol. Ecol. 92, fiw153. https://doi.org/10.1093/femsec/fiw153.

Lopman, B., Vennema, H., Kohli, E., Pothier, P., Sanchez, A., Negredo, A., Buesa, J., Schreier, E., Gray, J., 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., Svennson, L., Van Duijnhoven, Y., Koopmans, M., Reacher, M., Brown, D., Iturriza, M., 2004. Increase in viral gastroenteritis outbreaks in Europe and epidemic spread of new norovirus variant. The Lancet. 363, 682–688. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)15641-9.

Lou, F., Huang, P., Neetoo, H., Gurtler, J.B., Niemira, B.A., Chen, H., Jiang, X., Li, J., 2012. High-pressure inactivation of human norovirus virus-like particles provides evidence that the capsid of human norovirus is highly pressure resistant. Appl. Environ. Microbiol. 78, 5320–5327. https://doi.org/10.1128/AEM.00532-12.

Lou, F., Neetoo, H., Chen, H., Li, J., 2011. Inactivation of a human norovirus surrogate by high pressure processing: effectiveness, mechanism, and potential application in the fresh produce industry. Appl. Environ. Microbiol. 77, 1862–1871. https://doi.org/10.1128/AEM.01918-10.

Loury, P., Guyader, F.S.L., Saux, J.C.L., Ambert-Balay, K., Parrot, P., Hubert, B., 2015. A norovirus oyster-related outbreak in a nursing home in France, January 2012. Epidemiol. Infect. 143, 2486–2493. https://doi.org/10.1017/S0950268814003628.

Loutreul, J., Cazeaux, C., Levert, D., Nicolas, A., Vautier, S., Sauvage, A.L.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. https://doi.org/10.1007/s12560-014-9150-8.

Lowmoung, T., Pombubpa, K., Duangdee, T., Tipayamongkholgul, M., Kittigul, L., 2017. Distribution of naturally occurring norovirus genogroups I, II, and IV in oyster tissues. Food Environ. Virol. 9, 415–422. https://doi.org/10.1007/s12560-017-9305-5.

Lowther, J.A., Gustar, N.E., Hartnell, R.E., Lees, D.N., 2012. Comparison of norovirus RNA levels in outbreak-related oysters with background environmental levels. J. Food Prot. 75, 389–393. https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-11-360.

Ma, L., Zhao, F., Yao, L., Li, X., Zhou, D., Zhang, R., 2013. The presence of genogroup II norovirus in retail shellfish from seven coastal cities in China. Food Environ. Virol. 5, 81–86. https://doi.org/10.1007/s12560-013-9102-8.

Maalouf, H., Schaeffer, J., Parnaudeau, S., Pendu, J.L., Atmar, R.L., Crawford, S.E., Guyader, F.S.L., 2011. Strain-dependent norovirus bioaccumulation in oysters. Appl. Environ. Microbiol. 77, 3189–3196. https://doi.org/10.1128/AEM.03010-10.

Maalouf, H., Zakhour, M., Le Pendu, J., Le Saux, J.-C., Atmar, R.L., Le Guyader, F.S., 2010. Distribution in tissue and seasonal variation of norovirus genogroup I and II ligands in oysters. Appl. Environ. Microbiol. 76, 5621–5630. https://doi.org/10.1128/AEM.00148-10.

Mäde, D., Trübner, K., Neubert, E., Höhne, M., Johne, R., 2013. Detection and typing of norovirus from frozen strawberries involved in a large-scale gastroenteritis outbreak in Germany. Food Environ. Virol. 5, 162–168. https://doi.org/10.1007/s12560-013-9118-0.

Makary, P., Maunula, L., Niskanen, T., Kuusi, M., Virtanen, M., Pajunen, S., Ollgren, J., Minh, N.N.T., 2009. Multiple norovirus outbreaks among workplace canteen users in Finland, July 2006. Epidemiol. Infect. 137, 402–407. https://doi.org/10.1017/S0950268808000605.

Mans, J., 2019. Norovirus infections and disease in lower-middle- and low-income countries, 1997–2018. Viruses 11, 341. https://doi.org/10.3390/v11040341.

Manuel, C.S., Moore, M.D., Jaykus, L.-A., 2018. Predicting human norovirus infectivity - Recent advances and continued challenges. Food Microbiol. 76, 337–345. https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.06.015.

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. https://doi.org/10.1016/S0300-9084(01)01321-9.

Marionneau, S., Ruvoën, N., Moullac–Vaidye, B.L., Clement, M., Cailleau–Thomas, A., Ruiz–Palacois, G., Huang, P., Jiang, X., Pendu, J.L., 2002. Norwalk virus binds to histo-blood group antigens present on gastroduodenal epithelial cells of secretor individuals. Gastroenterology 122, 1967–1977. https://doi.org/10.1053/gast.2002.33661.

Matthews, J.E., Dickey, B.W., Miller, R.D., Felzer, J.R., Dawson, B.P., Lee, A.S., Rocks, J.J., Kiel, J., Montes, J.S., Moe, C.L., Eisenberg, J.N.S., Leon, J.S., 2012. The epidemiology of published norovirus outbreaks: a systematic review of risk factors associated with attack rate and genogroup. Epidemiol. Infect. 140, 1161–1172. https://doi.org/10.1017/S0950268812000234.

Maunula, L., Roivainen, M., Keränen, M., Mäkelä, S., Söderberg, K., Summa, M., Bonsdorff, C.H. von, 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, 19435. https://doi.org/10.2807/ese.14.49.19435-en.

Meghnath, K., Hasselback, P., McCormick, R., Prystajecky, N., Taylor, M., McIntyre, L., Man, S., Whitfield, Y., Warshawsky, B., McKinley, M., Bitzikos, O., Hexemer, A., Galanis, E., Buenaventura, E., Dale, K., David, S., Elmufti, M., Eloranta, K., Enns, C., Hluchy, T., Holmes, B., Honish, L., Kan, C., Kirby, K., Kirkby, P., Konrad, S., Kosmider, G., Martinez, A., Pang, X., Plamondon, J., Tsang, F., Turgeon, E., Outbreak Team, 2019. Outbreaks of norovirus and acute gastroenteritis associated with British Columbia oysters, 2016–2017. Food Environ. Virol. 11, 138–148. https://doi.org/10.1007/s12560-019-09374-4.

Mesquita, J.R., Costa, I., Oleastro, M., Conceição-Neto, N., Nascimento, M.S.J., 2014. First report of a norovirus outbreak associated with the variant Sydney 2012 in Portugal. J. Infect. Dev. Ctries. 8, 1350–1352. https://doi.org/10.3855/jidc.4880.

Mesquita, J.R., Nascimento, M.S., 2009. A foodborne outbreak of norovirus gastroenteritis associated with a Christmas dinner in Porto, Portugal, December 2008. Euro. Surveill. 14, 19355. https://doi.org/10.2807/ese.14.41.19355-en.

Minor, T.E., Allen, C.I., Tsiatis, A.A., Nelson, D.B., D'Alessio, D.J., 1981. Human infective dose determinations for oral poliovirus type 1 vaccine in infants. J. Clin. Microbiol. 13, 388–389.

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. https://doi.org/10.1128/JVI.01060-13.

Monedero, V., Buesa, J., Rodríguez-Díaz, J., 2018. The interactions between host glycobiology, bacterial microbiota, and viruses in the gut. Viruses 10, 96. https://doi.org/10.3390/v10020096.

Moore, M.D., Jaykus, L.-A., 2017. A plate-based histo-blood group antigen binding assay for evaluation of human norovirus receptor binding ability. Anal. Biochem. 533, 56–59. https://doi.org/10.1016/j.ab.2017.06.012.

Moore, M.D., Mertens, B.S., Jaykus, L.-A., 2017. Alternative in vitro methods for the determination of viral capsid structural integrity. J. Vis. Exp 129, e56444. https://doi.org/10.3791/56444.

Mori, K., Nagano, M., Kimoto, K., Somura, Y., Akiba, T., Hayashi, Y., Sadamasu, K., Kai, A., 2017. Detection of enteric viruses in fecal specimens from nonbacterial foodborne

gastroenteritis outbreaks in Tokyo, Japan between 1966 and 1983. Jpn. J. Infect. Dis. 70, 143–151. https://doi.org/10.7883/yoken.JJID.2015.456.

Morillo, S.G., Luchs, A., Cilli, A., do Carmo Sampaio Tavares Timenetsky, M., 2012. Rapid detection of norovirus in naturally contaminated food: foodborne gastroenteritis outbreak on a cruise ship in Brazil, 2010. Food Environ. Virol. 4, 124–129. https://doi.org/10.1007/s12560-012-9085-x.

Müller, L., Rasmussen, L.D., Jensen, T., Schultz, A.C., Kjelsø, C., Barnadas, C., Sigsgaard, K., Larsen, A.R., Widstrup Jensen, C., 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. https://doi.org/10.1371/currents.outbreaks.115761d5d6de6a8bc7dd4b41f0f5f142.

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. https://doi.org/10.1017/S0950268814003409.

Myrmel, M., Berg, E.M.M., Rimstad, E., Grinde, B., 2004. Detection of enteric viruses in shellfish from the Norwegian coast. Appl. Environ. Microbiol. 70, 2678–2684. https://doi.org/10.1128/AEM.70.5.2678-2684.2004.

Nenonen, N.P., Hannoun, C., Olsson, M.B., Bergström, T., 2009. Molecular analysis of an oyster-related norovirus outbreak. J. Clin. Virol. 45, 105–108. https://doi.org/10.1016/j.jcv.2009.04.011.

Nishida, T., Nishio, O., Kato, M., Chuma, T., Kato, H., Iwata, H., Kimura, H., 2007. Genotyping and quantitation of noroviruses in oysters from two distinct sea areas in Japan. Microbiol. Immunol. 51, 177–184. https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2007.tb03899.x.

Nordgren, J., Kindberg, E., Lindgren, P.-E., Matussek, A., Svensson, L., 2010. Norovirus gastroenteritis outbreak with a secretor-independent susceptibility pattern, Sweden. Emerg. Infect. Dis. 16, 81–87. https://doi.org/10.3201/eid1601.090633.

Nordgren, J., Svensson, L., 2019. Genetic susceptibility to human norovirus infection: an update. Viruses 11, 226. https://doi.org/10.3390/v11030226.

Nuanualsuwan, S., Cliver, D.O., 2002. Pretreatment to avoid positive RT-PCR results with inactivated viruses. J. Virol. Methods 104, 217–225. https://doi.org/10.1016/S0166-0934(02)00089-7.

Nuanualsuwan, S., Mariam, T., Himathongkham, S., Cliver, D.O., 2002. Ultraviolet inactivation of feline calicivirus, human enteric viruses and coliphages. Photochem. Photobiol. 76, 406–410. https://doi.org/10.1562/0031-8655(2002)0760406UIOFCH2.0.CO2.

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. https://doi.org/10.1128/AEM.00917-10.

Oristo, S., Lee, H.-J., Maunula, L., 2018. Performance of pre-RT-qPCR treatments to discriminate infectious human rotaviruses and noroviruses from heat-inactivated viruses: applications of PMA/PMAxx, benzonase and RNase. J. Appl. Microbiol. 124, 1008–1016. https://doi.org/10.1111/jam.13737.

Park, G.W., Linden, K.G., Sobsey, M.D., 2011. Inactivation of murine norovirus, feline calicivirus and echovirus 12 as surrogates for human norovirus (NoV) and coliphage (F+) MS2 by ultraviolet light (254 nm) and the effect of cell association on UV inactivation. Lett. Appl. Microbiol. 52, 162–167. https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2010.02982.x.

Park, J.H., Jeong, H.S., Lee, J.S., Lee, S.W., Choi, Y.H., Choi, S.J., Joo, I.S., Kim, Y.R., Park, Y.K., Youn, S.K., 2015a. First norovirus outbreaks associated with consumption of green seaweed (Enteromorpha spp.) in South Korea. Epidemiol. Infect. 143, 515–521. https://doi.org/10.1017/S0950268814001332.

Park, J.-H., Jung, S., Shin, J., Lee, J.S., Joo, I.S., Lee, D.-Y., 2015b. Three gastroenteritis outbreaks in South Korea caused by the consumption of kimchi tainted by norovirus GI.4. Foodborne Pathog. Dis. 12, 221–227. https://doi.org/10.1089/fpd.2014.1879.

Park, S.Y., Kim, A.-N., Lee, K.-H., Ha, S.-D., 2015. Ultraviolet-C efficacy against a norovirus surrogate and hepatitis A virus on a stainless steel surface. Int. J. Food Microbiol. 211, 73–78. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.07.006.

Pérez-Rodríguez, F., González-García, P., Valero, A., Hernández, M., Rodríguez-Lázaro, D., 2014. Impact of the prevalence of different pathogens on the performance of sampling plans in lettuce products. Int. J. Food Microbiol. 184, 69–73. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.04.019.

Prasad, B.V.V., Hardy, M.E., Dokland, T., Bella, J., Rossmann, M.G., Estes, M.K., 1999. X-ray Crystallographic structure of the Norwalk virus capsid. Science 286, 287–290. https://doi.org/10.1126/science.286.5438.287.

Prato, R., Lopalco, P.L., Chironna, M., Barbuti, G., Germinario, C., Quarto, M., 2004. Norovirus gastroenteritis general outbreak associated with raw shellfish consumption in South Italy. BMC Infect. Dis. 4, 37. https://doi.org/10.1186/1471-2334-4-37.

Pu, J., Kazama, S., Miura, T., Azraini, N.D., Konta, Y., Ito, H., Ueki, Y., Cahyaningrum, E.E., Omura, T., Watanabe, T., 2016. Pyrosequencing analysis of norovirus genogroup II distribution in sewage and oysters: first detection of GII.17 Kawasaki 2014 in oysters. Food Environ. Virol. 8, 310–312. https://doi.org/10.1007/s12560-016-9261-5.

Pu, J., Miura, T., Kazama, S., Konta, Y., Azraini, N.D., Ito, E., Ito, H., Omura, T., Watanabe, T., 2018. Weekly variations in norovirus genogroup II genotypes in Japanese oysters. Int. J. Food Microbiol. 284, 48–55. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.06.027.

Rabenau, H.F., Stürmer, M., Buxbaum, S., Walczok, A., Preiser, W., Doerr, H.W., 2003. Laboratory diagnosis of norovirus: which method is the best? Intervirology 46, 232–238. https://doi.org/10.1159/000072433.

Rajko-Nenow, P., Keaveney, S., Flannery, J., McIntyre, A., Doré, W., 2014. Norovirus genotypes implicated in two oyster-related illness outbreaks in Ireland. Epidemiol. Infect. 142, 2096–2104. https://doi.org/10.1017/S0950268813003014.

Rajko-Nenow, P., Waters, A., Keaveney, S., Flannery, J., Tuite, G., Coughlan, S., O'Flaherty, V., Doré, W., 2013. Norovirus genotypes present in oyster and effluent from a wastewater treatment plant during the seasonal peak of infections in Ireland, 2010. Appl Env. Microbiol. 79, 2578-2587. https://doi.org/10.1128/AEM.03557-12.

Rasmussen, L.D., Schultz, A.C., Uhrbrand, K., Jensen, T., Fischer, T.K., 2016. Molecular evidence of oysters as vehicle of norovirus GII.P17-GII.17. Emerg. Infect. Dis. 22, 2024–2025. https://doi.org/10.3201/eid2211.161171.

Robin, M., Chassaing, M., Loutreul, J., Rougemont, A. de, Belliot, G., Majou, D., Gantzer, C., Boudaud, N., 2019. Effect of natural ageing and heat treatments on GII.4 norovirus binding to histo-blood group antigens. Sci. Rep. 9, 1–11. https://doi.org/10.1038/s41598-019-51750-4.

Rockx, B.H.G., Vennema, H., Hoebe, C.J.P.A., Duizer, E., Koopmans, M.P.G., 2005. Association of histo–blood group antigens and susceptibility to norovirus infections. J. Infect. Dis. 191, 749–754. https://doi.org/10.1086/427779.

Rönnqvist, M., Mikkelä, A., Tuominen, P., Salo, S., Maunula, L., 2014. Ultraviolet light inactivation of murine norovirus and human norovirus GII: PCR may overestimate the persistence of noroviruses even when combined with pre-PCR treatments. Food Environ. Virol. 6, 48–57. https://doi.org/10.1007/s12560-013-9128-y.

Rougemont, A. de, Ruvoen-Clouet, N., Simon, B., Estienney, M., Elie-Caille, C., Aho, S., Pothier, P., Pendu, J.L., Boireau, W., Belliot, G., 2011. Qualitative and quantitative analysis of the binding of GII.4 norovirus variants onto human blood group antigens. J. Virol. 85, 4057–4070. https://doi.org/10.1128/JVI.02077-10.

Rubio-del-Campo, A., Coll-Marqués, J.M., Yebra, M.J., Buesa, J., Pérez-Martínez, G., Monedero, V., Rodríguez-Díaz, J., 2014. Noroviral P-particles as an in vitro model to assess the interactions of noroviruses with probiotics. PLos One. 9, e89586. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0089586.

Ruvoën-Clouet, N., Belliot, G., Pendu, J.L., 2013. Noroviruses and histo-blood groups: the impact of common host genetic polymorphisms on virus transmission and evolution. Rev. Med. Virol. 23, 355–366. https://doi.org/10.1002/rmv.1757.

Sakon, N., Sadamasu, K., Shinkai, T., Hamajima, Y., Yoshitomi, H., Matsushima, Y., Takada, R., Terasoma, F., Nakamura, A., Komano, J., Nagasawa, K., Shimizu, H., Katayama, K., Kimura, H., 2018. Foodborne outbreaks caused by human norovirus GII.P17-GII.17–contaminated nori, Japan, 2017. Emerg. Infect. Dis. 24, 920–923. https://doi.org/10.3201/eid2405.171733.

Sano, D., Pintó, R.M., Omura, T., Bosch, A., 2010. Detection of oxidative damages on viral capsid protein for evaluating structural integrity and infectivity of human norovirus. Environ. Sci. Technol. 44, 808–812. https://doi.org/10.1021/es9018964.

Sarvikivi, E., Roivainen, M., Maunula, L., Niskanen, T., Korhonen, T., Lappalainen, M., Kuusi, M., 2012. Multiple norovirus outbreaks linked to imported frozen raspberries. Epidemiol. Infect. 140, 260–267. https://doi.org/10.1017/S0950268811000379.

Sato, J., Miki, M., Kubota, H., Hitomi, J., Tokuda, H., Todaka-Takai, R., Katayama, K., 2016. Effects of disinfectants against norovirus virus-like particles predict norovirus inactivation: Effects of disinfectants on NoV VLPs. Microbiol. Immunol. 60, 609–616. https://doi.org/10.1111/1348-0421.12435.

Schaeffer, J., Le Saux, J.-C., Lora, M., Atmar, R.L., Le Guyader, F.S., 2013. Norovirus contamination on French marketed oysters. Int. J. Food Microbiol. 166, 244–248. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.07.022.

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. https://doi.org/10.1128/AEM.05806-11.

Shanker, S., Choi, J.-M., Sankaran, B., Atmar, R.L., Estes, M.K., Prasad, B.V.V., 2011. Structural analysis of histo-blood group antigen binding specificity in a norovirus GII.4 epidemic variant: implications for epochal evolution. J. Virol. 85, 8635–8645. https://doi.org/10.1128/JVI.00848-11.

Shanker, S., Czako, R., Sankaran, B., Atmar, R.L., Estes, M.K., Prasad, B.V.V., 2014. Structural analysis of determinants of histo-blood group antigen binding specificity in genogroup I noroviruses. J. Virol. 88, 6168–6180. https://doi.org/10.1128/JVI.00201-14.

Sharma, S., Hagbom, M., Carlsson, B., Nederby Öhd, J., Insulander, M., Eriksson, R., Simonsson, M., Widerström, M., Nordgren, J., 2019. Secretor status is associated with susceptibility to disease in a large GII.6 norovirus foodborne outbreak. Food Environ. Virol. https://doi.org/10.1007/s12560-019-09410-3.

Shetlar, M.D., 1980. Cross-linking of proteins to nucleic acids by ultraviolet light, in: Smith, K.C. (Eds.), Photochemical and Photobiological Reviews. Springer US, Boston, MA, Volume 5, pp. 105–197.

Shieh, Y.-S.C., Monroe, S.S., Fankhauser, R.L., Langlois, G.W., Burkhardt, W., Baric, R.S., 2000. Detection of Norwalk-like virus in shellfish implicated in illness. J. Infect. Dis. 181, S360–S366. https://doi.org/10.1086/315578.

Shin, G.-A., Sobsey, M.D., 2008. Inactivation of norovirus by chlorine disinfection of water. Water Res. 42, 4562–4568. https://doi.org/10.1016/j.watres.2008.08.001.

Shirato, H., 2011. Norovirus and histo-blood group antigens. Jpn. J. Infect. Dis. 64, 95–103.

Shirato, H., Ogawa, S., Ito, H., Sato, T., Kameyama, A., Narimatsu, H., Xiaofan, Z., Miyamura, T., Wakita, T., Ishii, K., Takeda, N., 2008. Noroviruses distinguish between type 1 and type 2 histo-blood group antigens for binding. J. Virol. 82, 10756–10767. https://doi.org/10.1128/JVI.00802-08.

Showell, D., Sundkvist, T., Reacher, M., Gray, J., 2007. Norovirus outbreak associated with canteen salad in Suffolk, United Kingdom. Wkly. Releases (1997–2007). 12, 3323. https://doi.org/10.2807/esw.12.48.03323-en.

Silva, A.K. da, Saux, J.-C.L., Parnaudeau, S., Pommepuy, M., Elimelech, M., Guyader, F.S.L., 2007. Evaluation of removal of norovirus in wastewater treatment using real-time RT-PCR: different behavior of genogroup I and genogroup II. Appl. Environ. Microbiol. 73, 7891-7897. https://doi.org/10.1128/AEM.01428-07.

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. https://doi.org/10.1128/AEM.01106-06.

Simonet, J., Gantzer, C., 2006b. Degradation of the poliovirus 1 genome by chlorine dioxide. J. Appl. Microbiol. 100, 862–870. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02850.x.

Smith, A.J., McCarthy, N., Saldana, L., Ihekweazu, C., McPhedran, K., Adak, G.K., Iturruza-Gómara, M., Bickler, G., O'Moore, É., 2012. A large foodborne outbreak of norovirus in diners at a restaurant in England between January and February 2009. Epidemiol. Infect. 140, 1695–1701. https://doi.org/10.1017/S0950268811002305.

Stals, A., Baert, L., Jasson, V., Van Coillie, E., Uyttendaele, M., 2011. Screening of fruit products for norovirus and the difficulty of interpreting positive PCR results. J. Food Prot. 74, 425–431. https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-10-209.

Symes, S.J., Gunesekere, I.C., Marshall, J.A., Wright, P.J., 2007. Norovirus mixed infection in an oyster-associated outbreak: an opportunity for recombination. Arch. Virol. 152, 1075–1086. https://doi.org/10.1007/s00705-007-0938-9.

Tan, M., Jiang, X., 2014. Histo-blood group antigens: a common niche for norovirus and rotavirus. Expert Rev. Mol. Med. 16, e5. https://doi.org/10.1017/erm.2014.2.

Tan, M., Jiang, X., 2010. Norovirus gastroenteritis, carbohydrate receptors, and animal models. Plos Pathog. 6, e1000983. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000983.

Tan, M., Jiang, X., 2005. Norovirus and its histo-blood group antigen receptors: an answer to a historical puzzle. Trends Microbiol. 13, 285–293. https://doi.org/10.1016/j.tim.2005.04.004.

Tan, M., Xia, M., Chen, Y., Bu, W., Hegde, R.S., Meller, J., Li, X., Jiang, X., 2009. Conservation of carbohydrate binding interfaces - evidence of human HBGA selection in norovirus evolution. Plos One 4, e5058. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005058.

Teunis, P.F.M., Moe, C.L., Liu, P., Miller, S.E., Lindesmith, L., Baric, R.S., Pendu, J.L., Calderon, R.L., 2008. Norwalk virus: how infectious is it? J. Med. Virol. 80, 1468–1476. https://doi.org/10.1002/jmv.21237.

Thurston-Enriquez, J.A., Haas, C.N., Jacangelo, J., Riley, K., Gerba, C.P., 2003. Inactivation of feline calicivirus and adenovirus type 40 by UV radiation. Appl. Environ. Microbiol. 69, 577–582. https://doi.org/10.1128/AEM.69.1.577-582.2003.

Tian, P., Engelbrektson, A.L., Jiang, X., Zhong, W., Mandrell, R.E., 2007a. Norovirus recognizes histo-blood group antigens on gastrointestinal cells of clams, mussels, and

oysters: a possible mechanism of bioaccumulation. J. Food Prot. 70, 2140–2147. https://doi.org/10.4315/0362-028X-70.9.2140.

Tian, P., Jiang, X., Zhong, W., Jensen, H.M., Brandl, M., Bates, A.H., Engelbrektson, A.L., Mandrell, R., 2007b. Binding of recombinant norovirus like particle to histo-blood group antigen on cells in the lumen of pig duodenum. Res. Vet. Sci. 83, 410–418. https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2007.01.017.

Tian, P., Yang, D., Quigley, C., Chou, M., Jiang, X., 2013. Inactivation of the tulane virus, a novel surrogate for the human norovirus. J. Food Prot. 76, 712–718. https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-12-361.

Todd, K.V., Tripp, R.A., 2020. Vero cells as a mammalian cell substrate for human norovirus. Viruses 12, 439. https://doi.org/10.3390/v12040439.

Tree, J.A., Adams, M.R., Lees, D.N., 2005. Disinfection of feline calicivirus (a surrogate for Norovirus) in wastewaters. J. Appl. Microbiol. 98, 155–162. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02442.x.

Tung, G., Macinga, D., Arbogast, J., Jaykus, L.-A., 2013. Efficacy of commonly used disinfectants for inactivation of human noroviruses and their surrogates. J. Food Prot. 76, 1210–1217. https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-12-532.

Tunyakittaveeward, T., Rupprom, K., Pombubpa, K., Howteerakul, N., Kittigul, L., 2019. Norovirus monitoring in oysters using two different extraction methods. Food Environ. Virol. 11, 374–382. https://doi.org/10.1007/s12560-019-09396-y.

US EPA, 2006. National Primary Drinking Water Regulations: Ground Water Rule. Fed. Regist. 71, 6573-65650.

Van Dycke, J., Ny, A., Conceição-Neto, N., Maes, J., Hosmillo, M., Cuvry, A., Goodfellow, I., Nogueira, T.C., Verbeken, E., Matthijnssens, J., de Witte, P., Neyts, J., Rocha-Pereira, J., 2019. A robust human norovirus replication model in zebrafish larvae. PLos Pathog. 15, e1008009. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008009.

Vega, E., Barclay, L., Gregoricus, N., Shirley, S.H., Lee, D., Vinjé, J., 2013. Genotypic and Epidemiologic trends of norovirus outbreaks in the United States, 2009-2013. J. Clin. Microbiol. 52, 147–55. https://doi.org/10.1128/JCM.02680-13.

Vega, E., Garland, J., Pillai, S.D., 2008. Electrostatic forces control nonspecific virus attachment to lettuce. J. Food Prot. 71, 522–529. https://doi.org/10.4315/0362-028X-71.3.522.

Verhoef, L., Hewitt, J., Barclay, L., Ahmed, S.M., Lake, R., Hall, A.J., Lopman, B., Kroneman, A., Vennema, H., Vinjé, J., Koopmans, M., 2015. Norovirus genotype

profiles associated with foodborne transmission, 1999–2012. Emerg. Infect. Dis. 21, 592–599. https://doi.org/10.3201/eid2104.141073.

Verhoef, L., Vennema, H., van Pelt, W., Lees, D., Boshuizen, H., Henshilwood, K., Koopmans, M., Use of norovirus genotype profiles to differentiate origins of foodborne outbreaks. Emerg. Infect. Dis. 16, 617–624. https://doi.org/10.3201/eid1604.090723.

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. https://doi.org/10.1086/517325.

Wadl, M., Scherer, K., Nielsen, S., Diedrich, S., Ellerbroek, L., Frank, C., Gatzer, 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. https://doi.org/10.1186/1471-2334-10-30.

Walker, D.I., Cross, L.J., Stapleton, T.A., Jenkins, C.L., Lees, D.N., Lowther, J.A., 2019. Assessment of the applicability of capsid-integrity assays for detecting infectious norovirus inactivated by heat or UV irradiation. 11, 229-237. Food Environ. Virol. https://doi.org/10.1007/s12560-019-09390-4.

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. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.11.027.

Wang, Y.-H., Zhou, D.-J., Zhou, X., Yang, T., Ghosh, S., Pang, B.-B., Peng, J.-S., Liu, M.-Q., Hu, Q., Kobayashi, N., 2012. Molecular epidemiology of noroviruses in children and adults with acute gastroenteritis in Wuhan, China, 2007-2010. Arch. Virol. 157, 2417–2424. https://doi.org/10.1007/s00705-012-1437-1.

Ward, R.L., Bernstein, D.I., Young, E.C., Sherwood, J.R., Knowlton, D.R., Schiff, G.M., 1986. Human rotavirus studies in volunteers: determination of infectious dose and serological response to infection. J. Infect. Dis. 154, 871–880. https://doi.org/10.1093/infdis/154.5.871.

Watier-Grillot, S., Boni, M., Tong, C., Renoult, P.-A., Fournier, A., Joie, L., Mérens, A., Chesnay, A., Perelle, S., Fraisse, A., Ambert-Balay, K., Chal, D., Larréché, S., Michel, R., de Santi, V.P., 2017. Challenging investigation of a norovirus foodborne disease outbreak during a military deployment in Central African Republic. Food Environ. Virol. 9, 498–501. https://doi.org/10.1007/s12560-017-9312-6.

Webby, R.J., Carville, K.S., Kirk, M.D., Greening, G., Ratcliff, R.M., Crerar, S.K., Dempsey, K., Sarna, M., Stafford, R., Patel, M., Hall, G., 2007. Internationally distributed frozen oyster meat causing multiple outbreaks of norovirus infection in australia. Clin. Infect. Dis. 44, 1026–1031. https://doi.org/10.1086/512807.

White, P.A., 2014. Evolution of norovirus. Clin. Microbiol. Infect. 20, 741–745. https://doi.org/10.1111/1469-0691.12746.

WHO, 2011. Guidelines for drinking-water quality.

Wigginton, K., Menin, L., Montoya, J.P., Kohn, T., 2010. Oxidation of virus proteins during UV 254 and singlet oxygen mediated inactivation. Environ. Sci. Technol. 44, 5437–5443. https://doi.org/10.1021/es100435a.

Wigginton, K.R., Menin, L., Sigstam, T., Gannon, G., Cascella, M., Hamidane, H.B., Tsybin, Y.O., Waridel, P., Kohn, T., 2012a. UV Radiation induces genome-mediated, site-specific cleavage in viral proteins. ChemBioChem 13, 837–845. https://doi.org/10.1002/cbic.201100601.

Wigginton, K.R., Pecson, B.M., Sigstam, T., Bosshard, F., Kohn, T., 2012b. Virus inactivation mechanisms: impact of disinfectants on virus function and structural integrity. Environ. Sci. Technol. 46, 12069–12078. https://doi.org/10.1021/es3029473.

Woods, J.W., Calci, K.R., Marchant-Tambone, J.G., Burkhardt, W., 2016. Detection and molecular characterization of norovirus from oysters implicated in outbreaks in the US. Food Microbiol. 59, 76–84. https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.05.009.

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. https://doi.org/10.1093/cid/cir478.

Yezli, S., Otter, J.A., 2011. Minimum infective dose of the major human respiratory and enteric viruses transmitted through food and the environment. Food Environ. Virol. 3, 1–30. https://doi.org/10.1007/s12560-011-9056-7.

Yu, J.-H., Kim, N.-Y., Koh, Y.-J., Lee, H.-J., 2010. Epidemiology of foodborne norovirus outbreak in Incheon, Korea. J. Korean Med. Sci. 25, 1128–1133. https://doi.org/10.3346/jkms.2010.25.8.1128.

Yu, Y., Cai, H., Hu, L., Lei, R., Pan, Y., Yan, S., Wang, Y., 2015. Molecular epidemiology of oyster-related human noroviruses and their global genetic diversity and temporal-geographical distribution from 1983 to 2014. Appl. Environ. Microbiol. 81, 7615–7624. https://doi.org/10.1128/AEM.01729-15.

Zhang, Z., Liu, D., Wu, Q., Lu, Y., Tian, P., Wang, Z., Wang, D., 2019. Characterization of a histo-blood group antigen-like substance in romaine lettuce that contributes to human norovirus attachment. J. Agric. Food Chem.68, 1207-1212. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b05887.

Zheng, D.-P., Ando, T., Fankhauser, R.L., Beard, R.S., Glass, R.I., Monroe, S.S., 2006. Norovirus classification and proposed strain nomenclature. Virology 346, 312–323. https://doi.org/10.1016/j.virol.2005.11.015.

FIGURES

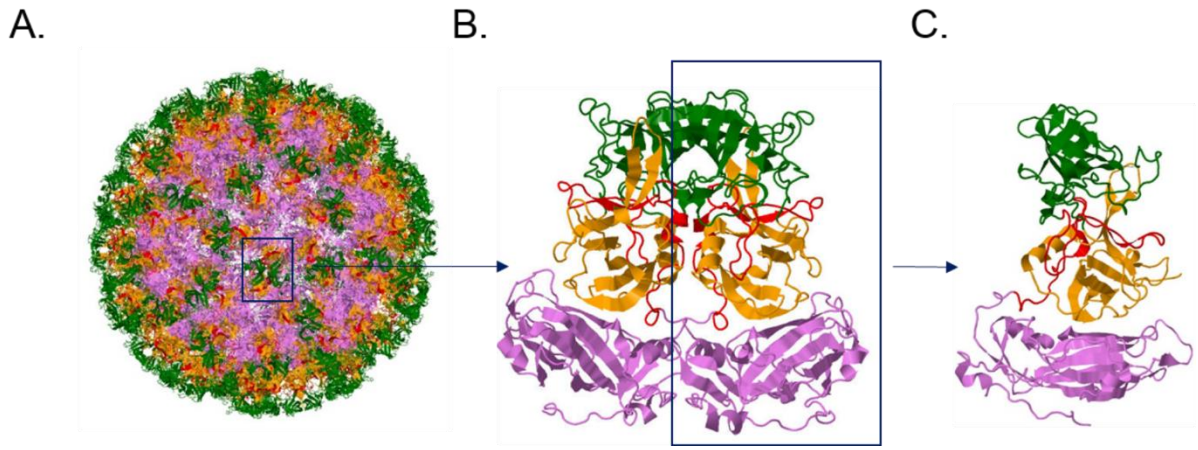


Figure 1: Capsid structure of GI.1 Norwalk virus (PDB 1IHM). Capsid composed of 180 copies of VP1 assembled into 90 dimers (A). Dimer (B) and monomer (C) of VP1. In purple: shell domain; in orange and red: P1 subdomain; in green: P2 subdomain (Prasad et al. (1999); http://www.jmol.org).

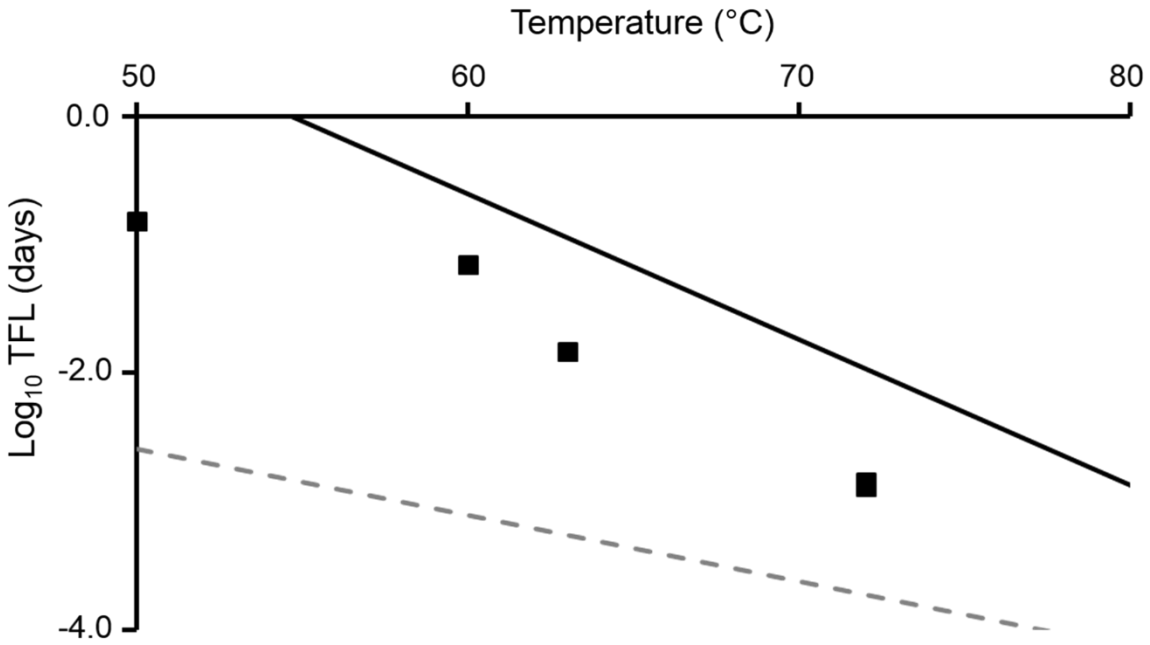


Figure 2: Time to reduce the first log_{10} (TFL) of infectious HuNoV surrogates and HuNoV genomes as a function of temperature. The dotted line represents the regression model of infectious HuNoV surrogates defined by Bertrand et al. (2012). The solid line represent the regression model of HuNoV genomes using eight TFL values determined from raw data obtained by Bertrand et al. (2012) and Escudero-Abarca et al. (2014). Squares represent the TFL values of HuNoV genomes quantified after HBGA-binding assays, determined from the raw data obtained by Wang and Tian (2014) and Robin et al. (2019).

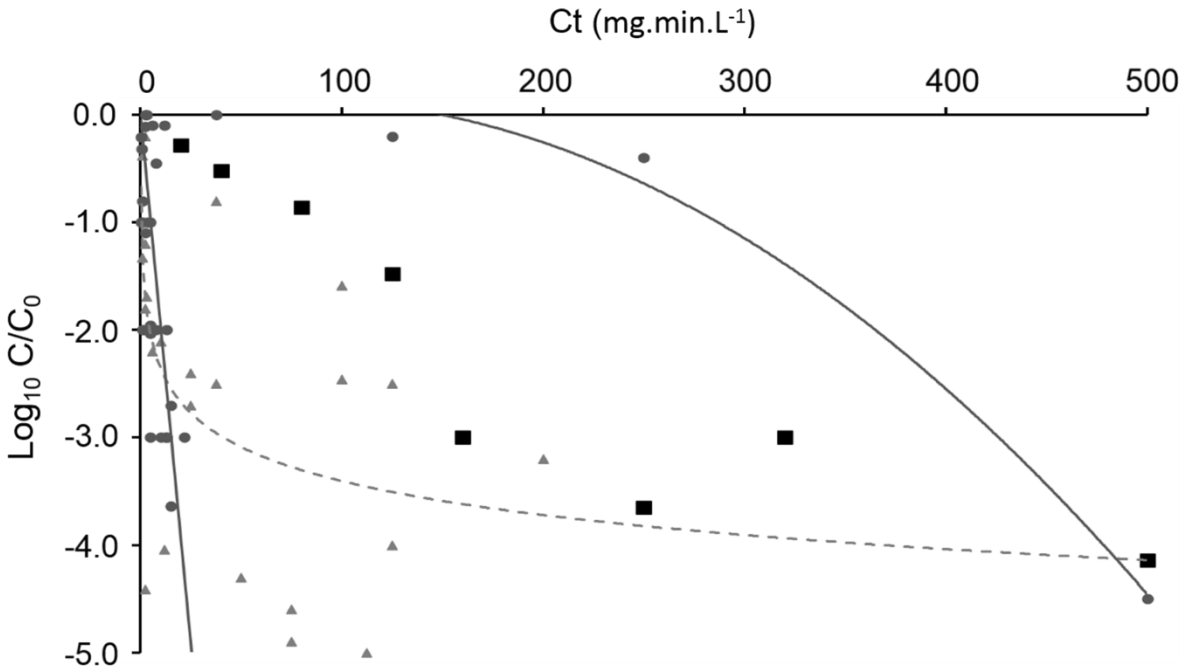


Figure 3: Decay of infectious HuNoV surrogates and HuNoV genomes as a function of chlorine disinfection. Grey triangles, grey circles and black squares correspond to infectious HuNoV surrogates, HuNoV genomes, and HuNoV genomes after HBGA-binding, respectively (for more information about data collection, see Table 1). C_0: initial concentration; C: concentration obtained after chlorine treatment. The lines representing HuNoV genomes (solid line) and infectious HuNoV surrogates (dotted line) indicate decay rates using the data collected.

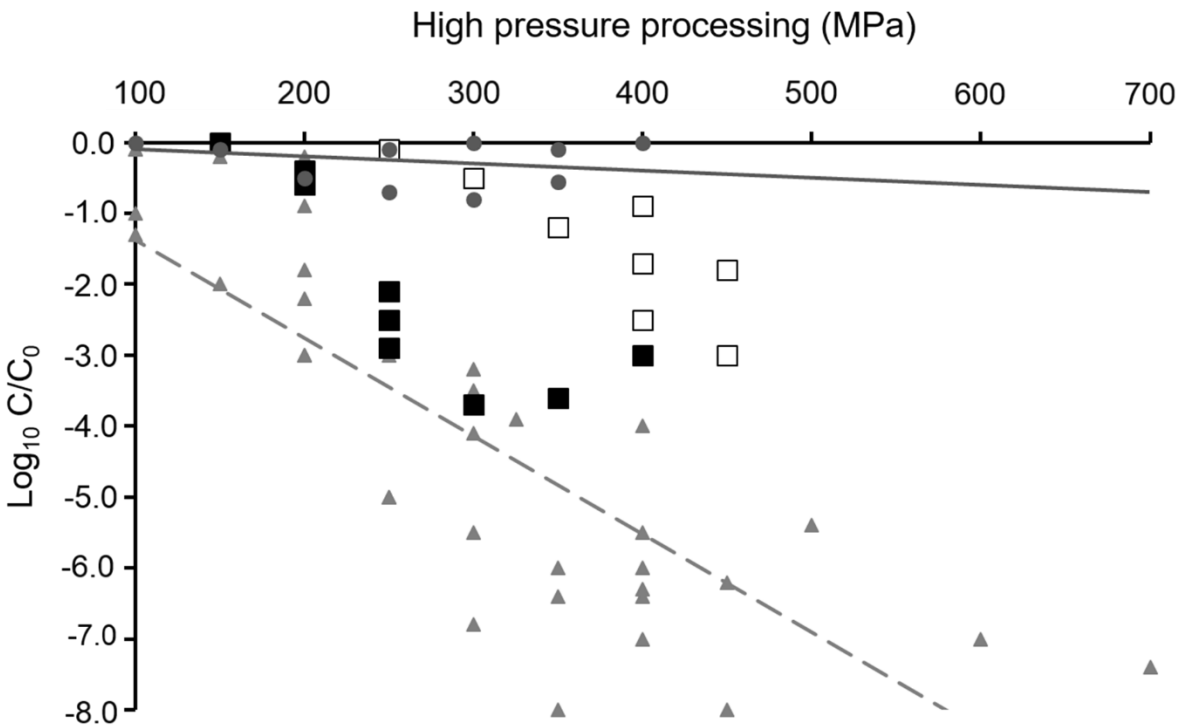


Figure 4: Decay of infectious HuNoV surrogates and HuNoV genomes as a function of high pressure processing between 0°C and 4°C. Grey triangles, grey circles, black squares and white squares correspond to infectious HuNoV surrogates, HuNoV genomes, GII.4 HuNoV genomes after HBGA-binding, and GI.1 HuNoV genomes after HBGA-binding, respectively (for more information, see Table 1). C_0: initial concentration; C: concentration obtained after high pressure processing. Lines representing HuNoV genomes (solid line) and infectious HuNoV surrogates (dotted line) indicate decay rates using the data collected.

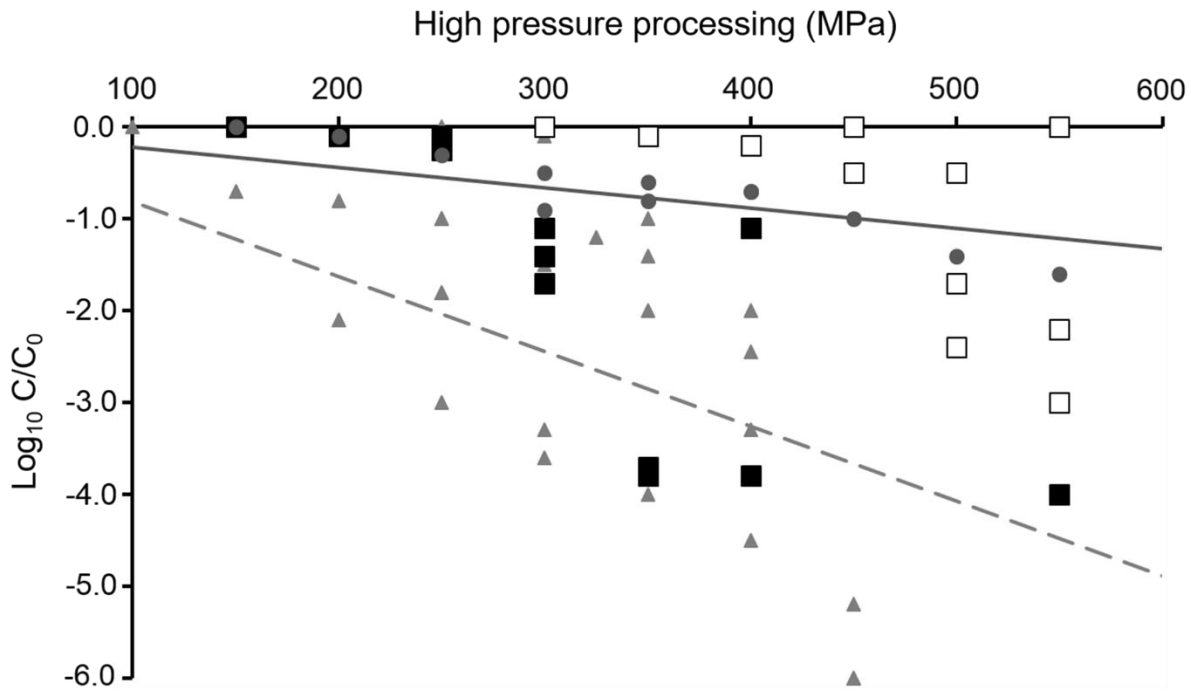


Figure 5: Decay of infectious HuNoV surrogates and HuNoV genomes as a function of high pressure processing between 20°C and 25°C. Grey triangles, grey circles, black squares and white squares correspond to infectious HuNoV surrogates, HuNoV genomes, GII.4 HuNoV genomes after HBGA-binding, and GI.1 HuNoV genomes after HBGA-binding, respectively (for more information, see Table 1). C_0: initial concentration; C: concentration obtained after high pressure processing. Lines representing HuNoV genomes (solid line) and infectious HuNoV surrogates (dotted line) indicate decay rates using the data collected.

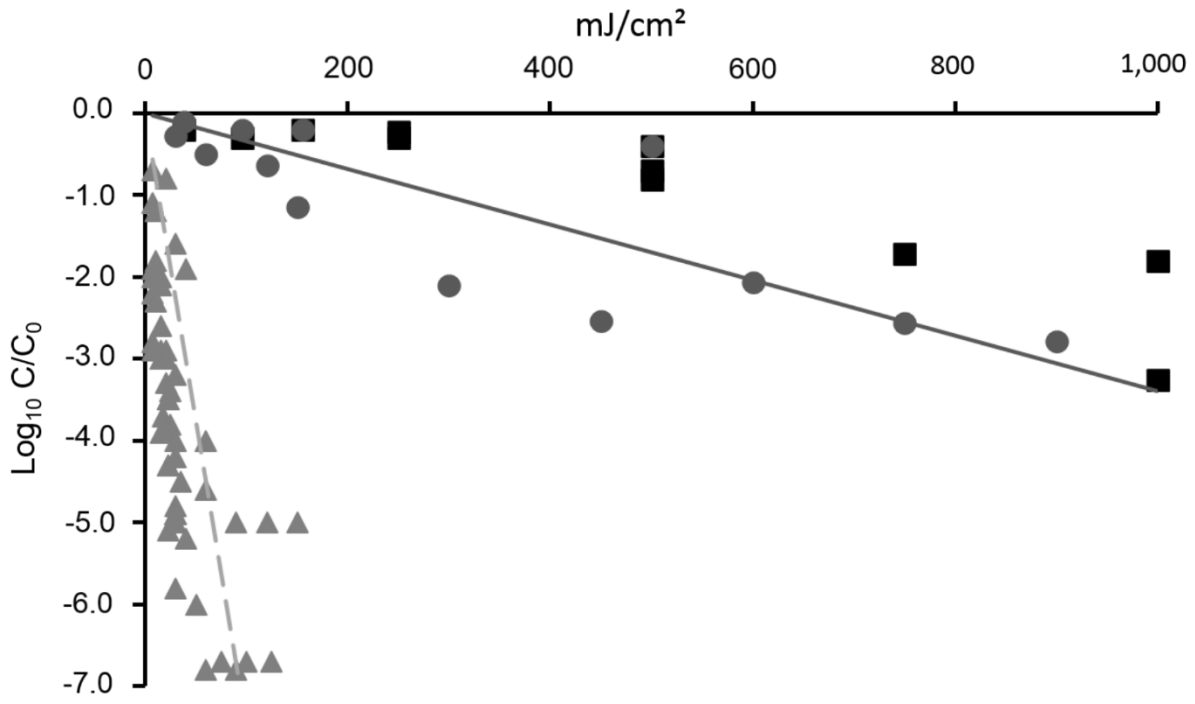


Figure 6: Decay of infectious HuNoV surrogates and HuNoV genomes as a function of UV light. Grey triangles, grey circles, and black squares correspond to infectious HuNoV surrogates, HuNoV genomes, and HuNoV genomes after HBGA-binding, respectively (for more information, see Table 1). C_0: initial concentration; C: concentration obtained after UV. Lines representing HuNoV genomes (solid line) and infectious HuNoV surrogates (dotted line) indicate decay rates using the data collected.

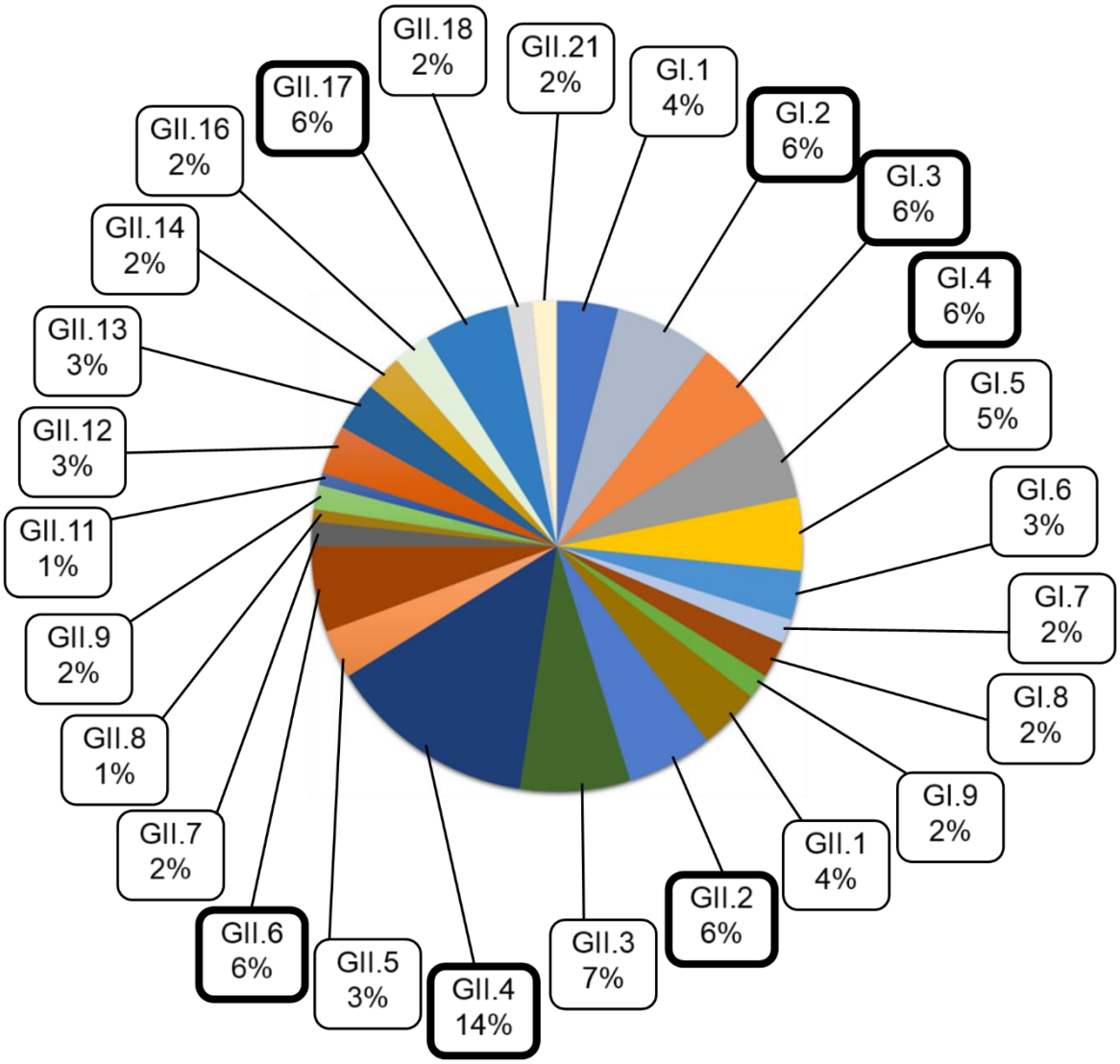


Figure 7: HuNoV genotypes detected in shellfish, based on 18 reports published between 2003 and 2016. The frequency of occurrence of each given genotype is expressed as a percentage. HuNoV genotypes with detection frequencies greater than or equal to 6% are shown in text boxes with bold borders. Adapted from Boxman et al., 2006; Cheng et al., 2005; Costantini et al., 2006; Croci et al., 2007; Hansman et al., 2008; Imamura et al., 2017, 2016; Kittigul et al., 2016, 2011; La Rosa et al., 2017; Lowmoung et al., 2017; Ma et al., 2013; Myrmel et al., 2004; Nishida et al., 2007; Pu et al., 2018, 2016; Rajko-Nenow et al., 2013; Tunyakittaveeward et al., 2019.

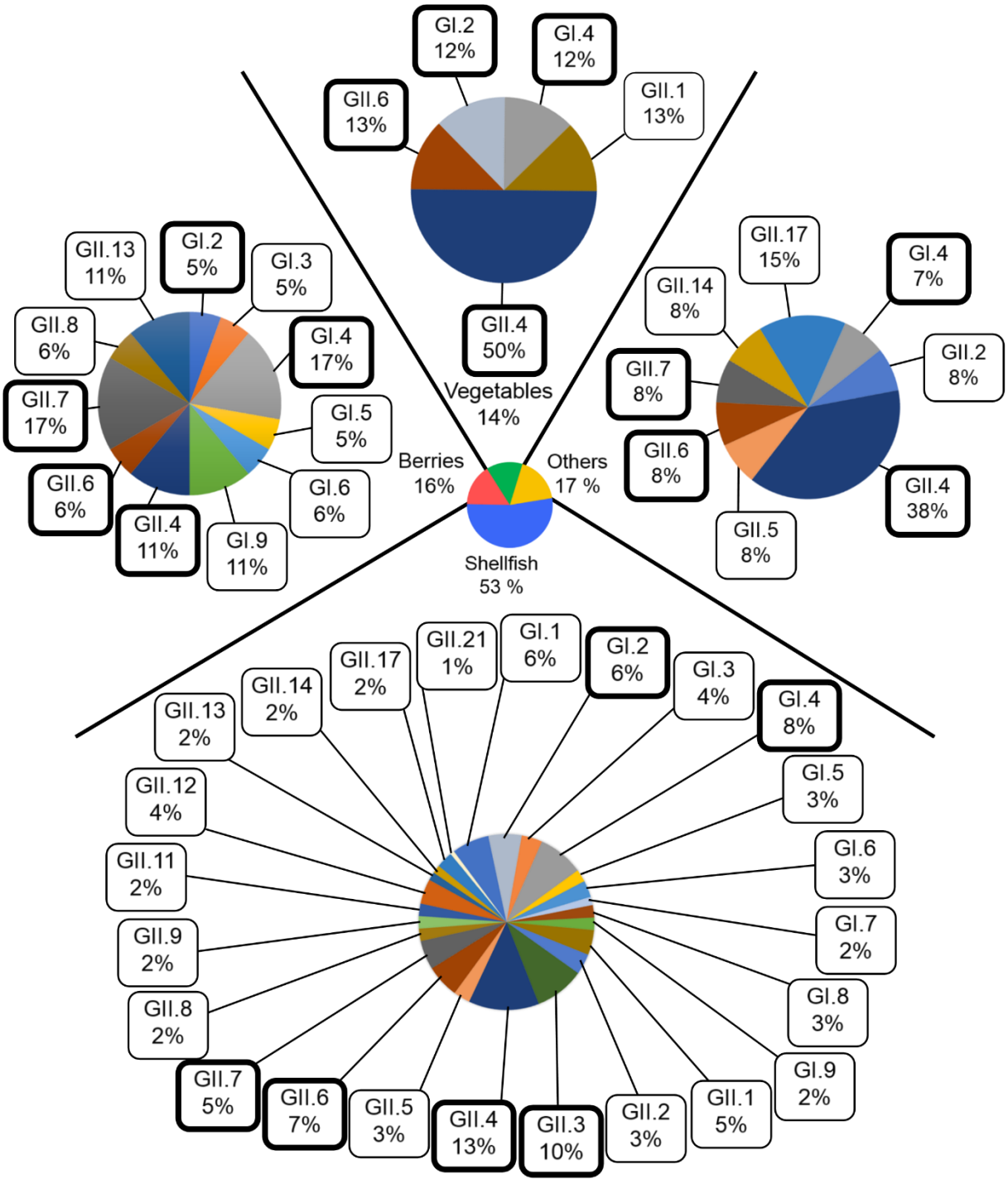


Figure 8: HuNoV genotypes detected in shellfish, berries, vegetables, and other food items responsible for foodborne outbreaks worldwide, according to 51 published reports. Each percentage corresponds to the frequency of occurrence of a given genotype, according to the reports. The six most prevalent HuNoV genotypes in foodstuffs (i.e. GII.4, GI.4, GII.7, GII.6, GI.2, and GII.3) are shown in text boxes with bold borders. GI: genogroup 1; GII: genogroup 2. For more information, see Table 2.

TABLES

Table 1: Data collection related to inactivation of infectious HuNoV surrogates and reduction of HuNoV genomes following the use of processing technologies. MNV: Murine Norovirus; CaCV: Canine Calicivirus; HAV: Hepatitis A Virus; TV: Tulane Virus; FCV: Feline Calicivirus; PV: Poliovirus; HuNoVs: genomes directly detected by RT-qPCR; HuNoVs + HBGAs: HuNoV genomes detected after HBGA-binding. HPP: high pressure processing. UV: ultraviolet light. The ranges used in the respective processing technologies were as follows: heating from 50 to 80°C; chlorine disinfection of between 0.25 and 500 mg.min.L^{-1}; HPP of 100 to 700 MPa, and 100 to 550 MPa, in the 0–4°C and 20–25°C temperature ranges, respectively; and UV light of 4 to 1,000 mJ/cm².

Processing technologies	Viruses		Values	References
Heat (Fig. 2)	Infectious surrogates	MNV	Regression models	Bertrand et al., 2012
		CaCV		
		HAV		
		TV		
		FCV		
	HuNoV genomes		Regression model (8 values)	Bertrand et al., 2012 Escudero-Abarca et al., 2014
	HBGA-binding assays + HuNoV genomes		5	Robin et al., 2019 Wang and Tian, 2014
Chlorine (Fig. 3)	Infectious surrogates	MNV	20	Hirneisen and Kniel, 2013 Corrêa et al., 2012 Feliciano et al., 2012 Kitajima et al., 2010 Tung et al., 2013
		FCV	3	Tung et al., 2013
		TV	3	Hirneisen and Kniel, 2013
	HuNoV genomes		32	Tung et al., 2013 Dunkin et al., 2017 Kitajima et al., 2010 Sano et al., 2010 Shin and Sobsey, 2008
	HBGA-binding assays + HuNoV genomes		8	Kingsley et al., 2014 Wang and Tian, 2014
HPP, 0–4°C (Fig. 4)	Infectious surrogates	MNV	20	Cromeans et al., 2014 Kingsley et al., 2007 Li and Chen, 2015 Lou et al., 2011
		FCV	4	Cromeans et al., 2014
		TV	12	Cromeans et al., 2014 DiCaprio et al., 2019 Li et al., 2017
	HuNoV genomes		10	Li et al., 2017

				Li and Chen, 2015
	HBGA-binding assays + HuNoV genomes		18	DiCaprio et al., 2019 Li et al., 2017, 2013
HPP, 20–25°C (Fig. 5)	Infectious surrogates	MNV	17	Kingsley et al., 2007 Li et al., 2013 Li and Chen, 2015 Lou et al., 2011
		FCV	3	Chen et al., 2005
		TV	8	DiCaprio et al., 2019 Li et al., 2017
	HuNoV genomes		12	Li et al., 2017 Li and Chen, 2015
	HBGA-binding assays + HuNoV genomes		23	DiCaprio et al., 2019 Li et al., 2017, 2013
UV light (Fig. 6)	Infectious surrogates	MNV	13	Park et al., 2011 Rönnqvist et al., 2014
		HAV	7	Nuanualsuwan et al., 2002
		TV	28	Araud et al., 2020 Tian et al., 2013
		PV	20	Nuanualsuwan et al., 2002 Simonet and Gantzer, 2006a Tree et al., 2005
		FCV	16	Nuanualsuwan et al., 2002 Park et al., 2011 Tree et al., 2005
	HuNoV genomes		15	Rönnqvist et al., 2014 Walker et al., 2019
	HBGA-binding assays + HuNoV genomes		13	Dancho et al., 2012 Wang and Tian, 2014 Walker et al., 2019

Table 2: HuNoV genotypes associated with 51 reported foodborne outbreaks. F: Number of times a given genotype was detected. Ref (x): References (number of publications reporting the genotype).

		Genogroup I									Genogroup II														
Genotype		1	2	3	4	5	6	7	8	9	1	2	3	4	5	6	7	8	9	11	12	13	14	17	21
Shellfish	F	7	7	5	10	3	4	2	3	3	6	4	12	15	4	8	6	2	3	3	5	2	2	3	1
	Ref (26)	Boxman et al., 2006; Cheng et al., 2005; Cho et al., 2016; Costantini et al., 2006; David et al., 2007; de Laval et al., 2011; Doyle et al., 2004; Fitzgerald et al., 2014; Gallimore et al., 2005; Huang et al., 2013; Iritani et al., 2014; Le Guyader et al., 2010, 2003; Lodo et al., 2014; Loury et al., 2015; Meghnath et al., 2019; Mori et al., 2017; Nenonen et al., 2009; Prato et al., 2004; Rajko-Nenow et al., 2014; Rasmussen et al., 2016; Shieh et al., 2000; Smith et al., 2012; Symes et al., 2007; Webby et al., 2007; Woods et al., 2016																							
Berries	F	-	1	1	3	1	1	-	-	2	-	-	-	2	-	1	3	1	-	-	-	2	-	-	-
	Ref (8)	Cotterelle et al., 2005; Einöder-Moreno et al., 2016; Falkenhorst et al., 2005; Höhne et al., 2015; Mäde et al., 2013; Maunula et al., 2009; Müller et al., 2015; Sarvikivi et al., 2012																							
Vegetables	F	-	1	-	1	-	-	-	-	-	1	-	-	4	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Ref (7)	Makary et al., 2009; Mesquita and Nascimento, 2009; Müller et al., 2016; Park et al., 2015a; Sharma et al., 2019; Showell et al., 2007; Wadl et al., 2010.																							
Other	F	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	1	-	5	1	1	1	-	-	-	-	-	1	2	-
	Ref (10)	Boxman et al., 2007; Glasscock, 2007; Kobayashi et al., 2004; Mesquita et al., 2014; Morillo et al., 2012; Park et al., 2015b; Sakon et al., 2018; Watier-Grillot et al., 2017; Yu et al., 2010;																							

Table 3: Estimated frequencies of HuNoV genotypes associated with foodborne outbreaks. Data from 5 reported outbreaks were used to calculate frequencies, which are expressed as a percentage.

Genotypes	Frequency (%)	References
GI.1	0.1	Chan et al., 2015 Ferreira et al., 2010 Kumthip et al., 2018 Vega et al., 2013 Wang et al., 2012
GI.2	0.3 - 1.8	
GI.3	0.3 - 2.7	
GI.4	0.3 - 1.1	
GI.5	0.1 - 0.6	
GI.6	0.4 - 5.5	
GI.7	0.1 - 0.7	
GI.8	0.1 - 0.3	
GI.9	< 0.1	
GII.1	2.0 - 5.4	
GII.2	0.9 - 1.7	
GII.3	0.6 - 15	
GII.4	63.4 - 87.9	
GII.5	0.3 - 0.6	
GII.6	2.3 - 8.3	
GII.7	0.9 - 1.3	
GII.8	0.1 - 1.6	
GII.9	< 0.1	
GII.10	0.1- 0.3	
GII.11	< 0.1	
GII.12	0.3 - 2.5	
GII.13	0.6 - 2.1	
GII.14	0.1 - 0.3	
GII.15	0.1 - 0.9	
GII.16	1.5 - 0.1	
GII.17	0.1 - 3.3	
GII.18	< 0.1	
GII.19	< 0.1	
GII.20	< 0.1	
GII.21	0.1 - 0.9	

Table 4: HBGA-binding profiles of HuNoV genotypes according to the three binding groups described by Huang et al. (2005) A/B: A/B binding group; Le: Lewis binding group; NB: No binding group; ND: Not determined.

GI Genotypes	GI.1	GI.2	GI.3	GI.4	GI.5	GI.6	GI.7	GI.8	GI.9
Binding Group	A/B	A/B - Le	NB - A/B	NB - A/B	ND	ND	A/B	A/B - NB	ND
GII Genotypes	GII.1	GII.2	GII.3	GII.4	GII.5	GII.6	GII.7	GII.8	GII.9
Binding Group	A/B - NB	A/B - NB	A/B	A/B	A/B	A/B	A/B	ND	Le
GII Genotypes	GII.10	GII.11	GII.12	GII.13	GII.14	GII.15	GII.16	GII.17	GII.18
Binding Group	ND	ND	A/B	Le	NB - A/B	ND	ND	A/B	ND
GII Genotypes	GII.19	GII.20	GII.21						
Binding Group	ND	ND	Le						

Adapted from Donaldson et al., 2008; Huang et al., 2005, 2003; Jin et al., 2016; Nordgren et al., 2010; Shanker et al., 2014; Shirato, 2011.

Résumé

Les norovirus (NoV) sont l'une des principales causes de gastro-entérites dans le monde. La recherche des NoV dans les aliments et l'eau est réalisée à l'aide des techniques de biologie moléculaire mais elles présentent l'inconvénient de ne pas apporter d'information sur le caractère infectieux des virus. La détection du génome d'un virus capable de reconnaître préalablement son récepteur cellulaire pourrait limiter la surestimation du danger viral en excluant les particules non infectieuses n'ayant plus de capside intègre. Plusieurs études ont montré que l'interaction spécifique de la capside avec des antigènes tissulaires de groupes sanguins (HBGA) favorisait l'infection des NoV chez l'Homme. Ces sucres complexes, retrouvés dans la salive et à la surface des cellules intestinales, sont considérés comme des facteurs d'attachement mais il n'est pas exclu qu'ils puissent jouer un rôle de (co)-récepteur cellulaire ou un rôle de protection des NoV vis-à-vis des stress imposés par le système digestif de l'Homme avant d'atteindre sa cellule hôte.

Dans un premier temps, des facteurs d'inactivation que les virus sont susceptibles de rencontrer avant leur arrivée dans l'intestin de l'Homme (*i.e.* pH acide, enzymes protéolytiques) ont été testés pour évaluer le rôle de protection des NoV par les HBGA. Dans un second temps, des traitements d'inactivation (*i.e.* vieillissement naturel, chaleur, oxydants) ont été testés pour évaluer le maintien de la fixation des HBGA par les capsides de NoV GII.4, et donc de l'intégrité de la capside virale. Par des approches méthodologiques complémentaires, il a été montré que l'interaction avec les HBGA ne protégeait pas les NoV GII.4 vis-à-vis du pH acide et des enzymes protéolytiques. Ensuite, nos résultats ont mis en évidence que la fixation spécifique des NoV aux HBGA permettait de sélectionner les virus possédant encore des capsides structurées. Cependant, cette approche montre certaines limites lorsque les traitements induisent des modifications mineures au niveau de la capside, suggérant que la perte de la fixation des HBGA par les capsides ne puisse pas toujours être corrélée à la perte du caractère infectieux des NoV.

Mots clés : Norovirus, Antigènes tissulaires de groupes sanguins, Inactivation, Capside.

Abstract

Noroviruses (NoVs) are one of the leading causes of gastroenteritis worldwide. The detection of NoVs in food and water is performed by using molecular tools, but they do not provide information about NoV infectivity when their genome is detected. The recognition of the cellular receptor prior the detection of viral genome could limit the overestimation of the viral hazard by excluding non-infectious particles having altered capsid. Many studies have shown that the specific interaction between histo-blood group antigens (HBGA) and the viral capsid promotes the infection of NoVs in humans. These complex carbohydrates, found in saliva and on the surface of intestinal cells, are described as attachment factors but it is not excluded that they may play a role of cellular co-receptor or a role of protection of NoVs against the stresses found in the gastrointestinal tract before reaching its host cell.

Firstly, inactivation factors that viruses can encountered before reaching the human intestine (*i.e*. acid pH, proteolytic enzymes) have been tested to evaluate the role of NoV protection by HBGAs. Secondly, various inactivation treatments (*i.e.* natural ageing, heat, oxidants) have been tested to evaluate the capacity of HBGA-binding to the GII.4 NoV capsids, and thus the capsid integrity. Using complementary methodological approaches, it was evidenced that the interaction between HBGAs and viral capsid did not protect GII.4 NoV against acid pH and proteolytic enzymes. Then, our results have demonstrated that the HBGA-binding to the capsid could select GII.4 NoVs having structured capsids. However, this approach displays some drawbacks for inactivation treatments which induce minor changes in the capsid integrity, suggesting that the loss of the HBGA-binding to the NoV capsid could not always be correlated to the loss of the NoV infectivity.

Keywords: Norovirus, Histo-blood group antigens, Inactivation, Capsid.