AVERTISSEMENT

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

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

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

Contact : ddoc-thesesexercice-contact@univ-lorraine.fr

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

UNIVERSITE DE LORRAINE
2015

FACULTE DE PHARMACIE

THESE

Présentée et soutenue publiquement

le 10 juin 2015, sur un sujet dédié à :

Connaissances actuelles et place du Norovirus parmi les agents de diarrhées infectieuses virales.
Serait-il un agent pathogène émergent parfait?

pour obtenir

le Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie

par Cécile MULLER

née le 7 janvier 1989

Membres du Jury

Président :

Pr Chantal FINANCE,	PU-PH, Université de Lorraine, CHU de Nancy

Juges :

Pr Raphaël DUVAL,	Professeur des universités, Université de Lorraine
Dr Gérard BELEY,	Pédiatre, Essey-les-Nancy
Dr Hervé BLAJMAN,	Pharmacien, Sarreguemines

UNIVERSITÉ DE LORRAINE
FACULTÉ DE PHARMACIE
Année universitaire 2014-2015

DOYEN
Francine PAULUS
Vice-Doyen
Béatrice FAIVRE
Directeur des Etudes
Virginie PICHON
Conseil de la Pédagogie
Président, Brigitte LEININGER-MULLER
Collège d'Enseignement Pharmaceutique Hospitalier
Président, Béatrice DEMORE
Commission Prospective Facultaire
Président, Christophe GANTZER
Vice-Président, Jean-Louis MERLIN
Commission de la Recherche
Président, Raphaël DUVAL

Responsable de la filière Officine	Béatrice FAIVRE
Responsables de la filière Industrie	Isabelle LARTAUD, Jean-Bernard REGNOUF de VAINS
Responsable de la filière Hôpital	Béatrice DEMORE
Responsable Pharma Plus ENSIC	Jean-Bernard REGNOUF de VAINS
Responsable Pharma Plus ENSAIA	Raphaël DUVAL
Responsable de la Communication	Marie-Paule SAUDER
Responsable de la Cellule de Formation Continue et individuelle	Béatrice FAIVRE
Responsable de la Commission d'agrément des maîtres de stage	Béatrice FAIVRE
Responsables des échanges internationaux	Bertrand RIHN
Responsable ERASMUS	Mihayl VARBANOV

DOYENS HONORAIRES

Chantal FINANCE
Claude VIGNERON

PROFESSEURS EMERITES

Jeffrey ATKINSON
Max HENRY
Gérard SIEST
Claude VIGNERON

PROFESSEURS HONORAIRES

Roger BONALY
Pierre DIXNEUF
Marie-Madeleine GALTEAU
Thérèse GIRARD
Michel JACQUE
Pierre LABRUDE
Lucien LALLOZ
Pierre LECTARD
Vincent LOPPINET
Marcel MIRJOLET
Maurice PIERFITTE
Janine SCHWARTZBROD
Louis SCHWARTZBROD

ASSISTANTS HONORAIRES

Marie-Catherine BERTHE
Annie PAVIS

MAITRES DE CONFERENCES HONORAIRES

Monique ALBERT
Mariette BEAUD
Gérald CATAU
Jean-Claude CHEVIN
Jocelyne COLLOMB
Bernard DANGIEN
Marie-Claude FUZELLIER
Françoise HINZELIN
Marie-Hélène LIVERTOUX
Bernard MIGNOT
Jean-Louis MONAL
Blandine MOREAU
Dominique NOTTER
Christine PERDICAKIS
Marie-France POCHON
Anne ROVEL
Maria WELLMAN-ROUSSEAU

ENSEIGNANTS	*Section CNU* *	*Discipline d'enseignement*

PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS

Danièle BENSOUSSAN-LEJZEROWICZ	*82*	*Thérapie cellulaire*
Chantal FINANCE	*82*	*Virologie, Immunologie*
Jean-Louis MERLIN	*82*	*Biologie cellulaire*
Alain NICOLAS	*80*	*Chimie analytique et Bromatologie*
Jean-Michel SIMON	*81*	*Economie de la santé, Législation pharmaceutique*

PROFESSEURS DES UNIVERSITES

Jean-Claude BLOCK	*87*	*Santé publique*
Christine CAPDEVILLE-ATKINSON	*86*	*Pharmacologie*
Raphaël DUVAL	*87*	*Microbiologie clinique*
Béatrice FAIVRE	*87*	*Biologie cellulaire, Hématologie*
Luc FERRARI	*86*	*Toxicologie*
Pascale FRIANT-MICHEL	*85*	*Mathématiques, Physique*
Christophe GANTZER	*87*	*Microbiologie*
Frédéric JORAND	*87*	*Eau, Santé, Environnement*
Isabelle LARTAUD	*86*	*Pharmacologie*
Dominique LAURAIN-MATTAR	*86*	*Pharmacognosie*
Brigitte LEININGER-MULLER	*87*	*Biochimie*
Pierre LEROY	*85*	*Chimie physique*
Philippe MAINCENT	*85*	*Pharmacie galénique*
Alain MARSURA	*32*	*Chimie organique*
Patrick MENU	*86*	*Physiologie*
Jean-Bernard REGNOUF de VAINS	*86*	*Chimie thérapeutique*
Bertrand RIHN	*87*	*Biochimie, Biologie moléculaire*

MAITRES DE CONFÉRENCES DES UNIVERSITÉS - PRATICIENS HOSPITALIERS

Béatrice DEMORE	*81*	*Pharmacie clinique*
Julien PERRIN	*82*	*Hématologie biologique*
Marie SOCHA	*81*	*Pharmacie clinique, thérapeutique et biotechnique*
Nathalie THILLY	*81*	*Santé publique*

MAITRES DE CONFÉRENCES

Sandrine BANAS	*87*	*Parasitologie*
Xavier BELLANGER	*87*	*Parasitologie, Mycologie médicale*
Emmanuelle BENOIT	*86*	*Communication et Santé*
Isabelle BERTRAND	*87*	*Microbiologie*
Michel BOISBRUN	*86*	*Chimie thérapeutique*
François BONNEAUX	*86*	*Chimie thérapeutique*
Ariane BOUDIER	*85*	*Chimie Physique*
Cédric BOURA	*86*	*Physiologie*
Igor CLAROT	*85*	*Chimie analytique*
Joël COULON	*87*	*Biochimie*
Sébastien DADE	*85*	*Bio-informatique*
Dominique DECOLIN	*85*	*Chimie analytique*
Roudayna DIAB	*85*	*Pharmacie galénique*
Natacha DREUMONT	*87*	*Biochimie générale, Biochimie clinique*
Joël DUCOURNEAU	*85*	*Biophysique, Acoustique*

ENSEIGNANTS (suite)	*Section CNU* *	*Discipline d'enseignement*
Florence DUMARCAY	*86*	*Chimie thérapeutique*
François DUPUIS	*86*	*Pharmacologie*
Adil FAIZ	*85*	*Biophysique, Acoustique*
Anthony GANDIN	*87*	*Mycologie, Botanique*
Caroline GAUCHER	*85/86*	*Chimie physique, Pharmacologie*
Stéphane GIBAUD	*86*	*Pharmacie clinique*
Thierry HUMBERT	*86*	*Chimie organique*
Olivier JOUBERT	*86*	*Toxicologie, Sécurité sanitaire*
Francine KEDZIEREWICZ	*85*	*Pharmacie galénique*
Alexandrine LAMBERT	*85*	*Informatique, Biostatistiques*
Julie LEONHARD	*86*	*Droit en Santé*
Faten MERHI-SOUSSI	*87*	*Hématologie*
Christophe MERLIN	*87*	*Microbiologie environnementale*
Maxime MOURER	*86*	*Chimie organique*
Coumba NDIAYE	*86*	*Epidémiologie et Santé publique*
Francine PAULUS	*85*	*Informatique*
Caroline PERRIN-SARRADO	*86*	*Pharmacologie*
Virginie PICHON	*85*	*Biophysique*
Sophie PINEL	*85*	*Informatique en Santé (e-santé)*
Anne SAPIN-MINET	*85*	*Pharmacie galénique*
Marie-Paule SAUDER	*87*	*Mycologie, Botanique*
Rosella SPINA	*86*	*Pharmacognosie*
Gabriel TROCKLE	*86*	*Pharmacologie*
Mihayl VARBANOV	*87*	*Immuno-Virologie*
Marie-Noëlle VAULTIER	*87*	*Mycologie, Botanique*
Emilie VELOT	*86*	*Physiologie-Physiopathologie humaines*
Mohamed ZAIOU	*87*	*Biochimie et Biologie moléculaire*
Colette ZINUTTI	*85*	*Pharmacie galénique*
PROFESSEUR ASSOCIE		
Anne MAHEUT-BOSSER	*86*	*Sémiologie*
PROFESSEUR AGREGE		
Christophe COCHAUD	*11*	*Anglais*

** <u>Disciplines du Conseil National des Universités</u> :*

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

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

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

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

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

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

32 : Personnel enseignant-chercheur de sciences en chimie organique, minérale, industrielle

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

SERMENT DES APOTHICAIRES

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

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

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

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

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

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

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

Remerciements

À ma présidente et directrice de thèse, Madame Chantal FINANCE, PU-PH à la faculté de pharmacie de Nancy et au CHU à Nancy

Pour m'avoir fait l'honneur de diriger et présider cette thèse,

Pour votre grande disponibilité,

Pour l'ensemble de vos précieux conseils,

Veuillez trouver ici l'expression de mon plus grand respect et de mes sincères remerciements.

À M. Hervé Blajman, docteur en pharmacie à Sarreguemines

Pour me faire l'honneur et le plaisir de participer au jury de cette thèse,

Pour m'avoir accueillie dans votre officine,

Pour tout ce que vous m'avez appris,

Veuillez trouver ici le témoignage de ma plus grande reconnaissance et de mes sincères remerciements.

À M. Raphaël Duval, professeur des Universités à Université de Lorraine

Pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de juger ce travail,

Pour l'intérêt que vous portez à ce travail,

Pour la qualité de vos enseignements tout au long de ces études,

Veuillez trouver ici ma plus grande reconnaissance.

À M. Gérard Beley, pédiatre à Essey les Nancy

Pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de juger ce travail,

Pour l'intérêt que vous portez à ce travail,

Veuillez trouver ici ma plus grande reconnaissance.

À mes parents

Pour m'avoir donné la possibilité de poursuivre ces études,
Pour avoir toujours cru en moi et m'avoir redonné confiance dans TOUS mes moments de doute (et il y en a eu !),
Pour avoir toujours été à mes côtés,
Je vous remercie infiniment.
Aujourd'hui, si je suis là, c'est grâce à vous.
Je vous dédie cette thèse avec tout mon amour.

À mon petit frère Baptiste

Pour notre grande complicité,
Pour ton soutien et ta présence, Je te remercie.
Je te souhaite tout le bonheur du monde.
Je t'aime mon Mull' !

À Anthony

Pour tout ton soutien et ta compréhension,
Pour tous les moments passés ensemble depuis presque 9 ans,
Pour ton amour, Merci infiniment.
Place à notre avenir maintenant.
Je t'aime.

À ma grand-mère

Pour tous tes encouragements,
Pour ta présence à cette thèse,
Merci Mémé !

À toute ma famille

À ma marraine, mon parrain qui sont toujours présents pour moi.
À Mes oncles, mes tantes, mes cousins et mes cousines... (ils sont trop nombreux pour tous les citer !)
À ma belle famille.
Merci à tous d'avoir cru en moi

À mes amis de "Nouss'"

A Céline, Seb', Olivia, Yan', Cindie, Camille, Manu, Evelyne...

Pour tous les moments partagés,

Pour votre amitié depuis ces longues années. Merci à vous!

À mes amis de la fac

Céline, les Mathilde's, Marie, Alex, Nicolas, Loïc, Edouard, Claire, Sarah, Paul.

Vous êtes mes plus belles rencontres. Sans vous ces 7 années à Nancy n'auraient pas été pareilles. Je vous souhaite à tous une belle carrière professionnelle, et j'espère que notre amitié durera le plus longtemps possible.

À toute l'équipe de la pharmacie SEITLINGER

Merci pour votre accueil et votre disponibilité lors de mes stages de 3ème, 4ème et 6ème année.

À toute l'équipe de la pharmacie BLAJMAN

Merci de votre accueil au sein de votre superbe équipe. C'est un réel plaisir de travailler avec vous !

A ceux qui sont partis trop tôt

Pépé, Léon et Jérôme. Vous me manquez.

Sommaire

Liste des figures 7

Liste des tableaux 10

Liste des abréviations 12

Introduction 14

I. Etiologies des gastroentérites aiguës 16

I.1 Les gastroentérites d'origine non infectieuse 18

I.1.1 Les diarrhées aiguës rapidement résolutives 18

I.1.2 Les diarrhées médicamenteuses (autres que les antibiotiques) 18

I.1.3 les diarrhées post antibiothérapie 19

I.2 Les gastroentérites d'origine infectieuse 22

I.2.1 Agents responsables des principales diarrhées infectieuses bactériennes 27

I.2.1.1 Les diarrhées à S*almonella* 27

I.2.1.2 Les diarrhées à *Shigella* 28

I.2.1.3 Les diarrhées à *Escherichia coli* 31

I.2.1.4 Les diarrhées à *Vibrio cholerae* 35

I.2.1.5 Les diarrhées à *Yersinia enterocolitica* 38

I.2.1.6 Les diarrhées à *Campylobacter* 38

I.2.2 Agents responsables des principales diarrhées infectieuses parasitaires 39

I.2.2.1 Les diarrhées à *Plasmodium* 40

I.2.2.2 Les diarrhées à *Trichinella* 40

I.2.2.3 Les diarrhées à *Entamoeba histolytica* 41

I.2.2.4 Les diarrhées à *Schistosoma* 41

I.2.2.5 Les diarrhées à *Giardia intestinalis* 41

I.2.2.6 Les diarrhées à *Balantidium coli* 42

I.2.2.7 Les autres helminthes 42

I.2.3 Agents responsables des principales diarrhées infectieuses virales 43

I.2.3.1 Les diarrhées à Rotavirus 44

I.2.3.2 Les diarrhées à Astrovirus 47

I.2.3.3 Les diarrhées à Adenovirus 40 et 41 48
I.2.3.4 Les diarrhées à Sapovirus 49
I.2.3.5 Autres virus....49
II. Aspects cliniques et épidémiologiques des infections à Norovirus 50
II.1 Caractéristiques cliniques des gastro-entérites à Norovirus 50
II.1.1 L'infection chez les patients immunocompétents....50
II.1.1.1 Chez les enfants 50
II.1.1.2 Chez les adultes....51
II.1.1.3 Chez les sujets âgés 52
II.1.2 L'infection chez les patients immunodéprimés....52
II.1.2.1 Cas d'une infection à Norovirus chez des enfants ayant subi une transplantation de CSH....53
II.1.2.2 Cas d'une infection à Norovirus chez un patient séropositif à VIH 54
II.1.2.3 Cas de patients ayant subi une transplantation rénale 54
II.1.2.4 Cas d'un patient souffrant d'une leucémie lymphoïde chronique (LLC) 55
II.1.3 Les infections à Norovirus chez les nouveau-nés prématurés....55
II.2 Epidémiologie du Norovirus....57
III. Aspects virologiques et diagnostiques des infections à Norovirus....60
III.1 Connaissances actuelles sur le Norovirus 60
III.1.1 La classification du virus 60
III.1.2 La découverte du Norovirus 64
III.1.3 La structure virale....66
III.1.3.1 Le génome viral....66
III.1.3.2 Les protéines structurales 66
III.1.3.2.1 VP1 67
III.1.3.2.2 VP2 68
III.1.3.3 Les protéines non structurales 68
III.1.4 Les propriétés physico-chimiques virales 69
III.1.5 Le cycle cellulaire de multiplication du virus 72

III.1.5.1 L'attachement....72
III.1.5.2 L'entrée et la décapsidation (avec libération du génome viral)....73
III.1.5.3 La traduction des protéines virales....73
III.1.5.4 La réplication....75
III.1.5.5 L'assemblage, la sortie des virions....79
III.1.6 La sensibilité génétique aux infections à Norovirus....79
III.1.6.1 Les antigènes du groupe sanguin (*histo-blood group antigens* - HBGA)....80
III.1.6.2 Groupes sanguins tissulaires et Norovirus....84
III.1.6.2.1 Analyse génétique de la résistance aux infections à Norovirus....84
III.1.6.2.2 Analyse structurale des interactions Norovirus-antigène tissulaires des groupes sanguins....86
III.1.7 L'immunité innée de la population....89
III.2 Diagnostic virologique des infections à Norovirus....92
III.2.1 Les prélèvements....92
III.2.2 La microscopie électronique....92
III.2.3 Les tests d'immunodiagnostic....93
III.2.3.1 *E.L.I.S.A.*....93
III.2.3.2 Les tests immunochromatographiques....97
III.2.4 Les tests moléculaires....99
III.2.4.1 RT-PCR....100
III.2.4.2 RT-PCR en temps réel....101
III.2.4.3 PCR multiplex....104
III.2.4.4 La spectrométrie de masse....106
IV. Traitement....108
IV.1 Traitement symptomatique des infections à Norovirus....108
IV.1.1 La réhydratation....108
IV.1.1.1 La réhydratation chez l'adulte....109
IV.1.1.2 La réhydratation chez le nourrisson....109
IV.1.2 Les anti-diarrhéiques....110

IV.1.2.1 Le racécadotril (Tiorfan®) 110
IV.1.2.2 Le lopéramide (Imodium®) 111
IV.1.2.3 La diosmectite (Smecta®) 111
IV.1.3 Les antiémétisants 112
IV.1.3.1 La métopimazine (Vogalène®) 112
IV.1.3.2 La dompéridone (Motilium®) 112
IV.1.3.3 Le métoclopramide (Primpéran®) 113
IV.1.4 Les antispasmodiques 114
IV.1.5 Les probiotiques/ les levures 114
IV.2 Etat actuel de la thérapeutique antivirale 115
IV.2.1 Modèles d'études des molécules actives 115
IV.2.1.1 Les virus de substitution 115
IV.2.1.2 Lignée cellulaire portant le réplicon du Norovirus humain 115
IV.2.1.3 Les modèles animaux 116
IV.2.2 Les molécules antivirales et leur cibles potentielles 116
IV.2.2.1 Attachement du virus à la cellule cible 116
IV.2.2.2 Entrée du virus dans la cellule et décapsidation 119
IV.2.2.3 Les inhibiteurs de protéase 122
IV.2.2.4 Les inhibiteurs de l'ARN polymérase 128
IV.2.2.4.1 Les inhibiteurs nucléosidiques 129
IV.2.2.4.2 Les analogues non nucléotidiques 136
IV.2.2.5 Autres molécules 140
V. Prévention 143
V.1 La vaccination 143
V.2 La 2'-C-methylcytidine 147
V.3 Contrôle des infections à Norovirus 147
V.3.1 Contrôle des épidémies dans les institutions 147
V.3.1.1 L'hygiène des mains 148
V.3.1.2 Port d'équipement individuel approprié 148

V.3.1.3 Nettoyage et désinfection 149
V.3.1.4 Regroupement et isolement des patients 149
V.3.1.5 Personnel de santé 149
V.3.1.6 Minimiser les visiteurs 149
V.3.2 Contrôle des épidémies d'origine alimentaire 150
V.3.2.1 Contrôle des épidémies liées à l'environnement 150
V.3.2.2 Les désinfectants 152
VI. Le Norovirus, un virus émergent parfait 154
Conclusion 160
Bibliographie 162
Webographie 176

Liste des figures

Figure 1 : Taux d'incidence national (cas pour 100000 habitants) de diarrhée aiguës et seuil épidémique, hivers 2012-2013, 2013-2014,2014-2015 17
Figure 2 : Mécanisme possible d'une diarrhée post-antibiotique 20
Figure 3 : Mécanisme physiopathologiques des diarrhées invasives à Salmonella 26
Figure 4 : Mécanisme d'action de *Shigella* 31
Figure 5 : Mécanisme d'action d'EPEC 32
Figure 6 : Mécanisme d'action d'ETEC 32
Figure 7 : Résumé de la clinique d'une infection à EHEC 33
Figure 8 : Mécanisme d'action d'EHEC 33
Figure 9 : Mécanisme d'action d'EIEC 33
Figure 10 : Mécanisme d'action d'EAEC 34
Figure 11 : Mécanisme d'action de DAEC 34
Figure 12 : Répartition du nombre de cas de choléra entre 1989 et 2011 36
Figure 13 : Mode d'action de la toxine cholérique (CT). 37
Figure 14 : Etiologies des gastroentérites aigües 43
Figure 15 : Etiologies virales des GEA par tranches d'âges 44
Figure 16 : Structure des Rotavirus 45
Figure 17 : Etiologies des GEA chez les enfants de moins de 5 ans hospitalisés 46
Figure 18 : Mode de transmission du Norovirus 59
Figure 19 : Analyse phylogénétique des cinq genres de la famille des *Caliciviridae*, selon la séquence de l'ARN polymérase ARN dépendante 61
Figure 20 : Classification des Norovirus en génogroupes et génotypes 63
Figure 21 : Visualisation, en immuno-microscopie électronique (a) "*small round structured viruses*" et en (b) "*classic human caliciviruses*" 65
Figure 22 : Organisation du génome viral en 3 cadres de lecture ouverts 66
Figure 23 : Représentation structurale de VP1 (..... 67
Figure 24 : (b) Structure du monomère de VP1 (c) Représentation du dimère de VP1 (d) Représentation du virion du Norovirus, composé de 90 dimères de VP1 (en jaune : domaine S, en bleu : P1, en rouge : P2) 68
Figure 25 : Schéma de la poly-protéine ORF1 68
Figure 26 : Inactivation des Norovirus humains par un traitement thermique 70
Figure 27 : Inactivation des Norovirus humains par un traitement au chlore 71
Figure 28 : Inactivation des Norovirus humains par les ultra-violets (UV) 72

Figure 29 : Description du cycle cellulaire du Norovirus 74
Figure 30: Représentation des facteurs du complexe d'initialisation de la traduction 75
Figure 31: Premier modèle de synthèse des ARN sous génomiques : par signal de terminaison.....77
Figure 32 : Deuxième modèle de synthèse des ARN sub-génomiques : par présence d'un promoteur.....78
Figure 33: Synthèse des HBGA.....83
Figure 34 : Analyse structurale des interactions de la souche Norwalk avec les antigènes tissulaires 88
Figure 35 : Analyse structurale des interactions du génotype GII.4 avec les antigènes tissulaires 88
Figure 36 : Mise en évidence des épitopes bloquants chez le Norovirus GII.4 90
Figure 37 : Variations antigéniques du génotype GII.4 91
Figure 38 : Schéma simplifiée de la méthode ELISA sandwich 94
Figure 39 : Fonctionnement du test immunochromatographique sur membrane de nitrocellulose 98
Figure 40 : Schéma de déroulement d'une PCR.....101
Figure 41 : Modèle graphique de la PCR en temps réel 103
Figure 42 : Détection d'allèles spécifiques avec la technologie Luminex 105
Figure 43 : Schéma de la méthode AQUA (spectrométrie de masse quantitative).....107
Figure 44 : Structure des 20 composés ciblant les sites de liaison des ligands A et/ou B au niveau de la capside virale 118
Figure 45 : Effets du traitement par la simvastatine sur le taux de LDL-R.....120
Figure 46 : Corrélation entre l'expression des récepteurs aux LDL et la réplication des Norovirus.....120
Figure 47 : Les 8 composés de la classe des pyranobenzopyrones 121
Figure 48 : Structure du motif de l'inhibiteur de la protéase du Norovirus 123
Figure 49 : Structure des cinq composés présentant la fonction aldéhyde au niveau de "la tête" du motif antiviral 124
Figure 50 : Structure des cinq composés présentant la fonction amide au niveau de "la tête" du motif antiviral 125
Figure 51 : Structure des cinq composés présentant la fonction bisulfite au niveau de "la tête" du motif antiviral 125
Figure 52 : Structure des cinq composés présentant la fonction α-hydroxy phosphonate au niveau de "la tête" du motif antiviral.....126
Figure 53: Relation dose-effet de la chymostatine sur les protéases NVpro et MD145pro..127
Figure 54 : Structure de la ribavirine.....129

Figure 55 : Histopathologie de l'intestin grêle des souris infectées par le MNV. D et E : traitées par 2'-C-MeC. B et C : non traités par 2'-C-MeC 133
Figure 56: Comparaison de la variation du poids des souris, infectées par MNV, traitées ou non avec 2'-C-MeC.....134
Figure 57 : Comparaison des charges d'ARN viral dans les échantillons de selles des souris infectées par MNV traitées ou non par 2'-C-MeC 134
Figure 58 : Structure de favipiravir.....135
Figure 59 : Structure de NAF2 (a) et PPNDS (b) 136
Figure 60 : Structure des 4 inhibiteurs non nucléosidiques de l'ARN polymérase ARN dépendant du Norovirus 137
Figure 61 : Structure de (E)-2 styrylchromones 139
Figure 62 : Structure du motif cyclosulfamide 140
Figure 63 : Dérivés cyclosulfamides dimériques présentant une bonne activité anti-Norovirus, mais une cytotoxicité élevée.....141
Figure 64 : Structure du motif cyclosulfamide (I) et du motif sulfamide acyclique (II) 141
Figure 65 : Excrétion virale du Norovirus chez les sujets du groupe placebo et chez les sujets vaccinés selon qu'ils sont malades ou non 146
Figure 66 : Le lavage des mains.....148
Figure 67 : Prévention des épidémies d'origine alimentaire 151
Figure 68 : Prévalence des Rotavirus et des Norovirus dans les échantillons de selles à l'hôpital d'enfants du Texas 154
Figure 69 : Prévalence des génogroupes I et II parmi les échantillons de selles positifs à Norovirus à l'hôpital d'enfants du Texas 155
Figure 70 : Schéma de l'infection des Norovirus : infection des cellules B *via* les bactéries commensales 158

Liste des tableaux

Tableau I : Principaux médicaments (hors antibiothérapie) responsables de diarrhées 19
Tableau II : Principaux agents infectieux responsables de diarrhées aiguës 23
Tableau III : Types de diarrhées aiguës.....25
Tableau IV: Exemples de distribution des sérogroupes de *Shigella* dans plusieurs pays.....29
Tableau V : Affections associées aux différents pathovars d'*Escherichia coli*.....32
Tableau VI : Etiologie des principales diarrhées parasitaires.....40
Tableau VII : Composition en substances actives des vaccins anti-Rotavirus par dose.....47
Tableau VIII : Comparaison des caractéristiques de l'infection à Norovirus entre les patients immunocompétents et les patients immunodéprimés 53
Tableau IX : Principaux symptômes rencontrés lors d'une infection à Norovirus chez les prématurés.....56
Tableau X : Propriétés des Calicivirus 62
Tableau XI : Localisation et structure des six précurseurs oligosaccharidiques 81
Tableau XII : Les antigènes d'attachement des différentes souches de Norovirus.....85
Tableau XIII : Evolution des interactions entre les différents variants de GII.4 et les HGBAs91
Tableau XIV : Détection de Norovirus dans les selles des enfants brésiliens (en 2011) par RT-PCR et RIDASCREEN®.....95
Tableau XV : Sensibilité et spécificité comparées des tests RIDASCREEN® Norovirus et RT-PCR lors de différentes études.....96
Tableau XVI : Evaluation de la sensibilité (nombre de positifs/nombre d'échantillons testés) des 5 kits d'immunochromatographie pour la détection des Norovirus.....99
Tableau XVII : Evaluation de la spécificité (nombre de positifs/nombre d'échantillons testés) des 5 kits d'immunochromatographie pour la détection des Norovirus.....99
Tableau XVIII : Sensibilité et spécificité comparées de la technique RT-PCR Luminex pour la détection d'agents pathogènes gastro-intestinaux.....106
Tableau XIX : Modèles animaux.....117
Tableau XX : Effets des composés de la classe des pyranobenzopyrones sur la réduction de la réplication du Norovirus 122
Tableau XXI : CE 50 des différents composés synthétisés.....126
Tableau XXII : Valeurs de la CI50 de la chymostatine pour l'inhibition des protéases.....128
Tableau XXIII : Activité anti-Norovirus et cytotoxicité des analogues nucléosidiques (MNV et NV réplicon) 131
Tableau XXIV : Efficacité du vaccin anti-Norovirus 145

Tableau XXV: Efficacité des vaccins anti-Rotavirus.....156
Tableau XXVI : Principales caractéristiques favorisant la transmission du Norovirus 157

Liste des abréviations

ADN : acide desoxyribonucléique

ADNc : acide desoxyribonucléique complémentaire

AdV : adénovirus

Amol : attomol (10^{-18} mol)

AMPc : adénosine monophosphate cyclique

ARN : acide ribonucléique

CC50 : concentration cytotoxique médiane

CE 50 : concentration effective médiane

CE 90 : concentration effective 90%

CI 50 : concentration inhibitrice médiane

CNR : Centre National de Référence

CT : toxine cholérique

CTP : 2′-amino-2′-deoxycytidine-5′-triphosphate

DAEC : *E. coli* à adhésion diffuse

DE 50 : dose effective médiane

DPA : diarrhée post-antibiotique

EEG : électroencéphalogramme

GE : gastroentérite

GEA : gastroentérite aiguë

EAEC : *E. coli* entéroaggrégatifs

ELISA : *enzyme-linked immunosorbent assay*

ETEC : *E. coli* entero-toxinogène

EPEC : *E. coli* entéropathogène

EHEC : *E. coli* entero-hémorragique

EIEC : *E. coli* entero-invasif

FCV : *feline calicivirus* - Calicivirus félin

GMPc : guanosine monophosphate cyclique

GTP : guanosine triphosphate

HBGA : *Histo-Blood Group Antigens* - Antigènes des groupes sanguins

HuNoV : Norovirus humain

Ig : immunoglobulines

IT : indice thérapeutique

IV : intraveineuse

LCR : liquide cépahlo-rachidien

MeC : méthylcytidine

MICI : maladie inflammatoire chronique de l'intestin

MMF : mycophénolate mofétil

MNV : Norovirus murin

NAF2 : disulfonique naphthalène

NHC : β-D-N(4)-hydroxycytidine

NLV : *virus Norwalk-like*

NTP : 5-nitro-cytidine-5'-triphosphate

NTPase : nucléoside triphosphatase

NoV: Norovirus

ORF : *open reading frame* - cadre de lecture ouvert

PCR : réaction par polymérisation en chaîne

ppm : partie par million

PPNDS : pyridoxal-5′-phosphate-6-(2′-naphthylazo-6′-nitro-4′,8′-disulfonate) sel tétrasodique

RICD : infection récidivante à *Clostridium difficile*

RT-PCR : reverse transcription polymerase chain réaction - Transcription inverse et amplification en chaîne par polymérase

SI : indice de sélectivité

SLV : *virus Sapporo-like*

SM : spectrométrie de masse

SMSV : *San Miguel sea lion Virus*

SRO : soluté de réhydratation oral

SHU : syndrome hémolytique et urémique

TD 50 : dose toxique médiane

TMF : transfert du microbiote fécal

VESV : *Vesicular Exanthema of Swine Virus*

VLP : *virus-like particles* - particules virales

Introduction

Véritable problème mondial de santé publique, les diarrhées aiguës infectieuses sont parmi les maladies humaines les plus fréquentes. Actuellement, les virus apparaissent comme les agents pathogènes les plus fréquents des gastroentérites communautaires, aussi bien chez l'adulte que chez l'enfant (environ 60 % des cas). En France, plus de 21 millions d'épisodes de gastro-entérites surviennent chaque année, plus fréquemment au cours des mois de décembre et de janvier.

Les deux virus, les plus fréquemment rencontrés dans ces infections sont les Norovirus et les Rotavirus. Les Norovirus sont responsables des principales gastroentérites aiguës communautaires (non bactériennes) liées à la consommation d'eau ou de nourriture contaminées et touchent toutes les populations d'âges. Les Rotavirus sont, à l'échelle mondiale, les principaux virus responsables de gastroentérites aiguës sévères chez les enfants moins de 5 ans. Cependant, depuis la mise sur le marché des vaccins anti-Rotavirus en 2006, recommandés pour les nourrissons, une réduction très importante du nombre d'infections à Rotavirus a été observée, au profit des infections à Norovirus.

Dans ce contexte, nous avons choisi pour ce mémoire, de faire un état actuel des connaissances sur le Norovirus.

Dans une première partie du travail, nous nous intéresserons aux multiples causes de gastro-entérites aiguës.

Dans une deuxième partie, nous aborderons les aspects cliniques des infections à Norovirus et distinguerons les situations chez les patients immunodéprimés et immunocompétents.

Ensuite, dans une troisième partie, nous étudierons les aspects virologiques du Norovirus : sa structure, son génome, son cycle de multiplication, ses propriétés physicochimiques, la susceptibilité génétique de l'hôte... Nous détaillerons également les techniques diagnostiques disponibles pour la détection de ces virus.

Puis, dans une quatrième partie, nous présenterons l'essentiel de la prise en charge symptomatique des gastroentérites virales, les conseils associés ainsi que les mesures hygiéno-diététiques à respecter. Nous analyserons également les différentes pistes de recherche du traitement antiviral.

Dans une cinquième partie, nous envisagerons la prévention des infections à Norovirus, et notamment le développement d'un éventuel vaccin ou l'utilisation de molécules antivirales. Nous nous intéresserons également aux mesures d'hygiène afin de limiter la transmission et la propagation de ces infections.

Enfin, dans une dernière partie, nous discuterons pourquoi les Norovirus peuvent être caractérisés comme des virus émergents et "parfaits".

I. Etiologies des gastroentérites aiguës

La gastro-entérite est une infection des muqueuses tapissant la paroi de l'intestin. Elle se manifeste principalement par une diarrhée aiguë d'apparition brutale, mais aussi par des nausées, des vomissements, des douleurs abdominales, une fièvre modérée et parfois du sang dans les selles (AMELI, 2014b). La déshydratation est la complication à redouter notamment chez le jeune enfant, la personne âgée et le patient immunodéprimé (INPES, 2014).

La diarrhée est définie comme l'émission d'au moins trois selles molles ou liquides par jour, ou à une fréquence anormale pour l'individu (AMELI, 2014b). Elle est considérée comme « aiguë » lorsqu'elle est d'apparition brutale et que sa durée est inférieure à 14 jours, « persistante » lorsque sa durée varie de 14 à 28 jours et « chronique » lorsque sa durée est supérieure à 28 jours (Carré D., 2004).

Dans les pays développés, la fréquence des diarrhées aigües est de l'ordre d'un épisode par habitant et par an, ce qui en fait un problème de santé publique. Leur évolution est le plus souvent favorable en moins de 3 jours (80% des patients), c'est pourquoi, seule une faible proportion de patients consulte un médecin. En France, grâce aux données du réseau sentinelle, on sait qu'environ 5% de patients, consultent leur médecin généraliste pour diarrhée aiguë. Les patients sont dirigés vers un spécialiste ou sont hospitalisés dans 1% des cas. Un arrêt de travail est prescrit dans 30% des cas, ce qui entraîne une indisponibilité des travailleurs et un impact socio-économique. Il existe un pic hivernal (figure 1) en décembre-janvier et une recrudescence en été (Beaugerie L., 2010). Le sex ratio hommes/femmes des patients est de 0,8. L'âge est un facteur de risque : l'incidence des épisodes aigus chez l'enfant de moins de 5 ans est doublée par rapport à la population générale (Carré D., 2004). Les diarrhées sont fébriles dans 50% dans cas, s'accompagnent de vomissements dans 80% des cas et de douleurs abdominales dans 84% des cas, la présence de glaire dans les selles dans 10% des cas et de sang dans 1% des cas (Beaugerie L., 2010).

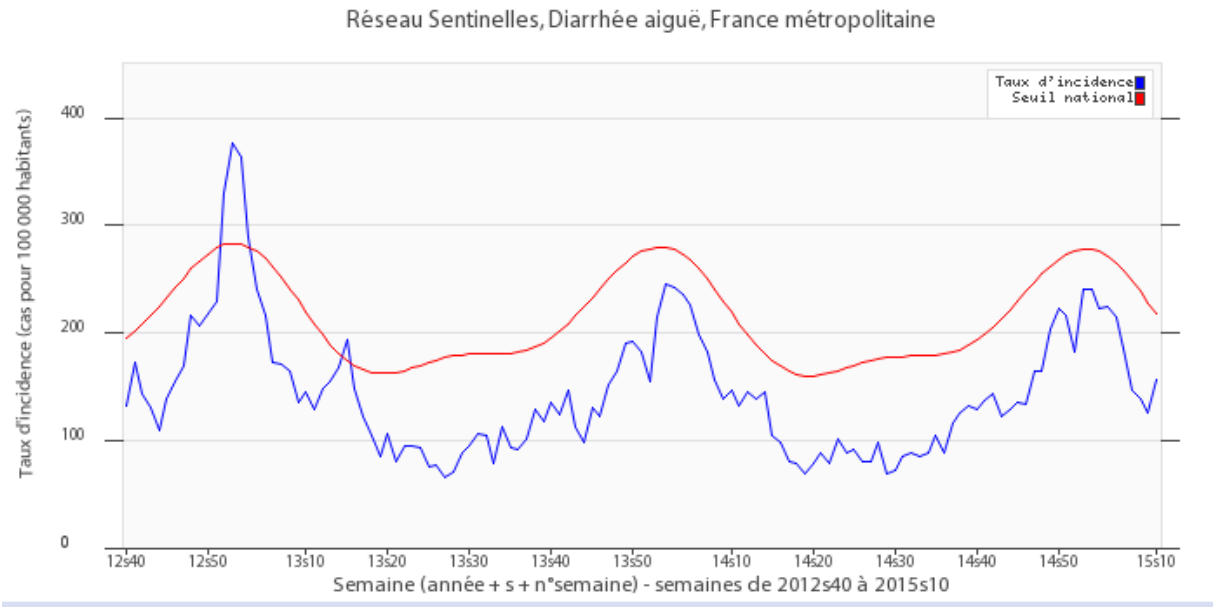


Figure 1 : Taux d'incidence national (cas pour 100000 habitants) de diarrhée aiguës et seuil épidémique, hivers 2012-2013, 2013-2014,2014-2015 (Websenti, 2015)

Dans les pays en voie de développement, l'incidence est beaucoup plus élevée du fait, du faible niveau d'hygiène, de la malnutrition, des moyens financiers réduits notamment pour l'assainissement de l'eau. Ainsi, la mortalité est nettement plus élevée dans les pays en voie de développement, surtout au cours de la première année de vie : 3,9 décès pour 100.000 habitants aux Etats Unis contre 8 à 50 pour 1000 cas (Carré D., 2004).

La diarrhée peut être classée comme étant osmotique, sécrétoire, due à une hyper-motilité ou inflammatoire.

- la diarrhée osmotique est due à une malabsorption de substances osmotiquement actives ce qui provoque une rétention d'eau dans la lumière de l'intestin ; la diarrhée stoppe lorsque le patient jeûne ;
- la diarrhée sécrétoire est provoquée par des toxines ou peptides qui causent un transport ionique anormal à travers l'épithélium intestinal ; la diarrhée persiste malgré le jeûne pendant 3 jours ;
- la diarrhée peut être due à une augmentation de la motilité intestinale ;
- la diarrhée inflammatoire est causée par une altération de la perméabilité de la muqueuse intestinale (Dinesen L., 2013).

L'étiologie est, dans la plupart des cas, infectieuse mais peut être également d'origine médicamenteuse et alimentaire (Carré D., 2004).

I.1 Les gastroentérites d'origine non infectieuse

I.1.1 Les diarrhées aiguës rapidement résolutives

Elles sont diverses et caractérisées par une durée courte (< 24h). Les différentes étiologies sont :

- l'allergie alimentaire : dans ce cas, assez rare, les diarrhées peuvent être accompagnées d'un urticaire ou plus rarement de réactions anaphylactiques plus sévères.

- la consommation d'aliments riches en histamine, comme du thon avarié, des épinards ou des fromages fermentés ; il peut y avoir des bouffées vasomotrices associées.

- la consommation de champignons : on distingue les cas bénins où les diarrhées surviennent dans un délai court (< 12h après l'ingestion), des cas graves et potentiellement létaux qui sont caractérisés par l'apparition de symptômes, tels que des diarrhées (selon le champignon ingéré), dans un délai beaucoup plus long (supérieur à 10h).

- l'ingestion d'aliments contaminés par des toxines ; par exemple *Staphylococcus aureus* présent dans la charcuterie, les pâtisseries, les glaces... ou *Bacillus cereus* qui contamine le riz frit ayant séjourné à l'air ambiant (dans les restaurants chinois).

- l'absorption de grandes quantités de sucres non ou mal absorbés dans l'intestin grêle, provoquant des diarrhées osmotiques (Carré D., 2004).

I.1.2 Les diarrhées médicamenteuses (autres que les antibiotiques)

Les médicaments peuvent être responsables de colites iatrogènes : il faut y penser devant toute diarrhée isolée dans un délai de quelques heures à 8 semaines après l'ingestion du médicament. Parmi la liste des médicaments responsables (tableau I), il y a ceux qui induisent des diarrhées aigües de manière décalée par rapport au début du traitement tels que le Cyclo 3®, la ticlopidine..., ceux qui provoquent la diarrhée juste après leurs premières prises comme les digitaliques, les antiacides contenant du magnésium, les AINS, la colchicine (Carré D., 2004)…

Les antimitotiques sont aussi fréquemment responsables de diarrhées (Carli P.*et al*, 2004). De même, un des principaux effets indésirables des antirétroviraux (notamment des antiprotéases) est la diarrhée, pouvant être responsable d'une mauvaise observance et d'un arrêt du traitement antirétroviral (Gerbouin O. et Grellet J., 2008).

Tableau I : Principaux médicaments (hors antibiothérapie) responsables de diarrhées (Carli.P et *al*, 2004)

Principaux médicaments (hors antibiotiques) responsables de diarrhées aiguës
Alphaméthyldopa **Antiacides** **Antidépresseurs** **Antiépileptiques** **AINS** **Antiparkinsoniens** **Antiarythmiques** **Cholestyramine** **Colchicine** **Digitaliques** **L-Dopa** **Metformine** **Prostaglandines** **Theophylline** **Antirétroviraux**

I.1.3 les diarrhées post antibiothérapie

La diarrhée est une complication fréquente des traitements antibiotiques. La prévalence des diarrhées post antibiotiques varie de 5 à 25%. Il existe trois types de mécanismes responsables de la survenue de diarrhées post-antibiotiques (figure 2) (Eckert C. et Barbut F., 2010).

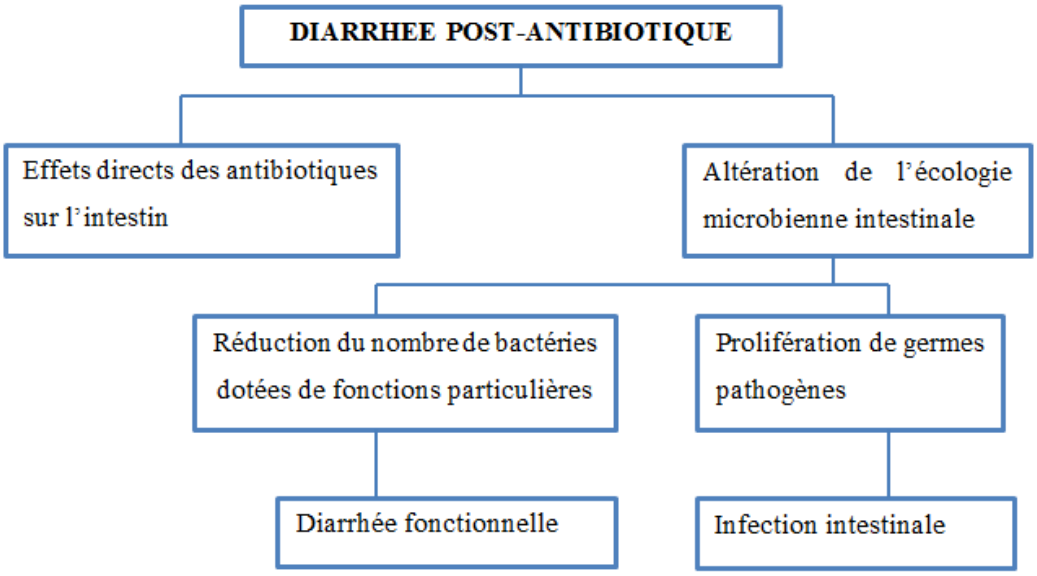


Figure 2 : Mécanisme possible d'une diarrhée post-antibiotique (Eckert C. et Barbut F., 2010)

La diarrhée post-antibiothérapie (DPA) peut être due à la prolifération d'agents pathogènes ; la flore intestinale, outre ses nombreuses autres fonctions, possède un "effet barrière" empêchant les bactéries pathogènes de s'implanter et de se multiplier. Les antibiotiques, en déséquilibrant cette flore, créent une niche permettant la prolifération d'agents infectieux (déjà présents dans la flore ou acquis par l'environnement). Parmi ces causes infectieuses de DPA, *Clostridium difficile* est de loin la plus fréquente : elle est impliquée dans 10 à 20% de ces diarrhées et dans la totalité des colites pseudomembraneuses. C'est une bactérie anaérobie à Gram positif sporulée, présente dans l'eau, le sol et l'intestin des hommes et animaux. Elle est la principale cause des diarrhées nosocomiales des pays développés.

Une fois implantée au niveau de la muqueuse digestive (due à la modification de la flore intestinale), cette bactérie produit deux toxines A et B, ayant des propriétés entérotoxiques et cytotoxiques. Certaines souches de *Clostridium difficile* produisent également une troisième toxine (toxine binaire) dont le mécanisme est mal connu, mais elle pourrait être un facteur de virulence supplémentaire.

Sur le plan de la clinique, classiquement, les symptômes sont une diarrhée banale aqueuse non sanglante avec une odeur caractéristique accompagnée de nausées, crampes abdominales et de fièvre. La CPM est la forme sévère de l'affection, caractérisée par un début brutal, une diarrhée profuse ainsi que la formation de pseudomembranes (plaques jaunes friables) au niveau du colon et/ou du rectum.
Tous les antibiotiques peuvent être incriminés, même si les céphalosporines, l'ampicilline, l'amoxicilline, la clindamycine et les fluoroquinolones sont régulièrement mises en cause. Les principaux facteurs de risque de ces infections, autre que la prise d'antibiotiques sont l'âge > 65 ans, les hospitalisations prolongées ou répétées.
Le traitement repose sur le retrait de l'antibiotique impliqué : dans 25 % des cas cela suffit à faire régresser les symptômes dans les 48 à 72 heures. Si les symptômes persistent, l'utilisation du métronidazole et/ou de la vancomycine est préconisée (Eckert C. et Barbut F., 2010). Cependant, du fait de la faible efficacité de ces antibiotiques, de nombreuses récidives d'infections à *Clostridium difficile* (RICD) ont été décrites (chez environ 25 % des patients). Ces RICD sont définies par une réapparition de l'infection 8 semaines après l'épisode initial. Ainsi, le traitement des RICD repose sur le transfert de microbiote fécal (TMF) qui consiste à administrer un filtrat de selles d'un donneur sain dans le tube digestif d'un patient malade (par lavement, sonde naso-gastrique, coloscopie ou gastroscopie). A ce jour, 500 patients ont été traités par TMF montrant un succès thérapeutique allant de 81% à 100%. L'efficacité de cette procédure peut être due à la capacité à reconstituer la flore digestive, mais la présence d'autres substances dans les selles du donneur peut également contribuer à l'efficacité de cette procédure. A court terme, aucun effet indésirable grave n'a été décrit (éructations, gênes abdominales, constipation...). Cependant des études complémentaires sur les risques à long terme ainsi que sur la tolérance et la sécurité du TMF (notamment chez les patients immunodéprimés) devront être menées (Barbut F. et *al*, 2015).

D'autres bactéries seraient également impliquées dans les DPA, notamment *Klebsiella oxytoca*, bacille Gram négatif, ubiquitaire, présente dans l'environnement, sur la peau et les muqueuses des hommes et animaux. Cette bactérie est responsable de colites hémorragiques, lors d'une antibiothérapie par pénicillines et dans une moindre mesure par céphalosporines, caractérisées par des diarrhées sanglantes ainsi que par des crampes abdominales sévères, ce qui nécessite souvent une hospitalisation. Ces diarrhées se résolvent dès l'arrêt de l'antibiotique incriminé.

Selon des études, *Clostridium perfringens, Staphylococcus aureus, Candida, Salmonella* seraient également capables d'induire des DPA.

Ces diarrhées sont également provoquées par une toxicité directe des antibiotiques sur l'intestin. Par exemple, l'érythromycine est identifiée comme un agoniste des récepteurs à la motiline (peptide prokinétique), d'où la stimulation de la vidange gastrique et des effets indésirables digestifs. L'association amoxicilline-acide clavulanique (Augmentin®) induit plus fréquemment des diarrhées que d'autres β-lactamines ; ceci est dû à l'augmentation du péristaltisme par cette association, d'autant plus que la concentration en acide clavulanique (inhibiteurs des β-lactamases) est élevée.

Enfin ces DPA peuvent être dues à l'altération des fonctions métaboliques microbiennes. Parmi ses fonctions, le microbiote intestinal peut métaboliser les hydrates de carbone notamment l'amidon, les fibres alimentaires (les produits de cette dégradation sont des acides gras à courtes chaînes, sources d'énergie pour les entérocytes). Il permet également de convertir les acides biliaires primaires, non absorbés par l'intestin grêle, en acides biliaires secondaires. Ainsi, en cas de modification du microbiote, la survenue d'une diarrhée peut être due, soit à l'accumulation d'hydrate de carbone dans la lumière colique exerçant un effet osmotique, soit due à l'excès d'acides biliaires primaires exerçant un effet sécrétoire sur la muqueuse colique (Eckert C. et Barbut F., 2010).

I.2 Les gastroentérites d'origine infectieuse

Le terme de diarrhée infectieuse recouvre des pathologies dues à de multiples agents notamment les virus, bactéries, parasites (tableau II).

Elles représentent une importante cause de morbidité et mortalité infantile et gériatrique dans le monde (Aranda-Michel J. *and* Giannella R-A., 1999). Dans les pays en voie de développement, la mortalité est estimée à 3 millions de décès par an et dans les pays développés, les diarrhées infectieuses sont la deuxième cause de morbidité (après les causes d'infections respiratoires).

La place relative des principaux agents infectieux varie en fonction de l'âge des patients, du contexte épidémique, des régions du globe, de la saison (les diarrhées d'origine virale prédominent en décembre-janvier, alors que les diarrhées bactériennes présentent un pic en période estivale). Cependant, les gastro-entérites d'origine virale sont de loin la première cause des diarrhées infectieuses en Europe, comme aux Etats Unis. L'étude Pang et *al* a permis d'identifier un virus dans 60% des épisodes diarrhéiques et dans 85% des diarrhées de gravité moyenne ou sévère chez l'enfant (Alain S. et Denis F., 2007).

La contamination du tube digestif est soit :

- directe, à partir des selles, par manuportage ce qui correspond à une contamination oro-fécale
- indirecte, par ingestion d'aliments ou d'eau souillés par le micro-organisme ou sa toxine.

L'expression clinique dépend de deux facteurs :

- de la virulence et donc de l'inoculum avec la notion de dose infestante ; par exemple, les *Shigella* très virulentes provoquent une infection avec un très faible inoculum alors qu'il faut un inoculum moyen pour provoquer une infection à *Salmonella* ;
- des moyens de défense de l'organisme, outre l'immunité générale, tels que l'âge, l'état nutritionnel... Ces moyens peuvent être :

- l'acidité gastrique auquel l'agent infectieux doit résister (l'infection est alors favorisée par une achlorhydie ou par la prise d'anti-acides) ;
- la motilité de l'intestin grêle qui joue un rôle de lavage et d'élimination des agents pathogènes ;
- la composition de flore de barrière ;
- l'immunité locale, notamment les IgA sécrétoires (Rabaud C., 2004). En effet, les enfants de moins de 5 ans sont plus vulnérables à ces infections, notamment après la période où ils sont protégés par les anticorps maternels. La fréquence de ces infections diminue par maturation du système immunitaire.

Tableau II : Principaux agents infectieux responsables de diarrhées aiguës (Carré D., 2004)

Bactéries	Virus	Parasites
Salmonella *Shigella* *Campylobacter* *Escherichia coli:* *- entéro-toxigénique (ETEC)* *-entéro-pathogènes (EPEC)* *-entéro-hémorragiques (EHEC)* *-entéro-invasifs (EIEC)* *Clostridium difficile* *Clostridium perfringens* *Staphylococcus aureus* *Bacillus cereus* *Vibrio Cholerae*	*Rotavirus* *Calicivirus* *- Norovirus* *- Sapovirus* *Adénovirus* *Astrovirus*	*Giardia intestinalis* *Entamoeba histolytica* *Strongyloïdes stercoralis* *Balantidium coli* *Schistosoma interacalatum* *Cryptosporidium*

On distingue différentes formes de diarrhées, selon le mode d'action des agents infectieux :

- les diarrhées dites "hydriques", de type sécrétoire. Elles sont caractérisées par une action des agents infectieux, principalement sur la partie proximale de l'intestin grêle et peuvent être causées par :

  - des bactéries telles que *Vibrio Cholerae, Escherichia coli entero-toxigénique, Staphyloccocus aureus...* Elles adhèrent à l'entérocyte, permettant l'action de leur toxine (Carré D., 2004) : celle-ci provoque une stimulation de l'adénylate cyclase de l'entérocyte d'où un accroissement de la production d'AMPc ou de GMPc ; cette augmentation d'AMPc ou de GMPc stimule la sécrétion d'ions chlore, sodium, et probablement bicarbonates, vers la lumière intestinale. Afin de maintenir la balance osmotique, il y a déplacement d'eau des cellules vers la lumière intestinale. Dans ce cas, la morphologie de la muqueuse reste normale (Rabaud C., 2004).
  - des agents viraux comme *Rotavirus, Calicivirus* et des parasites tels que *Cryptosporidium* ou *Giardia.* Ils infectent les entérocytes par invasion : les entérocytes sont détruits et sont peu à peu remplacés par des entérocytes immatures ayant une capacité d'absorption moindre, ce qui provoque cette diarrhée (Carré D., 2004).

Cette forme de diarrhée se manifeste par un "syndrome diarrhéique non inflammatoire" (tableau II) défini par une diarrhée aqueuse, de volume important (> 1L), dépourvue de sang, de pus et de douleurs abdominales sévères (Aranda-Michel J. *and* Giannella R-A., 1999).

- les diarrhées dites "invasives ". Les agents infectieux provoquent une réaction inflammatoire aigüe, au niveau de la partie distale de l'intestin grêle ou du côlon **:**

  - soit par invasion cellulaire avec destruction ; par exemple *EIEC, Shigella*
  - soit par le biais de toxines ; par exemple *Shigella, EHEC* avec la shigatoxine*, Clostridium difficile* avec les toxines A et B (Carré D., 2004)

On retrouve, alors, un "syndrome diarrhéique inflammatoire" (tableau III) caractérisé par des selles fréquentes, glairo-sanglantes, de faible volume et pouvant être accompagnées de ténesme (tension douloureuse, sensation de brûlure et envie constante d'aller à la selle) ou d'épreinte, de fièvre et de douleurs abdominales sévères : c'est le syndrome dysentérique (Aranda-Michel J. *and* Giannella R-A., 1999).

Tableau III : Types de diarrhées aiguës (Huicho L., 1995)

	Non inflammatoire	**Inflammatoire**
Mécanisme	Entérotoxines ou diminution de la capacité d'absorption	Invasion de la muqueuse ou cytotoxines induisant une réponse inflammatoire
Site	Partie proximale de l'intestin grêle	Partie distale de l'intestin grêle, colon
Diagnostic	Absence de leucocytes dans les selles	Présence de leucocytes dans les selles
Exemples	*Vibrio cholerae, ETEC, Norovirus, Giardia*	*Shigella, Entamoeba histolytica, Campylobacter*

- un mécanisme mixte comprenant un mécanisme entéro-invasif et un mécanisme toxinogène. Par exemple, les salmonelles (figure 3) se fixent aux entérocytes et/ou aux cellules M de la plaque de Peyer, traversent la cellule épithéliale digestive dans une vacuole d'endocytose (dans laquelle, elles se multiplient), vers la membrane latéro-basale, où la vacuole est expulsée. Il n'y a pas de destruction cellulaire. Les bactéries sont prises en charge par les cellules phagocytaires des follicules lymphoïdes et des ganglions mésentériques dans la *lamina propria*, ce qui crée une réaction inflammatoire locale.
Les salmonelles phagocytées et retenues dans la *lamina propria*, libèrent des entérotoxines responsables des symptômes de la gastro-entérite banale. Si elles n'étaient pas éliminées, elles seraient déversées, *via* le canal thoracique, dans la circulation sanguine et responsables d'un épisode septicémique (Leyral G. et Vierling E.,2007).

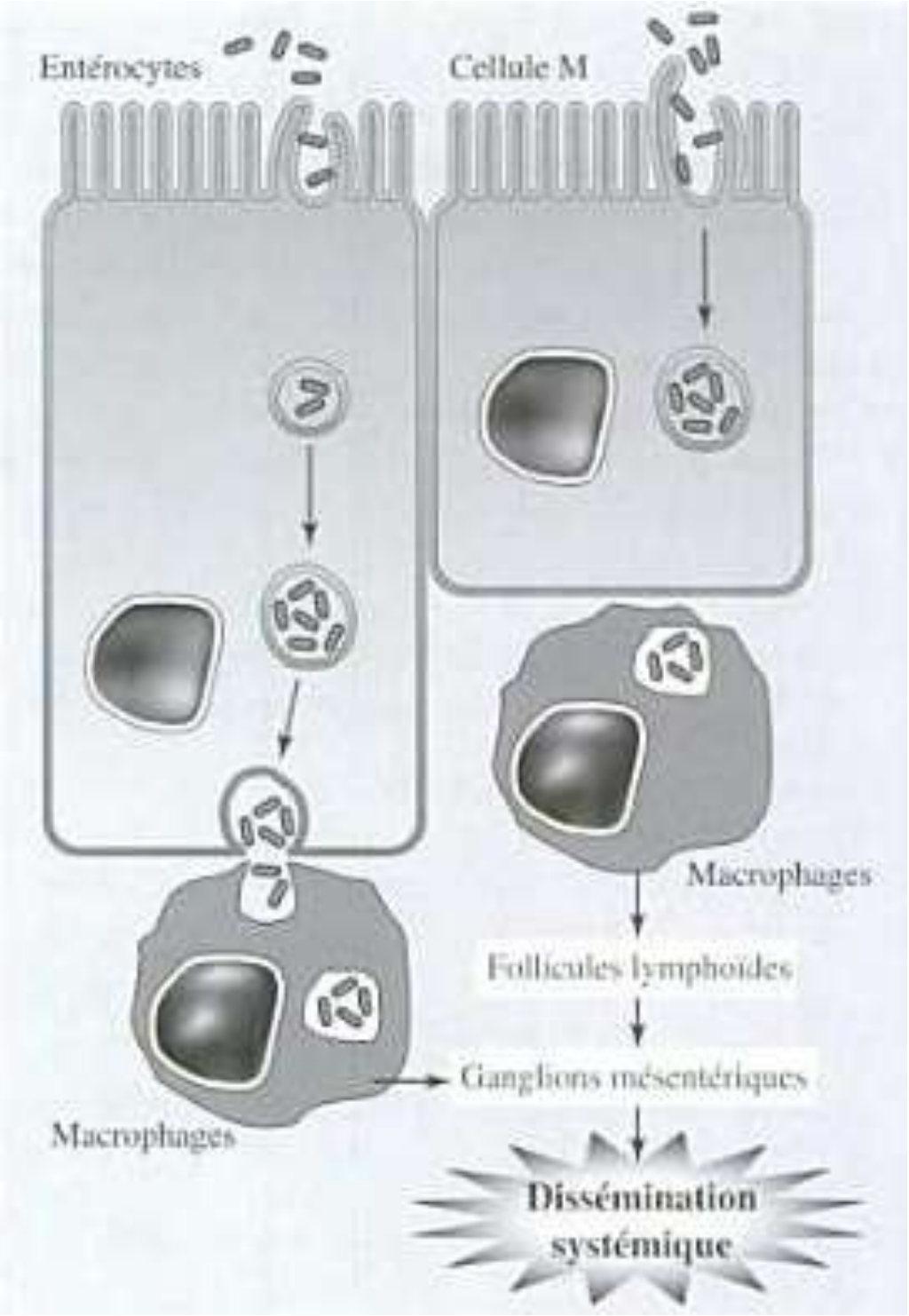


Figure 3 : Mécanisme physiopathologiques des diarrhées invasives à Salmonella (Leyral G. et Vierling E., 2007)

I.2.1 Agents responsables des principales diarrhées infectieuses bactériennes

I.2.1.1 Les diarrhées à *Salmonella*

Ce sont des bacilles Gram négatifs, non sporulés (Aumaitre H. et *al*, 2004). Ils sont considérés comme d'importants pathogènes pour l'homme et les animaux. Malgré les mesures prises en matière d'assainissement, d'approvisionnement en eau potable, de contrôle alimentaire, la transmission des salmonelles persiste, notamment dans les communautés. Celle-ci conduit à une importante morbidité dans les pays en cours de développement mais aussi dans les pays industrialisés, ainsi qu'à une mortalité élevée uniquement dans les pays pauvres. A l'échelle mondiale, 93 millions de gastro-entérites à salmonelles non typhiques sont recensées chaque année, conduisant à 155.000 décès (Sanchez-Vargas F-M. et *al*, 2011). Le genre *Salmonella*, comporte deux espèces, *Salmonella bongori* et *Salmonella enterica*. Cette dernière est divisée en 6 sous-espèces. La sous espèce *enterica* est responsable de la majorité (plus de 99%) des infections à salmonelles. Les salmonelles appartiennent à plus de 2500 sérotypes (Chena H-M. et *al*, 2013), ces derniers étant caractérisés à partir des antigènes spécifiques : Ag O (somatique, de composition lipolysaccharidique), Ag Vi (capsulaire), Ag H (flagellaire) (Aumaitre H. et *al,* 2004). Selon la symptomatologie qu'elles provoquent chez l'homme, les salmonelles sont plus couramment divisées en deux groupes : les salmonelles typhiques et les salmonelles non typhiques (Sanchez-Vargas F-M. et*al*, 2011)

- **les salmonelles non typhiques** : les deux principales espèces sont *Salmonella enteritidis et Salmonella typhimurium.* La principale infection provoquée par ces espèces est la gastroentérite (Chena H-M. et *al*, 2013), mais d'autres syndromes, de sévérité variable, peuvent être associés (Sanchez-Vargas F-M. et *al*, 2011).

La contamination est principalement d'origine alimentaire (œufs, volailles, viandes, produits laitiers, fruits de mer, eaux...) (Aumaitre H. et *al*, 2004).

Après une période d'incubation de 4 à 72 h, l'infection se manifeste brutalement par des nausées et des vomissements, des douleurs abdominales, une diarrhée pouvant être grossièrement sanglante. S'il y a présence de fièvre (accompagnée de frissons), elle disparaîtra spontanément dans les 72 h. L'évolution de la diarrhée est favorable en 3 à 7 jours. Une bactériémie apparaît chez 5% à 10% des patients infectés. Celle-ci peut évoluer, dans certains cas, vers une méningite ou des atteintes ostéo-articulaires.

La durée d'excrétion de la bactérie varie selon l'âge du patient. En général, les salmonelles sont excrétées dans les selles jusqu'à 5 semaines après l'infection, mais chez les jeunes enfants, cette durée peut être prolongée.

Quant aux patients immunodéprimés, ils présentent des formes prolongées et récurrentes de l'infection. Pour des personnes immunocompétentes, la dose infectieuse est d'environ 10^6 à 10^8 bactéries. Pour les nourrissons ou les personnes souffrant de pathologies sous-jacentes, la quantité de bactéries nécessaire pour causer l'infection est moindre, ce qui explique la possibilité de transmission interhumaine et la fréquence des infections à Salmonelles chez les moins de 2 ans.

Au niveau du traitement, l'antibiothérapie est réservée aux formes sévères (bactériémie, méningite, ostéomyélite) ou en cas de terrain à risque (nourrissons, immunodéprimés, pathologies sous-jacentes...). Le problème est l'émergence de souches multirésistantes de *Salmonella Typhymurium, Salmonella enteritidis* restant relativement sensibles aux antibiotiques et qui constituent une grave menace pour la santé publique. En effet, une augmentation des résistances aux antibiotiques traditionnels tels que l'ampicilline, le cotrimoxazole, le chloramphénicol a été observée, mais aussi l'émergence d'une résistance aux fluoroquinolones (médicament de choix pour le traitement des infections à salmonelles potentiellement mortelles causées par des souches multirésistantes chez les adultes) et l'émergence d'une résistance aux céphalosporines de 3ème génération. Des résistances aux carbapénèmes, utilisés en présence de souches résistantes à la ciprofloxacine et à la ceftriaxone, ont également été identifiées. En cas de bactériémie ou d'infections extra-intestinales dues aux salmonelles non typhoïdes, le traitement antibiotique dépendra de l'état clinique du patient et de la sensibilité de la souche. Cependant, des études récentes ont montré qu'un traitement de 3 à 5 jours de ceftriaxone, chez des patients souffrant de gastroentérites non compliquées à *Salmonella,* conduit à une guérison clinique rapide (Chena H-M. et *al*, 2013).

- **les salmonelles typhiques :** *Salmonella typhi et paratyphi.* Elles sont responsables de la fièvre typhoïde (Sanchez-Vargas F-M. et *al*, 2011).

I.2.1.2 Les diarrhées à *Shigella*

Ce sont des bacilles à Gram négatifs, intracellulaires, de la famille des Entérobactéries. Ces bactéries peuvent être responsables d'une diarrhée aqueuse aiguë puis d'un syndrome dysentérique.

Le genre *Shigella* est composé de 4 espèces principales, chacune d'entre elles étant divisée en sérotypes (selon la structure du lipopolysaccharide de la membrane externe de la bactérie) : *S. dysenteriae* (15 sérotypes), *S. flexneri* (6 sérotypes), *S. boydii* (18 serotypes) et *S. sonnei* (1 sérotype). Les espèces *S. dysenteriae* et *S. flexneri* sont retrouvées dans les zones aux ressources limitées (pauvreté, mauvaise hygiène...), contrairement à *S. sonnei* qui colonise les régions plus riches. Ainsi, *S. dysenteriae* est présent principalement en Inde, alors que

S. flexneri est retrouvé en Asie du sud-est, en Amérique latine et en Afrique. Dans certains pays tels que la Chine, la Thaïlande ou le Vietnam, ayant profité récemment d'améliorations socio-économiques, *S. sonnei* et *S. flexneri* sont recensés (tableau IV) (Zaidi M-B. et *al*, 2014)

Tableau IV : Exemples de distribution des sérogroupes de *Shigella* dans plusieurs pays (Nicolas X.,et *al,* 2007).

Pays	*S. flexneri* (%)	*S. sonnei* (%)	*S. boydii* (%)	*S. dysenteriae* (%)
Rwanda (1983-1993)	55.5	18.3	6.1	19
Argentine (1990-1997)	73			
Brésil (1994-2004)	52.7	44.2	2.3	0.6
Chili (1994-1998)	19	45		
Israël (1990-1996)	10.4	86	1.9	0.7
Chine (2002)	93	7	0	0
Bangladesh (2004)	54	10	16	20
Pakistan (2002-2003)	58	16	15	11
Inde : Calcuta (2001-2004)	60	23.8	5.7	9.8
Inde : Kolkata (1995-2000)	58	28	9	5
Indonésie (2001-2003)	72	23	3	2
Etats-Unis (1982-2002)	18.4	71.7	1.6	0.7
France (2001-2003)	30.8	58.2	4.8	3

Malgré une baisse importante de la mortalité au cours de ces 50 dernières années, la shigellose reste considérable au niveau mondial. En effet, une étude prospective cas-témoins en Afrique et en Asie a montré que *Shigella* était responsable, respectivement, de 17%, 66% et 78% des formes modérées à sévères de dysenterie chez des nourrissons, des jeunes enfants et des enfants. De plus, elle a été recensée parmi les quatre principaux agents infectieux responsables de diarrhées modérées à sévères.

Ce sont des bactéries strictement humaines qui se transmettent par contact direct avec une personne infectée, par des aliments ou de l'eau contaminés. La dose infectieuse est faible, de 10 à 100 bactéries.

Son mode d'action associe l'entéro-invasion et la sécrétion de toxines. En effet, la bactérie possède un plasmide de virulence qui porte des gènes permettant l'invasion des cellules épithéliales. La bactérie traverse la cellule épithéliale (cellule M) jusqu'au tissu lymphoïde associé. Elle s'échappe de la vacuole phagocytaire en provoquant l'apoptose du macrophage. La bactérie est ainsi libérée au niveau de la face basale de l'épithélium. *Shigella* envahit les cellules épithéliales du côté basolatéral et se propage dans les cellules voisines. Les cellules hôtes libèrent des signaux pro-inflammatoires qui activent davantage la réponse immunitaire déjà initiée : l'infection est alors aggravée et il y a une destruction des tissus. L'infection est résolue par les neutrophiles qui phagocytent et tuent *Shigella* (figure 4). De plus, *Shigella* peut produire une ou plusieurs toxines, notamment la shigatoxine (par *Shigella dysenteriae*) responsable des manifestations les plus graves de la shigellose. Au niveau des manifestations cliniques, celles-ci sont très variables, allant d'une simple diarrhée aqueuse, sans fièvre à une dysenterie sévère, avec une fièvre élevée et des complications systémiques (Zaidi M-B. et *al*, 2014).

La période d'incubation est de 1 à 4 jours. Une fièvre apparaît dans un premier temps, très vite accompagnée de douleurs abdominales, de nausées, de vomissements et d'une asthénie. Après cette phase "atténuée" peut survenir le syndrome dysentérique typique caractérisé par des émissions de selles afécales, glairo-sanglantes, muco-purulentes ou parfois hémorragiques et des faux besoins. Des épreintes et un ténesme rectal peuvent être associés, ainsi que des vomissements. La fièvre est alors élevée, l'anorexie importante d'où une altération de l'état général. La guérison spontanée survient après 7 à 14 jours, mais il y a un risque de diarrhée persistante. Les complications digestives sont possibles : un mégacôlon toxique avec risque de perforation digestive et péritonite, une appendicite et un prolapsus rectal chez l'enfant. La bactériémie est rare sauf prédispositions particulières : immunodépression, dénutrition... (Nicolas X.et *al,* 2007). Un syndrome hémolytique et urémique (SHU) survient, généralement une semaine après le début de la diarrhée, dans environ 8 à 13% des cas d'infections par *S. dysenteriae* (avec un taux de mortalité de 36%). Il est caractérisé par la triade anémie hémolytique, thrombopénie et insuffisance rénale. D'autres complications sont rares : hypovolémie, hyponatrémie, encéphalopathie, infection urinaire, rhabdomyolyse, complications cardiaques, complications oculaires, complications neurologiques, complications rhumatologiques…

Quant au traitement, les personnes à risques nécessiteront l'administration d'un antibiotique (personnes âgées, jeunes enfants, patients immunodéprimés…). L'infection à *Shigella* peut être traitée avec de l'ampicilline ou du cotrimoxazole (si la bactérie est sensible).

Malheureusement, de nombreuses résistances émergent. Les souches deviennent résistantes à ces molécules, mais également aux tétracyclines, fluoroquinolones et céphalosporines de troisième génération, selon les régions du monde. L'OMS recommande la ciprofloxacine, la ceftriaxone et le pivmecillinam pour le traitement des souches mutlirésistantes. L'azithromycine peut être une alternative thérapeutique, bien que son utilisation ait provoqué des résistances (Zaidi M-B. et *al*, 2014).

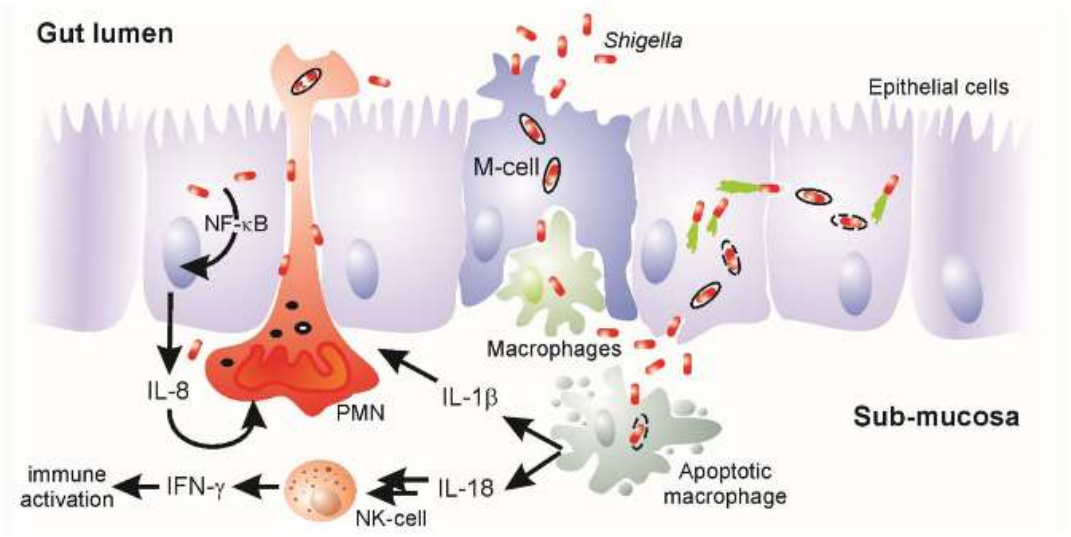
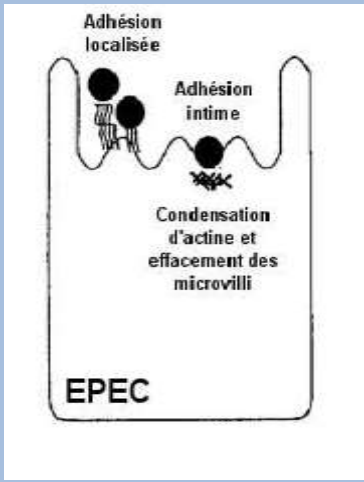
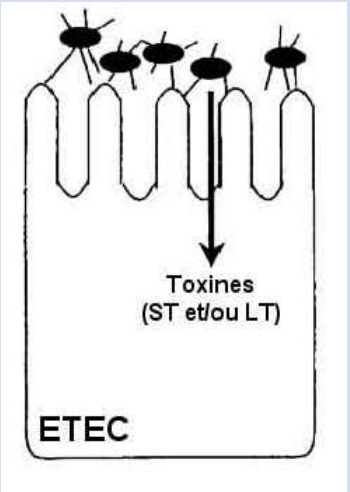


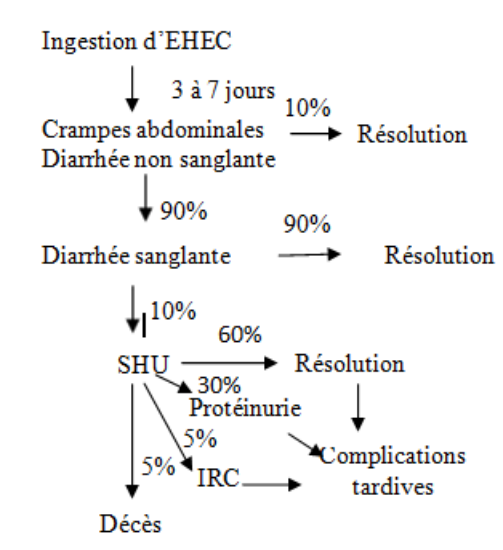
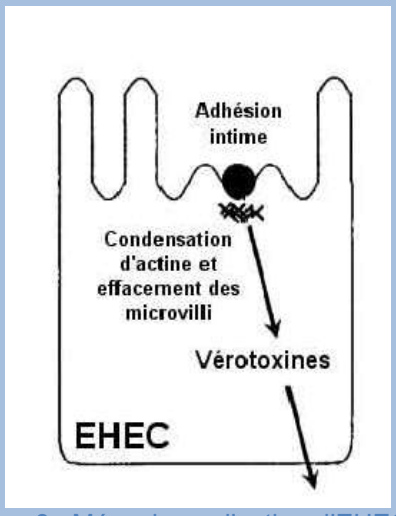
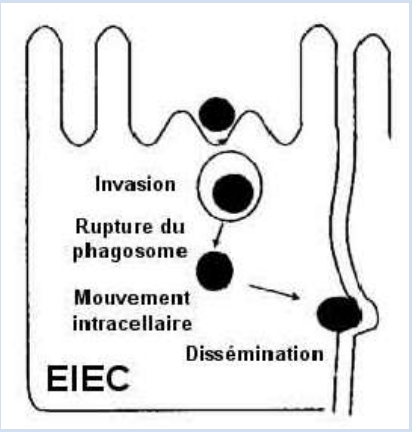
Figure 4 : Mécanisme d'action de *Shigella* (Zaidi M-B. et *al*, 2014)

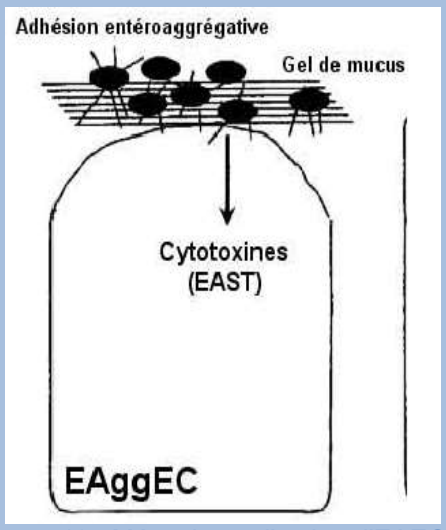
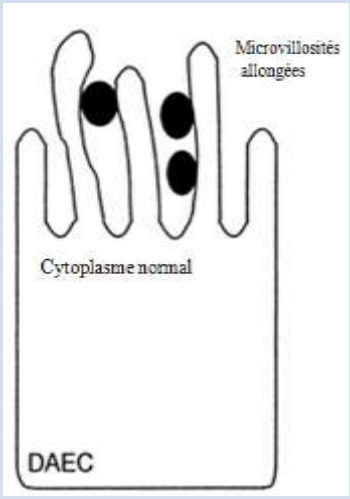
I.2.1.3 Les diarrhées à *Escherichia coli*

Les *Escherichia coli* sont des bacilles Gram négatifs, de la famille des Entérobactéries. Ces bactéries font partie de la flore commensale de l'homme et des animaux à sang chaud, mais peuvent également être pathogènes et responsables d'entérites. Les différentes souches d'*E. coli* sont divisées en sérogroupes, définis par l'antigène de paroi lipopolysaccharide « O » Au sein d'un même sérogroupe, le sérotype est déterminé par l'identification du flagelle de nature protéique « H » et éventuellement de l'antigène capsulaire polysaccharidique « K ». De plus, toutes les souches d'*E. coli* ont été classées en pathovars, selon leur interaction avec l'hôte et les signes cliniques qu'elles provoquent : les *E. coli* entéropathogènes (EPEC), les *E. coli* entérotoxinogènes (ETEC), les *E. coli* entérohémorragiques (EHEC), les *E. coli* entéroinvasifs (EIEC), les *E. coli* entéroaggrégatifs (EAEC) et les *E. coli* à adhésion diffuse (DAEC) (tableau V) (Gouali M. et Weill F-X., 2013).

Tableau V : Affections associées aux différents pathovars d'*Escherichia coli* (d'après Gouali M. et Weill F-X., 2013)

Pathovars	Affections associées	Caractéristiques des souches
EPEC	Diarrhée aqueuse aiguë ou persistante (Gouali M. et Weill F-X., 2013)	Adhésion localisée Adhésion « intime » aux entérocytes Destruction des microvillosités (lésion d'attachement-effacement), Présence du locus d'effacement des entérocytes Pas de caractère invasif Pas de production de toxines (Gouali M. et Weill F-X., 2013) (figure 5).  Figure 5 : Mécanisme d'action d'EPEC (Nataro J-P. et Kaper J-B., 1998)
ETEC	Diarrhée aqueuse aiguë (Gouali M. et Weill F-X., 2013), crampes abdominales. L'infection à EPEC est la principale cause de « Turista ». La contamination se fait par l'ingestion d'eau ou d'aliments souillés (notamment les crudités et fruits) (Aumaitre H. *et al*, 2004).	Adhésion aux entérocytes grâce à des pili spécifiques Production d'entérotoxines thermostables (ST) et thermolabiles (LT) (Gouali M. et Weill F-X., 2013) (figure 6)  Figure 6 : Mécanisme d'action d'ETEC (Nataro J-P. et Kaper J-B., 1998)

EHEC	Diarrhée aqueuse aiguë Colite hémorragique Syndrome hémolytique et urémique, Purpura thrombotique et thrombocytopénique) (figure 7)  Figure 7 : Résumé de la clinique d'une infection à EHEC (Gouali M. et Weill F-X., 2013) La contamination se fait par la consommation de viande bovine crue ou insuffisamment cuite, mais aussi *via* d'autres aliments tels que les produits laitiers non pasteurisés, jus de fruits non pasteurisés, légumes crus, graines germées… La transmission est également interhumaine ou par le contact avec des animaux, notamment les bovins (Gouali M. et Weill F-X., 2013).	Production de shiga toxines ou vérotoxines Lésions d'attachement-effacement sur les entérocytes et présence du locus d'effacement des entérocytes Plasmide de virulence (figure 8).  Figure 8 : Mécanisme d'action d'EHEC (Nataro J-P. et Kaper J-B., 1998)
EIEC	Diarrhée aqueuse Syndrome dysentérique	Génétiquement très proche de *Shigella* Plasmide de virulence Invasion et prolifération dans les cellules épithéliales (Gouali M. et Weill F-X., 2013) (figure 9)  Figure 9 : Mécanisme d'action d'EIEC (Nataro J-P. et Kaper J-B., 1998)

EAEC	Diarrhée persistante	Adhésion typique en briques « empilées » sur les cellules Facteurs de virulence : adhésines, toxines et facteurs entéro-aggrégants (Gouali M. et Weill F-X., 2013) (figure 10)  Figure 10 : Mécanisme d'action d'EAEC (Nataro J-P. et Kaper J-B., 1998)
DAEC	Diarrhée aqueuse aiguë	Adhésion diffuse sur les cellules Production d'adhésines afimbriales Pas de production d'entérotoxines ou de shigatoxines(Gouali M. et Weill F-X., 2013) (figure 11)  Figure 11 : Mécanisme d'action de DAEC (Nataro J-P. et Kaper J-B., 1998)

I.2.1.4 Les diarrhées à *Vibrio cholerae*

Selon l'OMS, 160.000 cas de choléra sont déclarés chaque année, avec en moyenne 4000 décès. L'Afrique (notamment l'Afrique subsaharienne) présente la majorité des cas, même si l'épidémiologie des infections à *Vibrio Cholerae* a été modifiée suite au séisme à Haïti en 2010. En effet, les mauvaises conditions d'hygiène, la pauvreté, le manque d'installations sanitaires et de logements, l'entassement de la population, l'accès à l'eau potable non maîtrisé, les moyens de prévention limités, l'arrivée de la pluie ont été à l'origine de l'épidémie et de son expansion (figure 12) (Thefenne H. et Garnotel E., 2013).

Vibrio cholerae est un bacille Gram négatif incurvé. Il vit dans un environnement hydrique, dont la croissance dépend de la température, du pH, du taux de salinité et de nutriments (son optimum est une température à 35°C, un pH basique et un taux de salinité de 0,5 à 2,5%). Le choléra est alors transmis essentiellement par les eaux de boisson, mais également *via* les aliments mal préparés. La transmission interhumaine semble moins importante.

Du fait de la grande sensibilité de la bactérie à l'acidité gastrique, la dose infectieuse est importante, de l'ordre de 10^8 à 10^{11} bactéries. Au niveau de la physiopathologie (figure 13), la bactérie se fixe sur les entérocytes (au niveau de l'intestin grêle), et sécrète une cytotoxine (CT) responsable du syndrome cholériforme. Cette dernière (la sous-unité A) active l'adénylcyclase, qui elle-même induit une augmentation de la production d'adénosine monophosphate cyclique (AMPc), ce qui provoque l'activation de la protéine kinase A (PKA). La PKA active le canal chlore ayant pour conséquence une perte massive d'électrolytes et d'eau.

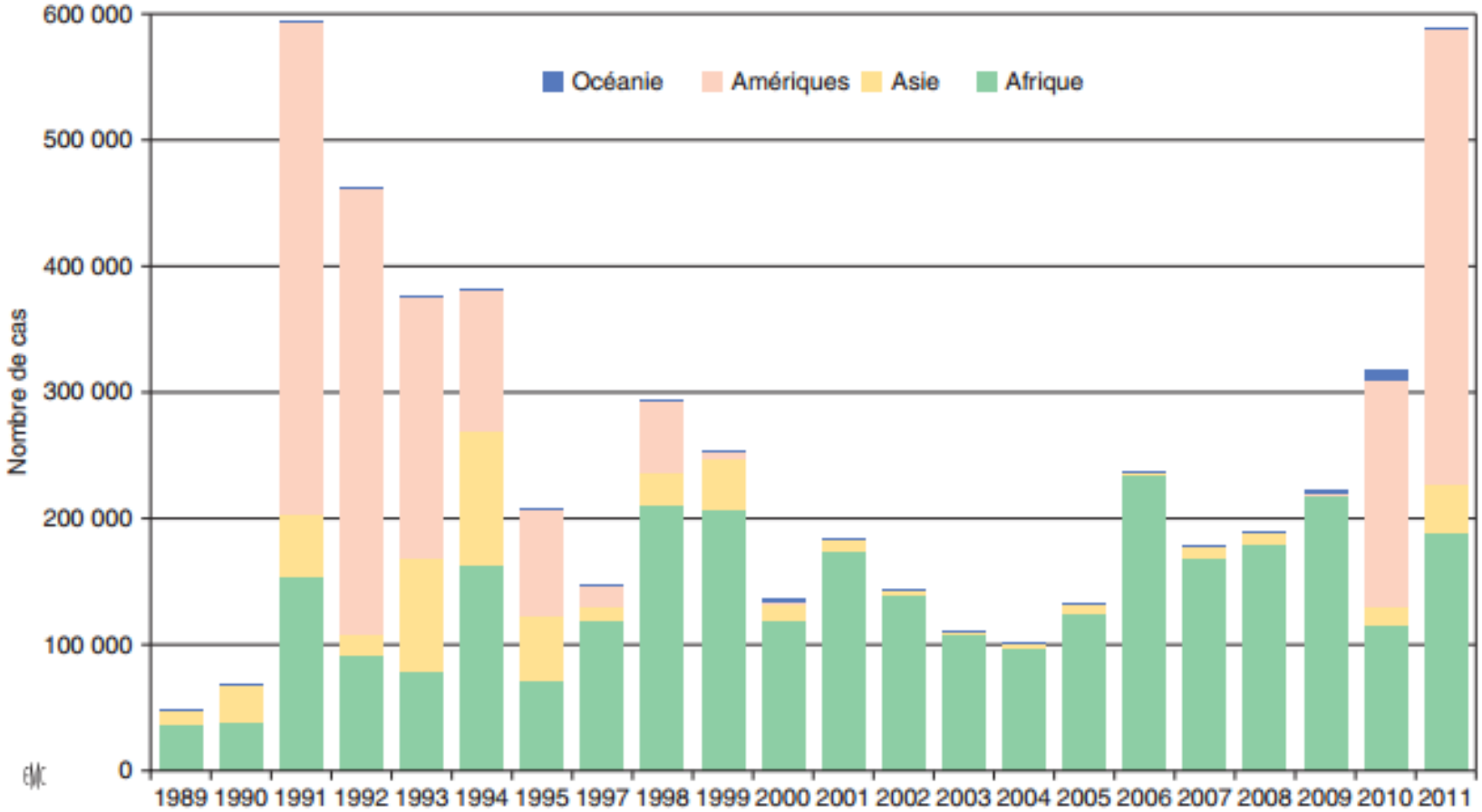


Figure 12 : Répartition du nombre de cas de choléra entre 1989 et 2011 (Thefenne H. et Garnotel E., 2013)

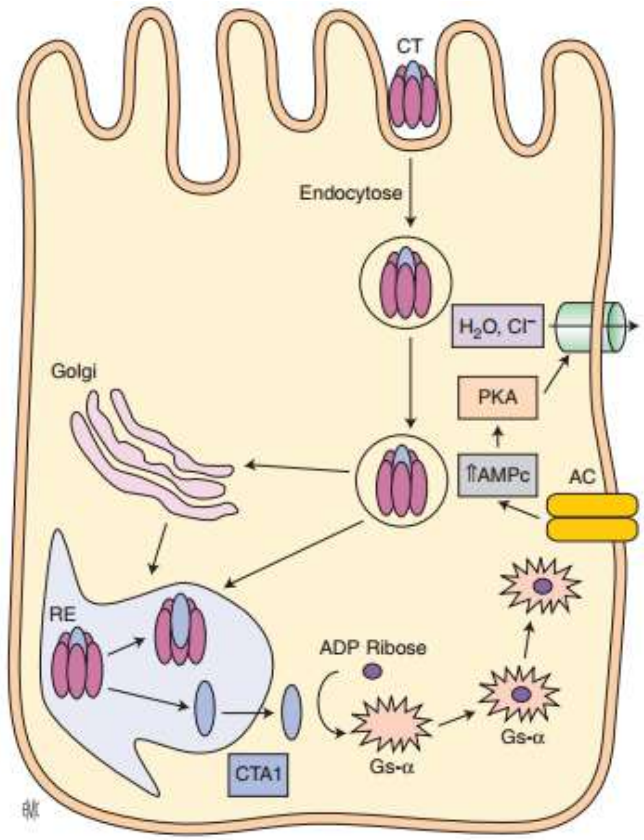


Figure 13 : Mode d'action de la toxine cholérique (CT) (Thefenne H. et Garnotel E., 2013).

La période d'incubation de la maladie est de quelques heures à 5 jours, puis l'infection se manifeste brutalement par une diarrhée liquide profuse (jusqu'à 5 voire 10 litres par jour), à l'aspect « eau de riz », Ainsi, il y un risque de déshydratation, d'hypokaliémie, d'hypoglycémie et d'acidose métabolique.

L'essentiel du traitement est la réhydratation, jusqu'à l'arrêt de la diarrhée. Le traitement antibiotique est préconisé seulement en cas de déshydratation grave afin de réduire la durée de la diarrhée. Les antibiotiques doivent être administrés lorsque le patient est réhydraté et que les vomissements ont cessé ; ceux recommandés par l'OMS sont la doxycycline, le cotrimoxazole, l'érythromycine, le choramphénicol. La ciprofloxacine et la norfloxacine sont également efficaces. Du fait de l'augmentation des résistances aux antibiotiques, un antibiogramme doit être réalisé. Les anti-diarrhéiques, les antiémétiques et les antispasmodiques ne doivent pas être utilisés. Concernant la prévention, les principes de la lutte contre le choléra restent l'accès à l'eau potable, l'amélioration de l'assainissement et les mesures d'hygiène générale (lavage de mains, désinfection à l'eau de javel) (Thefenne H. et Garnotel E., 2013).

I.2.1.5 Les diarrhées à *Yersinia enterocolitica*

C'est un bacille Gram négatif de la famille des Entérobactéries. *Yersinia enterocolitica* est subdivisée en 5 biotypes (1A/1B, 2, 3, 4, 5) et plus de 70 biosérotypes. Elle est responsable de la troisième zoonose d'origine alimentaire, la plus fréquemment rencontrée dans les pays européens (Gupta V. et *al*, 2014).

Elle est transmise *via* la voie oro-fécale, à partir d'un réservoir animal (porcs, bovins, caprins).

Elle a la capacité de croître à faible température (4°C), dans les réfrigérateurs.

Cliniquement, l'infection se traduit par des diarrhées, des douleurs abdominales, de la fièvre et parfois des vomissements. Des prédispositions telles que la surcharge en fer (le fer jouant un rôle important dans la multiplication de la bactérie), la cirrhose, le diabète, l'immunodépression, peuvent entraîner une septicémie (Savin C. et Carniel E., 2008). Des symptômes plus invasifs tels, l'iléite terminale et/ou la lymphadénite mésentérique aiguë simulant une appendicite, peuvent être présents. Les principales complications post-infectieuses sont un érythème noueux, des arthrites réactionnelles et/ou une glomérulonéphrite (Gupta V. et *al*, 2014).

L'administration d'antibiotiques n'est pas sysématique : seules les formes prolongées, les formes sévères avec complications, ou les formes survenant sur terrains particuliers sont concernées. *Yersinia enterocolitica* est sensible aux céphalosporines de troisième génération, aux fluoroquinolones (ciprofloxacine), au sulfamethoxazole, à la gentamicine et aux pénèmes (Savin C. et Carniel E., 2008).

I.2.1.6 Les diarrhées à *Campylobacter*

Ce sont des bactéries à Gram négatif, incurvées ou spiralées, mobiles et non sporulées qui appartiennent au genre *Campylobacter*. Il existe 16 espèces de *Campylobacter*. Les principales espèces pathogènes sont *Campylobacter jejuni* et *Campylobacter coli*, qui sont thermo-tolérants, ainsi que *Campylobacter fetus*. La campylobactériose est une zoonose.

Le réservoir principal des *Campylobacter* est le tube digestif des volailles.

La transmission est ainsi principalement alimentaire, par ingestion de volailles (dans 2/3 des cas sporadiques). L'ingestion d'eau contaminée, de viandes bovines insuffisamment cuites, de lait non pasteurisé sont également des sources de contamination, ainsi que la contamination interhumaine qui est aussi possible.

Après un délai d'incubation de trois à quatre jours, l'infection se manifeste par une diarrhée inflammatoire, avec parfois une présence de sang dans les selles, des douleurs abdominales accompagnées de fièvre modérée, de céphalées, d'une anorexie et d'une asthénie. Ces symptômes sont spontanément résolutifs après une semaine. Les complications locales et régionales sont exceptionnelles : colite pseudomembraneuse, mégacôlon toxique, appendicite, péritonite, cholécystite, voire hépatite et pancréatite. Les complications systémiques sont davantage rencontrées avec les infections à *Campylobacter fetus*, notamment chez les personnes souffrant de maladies sous-jacentes telles que le diabète, le cancer, la cirrhose… Les localisations secondaires concernent l'endothélium, l'os, l'articulation, les méninges… *Campylobacter jejuni* peut également être à l'origine de rares complications post-infectieuses telles qu'un syndrome de Guillain-Barré, un érythème noueux, une arthrite réactionnelle, un urticaire.

Au niveau thérapeutique, le traitement de la déshydratation, notamment chez le nourrisson et la personne âgée, est primordiale. Concernant l'antibiothérapie, elle n'est pas systématique mais entraîne une éradication de la bactérie et diminue le portage. Elle est surtout utilisée chez les patients immunodéprimés, aux âges extrêmes de la vie, ayant un terrain particulier… L'antibiotique de 1ère intention est un macrolide (azithromycine, clarithromycine ou autre) pendant 5 jours. L'alternative peut être une fluoroquinolone ou l'amoxicilline (avec ou sans l'acide clavulanique) voire la doxycycline (Megraud F. et *al*, 2013).

I.2.2 Agents responsables des principales diarrhées infectieuses parasitaires

De nombreux parasites, cosmopolites ou tropicaux, sont responsables d'une faible proportion de diarrhées aiguës (fébriles ou non) (tableau VI), alors qu'ils sont à l'origine d'une part plus importante de diarrhées prolongées (Bourée P.et Bisaro F., 2007).

Tableau VI : Etiologie des principales diarrhées parasitaires (Bourée P. et Bisaro F., 2007)

Symptômes	Cause
Diarrhée aiguë avec fièvre	Paludisme (primo-infection) Trichinellose
Diarrhée aiguë sans fièvre	Amibiase (dysenterie) Bilharziose
Diarrhée chronique sans fièvre	Amibiase Giardiose Balantidiose Helminthiases

I.2.2.1 Les diarrhées à *Plasmodium*

Le paludisme peut être causé par quatre espèces de *Plasmodium : Plasmodium falciparum, Plasmodium vivax, Plasmodium ovale, Plasmodium malariae*. Il est transmis, en zone d'endémie, par une piqûre d'insecte : l'anophèle femelle. En cas de primo-invasion, il est à l'origine d'accès fébriles typiques, alternant trois phases : frissons, chaleurs, sueurs, mais également d'épisodes diarrhéiques. Lors de voyages dans des zones à risques, il est nécessaire de respecter les mesures de protection contre les moustiques (moustiquaires, insectifuges) et de recourir à une chimioprophylaxie (prise de médicaments antipaludéens à titre préventif) (Bourée P. et Bisaro F., 2007).

I.2.2.2 Les diarrhées à *Trichinella*

Ces parasites appartiennent à la classe des Nématodes.. La trichinellose est transmise à l'homme par l'ingestion de viande insuffisamment cuite, notamment la viande de porc, sanglier ou cheval, en Europe. Les symptômes retrouvés dans cette infection sont dans un premier temps (de J0 à J15) : de la fièvre, des troubles digestifs tels que des nausées, des vomissements, des douleurs abdominales et des diarrhées. Après J15, une altération de l'état général, des myalgies, un œdème de la face, des manifestations de type allergique sont observés. La prévention repose sur la cuisson suffisante des viandes et sur un contrôle sanitaire des viandes à l'abattoir. C'est une maladie à déclaration obligatoire (Santé Gouv., 2009).

I.2.2.3 Les diarrhées à *Entamoeba histolytica*

L'amibiase intestinale est transmise par ingestion d'eau ou de crudités souillées par des kystes d'amibes. Ces amibes se multiplient tout d'abord dans le tube digestif, sans aucune conséquence : c'est le cycle "non pathogène", le parasite étant sous la forme végétative *minuta*. A l'occasion d'une altération de l'état général, le cycle devient pathogène (forme *histolytica*) (Bourrée P.et Bisaro F., 2007). Les amibes grossissent, deviennent hématophages, attaquent la muqueuse intestinale et provoquent un abcès en "bouton de chemise" dans la paroi de l'intestin. Ceci induit un syndrome dysentérique caractérisé par des douleurs abdominales, des épreintes, un ténesme, une diarrhée aiguë glairo-sanglante, mais non fébrile. La complication principale, surtout chez l'enfant est une colite nécrosante avec péritonite. En l'absence de traitement, le parasite peut migrer vers le foie et/ou vers le poumon où il forme un abcès (Bourée P., 2014). La prévention repose sur l'hygiène alimentaire (Bourrée P. et Bisaro F., 2007).

I.2.2.4 Les diarrhées à *Schistosoma*

Ces parasites sont regroupés dans la famille des Trématodes et provoquent des bilharzioses intestinales. En Afrique noire, en Amérique du Sud et au Moyen-Orient, elles sont dues à *Schistosoma mansoni*. En Afrique centrale, *Schistosoma intercalatum ou Schistosoma guineensis* sont responsables de ces infections. En Asie, deux espèces sont présentes : *Schistosoma japonicum* et *Schisostoma mekongi.* La contamination chez l'homme se fait par voie cutanée lors de baignades dans des bassins d'eau douce infestée. Ensuite le parasite gagne la circulation sanguine pour arriver dans les vaisseaux hépatiques où a lieu la fécondation. Les femelles se dirigent vers les vaisseaux de l'intestin pour pondre leurs œufs (se retrouvant dans les selles du patient infesté). Ainsi, les symptômes sont des troubles digestifs non spécifiques (Bourée P., 2014).

I.2.2.5 Les diarrhées à *Giardia intestinalis*

La giardiase est due à l'ingestion de kystes de *Giardia intestinalis*, protozoaire intestinal flagellé, présent dans l'eau et les crudités. Cette parasitose provoque des épigastralgies pseudo-ulcéreuses et une diarrhée abondante, jaunâtre, sans glaires ni sang.

Elle peut également provoquer une malnutrition avec un retard de croissance chez l'enfant (Bourée P., 2014). La prévention est également basée sur une hygiène alimentaire (Bourrée P.et Bisaro F., 2007).

Il existe d'autres protozoaires flagellés tels que *Cryptosporidium* et *Microsporidium* responsables de diarrhées importantes, notamment chez les personnes immunodéprimées (Bourée P., 2014) (elles sont d'autant plus sévères que l'immunodépression est profonde) (Bourrée P. et Bisaro F., 2007) et les voyageurs (Bourée P., 2014).

I.2.2.6 Les diarrhées à *Balantidium coli*

Cette protozoose survient dans les zones rurales (Bourrée P.et Bisaro F., 2007), notamment en Amérique centrale et en Amérique du sud (Bourée P., 2014) où l'hygiène est précaire (Bourrée P. et Bisaro F., 2007). Ce protozoaire est fréquent chez les porcs. La transmission se fait par l'ingestion d'eau et de saucisses crues infestées par des kystes de ce parasite. Elle se manifeste par une diarrhée chronique et parfois un syndrome dysentérique.

Un autre protozoaire intestinal tropical, présent en Nouvelle Guinée et appelé *Cyclospora cayetanensis* provoque également une diarrhée abondante, accompagnée de douleurs abdominales, de nausées et d'un amaigrissement, surtout chez les patients immunodéprimés. La contamination se fait par l'ingestion d'aliments souillés (Bourée P., 2014).

I.2.2.7 Les autres helminthes

Les cestodes (*Taenia solium, Taenia saginata*) provoquent des troubles digestifs types anorexie (ou boulimie) et douleurs abdominales accompagnés de signes généraux (asthénie, céphalées, insomnie, vertiges, hyperexcitabilité).

Les nématodes tels que les oxyures, les ascaris et les trichocéphales contaminent l'homme par ingestion de crudités. Ils provoquent des troubles digestifs non spécifiques. Les anguillules, qui infestent l'homme par voie transcutanée, provoquent également des troubles digestifs et risquent de diffuser dans tout l'organisme chez les patients immunodéprimés.

Les douves du foie, de la famille des trématodes sont, eux aussi, responsables de troubles digestifs (Bourée P., 2014).

I.2.3 Agents responsables des principales diarrhées infectieuses virales

Même si les étiologies de gastro-entérites aiguës sont très variées, les étiologies virales restent prédominantes (figure 14) (Bertholom C., 2013).

Les virus dits « classiques », principaux responsables de GEA sont les Rotavirus, les Calicivirus, les Astrovirus, les Adénovirus, les Sapovirus (Bertholom C., 2013) mais une émergence de nouveaux virus est actuellement constatée (Coronavirus, Aichi virus, Salivirus, Cosavirus, Parechovirus) (figure 15) (Bertholom C., 2014b).

Les principaux d'entre eux vont être présentés, à l'exception du Norovirus qui fera l'objet d'une étude ultérieure.

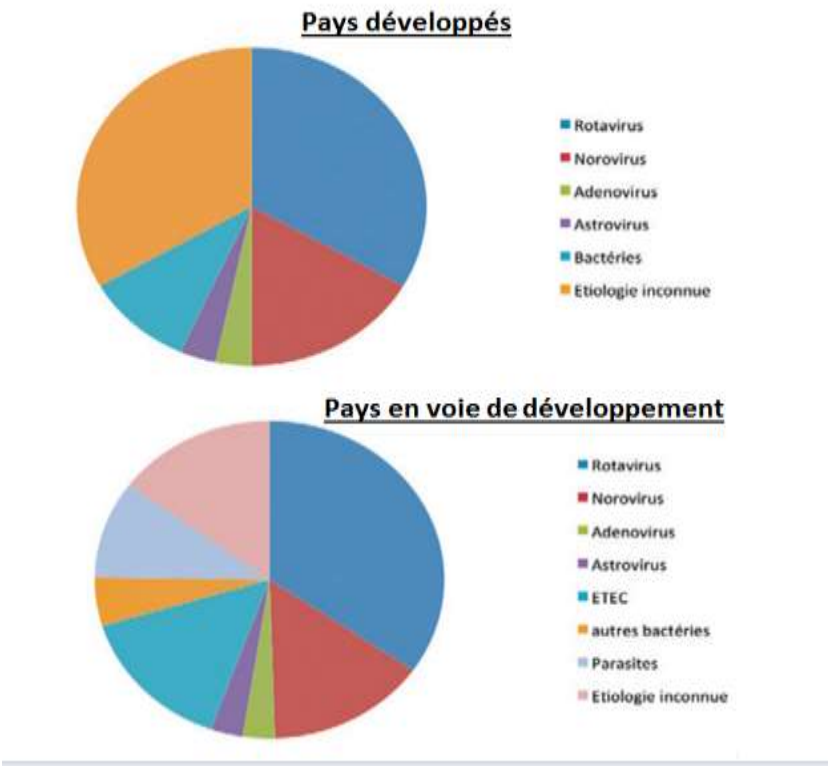


Figure 14 : Etiologies des gastroentérites aigües (Bertholom C., 2014b).

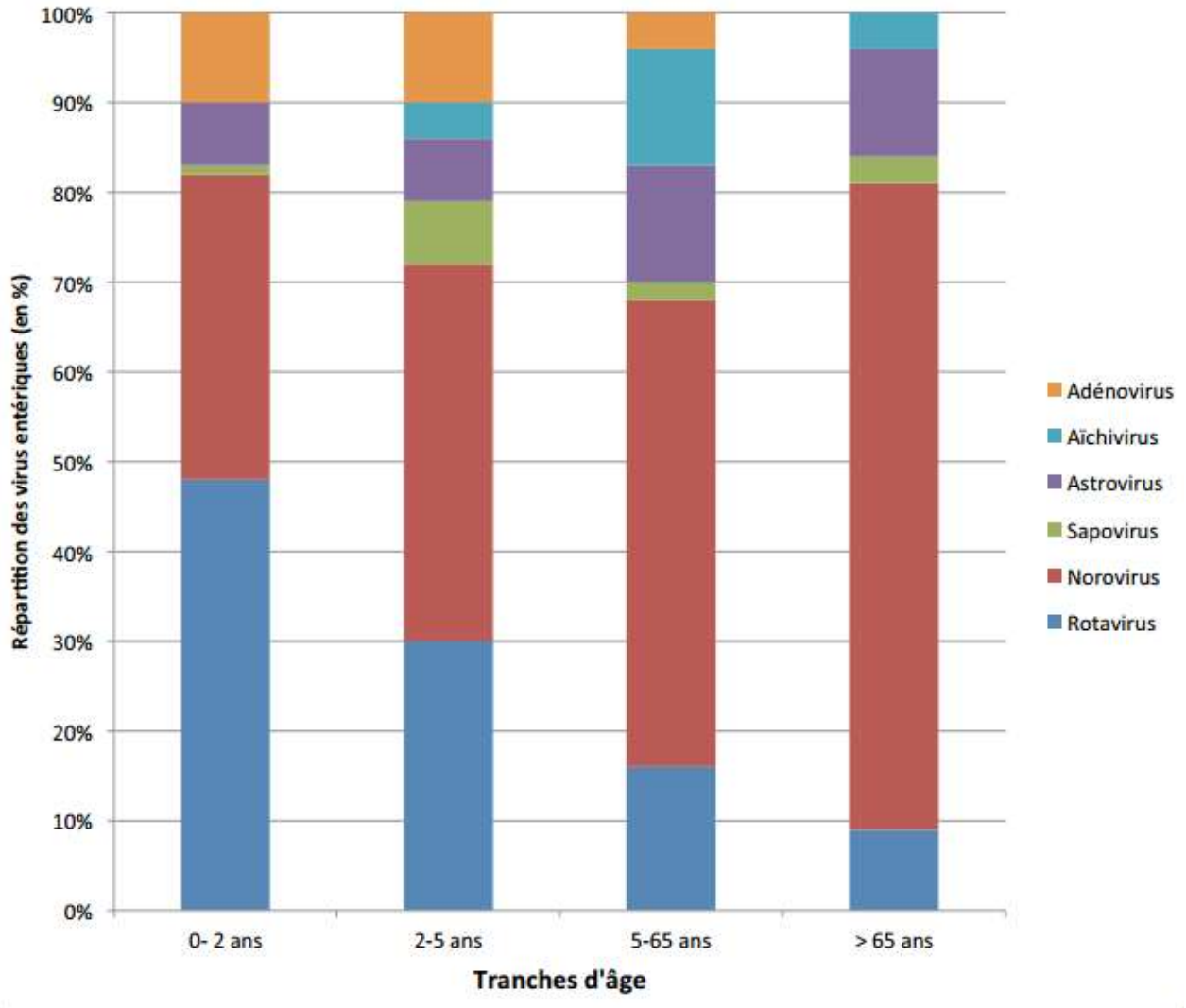


Figure 15 : Etiologies virales des GEA par tranches d'âges (Bertholom C., 2013).

I.2.3.1 Les diarrhées à Rotavirus

Ce sont des virus non enveloppés à ARN double brin, segmenté, avec un aspect en rayon de roue d'où leur nom. Leur capside icosaédrique possède 3 couches :

- la couche externe est constituée par la protéine VP7 et surmontée de spicules (protéines VP4)

- la couche intermédiaire est formée par la protéine VP6

- la couche interne (le core) est constituée par la protéine VP2 et interagit avec l'ARN.

Les protéines VP1 et VP3 sont associées au génome et possèdent une activité enzymatique nécessaire à l'infectiosité du virus. Il existe 7 groupes distincts de Rotavirus (A à G), définis par le déterminant antigénique de VP6. Seuls les groupes A, B et C infectent l'homme ; le groupe A étant le principal responsable d'épidémies de GEA chez les enfants de moins de 5 ans. Au sein de chaque groupe, les Rotavirus sont classés en sérotypes, définis selon les protéines VP4 (sérotype P) et VP7 (sérotype G) (figure 16) (De Rougemont A. et Pothier P., 2010)

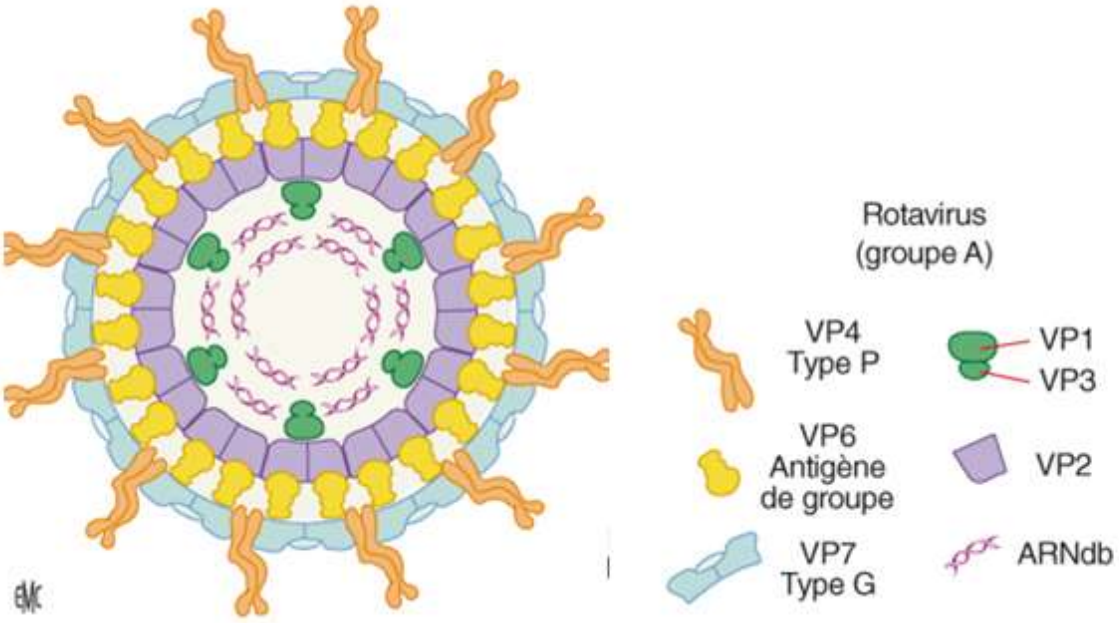
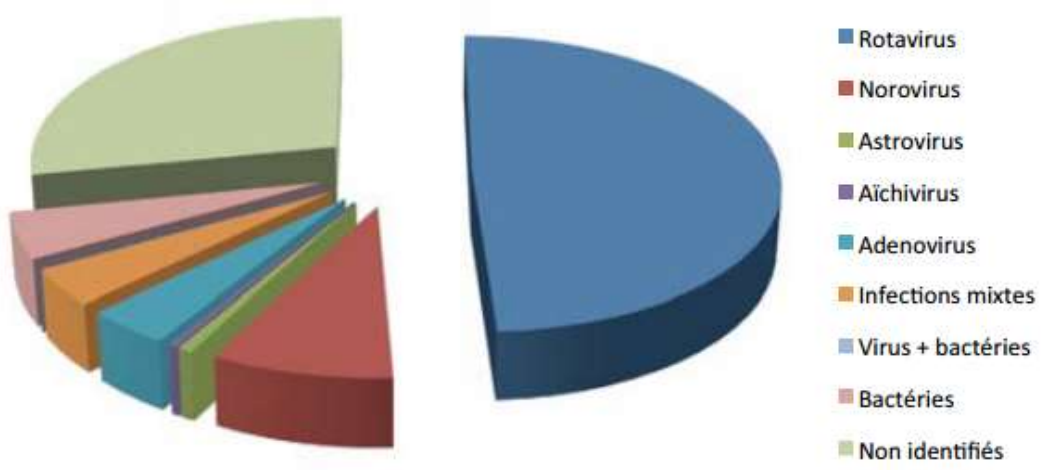


Figure 16 : Structure des Rotavirus (De Rougemont A. et Pothier P., 2010)

Le Rotavirus est l'agent pathogène le plus fréquemment responsable de diarrhées nécessitant une hospitalisation chez les nourrissons et les jeunes enfants, notamment lors des deux premières années de vie (figure 17) (Gagneur A. et *al*, 2011).



Rotavirus 49 % – Norovirus 8,5 % – Adénovirus 4 % – Astrovirus 0,7 % – Aïchivirus 0,4 % – Saövirus 0,2 % – Infection mixte 4 % – Bactéries 5 % – Virus + bactéries ? – Non identifiés 28 %

Figure 17 : Etiologies des GEA chez les enfants de moins de 5 ans hospitalisés (Bertholom C., 2013).

Dans les pays européens, ce virus provoque environ 3,6 millions d'épisodes diarrhéiques, dont un peu plus de 200 décès, 87.000 hospitalisations et 700.000 consultations médicales (hors hôpital) (Gagneur A.et *al*, 2011). Les infections à Rotavirus sont observées au cours d'épidémies saisonnières hivernales avec un pic de janvier à mars, notamment dans les collectivités (crèches, service de pédiatrie...). Chez les enfants plus âgés et les adultes, l'infection est souvent asymptomatique, due à l'importante immunité acquise lors de l'enfance. Néanmoins leur ré-infestation est assez commune et ils constituent un vecteur de transmission du virus. La transmission est oro-fécale, soit directement par manuportage, soit par les surfaces ou les objets souillés. La période d'incubation est d'environ 48h, les premiers symptômes apparaissent 1 à 4 jours après la contamination. L'expression clinique varie selon l'âge mais aussi selon l'état d'immunité du patient (expositions antérieures). Chez les nourrissons et jeunes enfants, l'infection est d'apparition brutale, caractérisée par une diarrhée aqueuse et des vomissements pouvant précéder la diarrhée, accompagnés de douleurs abdominales et une fièvre modérée (< 38°C). L'infection cède normalement en 5 à 7 jours, alors que l'excrétion du virus dans les selles peut persister encore 8 à 10 jours après la disparition des symptômes (De Rougemont A. et Pothier P., 2010).

Au niveau de la prévention, la vaccination est considérée comme la stratégie préventive la plus efficace contre les infections à Rotavirus ; elle réduit "le poids" de la maladie (Gagneur A. et *al,* 2011). Il existe deux vaccins oraux contre le Rotavirus (AMM depuis 2006) dont les caractéristiques différentielles sont présentées dans le tableau VII : RotaTeq® et Rotarix®.

Tableau VII : Composition en substances actives des vaccins anti-rotavirus par dose (INPES, 2012a).

	Rotarix®	RotaTeq®
Composition	Rotavirus humain, souche RIX4414 appartenant au sérotype G1 et au génotype P8	Rotavirus réassortants humain bovin produits sur cellules Vero contenant les sérotypes G1, G2, G3 G4 et P1A(8)
Forme pharmaceutique	Poudre et solvant pour solution buvable	Solution buvable
Posologie	2 doses : - la 1ère dose peut être administrée dès l'âge de 6 semaines - l'intervalle entre les 2 doses doit être de 4 semaines - les 2 doses doivent être préférentiellement administrées avant l'âge de 16 semaines, et les prises doivent être terminées avant l'âge de 24 semaines	3 doses : - la 1ère dose peut être administrée dès de l'âge de 6 semaines et au plus tard à l'âge de 12 semaines - l'intervalle entre les doses doit être au moins de 4 semaines - il est préférable que les 3 doses soient administrées avant l'âge de 20-22 semaines - les 3 doses doivent être administrées avant l'âge de 26 semaines
Conservation	A conserver entre +2 et +8 °C	

Le traitement est principalement la réhydratation, notamment par des solutés de réhydratation oraux chez les nourrissons et les jeunes enfants (INPES, 2012a).

I.2.3.2 Les diarrhées à Astrovirus

Les Astrovirus humains sont de petits virus, non enveloppés, à ARN simple brin (+) (Bosch A. et *al*, 2014). Ils présentent une structure caractéristique en étoile (Phan T-G. et *al*, 2014). Les Astrovirus humains classiques (ou mamastrovirus 1) contiennent huit sérotypes et sont responsables de moins de 5% des GEA chez l'homme (Bertholom C., 2014b).

L'infection est spontanément résolutive sauf chez les patients immunodéprimés, chez lesquels le virus peut provoquer des infections graves (Bosch A. et *al*, 2014).

De nouveaux clades d'Astrovirus, dus à des recombinaisons inter-génotypiques de souches d'origine animale, émergent actuellement (Bertholom C., 2014b) :

- la souche prototype MLB1, caractérisée en 2008 est appelée mamastrovirus 6 ;
- les souches VA2 et HMO-A qui ont été signalées en 2009 sont appelées mamastrovirus 8 ;
- les souches VA1, VA3, HMO-B et HMO-C qui ont également été décrites en 2009 sont appelées mamastrovirus 9 (Phan T-G. et *al*, 2014).

Ces nouveaux clades seraient responsables de 25 % des épidémies à Astrovirus (Bertholom C., 2014b).

I.2.3.3 Les diarrhées à Adenovirus 40 et 41

Les Adénovirus sont des virus à ADN double brin, à capside icosaédrique, de 70 à 100 nm et appartenant à la famille des *Adenoviridae.* Il existe 63 sérotypes d'adénovirus humains, classés en 6 sous-groupes (A à F), selon des propriétés structurales et biologiques distinctes. Parmi tous ces sérotypes, les types 40 et 41 (sous-groupe F) et plus rarement le sérotype 52 (le seul du groupe G) induisent des gastro-entérites. Les Adénovirus sont la 3ème cause de gastroentérite infantile après les Rotavirus et les Norovirus. Ils sont responsables de 5 à 15% des gastro-entérites nécessitant une hospitalisation.
La contamination est oro-fécale (manuportée) et la durée d'incubation, plus longue que celle observée lors des infections à Rotavirus et Calicivirus, est de 8 à 10 jours. Au niveau de la clinique, la diarrhée est le symptôme majeur et persiste 1 à 2 semaines. Elle est accompagnée d'une fièvre (pendant 48h à 72h), de vomissements et parfois de signes respiratoires. L'excrétion du virus dure 10 à 14 jours (voire plus chez les patients immunodéprimés). Le virus, étant très résistant dans le milieu extérieur, il se transmet facilement entre les individus : le respect des règles d'hygiène tels que le port de gants pour le personnel soignant et le lavage des mains doit être respecté (Feghoul L. et Le Goff J., 2012).

I.2.3.4 Les diarrhées à Sapovirus

Ce sont des virus à ARN simple brin (Wang G. et *al*, 2014) de la famille des *Caliciviridae* (Hall A-J. et *al*, 2013) (comme le Norovirus). Ils regroupent 7 génogroupes, mais les groupes GI et GII sont principalement responsables de gastroentérites aiguës. L'incidence des GEA à Sapovirus est estimée à 2 à 10% (Bertholom C., 2014b). L'infection touche les individus de tout âge. La transmission est principalement directe, par contact de personnes à personnes, mais le virus se transmet également *via* les aliments, l'eau ou les surfaces contaminées (Hall A-J. et *al*, 2013). Pour ces virus, il n'a pas été démontré de fixation aux antigènes des groupes sanguins (Bertholom C., 2014b).

I.2.3.5 Autres virus

- les virus Aïchi, du genre Kobuvirus, de la famille des *Picornaviridae* comprennent 3 génotypes (A à C) dont la répartition est mondiale. Ils sont responsables de moins de 5% des GEA. Ces dernières sont liées à la consommation de coquillages souillés par ces virus.

- Les Cosavirus, également de la famille des *Picornaviridae*, comprennent 6 espèces (A à F) et plus de 30 sérotypes/génotypes. Ils ont été retrouvés dans les eaux usées aux Etats-Unis et à Paris et seraient responsables de GEA.

- Les Salivirus, proche des Kobuvirus, de la famille des *Picornaviridae* seraient retrouvés dans 4 à 9% des selles diarrhéiques.

- Les Parechovirus, de la famille des *Picornaviridae* comprennent 16 génotypes dont 8 seraient responsables de GEA (notamment HPeV-1 et HPeV-3). Ces infections sont fréquentes chez les enfants de moins de 2 ans. Les atteintes méningées et respiratoires sont souvent associées à la diarrhée. Un important portage asymptomatique est également observé pour ces virus. Il y a un pic d'infection de l'été à la fin de l'hiver.

- Les Coronavirus, notamment les souches NL63, OC43, 229E sont responsables de GEA, mais fréquemment en association avec les Rotavirus et les Norovirus (Bertholom C., 2014b).

II. Aspects cliniques et épidémiologiques des infections à Norovirus

II.1 Caractéristiques cliniques des gastro-entérites à Norovirus

Les GEA à Norovirus touchent l'ensemble de la population avec des pics d'infection entre 3 mois et 5 ans et après 65 ans (Delacour H. et *al*, 2010). La symptomatologie des infections à Norovirus apparaissant après une courte période d'incubation, de 12 à 48h, est caractérisée par des vomissements souvent en jets incontrôlables et d'une diarrhée aqueuse, accompagnés de nausées, de crampes et douleurs abdominales, de fièvre, de frissons, de myalgies et de céphalées. Environ 30% des personnes infectées restent asymptomatiques. Les symptômes varient selon l'âge et l'état d'immunité du patient (InVS, 2014).

II.1.1 L'infection chez les patients immunocompétents

Chez les personnes immunocompétentes, les GEA à Norovirus sont de courtes durées (de 24 à 48h) et présentent un pic saisonnier en hiver (décembre-janvier) (Bok K. *and* Green K-Y., 2012). L'infection est généralement modérée, mais on observe des formes cliniques plus sévères aux âges extrêmes de la vie (tableau VIII) (Delacour H.et *al,* 2010).

II.1.1.1 Chez les enfants

Dans ce cas, les vomissements et la fièvre prédominent (Delacour H.et *al*, 2010). Les vomissements sont fréquents (jusqu'à 94% des cas). Par rapport aux infections à Rotavirus, les vomissements répétés (4 ou plus par jour) sont plus fréquents et les GEA à Norovirus sont moins sévères (d'où moins d'hospitalisations) (Lorrot M. et *al,* 2008). Les complications sont rares chez les enfants en bonne santé, bien que certaines, extradigestives, aient été décrites récemment notamment des convulsions.

Un cas a été décrit dans une étude publiée en 2010 à Parme en Italie : un nourrisson de 14 mois, en parfaite santé, a présenté des crises convulsives tonico-cloniques peu de temps après un épisode de gastro-entérite à Norovirus. Des examens tels que l'IRM, le scanner et l'EEG n'ont rien montré d'anormal. La culture bactérienne et l'examen par microscopie électronique du LCR ont également donné des résultats négatifs, tout comme la PCR et la RT-PCR (recherche des virus neurotropes) sur le LCR et le plasma. Les selles, soumises à la microscopie électronique ainsi qu'à la culture cellulaire ont donné des résultats négatifs. Néanmoins, le Norovirus a été retrouvé dans les selles et dans le plasma par la technique RT-PCR ciblant le gène de la NoV polymérase. Le séquençage des souches issues de ces deux prélèvements (selles et plasma) sont 100% identiques, ce qui a permis de montrer que le virus présent au niveau de l'intestin a envahi la circulation sanguine, le génotype impliqué étant le GII.4 (Medici MC. *et al,* 2010). Une autre étude publiée en 2011, concernant des enfants de 1 mois à 6 ans qui présentent un épisode de gastro-entérite aiguë et admis à l'hôpital de Hong Kong a permis de montrer qu'une infection intestinale à Norovirus présente un plus haut risque de développer une crise convulsive afébrile (8,67%) par rapport à une infection à Rotavirus (1,29%). Il s'agit d'une crise tonico-clonique de moins de 5 minutes apparaissant en moyenne 2,94 jours après le début des symptômes gastro-intestinaux. Dans environ 78% des cas, il y a une récurrence de la crise dans les 24h, mais le pronostic est excellent. Aucun recours à des soins intensifs pédiatriques n'a été rapporté et aucune autre crise n'a été décrite après ce désordre. Un traitement anticonvulsivant prophylactique n'est donc pas nécessaire (Chan C-M V. et *al*, 2010).

II.1.1.2 Chez les adultes

Chez l'adolescent et l'adulte, la diarrhée prédomine devant les vomissements et les nausées, la fièvre étant moins marquée (Delacour H. et *al,* 2010). Dans ce type de population, le Norovirus pourrait également causer des complications neurologiques comme le démontre ce cas d'encéphalopathie liée au Norovirus (détection de Norovirus dans les selles par RT-PCR) publié en 2010. Une femme âgée de 60 ans souffre des fortes céphalées, un comportement anormal, une apathie, une aphasie et des troubles de la marche après avoir présenté de faibles douleurs abdominales et de la fièvre. On observe un léger signal anormal à l'IRM (au niveau du cortex) ainsi qu'une augmentation des globules blancs au niveau du LCR (pléiocytose). Les cliniciens reconnaissent que l'infection à Norovirus peut potentiellement causer des encéphalopathies (même chez les adultes) qui cèdent rapidement aux corticoïdes (méthylprednisolone) (Kimura E. et *al*, 2010).

II.1.1.3 Chez les sujets âgés

Chez les personnes âgées, des formes cliniques plus sévères ont été observées, liées à la sensibilité accrue à la déshydratation. Par exemple, lors des épidémies de gastroentérites à Norovirus en Angleterre entre 1992 et 2000, des taux de létalité de 7,5 pour 10 000 cas ont été rapportés. La cause de ces décès, observés surtout chez les personnes âgées (et chez les personnes fragilisées) est le choc hypovolémique lié à la déshydratation (Delacour H. et *al*, 2010).

II.1.2 L'infection chez les patients immunodéprimés

Des formes prolongées de l'infection à Norovirus ont été rapportées chez les patients immunodéprimés (déficit immunitaire congénital, immunosuppresseurs, chimiothérapie, infection à VIH) (tableau VIII) (Kundig F. et *al*, 2013). Ces personnes peuvent être exposées au virus *via* plusieurs sources : les membres de la famille, le personnel soignant, l'alimentation, l'environnement. Ainsi, 18% des patients greffés par des cellules souches hématopoïétiques (CSH) et traités pendant 1 an par des immunosuppresseurs sont infectés cliniquement par le Norovirus. Il en est de même pour 17% de patients transplantés rénaux. Dans l'un et l'autre des cas, les patients présentent des diarrhées intermittentes. Chez ces patients, la dose infectieuse est de moins de 20 particules virales. L'infection à Norovirus devient chronique et peut persister des semaines et même des années. Des études concernant des enfants cancéreux traités par des chimiothérapies et des patients greffés (par des CSH) traités par des immunosuppresseurs ont montré que l'incidence de la maladie ne varie pas tout au long de l'année chez ces patients contrairement aux personnes immunocompétentes (présence d'un pic hivernal toutefois) (Bok K. *and* Green K-Y., 2012).

Tableau VIII : Comparaison des caractéristiques de l'infection à Norovirus entre les patients immunocompétents et les patients immunodéprimés (Kundig F. et *al*, 2013)

Caractéristiques	Patients immunocompétents	Patients immunodéprimés
Prévalence	Cause prédominante de GEA dans le monde	Indéterminée précisément, environ 20%
Période d'incidence	Pic en hiver	Tout au long de l'année
Manifestations cliniques	Début brusque, durée de 1 à 3 jours	Début brusque, durée peut être longue
Excrétion virale	20 à 40 jours	Semaines à années
Complications	Déshydratation	Déshydratation, malnutrition, dysfonction de la barrière intestinale, autres complications
Traitement	Infection habituellement spontanément limitée ; réhydratation	Pas de traitement viral spécifique : traitement symptomatique
Pronostic	Bon, le plus souvent mais peut être létale	Variable, excellent à très mauvais, évolution fréquente en infection chronique

II.1.2.1 Cas d'une infection à Norovirus chez des enfants ayant subi une transplantation de CSH

Une étude portant sur 12 patients transplantés, âgés de 6 mois à 22 ans, a montré que ces patients souffraient de diarrhées persistantes (en moyenne, depuis 3 jours). Elles ont été quelques fois associées à des nausées et des vomissements. Des complications telles qu'une hypotension, un choc hypovolémique, une entéropathie avec perte de protéines, une pneumatose intestinale (c'est-à-dire des bulles de gaz dans la paroi du tube digestif) ont été observées dans 75% des cas, avec nécessité d'une prise en charge en soins intensifs dans 1/3 des cas. Le Norovirus a été détecté dans les selles de tous les patients par PCR. Chez la majorité de ces patients, l'excrétion virale a duré plus de 3 mois, néanmoins l'un d'entre eux a présenté une excrétion virale intermittente. Ces patients ont souffert d'une perte de poids significative nécessitant une nutrition parentérale (Ozdemir N.et *al,* 2012).

II.1.2.2 Cas d'une infection à Norovirus chez un patient séropositif à VIH

Un patient immunodéprimé de 36 ans, infecté par le VIH et peu compliant à son traitement anti-rétroviral a présenté une infection chronique à Norovirus. Elle s'est manifestée par une diarrhée aqueuse, profuse, allant jusqu'à 20 selles par jour, qui durait depuis plus de 6 mois. Elle était associée à des coliques abdominales, des vomissements occasionnels ainsi qu'à une perte de poids. Son taux de CD4 était faible et sa charge virale était élevée. Un Norovirus de génotype GII.4 a été détecté dans ses selles par RT-PCR. Lors d'une reprise d'un traitement anti-rétroviral adéquat, la charge virale s'est effondrée, le taux de CD4 s'est légèrement amélioré. Ainsi, les selles du patient ont commencé à être à nouveau moulées (après 16 mois de diarrhée chronique) et une prise de poids a été observée. La recherche du Norovirus dans les selles du patient se révélait alors négative (Wingfield T. *et al*, 2010).

II.1.2.3 Cas de patients ayant subi une transplantation rénale

Un patient de 8 ans, transplanté rénal depuis trois ans et traité par du tacrolimus et du mycophénolate mofétil, présente de la fièvre, des douleurs abdominales, des vomissements et une diarrhée aqueuse (débutée 24h plus tôt). Il présente une faible déshydratation. La numération de formule sanguine (NFS) montre une agranulocytose (absence de neutrophiles). Le Norovirus est retrouvé dans les selles du patient, par RT PCR. Les immunosuppresseurs ne peuvent être responsables de cette agranulocytose car le taux de neutrophiles est correct depuis trois ans, et la dernière NFS, datant de 3 jours avant l'infection aiguë, normale. En absence d'autres étiologies probantes, l'infection à Norovirus semble être responsable de cette agranulocyotse (Chehade H. *et al* 2012).

L'infection à Norovirus chez les transplantés rénaux, traités par immunosuppresseurs, est caractérisée par une importante perte de poids et une longue durée (9 mois). La déshydratation, la malnutrition et l'altération de la muqueuse intestinale associées à cette diarrhée prolongée augmentent la morbidité : un décès a été rapporté 49 jours après le début des symptômes ; un autre, après un an de gastro-entérite non résolue (Bok K. and Green K-Y., 2012).

II.1.2.4 Cas d'un patient souffrant d'une leucémie lymphoïde chronique (LLC)

Un patient de 62 ans, souffrant d'une LLC est traité par alemtuzumab présente une diarrhée chronique à Norovirus. Malgré différentes stratégies thérapeutiques, y compris une adaptation du traitement immunosuppresseur et l'administration d'immunoglobulines, la diarrhée n'a pas cessé et a duré plus de douze semaines, avec une excrétion virale prolongée (Ronchetti A-M. et *al*, 2014).

II.1.3 Les infections à Norovirus chez les nouveau-nés prématurés

Une épidémie à Norovirus a été décrite dans une unité néonatale de soins intensifs ; elle a ainsi permis de mettre en évidence une grande variété de signes cliniques lors d'une infection chez les prématurés. L'étude de la symptomatologie chez onze d'entre eux infectés par le virus, sur une période de deux mois, a montré que la clinique typique des infections à Norovirus (diarrhée, vomissements, nausées, douleurs abdominales, malaise, fièvre) est retrouvée en partie seulement, et que l'on retrouve surtout d'autres symptômes tels que abdomen distendu, apnée, reflux gastrique, signes de septicémie...
Les données sont rapportées dans le tableau IX (Armbrust S. et *al*, 2009).

Tableau IX : Principaux symptômes rencontrés lors d'une infection à Norovirus chez les prématurés (Armbrust S. et *al*, 2009)

	Cas 1	Cas 2	Cas 3	Cas 4	Cas 5	Cas 5	Cas 6	Cas 7 (1)	Cas 7 (2)	Cas 7 (3)	Cas 8
Insuffisance respiratoire	X								X		
Apnée	X	X		X					X		
Oxygénothérapie	X	X		X					X		
Signes de septicémie	X	X									
Anémie	X	X									
Thrombopénie		X									
Tachycardie		X									
Reflux gastrique			X						X	X	X
Abdomen distendu		X	X		X	X	X	X		X	
Colites		X							X		
Vomissements			X		X			X			
Infections sévères récurrentes				X							
Sang dans les selles						X			X	X	
Sang dans le liquide gastrique											X
Peau colorée										X	
Décès									X		
Preuve de la présence du virus											
Dans les selles	X	X	X	X	X	?	X	X	?		X
Dans les aspirations trachéales	X	X									

Cas 7 : Triplés (1) (2) (3)

II.2 Epidémiologie du Norovirus

Dans les pays développés, les Norovirus constituent la première cause de gastroentérites communautaires dans le monde ; ils touchent l'ensemble de la population, toutes classes d'âges confondues, avec un pic d'infection entre 3 mois et 5 ans et après 65 ans. Ces infections sont présentes à bas bruit toute l'année avec un pic entre décembre et janvier. Ces virus sont moins fréquemment impliqués que les Rotavirus dans des infections nécessitant une hospitalisation. En France, le nombre de consultations est estimé à plus de 500.000 annuellement. (Delacour H. *et al,* 2010). Aux Etats-Unis, les Norovirus provoquent 21 millions de cas de gastroentérites, dont plus de 70.000 hospitalisations et près de 800 décès.

Dans les pays en développement, 1.000.000 d'infections dont 200.000 décès sont recensés chaque année chez les enfants de moins de 5 ans (Hall A-J., 2012).

Les premières études épidémiologiques sous estimaient le rôle des Norovirus dans les épidémies de gastro-entérites. Actuellement, grâce aux techniques de biologie moléculaire, il a pu être montré que plus de 90% des épidémies de gastro-entérites non bactériennes survenant dans les collectivités aux Etats-Unis sont dues au Norovirus. Il en est de même en Europe où les Norovirus provoquent 80% des épidémies dans les collectivités, notamment dans les institutions accueillant les personnes âgées, les hôpitaux, les crèches, les écoles ainsi que dans les camps de vacances, les hôtels, les armées…

Ces épidémies sont favorisées par la grande diversité des modes de transmission du virus (figure 18) (Delacour H. et *al,* 2010) :

- de personnes à personnes selon le mode féco-oral, soit de façon directe (transmission interhumaine), soit indirecte (par l'intermédiaire de surfaces contaminées) ;

- par des aérosols formés lors des vomissements, là aussi, de façon directe ou indirecte (ils peuvent souiller les surfaces comme les sols, tapis, téléphones, poignées de porte…) ;

- par les voies alimentaires et hydriques: les coquillages sont souvent incriminés, en particulier les huîtres (Kohli E.et *al*, 2005). Longtemps, les coquillages ont été considérés comme des "filtres" concentrant les virions. Si ce mécanisme est exact pour de nombreux agents pathogènes, une étude publiée en 2013 a montré qu'il existe un autre mécanisme permettant l'accumulation des Norovirus dans les huitres (surtout pour les souches GI). L'huitre peut sélectionner un agent pathogène humain *via* des ligands partagés avec l'homme; ces ligands favoriseraient la bioaccumulation (type antigène A-like) ou contriburaient à la destruction du virus (type acide sialique) (Le Guyader F-S.et *al*, 2013).

  De nombreux aliments contaminés ont également été mis en cause : salades, sandwichs, fruits et légumes frais ou congelés, pâtisseries... La contamination de ces aliments peut être d'origine hydrique ou due à leur manipulation par du personnel infecté. Elle peut être suivie d'une propagation de la maladie de personnes à personnes par transmission secondaire (Kohli E.et *al*, 2005).

Cette transmission est facilitée par diverses caractéristiques de l'infection virale, telles que l'excrétion de quantités importantes de virus (environ 10^5 - 10^{11} virions/g de selles) (Hall A-J., 2012), une dose infectante faible (18 à 1000 particules virales) (InVS, 2014), la présence de porteurs asymptomatiques et la possibilité de transmettre l'infection par un patient durant les phases présymptomatiques, l'excrétion pouvant durer plus de 3 semaines (Kohli E. et *al*, 2005).

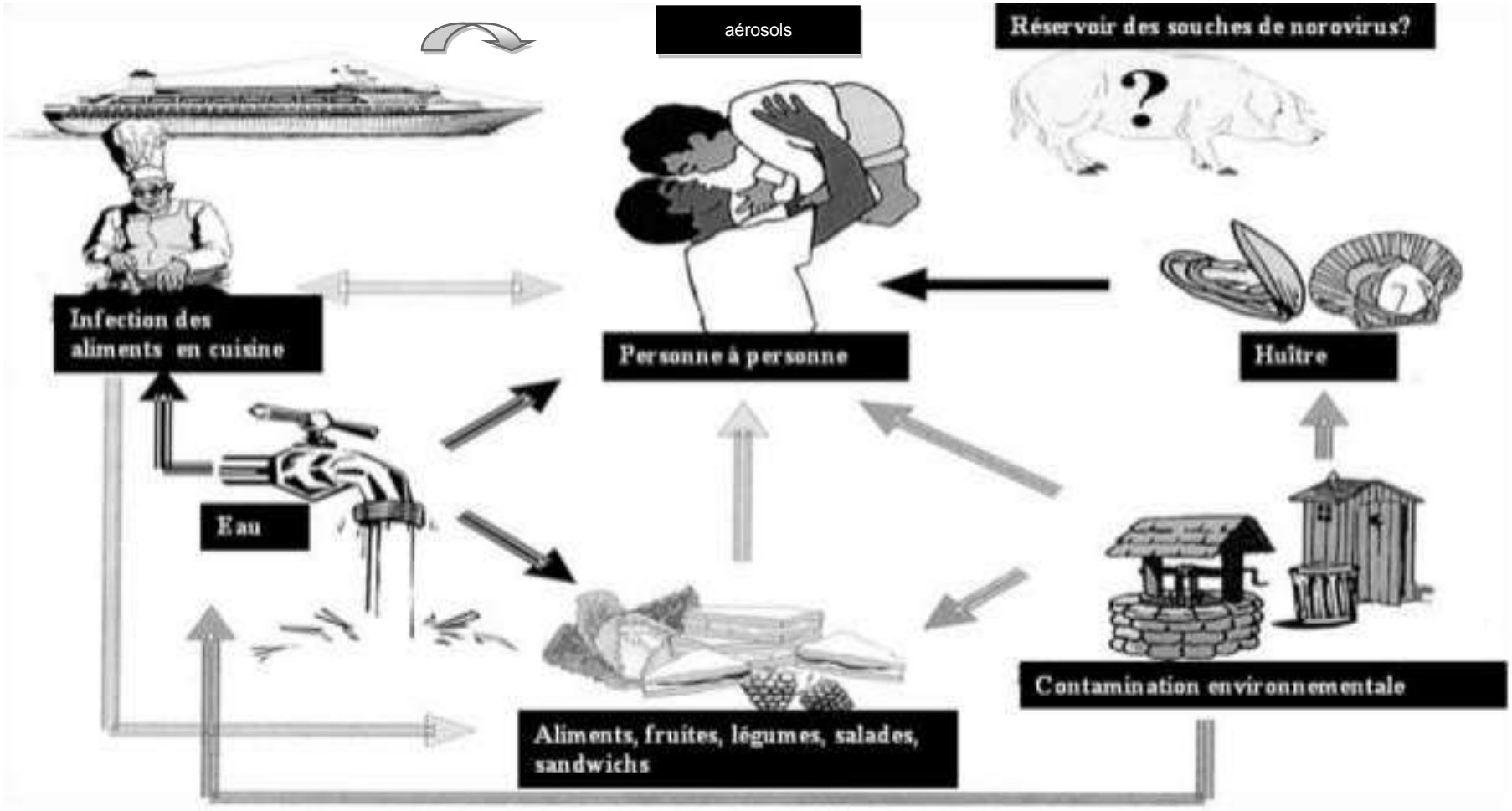


Figure 18 : Mode de transmission du Norovirus (Zakhour M., 2009)

III. Aspects virologiques et diagnostiques des infections à Norovirus

III.1 Connaissances actuelles sur le Norovirus

III.1.1 La classification du virus

Les Norovirus représentent un des principaux genres de la famille des *Caliciviridae.* Cette dernière est caractérisée comme un groupe hétérogène de virus, classés en cinq genres : Norovirus, Sapovirus, Vesivirus, Beco/Navovirus et Lagovirus (figure 19). La classification est basée sur les différences de l'organisation du génome, de stratégie de codage, d'hôtes et selon la persistance du virus.

Outre les Norovirus, le genre Sapovirus infecte également l'homme et est responsable de gastroentérites aiguës.

Le genre Vesivirus, touche une grande variété d'espèces de mammifères et se répartit en deux espèces : (Simmonds P. et *al*, 2008)
- VESV (*vesicular exanthema of swine virus*), responsable de lésions vésiculeuses, ressemblant à la fièvre aphteuse. Il provient du virus de lions de mer de San Miguel (SMSV : *San Miguel sea Lion virus*) qui cause une infection virale aux mammifères marins. Ce virus s'est propagé aux USA, des mammifères marins aux porcs (Clarke I-N. et Lambden P-R., 1997) ;
- FCV (*feline calicivirus*), infecte les chats domestiques et sauvages.

Le genre Lagovirus comprend le virus de la fièvre hémorragique de lapin (RHDV : *Rabbit hemorrhagic disease virus*) et le virus du syndrome du lièvre brun européen connexe (EBHSV : *European brown hare syndrome virus*), tous deux responsables d'une maladie hémorragique progressant rapidement et souvent fatale, ainsi que d'une hépatite nécrosante. Les caractéristiques de ces virus sont résumées dans le tableau X.

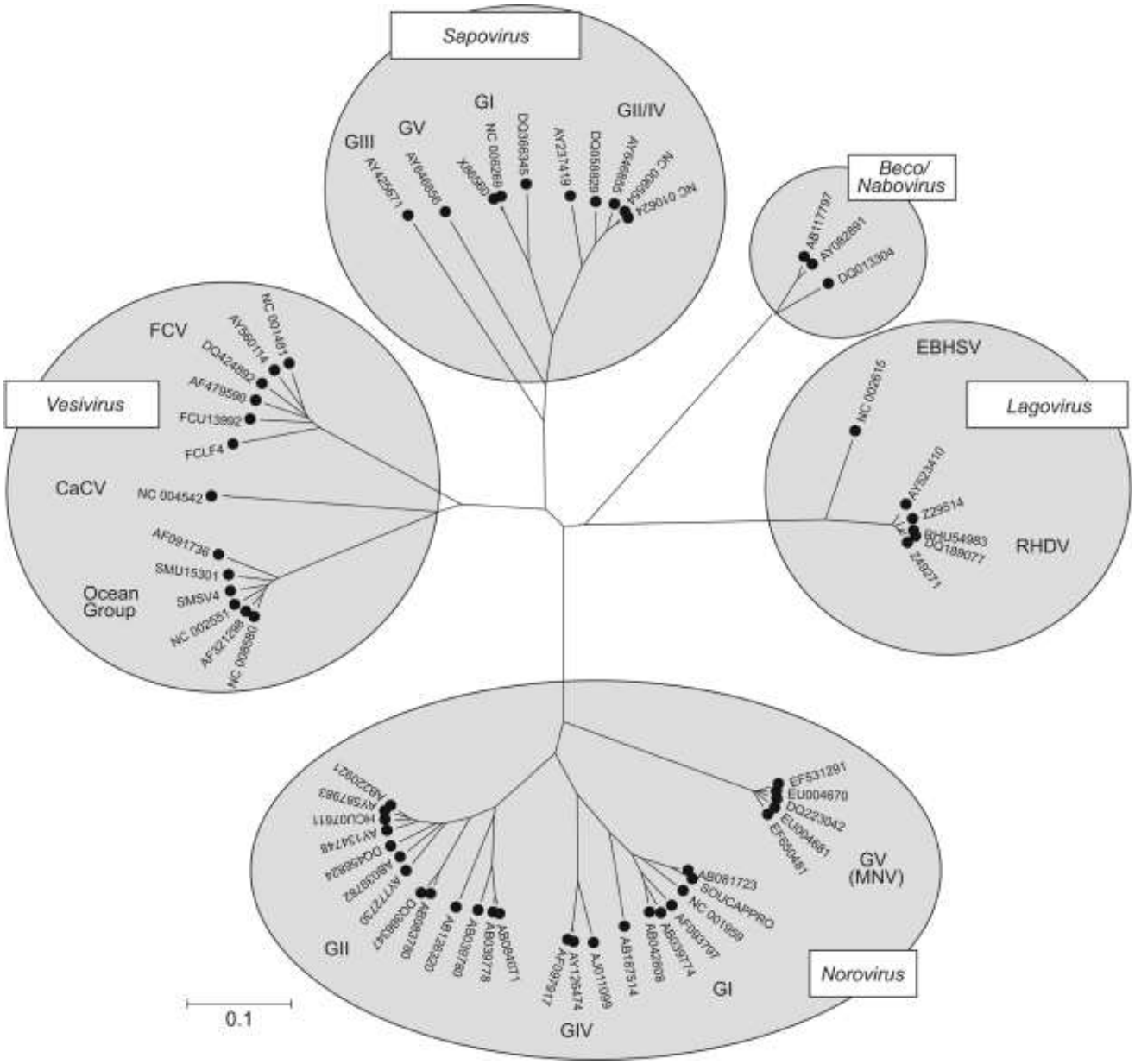


Figure 19 : Analyse phylogénétique des cinq genres de la famille des *Caliciviridae*, selon la séquence de l'ARN polymérase ARN dépendante (Simmonds P. *et al*, 2008).

Tableau X : Propriétés des Calicivirus (Clarke I-N. et Lambden P-R., 1997)

Virus	Culture cellulaire	Clinique et épidémiologie
VESV/SMSV (morphologiquement non distinguables)	oui	Chez les porcs : lésions vésiculaires similaires à la fièvre aphteuse. Chez les mammifères marins, SMSV cause des avortements et des lésions sur les palmes
FCV	oui	Maladie respiratoire sévère, pneumonie et aussi un "syndrome boitant" chez les chats
RHDV et EBHSV	non	Maladie épidémique et hémorragique du foie, mortelle chez le lapin et le lièvre brun européen. Il n'y a pas de protection par une précédente infection par le RHDV ou EBHSV. Un "*rabbit Calicivirus*" non pathogène a été récemment décrit ; il se réplique dans l'intestin de lapin. Une précédente infection par le virus non pathogène protège les lapins contre RHDV.

VESV : *Vesicular exanthema of swine virus*

SMSV : *San* Miguel sea lion virus

FCV : *Feline calicivirus*

EBHSV : *European brown hare syndrome virus*

Deux autres groupes de Calicivirus ont été caractérisés; ils causent des diarrhées et des infections intestinales aiguës :

- l'un des deux, génétiquement différent des autres genres a été classé dans un nouveau genre, appelé Nabovirus ou Becovirus.
- l'autre est lié au Norovirus humain et a été classé dans le génogroupe GIII du genre Norovirus.

Un autre Calicivirus, touchant principalement les souris de laboratoire immunodéprimées et présentant une parenté génétique avec les Norovirus humains, a été classé dans le génogroupe V du genre Norovirus sous le nom de Norovirus murin (MNV) (Simmonds P. et *al*, 2008).

Au sein de genre Norovirus :

- cinq groupes génétiques appelés génogroupes, GI à GV, sont distingué, par comparaison des séquences de la polymérase et de la protéine virale de capside d'un grand nombre de souches de Norovirus :

- GI.1 est la souche prototype *Norwalk*
- GI, GII regroupent les principaux Norovirus humains, GIV étant plus rare chez l'homme
- de multiples Norovirus porcins sont également regroupés dans le génogroupe GII
- GIII rassemble les Norovirus bovins
- GIV regroupe également des souches isolées chez le chien et le lion
- les Norovirus murins sont regroupés dans le génogroupe GV (Ruvoen-Clouet N. et *al*, 2013)

- des génotypes (figure 20), au sein des génogroupes, après analyse des séquences complètes de VP1, notamment 8 génotypes parmi les GI (GI.1 à GI.8) et 21 génotypes parmi les GII (GII.1 à GII.21) (Hall A-J. et *al*, 2011).

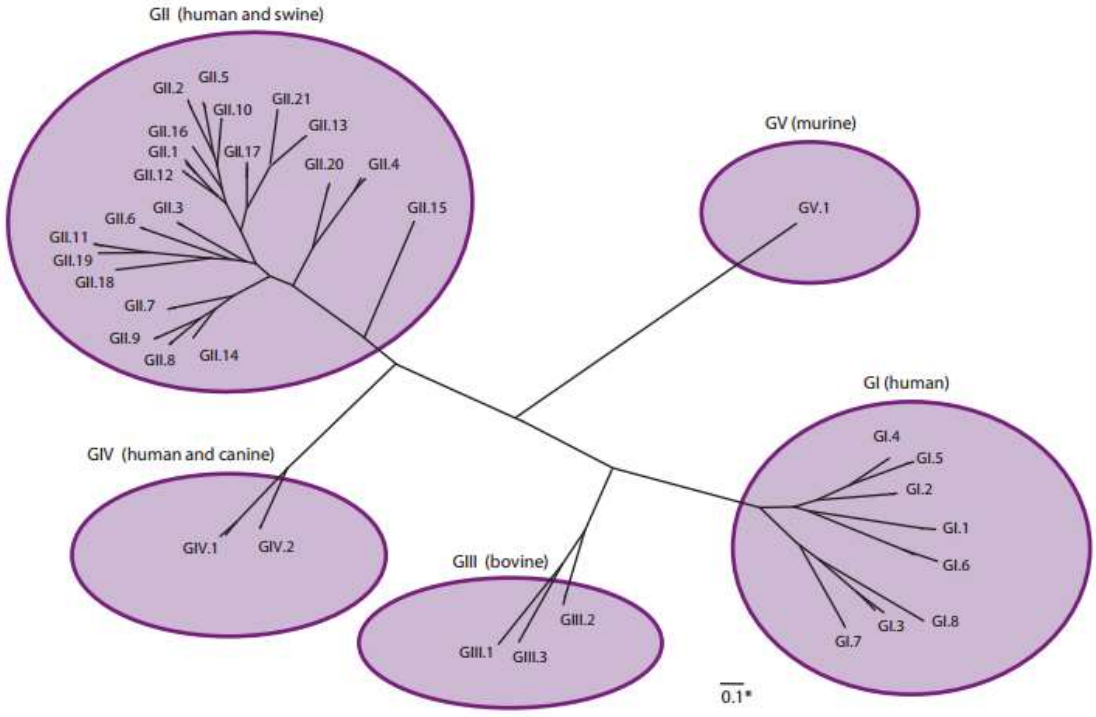


Figure 20 : Classification des Norovirus en génogroupes et génotypes (Hall A-J. et *al*, 2011).

La diversité génétique des Norovirus peut être due à deux mécanismes :

- l'accumulation d'erreurs lors de la réplication (mutations ponctuelles)
- la recombinaison entre deux souches, en cas de co-infection : il existe une région hautement conservée à la jonction ORF1 et ORF2 (c'est le site de recombinaison); l'ARN polymérase peut alors passer d'un génome d'une souche à l'autre au niveau de ce site (la souche recombinante possède alors l'ORF1 d'une souche et l'ORF2 de l'autre souche) (Delacour H. et *al*, 2010)

III.1.2 La découverte du Norovirus

C'est en 1929, que Zahorsky décrit pour la première fois "*hyperemesis hemis"* ou "*winter vomiting disease"* , la maladie hivernale caractérisée par l'apparition brutale de vomissements et diarrhées, avec un pic de prévalence lors des mois les plus froids de l'année (Patel M-M. et *al*, 2009).

En octobre 1968, à Norwalk (Ohio, aux Etats-Unis), une épidemie de gastroentérite se déclare dans une école primaire ; la moitié des élèves et enseignants sont frappés de nausées, vomissements et douleurs abdominales. Il en est de même d'un tiers des familles (ou entourage proche) en contact. Aucune cause d'origine bactérienne n'a été retrouvée lors de cette épidémie, c'est pourquoi une cause virale a été évoquée, sans être confirmée par la mise en évidence de l'agent infectieux en culture cellulaire (Lopman B-A. et *al*, 2002). Une étude réalisée en 1971, consistant en l'ingestion par des volontaires sains de filtrats de selles de patients impliqués dans l'épidémie de Norwalk, a montré que 2 patients sur 3 ont développé la maladie. En 1972, l'immuno-microscopie électronique a permis d'observer une particule de 27 nm dans les selles de ces volontaires (Kapikian A-Z. et *al,* 1972).

Malgré cette découverte, le rôle important du Norwalk virus dans les épidémies de gastroentérites reste en suspens, car il est peu détecté ; il ne peut être amplifié en culture cellulaire ou sur modèles animaux et n'est que rarement visualisé par microscopie électronique. De plus, par la suite, d'autres virus entériques morphologiquement similaires ont été découverts par microscopie électronique. Ils ont été désignés par le lieu de leur découverte (ex: Hawai, Snow Mountain, Sapporo, Taunton...) et regroupés :

- soit sous le nom "*small round structured virus*" ("petits virus ronds structurés" ou SRSV) (Monroe S-S. *et al*, 2000) dont le prototype est le Norwalk virus (Huraux JM. et *al*, 2003).

Morphologiquement, ils présentent un contour irrégulier, plumeux et ne possèdent pas de structures distinctes à leur surface (Clarke I-N. et Lambden P-R., 1997) (figure 21a).

- soit sous le nom "*classic human caliciviruses*" (Monroe S-S. *et al*, 2000) (calicivirus "classiques") identifiés en 1977, dont le prototype est le virus Sapporo. Morphologiquement, leur surface présente des dépressions, donnant une forme classique de "coupe", dite en "étoile de David" (Clarke I-N. et Lambden P-R., 1997) (figure 21b).

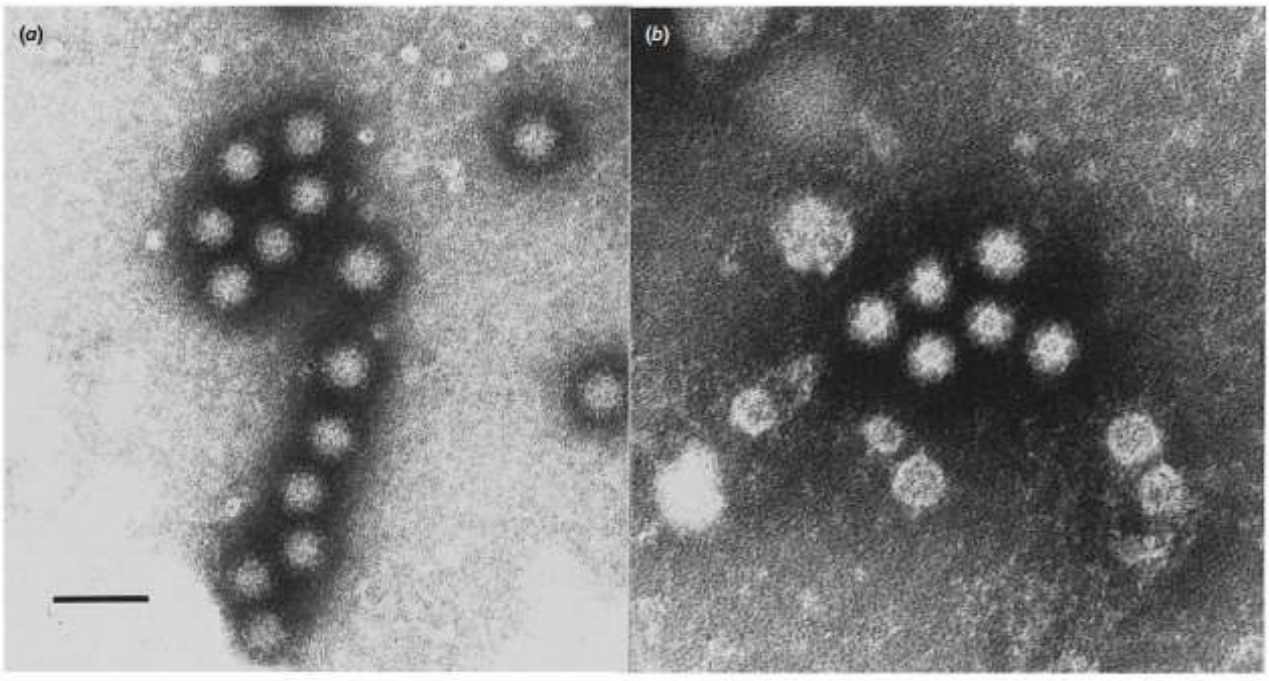


Figure 21 : Visualisation, en immuno-microscopie électronique (a) "*small round structured viruses*" et en (b) "*classic human caliciviruses*" (Clarke I-N. et Lambden P-R., 1997)

Dans les années 1990, le clonage et le séquençage des virus de Norwalk et de Southampton, ont révolutionné l'étude de ces virus (Monroe S-S. et *al*, 2000). Sur la base de leurs séquences, tous ces virus ont été placés dans deux genres provisoires de la famille des *Caliciviridae* : " *virus Norwalk-like*" (NLV) et "*virus Sapporo-like"* (SLV) (Monroe S-S. *et al*, 2000) (ainsi que dans le genre astrovirus) (Scipinio A., 2009). Dans cette classification, les virus, précédemment dénommés SRSV, sont largement affectés à NLV, mais les calicivirus humains classiques se répartissent dans les deux genres NLVs et SLVs (Monroe S-S. *et al*, 2000). Les NLVs et les SLVs sont maintenant respectivement devenus Norovirus et Sapovirus (Scipinio A., 2009).

III.1.3 La structure virale

Les Norovirus sont de petits virus, non enveloppés dont le diamètre varie de 27 à 40 nm. Ils sont caractérisés par une capside composée de 180 copies d'une même protéine, à symétrie icosaédrique d'ordre 3 (Loisy F. *et al,* 2004).

III.1.3.1 Le génome viral

Le génome des Norovirus est composé d'un ARN simple brin, de polarité positive et de taille comprise entre 7400 et 7700 bases. Il est organisé en trois cadres de lecture ouverts : ORF1, ORF2 et ORF3 (Karst S-M., 2010). Ce génome comprend successivement, de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3' (figure 22) : l'ORF1 codant pour une poly-protéine, clivée en protéines non structurales par la 3C-like protéase ; l'ORF2 codant la protéine (majeure) de capside VP1 ; l'ORF3 codant la protéine (mineure) de capside VP2 (Hardy M-E., 2005). L'ORF2 est en décalage de phase de lecture par rapport à l'ORF1 et l'ORF2 (Delacour H. *et al*, 2010) et il y a un léger chevauchement entre l'ORF1 et l'ORF2. La molécule d'ARN est associée en 5' à une protéine appelée VPg, elle est polyadénylée en 3'.



Figure 22 : Organisation du génome viral en 3 cadres de lecture ouverts (Delacour H. *et al*, 2010)

La région 3' proximale (VP1 et VP2) est transcrite en ARNm; ce dernier est lui aussi associé en 5' à une protéine VPg et polyadénylé en 3'. Il agit comme une matrice pour la production des protéines structurales (Karst S-M., 2010).

III.1.3.2 Les protéines structurales

Ce sont les protéines VP1 et VP2.

III.1.3.2.1 VP1

Elle représente la protéine structurale majeure du Norovirus. La capside du virion est composée de 90 dimères (ou 180 monomères) de VP1, formant chacun, une protubérance en forme d'arche à sa surface. VP1 possède entre 530 et 550 acides aminés, et sa masse moléculaire est d'environ 58 kDa. Elle est composée de deux domaines conservés (S et P1) qui entourent un domaine central variable (P2), observable sur la figure 23. Ce dernier est responsable des spécificités de souches.

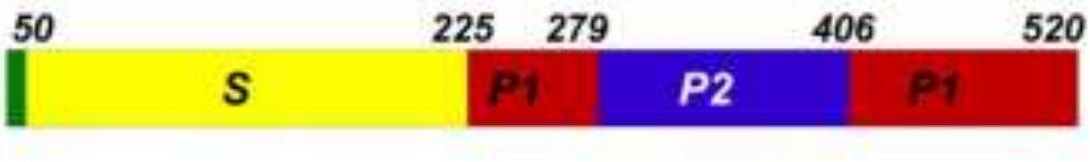


Figure 23 : Représentation structurale de VP1 (Hardy M-E., 2005)

La protéine majeure VP1 est divisée en deux domaines : le domaine S "*shell domain*" (coquille) et le domaine P "*protruding domain*" (protubérance). L'extrémité N-terminale, comprenant un petit domaine N-terminal de 49 acides aminés et le domaine S, allant du 50ème au 225ème acide aminé, contient les éléments essentiels pour la formation de la capside icosaédrique. Quant aux autres acides aminés (du 226ème au 520ème), ils constituent le domaine P, lui-même divisé en deux sous-domaines, P1 et P2 (figure 24) (Hardy M-E., 2005) : P1 forme les cotés/faces des arches (des protubérances), alors que P2 est localisé au sommet de ces arches (Karst S-M., 2010). Ceci est représenté sur la figure 24.

Le domaine P2, contenant 127 acides aminés, est inséré dans le domaine P1 (figure 25). C'est une région hypervariable, suspectée de jouer un rôle important dans la réaction immunitaire (elle contient des sites antigéniques) (Hardy M-E., 2005). Plusieurs études ont montré que le(s) site(s) de fixation à la cellule (les antigènes de groupes sanguins) est localisé dans cette zone (Ruvoën-Clouet N. et *al*, 2013).
L'expression de VP1 implique l'auto-assemblage des particules virales, indépendammant d'autres composantes virales (Karst S-M., 2010).

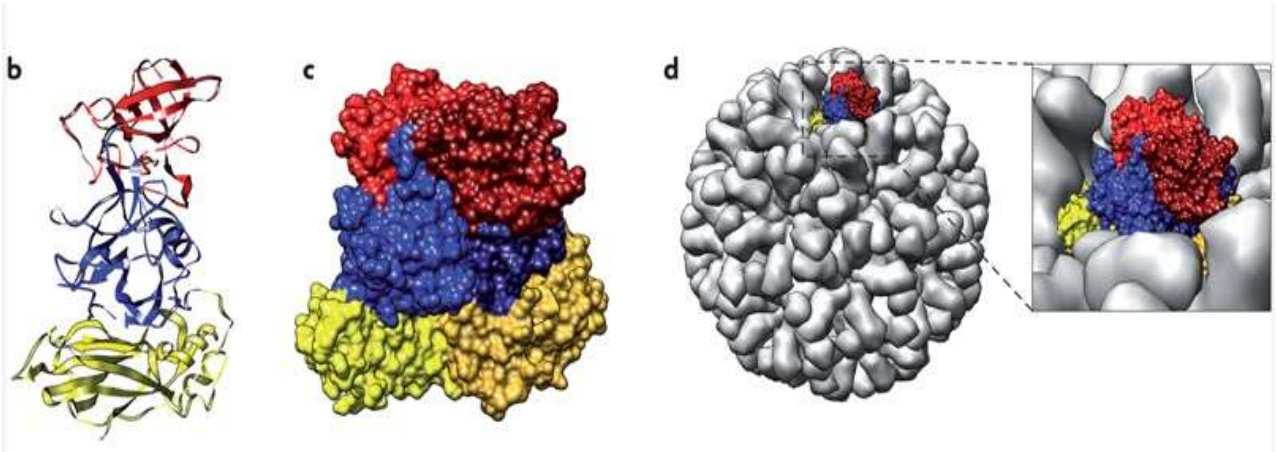


Figure 24 : (b) Structure du monomère de VP1 (c) Représentation du dimère de VP1 (d) Représentation du virion du Norovirus, composé de 90 dimères de VP1 (en jaune : domaine S, en bleu : P1, en rouge : P2) (Donaldson E-F. *et al,* 2010)

III.1.3.2.2 VP2

Elle représente la protéine structurale mineure, seules 1 à 2 copies sont présentes par virion. Elle est composée de 208 à 268 acides aminés, sa masse moléculaire varie de 22 à 29 kDa et il y a une grande variabilité de séquences entre les souches (Hardy M-E., 2005).

Le rôle de la protéine VP2 dans la réplication virale n'est pas défini, mais elle augmenterait le niveau d'expression de la protéine VP1 et aurait un rôle de stabilisation de la particule virale (Karst S-M., 2010).

III.1.3.3 Les protéines non structurales

Les protéines non structurales, obtenues après clivage protéolytique de la polyprotéine (175kDa) codée par ORF1 sont (figure 25) :



Figure 25 : Schéma de la poly-protéine ORF1 (Thorne L-G. *and* Goodfellow I-G, 2014)

- p48, induit un réarrangement de la membrane de Golgi dans les cellules infectées. Il interagirait avec des protéines de l'hôte impliquées dans la régulation du transport vésiculaire et inhiberait l'expression des protéines de surface cellulaire chez l'hôte ;

- NTPase a une activité nucléotide triphosphatase ;

- p22, induit une perturbation de l'appareil de golgi. En effet, elle émet un signal d'exportation au niveau du réticulum endoplasmique, ce qui modifie le trafic des vésicules, allant du réticulum endoplasmique vers le golgi et inhibe la sécrétion des médiateurs immunitaires (cytokines) des cellules infectées ;

- VPg est suspectée être liée à l'extrémité 5' (à la place de la coiffe typique en 5'). Elle joue un rôle d'amorce dans la réplication de l'ARN viral ;

- 3CLpro est une protéase impliquée dans le clivage de la polyprotéine codée par l'ORF1 ;

- Pol est une ARN polymérase ARN-dépendante, responsable de la réplication du génome viral (Karst S-M., 2010).

III.1.4 Les propriétés physico-chimiques virales

Les Norovirus présentent une grande stabilité dans l'environnement et dans les aliments.

Ils sont résistants à la chaleur (72 °C pendant 4 min, 100° C pendant 2 min) (figure 26) (Wang D. et Tian P., 2014). Ils sont stables à la congélation. En effet, ils peuvent rester infectieux dans les aliments congelés (< ou = à -20°C) jusqu'à 6 mois (Barclay L. et *al*, 2014).

Ces virus ne sont pas inactivés par les concentrations de chlore utilisées dans le traitement des eaux potables (3,75 à 6,25 ppm). Néanmoins, ils sont sensibles à des concentrations de chlore libre de 16 ppm (figure 27). Ils sont également inactivés par des traitements à l'eau de javel présentant des concentrations de chlore > à 1000 ppm.

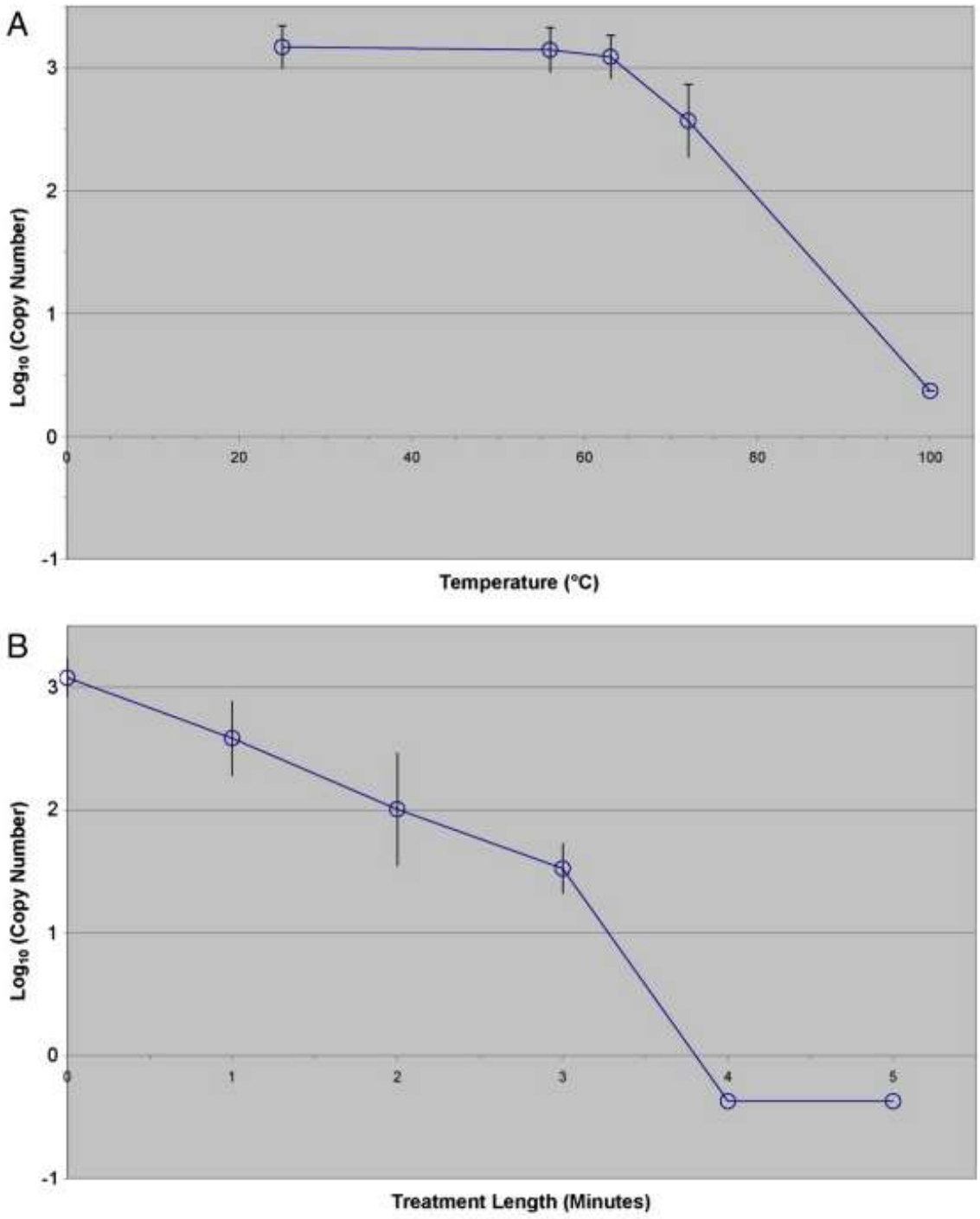


Figure 26 : Inactivation des Norovirus humains par un traitement thermique (Wang D. et Tian P., 2014)

A : nombre de copie de l'ARN viral (log10) après un traitement de 2 minutes à 56°C, 63°C, 72°C et 100°C

B : nombre de copies de l'ARN viral (log10) après un traitement à 72°C pendant 5 min

L'éthanol présente un effet limité sur l'inactivation des Norovirus humains (Wang D. et Tian P., 2014).

Ils sont résistants aux pH acides (pH 2, 30 min à 37°C) ou basiques (pH 12, 30 min à 37°C) (AFSSA, 2006).

Concernant le traitement par les ultraviolets, il est nécessaire d'administrer une dose de plus de 1 mJ/cm^2 afin d'obtenir une inactivation complète des Norovirus humains (figure 28).

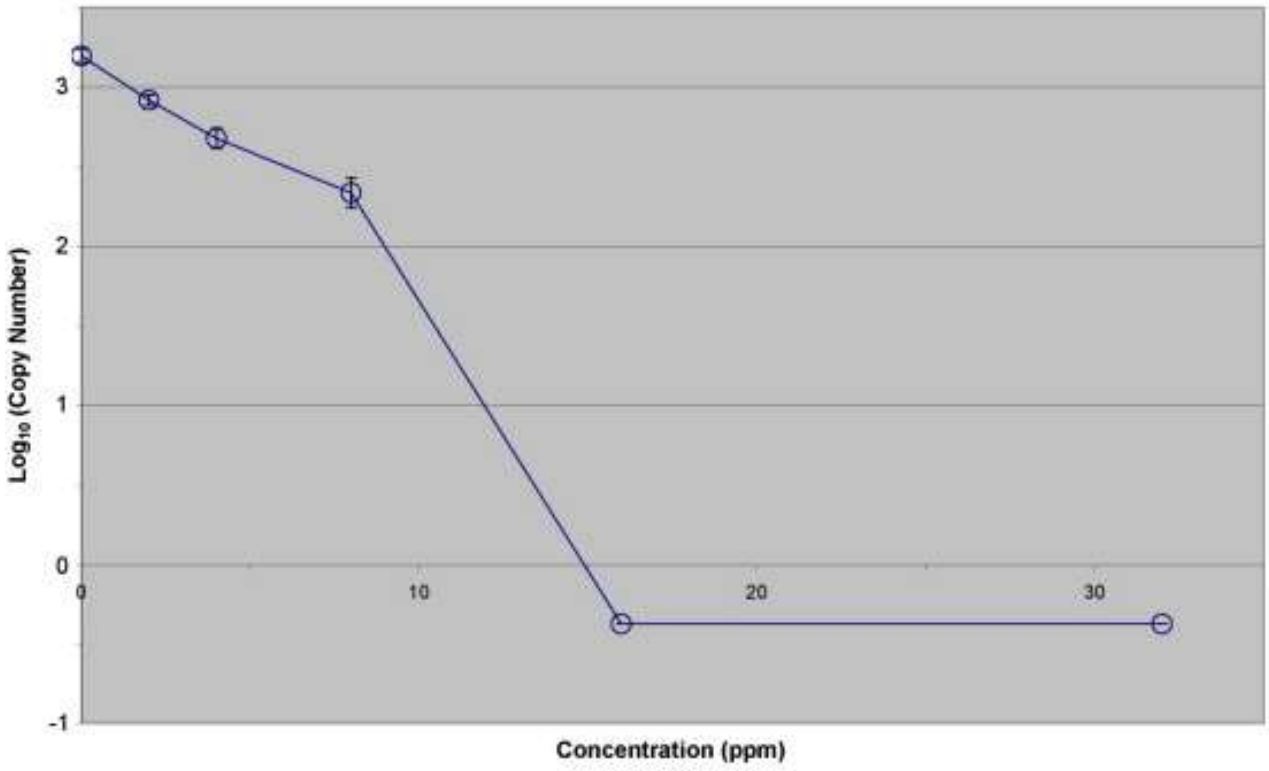


Figure 27 : Inactivation des Norovirus humains par un traitement au chlore (Wang D. et Tian P., 2014)

Réduction du taux d'ARN viral (log10) lors d'un traitement par du chlore libre à des concentrations de 2, 4, 8, 16 et 32 ppm.

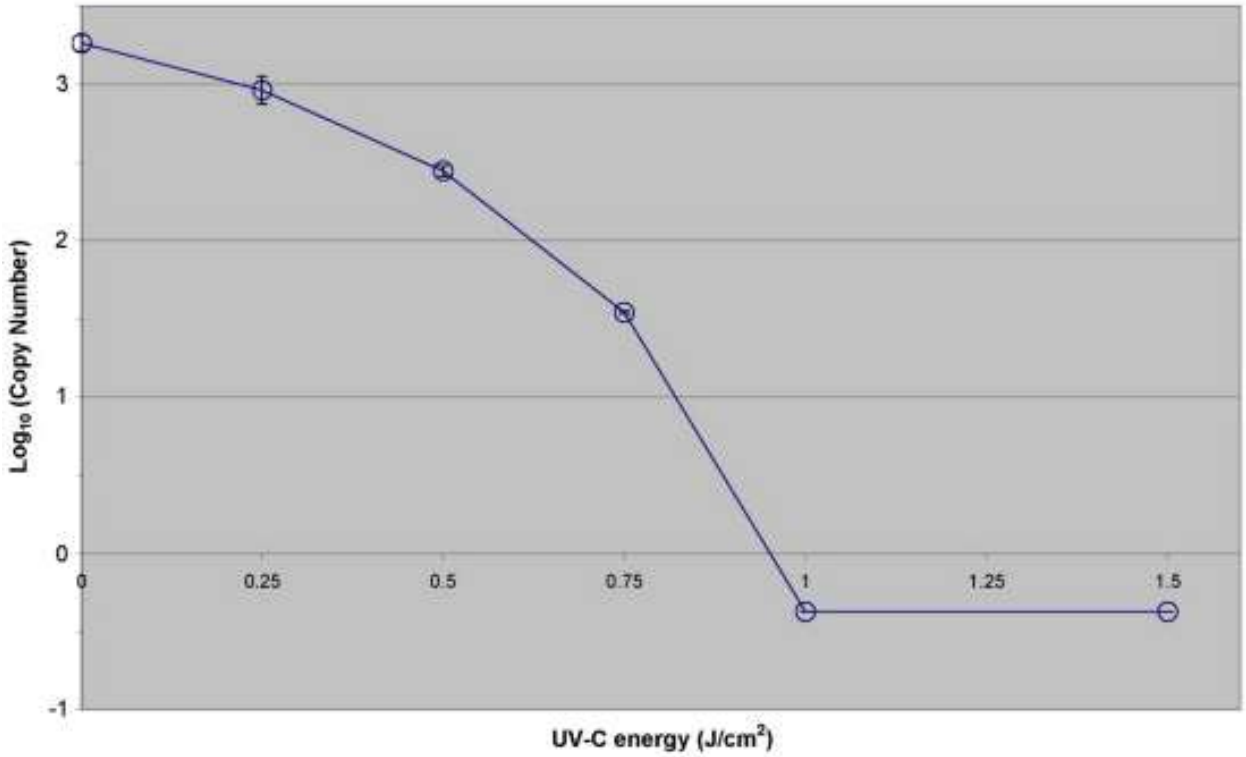


Figure 28 : Inactivation des Norovirus humains par les ultra-violets (UV) (Wang D. et Tian P., 2014)

Nombre de copies d'ARN viral (log10) lors d'un traitement par des doses d'UV à 250, 500, 750, 1000 et 1500 mJ/cm2.

III.1.5 Le cycle cellulaire de multiplication du virus

Les différentes étapes de ce cycle sont décrites dans la figure 29:

III.1.5.1 L'attachement

Les récepteurs cellulaires pour l'attachement du virus sont les antigènes de groupes sanguins (*histo-blood group antigens :* HBGA). L'interaction entre le domaine P2 et les HBGA a été récemment détaillée par analyse structurale (Ruvoën-Clouet N. et *al*, 2013). Cependant, des études réalisées sur des cultures cellulaires de Norovirus murins (MNV) suggèrent que l'acide sialique, des glycolipides et des glycoprotéines sont importants pour la fixation de ces virus (Ryu S. et *al,* 2015).

III.1.5.2 L'entrée et la décapsidation (avec libération du génome viral)

Ces deux étapes sont réalisées par des procédés encore non élucidés. Néanmoins, l'entrée du MNV se fait par un mécanisme d'endocytose, dépendant de la dynamine et du cholestérol (Ryu S. et *al,* 2015).

III.1.5.3 La traduction des protéines virales

Une fois le génome viral libéré dans le cytoplasme de la cellule, l'ARN viral lié à la protéine VPg se comporte comme une matrice d'ARNm pour la traduction. Pour se faire, la protéine VPg accueillerait le complexe d'initiation de la traduction, nommé eIF4F. Elle interagirait avec des composants de ce complexe, en particulier avec eIF4E (formant un complexe avec eIF4G) et eIF3. Ce dernier contribuerait à recruter le complexe ribosomal de pré-initiation 43S, alors que eIF4A (la composante ARN hélicase de eIF4F) aurait un rôle lors de la traduction, pour le déroulement de l'ARN (figure 30).

La traduction des protéines virales VP1 et VP2 se produit principalement à partir de l'ARN sub-génomique (extrémité 3' de l'ARN génomique viral) afin de produire des niveaux élevés de la protéine majeure de capside (VP1) pour l'assemblage du virus. En effet, l'ARN sub-génomique est présent à des concentrations plus élevées que l'ARN génomique viral dans les cellules infectées. Comme l'ARN est polycistronique, la traduction de VP2 utilise un mécanisme de "terminaison-réinitiation": lors de la terminaison de la traduction de ORF2 (VP1), les ribosomes restent associés à l'ARN et se relancent au début de ORF3 (ceci est facilité par le chevauchement et le codon d'initiation de ORF2 et ORF3, respectivement).
La traduction de la polyprotéine ORF1 est suivie par une maturation co- ou post-traductionnelle, par la protéase 3Clpro, produisant les protéines non structurales (utilisées pour la suite du cycle cellulaire).

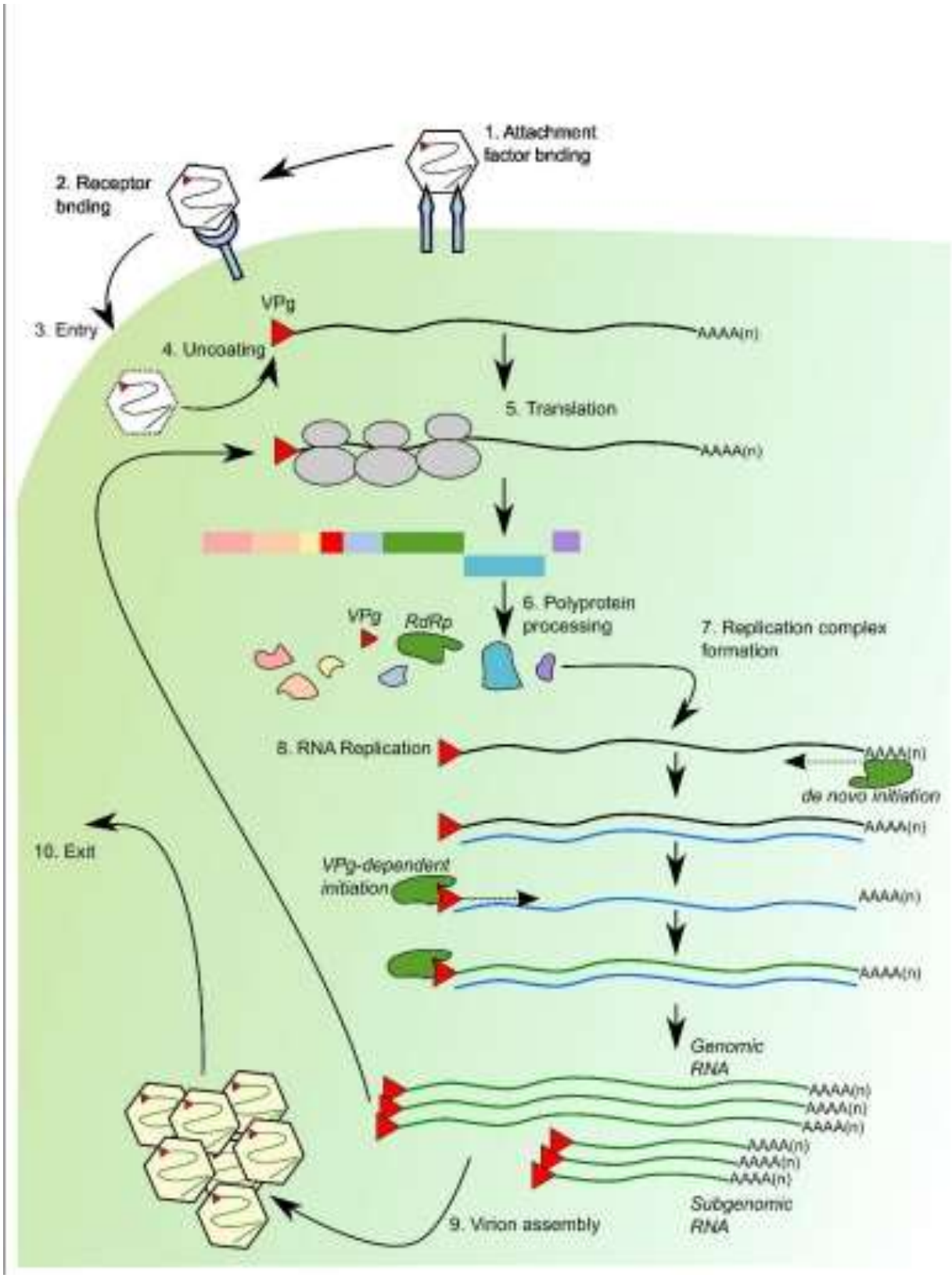


Figure 29 : Description du cycle cellulaire du Norovirus (Thorne L-G. *and* Goodfellow I-G., 2014)

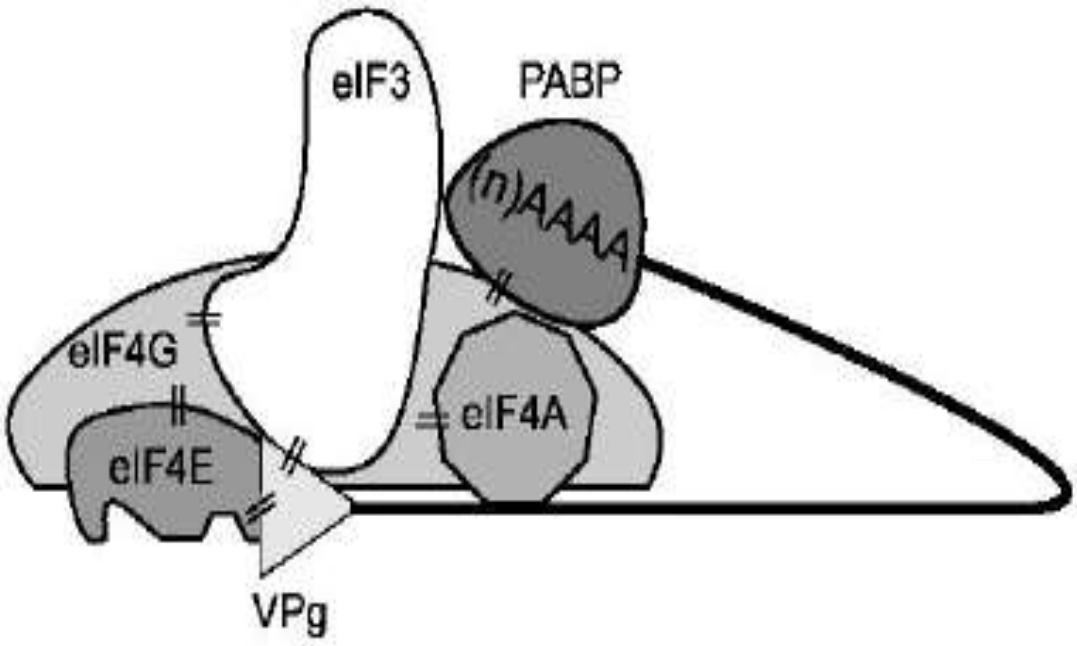


Figure 30: Représentation des facteurs du complexe d'initialisation de la traduction (Thorne L-G. *and* Goodfellow I-G, 2014)

III.1.5.4 La réplication

Comme d'autres virus à ARN (+), la réplication du Norovirus se produit en étroite association avec des complexes membranaires du cytoplasme des cellules infectées de l'hôte. En effet, un complexe de réplication est formé par recrutement des membranes cellulaires à la région périnucléaire de la cellule (y compris celle de l'appareil de golgi), notamment par l'interaction des protéines p22 et p48.

La réplication se déroule en plusieurs étapes :

- d'abord, il y a synthèse d'un ARN de sens négatif intermédiaire, par l'ARN polymérase ARN-dépendante à partir de l'ARN génomique viral, et ainsi formation d'une forme réplicative double brin. Récemment, une étude a suggéré que "l'initiation *de novo*" est utilisée pour la synthèse de cet ARN anti-sens, à l'extrémité 3' de l'ARN viral. Il y alors une interaction directe (spécifique de l'espèce et concentration dépendante) entre le domaine S de la protéine VP1, des virus entrant ou issus des premiers cycles de traduction de l'ARN viral, et la polymérase virale, ce qui stimule la synthèse d'ARN.

Au niveau de la régulation, ce modèle propose que l'augmentation de la quantité de VP1 (notamment due à la production de l'ARN sens positif) induise la formation de complexes multimériques, empêchant l'interaction avec la polymérase virale (donc la synthèse d'ARN) et conduise à la formation de nouvelles particules virales par assemblage de la capside virale. Ainsi, lors de la première étape de traduction, seule une petite quantité de ribosome traduisant ORF1 sera relancée sur ORF2 pour la traduction de la protéine VP1.

- le brin d'ARN anti-sens néoformé sert ensuite à la synthèse d'ARN génomiques et sous génomiques à sens positif. Dans ce cas, l'ARN polymérase ARN-dépendante initie la synthèse d'ARN par fixation covalente à la protéine VPg (considérée comme la protéine "amorce") par une liaison phosphodiester au nucléotide d'initiation qu'est la guanidine : c'est la VPg guanylation (la liaison est formée entre la guanine à l'extrémité 5 ' du génome et un résidu tyrosine de VPg).

- deux modèles de la synthèse des ARN sub-génomiques ont été proposés :

1) Présence d'un signal de terminaison, induisant une terminaison prématurée au cours de la synthèse du brin d'ARN (-) ; ce dernier servant de matrice pour la production du brin d'ARN (+) subgénomique (figure 31).

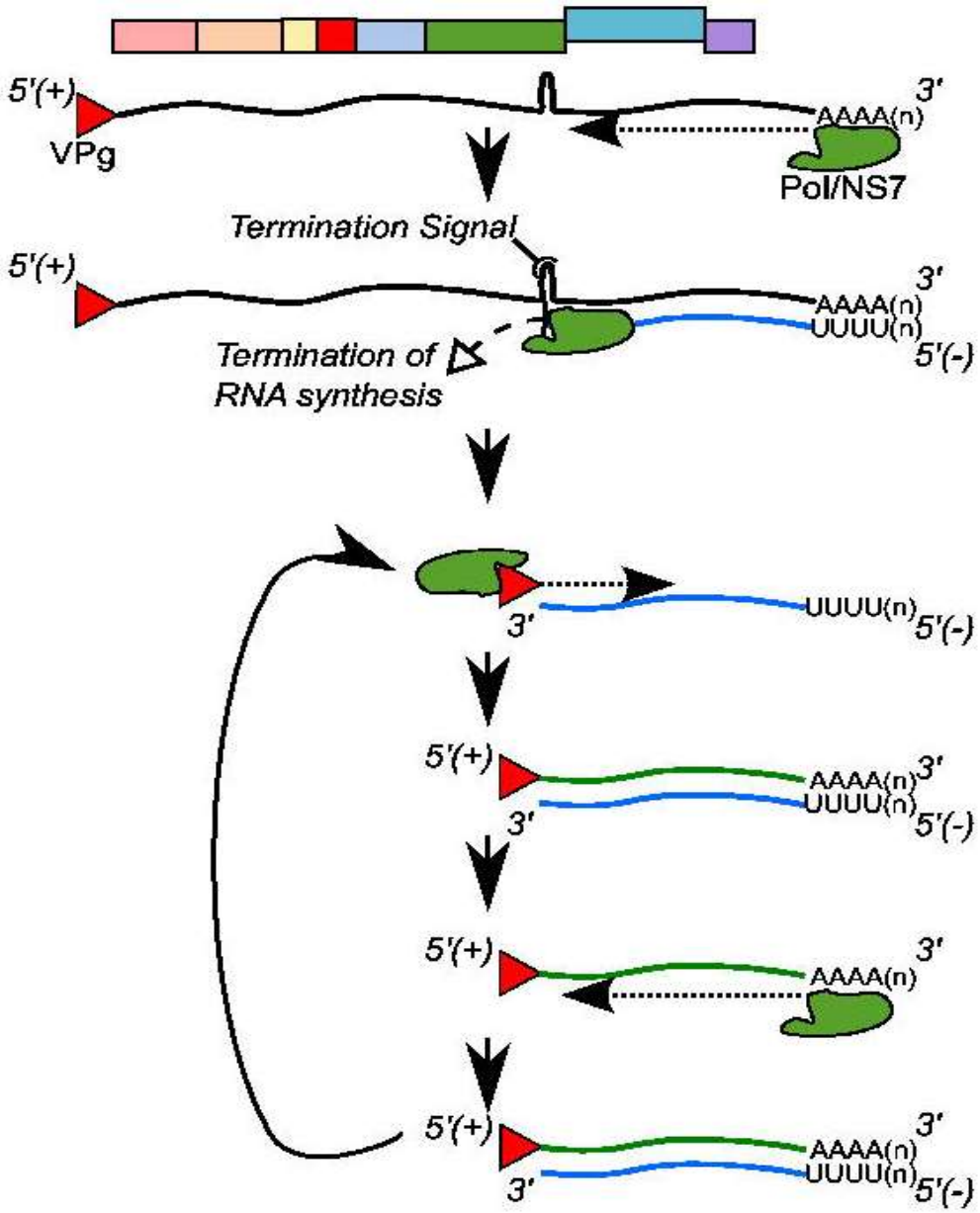


Figure 31: Premier modèle de synthèse des ARN sous génomiques : par signal de terminaison (Thorne L-G. *and* Goodfellow I-G., 2014)

2) Présence d'une structure secondaire hautement conservée de 6 nucléotides, en amont de ORF2 sur le brin d'ARN (-), celui-ci étant considéré comme promoteur pour la synthèse du brin d'ARN (+) subgénomique (figure 32)

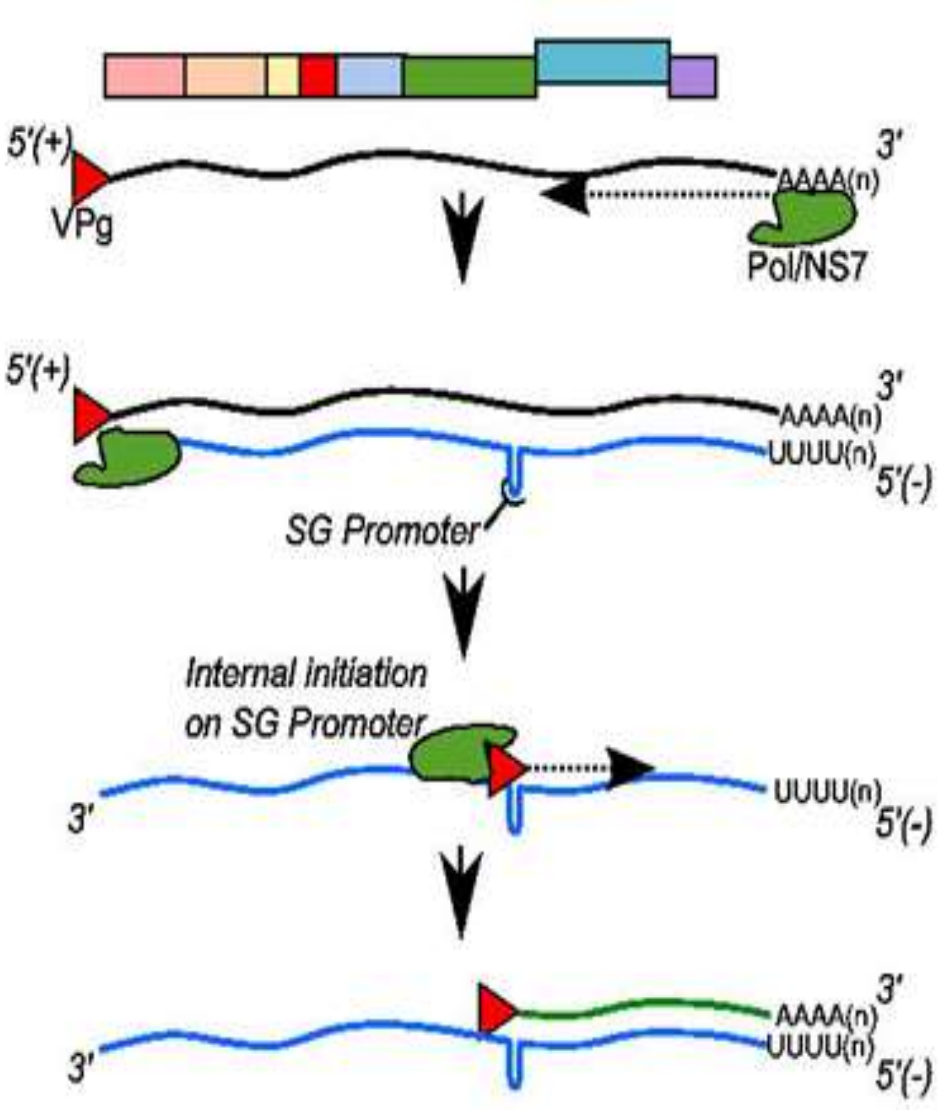


Figure 32 : Deuxième modèle de synthèse des ARN sub-génomiques : par présence d'un promoteur (Thorne L-G. *and* Goodfellow I-G., 2014)

- enfin, lorsque la synthèse des brins d'ARN (+) génomiques et sous génomiques est initiée, il s'ensuit plusieurs tours de traduction des ARN nouvellement synthétisés, puis de nouveaux cycles de synthèse d'ARN.

III.1.5.5 L'assemblage, la sortie des virions

Les processus d'assemblage de la capside et d'encapsidation sont encore largement inconnus ; quelques études ont été réalisées :

- la capacité d'auto-assemblage de VP1 pourrait être suffisante pour entrainer la formation de la nouvelle particule virale.
- VP2 semblerait favoriser la stabilité de VP1 et serait essentielle pour la production de particules infectieuses.
- VP2 ayant un caractère basique pourrait intervenir dans l'encapsidation par une interaction avec l'ARN viral acide; de plus, il a été montré que VP1 et VP2 interagiraient, ce qui placerait VP2 à l'intérieur de la capside. Mais à ce jour, aucune interaction directe entre VP2 et l'ARN viral n'aurait été démontrée.
- une interaction possible entre VP1 et la protéine VPg aurait été observée.

(Thorne L-G. *and* Goodfellow I-G., 2014)

Le mécanisme de libération des virions néoformés des cellules infectées n'est pas connu à ce jour, mais des résultats récents suggèrent que l'induction de l'apoptose soit impliquée dans la stratégie de sortie, comme chez le Calicivirus félin et le MNV-1 (Hyde J-L. *and* Mackenzie J-M, 2012). En effet, une accumulation de cellules épithéliales a été découverte dans les cellules intestinales de patients infectés (Thorne L-G. *and* Goodfellow I-G., 2014).

III.1.6 La sensibilité génétique aux infections à Norovirus

Les virus initient l'infection en se fixant aux cellules spécifiques du tissu cible de l'hôte. Ils utilisent fréquemment des hydrates de carbone comme molécules d'attachement. Ces derniers sont alors, très souvent, chargés négativement comme par exemple, l'acide sialique pour les Paramyxovirus, Coronavirus ou l'héparane sulfate pour l'Herpesvirus. Des glycannes neutres (non chargés), comme les antigènes du groupe sanguin, peuvent également être utilisés comme récepteurs par certains virus ; c'est le cas du parvovirus B19, du virus de la maladie hémorragique du lapin, ainsi que du Norovirus (Ruvoen-Clouet N. et *al*, 2013).

III.1.6.1 Les antigènes du groupe sanguin (*histo-blood group antigens* - HBGA)

Ce sont des sucres complexes qui regroupent les antigènes ABH et Lewis. On les retrouve à la surface des érythrocytes, mais également sur d'autres types cellulaires ainsi que sous forme libre ou complexée dans des fluides biologiques comme le lait ou la salive.

Ces antigènes sont synthétisés à partir de six précurseurs oligo-saccharidiques (tableau XI) portant chacun un résidu galactose en position terminale, et constituant la région périphérique des glycolipides ainsi que des O- et N- glycannes des glycoprotéines. Des enzymes, appelées les glycosyltransférases (codées par plusieurs gènes) permettent l'addition spécifique de monosaccharides sur ces précurseurs (Ruvoen-Clouet N. et *al*, 2013). Celles des groupes A, B et H peuvent agir sur les 6 précurseurs, alors que pour le groupe Lewis, seuls les précurseurs 1 et 2 sont utilisés (Zakhour M., 2009).

Le précurseur de type 1 est exprimé préferentiellement dans les tissus dérivant de l'endoderme, comme les épithéliums de recouvrement ou les épithéliums glandulaires alors que le type 2 est plutôt retrouvé dans les tissus dérivant de l'ectoderme ou du mésoderme, incluant les erythrocytes et la peau. A la jonction gastro-duodénale chez l'homme, le type 1 est surtout retrouvé au niveau de l'épithelium de surface ; quant au type 2, il se trouve préférentiellement au niveau glandulaire.

Tableau XI : Localisation et structure des six précurseurs oligosaccharidiques (Zakhour M., 2009)

Nom	Structure	Types de glycoconjugués des antigènes de groupes sanguins			
		Glyco-sphingolipides	**N-Glycoprotéines**	**O-Glycoprotéines**	**Distribution tissulaire**
Type 1	Galβ1-3GlcNAcβ1-R	+	+	+	tissus dérivés de l'endoderme
Type2	Galβ1-4GlcNAcβ1-R	+	+	-	érythrocytes, sécrétions de l'hôte, tissus de l'ectoderme et du mésoderme, plasma
Type 3	Galβ1-3GalNAcα1-R	+	-	+	érythrocytes du groupe A1, mucines
Type 4	Galβ1-3GalNAcβ1-R	+	-	-	érythrocytes et rein
Type 5	Galβ1-3Galβ1-R	+	-	-	rein (quantité minime)
Type 6	Galβ1-3Glcβ1-R	+	-	-	nombreux types cellulaires

Trois gènes de glycosyltransférases sont importants : FUT 2, FUT 3 et ABO

- FUT 2 (enzyme sécrétrice) ajoute un fucose en α1,2 sur le galactose terminal des précurseurs, donnant naissance à l'antigène H

- FUT3 (enzyme Lewis)
ajoute un fucose :

- en α1-4 sur la N-acétylglucosamine du précurseur type 1
- en α1-3 sur la N-acétylglucosamine du précurseur type 2

donnant naissance aux antigènes Lewis

- l'enzyme A du système ABO ajoute une N-acétylgalactosamine en α1,3 sur le galactose de l'antigène H pour donner l'antigène A
- l'enzyme B du système ABO ajoute un galactose en α1,3 sur le galactose de l'antigène H pour donner l'antigène B (figure 33).

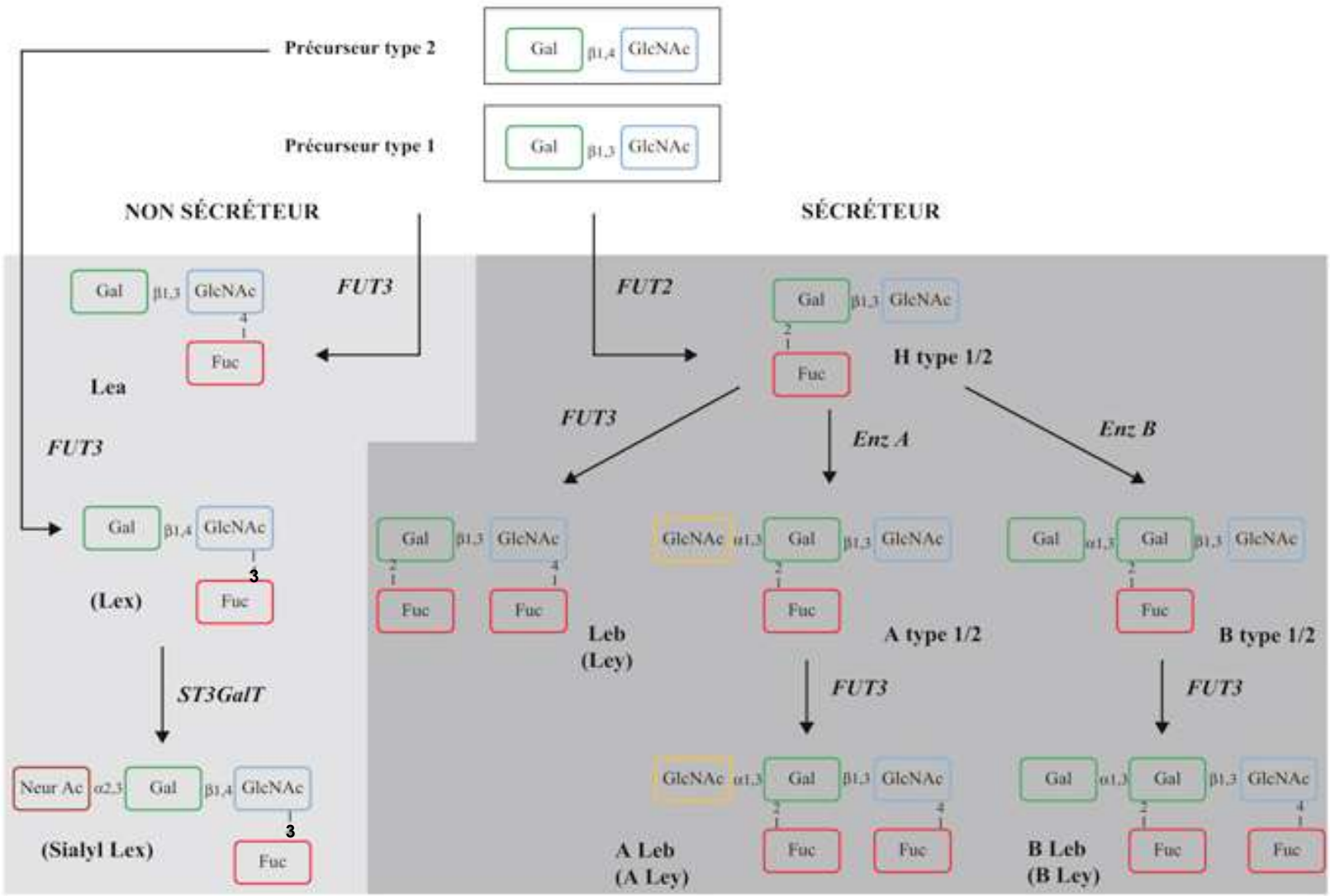


Figure 33: Synthèse des HBGA (Ruvoen-Clouet N. et *al*, 2013)

III.1.6.2 Groupes sanguins tissulaires et Norovirus

III.1.6.2.1 Analyse génétique de la résistance aux infections à Norovirus

Des études sur volontaires sains ont montré que la souche prototype Norwalk-virus n'infecte pas les individus "non-sécréteurs". En effet, parmi ces 77 volontaires, tous les individus infectés apparaissent comme "sécréteurs" alors que tous les individus "non sécréteurs" ne sont pas infectés (Shirato H., 2011). Ces derniers n'excrètent pas de virus dans leurs selles, n'ont pas de symptômes d'infection, n'ont pas de réponse immunitaire vis-à-vis du virus (Ruvoen-Clouet N. et *al*, 2013). Parmi les "sécréteurs", ceux de type O sont les plus infectés par le Norwalk-virus contrairement à ceux possédant l'antigène B qui le sont moins.

Grâce à l'utilisation de pseudo-particules de Norovirus (VLP), des études de fixation de ces VLP avec d'une part, les glycannes salivaires (ressemblant à ceux du tube digestif) et d'autre part, des carbohydrates synthétiques ont été réalisées; elles ont ainsi permis de détecter l'attachement des différents Norovirus aux HGBAs :

- en ce qui concerne les VLP dérivant de la souche prototype Norwalk-virus, ces études ont confirmé la liaison aux antigènes de groupe sanguin des individus "sécréteurs", mais aussi leur attachement préférentiel aux oligosaccharides synthétiques H type 1 et Le^b (figure 33), aux oligosaccharides synthétiques A et aux antigènes salivaires de type A. En revanche, ils ne se fixent pas aux carbohydrates synthétiques B ni aux antigènes de type B de la salive (Shirato H., 2011).

- quant aux autres souches de Norovirus, chacune d'entre elles reconnait des motifs glycanniques différents (tableau XII) : par exemple, les études ont montré une relation entre le caractère secréteur d'un individu et l'infection (avec une influence plus ou moins forte du phénotype ABO), mais aussi que certaines souches peuvent reconnaitre des individus non secréteurs si l'antigène Lewis est présent (c'est le cas pour les souches GII.4 ou GI.3 qui reconnaissent les antigènes Lewis a ou x présents sur les cellules épithéliales des individus non secréteurs et Lewis positifs) (Ruvoen-Clouet N. et *al*, 2013).

Tableau XII : Les antigènes d'attachement des différentes souches de Norovirus (Shirato H., 2011)

Génogroupe	Génotype	VLP	Motif de liaison
GI	1	rNV/68	H type 1, 2, 3, A, Le^b
	1	r124	H type 1, 2, 3, A, Le^b
	2	r258	H type 1, 3, A, Le^a
	2	c59	H, A
	3	r645	H type 2, A, Le^a
	3	DSV	Pas de liaison
	3	VA115	Pas de liaison
	4	rCV	H type 1/2, A, Le^a, Le^b
	8	rW18	H type 1/2, A, B, Le^aLe^b
	10	boxer	Le^b, Le^y
GII	1	r485	Pas de liaison
	1	rHV	Pas de liaison
	2	BUDS	A,B
	3	r18-3	H type 3, A, B
	3	r336	H type 3, A, B
	3	PiV	A, B, Le^b
	3	Mexico	A, B, Le^b
	4	r104	H type 1, 2, 3 A, B, Le^b
	4	VA387	H type 1, 3, A, B, Le^b, Le^y
	4	Grimsby	H, A, B
	5	r754	A, B
	5	MOH	A, B
	6	r7k	H type 2, 3, B, Le^a, Le^b
	6	r445	H type1/2, 3
	7	r10-25	H type 1/2, 3, B, Le^a, Le^b
	9	VA207	Le^x, Le^y
	12	r76	B
	14	r47	Pas de liaison
	16	OIF	Le^a

Les interactions VPL-HBGA ont été analysées en détail et ont montré l'importance du résidu terminal au niveau de HBGA. Par exemple :

- au niveau de l'attachement, trois observations ont démontré l'importance de la présence de α1,2 fucose ou N-acétylgalactosamine dans l'attachement du Norwalk-virus (génotype GI.1) sur les antigènes H, A et Le^b :

- en absence du résidu α1,2 fucose, cette souche ne peut se fixer sur l'antigène H ;
- un traitement à l'α1,2 fucosidase annule l'attachement de cette souche sur les cellules épithéliales de surface de la jonction gastroduodénale ;

- des études de cristallisation ont montré l'interaction entre la capside virale de cette souche et les résidus α1,2 fucose N-acétylgalactosamine (Shirato H., 2011).

- au niveau de la spécificité d'espèce, des VLPs préparées à partir des souches GIII isolées de veaux ont montré l'existence possible d'un réservoir animal. En effet, ces souches reconnaissent le résidu α-gal, antigène ressemblant à l'antigène B du groupe sanguin par la présence d'un galactose lié en α1,3 à un autre résidu galactose mais celui-ci n'est pas fucosylé. Or, cet épitope α-gal n'est pas exprimé chez l'homme, il s'exprime seulement sur l'endothélium vasculaire des porcins mais il est retrouvé sur l'endothélium vasculaire et sur les cellules epithéliales digestives des bovins. La spécificité d'espèce du génogroupe GIII est ainsi problablement due à la reconnaissance exclusive de ce résidu sur les cellules cibles bovines (Ruvoen-Clouet N. et *al*, 2013).

Les Norovirus sont capables de distinguer les structures de type 1 des structures de type 2, lors de l'attachement aux antigènes sanguins tissulaires :

- une analyse immunohistochimique a montré que l'interaction entre le Norwalk virus et la jonction gastroduodénale dépend de la présence de l'antigène H de type 1 et non de l'antigène H de type 2 ;

- d'autres analyses permettant de mesurer les interactions protéine-ligand ont montré que :
    - GI.3 et GII.4 fixent plus efficacement l'antigène H de type 2 par rapport à l'antigène H de type 1 ;
    - GI.1, GI.2, GI.3, GI.4, GI.8 et GII.4 fixent plus efficacement l'antigène A de type 2 par rapport à l'antigène A de type 1 ;
    - GI.8 et GII.4 fixent plus efficacement l'antigène B de type 2 que l'antigène B de type 1 (Shirato H., 2011).

III.1.6.2.2 Analyse structurale des interactions Norovirus-antigène tissulaires des groupes sanguins

Le(s) site(s) de fixation du Norovirus à la cellule sont localisés dans le sous-domaine P2 hypervariable de la protéine VP1. Grâce à la co-cristallisation des particules P du Norwalk-virus et d'autres souches telles que GII.4, GII.9, GII.10, GII.12 avec leurs ligands oligosaccharidiques respectifs, l'analyse structurale des interactions entre le domaine P et les HBGA a pu être étudiée.

Ainsi, le site de fixation de la souche prototype Norwalk virus est localisé sur un seul monomère à la surface la plus externe de la capside. Au niveau de ce site :
- six acides aminés ont été mis en évidence dans la liaison spécifique à l'antigène A, et principalement à son résidu α1,3 N-acétylgalactosamine (Ser380, Pro 378, Ser 377, Asp327, His329, Trp375) ;
- sept acides aminés se lient spécifiquement à l'antigène H, et notamment au résidu β1,3 galactose ;
- le résidu α1,2 fucose, commun aux deux antigènes, n'intervient que très peu dans la liaison.
L'interaction entre le domaine P et l'oligosaccharide s'effectue perpendiculairement (figure 34).

Des études de mutagenèse ont montré que trois autres acides aminés, situés près du site de fixation sont importants pour l'attachement du Norwalk-virus (Ser338, Ala430, Tyr 431).

Par ailleurs, la souche VA387 (GII.4) possède un site de liaison localisé à l'interface des deux monomères. C'est le résidu fucose qui interagit d'une part, avec les acides aminés Ser343, Thr344, Arg 345, Asp374 d'un monomère et d'autre part, avec les acides aminés Ser441, Gly442, Tyr443 de l'autre monomère, l'ensemble formant une poche hydrophobe.
Dans ce cas, l'oligosaccharide est positionné "à plat" par rapport à la surface du domaine (figure 35).

Comme pour la souche Norwalk, des études de mutagenèse ont mis en évidence d'autres acides aminés, situés en dehors du site de fixation et impliqués dans la reconnaissance du résidu α1,3 galactose de l'antigène B et du résidu α1,3 N-acétylgalactosamine de l'antigène A : Ala346, Ser441, lys348, Asp391. Les mutations en position 346, 441 et 391 abolissent la fixation du Norovirus GII.4 aux antigènes A et B, alors que la mutation en 348 empêche seulement la reconnaissance de l'antigène A (Ruvoen-Clouet N. et *al*, 2013).

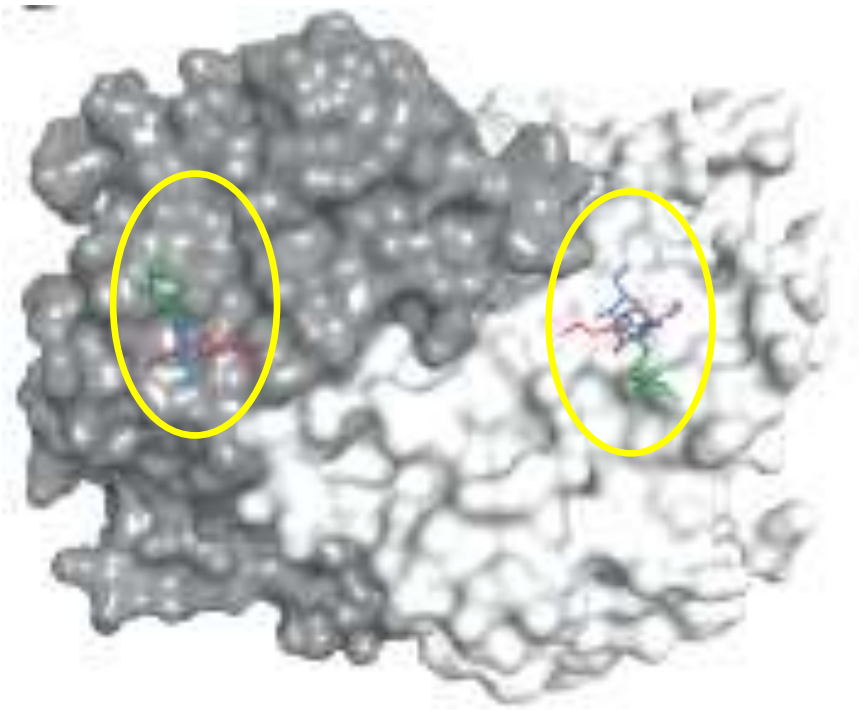


Figure 34 : Analyse structurale des interactions de la souche Norwalk avec les antigènes tissulaires (Ruvoen-Clouet N. et *al*, 2013).

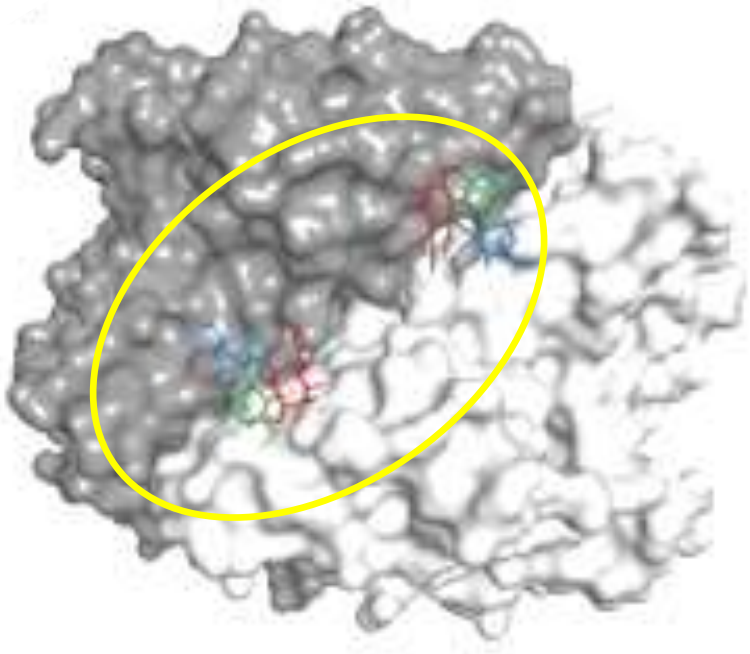


Figure 35 : Analyse structurale des interactions du génotype GII.4 avec les antigènes tissulaires (Ruvoen-Clouet N. et *al*, 2013)

III.1.7 L'immunité innée de la population

La dynamique des populations joue un rôle important dans l'émergence de nouveaux pathogènes. En effet, si une population est largement résistante à un variant, du fait de l'immunité de population, permettant ainsi de réduire le risque d'infection des individus naïfs à un pathogène grâce à leur proximité avec des individus immunisés, il va se produire ce qu'on appelle "un échappement de l'immunité". Il a été montré que les virus évoluent rapidement en présence d'une forte immunité des populations (Donaldson E-F. et *al*, 2010).

En prenant l'exemple du NoV GII.4, les analyses phylogéniques montrent une dérive génétique, avec l'apparition de nouveaux variants tous les deux à sept ans, correspondant à une évolution périodique par échappement à l'immunité de population tels le variant Bristol (1987-1994), le variant Grimsby US95/96 (1995-2001), le variant Farmington (2002-2004), les variants Hunter et Chiba (2004-2006), les variants DenHaag et Yerseke (2006-2009), (Ruvoen-Clouet N. *and al*, 2013) le variant New Orleans (2009-2012) et récemment le variant de Sydney (depuis 2012) (Eden J-S. et *al*, 2014). Depuis 2002, le remplacement des souches s'est accéléré, provoquant d'importantes épidémies tous les 1-2 ans. Des études immunologiques à l'aide de sérums polyclonaux (humains et murins) et d'anticorps monoclonaux humains et murins ont mis en évidence trois épitopes bloquants (figure 36) dans le domaine P des souches GII.4 (Ruvoen-Clouet N. et *al*, 2013) : l'épitope A essentiellement reconnu par les sérums polyclonaux humains, l'épitope D particulièrement important car il peut altérer la liaison aux antigènes de groupe sanguin et l'épitope E (Debbink K. *et al*, 2012).

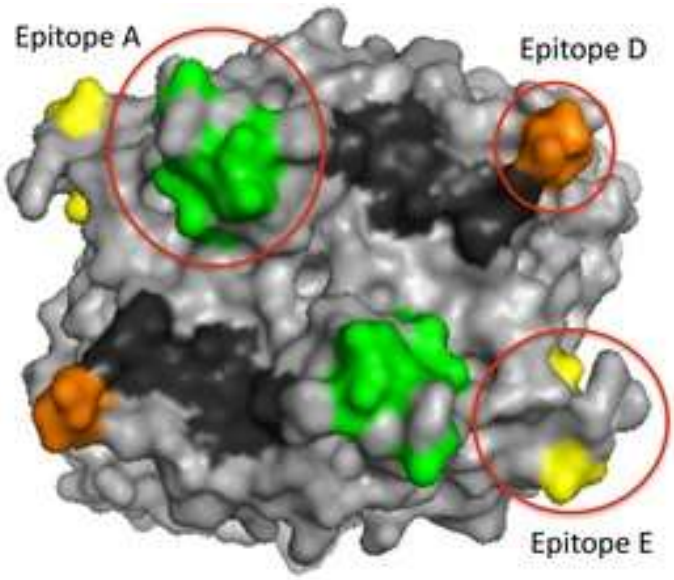


Figure 36 : Mise en évidence des épitopes bloquants chez le Norovirus GII.4 (Debbink K. *et al*, 2012)

Au cours de ces 20 dernières années, ces sites antigéniques ont évolué par accumulation de mutations au niveau du domaine P de la capside (figure 37) et ont ainsi induit un phénomène d'échappement à l'immunité, avec la formation de nouveaux variants épidémiques (Ruvoen-Clouet N. et *al*, 2013). Ces modifications antigéniques aboutissent également à des modifications des interactions avec les HBGAs (Debbink K. *et al*, 2012). Ainsi, bien qu'un maintien global de la capacité de reconnaissance des HBGAs par les Norovirus ait été observé, ces mutations induisent une augmentation de l'affinité et du nombre de motifs glycanniques reconnus, conduisant même à la reconnaissance d'individus non secréteurs/Lewis positifs pour certains variants (tableau XIII).
L'émergence de nouveaux variants semble ainsi être due, à la fois à l'immunité de population et au polymorphisme génétique de l'hôte (Ruvoen-Clouet N. et *al*, 2013).

Concernant les souches du génogroupe GI, des études récentes ont montré d'importantes réactions croisées des anticorps dirigés contre les souches de ce génogroupe, contrairement au génogroupe GII (Donaldson E-F. et *al*, 2010), ce qui explique la faible fréquence d'infections observées au sein des populations humaines (Debbink K. et *al*, 2012).

	A							D				E		
VLPs	294	296	297	298	368	372		393	394	395		407	412	413
GII.4.1974	G	S	H	D	T	N		D	-	H		N	S	G
GII.4.1987	V	S	H	D	T	N		D	-	H		N	T	G
GII.4.1997	A	S	H	D	T	N		D	-	H		N	T	G
GII.4.2002	A	T	H	N	N	N		N	G	A		S	T	G
GII.4.2002a	A	T	H	N	N	N		N	G	T		S	T	G
GII.4.2004	A	A	Q	N	S	S		S	T	T		D	D	S
GII.4.2005	P	T	R	T	A	D		S	S	A		D	T	V
GII.4.2006	A	S	R	N	S	E		S	T	T		S	N	V
GII.4.2009	P	S	R	N	A	D		S	T	T		S	N	I

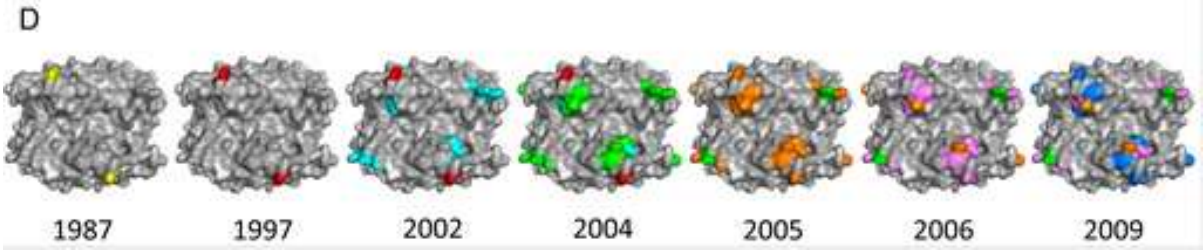
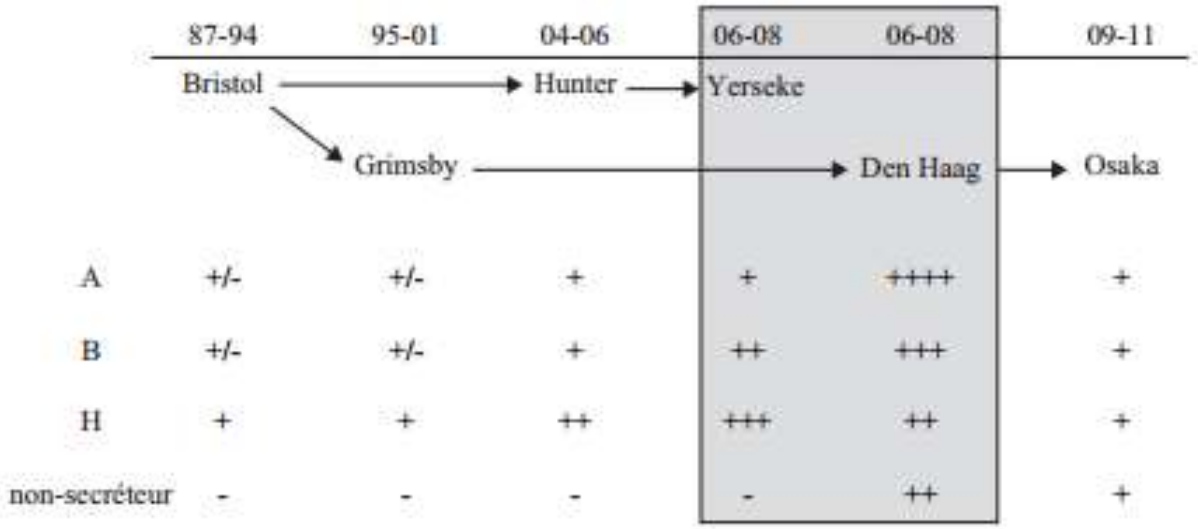


Figure 37 : Variations antigéniques du génotype GII.4 (Debbink K. *et al*, 2012)

Tableau XIII : Evolution des interactions entre les différents variants de GII.4 et les HGBAs (Ruvoen-Clouet N. et*al*, 2013)



III.2 Diagnostic virologique des infections à Norovirus

Durant de nombreuses années après la découverte du Norwalk virus en 1972, la microscopie électronique était la seule méthode permettant de détecter des Norovirus. Plus récemment, la technique de *reverse transcription polymerase chain réaction* (RT-PCR), plus sensible, est devenue la technique de référence pour la recherche de ces virus (Anderson Monteiro Siquiera J. et *al*, 2011). Le diagnostic de routine peut être réalisé par des tests immuno-enzymatiques et immuno-chromatographiques commercialisés pour une détection facilitée et plus rapide des antigènes de Norovirus présents dans les selles de patients souffrant de gastroentérite (Guadagnucci Morillo S. et *al*, 2011).

III.2.1 Les prélèvements

Les échantillons de choix pour la détection des Norovirus sont les selles. D'autres échantillons peuvent également être utilisés pour le diagnostic, mais avec une sensibilité moindre par rapport aux selles : des vomissures, des écouvillons rectaux ou des échantillons de bains de bouche après des vomissements (Kirby A. *and* Iturriza-Gómara M., 2012).

III.2.2 La microscopie électronique

Ce fut le premier outil utilisé pour identifier le Norovirus. Cette technique est peu sensible, elle nécessite des concentrations supérieures à 10^6 particules/mL de selles (Atmar R-L. *and* Estes M-K, 2001) et exige un personnel hautement qualifié, ainsi que des installations coûteuses. Cependant, elle pourrait permettre un diagnostic très précoce de l'infection et l'identification éventuelle d'autres virus pathogènes (Kirby A. *and* Iturriza-Gómara M., 2012). Cette méthode n'est plus utilisée en diagnostic de routine.

III.2.3 Les tests d'immunodiagnostic

Plusieurs tests ont été développés à la fin des années 1970 et dans les années 1980 (Hall A-J. *et al*, 2011) pour une détection rapide des antigènes des Norovirus présents dans les selles, grâce à des anticorps spécifiques. Cependant, la diversité antigénique des Norovirus pourrait les remettre en cause (Kirby A. *and* Iturriza-Gómara M., 2012). Afin de palier à cet inconvénient et pouvoir détecter les souches nouvelles, ces tests requièrent l'utilisation d'anticorps présentant une réactivité croisée entre les génogroupes et/ou génotypes. Ils doivent donc utiliser des anticorps monoclonaux ou polyclonaux dirigés contre un panel de différents VLPs (Costantini V. *et al*, 2010).

Deux méthodes d'immunodiagnostic sont actuellement développées :
- la méthode immuno-enzymatique ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) ;
- la méthode d'immunochromatographie.

III.2.3.1 *E.L.I.S.A.*

Deux tests sont commercialisés pour la détection simultanée des Norovirus de génogroupes I et II : RIDASCREEN® et IDEIA® (Kirby A. et Iturriza-Gómara M., 2012).

- RIDASCREEN® (troisième génération) : ce kit utilise la méthode ELISA sandwich (figure 38). Des anticorps monoclonaux spécifiques dirigés contre les antigènes de plusieurs génotypes sont adsorbés à la surface des puits d'une microplaque. Une suspension de l'échantillon des selles à analyser est mise à incuber dans les puits de la microplaque ainsi que des anticorps monoclonaux de détection (anti-Norovirus) marqués à la biotine. Après un lavage, qui permet d'éliminer l'excédent des anticorps de détection libres, un complexe streptavidine-peroxydase (se liant à la biotine) est à son tour ajouté. Le complexe anticorps monoclonal-antigène-anticorps de détection conjugué avec le complexe biotine-streptavidine-peroxydase est alors mis en évidence lors de l'ajout du substrat. La réaction enzymatique induit un changement de couleur de la solution (présence d'une coloration bleue devenant jaune lors de l'ajout du réactif d'arrêt). L'extinction est ainsi proportionnelle à la concentration en Norovirus présents dans l'échantillon (R-Biopharm AG, 2010).

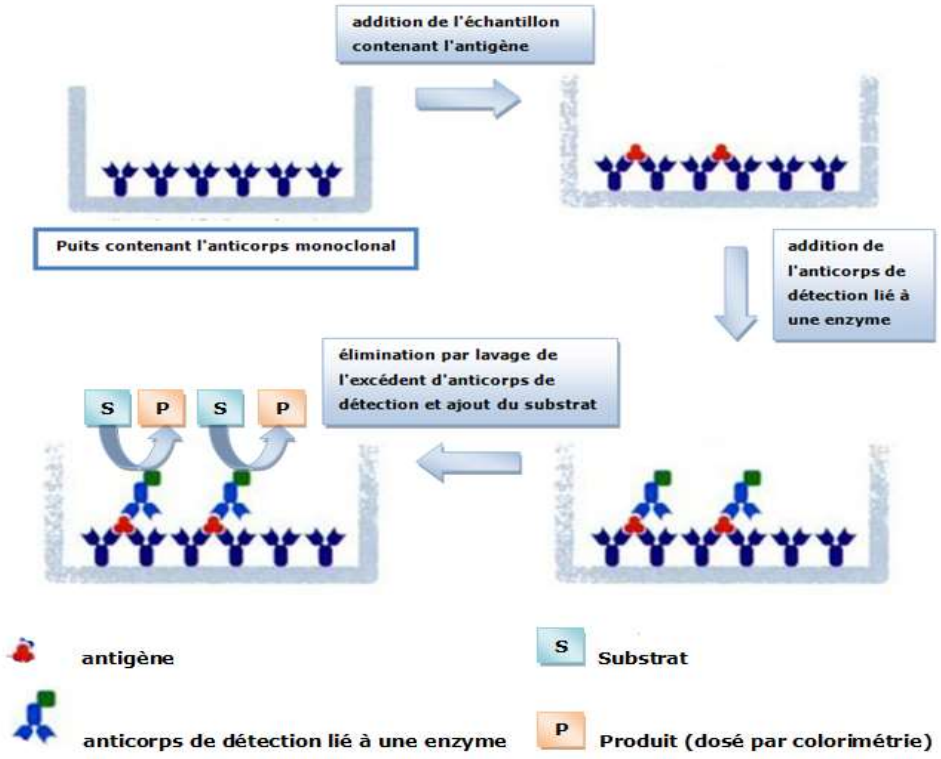


Figure 38 : Schéma simplifiée de la méthode ELISA sandwich (De Franco A. et *al*, 2009)

Ce test a été évalué comparativement à la RT-PCR (méthode de référence). L'évaluation repose sur la comparasion des valeurs de sensibilité et spécificité. La sensibilité est alors définie comme le pourcentage des échantillons "vrai-positifs" (positifs par RT-PCR) qui sont également positifs par RIDASCREEN®, alors que la spécificité est définie comme le pourcentage des échantillons "vrai-négatifs" qui sont également négatifs par RIDASCREEN®. Une étude d'évaluation de ce test, réalisée au Brésil et publiée en 2011 a montré une spécificité de 83,3% et une sensibilité de 93%. En effet, sur 92 échantillons de selles provenant d'enfants souffrant de diarrhées aiguës, 46 ont été positifs aux deux techniques (RT-PCR et RIDASCREEN®), 4 ont été positifs seulement à la technique RT-PCR et 7 ont été seulement positifs au test RIDASCREEN® (tableau XIV).

Tableau XIV: Détection de Norovirus dans les selles des enfants brésiliens (en 2011) par RT-PCR et RIDASCREEN® (Anderson Monteiro Siqueira J. et *al*, 2011)

		RT-PCR		TOTAL
		+	-	
RIDASCREEN®	+	46	7	53
	-	4	35	39
TOTAL		50	42	92

Spécificité = 35/42 = 83.3%

Sensibilité = 46/50 = 92%

De plus, parmi les 7 échantillons positifs par le test RIDASCREEN®, 6 ont été positifs par la technique RT-PCR semi-nichée, considérée comme encore plus sensible. Ces données renforcent la spécificité de ce test ELISA commercial.

Les résultats de plusieurs études (tableau XV) ont mis en évidence des différences de valeurs de sensibilité et spécificité (Anderson Monteiro Siqueira J. et *al*, 2011).

Ces différences peuvent être liées à des facteurs tels que la diversité des génotypes (par exemple, GI.1 et GII.4 seront détectés avec une haute sensibilité, alors que GI.4, GI.5, GI.7 ne seront pas détectés), le nombre d'échantillons de selles examiné (la spécificité étant de 49.5% dans le cas d'un échantillon unique), des différences de sensibilité des techniques de RT-PCR (méthode de référence), les conditions de conservation des échantillons (possibilité de dégradations protéolytiques si le temps de conservation est long), les méthodes pré-analytiques de préparation des échantillons dans chaque évaluation, des modifications du test (nouvelles générations du test)...

Quoi qu'il en soit, le test RIDASCREEN® troisième génération a démontré une meilleure sensibilité (par rapport aux tests de première et deuxième générations) et une haute spécificité, ce qui fait de ce test, une alternative rapide et facile à la RT-PCR, notamment pour les centres qui n'ont pas accès à des méthodes de biologie moléculaire (Guadagnucci Morillo S. et *al*, 2011).

Tableau XV : Sensibilité et spécificité comparées des tests RIDASCREEN® Norovirus et RT-PCR lors de différentes études (Anderson Monteiro Siqueira J. et *al*, 2011)

Localisation	Sensibilité	Spécificité	Année de l'étude
Brésil	92%	83.3%	2011
Europe centrale	43.8%	96.4%	2007
Canada	80.3%	100%	2007
Espagne	59%	73.1%	2007
Pays-Bas	36%	88%	2006
Japon	76.3%	94.9%	2006
Venezuela	60%	95.7%	2006
Australie	71%	47%	2005
Allemagne	34.6%	65.3%	2004

- IDEIA® : ce test repose également sur la méthode ELISA sandwich. Le principe est identique au test précedent, mais il utilise des anticorps de détection monoclonaux et polyclonaux. Il permet de détecter les souches des génogroupes I et II, mais il ne les distingue pas entre eux (Oxoid, 2013).

Selon une étude publiée en 2010, ce test montre une excellente spécificité (91.6%), mais une faible sensibilité (57.6%), ainsi qu'une mauvaise valeur prédictive négative (59%). Ces chiffres indiquent donc qu'un résultat positif est fortement correlé à la présence de Norovirus, mais qu'un résultat négatif doit être confirmé par RT-PCR. Plusieurs facteurs peuvent aussi être à l'origine de la faible sensibilité :

- une collecte de selles plus de 72 h après l'apparition des premiers symptômes, d'où une concentration trop faible de virus dans les selles, sachant qu'il faut au moins 10^7 virions/g de selles pour obtenir un signal positif ;

- un temps de conservation des échantillons trop long (> 72h) pouvant ainsi diminuer le taux de virus lié à une dégradation protéolytique ;

- les critères d'inclusion, c'est-à-dire l'inclusion des échantillons provenant de patients présentant des symptômes caractéristiques de l'infection à Norovirus ;

- le nombre d'échantillons ;

- la diversité antigénique : 18 des 21 génotypes sont détectés, seuls GI.8, GII.10 et GII.16 ne le sont pas.

Finalement, cette étude montre que le test IDEA peut être utilisé pour une détection rapide sur des échantillons de selles collectés lors d'épidémies et préférentiellement dans les 48h après les premiers symptômes, les résultats négatifs devant être confirmés par RT-PCR (Costantini V. et *al*, 2010).

III.2.3.2 Les tests immunochromatographiques

L'immunochromatographie sur membrane consiste à déposer l'échantillon à analyser à l'extrémité d'une membrane de cellulose fixée sur un support, sur laquelle sont déposés des anticorps marqués, le plus souvent à l'or colloïdal. Si l'échantillon contient les antigènes recherchés, il y a formation du complexe antigène-anticorps marqué présent sur la membrane. Celui-ci migre alors par capillarité le long de la membrane, jusqu'à ce qu'il soit arrêté par des anticorps de capture et une bande colorée apparait au niveau de la zone test "T" si le test est positif (Dupeyron C. et Bourée P., 2013). L'apparition d'une bande colorée dans la zone de contrôle "C" , due à la capture des anticorps marqués à l'or non complexés par des anticorps spécifiques, témoigne du bon fonctionnement du test (R-Biopharm AG., 2012). Ce test a l'avantage d'être simple et rapide, la réponse étant obtenue en 15 à 20 min (figure 39).

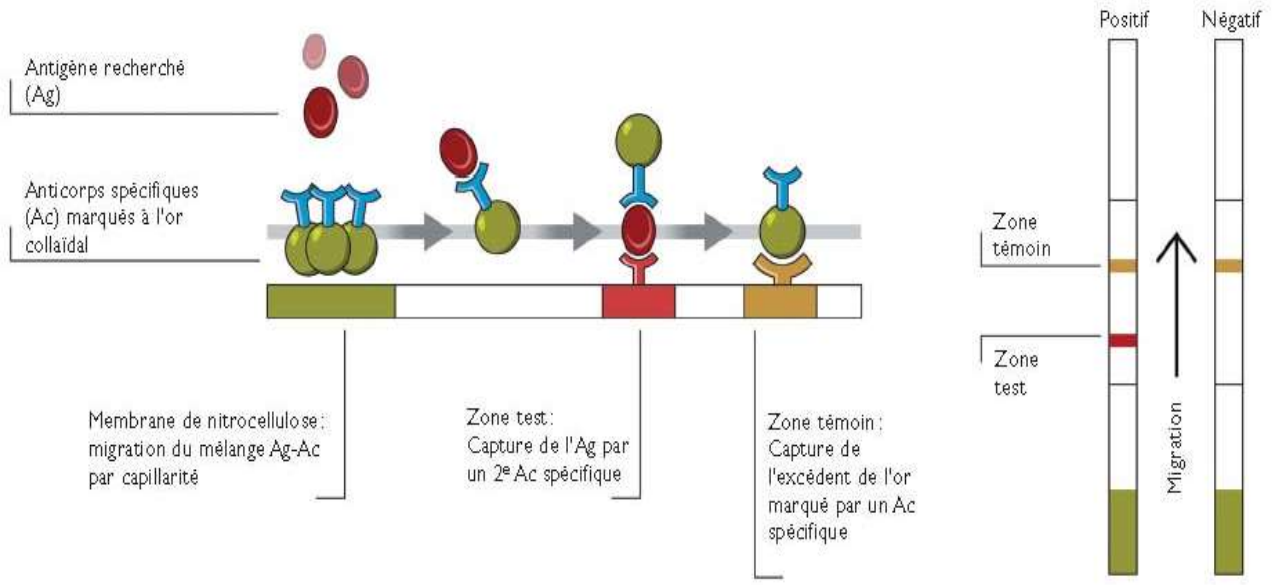


Figure 39 : Fonctionnement du test immunochromatographique sur membrane de nitrocellulose (Prod'hom G. et Bille J., 2008)

A ce jour, 5 tests immunochromatographiques sont commercialisés sur le marché français pour la détection des Norovirus de génogroupes I et II: *RIDAQuick® Norovirus 1ère génération* (*R-Biopharm*), ImmunoCardSTAT® Norovirus (Meridian Bioscience Europe), Norotop® (*All Diag SA*), *SD Bioline Norovirus* (*Standard Diagnostics, Inc*.) et *actimNoro* (*OyMedixBiochemica Ab*). Ils ont été évalués au Centre National de Référence du CHU de Dijon (CNR). Les valeurs de sensibilité et spécificité respectives comparées à celles de RT-PCR sont regroupées dans les tableaux XVI et XVII.

L'excellente spécificité de ces tests suggère que tous les résultats positifs sont fiables, d'autant plus qu'aucune réaction croisée n'a été démontrée (CHU-Dijon, 2014). Cependant, la sensibilité est génotype-dépendant, les résultats varient considérablement en fonction de la souche responsable de l'infection. Sachant que les meilleures valeurs de sensibilité sont retrouvées pour la souche GII.4 qui est prédominante dans les épidémies, ces tests peuvent être utilisés pour un diagnostic rapide d'une épidemie à Norovirus. En effet, dans ce cas, plusieurs échantillons sont testés et seules quelques réponses positives sont nécessaires pour confirmer l'étiologie. Les résultats négatifs doivent être confirmés par RT-PCR (Ambert Balay K. et Pothier P., 2013).

Tableau XVI : Evaluation de la sensibilité (nombre de positifs/nombre d'échantillons testés) des 5 kits d'immunochromatographie pour la détection des Norovirus (CHU-Dijon, 2014).

	RIDAQuick®	ImmunoCard STAT® Norovirus	Norotop®	SD Bioline Norovirus	ActimNoro
Globale	52% (113/218)	35% (62/175)	51% (76/148)	41% (78/189)	56% (45/80)
Génogroupe I	17% (10/58)	22% (13/49)	52% (32/61)	23% (19/81)	43% (13/30)
Génogroupe II	64% (103/160)	39% (49/126)	50% (44/87)	54% (59/108)	64% (32/50)
Génotype II.4	78% (60/77)	59% (32/54)	61% (17/28)	64% (22/33)	73% (11/15)

Tableau XVII : Evaluation de la spécificité (nombre de positifs/nombre d'échantillons testés) des 5 kits d'immunochromatographie pour la détection des Norovirus (CHU-Dijon, 2014).

	RIDAQuick®	ImmunoCard STAT® Norovirus	Norotop®	SD Bioline Norovirus	ActimNoro
Négatifs Tout virus	100% (0/62)	100% (0/26)	100% (0/25)	100% (0/22)	90% (2/20)
Positifs Autres virus	100% (0/21)	100% (0/21)	100% (0/21)	100% (0/21)	100% (0/10)
Globale	100% (0/83)	100% (0/47)	100% (0/46)	100% (0/43)	93% (2/30)

III.2.4 Les tests moléculaires

Les tests moléculaires augmentent considérablement la sensibilité analytique par l'amplification de l'ARN viral après extraction de l'acide nucléique de l'échantillon mais ils se heurtent à la diversité moléculaire des virus. C'est pourquoi des amorces d'oligonucléotides complémentaires de la région la plus conservée du génome des Norovirus, c'est-à-dire celle entourant la jonction entre ORF1 et ORF2, sont utilisées (Kirby A. et Iturriza-Gómara M., 2012).

III.2.4.1 RT-PCR

"L'amplification par polymérisation en chaîne (PCR) est une méthode d'amplification génique *in vitro,* qui permet de dupliquer en grand nombre (de l'ordre du milliard) une séquence d'acides nucléiques connue au sein d'une faible quantité d'acide nucléique servant de matrice."

Plusieurs étapes sont nécessaires à la RT-PCR : l'acide nucléique est d'abord purifié à partir de l'échantillon à analyser ; l'ARN viral est ensuite transcrit en ADN complémentaire (ADNc) par la *reverse transcriptase* en utilisant des amorces oligo-nucléotidiques spécifiques des Norovirus ; enfin c'est l'étape d'amplification au cours de laquelle l'ADNc est amplifié par une polymérase en présence des amorces oligo-nucléotidiques spécifiques des Norovirus (Kirby A. et Iturriza-Gómara M., 2012). Cette dernière étape est basée sur une répétition de cycles, selon trois étapes (figure 40) :

- dénaturation : séparation des deux brins de l'acide nucléique à amplifier grâce à une température supérieure à 95 °C

- hybridation de l'amorce oligo-nucléotidique sur la séquence à amplifier à une température d'environ 60 °C

- élongation de l'acide nucléique par des enzymes appelées « polymérases » à une température de 72 °C.

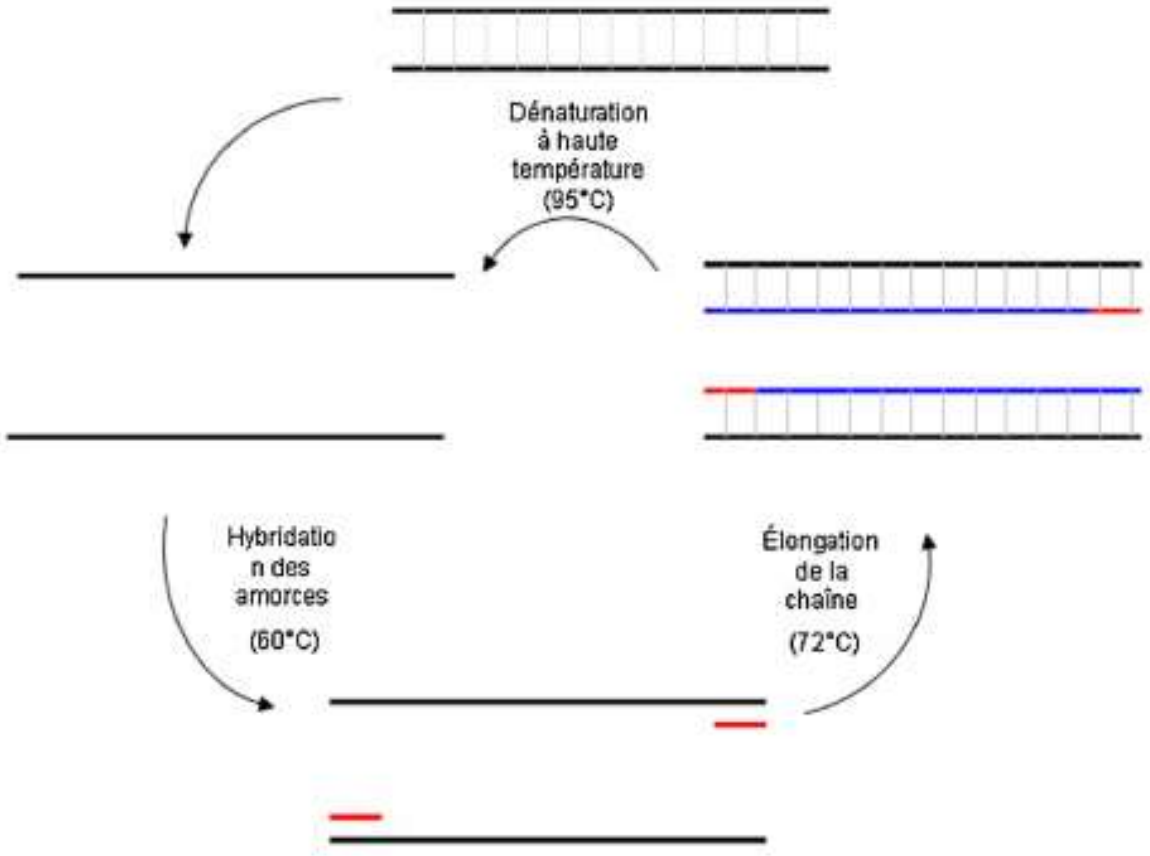


Figure 40 : Schéma de déroulement d'une PCR (Torres-Frenkian A. et Toledo M., 2014)

Les produits issus de la PCR, appelés amplicons, peuvent être détectés par électrophorèse sur gel d'agarose. Les fragments d'acides nucléiques sont chargés négativement et ainsi, migrent sous l'action d'un champ électrique, selon leur masse moléculaire. Une coloration au bromure d'éthidium (révélée sous lampe ultra-violet) permet d'observer la position des bandes présentes sur le gel d'agarose (ce qui représente l'empreinte génétique) (Torres-Frenkian A. et Toledo M., 2014).

III.2.4.2 RT-PCR en temps réel

La détection des amplicons peut être également réalisée en utilisant la méthode RT-PCR en temps réel ou RT-PCR quantitative (Torres-Frenkian A. et Toledo M., 2014).

C’est une méthode dérivée de la RT-PCR permettant de quantifier à chaque cycle d'amplification, l'acide nucléique grâce à un marqueur fluorescent. L'émission de fluorescence est ainsi directement proportionnelle à la quantité d'amplicons formés.

Cette technique assure au test une grande spécificité, ainsi qu'une meilleure sensibilité. Ce test peut être réalisé soit :

- en 2 étapes, dans lesquelles la phase de reverse transcription et la phase de PCR sont exécutées séparément, ce qui permet d'utiliser soit des amorces aléatoires, soit des amorces spécifiques dans l'étape de reverse transcription. Dans le cas de l'utilisation d'amorces aléatoires, ce test peut être utilisé pour des amplifications d'autres fragments d'acides nucléiques "cibles", non seulement d'agents pathogènes autres que le Norovirus, mais aussi d'autres régions du génome des Norovirus. Il peut être utile pour le génotypage ou le suivi des épidémies.

- en 1 étape, au cours de laquelle les deux processus sont effectués en une seule réaction et qui utilise des amorces oligonucléotidiques spécifiques de la cible. Ce test est rapide, et diminue le risque de contamination croisée, par la réduction du nombre de manipulation (Kirby A. et Iturriza-Gómara M., 2012).

Le résultat d'une PCR est représenté graphiquement (valeur de la fluorescence en fonction du nombre de cycles) sous la forme d'une courbe sigmoïde. A partir de ce graphique (figure 41), la notion de "cycle seuil" ou "Ct", qui est la base d'une quantification précise et reproductible de la PCR en temps réel est définie comme le nombre de cycles requis pour atteindre un point où le signal d’émission de fluorescence sera significativement plus élevé que le bruit de fond. Celui-ci apparait toujours au cours de la phase exponentielle d'amplification. Plus il y a de matrices à amplifier au départ, plus le Ct sera faible (Poitras E. et Houde A., 2002).

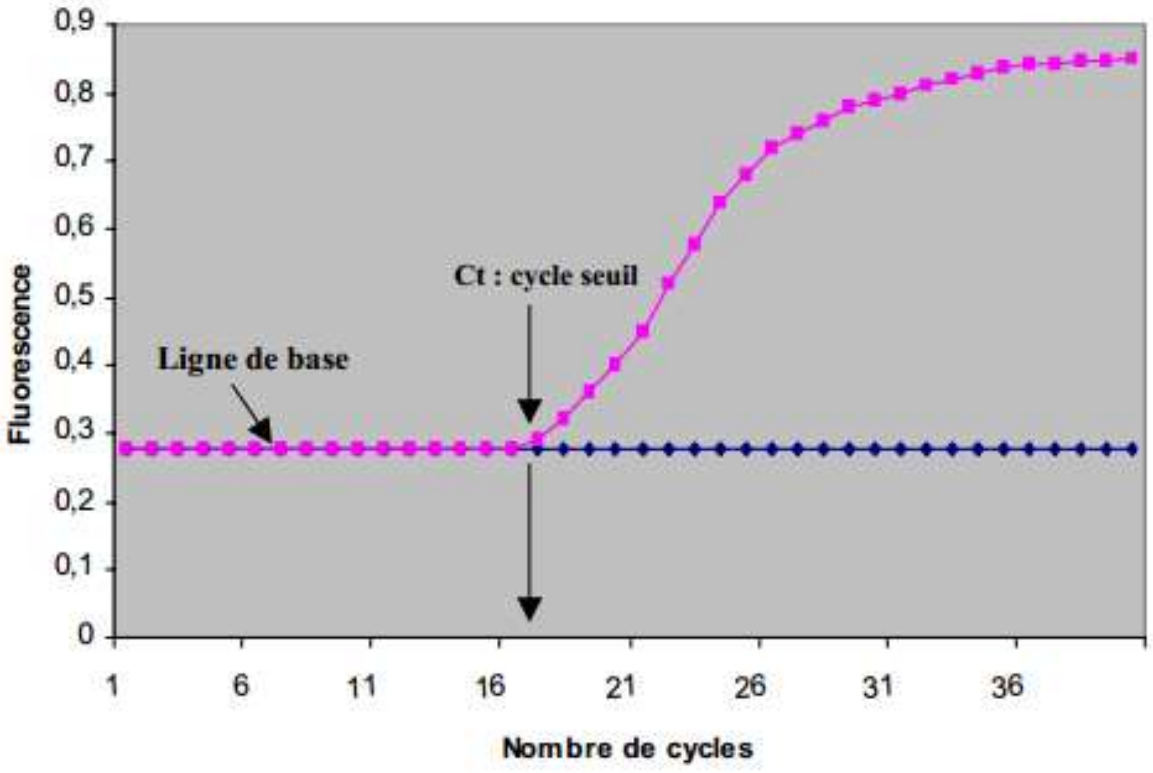


Figure 41 : Modèle graphique de la PCR en temps réel (d'après Poitras E. et Houde A., 2002)

A l'aide de cette méthode, des études ont été réalisées afin de différencier les individus symptomatiques des porteurs sains excrétant le Norovirus : une valeur "cible" de Ct a été définie pour distinguer les deux cas avec une sensibilité de 72% et une spécificité de 89%. Cependant, ces valeurs "cibles" de Ct ne peuvent être comparées entre différents centres de diagnostic car ils peuvent varier selon le matériel et les réactifs utilisés (amorces, thermocycleurs...) (Kirby A. *and* Iturriza-Gómara M., 2012).

Des travaux sont en cours, au niveau européen, pour la normalisation des méthodes d'analyse dans les aliments (eaux, fruits frais, légumes, coquillages) et sur les surfaces alimentaires. Après une étape d'élution-concentration des virus, une détection par RT-PCR en temps réel (utilisant une sonde d'hybridation) est mise en oeuvre selon une approche qualitative ou quantitative (AFSSA, 2011).

III.2.4.3 PCR multiplex

Cette méthode permet l'incorporation d'amorces nucléotidiques de plusieurs agents pathogènes gastro-intestinaux dans un même tube, elle peut ainsi incorporer différents génogroupes de Norovirus dans une même réaction et être réalisée en temps réel (Kirby A. *and* Iturriza-Gómara M., 2012). L'étude publiée en 2013 a montré une haute sensibilité et une haute spécificité lors de la détection simultanée de trois génogroupes (I, II et IV) de Norovirus (mais aussi d'autres agents viraux et non viraux responsables de GEA) par RT-PCR multiplex. Elle a mis en évidence une bonne cohérence des résultats avec les essais monoplex correspondants pour la détection des génogroupes I, II et IV des Norovirus (Yana Y et *al*, 2013).

La technique de RT-PCR multiplex en temps réel est limitée par le nombre de molécules fluorescentes disponibles avec l'utilisation d'une source lumineuse monochromatique. En effet, le spectre de longueur d'onde (de cette source lumineuse monochromatique) réduit le nombre de molécules fluorescentes qui peuvent induire des réactions sans interférence et ainsi la possibilité de distinguer les différents génomes viraux, ceci étant dû aux différents signaux de fluorescence (Candotti D. et Allain J-P., 2007). A l'heure actuelle, il est possible d'identifier 4 à 6 génomes distincts dans une même réaction (Kirby A. et Iturriza-Gómara M., 2012).

Ainsi, la technique RT-PCR multiplex Luminex est basée sur l'utilisation de microsphères de polystyrène identifiées par un mélange de deux fluorochromes à proportions variables (on peut ainsi définir jusqu'à 100 types de microsphères). Chacune de ces billes est recouverte d'oligonucléotides spécifiques d'un allèle (ou sondes) (Hamza I-A. et *al*, 2014). L'ARN cible est d'abord amplifié par PCR en utilisant des amorces biotinylées. Les amplicons biotinylés obtenus sont ensuite dénaturés. Ils se fixent aux sondes spécifiques présentes à la surface des billes. Cette fixation est révélée par de la streptavidine conjuguée à la phycoérythrine, la streptavidine se liant à la biotine des amplicons (Moalic V. et *al*, 2004), par cytométrie en flux (figure 42). L'échantillon contenant les microsphères est aspiré dans un liquide de gaine et les microsphères passent les unes après les autres devant les deux lasers du cytomètre en flux. Le laser rouge, en excitant les fluorochromes incorporés dans les microsphères permet d'identifier le type de microsphère lu. Le laser vert excite la phycoérythrine, si elle est présente, et rend compte de la positivité d'un échantillon pour un allèle donné (Hamza I-A. et *al*, 2014).

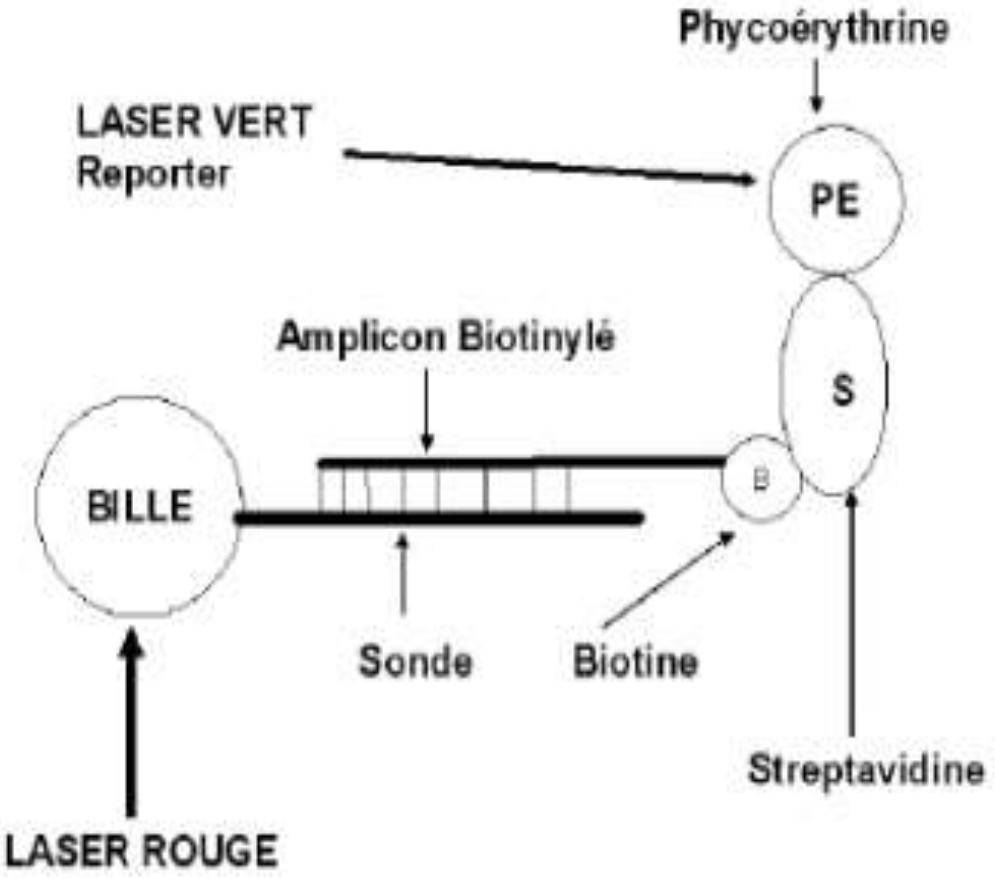


Figure 42 : Détection d'allèles spécifiques avec la technologie Luminex (Moalic V. et *a*l, 2004)

Cette technologie a été utilisée pour détecter cinq agents pathogènes gastro-intestinaux, les valeurs de sensibilité et spécificité étaient supérieures à 94% pour les génogroupes I et II des Norovirus (tableau XVIII) par rapport à la technique RT-PCR en temps réel monoplex (Kirby A. *and* Iturriza-Gómara M., 2012).

Tableau XVIII : Sensibilité et spécificité comparées de la technique RT-PCR Luminex pour la détection d'agents pathogènes gastro-intestinaux (Liu J. et *al*, 2010)

Virus	Sensibilité	Spécificité
Adenovirus	1	1
Astrovirus	1	1
Norovirus GI	0.94	0.94
Norovirus GII	1	0.95
Rotavirus	0.97	0.97
Sapovirus	0.88	0.88

III.2.4.4 La spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse quantitative, basée sur la méthode AQUA (figure 43) est un outil prometteur pour la surveillance des Norovirus. Elle est rapide, sensible et robuste face à des interférences de l'environnement (par exemple, lors de la présence d'autres agents pathogènes dans l'échantillon). Les peptides biomarqueurs de la capside virale ont été détectés à 500 amol par électrospray et à 100 amol par MALDI (*matrix-assisted laser desorption/ionization),* représentant $1{,}67.10^{6}$ et $3{,}34.10^{5}$ virions, respectivement (ce qui représente bien la masse cible de virus excrétée/mL de selles diarrhéiques) (Hartmann E-M. et *al*, 2015).

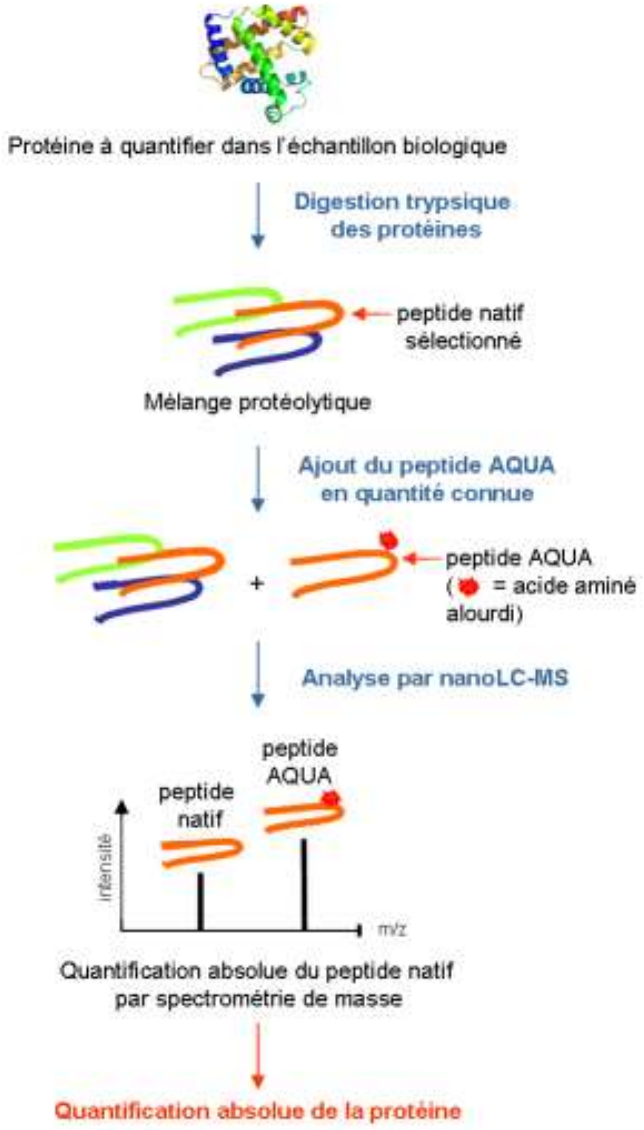


Figure 43 : Schéma de la méthode AQUA (spectrométrie de masse quantitative)

Un peptide natif issu de la digestion de la protéine à quantifier est sélectionné selon plusieurs critères pour représenter la protéine . Le peptide AQUA est un peptide synthétique possédant la même séquence que le peptide natif mais qui comporte un acide aminé alourdi par un isotope stable (ceci permet d'augmenter la masse du peptide). Ce peptide est donc ajouté à l'échantillon (après digestion trypsique) en quantité connue, c'est l'étalon interne. L'échantillon est ensuite analysé par nano chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse (nano LC-MS). Les deux peptides sont détectés au même temps de rétention, possèdent les même propriétés d'ionisation mais sont distingués en SM par leur différence de masse. La quantité de peptide peut ainsi être déterminée à partir du rapport d'intensité observé entre les deux signaux (Genouest, 2015).

IV. Traitement

A ce jour, il n'existe pas de traitement antiviral contre les Norovirus. Seuls des traitements symptomatiques sont mis en place. Pourtant, du fait de l'incidence de ces infections et de l'importante morbidité qu'elles causent notamment chez les patients immunodéprimés, le développement d'une stratégie antivirale pour traiter et/ou prévenir ces infections s'impose de façon urgente. Ainsi, de nombreuses recherches sont effectuées sur des molécules à activité antivirale (Rocha-Pereira J. et *al*, 2014c).

IV.1 Traitement symptomatique des infections à Norovirus

Du fait qu'aucun traitement spécifique n'est disponible à ce jour, le traitement symptomatique est l'esssentiel de la prise en charge des infections à Norovirus.

IV.1.1 La réhydratation

La mesure essentielle de toute diarrhée aigüe est la compensation des pertes en eau et sels minéraux afin de lutter contre la déshydratation (Beaugerie L. et Sokol H., 2013).

Les signes de déshydratation de l'adulte

Les premiers signes de déshydratation sont la soif, les lèvres sèches, une perte de poids > 5%, une fatigue anormale. Si la déshydratation n'est pas rapidement compensée, elle peut s'aggraver. La déshydratation grave se manifeste alors par une soif intense, un regard terne avec des yeux enfoncés, un pli cutané, une peau sèche, froide et pâle, des urines en faible quantité, des maux de tête, des vertiges, des troubles de la conscience, une apathie, une agitation…

Les personnes âgées ressentent peu la soif, la déshydratation est souvent aggravée.

Les signes de déshydratation chez les nourrissons

L'enfant est apathique, il dort beaucoup, il présente des difficultés à se réveiller, il gémit, il est pâle, il a des yeux cernés, il respire vite, il présente une dépression au niveau des fontanelles et une perte de poids > 5% (AMELI, 2014a).

IV.1.1.1 La réhydratation chez l'adulte

En cas de déshydratation débutante (perte de poids < 5%), la compensation hydrosodée doit être réalisée *per os* par des boissons abondantes et des apports salés (biscuits salés, sachets de sel) accompagnés d'apports de glucose, le transport actif de glucose au niveau de l'entérocyte favorisant l'absorption concomitante hydrosodée. En présence de nausées et de vomissements, la réhydratation doit se faire par petites quantités à intervalles réguliers rapprochés.

En cas de déshydratation sévère, l'hospitalisation est nécessaire. Les pertes en eau et sels minéraux sont compensées par voie sous cutanée, par sonde nasogastrique ou voie intraveineuse.

Une alcalinisation par du bicarbonate 14‰ peut être nécessaire, s'il y a présence d'une acidose métabolique avec hypokaliémie (rare) induite par la diarrhée aigüe.

Cas des personnes âgées :

En raison de leur risque de déshydratation grave, la compensation des pertes hydro-électrolytiques doit être réalisée par les solutions de réhydratation orale (SRO). Ces SRO contiennent du sodium, du glucose, du potassium, du chlore et un agent alcalinisant. Ce sont des sachets à reconstituer dans 200 mL d'eau qui doivent être consommés dans les 24h suivant la reconstitution. Le premier jour, les sujets âgés doivent boire un à deux litres de la solution en alternance avec de l'eau. Dès que la diarrhée régresse, l'utilisation des solutions doit être interrompue, afin d'éviter le risque secondaire d'inflation hydrosodée (œdèmes, hypertension artérielle) et d'hypernatrémie (Beaugerie L. et Sokol H., 2013).

IV.1.1.2 La réhydratation chez le nourrisson

Chez le jeune enfant, la déshydratation doit être prise en charge sans en attendre les premiers signes. Il convient alors d'administrer, à volonté, des solutés de réhydratation. Il faut ainsi, donner plusieurs fois par heure, la SRO à boire à l'enfant. En cas de vomissements, il convient de lui donner la solution bien fraîche (la laisser au réfrigérateur), au début toutes les 5 à 10 minutes, à la cuillère. Ensuite, il est conseillé de laisser boire à volonté l'enfant, qui règlera ainsi ses apports à sa soif.

Les parents doivent noter les quantités bues, le nombre de selles et de vomissements, la température et, si possible, peser l'enfant toutes les 4 heures (surtout si âge < 6 mois) (Cléré N., 2014).

Quelle que soit la modalité de réhydratation choisie, les SRO seront utilisés en complément du régime habituel en cas de déshydratation légère (perte de poids < 5 %) et utilisés exclusivement (sauf l'alimentation au sein où il y aura alternance tétées/SRO) s'il s'agit d'une déshydratation modérée (perte de poids entre 5% et 8%) ou sévère (perte de poids > 8%). L'alimentation artificielle, arrêtée pendant la phase de réhydratation et reprise 4 à 6h après le début de la réhydratation peut se faire avec le lait habituel. En effet, une étude montre que plus de 80 % des enfants souffrant de déshydratation légère ou modérée peuvent être traités avec succès par la reprise d'une alimentation avec des laits artificiels non dilués. Le lait sans lactose ne serait indiqué que chez les nourrissons souffrant soit de déshydratation grave, soit de lésions intestinales préexistantes et de malnutrition grave ou bien encore chez ceux dont la diarrhée persiste plusieurs jours. Avant l'âge de deux mois, certains auteurs recommandent de reprendre l'alimentation avec un hydrolysat de protéines du lait de vache mais le bénéfice de cette attitude n'est pas démontré (Hubert P., 2008). Chez les enfants ayant déjà une alimentation variée, il est conseillé de privilégier des aliments suivants : riz, carottes, pommes de terre, viandes de volaille, banane, pomme crue, pomme-coing… (Cléré N., 2014)

Si l'apport oral n'est pas réalisable, la réhydratation entérale par sonde nasogastrique est aussi efficace que la réhydratation IV.

Une déshydratation sévère (perte de poids > 8%) entraine une hospitalisation du nourrrisson et une réhydratation par voie IV.

Une déshydratation moderée (perte de poids entre 5 et 8%) nécessite une éventuelle hospitalisation, dépendant de l'âge du patient, du contexte social, de la clinique (eVidal, 2014c).

IV.1.2 Les anti-diarrhéiques

IV.1.2.1 Le racécadotril (Tiorfan®)

C'est un antisécrétoire intestinal. Il est un complément efficace à la réhydratation (en moyenne, il réduit la durée de la diarrhée d'une journée). La dose à administrer est de 1,5mg/kg/prise ; une prise d'emblée, puis 3 fois par jour au début des repas à J1 et une prise trois fois par jour au début des repas, à partir de J2 (eVidal, 2014c).

IV.1.2.2 Le lopéramide (Imodium®)

Il présente des propriétés inhibitrices du péristaltisme intestinal et anti-sécrétoires. Il est contre-indiqué chez les patients de moins de 2 ans, en cas de diarrhées hémorragiques et/ou accompagnées de fièvre, en cas de diarrhées dues à des bactéries invasives telles que *Salmonella*, *Shigella* et/ou *Campylobacter.*

La posologie de la suspension buvable (enfant de 2 à 8 ans) est de 0,03 mg/kg, 2 à 5 fois par jour tant que persistent les selles liquides, en respectant un minimum de 4 heures entre chaque prise.

La posologie initiale de la forme gélule est de deux gélules chez l'adulte et d'une gélule chez l'enfant (> 8 ans). Après chaque selle non moulée, une gélule supplémentaire sera administrée, sans dépasser 8 gélules par 24 heures chez l'adulte, et 6 gélules chez l'enfant (eVidal, 2014b)

IV.1.2.3 La diosmectite (Smecta®)

Elle permet la réduction du nombre de selles (eVidal, 2014a) et la durée de la diarrhée ; elle joue un rôle de pansement digestif par formation d'une couche homogène tapissant la muqueuse. Elle adsorbe les gaz, l'eau et fixe les éventuelles toxines microbiennes (Cléré N., 2014). C'est un traitement complémentaire à la réhydratation orale. Elle n'a pas d'efficacité démontrée sur la prévention de la déshydratation.

La posologie est de 1 à 4 sachets par jour en fonction de l'âge, à administrer à distance des autres médicaments (intervalle de 2 heures), en complément de la réhydratation (eVidal, 2014a).

« Règles hygiéno-diététiques

Comme vu précédemment, les pertes liquidiennes doivent être compensées : boire 1,5 L d'eau par jour (en évitant les eaux riches en magnésium) et si besoin, recourir aux SRO (notamment chez les nourrissons et les sujets âgés).
L'alimentation doit rester variée. Préférer des féculents sans fibres et des sources d'énergie comme le riz, les pâtes, le pain blanc, ainsi que des viandes blanches et des œufs, sources de protéines. Eviter les aliments riches en fibres et les aliments gras. Les végétaux doivent être consommés cuits (carottes, betteraves, courgettes, coings, poires et bananes sont les légumes et fruits à privilégier). Les produits laitiers sont à éviter (les fromages à pâtes dures, comme le gruyère, peuvent être consommés).
L'hygiène des mains est primordiale » (Derbré S. et Leclerc M-V., 2014).

IV.1.3 Les antiémétisants

Les nausées et vomissements sont fréquents lors de gastroentérite d'origine virale.

IV.1.3.1 La métopimazine (Vogalène®)

Cette molécule est utilisée dans le traitement symptomatique des nausées et vomissements. C'est un antiémétique appartenant à la classe des phénothiazines, caractérisée par une activité anti-dopaminergique sélective en raison de son passage très limité de la barrière hémato-encéphalique. C'est la seule molécule délivrée dans le cadre d'un conseil à l'officine (Vogalib®). La posologie chez l'adulte est de 15 à 30 mg/jour ; chez l'enfant de plus de 6 ans : 7,5 à 15 mg par jour ; chez l'enfant de moins de 6 ans : 1mg/kg/jour (eVidal, 2014d)

IV.1.3.2 La dompéridone (Motilium®)

La dompéridone est utilisée dans le soulagement des nausées et vomissements. C'est un antagoniste de la dopamine aux propriétés antiémétiques qui ne traverse pas facilement la barrière hémato-encéphalique (eVidal, 2014c).

Depuis septembre 2014, de nouvelles recommandations sur l'utilisation de cette molécule visent à minimiser les risques cardiaques. En effet, une réévaluation confirme une légère augmentation du risque d'effets indésirables cardiaques graves liés à l'utilisation de la dompéridone (notamment chez les patients âgés de plus de 60 ans, chez les patients traités par une dose quotidienne de plus de 30 mg ou en cas de prise concomitante de médicaments qui allongent l'intervalle QT ou d'inhibiteurs du cytochrome P450 3A4). De ce fait, la dompéridone doit être utilisée à la dose efficace la plus faible, pour une période la plus courte possible. La durée maximale du traitement ne doit généralement pas dépasser une semaine.

Les nouvelles posologies recommandées sont les suivantes :

- Pour les adultes et adolescents à partir de 12 ans et de 35 kg : 10 mg jusqu'à 3 fois par jour, la dose quotidienne maximale étant de 30 mg.
- Pour les nouveau-nés, nourrissons, enfants (moins de 12 ans) et adolescents de moins de 35 kg : 0,25 mg/kg jusqu'à 3 fois par jour, la dose quotidienne maximale étant de 0,75 mg/kg.

La dompéridone est désormais contre-indiquée chez les patients présentant une insuffisance hépatique modérée ou sévère, en cas d'affections qui allongent ou qui pourraient affecter la conduction cardiaque, en cas d'affections cardiaques sous-jacentes telles qu'une insuffisance cardiaque congestive, ainsi qu'en cas de prise concomitante de médicaments qui allongent l'intervalle QT ou d'inhibiteurs puissants du cytochrome P450 3A4 (ANSM, 2014a).

IV.1.3.3 Le métoclopramide (Primpéran®)

Le métoclopramide est un neuroleptique antagoniste de la dopamine. Il prévient les vomissements par blocage des sites dopaminergiques. Suite à une réévaluation du médicament, en février 2014, l'indication dans le traitement symptomatique des nausées et vomissements est réservée aux adultes. De plus, la dose journalière maximale est 30 mg, répartie en 3 prises et la durée maximale du traitement est de 5 jours (ANSM, 2014b).

« Les règles hygiéno-diététiques

Il est conseillé de fractionner la prise alimentaire en plusieurs petits repas et collations, préférer des repas froids si les odeurs sont écœurantes, manger lentement, maintenir une position assise 30 minutes après les repas et, en cas de position couchée, privilégier le côté droit afin de favoriser la vidange gastrique.
L'hydratation est également primordiale : boire régulièrement entre les repas (eau, infusions, jus de fruits, boissons gazeuses,...) » (Derbré S. et Leclerc M-V., 2014)

IV.1.4 Les antispasmodiques

Les épisodes diarrhéiques sont souvent accompagnés de douleurs abdominales, dues à des spasmes du tube digestif. Des molécules antispasmodiques (seules ou en association à des pansements digestifs ou du charbon) peuvent être administrées : phloroglucinol (Spasfon®, Meteoxane®), trimébutine (Débridat®), pinaverium (Dicetel®), alvérine (Météospasmyl®), mébévérine (EurekaSanté, 2014).

IV.1.5 Les probiotiques/ les levures

Ce sont des micro-organismes vivants, non pathogènes. Des études ont montré leur efficacité (modeste) dans le traitement des gastroentérites aiguës : réduction de la durée de la diarrhée (environ d'un jour) et de la fréquence des selles (Derbré S. et Leclerc M-V., 2014). Selon la société européenne de gastroentérologie, d'hépatologie et de nutrition pédiatriques (ESPGHAN), ces probiotiques pourraient être utilisés dans le traitement des gastroentérites aiguës (en complément de la réhydratation), notamment les *Lactobacillus rhamnosus* et *Saccharomyces boulardii* (niveau de preuve faible, recommandation forte). Il existe des preuves moins convaincantes quant à l'utilisation des probiotiques tels que *Lactobacillus reuteri* et *Lactobacillus acidophilus* (Szajewska H. et *al*, 2014).

L'efficacité des probiotiques doit être confirmée dans les gastroentérites à Norovirus, notamment après la découverte récente de l'implication de la flore commensale dans l'infection des lymphocytes B par le Norovirus (Zimmer C., 2014).

IV.2 Etat actuel de la thérapeutique antivirale

Grâce aux connaissances actuelles sur l'organisation du génome, sur les mécanismes de la réplication et sur la transmission du Norovirus, la recherche des médicaments antiviraux a pu être entreprise (Rohayema J. et *al*, 2010). Ainsi, toutes les étapes du cycle cellulaire du Norovirus ont été utilisées comme cibles potentielles de ces médicaments. Cependant, jusqu'à aujourd'hui, le développement d'antiviraux a été difficile en raison de l'absence d'un système de culture cellulaire permissif au Norovirus. Plusieurs modèles (*in vitro* et *in vivo*) ont alors été utilisés pour évaluer l'activité antivirale des divers composés (Rocha-Pereira J. et *al*, 2014c).

IV.2.1 Modèles d'études des molécules actives

IV.2.1.1 Les virus de substitution

Compte tenu des similitudes observées entre le Norovirus humain et le Norovirus murin (MNV), leur processus de réplication (notamment l'organisation du génome, la fonction des protéines et leur structure), leur pathogenèse (notamment la symptomatologie de l'infection, la voie de transmission et l'excrétion importante du virus dans les selles), le MNV est le virus de substitution idéal pour l'étude de médicaments antiviraux contre le Norovirus humain. De plus, il a l'avantage d'être le seul Norovirus, à ce jour, capable de se répliquer dans une culture cellulaire et dans un petit modèle animal (Rocha-Pereira J. et *al*, 2014c).

IV.2.1.2 Lignée cellulaire portant le réplicon du Norovirus humain

Cette approche est une alternative à l'absence de modèle de culture cellulaire pour l'étude de la réplication du Norovirus humain. Elle consiste en la transfection d'un plasmide contenant le génome du Norwalk virus dans une lignée de cellules de mammifères. Cette lignée contient alors le réplicon du Norovirus humain. Ce modèle ne permet pas l'étude de l'entrée ou de la maturation du virus dans les cellules cibles mais est utile pour l'étude de l'activité et de l'inhibition des protéines virales et permet d'évaluer l'activité de molécules antivirales (Rocha-Pereira J. et *al*, 2014c).

IV.2.1.3 Les modèles animaux

Les modèles animaux d'infection à Norovirus sont des outils utiles, non seulement pour l'étude de la pathogenèse, mais aussi pour le développement d'agents antiviraux (Rocha-Pereira J. et *al*, 2014c). Les différentes études réalisées sont présentées dans le tableau XIX. Le modèle porcin (comparable à l'infection observée chez l'homme) et le modèle murin, déficient en récepteur à l'interféron et infecté par le MNV ont été utilisés récemment dans les études d'antiviraux (Kaufman S-S. et *al*, 2014). Le modèle murin infecté par la souche MNV-CR6 peut être utilisé pour l'étude des agents antiviraux lors d'infections persistantes chez les patients immunodéprimés (Rocha-Pereira J. et *al*, 2014c).

IV.2.1 Les molécules antivirales et leur cibles potentielles

Quelques exemples d'études portant sur la recherche de molécules antivirales sont rapportés ci-dessous.

IV.2.1.1 Attachement du virus à la cellule cible

Comme vu précédemment, les HBGA jouent un rôle important dans l'attachement du virus, et ainsi dans l'entrée du virus dans la cellule cible, agissant probablement comme récepteur ou corécepteur du virus (Rocha-Pereira J. et *al*, 2014c). La recherche de molécules bloquant l'interaction entre le domaine P de la capside virale et les ligands A et/ou B des HBGA peut s'avérer utile dans le traitement des infections à Norovirus (Kaufman S-S. et *al*, 2014). Ainsi, une étude publiée en 2013 a montré que 255 molécules candidates ont été identifiées par la technique de la conception de médicaments assistée par ordinateur (CMAO). Des études d'amarrage (Zhang X-F. et *al*, 2013) (c'est à dire la recherche de positions et d'orientations probables de petites molécules en interaction avec leur cible ainsi que l'évaluation de l'énergie entre ces complexes) (Fortuné A., 2006) et de criblage virtuel ont été utilisées pour identifier des composés ciblant les sites de liaison des antigènes A et B au niveau du domaine P (dimère) de la capside du Norovirus de génotype GII.4. Parmi les 255 composés candidats, 160 ont été sélectionnés (selon leur affinité prédictive et leur structure chimique) pour des tests complémentaires (de blockage des HBGA) : 20 molécules présentent ainsi une CI 50 (concentration nécessaire d'un composé pour réduire de 50% la croissance *in vitro* d'une population d'organisme) < 40 µM dont 5 d'entre elles ont une CI 50 < 10 µM (figure 44) (Zhang X-F. *et al*, 2013).

Tableau XIX : Modèles animaux (d'après Rocha-Pereira J. et *al*, 2014c et Kaufman S-S. et *al*, 2014)

Virus	Hôte	Durée de l'infection	Symptômes	Détection de l'ARN viral	Détection de l'antigène viral
NoV humain	Souris immunodéprimée	< 3 jours	aucun	intestin, rate, foie, coeur, poumons, reins, ganglions lymphatiques mésentériques	intestin grêle, rate, foie
NoV humain	Porc	1 semaine	diarrhée	sang	intestin grêle
NoV humain	Veau	1 semaine	diarrhée		intestin grêle
NoV humain	Chimpanzé	2 à 6 semaines	aucun	intestin, foie	intestin grêle
MNV (MNV-CW3, MNV-3)	Souris immunodéprimée(déficiente en récepteur à l'interféron)	infection aiguë, 100% de mortalité 9 jours après l'infection	MNV.CW3 : diarrhée, ballonnements, amaigrissement, mortalité MNV-3 : perte de poids, selles inconsistantes	foie, rate, intestin, poumons, ganglions lymphatiques mésentériques	
MNV (MNV-CR6)	Souris immunodéprimée	persistance des semaines à des mois	aucun	Rate, intestin, ganglions lymphatiques mésentériques	

NoV : Norovirus

MNV : Norovirus murin

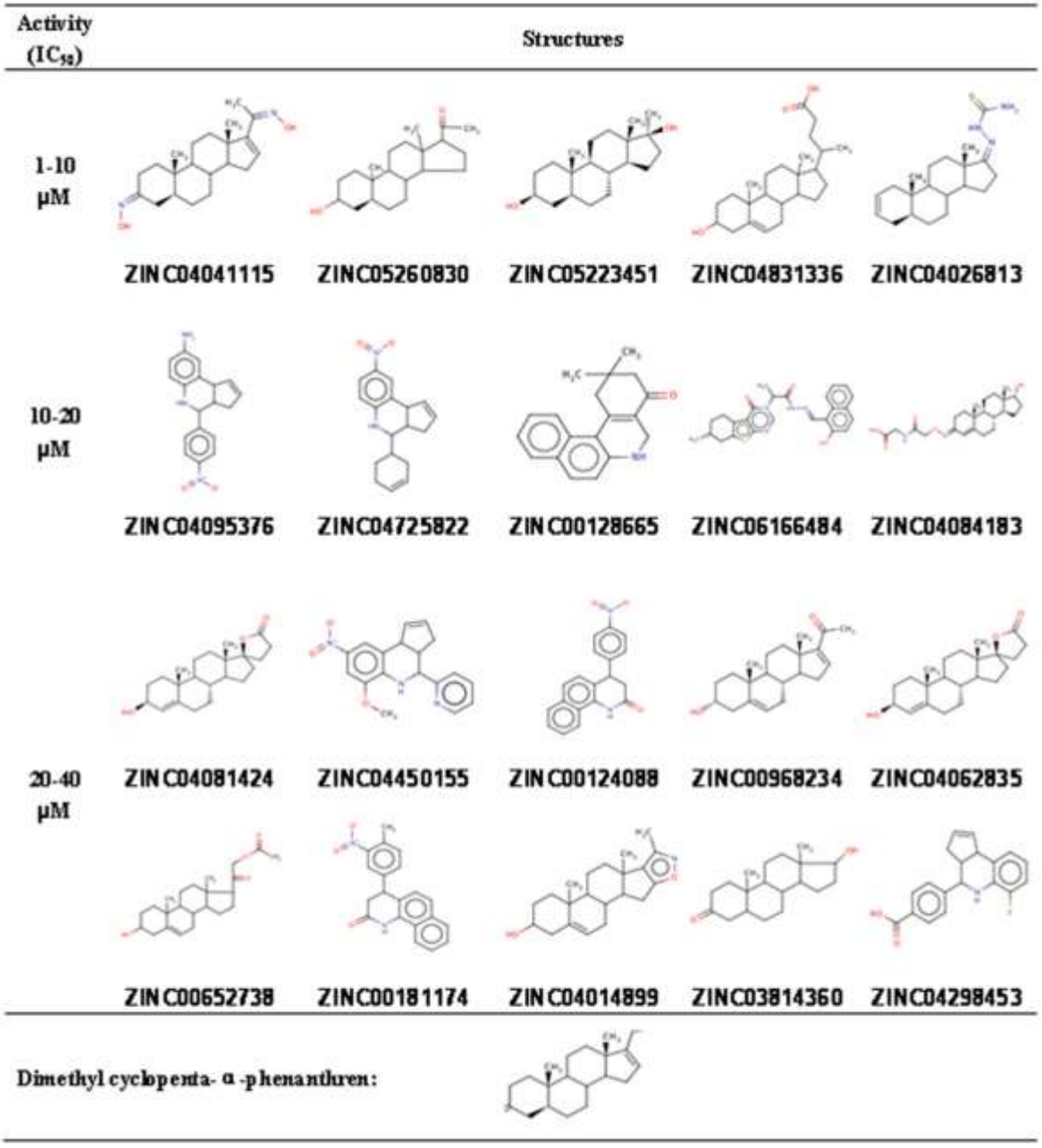


Figure 44 : Structure des 20 composés ciblant les sites de liaison des ligands A et/ou B au niveau de la capside virale (Zhang X-F. *et al*, 2013).

La faible toxicité de ces 5 derniers composés (testée sur les cellules HeLa et LLC-MK2) et leur structure commune de base appelée *cyclopenta [a] dimethyl phenanthren* en font des inhibiteurs potentiels des Norovirus (Zhang X-F. *et al*, 2013).

Par ailleurs, l'utilisation d'anticorps monoclonaux neutralisants pourrait être envisagée pour traiter les infections à Norovirus, notamment chez les sujets à hauts risques (personnes immunodéprimées, jeunes enfants...) comme le démontre une étude publiée en 2013. Une réaction immunitaire adaptative a été induite chez les chimpanzés après infection par la souche Norwalk. Dans un 2ème temps, les gènes codant les anticorps produits ont été caractérisés (notamment les fragments variables appelés "Fab"), à partir de cellules de la moelle osseuse. Quatre fragments "Fab" réagissant avec les VLP recombinants du Norwalk virus ont ainsi été découverts. Ces fragments anti-Norovirus ont été transformés en anticorps monoclonaux porteurs d'une chaine lourde γ humaine (correspondant à la partie constante de l'anticorps). Deux de ces anticorps ont été testés avec succès chez les chimpanzés, ils neutralisent le virus et préviennent l'infection (Chen Z. et *al*, 2013).

IV.2.1.2 Entrée du virus dans la cellule et décapsidation

L'entrée du MNV s'effectue par un mécanisme médié par la dynamine II et le cholestérol (Rocha-Pereira J. et *al*, 2014c). En revanche, une étude a montré que la simvastatine (inhibiteur de l'HMG coenzyme A réductase) augmente l'infectiosité du Norovirus (figure 45). En effet, elle induit une apparition des symptômes de l'infection beaucoup plus précocement et une excrétion virale prolongée chez les porcs traités par cette molécule et infectés par le Norovirus GII.4. Il y a deux explications à cette observation :

- la simvastatine possède un effet inhibiteur de l'immunité innée, notamment sur l'interféron α (IFN-α). De plus, d'après cette étude, l'IFN-α inhibe la réplication et l'excrétion virale du Norovirus humain chez les porcs et pourrait être un potentiel agent antiviral de l'infection à Norovirus.
- la simvastatine diminue la production de cholestérol au niveau du foie, ce qui provoque l'augmentation des récepteurs LDL (ceux-ci permettent l'augmentation de l'absorption du cholestérol à partir du plasma afin de compenser les faibles concentrations de cholestérol cellulaire). Ainsi, le Norovirus manipule les différentes voies du cholestérol pour accroître sa replication. Par exemple, la simvastatine induit l'expression des LDL-R par les cellules du jéjunum de porc, ce qui augmente la réplication du Norovirus dans le tractus gastro-intestinal (figures 45 et 46) (Jung K. *et al*, 2012).

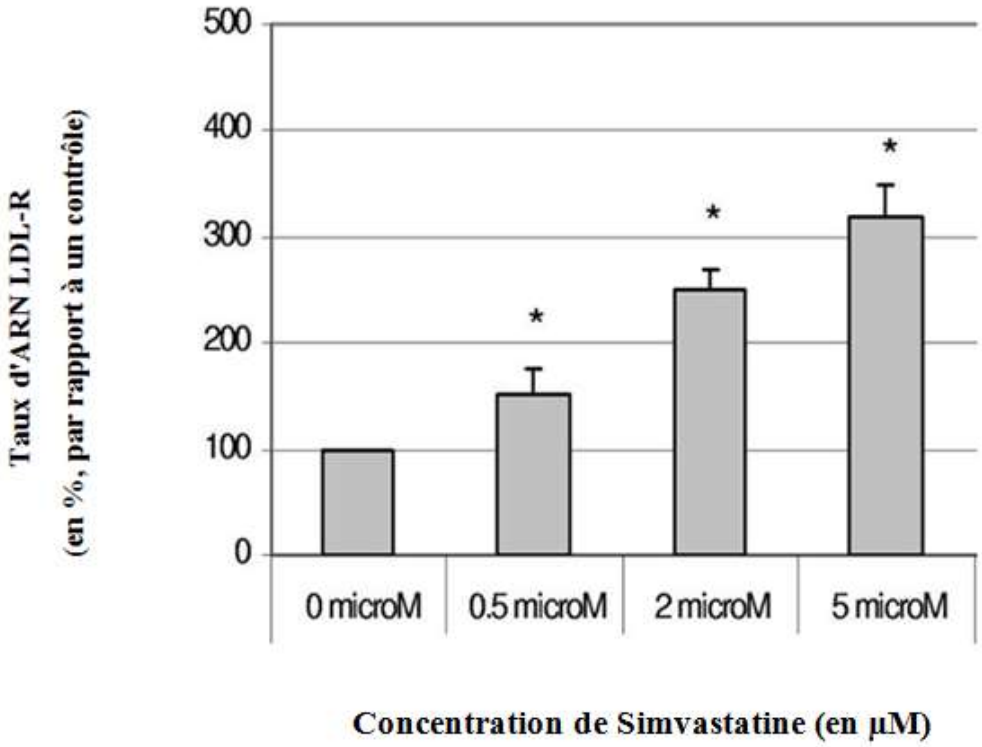


Figure 45 : Effets du traitement par la simvastatine sur le taux de LDL-R (Chang K-O, 2009)

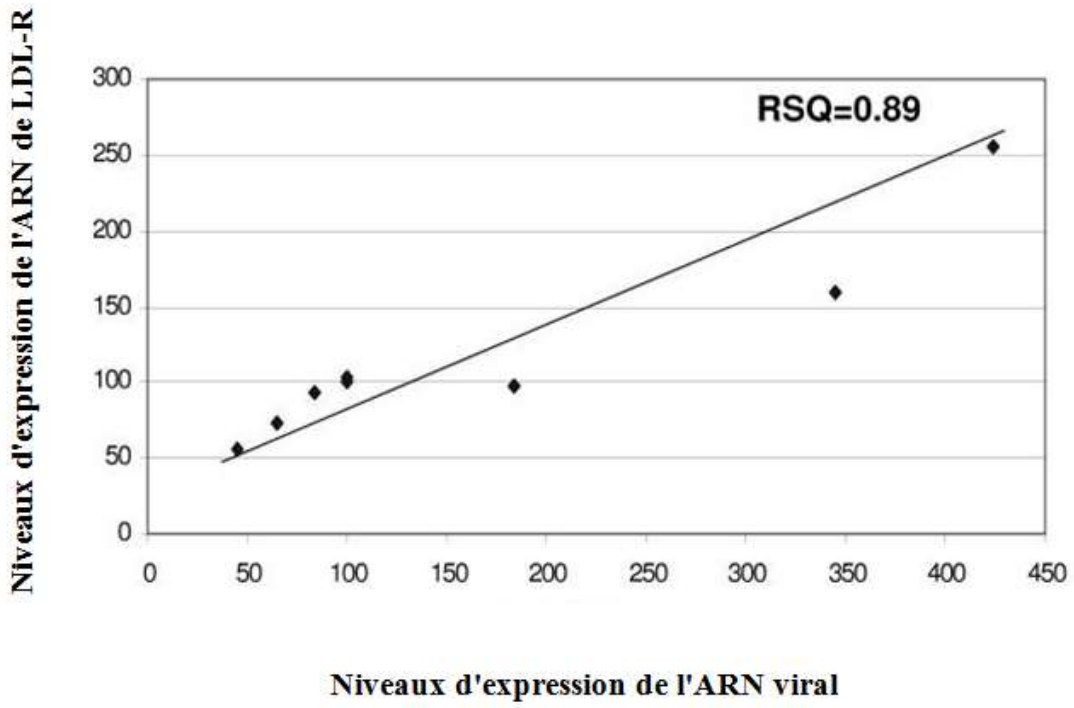


Figure 46 : Corrélation entre l'expression des récepteurs aux LDL et la réplication des Norovirus (Chang K-O, 2009)

Une étude montre l'importance de l'enzyme *cholesterol acyltransferase* (ACAT) dans la régulation de la réplication du Norovirus (au niveau de cellules portant le replicon). Cette enzyme catalyse la réaction d'estérification du cholesterol libre. Le traitement par un inhibiteur de l'ACAT entraine une réduction du taux d'expression des récepteurs aux LDL et ainsi une diminution de la réplication (Chang K-O, 2009). La recherche d'inhibiteurs d'ACAT a permis de synthétiser et d'évaluer 8 composés de la classe des pyranobenzopyrones, contenant des fonctions amino, pyridine, quinoline ou 7,8 benzoquinoline (figure 47) (Pokhrel L. et *al*, 2012).

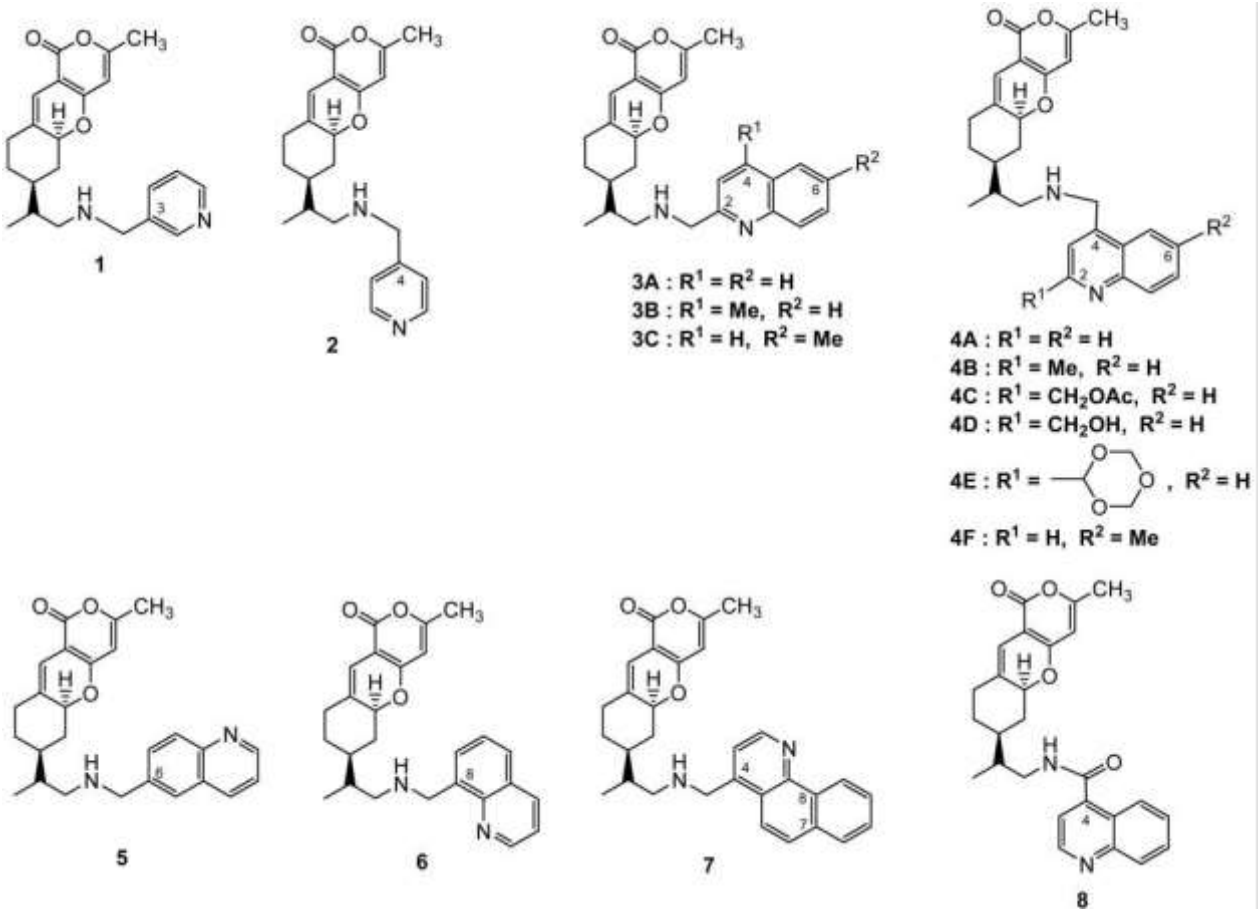


Figure 47 : Les 8 composés de la classe des pyranobenzopyrones (Pokhrel L. et *al*, 2012)

Les résultats de l'évaluation des composés de la classe des pyranobenzopyrones sur la réduction de la réplication sont regroupés dans le tableau XX. L'étude a été réalisée à partir de cellules porteuses du replicon du Norovirus (Pokhrel L. et *al*, 2012).

Tableau XX : Effets des composés de la classe des pyranobenzopyrones sur la réduction de la réplication du Norovirus (Pokhrel L. *et al*, 2012)

Composé	DE 50	DT 50	IT
1	4,1	>200	>50
2	9,6	Non déterminé	-
3A	3,4	>200	>58,8
4A	2,4	96,4	40,2
5	8,1	Non déterminé	-
6	>10	>160	>16
4B	8,2	Non déterminé	-
4C	9,7	Non déterminé	-
4D	9,5	Non déterminé	-
4E	8,4	Non déterminé	-
3B	5,3	>200	>40
4F	3,4	61,2	18,0
3C	8,1	83,7	10,3
7	5,3	>200	>40
8	5,5	103,5	18,8
10	>10	>200	-

DE 50 = dose de substance provoquant une réponse thérapeutique chez 50 % de la population ayant reçu le traitement (cellules portant le replicon du Norovirus)

DT 50 = dose toxique moyenne d'un médicament à laquelle la toxicité se produit dans 50% des cas au niveau des cellules portant le replicon du Norovirus

IT = index thérapeutique

Non déterminé = valeur DE 50 trop élevée

Le Norovirus est un virus entérique. Son passage gastrique et sa résistance au pH acide sont obligatoire pour atteindre son site de réplication. C'est pourquoi, les molécules chimiques utilisées avec d'autres virus pour lutter contre l'acidification, et ainsi contre la décapsidation ne seront pas efficaces vis-à-vis du Norovirus (Rocha-Pereira J. et *al*, 2014c).

IV.2.1.3 Les inhibiteurs de protéase

Cette enzyme est une protéase à cystéine, *chymotrypsin-like* qui se lie préférentiellement à une glutamine ou à un acide glutamique de son substrat. Une étude portant sur une classe d'inhibiteurs de l'état de transition de la réaction catalysée par cette protéase a permis de définir un "motif antiviral" (figure 48).

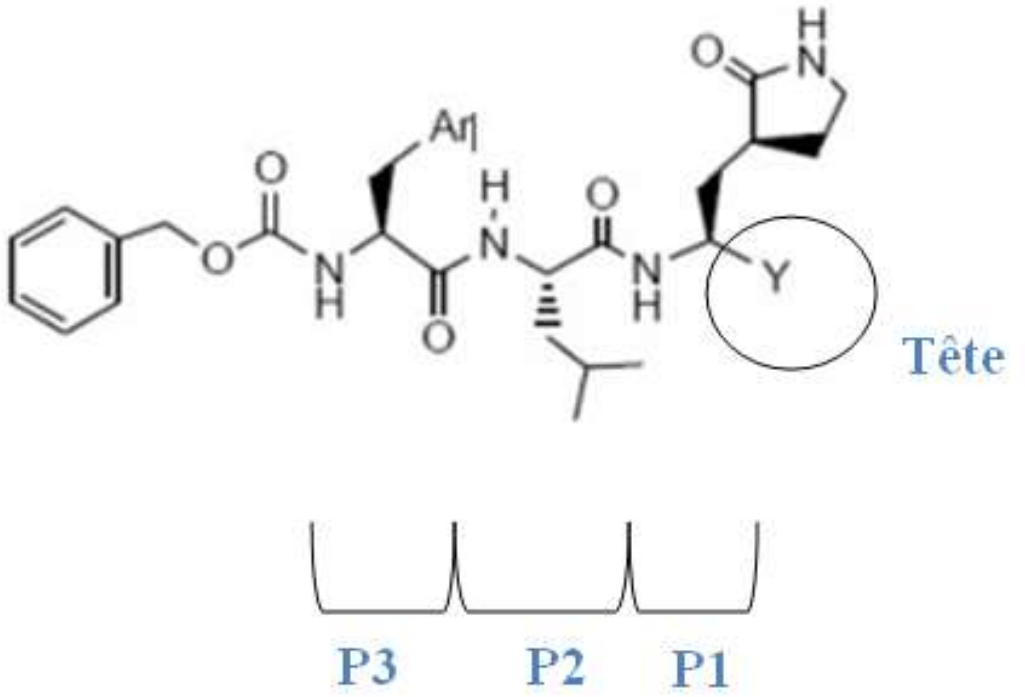


Figure 48 : Structure du motif de l'inhibiteur de la protéase du Norovirus (Prior A-M. *et al*, 2013)

Ce motif est composé d'un fragment tripeptidyl, compatible avec la spécificité du substrat et d'une tête (aldéhyde, un α-amide, un bisulfite ou un α-hydroxy-phosphonate). P1 est une glutamine. Au niveau du site P2, un résidu hydrophobe, tel la leucine, augmente la reconnaissance du couple enzyme-substrat. Une arylalanine en P3 permet une activité antivirale mais est également importante pour la pénétration de l'agent antiviral dans la cellule. C'est ainsi qu'à partir de ce motif (P1= glutamine, P2 = leucine et P3= arylalanine), huit molécules ont été synthétisées, en modifiant la fonction Y (figure 48) de la tête du "motif antiviral" (figures 49 à 52).

- **fonction aldéhyde :**

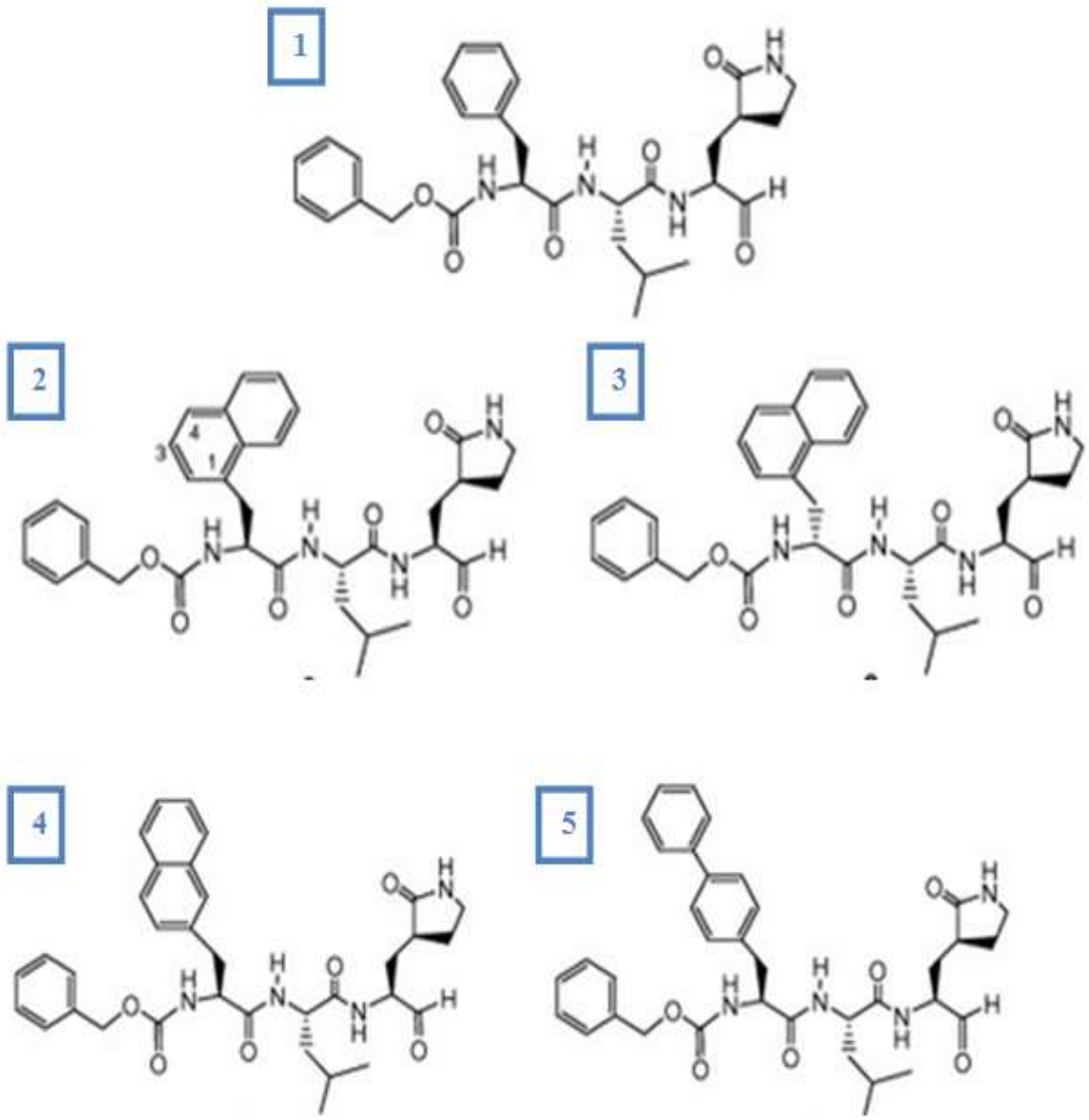


Figure 49 : Structure des cinq composés présentant la fonction aldéhyde au niveau de "la tête" du motif antiviral (Prior A-M. et *al*, 2013)

Les 5 molécules diffèrent par leur groupement -aryl (au niveau du résidu P3)

- fonction α-amide

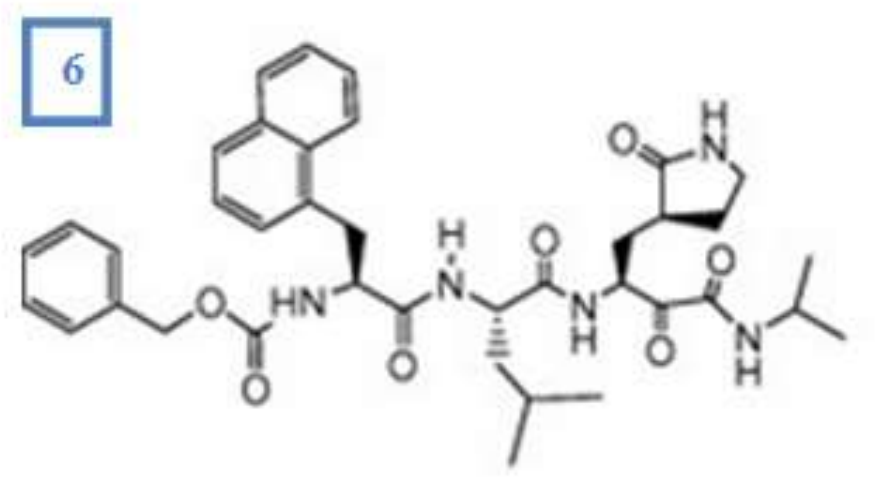


Figure 50 : Structure des cinq composés présentant la fonction amide au niveau de "la tête" du motif antiviral (Prior A-M. et *al*, 2013)

- fonction bisulfite

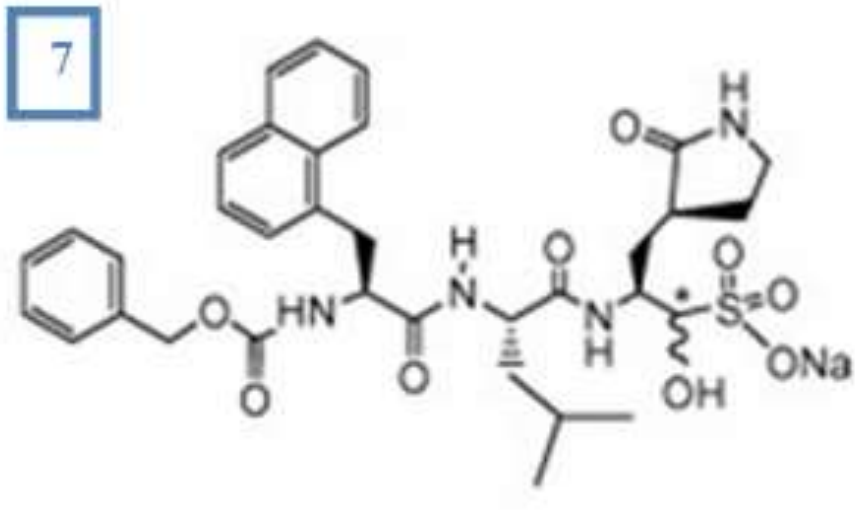


Figure 51 : Structure des cinq composés présentant la fonction bisulfite au niveau de "la tête" du motif antiviral (Prior A-M. et *al*, 2013)

- fonction α-hydroxy phosphonate

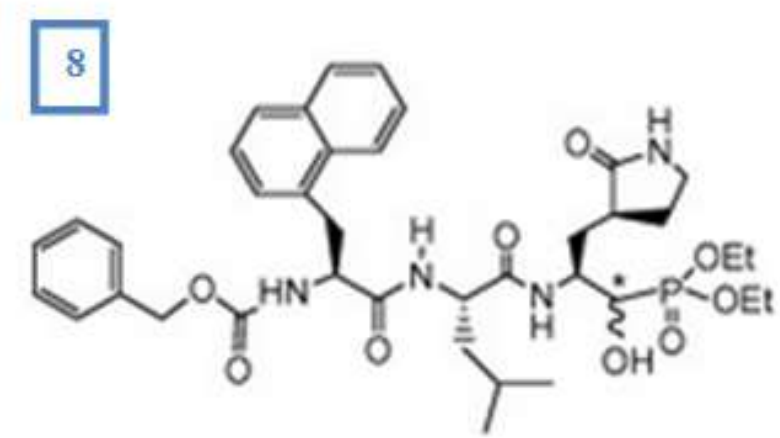


Figure 52 : Structure des cinq composés présentant la fonction α-hydroxy phosphonate au niveau de "la tête" du motif antiviral (Prior A-M. et *al*, 2013)

L'activité inhibitrice, et notamment la CE 50 (= concentration de médicament produisant 50 % de l'effet maximal observé) de chaque composé a été évaluée (tableau XXI) :

Tableau XXI : CE 50 des différents composés synthétisés (Prior A-M. *et al*, 2013)

Composé	CE 50 (µM)
1	0.06 +/- 0.03
2	0.04 +/- 0.02
3	0.45 +/- 0.4
4	0.08 +/- 0.03
5	0.05 +/- 0.05
6	4.2 +/- 2.4
7	0.04 +/- 0.03
8	0.1 +/- 0.3

- toutes les molécules, à l'exception de la molécule n°6, possèdent des CE 50 de l'ordre du micromolaire ;
- parmi les composés 1 à 5 qui différent par leur résidu P3 (au niveau du groupe -aryl), le composé n°2 possède l'activité inhibitrice la plus importante ;
- en comparant l'activité des molécules par rapport à leur fonction au niveau de la "tête" du motif, les composés n° 2 (fonction aldéhyde) et 7 (fonction bisulfite) présentent les activités les plus fortes. Le composé 7 est un précurseur du composé 2.

Le composé n°2 présente également des activités inhibitrices, de l'ordre du nanomolaire contre des protéases d'autres virus tels que les Coronovirus et les Picornavirus. De plus, ce composé n'interagit pas ou très peu avec les protéases "humaines" comme l'élastase, l' α-chymotrypsine, la trypsine et la thrombine. Il pourrait être un très bon candidat dans le développement d'antiviraux contre ces virus (Prior A-M. et *al*, 2013).

D'autres molécules ont été présentées comme ayant des propriétés inhibitrices des protéases à Norovirus. La chymostatine inhibe les protéases des Norovirus des génogroupes I et II, respectivement NVpro et MD145 (figure 53) (Chang K-O. et *al*, 2013).

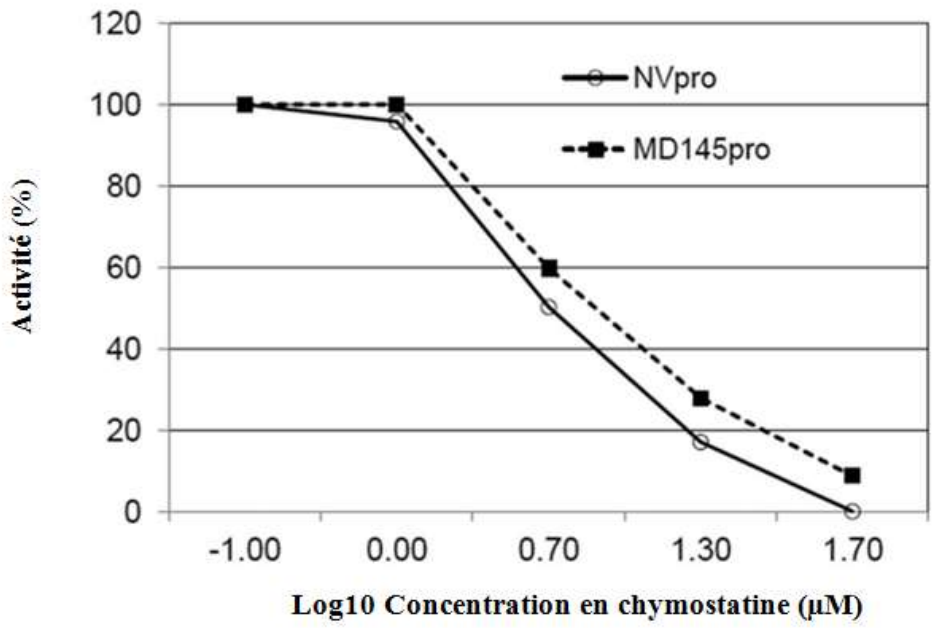


Figure 53: Relation dose-effet de la chymostatine sur les protéases NVpro et MD145pro (Chang K-O. et *al*, 2013)

NVpro = protéase des Norovirus du GI

MD145 = protéase des Norovirus du GII

Les résultats de l'évaluation de l'activité inhibitrice de cette molécule sur les protéases des génogroupe I et II des Norovirus sont résumés dans le tableau XXII. Ils montrent que les deux protéases présentent un profil d'inhibition similaire (Chang K-O. et *al*, 2013).

Tableau XXII : Valeurs de la CI50 de la chymostatine pour l'inhibition des protéases (Chang K-O. *et al*, 2013)

Protéase	CI 50 (µM)
NVpro	5,489
MD145pro	9,861

Un autre inhibiteur de protéase, le rupintrivir, agit contre le MNV et détruit les cellules humaines portant le replicon du Norwalk virus. De plus, l'association de cette molécule à des agents inhibiteurs de l'ARN polymérase tels que la 2'-C-methylcytidine et le favipiravir induit un effet antiviral additif. Le fait que le rupintrivir soit actif contre le génogroupe I, le génogroupe V et contre la protéase recombiante 3C-like du génogroupe II indique qu'il présente une activité anti-Norovirus inter-génotype et qu'il est très probablement efficace contre les principales souches cliniquement actives (Rocha Peirera J. et *al*, 2014b).

Récemment, un système rapporteur humain, appelé NoroGlu a été développé afin d'étudier la replication des Norovirus et d'évaluer les agents antiviraux potentiels. En effet, il s'agit d'un système basé sur la fusion entre la protéine p41 du Norovirus et la Gaussia luciférase (GLuc) secrétée naturellement. Ces derniers sont liés par le site de clivage p41/p22 de la protéase NVpro. Le clivage du système par la protéase entraine la libération d'une GLuc active (Qu L. et *al*, 2014). L'enzyme luciférase catalyse la réaction d'oxydation de la luciférine qui génère de l'oxyluciférine et de la lumière à une longueur d'onde de 562nm. L'activité de la protéase est ainsi mesurée par l'expression de la luciférase, et ainsi par l'emission de lumière (Brault M-E., 2007).

IV.2.1.4 Les inhibiteurs de l'ARN polymérase

On distingue deux classes d'inhibiteurs de l'ARN polymérase :

- les inhibiteurs nucléosidiques
- les inhibiteurs non nucléosidiques

IV.2.1.4.1 Les inhibiteurs nucléosidiques

Plusieurs publications recensent divers analogues nucléosidiques présentant des propriétés anti-Norovirus.

Une étude montre que le traitement par la ribavirine, analogue de la guanosine (figure 54), de cellules porteuses du réplicon du Norwalk-virus permet une réduction de la réplication du virus et ainsi que de l'expression des protéines virales. La dose réduisant de 50% la réplication du virus (DE 50) est alors de 40 µM. Cette molécule exerce également un effet inhibiteur sur le Norovirus murin au niveau des macrophages de souris. Le traitement combiné de la ribavirine et de l'IFN-α entraine un effet additif sur l'inhibition de la réplication du Norwalk virus. Ce travail met aussi en évidence un mécanisme d'action potentiel de la ribavirine. En effet, l'ajout de guanosine lors du traitement par ribavirine diminue modérément l'effet de la ribavirine. Cette dernière provoquerait une déplétion de GTP par inhibition de l'IMP déshydrogénase. Cependant, après analyse de la séquence hautement conservée de la polymérase du Norwalk virus, d'une part dans un groupe de cellules traité par la ribavirine (100 µM) et d'autre part dans un groupe non traité par cette molécule, les données montrent que l'activité antivirale n'est pas associée à la production de mutations excessives conduisant à l'extinction du virus (Chang K-O et George D-W, 2007). Cette information a été confirmée plus récemment (Arias. et *al,* 2014).

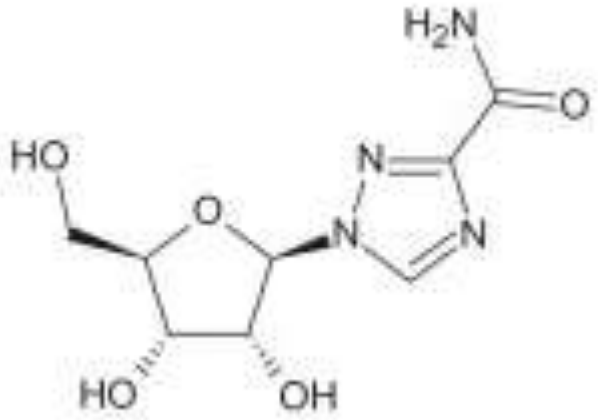


Figure 54 : Structure de la ribavirine (Rocha Pereira J et *al.*, 2014c)

Par ailleurs, a été mis en évidence un (potentiel) nouveau mécanisme d'inhibition de l'ARN polymérase ARN dépendante, grâce au 2′-amino-2′-deoxycytidine-5′-triphosphate. L'étude des structures de cette enzyme liée à un nucléotide naturel, la cytidine triphosphate (CTP) ou à un inhibiteur, le 5-nitro-cytidine-5'-triphosphate (NTP) a montré que des liaisons hydrogènes et Van des Waals avec le fragment ribose jouent un rôle important dans la reconnaissance et le positionnement des nucléotides dans le site actif. Le fait que la molécule 2′-amino-2′-deoxycytidine-5′-triphosphate possède un groupement amino en 2' (différent du groupement 2' hydroxyl dans NTP et CTP), induit un réarrangement au niveau du site actif de l'enzyme et oblige celle-ci à rester dans une conformation dite "inactive", qui peut être à l'origine de l'inhibition de cette enzyme (Rocha-Pereira J. et *al*, 2014c).

Une autre étude, publiée en 2012, évalue l'efficacité et la toxicité de cinq autres analogues nucléosidiques : 2'-C-methylcytidine (2'-C-MeC), 2'-F-2'-C-methylcytidine (2'-F-2'-C-MeC), β-D-N(4)-hydroxycytidine (NHC) et lamivudine (tableau XXIII) :

- aucun composé n'est toxique. En effet, la concentration efficace pour réduire de 50% la viabilité des cellules (CC 50) est supérieure à 100 pour chaque composé.

- au niveau de l'efficacité, cette étude montre que :

- 2′-C-MeC, 2′-F-2′-C-MeC et NHC réduisent considérablement le taux d'ARN du Norwalk virus au niveau des cellules HG23, cependant seuls les composés 2′-C-MeC et 2′-F-2′-C-MeC diminuent le taux d'ARN du Norwalk virus (NV) et l'infectiosité du MNV de manière dose et temps dépendants ;

- 2′-C-MeC est 8 à 60 fois plus active contre le NV que contre les autres virus à ARN (+) ;

- 2′-F-2′-C-MeC est 1,4 à 3,3 fois plus active contre le NV par rapport au virus de l'hépatite C et au MNV, respectivement ;

- par rapport à la ribavirine, 2′-C-MeC , 2′-F-2′-C-MeC et NHC sont respectivement 30, 12 et 27 fois plus actives contre le NV et 2′-C-MeC et 2′-F-2′-C-MeC sont respectivement 4 et 7 fois plus puissants contre MNV ;

- par rapport au 2-styrylchromones (décrit ultérieurement), 2′-C-MeC et 2′-F-2′-C-MeC présentent des CI 50 comparables

Tableau XXIII : Activité anti-Norovirus et cytotoxicité des analogues nucléosidiques a) MNV et b) NV réplicon (Constantini V-P. *et al*, 2012)

a) MNV					
Analogues nucléosidiques	**CE 50**	**CI 50**	**CE 90**	**CC50**	**IS**
3TC	-	-	-	>100	-
2'-F-2'-C-MeC	12,7±2,9	33 ,9 ±1,1	91,2±2,8	>100	>7,9
2'-C-MeC	6,9±3,9	15,7±1,2	25,4±3,6	>100	>14,6
NHC	8,8±4,2	-	-	>100	>11,4
RBV	63,5±2,3	73,5±3,1	104,7±1,5	>100	>1,6

b) NV réplicon					
Analogues nucléosidiques	**CE 50**	**CI 50**	**CE 90**	**CC50**	**IS**
3TC	-	-	-	>100	-
2'-F-2'-C-MeC	3,2±1,5	N/A	49,0±2,9	>100	>31,4
2'-C-MeC	1,29±0,8	2,77±1,4	8,9±1,5	>100	>77,5
NHC	1,47±1,1	6,0±1,7	16,6±2,1	>100	>68,0
RBV	40,0±2,3	N/A	96,3±2,5	>200	>5,0

MNV = Norovirus murin

NV = Norovirus

CE 50 = concentration de composé nécessaire pour réduire les copies d'ARN de 50%

CI 50 = concentration requise pour réduire de 50% l'infectiosité du virus dans des cellules RAW 264

CE 90 = concentration requise pour réduire le nombre de copies d'ARN de 90%

CC50 = concentration requise pour réduire la viabilité des cellules RAW 264.7 de 50%

IS = indice sélectif = CC50 / CE50

N/A= non applicable

Le 2′-C-MeC présente une faible CI 50 ainsi qu'un SI (indice de selectivité) élevé, qui fait de cette molécule un bon candidat pour de futures études. Cependant, l'activité de cette molécule a été démontrée sur le Norwalk virus (GI) et sur le MNV (GV), mais pas sur le génogroupe II, responsable de la majorité des infections. La 2′-C-MeC est un très bon candidat pour des tests contre d'autres souches de Norovirus, et notamment du génogroupe GII (Constantini V-P. *et al*, 2012).

Une autre publication (Rocha-Peirera J. et *al*, 2013), plus récente, évalue également l'action de l'agent antiviral 2'-C-MeC sur le MNV (chez des souris immunodéprimées) et sur les cellules HG23:

- au niveau du "système replicon", l'inhibition de la replication *in vitro* est dose-dépendante et la CE 50 est de 18 +/- 4 µM. L'inhibition de la replication est réalisée à des concentrations de 2'-C-MeC n'entrainant pas de toxicité ;
- chez les souris immunodéprimées, la 2'-C-MeC permet de "limiter" les symptômes liés à une infection à MNV. Chez les souris non traitées par la 2'-C-MeC, les symptômes apparaissent 3 jours après l'infection du MNV par voie orale : léthargie, pelage ébourrifé, posture voutée, perte de poids allant jusqu'à 14,5% et diarrhée (figure 56). L'excrétion virale est importante, dès le premier jour après l'infection (figure 57) et l'examen histologique présente une nécrose aiguë de la muqueuse accompagnée d'une inflammation bénigne (figure 55). Quant aux souris traitées par l'agent antiviral, elles ne présentent aucun symptôme, pas de diarrhée. Au niveau de l'examen histologique, la muqueuse présente un aspect normal (figure 55). Quatre jours après l'infection, une perte de poids est observée (avec une diminution de 7,2% à 13,9% de leur poids au 6ème jour) (figure 56). De plus, l'ARN est détecté dans les selles avec un taux maximal au 6ème jour (mais il reste inférieur au taux d'ARN des souris non traitées) (figure 57). Finalement, les souris traitées ont totalement récupéré. En effet, une reprise de leur poids est observée à partir du 7ème jour avec une récupération complète au 11ème jour (figure 56). Concernant l'excrétion du virus, la charge virale dans les échantillons de selles est indétectable jusqu'au 4ème après l'inoculation, maximale à J6 (mais toujours inférieure à celle des animaux non traités) et indétectable à J11 (figure 57).

Aucune (ré)infection n'a été démontrée après la fin du traitement (Rocha-Peirera J. et *al*, 2013).

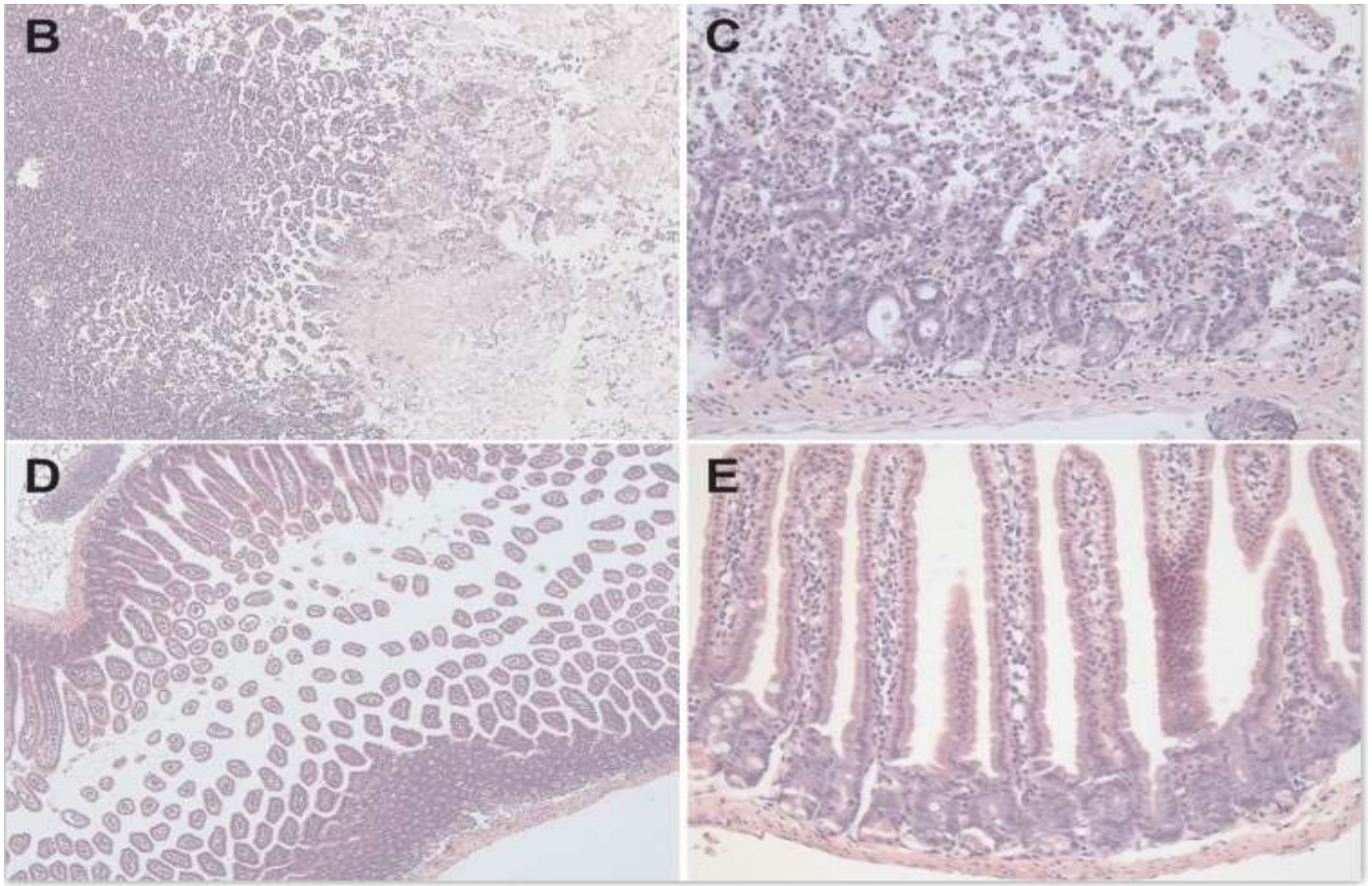


Figure 55 : Histopathologie de l'intestin grêle des souris infectées par le MNV. D et E : traitées par 2'-C-MeC. B et C : non traités par 2'-C-MeC (Rocha-Peirera J. et *al*, 2013)

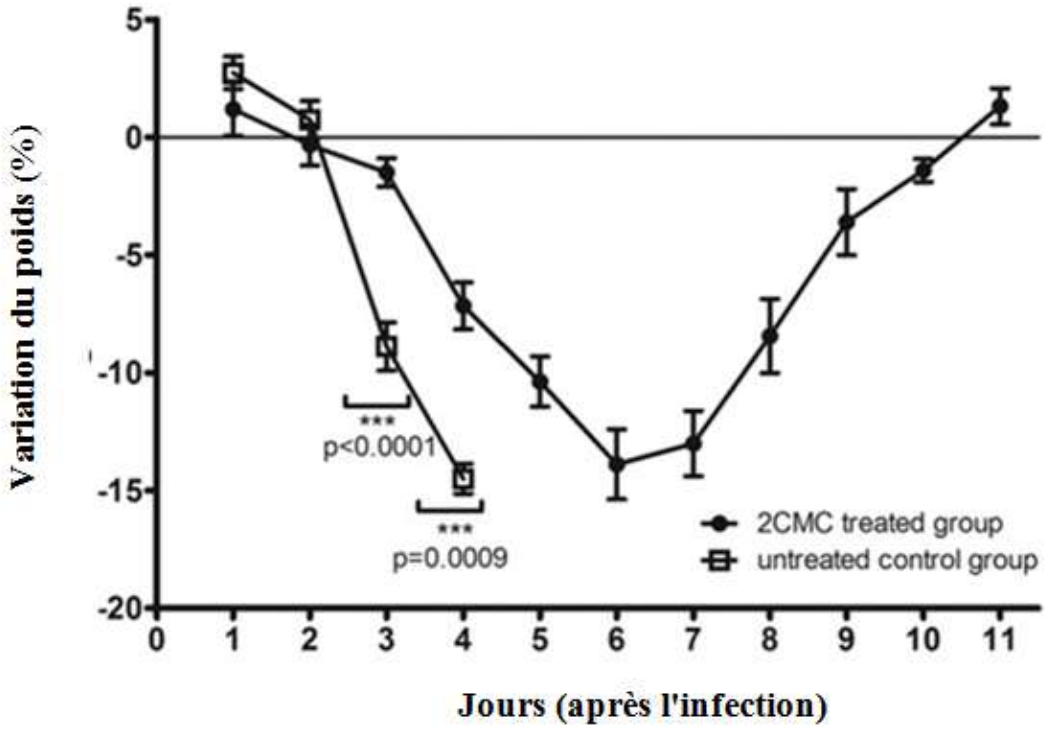


Figure 56: Comparaison de la variation du poids des souris, infectées par MNV, traitées ou non avec 2'-C-MeC (Rocha-Peirera J. et *al*, 2013).

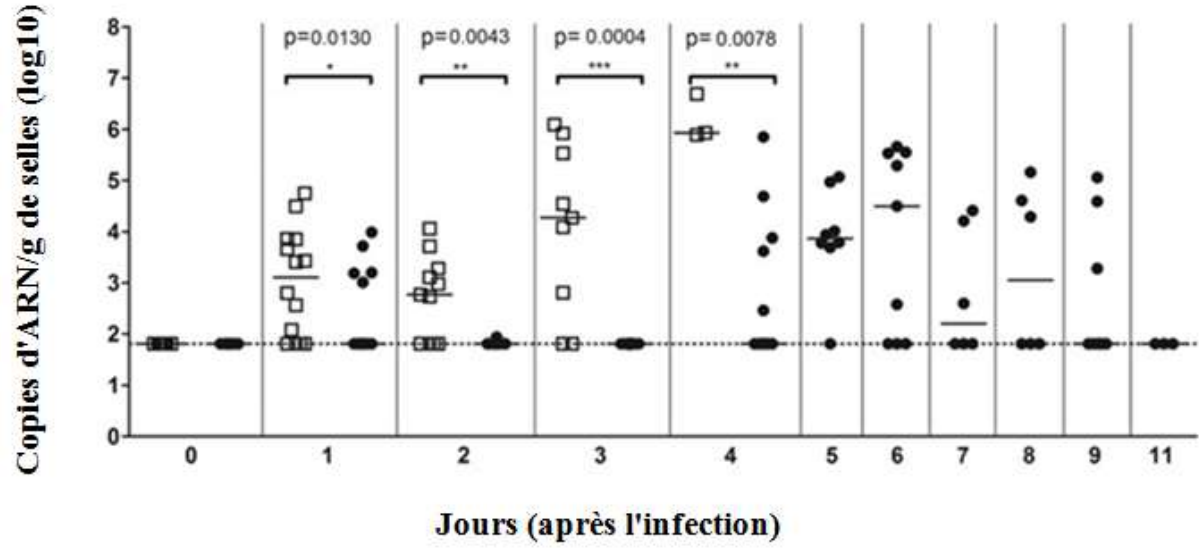


Figure 57 : Comparaison des charges d'ARN viral dans les échantillons de selles des souris infectées par MNV traitées ou non par 2'-C-MeC (Rocha-Peirera J. et *al*, 2013).

Une autre molécule présente des activités antivirales contre les Norovirus, le ravir (figure 58).

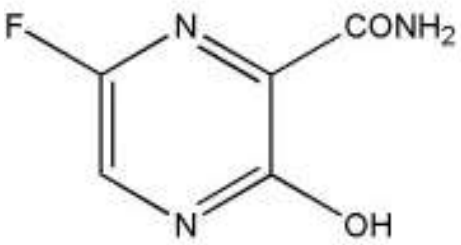


Figure 58 : Structure de favipiravir (Rocha Pereira J et *al.*, 2014c)

Cette molécule réduit de manière dose dépendante l'effet cytopathogénique du MNV ainsi que sa réplication, au niveau d'une culture cellulaire. Les CE 50 sont alors, respectivement de 39 ± 4 µg/mL soit 250 ± 11 µM et 19 ± 6 µg/mL soit 124 ± 42 µM. Cela représente une activité modeste, mais une concentration de 100 µg/mL inhibe complètement la réplication du Norovirus, sans effets toxiques pour les cellules. Ces travaux confirment que cette molécule agit sur l'ARN polymérase ARN dépendante. Si l'ajout de favipiravir aux cellules infectées par le MNV est réalisée au cours des 4h suivant l'infection, la molécule induit une inhibition complète de la replication du virus. S'il a lieu plus tardivement, c'est-à-dire juste avant ou au début de la synthèse d'ARN, l'effet de la molécule diminue progressivement. Ceci démontre que le favipiravir agit à un temps qui coincide avec le début de la replication par l'ARN polymérase virale (Rocha-Pereira J. *et al,* 2012).

L'activité antivirale *in vivo* du favipiravir peut être une conséquence de mutations au niveau de la réplication du Norovirus (= phénomène de mutagenèse). L'examen de la fréquence de mutations des populations virales excrétées dans les selles de deux groupes d'animaux, animaux traités par favipiravir versus animaux traités par un placebo, a ainsi mis en évidence une fréquence des mutations plus élevée (2,9 fois) chez les animaux traités par favipiravir (par rapport à des animaux traités par un placebo). Parallèlement, l'examen de la fréquence des mutations des virus excrétés dans les selles d'animaux traités par ribavarine n'a pas montré de différence avec celle des virus excrétés dans les selles d'animaux traités par le placebo. Ainsi, favipiravir agit en augmentant la mutagenèse et en diminuant l'infectiosité spécifique, *in vivo*, du Norovirus (Arias. et *al,* 2014).

IV.2.1.4.2 Les analogues non nucléotidiques

Deux molécules ont été identifiées comme étant des inhibiteurs de l'ARN polymérase de Norovirus humain et de MNV, respectivement la suramine et son analogue le NF023. Les études cristallographiques montrent qu'elles se lient à un site commun, près du site actif de l'enzyme (site A). Du fait de leur faible perméabilité membranaire, due aux charges négatives de leurs groupements sulfonyles, une nouvelle molécule a été étudiée : l'acide 1,5 disulfonique naphthalène NAF2 correspondant à un fragment commun aux deux autres inhibiteurs (figure 59). Cette molécule présente une activité inhibitrice modeste (CI 50 = 14 µM). La structure cristalline du complexe NAF2/ARN polymérase du Norovirus humain montre que NAF2 possède deux sites de liaison : le site A, commun à la suramine et à NF023, ainsi qu'un nouveau site, le site B. Afin de caractériser ce nouveau site, un analogue de NAF2, le pyridoxal-5′-phosphate-6-(2′-naphthylazo-6′-nitro-4′,8′-disulfonate) sel tétrasodique (PPNDS) a été sélectionné (car il se lie également au site B). Ce composé présente une activité anti-Norovirus humain comparable à la suramine et NF023 (CI50 = 0.45 ± 0.09µM). Il est lié à l'enzyme (ARN polymérase du Norovirus humain) par son groupement naphtalène et son groupement pyridoxal, qui se prolonge au niveau du site actif de l'enzyme, permet l'amélioration de l'activité inhibitrice enzymatique (blocage de l'accès de la matrice d'ARN et des nucléotides) (figure 59) (Tarantino D. *et al,* 2014).

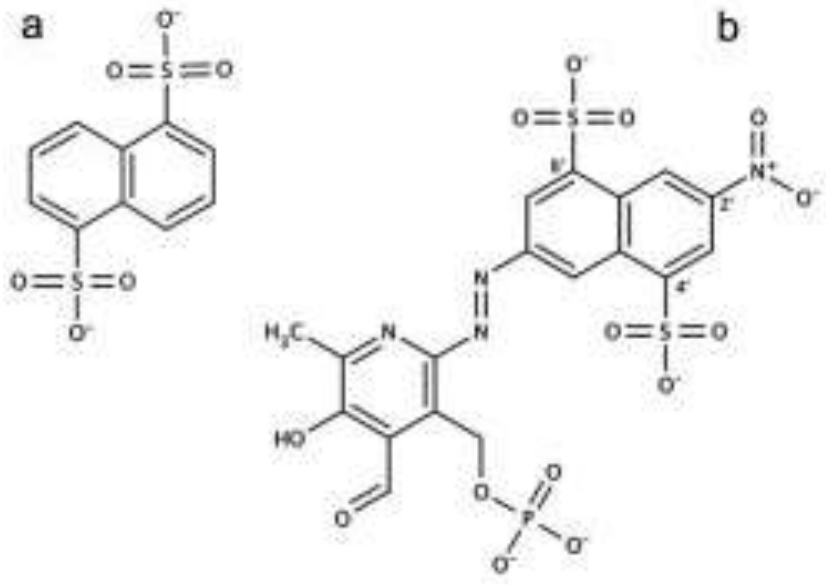


Figure 59 : Structure de NAF2 (a) et PPNDS (b) (Tarantino D. *et al,* 2014)

Deux molécules de PPNDS lient un site proche du site B de l'ARN polymérase du Norovirus murin. Leur mode de fixation mime deux bases nucléotidiques d'ARN empilées, l'empilement étant anti-parallèle. Elles adoptent une orientation tournée d'environ 60° par rapport à celle observée pour la molécule de PPNDS liée à la polymérase de HuNV (Croci R.*et al*, 2014).

Quatre nouveaux inhibiteurs non nucléosidiques de l'ARN polymérase ARN dépendante du Norovirus ont également été étudiés (figure 60) :

- phenylthiazole carboxamide : NIC02
- pyrazole actémide : NIC04
- triazole : NIC10
- pyrazolidinedione : NIC12

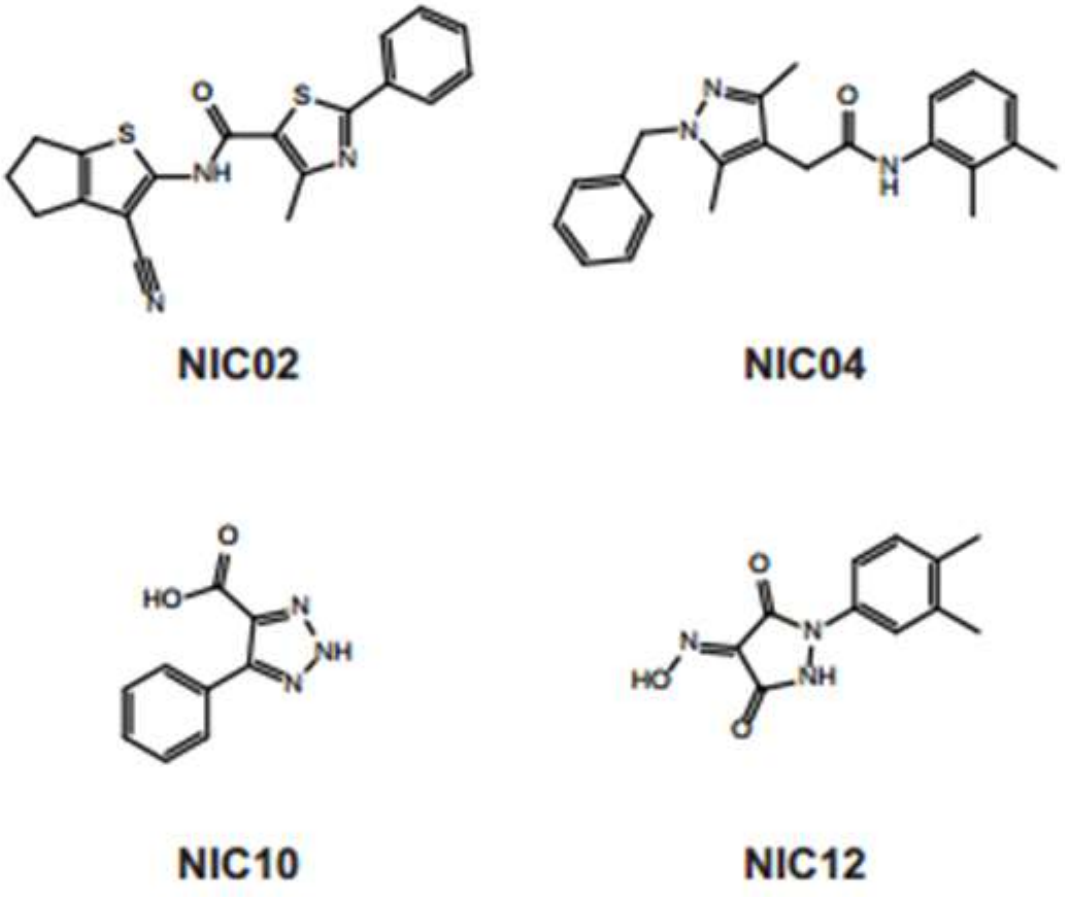


Figure 60 : Structure des 4 inhibiteurs non nucléosidiques de l'ARN polymérase ARN dépendant du Norovirus (Etahla A-A. et al, 2014).

Ces composés (NIC02, NIC04, NIC10 et NIC12) inhibent la souche GII.4 (Den Haag 2006b variant) avec des CI 50, respectivement, de 5 µM, 5,5 µM, 9,2 µM et 9,8µM :

- NIC02 et NIC04 présentent un mode d'inhibition mixte (caractérisé par une diminution de l'affinité pour le substrat ainsi qu'une diminution de la vitesse de réaction, si les doses d'inhibiteurs augmentent) ;
- NIC10 et NIC12, quant à eux, présentent un mode d'inhition non compétitif (c'est-à-dire une vitesse de réaction diminuée et une augmentation de l'affinité pour le substrat lorsque les concentrations d'inhibiteurs augmentent) ;
- NIC02 possède une activité inhibitrice large, ainsi qu'un même niveau d'inhibition pour tous les Calicivirus ;
- NIC10 présente un spectre plus étroit : par rapport à l'enzyme de GII.4, l'activité inhibitrice est réduite pour le Sapovirus (11 fois), pour le GI.1 (56 fois), pour le MNV (1,9 fois) et elle est identique à GII.7 ;
- NIC12 présente une modeste perte d'activité par rapport à GII.4 pour GI.1 (2,3 fois), pour GII.7 (4.6 fois). Il ne présente que très peu d'activité inhibitrice pour Sapovirus (33% à une concentration de 100 µM), par contre il est 4 fois plus actif pour MNV par rapport à GII.4.
- NIC04 est la molécule la plus spécifique de l'enzyme de GII.4 ;
- NIC02 et NIC04 inhibe le replicon de manière dose dépendante mais présente des effets toxiques pour des concentrations >10 µM (CC 50 =134 µM) ;
- NIC10 et NIC12 ne présentent aucun effet, ni inhibiteur, ni toxique (à des concentrations > 100µM) ;
- En culture cellulaire de MNV, NIC02 est l'inhibiteur le plus puissant (CE 50 = 4,8 µM pour la réduction de la taille des plaques (ECP), CE 50 = 2,3 µM pour la quantification de l'ARN viral de MNV) ;
- De plus hautes concentrations sont nécessaires pour inhiber la replication de MNV :

32,8 µM pour NIC04, 34,5 µM pour NIC10 et 3,1 µM pour NIC12. Par contre, NIC02 présente une CC50 de 57,1 µM (10 fois supérieure à CE 50) ;

- Quant à NIC04, NIC10 et NIC12, ils ne présentent aucun effet cytotoxique pour des concentrations > à 100 µM ;
- Enfin la recherche d'analogues de ces composés a été entreprise :
    - seuls 3 analogues de NIC02 ont été trouvés et ne présentent qu'une faible activité inhibitrice (à une concentration de 10 µM) par rapport à la molécule candidate
    - aucun analogue n'a été découvert pour NIC04 et NIC12
    - trois analogues ont démontré une activité inhibitrice plus puissante que la molécule candidate (Etahla A-A. *et al,* 2014).

Une étude publiée en 2010 a mis en évidence l'action inhibitrice des molécules dérivées de (E)-2 styrylchromones (figure 61), notamment le (E)-5-hydroxy-2 styrylchromone et le (E)-4'-methoxy-2 styrylchromonesprésentant une CI50 d'environ 7µM.

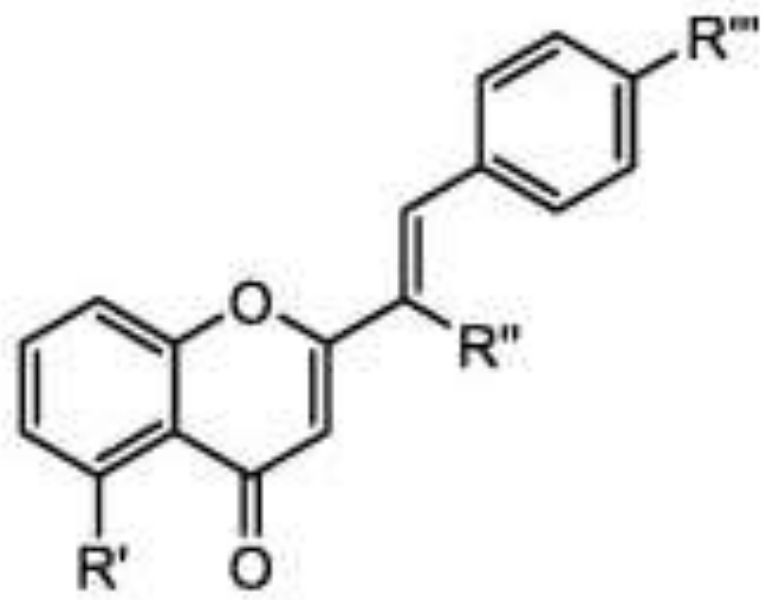


Figure 61 : Structure de (E)-2 styrylchromones (Rocha-Pereira J. *et al*, 2010).

En effet, l'introduction du groupement 2-styryl (E) est responsable de l'activité antivirale. La substitution en 4' par un groupement méthoxy- provoque une augmentation de l'activité inhibitrice, contrairement au groupement chloro- ou hydroxy- qui diminue cette activité. Le substituant en 5' est également important pour l'activité anti-Norovirus : le groupement hydroxy induit un effet inhibiteur puissant, alors que le groupement benzoyloxy réduit cet effet. La substitution en position 3 par un groupement hydroxy- augmente la toxicité du composé. Quant au mécanisme d'action de ces molécules, elles agiraient après l'entrée du virus dans la cellule et cibleraient la polymérase. En effet, elles détruisent préferentiellement les cellules tumorales qui présentent un taux de replication très important. De plus, (E)-4'-methoxy-2 styrylchromone a la capacité d'inhiber une phase tardive du cycle. Ce mécanisme d'action reste encore à élucider (Rocha-Pereira J. et *al*, 2010).

IV.2.1.5 Autres molécules

Une étude a montré que l'administration de nitazoxanide lors d'une gastroentérite sévère à Norovirus permet une résolution plus rapide des symptômes. Parmi les 13 patients souffrant de GE, 6 sont traités par la molécule (nitazoxanide) et 7 recoivent le placebo. Le temps de résolution des symptômes est significativement diminué lors d'un traitement par nitazoxanide (1,5 jours versus 2,5 jours). Le mécanisme d'action problable est la potentialisation de la protéine kinase (PK), activée par l'ARN double brin. Une fois la PK phosphoryle elf2α activée, la synthèse protéique virale est bloquée (Siddiq D-M.et *al,* 2011).

Une autre étude a montré que le motif cyclosulfamide (figure 62) inhibe le replicon GI.1 (Dou D.et *al,* 2012a).

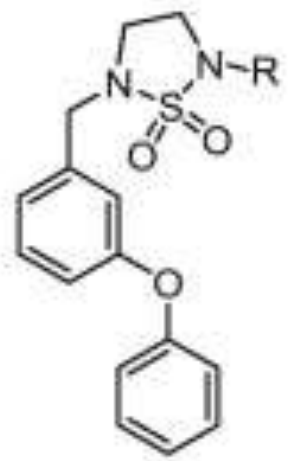


Figure 62 : Structure du motif cyclosulfamide (Dou D.et *al,* 2012a)

L'optimisation du motif de départ a consisté en l'introduction de groupements -R structurellement variés. Les composés dimériques 3 et 4 (en présence de pipérazine) obtenus initialement présentent des activités inhibitrices remarquables (DE 50 = 1,5 et 0,4 µM, respectivement), mais une cytotoxicité importante (TD 50 = concentration à laquelle la toxicité se produit dans 50% des cas = 8,5 et 5,1 µM, respectivement) (figure 63).

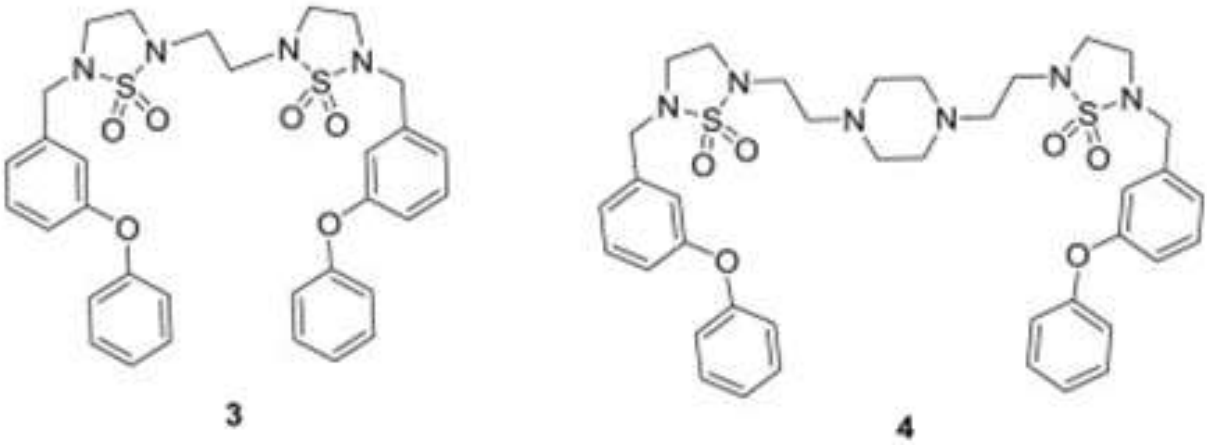


Figure 63 : Dérivés cyclosulfamides dimériques présentant une bonne activité anti-Norovirus, mais une cytotoxicité élevée (Dou D. *et al*, 2012a)

De ce fait, la substitution du groupement -R par d'autres fonctions telles que la pipérazine, la pipéridine, la morpholine ou des dérivés de l'acide isonipecotique a été réalisée. Tous ces dérivés cyclosulfamides présentent une faible activité inhibitrice (DE 50 comprise entre 3 et 10 µM) et un index thérapeutique faible (Dou D. *et al*, 2012a).

C'est ainsi qu'une nouvelle étude a été réalisée sur l'activité potentielle anti-Norovirus des dérivés sulfamides acycliques (figure 64).

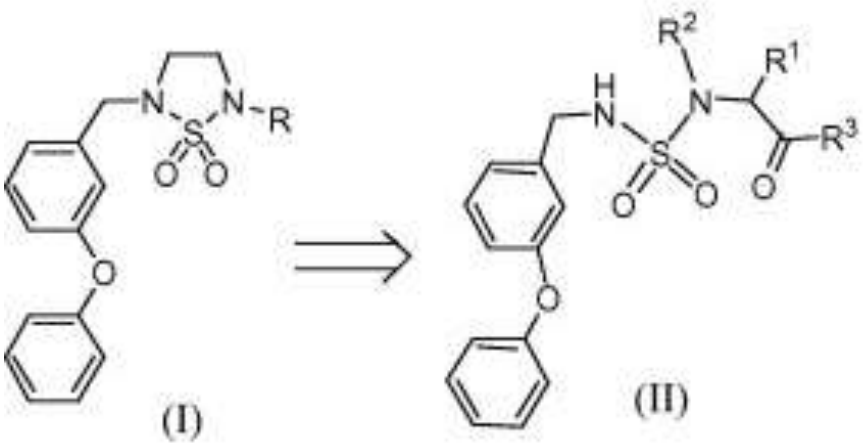


Figure 64 : Structure du motif cyclosulfamide (I) et du motif sulfamide acyclique (II)

Les dérivés sulfamides acycliques présentent une activité anti-Norovirus et un index thérapeutique augmentés par rapport à leur équivalent cyclique (Dou D.et *al,* 2012b).

Une autre approche thérapeutique basée sur l'utilisation d'immunoglobulines humaines polyvalentes par voie entérale pour traiter l'infection à Norovirus chez une patiente immunodéprimée, transplantée rénale et pancréatique souffrant d'une diarrhée à GII.4 (souche Sydney 2012) a été présentée. Elle est alors traitée par des immunoglobulines humaines *via* une sonde nasojéjunale (voie orale) à raison de 45 mg/kg toutes les 6 h pendant 48 h. Après la 3ème dose d'Ig, la patiente présente des douleurs abdominales, une distension abdominale et une constipation. La radiographie abdominale montre une dilatation de l'abdomen (progressive). Ces symptômes pourraient être liés à une réponse immunitaire. Quoi qu'il en soit, les douleurs ont cédé et la diarrhée a disparu dans les 24h suivantes. De plus, une semaine après l'administration des Ig, plus aucun virus n'est détecté dans les selles, ni après 2 mois. Cette thérapeutique a provoqué une résolution clinique et une résolution virologique de l'infection à Norovirus GII.4 (Chagla Z. et *al,* 2013).

V. Prévention

Depuis le développement des vaccins à Rotavirus, les infections à Norovirus sont les premiers agents pathogènes responsables de gastroentérites (Bertholom C., 2014a) causant plus de 200.000 décès par an, dans le monde entier. Ainsi, le développement du vaccin contre les Norovirus est primordial afin de réduire et même d'éliminer ces infections (Vesikari T. et Blazevic V, 2014).

V.1 La vaccination

Le développement d'un vaccin anti-Norovirus est un *challenge,* du fait de la diversité antigénique et de l'incapacité du virus à se cultiver.

Une étude a mis en évidence un vaccin candidat à base de VLPs du Norwalk virus (le développement d'un vaccin à base du virus atténué ou tué n'étant pas une option par rapport à l'impossibilité du vaccin à se propager en culture cellulaire). La voie d'administration est intra-nasale. Il contient des adjuvants topiques ou du chitosane muco-adhérent (Vesikari T. et Blazevic V, 2014). En effet, les antigènes n'ont pas ou peu d'affinités pour la muqueuse nasale et ont tendance à être éliminés par clairance muco-ciliaire. Ainsi, il est nécessaire de les associer avec des agents muco-adhésifs qui permettent d'augmenter leur absorption afin de faciliter leur interaction avec le système immunitaire. Le chitosane, en plus d'avoir cette propriété, est connu pour ses propriétés adjuvantes qui améliorent les réponses immunitaires humorales et cellulaires (Zaman M. et *al*, 2013). L'évaluation de la vaccination montre un niveau de protection modéré contre le Norwalk virus (Vesikari T. et Blazevic V, 2014) : elle diminue la fréquence des gastroentérites à Norwalk-virus (survenant chez 69% des sujets du groupe « placebo » contre 37% des sujets vaccinés) et réduit l'infection à Norwalk virus (82% des sujets du groupe « placebo » contre 61% des sujets vaccinés). Ce vaccin cause une congestion nasale, un écoulement nasal et des éternuements (Atmar R-L. *et al,* 2011). L'étude a été très importante car elle a montré qu'un vaccin à base de VLPs peut induire une protection clinique, au moins contre une infection « homologue » (la souche de l'infection étant la même que celle du vaccin).

Cependant, ce sont les génotypes GII.4 qui sont les plus courants dans le monde entier, c'est pourquoi un nouveau vaccin candidat bivalent a été développé représentant les génotypes GI.1 et GII.4. Dans ce cas, la VLP GII.4 est "artificielle" et basée sur une séquence consensus à partir de trois souches GII.4. Cette VLP diffère de la « souche d'épreuve » GII.4 Farmington par 19 acides aminés dans le domaine hypervariable de la protéine de la capside du Norovirus. Cette différence est retrouvée naturellement entre les différents variants du génotype GII.4 des Norovirus, ce qui laisse espérer qu'une seule VLP GII.4 peut être suffisante pour induire une large réponse immunitaire au sein du génogroupe GII. En revanche, il n'existe pas de réaction croisée entre les différents génogroupes (GI et GII), d'où la nécessité de combinaison des VLPs pour un vaccin candidat (Vesikari T. et Blazevic V, 2014). L'évaluation du vaccin bivalent, après son administration par voie intramusculaire a montré que celui-ci est immunogène et très bien toléré (Treanor J-J*. et al*, 2014). En effet, il induit un taux d'anticorps plus élévé que lors de l'administration du vaccin nasal monovalent ; la concentration d'IgA et d'IgG de chaque VLP atteint un pic le 7ème jour après la première dose du vaccin. Une deuxième dose ne stimule pas d'avantage la production d'anticorps.

La réponse immunitaire est fonction de l'âge : elle diminue chez les sujets âgés.

Parmi les effets indésirables, ce vaccin cause de simples réactions locales au point d'injection sans fièvre ou évenements indésirables graves (Ramani S. *et al*, 2014).

Quant à son efficacité, ce vaccin ne protège pas de l'infection, mais réduit la sévérité des symptômes induits par la « souche d'épreuve » GII.4. Il est alors plus protecteur des formes graves de gastroentérites aiguës que des maladies bénignes (comme le vaccin contre le Rotavirus) (Bernstein D-I., *et al* 2014). En effet, la protection est de 100% contre les vomissements ou les diarrhées sévères, 68% contre les vomissements ou diarrhées considérées comme modérées à sévères et 47% contre les vomissements ou les diarrhées de toute autre gravité (tableau XXIV) (Vesikari T. et Blazevic V., 2014).

Tableau XXIV : Efficacité du vaccin anti-Norovirus (Bernstein D-I., *et al* 2014)

	Vaccin (n=50)	Placebo (n=48)	Réduction relative (%)
Infecté par Norovirus	27 (54%)	30 (62,5%)	13,6
Infecté par Norovirus et malade	13 (26%)	16 (33.3%)	22,0

Sévérité des vomissements et des diarrhées dus au Norovirus :

Vomissements et diarrhées sévères	0	4 (8,3%)	100
Vomissements et diarrhées modérés	3 (6%)	9 (18,8%)	68
Vomissements et diarrhées de toute gravité	10 (20%)	18 (37,5%)	47
Durée de la maladie (heures)	33 ,6	42,9	
Temps d'apparition de la maladie (heures)	33,2	36,9	

De plus, la vaccination permet une diminution de l'excrétion virale, en terme de durée et de taux (figure 65) (Bernstein D-I., *et al* 2014).

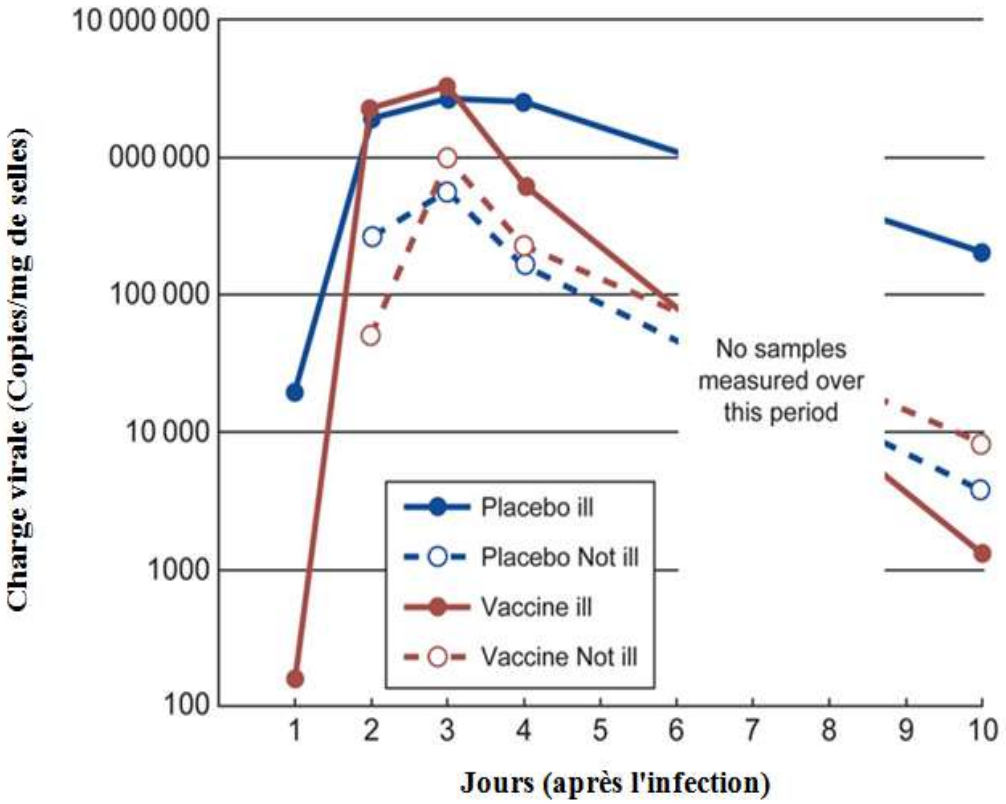


Figure 65 : Excrétion virale du Norovirus chez les sujets du groupe placebo et chez les sujets vaccinés selon qu'ils sont malades ou non (Bernstein D-I., *et al* 2014)

Un critère important reste à déterminer, il s'agit de la durée de protection post-vaccination. Récemment, des études ont montré que la protection contre les infections naturelles est de 4 à 9 ans. Cependant, même si la vaccination apporte une protection de courte durée, elle pourrait être bénéfique dans le contrôle des symptômes ou de la transmission de l'infection, notamment dans des espaces confinés (hôpitaux, maisons de retraite, camps militaires, bateaux de croisières…) (Bernstein D-I., *et al* 2014).

Ce vaccin candidat est prometteur, mais d'autres études d'efficacité sont nécessaires pour fournir une estimation précise de la protection des vaccins vis-à-vis de l'infection par des Norovirus présents dans l'environnement naturel, dans lequel plusieurs génotypes de NoV sont présents (Ramani S. *et al*, 2014).

V.2 La 2'-C-methylcytidine

Une première étude, publiée en 2013, a montré que le traitement (2 fois/jour pendant jours) par l'analogue nucléosidique, la 2'-C-methylcytidine, de souris infectées par le MNV induit une immunité protectrice chez ces même souris. En effet, 2 semaines après l'arrêt du traitement par 2'-C-MeC (soit 3 semaines après la 1ère infection par MNV), 6 souris ont été ré-infestées volontairement par le MNV. Durant les 7 jours suivants, ces souris ont été pesées tous les jours et leurs selles ont été recueillies. Les résultats de cette étude ont montré que la variation du poids n'est pas significative (< 2%) et l'ARN MNV est indétectable dans les selles, d'où la présence d'une protection contre une nouvelle infection à MNV (Rocha Pereira J. et *al*, 2013)

Une étude récente, publiée en septembre 2014, a également montré que le traitement par 2'-C-MeC de souris infectées par MNV permet de réduire l'excrétion virale, mais aussi la transmission du virus aux souris sentinelles non infectées. Ainsi, un traitement prophylactique des souris sentinelles par la 2'-C-MeC induit une protection contre les infections à MNV. Ces résultats constituent une étape importante vers l'élaboration d'une prophylaxie efficace pour le contrôle des épidémies à Norovirus (Rocha Pereira J.et *al*, 2014a).

V.3 Contrôle des infections à Norovirus

Les infections à Norovirus sont difficiles à prévenir et contrôler, en raison de leur faible dose infectieuse, de leur titre d'excrétion élevé et de leur importante stabilité dans l'environnement. De plus, le virus peut se propager par de multiples voies de transmission mais la contamination directe (de personnes à personnes) et celle d'origine alimentaire sont les plus importantes. Diverses mesures de contrôle doivent être prises afin de limiter la transmission du virus.

V.3.1 Contrôle des épidémies dans les institutions

Un ensemble de recommandations doit être édicté pour prévenir et limiter la propagation du virus dans l'institution :

V.3.1.1 L'hygiène des mains

Elle doit être activement promue chez les professionnels de santé, les patients et les visiteurs présents dans les zones de soins touchées par des flambées de gastroentérite. Pendant les épidémies, le lavage (figure 67) est réalisé avec de l'eau et du savon pendant au moins 20 secondes, notamment chez les soignants, après avoir réalisé des soins sur des patients présentant une infection suspectée ou confirmée (Barclay L. et *al,* 2014).



Figure 66 : Le lavage des mains (INPES, 2014)

Les solutions hydro-alcooliques ne sont utilisées qu'en complément du lavage des mains).

V.3.1.2 Port d'équipement individuel approprié

L'aérosolisation du virus et le contact direct, de personnes à personnes augmentent le risque de transmission du Norovirus, c'est pourquoi le port de masque et de gants est recommandé lors des épidémies à Norovirus (également en présence de vomissures). Ces équipements doivent être jetables et à usage unique.

V.3.1.3 Nettoyage et désinfection

La fréquence de nettoyage, notamment des zones à forte circulation ainsi que des surfaces fréquemment contaminées (poignées de porte, téléphone,…) doit être augmentée.
La désinfection doit être réalisée avec de l'eau de javel à une concentration > 1000 ppm. En effet, des études ont montré que l'eau de javel est plus efficace que les autres désinfectants tels que les ammoniums quaternaires.
Le nettoyage et la désinfection doivent être réalisés des zones à faibles contaminations vers les zones à fortes contaminations.
Le nettoyage à la vapeur peut être utilisé pour les tapis, chaises ou autres textiles sensibles à l'eau de javel.

V.3.1.4 Regroupement et isolement des patients

Les patients sont groupés selon leurs symptômes. Les patients symptomatiques sont isolés et leur transfert est interdit (dans d'autres services, zones non infectées) au moins jusqu'à 48h après résolution des symptômes, afin d'éviter la propagation de l'infection aux zones indemnes.

V.3.1.5 Personnel de santé

Les soignants sont responsables d'un groupe de patient donné : symptomatique ou asymptomatique, les mouvements entre les groupes de patients doivent être limités.
Si le personnel est touché par l'infection, il ne doit pas fréquenter l'établissement de santé jusqu'à au moins 48h après la résolution des symptômes.

V.3.1.6 Minimiser les visiteurs

Les visites dans les zones touchées doivent être limitées. Les visiteurs symptomatiques doivent être exclus de l'établissement de soins.

V.3.2 Contrôle des épidémies d'origine alimentaire

Les épidémies d'origine alimentaire (figure 67) peuvent être dues à une contamination des aliments lors de la production, du traitement, de la préparation ou du service. Très fréquemment, les manipulateurs de denrées alimentaires infectés sont responsables d'épidémies, d'où l'importance de l'hygiène des mains et de leur exclusion des cuisines jusqu'à au moins 48h après la résolution des symptômes. Les aliments, les plus souvent responsables des épidémies sont les légumes, les fruits, les crustacés car ils sont consommés crus ou peu cuits. Les aliments, ustensiles et plan de travail doivent être nettoyés et désinfectés (Barclay L. et *al*, 2014).

V.3.2.1 Contrôle des épidémies liées à l'environnement

Le Norwalk virus est capable d'infecter des individus après 61 jours passés dans les eaux souterraines. Des études ont montré que ces virus peuvent rester potentiellement infectieux jusqu'à 6 mois sur des aliments congelés, jusqu'à 7 jours sur des aliments réfrigérés et plus de 7 jours sur des vecteurs passifs. Leur importante stabilité sur les mains permet leur transfert sur des surfaces, par simple contact. Le lavage des mains (comme vu précédemment) est donc primordial : il doit être fréquent et réalisé à l'eau savonneuse. La désinfection par une solution alcoolique n'est pas suffisante, elle n'est qu'un complément au lavage des mains (Barclay L. et *al*, 2014).

« Le B.A.-BA du lavage des mains

Le lavage des mains est un des moyens les plus efficaces pour limiter la diffusion des micro-organismes. Ce geste simple est à effectuer plusieurs fois dans la journée, encore plus si l'on s'occupe d'enfants et de personnes âgées, qui sont plus vulnérables. Il est impératif de se laver les mains :

- avant de s'occuper d'un bébé et après l'avoir changé,
- après s'être occupé d'une personne malade,
- avant de préparer, servir ou prendre les repas,
- après être allé aux toilettes
- après chaque sortie à l'extérieur » (INPES, 2012b)



Figure 67 : Prévention des épidémies d'origine alimentaire (CDC, 2014)

La désinfection des surfaces, des poignées de porte, des robinets, des sièges de toilette doit être réalisée avec de l'eau de javel à une concentration > 1000 ppm (Barclay L. et *al*, 2014). En effet, une étude publiée en 2013 a montré que l'eau de javel doit avoir une concentration > 500 ppm pour induire une diminution significative de la concentration virale de HuNoV. De plus, HuNoV est relativement résistant à l'éthanol et résistant aux ammoniums quaternaires (Tung G. et *al*, 2013). Pour une désinfection efficace, la durée de contact (de l'eau de javel) doit être > 5 minutes. Les désinfectants ne possèdent pas d'activité résiduelle, d'où la nécessité de désinfections fréquentes (Barclay L. et *al*, 2014).

V.3.2.2 Les désinfectants

Plusieurs études récentes ont mis en évidence divers désinfectants potentiels contre les Norovirus :

- Le chlore est un désinfectant efficace dans l'inactivation de HuNoV
- le phosphate trisodique (pH ~ 12) permet une réduction de la concentration de HuNoV ; il pourrait être utilisé dans la désinfection des aliments et des surfaces en contact avec les aliments (Kingsley D-H. et *al*, 2014).
- quatre peroxydes ont été évalués (acide per-acétique, acide per-propionique, acide per-lactique, acide per-citrique). L'acide per-acétique et l'acide per-propionique sont les plus efficaces contre HuNoV. Ils pourraient être utilisés dans l'inactivation des Norovirus dans l'eau et sur les surfaces dures (Vimont A. et *al*, 2014).

Les désinfectants chimiques doivent satisfaire à des exigences, telles que la faible toxicité ou le faible risque d'endommager les matériaux contaminés. C'est pourquoi, de nouvelles méthodes de désinfection sont considérées comme des alternatives ou des compléments aux interventions traditionnelles d'hygiène. Par exemple :

- le film de dioxyde de titane fluoré permet une auto-désinfection des surfaces ;
- l'ozone permet une décontamination de grandes surfaces ;
- le peroxyde d'hydrogène induit une décontamination de grandes surfaces ;
- l'eau super oxydée est un désinfectant alimentaire ;
- la vapeur d'eau saturée ou la vapeur produite par ultrason peuvent être utilisées pour la désinfection de surfaces en contact avec les aliments (Barclay L. et *al*, 2014) ;
- des composés phyto-chimiques pourraient également avoir une activité anti-Norovirus. Ils présentent une faible toxicité et peu d'effets indésirables.

Des études futures sont nécessaires pour confirmer l'activité anti-Norovirus et ainsi le mécanisme d'action des composés phyto-chimiques (Ryu S. et *al*, 2014), ainsi que des autres méthodes de désinfection (Barclay L. et *al*, 2014).

VI. Le Norovirus, un virus émergent parfait

Le Norovirus est-il un virus émergent ?

Depuis la découverte des Norovirus en 1972, les progrès diagnostiques avec notamment les techniques moléculaires ont permis de prendre conscience de la place importante des Norovirus dans les gastroentérites aiguës. Cependant, les Rotavirus, découverts en 1973 étaient largement considérés comme les principaux virus responsables de GEA, plaçant les Norovirus en seconde ligne. Depuis la disponibilité du vaccin anti-Rotavirus la situation semble changer, le fardeau de la gastroentérite à Norovirus augmente, surtout chez les enfants (Desselberger *and* Goodfellow I., 2014). Une étude, menée dans un hôpital d'enfants du Texas et publiée en 2013 portant sur la recherche des virus entériques avant (de 2002 à 2006) et après l'introduction du vaccin anti-Rotavirus (de 2007 à 2010), le démontre. Les résultats de cette étude sont représentés sous forme de graphiques dans les figures 68 et 69.

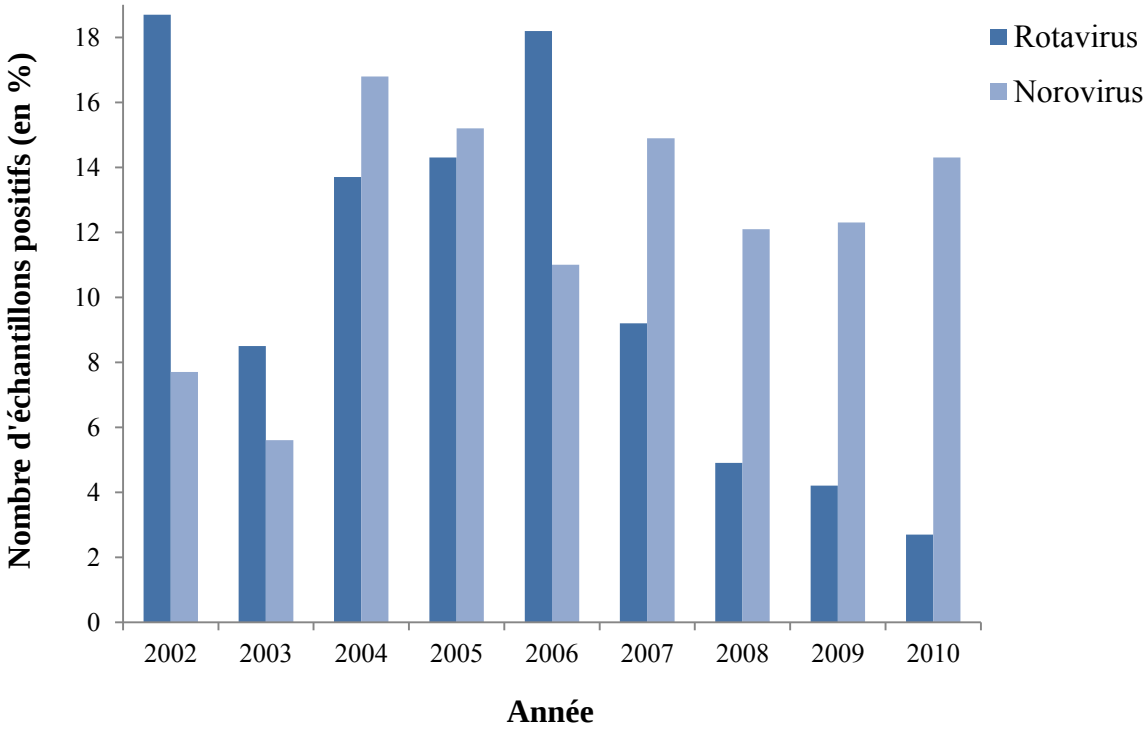


Figure 68 : Prévalence des Rotavirus et des Norovirus dans les échantillons de selles à l'hôpital d'enfants du Texas d'après les données de Koo H-L. et *al*, 2013).

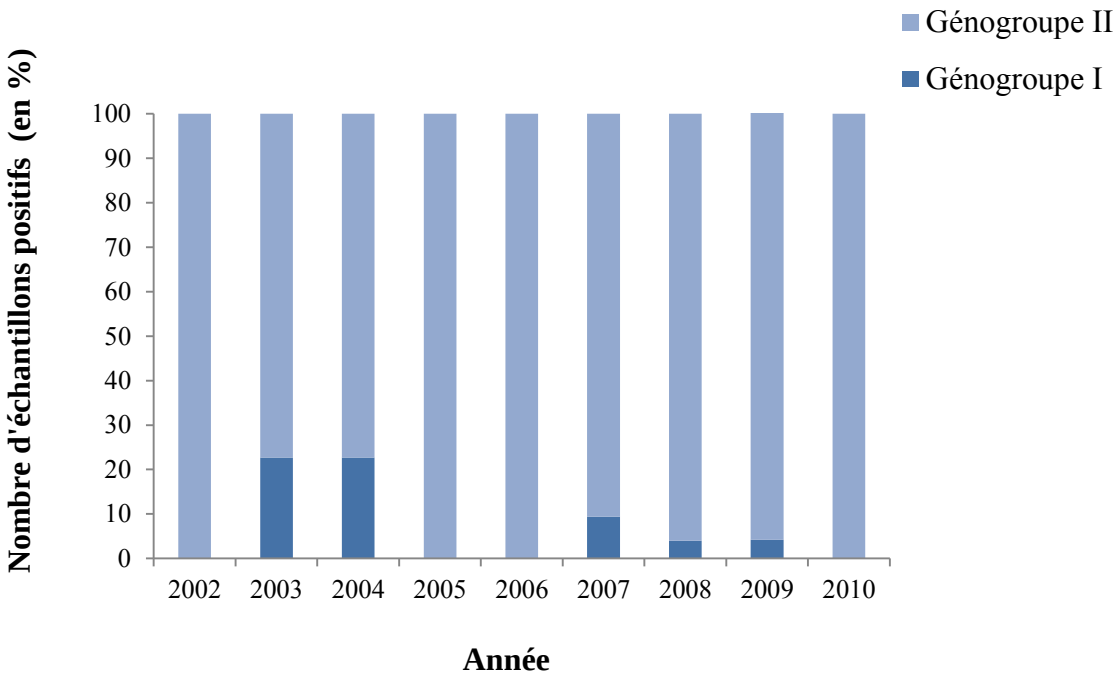


Figure 69 : Prévalence des génogroupes I et II parmi les échantillons de selles positifs à Norovirus à l'hôpital d'enfants du Texas (d'après les données de Koo H-L. et al, 2013)

Cette étude montre un réel impact de la vaccination sur la prévalence des gastroentérites à Rotavirus ; de 14,6% de 2002 à 2006, elle n'est plus que de 5,2 % de 2007 à 2010, soit une baisse de 64% après l'introduction du vaccin en 2006. Parallèlement, la prévalence des gastroentérites à Norovirus a augmenté depuis 2003. Cette augmentation peut être la conséquence de l'émergence de nouveaux variants de la souche GII.4, mais surtout de l'introduction du vaccin anti-Rotavirus après 2006. Ainsi, le Norovirus est devenu prédominant dans les gastroentérites infantiles, tandis que la prévalence des Rotavirus a diminué de façon spectaculaire depuis la disponibilité du vaccin (Koo H-L. *et al*, 2013).

De plus, des études ont montré que dans certains pays, où la vaccination contre le Rotavirus est entré dans un programme vaccinal (et est remboursé), notamment la Belgique, la Finlande, l'Autriche, une réduction du nombre d'hospitalisations et de la mortalité est observée. Cependant, l'efficacité du vaccin, c'est-à-dire son effet protecteur, dépend de la zone du globe concernée (tableau XXV).

Tableau XXV: Efficacité des vaccins anti-Rotavirus (Bertholom C., 2014a)

Zone concernée	Efficacité du vaccin vis à vis des diarrhées sévères (réduction en %)
Europe	95%
Amérique du Nord	96%
Amérique du Sud	92%
Afrique	61,2%

Cette efficacité dépend du niveau socio-économique de la zone concernée, plus il est élevé plus l'efficacité est importante. Ainsi, la malnutrition semble jouer un rôle dans la diminution de l'efficacité des vaccins anti-Rotavirus. En effet, elle induit un risque plus important de survenue d'infections, une mauvaise réponse immunitaire et donc une mauvaise réponse à la vaccination (Bertholom C., 2014a).

Le Norovirus est-il un virus "parfait"?

Les Norovirus possèdent tous les attributs d'un agent infectieux idéal. En effet, comme nous l'avons montré tout au long de ce travail, leur stabilité dans l'environnement, les voies multiples de transmission, la dose infectieuse faible, l'excrétion importante et prolongée, mais aussi leur diversité génétique expliquent leur grande contagiosité et leur facilité de transmission (tableau XXVI).

Tableau XXVI : Principales caractéristiques favorisant la transmission du Norovirus (d'après Barclay L. et *al*, 2014)

Caractéristiques	Description
Dose infectieuse très faible	Elle varie de 18 à 10^3 particules virales (Hall A-J., 2012)
Excrétion virale importante	Elle varie de 10^5 à 10^9 particules virales/g de selles (Barclay L. et *al*, 2014), même si infections asymptomatiques (Hall A-J., 2012)
Excrétion prolongée	En moyenne, le virus est excrété 4 semaines après le début des symptômes, mais peut être détecté jusqu'à 8 semaines après le début des symptômes (Barclay L. et *al*, 2014) ; chez les immunodéprimés la durée d'excrétion est prolongée et peut devenir chronique (Kundig F. et *al*, 2013)
Stabilité dans l'environnement	Les particules virales peuvent rester infectieuses sur des surfaces jusqu'à 2 semaines et plus de 2 mois dans l'eau ; de plus, elles sont résistantes à la congélation (jusqu'à -20°C) (Barclay L. et *al*, 2014) et à la chaleur (4 min à 72°C) (Wang D. et Tian P., 2014) ainsi qu'à de nombreux désinfectants (Hall A-J., 2012)
Diversité génétique	Il existe plus de 30 génotypes infectant l'Homme (9 GI et 22 GII) (Kundig F. et *al*, 2013) ; les Norovirus évoluent rapidement suite à des mutations, d'où la faible immunité protectrice (Hall A-J., 2012)
Multiples voies de transmission	Les Norovirus sont transmis par voie oro-fécale, par les vomissures (aérosols), aliments, eau, contact avec des surfaces infectées, contact direct de personnes à personnes... (Barclay L. et *al*, 2014)

Par ailleurs, jusqu'à ce jour, les Norovirus humains ne pouvaient pas être cultivés, d'où le manque de connaissances sur leur mode de réplication et l'impossibilité de développer des molécules antivirales ou un vaccin, ce qui contribue à renforcer la prévalence des infections à Norovirus dans tous les groupes d'âges. Cependant, des chercheurs ont démontré que les cellules cibles du Norovirus humain sont les lymphocytes B (et non les cellules épithéliales, supposées jusqu'à ce jour). De plus, la présence de bactéries commensales est nécessaire à l'infection de ces cellules (figure 70), notamment *Enterobacter cloacea* qui engloberait les antigènes de groupe sanguin (HBGA) et pourrait fixer les Norovirus. Néanmoins, cette étude ne révèle pas comment ces bactéries aident les Norovirus à infecter les lymphocytes B (transport du virus? activation de molécules de surface?). Des recherches complémentaires sont nécessaires pour comprendre ce mécanisme.

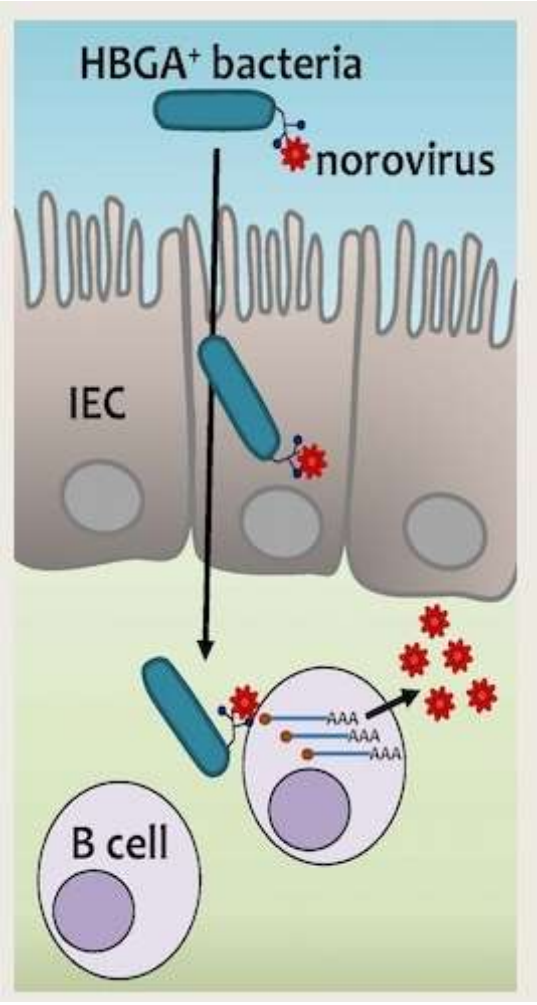


Figure 70 : Schéma de l'infection des Norovirus : infection des cellules B *via* les bactéries commensales (Zimmer C., 2014)

Quoi qu'il en soit, cette découverte importante explique l'échec des multiples tentatives de culture du Norovirus. Elle devrait ouvrir de nouvelles pistes pour le développement du vaccin et de médicaments antiviraux (Zimmer C., 2014).

Conclusion

Nous avons rappelé, au cours de ce travail, que les étiologies des gastroentérites aiguës sont nombreuses, infectieuses (bactériennes, parasitaires, virales) ou non (provoquées par des médicaments, par des allergies, par des aliments...). Cependant les virus (Rotavirus, Norovirus, Adénovirus, Sapovirus...) sont responsables du plus grand nombre de cas de GEA. Les Norovirus, quant à eux, provoquent des gastroentérites de courtes durées (24h à 48h) chez les personnes immunocompétentes. Toutefois, chez les patients immunodéprimés, les infections à Norovirus peuvent devenir chroniques (diarrhées chroniques, diarrhées intermittentes, excrétion virale prolongée). La transmission des Norovirus est facilitée d'une part, par ses multiples voies de contamination (directes ou indirectes par des surfaces contaminées, des aérosols, l'alimentation) et d'autre part, du fait de leurs caractéristiques particulières (faible dose infectieuse, très grande stabilité dans l'environnement, excrétion virale importante et prolongée...).

Nous avons mentionné le rôle de l'hôte et sa susceptibilité génétique au Norovirus. Cette sensibilité est liée aux antigènes des groupes sanguins. De plus, l'importante diversité antigénique virale favorise l'apparition de nouvelles épidémies à Norovirus.

Les méthodes biologiques de diagnostic sont devenues plus accessibles et se sont diversifiées. La microscopie électronique a fait place aux techniques moléculaires, sensibles et spécifiques, mais coûteuses. Elles permettent d'identifier le génogroupe de la souche en cause et contribuent aux études épidémiologiques et à la surveillance de la circulation virale. Des techniques multiplex sont aussi proposées pour la recherche simultanée de plusieurs agents de diarrhées infectieuses, viraux, bactériens, parasitaires et fongiques. L'immunodiagnostic par *ELISA*, de préférence, ou par tests immunochromatographiques rapides, est couramment utilisé pour un diagnostic ou un dépistage de routine de Norovirus, conjointement, si demandé, avec la recherche de Rotavirus et d'Adénovirus.

A ce jour, le traitement n'est que symptomatique. Il consiste en la réhydratation des patients et est associé à des règles d'hygiène stricte. Aucun traitement antiviral, ni aucun vaccin ne sont disponibles actuellement, du fait de l'impossibilité à cultiver ces virus.

Cependant des modèles tels que des virus de substitution, des lignées cellulaires portant le réplicon du Norovirus humain ou des modèles animaux ont pu être utilisés pour étudier de potentielles molécules antivirales Un vaccin candidat, bivalent (protégeant contre les génotypes GI.1 et GII.4) est en cours de développement.

En conclusion,

- **Les Norovirus sont-ils des virus émergents ?** A cette question, nous pouvons répondre oui, et notamment depuis l'introduction des vaccins anti-Rotavirus sur le marché mondial. En effet, la prévalence des infections à Rotavirus a considérablement diminué (particulièrement chez les enfants de moins de 5 ans), alors que celle des Norovirus est restée stable ou a augmenté.

- **Les Norovirus peuvent-ils être considérés comme des virus parfaits ?** Etant donné la facilité de transmission des Norovirus favorisant les petites épidémies (notamment dans les collectivités), l'absence de vaccin permettant de prévenir les infections à Norovirus et le manque de traitement spécifique pouvant limiter les symptômes et la durée de l'infection, nous pouvons considérer que les Norovirus sont des agents pathogènes parfaits.

Cependant les travaux récents ont permis de cultiver le Norovirus humain et identifier la cible réelle des virus, le lymphocyte B. Cette nouvelle avancée pourrait favoriser le développement rapide et la mise sur le marché d'un vaccin anti-Norovirus, ainsi qu' un traitement antiviral spécifique. Ainsi, les Norovirus resteront-ils encore longtemps les principaux virus responsables de gastroentérites ?

Bibliographie

ALAIN S., DENIS F., 2007. Epidémiologie des diarrhées aiguës infectieuses en France et en Europe. *Archives de pédiatrie.* Vol. 14, 132-144.

AMBERT-BALAY K., POTHIER P., 2013. Evaluation of 4 immunochromatographic tests for rapid detection of Norovirus in faecal samples. *JCV.* Vol. 56, 3, 278-282.

ANDERSON MONTEIRO SIQUIERA J., DA COSTA LINHARES A., DE SOUZA OLIVEIRA O., DA SILVA SOARES L., SOUSA LUCENA M-S., MONTEIRO WANZELLER A-L., PEREIRA MASCARENHAS J-D., BENCHIMOL GABBAY Y., 2011. Evaluation of third-generation RIDASCREEN enzyme immunoassay for the detection of Norovirus antigens in stool samples of hospitalized children in Belém, Pará, Brazil. *DMID.* Vol. 71, 4, 391-395.

ARANDA-MICHEL J., GIANNELLA R A., 1999. Acute diarrhea : A pratical review. *The American Journal of Medicine.* Vol. 106, 6.

ARIAS A., THORNE L., GOODFELLOW I., 2014. Favipiravir elicits antiviral mutagenesis during virus replication in vivo, disponible sur http://elifesciences.org/content/3/e03679#sthash.cBEPY8fQ.dpuf (page consultée le 1 novembre 2014)

ARMBRUST S., KRAMER A., OLBERTZ D., ZIMMERMANN K., FUSCH C., 2009. Norovirus infectious in paterm infants : wide variety of clinical courses. *BMC Research Notes.* Vol. 2.

ATMAR R-L., ESTES M-K., 2001. Diagnosis of non cultivable gastroenteritis viruses, the human caliciviruses. *Clinical microbiology reviews.*Vol. 14, 1, 15-37.

ATMAR R-L., M D., BERNSTEIN D-I., M D., HARRO C-D., M D., AL-IBRAHIM M-S., M B., B CH., CHEN W-H., M D., FERREIRA J., M SC., ESTES M-K., D PH., GRAHAM D-Y., M D.,OPEKUN A-R., A-C P., RICHARDSON C., D PH., MENDELMAN P-M., M D., 2011. Norovirus Vaccine against Experimental Human Norwalk Virus Illness. *The new england journal of medicine.*Vol. 365, 23, 2178-2187.

AUMAITRE H., LECAILLON E., OLIVIER S., BOUCHAUD O., 2004. Diarrhées bactériennes. *EMC-Chirurgie.* Vol. 1, 5, 437-454.

BARBUT F., COLLIGNON A., BUTEL M-J., BOURLIOUX P.,. 2015. Le transfert de flore digestive : une revue de la littérature. *Annales Pharmaceutiques Françaises.* Vol. 73, 1, 13-21.

BARCLAY L., PARK G-W., VEGA E., HALL A., PARASHAR U., VINJE J., LOPMAN B., 2014. Infection control for Norovirus. *Clinical microbiology and infection.* Vol. 20, 8, 731-740.

BEAUGERIE L., 2010. Epidémiologie des diarrhées aiguës en France. *Hépato-Gastro.* Vol. 7, 4, 55-261.

BEAUGERIE L., SOKOL H.,. 2013. Diarrhées infectieuses aiguës de l'adulte : épidémiologie et prise en charge. *La presse médicale.* Vol. 42, 1, 52-59.

BERNSTEIN D-I., ATMAR R-L., LYON G-M., TREANOR J-J., CHEN W-H., JIANG X., VINJE J., GREGORICUS N., FRENCK R-W., MOE C-L., AL-IBRAHIL M-S., BARRETT J., GRAHAM D-Y., GOODWIN R., BORKOWSKI A., CLEMENS R., MENDELMAN P-M., 2014. Norovirus Vaccine Against Experimental Human GII.4 Virus Illness: A Challenge Study in Healthy Adults. *JID.* 1-9.

BERTHOLOM C., 2013. Actualités sur les gastroentérites virales. *Option bio.* Vol. 24, 484, 13-19.

BERTHOLOM C., 2014a. Les vaccins rotavirus : couverture vaccinale en 2014 et impact sur l'épidémiologie. *Option bio.* Vol. 25, 511, 13-14.

BERTHOLOM C., 2014b. Nouveaux virus responsables de gastro-entérites. *Option bio.* Vol. 25, 515, 16-17.

BOK K., GREEN K-Y., 2012. Norovirus Gastroenteritis in Immunocompromised Patients. *The new England journal of medicine.* Vol. 367, 2126-2132.

BOSCH A., PINTO R-M., GUIX M., 2014. Human astroviruses. *Clinical microbiology reviews.*Vol. 27, 4, 1048-1074.

BOUREE P., 2014. Infections parasitaires de l'intestin. *AKOS.* Vol. 9, 2, 1-8.

BOURREE P., BISARO F., 2007. Diarrhées parasitaires. *La presse médicale.* Vol. 36, 706-716.

BRAULT M-E., 2007. Développement d'un essai in *vivo* pour mesurer l'activité de BACE et son implication dans la maladie d'Alzheimer. Mémoire de maîtrise en biologie moléculaire et cellulaire. Laval :Université de Laval, 93 p.

CANDOTTI D., ALLAIN J-P., 2007. Tests d'amplification génomique multiple. *Virologie.* Vol. 11, 2, 35-150.

CARLI P., RIOU B., TELION C., 2004. Urgences médico-chirurgicales de l'adulte. Arnette Blackwell. 2e edition. 1579 p.

CARRE D., 2004. Conduite à tenir devant une diarrhée aiguë. Etiologies. *EMC-Chirurgie.* Vol. 1, 5, 493-532.

CHAGLA Z., QUIRT J., WOODWARD K., NEARY J., RUTHERFORD C., 2013. Chronic Norovirus infection in a transplant patient successfully treated with enterally administered immune globulin. *JCV.* Vol. 58, 1, 306-308.

CHAN C-M V., CHAN C-W D., MA C-K, CHAN H-B., 2010. Norovirus as cause of benign convulsion associated with gastro-enteritis. *JPCH*. Vol. 10, 1440-1754.

CHANG K-O., 2009. Role of Cholesterol Pathways in Norovirus Replication. *Journal of virology.* 2009, Vol. 83, 17, 8587–8595.

CHANG K-O., GEORGE D-W., 2007. Interferons and Ribavirin Effectively Inhibit Norwalk Virus Replication in Replicon-Bearing Cells. *Journal of Virology.* Vol. 81, 22, 12111-12118.

CHANG K-O., TAKAHASHI D., PRAKASH O., KIM Y., 2013. Characterization and inhibition of Norovirus proteases of genogroups I and II using a fluorescence resonance energy transfer assay. *Virology.* 2013, Vol. 432, 2, 125-133.

CHEHADE H., GIARARDIN E., DELICH V., PASCUAL M-A., VENETZ J-P., CACHAT F., 2012. Acute Norovirus-induced agranulocytosis in a pediatric kidney transplant recipient. *Transplant Infectious Disease.* Vol. 14, E27-E29.

CHEN Z., SOSNOVTSEV S-V., BOK K., PARRA G-I., MAKIYA M., AGULTO L., GREEN K-Y., PURCELL R-H., 2013. Development of Norwalk Virus-Specific Monoclonal Antibodies with Therapeutic Potential for the Treatment of Norwalk Virus Gastroenteritis. *Journal of Virology.* Vol. 87, 17, 9545-9557.

CHENA H-M., WANGB Y., SUC L-H., CHIUD C-H., 2013. Nontyphoid Salmonella Infection: Microbiology, Clinical Features, and Antimicrobial Therapy. *Pediatrics & Neonatology.* Vol. 54, 3, 147-152.

CLARKE I-N., LAMBDEN P-R., 1997. The molecular biology of caliciviruses. *Journal of general virology.* Vol. 78, 291-301.

CLERE N., 2014. Importance du conseil officinal dans la prise en charge de la gastroentérite aiguë virale. *Actualités pharmaceutiques.* Vol. 53, 541, 40-42.

CONSTANTINI V., GRENZ L., FRITZINGER A., LEWIS D., BIGGS C., HALE A., VINJE J., 2010. Diagnostic accuracy and analytical sensitivity of IDEIA Norovirus assay for routine screening of human Norovirus. *Journal of clinical microbiology.* Vol. 48, 8, 2770-2778.

CONSTANTINI V., WHITAKER T., BARCLAY L., LEE D., MCBRAYER T-R., SCHINAZI R-F., VINJE J., 2012. Antiviral activity of nucleoside analogues against Norovirus. *Antiviral Therapy.* Vol. 17, 981-991.

CROCI R., TARANTINO D., MILANI M., PEZZULLOA M., ROHAYEM J., BOLOGNESI M., MASTRANGELO E., 2014. PPNDS inhibits murine Norovirus RNA-dependent RNA-polymerase mimicking two RNA stacking bases. *FEBSL.* Vol. 588, 9, 1720–1725.

DEBBINK K., LINDESCHMIDT L-C.,DONALDSON E-F., BARIC R-S., 2012. Norovirus Immunity and the Great Escape, disponible sur : http://www.plospathogens.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.ppat.1002921.10.1371/journal.ppat.1002921 (page consultée le 9 septembre 2014)

DE FRANCO A., ROBERTSON M., LOCKSLEY R., CUNIN R., 2009. Immunité : La réponse immunitaire dans les maladies infectieuses et inflammatoires. BROCHE, 365 p

DELACOUR H., DUBROUS P., KOECK JL., 2010. Les Norovirus : une cause majeure des gastro-entérites. *Médecine tropicale.* Vol. 70, 111-118.

DERBRE S., LECLERC M-V., 2014. Prise en charge des vomissements, diarrhées et constipation par les thérapeutiques complémentaires et alternatives. *Actualités pharmaceutiques.* Vol. 534, 53, 47-52.

DE ROUGEMONT A., POTHIER P., 2010. Rotavirus. *Biologie médicale.* 2010, 1-14.

DESSELBERGER U., GOODFELLOW I., 2014. Noroviruses : a global cause of acute gastroenteritis. *The lancet infectious disease.* Vol. 14, , 664-665.

DINESEN L., 2013. Acute diarrhoea. *Medicine.* Vol. 41, 2, 104-107.

DONALDSON E-F., LINDERSMITH L-C., LOBUS A-D., BARIC R-S., 2010. Viral shape-shifting: Norovirus evasion of the human immune system. *Nature review microbiology.* Vol. 8, 231-241.

DOU D., MANDADAPU S-R., ALLISTON K-R., KIM Y., CHANG K-O.,GROUTAS W-C., 2012a. Cyclosulfamide-based derivatives as inhibitors of Noroviruses. *EJMC.* Vol. 47, 59–64.

DOU D., TIEW K-C., MANDASAPU S-R., GUNNAM M-R.,KIM Y.,CHANG K-O., GROUTAS W-C., 2012b. Potent Norovirus inhibitors based on the acyclic sulfamide scaffold. *Bioorganic & Medicinal Chemistry.*Vol. 20, 6, 2111–2118.

DUPEYRON C., BOUREE P. , 2013. Tests de diagnostic rapide en pathologie infectieuse, intérêt en zone tropicale (2013) disponible sur :http://devsante.org/base-documentaire/examens-complementaires/tests-de-diagnostic-rapide-en-pathologie-infectieuse-inter (page consultée le 9 septembre 2014)

ECKERT C., BARBUT F., 2010. Les diarrhées post-antibiotiques. *Revue francophone des laboratoires.* 426, 93-99.

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. *Virology.* 450-451, 106-113.

ETAHLA A-A., LIM K-L., EDEN J-S., KELLY A-G., MACKENZIE J-M., WHITE P-A., 2014. Non-nucleoside inhibitors of the Norovirus RNA polymerase; scaffolds for rational drug design. *Antimicrobial agents and chemotherapy.*

FEGHOUL L., LE GOFF J., 2012. Adénovirus. *Revue francophone des laboratoires.* Vol. 42, 447, 63-71.

FORTUNE A., 2006. Techniques de Modélisation Moléculaire Appliquées à l'Etude et à l'Optimisation de Molécules Immunogènes. Thèse doctorat d'université. Grenoble : Université de Grenoble. 167 p.

GAGNEUR A., NOWAK E., LEMAITRE T., SEGURA J P.,DELAPERRIERE N., ABALEA L., POULHAZAN E., JOSSENS A., AUZANNEAU L., TRAN A., PAYAN C., JAY N., DE PARSCAU L., OGER E., 2011. Impact of Rotavirus vaccination on hospitalizations for rotavirus diarrhea : The IVANHOE study. *Vaccine.* Vol. 29, 3753-3759

GERBOUIN O., GRELLET J.,. 2008. Le point sur les traitements médicamenteux du sida. *Actualités pharmaceutiques.* Vol. 47, 472, 10-22.

GOUALI M., WEILL F-X., 2013. Les Escherichia coli entérohémorragiques : des entérobactéries d'actualité. *La presse médicale.*Vol. 42, 1, 68-75.

GUADAGNUCCI MORILLO S., LUCHS A., CILLI A.,RIBEIRO C-D., CALUX S-J., DE CASSA COMPAGNOLI CARMONA R., DO CARMO SAMPAIO TAVARES TIMENETSKY M., 2011. Norovirus 3rd Generation kit: An improvement for rapid diagnosis of sporadic gastroenteritis cases and valuable for outbreaks detection. *Journal of Virological Methods.* Vol. 173, 13-16.

GUPTA V., GULATI P., BHAGAT N., DHAR M-S., VIRDI J-S., 2014. Detection of Yersinia enterocolitica in food: an overview. *EJCMID*

HALL A-J., 2012. Noroviruses : The perfect human pathogens? *Journal of infectious diseases.* Vol. 205, 1622-1624.

HALL A-J., LOPMAN B-A., VINJE J., 2013. Sapovirus. *Foodborne Infections and Intoxications.* 4, 313-319.

HALL A-J., VINJE J., LOPMAN B., WOO PARK G., YEN C., GREGORICUS N., PARASHAR U., 2011. Updated Norovirus Outbreak Management and Disease Prevention Guidelines. *MMWR.* Vol. 60, 3, 1-15.

HAMZA I-A., JURZIK L., WIHLELM M., 2014. Development of a Luminex assay for the simultaneous detection of human enteric viruses in sewage and river water. *Journal of Virological Methods.* Vol. 204, 65-72.

HARDY M-E., 2005. Norovirus protein structure and function. F*ederation of European Microbiological Societies-Microbiology Letters.* Vol. 253, 1-8.

HARTMANN E-M., COLQUHOUN D-R., SCHWAB K-J., HALDEN R-U., 2015. Absolute quantification of Norovirus capsid protein in food, water, and soil using synthetic peptides with electrospray and MALDI mass spectrometry. *JHM.* Vol. 286, 525-532.

HUBERT P., 2008. Déshydratation aiguë du nourrisson. *Journal de pédiatrie et puericulture.* Vol. 21, 3, 124-132.

HUICHO L., 1995. Diagnostic approach of acute infectious diarrhea : the state of the art. *Bulletin de l'Institut francais d'études Andins.* Vol. 24, 2, 317-339.

HURAUX JM., NICOLAS JC., AGUT H., PEIGUE-LAFEUILLE H., 2003. Traité de virologie médicale*.*Editions Estem, 699 p.

HYDE J-L., MACKENZIE J-M., 2012. Pathogenesis and replication of Norovirus: following the mouse tail? *Microbiology Australia.* Vol. 33, 2, 74-76.

JUNG K., WANG Q., KIM Y., SCHEUER K., ZHANG Z., SHEN Q., CHANG K-O., SAIF L-J., 2012. The Effects of Simvastatin or Interferon-α on Infectivity of Human Norovirus Using a Gnotobiotic Pig Model for the Study of Antivirals, disponible sur : http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0041619 (page consultée le 20 octobre 2014)

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. *Journal of virology.* Vol. 10, 5, 1075-1081.

KARST S-M., 2010. Pathogenesis of Noroviruses, Emerging RNA Viruses. *Viruses.* Vol. 2, 748-781.

KAUFMAN S-S., GREEN K-Y., KORBA B-E., 2014. Treatment of Norovirus infections: Moving antivirals from the bench to the bedside. *Antiviral Research.* Vol. 105, 80-91.

KIMURA E., GOTO H., MIGITA A., HARADA S., YAMASHITA S., HIRANO T., UCHINO M., 2010. An adult Norovirus-related encepahlitis/encephalopathy with mild clinical manifestation. *BMJ - Case Reports,* 6 p.

KINGSLEY D-H., VINCENT E-M., MEADE G-K., WATSON C-L., FAN X., 2014. Inactivation of human Norovirus using chemical sanitizers. *IJFM.* Vol. 171, 3, 94-99.

KIRBY A., ITURRIZA-GOMARA M., 2012. Norovirus Diagnostics : Options, Applications and Interpretations. *Expert Review of Anti-Infective Therapy.*Vol. 10, 4, 223-233.

KOHLI E., BON F., BALAY K., POTHIER P., 2005. Les calicivirus humains, une cause majeure de gastro-entérite aiguë. *Virologie.* Vol. 9, 2, 93-105.

KOO H-L., NEILL F-H., ESTES M-K., MUNOZ F-M., CAMERON A., DUPONT H-L., ATMAR R-L., 2013. Noroviruses: The Most Common Pediatric Viral Enteric Pathogen at a Large University Hospital After Introduction of Rotavirus Vaccination. *JPIDS*. Vol. 2, 1, 57-60.

KUNDIG F., CHEVALLEY P., GENNE D., 2013. Gastro-entérites à Norovirus : fréquentes, souvent épidémiques et potentiellement graves. *Revue médicale suisse.* 9, 1806-1811.

LE GUYADER F-S., MAALOUF H., LE PENDU J., 2013. Huitres et Norovirus : une affinité particulière. *Virologie.* Vol. 17, 4, 253-263.

LEYRAL G., VIERLING E., 2007. *Microbiologie et toxicologie des aliments: Hygiène et sécurité alimentaires.* Doin / CRDP Aquitaine. 4e edition, 101 p.

LIU J., KIBIKIB G., MAROB V., KUMBURUB H., SWAIB N., TANIUCHIA M., GRATZA J., TONEYC D., KANDG G., HOUPTA E., 2010. Multiplex reverse transcription PCR Luminex assay for detection and quantitation of viral agents of gastroenteritis. *JCV.* Vol. 50, 4, 308-313.

LOISY F., ESTES M-K., KOOPMANS M., LE GUYADER SF., 2004. Les Norovirus humains : du nouveau ? *Virologie.* Vol. 8, 6, 635-643.

LOPMAN B-A., BROWN D-W., KOOPMANS M., 2002. Human caliciviruses in Europe. *JCV.* Vol. 24, 3, 137-160.

LORROT M., POTHIER P., FAYE A., GENDREL D., BOURRILLON A., 2008. Gastro-entérites à Calicivirus de l'enfant. *JPP.* Médecine Diffusion MD, 14.

MEDICI MC., ABELLI LA., DODI I., DETTORI G., CHEZZI C., 2010. Norovirus RNA in the blood of a child with gastroenteritis and convulsions - A case report. *JCV.* Vol. 48, 147-149.

MEGRAUD F., BESSEDE E., LEHOURS P., 2013. Campylobacter. *Biologie médicale.* Vol. 8, 1, 1-8.

MOALIC V., MERCIER B., FEREC C., 2004. Technologie Luminex™ : principe, applications, et perspectives. *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée.* Vol. 19, 4, 181-187.

MONROE S-S., ANDO T., GLASS R-I., 2000. Introduction: Human Enteric Caliciviruses—An Emerging Pathogen Whose Time Has Come. *JID.* Vol. 181, S249-S251.

NATARO J-P., KAPER J-B., 1998. Diarrheagenic Escherichia coli. *Clinical microbiology review.*Vol. 11, 1, 142-201.

NICOLAS X., GRANIER H., LEGUEN P., 2007. Shigellose ou dysenterie bacillaire. *La Presse Médicale.*Vol. 36, 1606-1618.

OZDEMIR N., DAVIES S-M., FILIPOVICH A-H., BLEESING J-J., JODELE S., GRIMLEY M-S., MARSH R-A., MYERS K-C., MEHTA P-A., 2012. Norovirus gastro-enteritis- An emerging pathogen in pediatric hematopoietic stem cell transplant (HSCT) recipients. *BBMT.* Vol. 18, 2, p. S314.

PATEL M-M., HALL A-J., VINJE J., PARASHAR U-D., 2009. Noroviruses : A comprehensive review. *JCV.* Vol. 44, 1-8.

PHAN T-G., NORDGREN J., OUERMI D., SIMPORE J., NITIEMA L-W., DENG X., DELWART E., 2014. New astrovirus in human feces from Burkina Faso. *JCV.* Vol. 60, 2, 161-164.

POITRAS E., HOUDE A., 2002. La PCR en temps réel: principes et applications. *Reviews in Biology and Biotechnology.* Vol. 2, 2, 2-11.

POKHREL L., YUNJEONG K., NGUYEN T-D-T., PRIOR A-M., LU J., CHANG K-O., HUA D-H., 2012. Synthesis and Anti-Norovirus Activity of Pyranobenzopyrone Compounds. *Bioorganic& medicinal chemistry letters.*Vol. 22, 10, 3480–3484.

PRIOR A-M., KIM Y., WEERASEKARA S., MOROZE M., ALLISTON K-R., UY R-A-Z., GROUTAS W-C., CHANG K-O., HUA D-H., 2013. Design, synthesis, and bioevaluation of viral 3C and 3C-like protease inhibitors. *Bioorganic& Medicinal Chemistry Letters.*Vol. 23, 23, 6317-6320.

PRODHOM G., BILLE J., 2008. Diagnostic des maladies infectieuses : place des «point of care tests» (POCT). *Revue médicale suisse.* 4, 908-913.

QU L., VONGPUNSAWAD S., ATMAR R-L., PRASAD B-V., ESTES M-K., 2014. Development of a Gaussia luciferase-based human Norovirus protease reporter system: cell type-specific profile of Norwalk virus protease precursors and evaluation of inhibitors. *Journal of Virology.* Vol. 88, 18, 10312-10326.

RABAUD C., 2004. Diarrhée aiguë chez l'enfant et chez l'adulte (avec le traitement) 2e partie: chez l'adulte. *La revue du praticien.* Vol. 4, 27-434.

RAMANI S., ATMAR R-L., ESTESA M-K., 2014. Epidemiology of human Noroviruses and updates on vaccine development. *Current opinion in gastroenterology.* Vol. 30, 1, 25-33.

ROCHA-PEREIRA J., CUNHA R., PINTOC D-C.G.A., SILVAC A-M.S., NASCIMENTO M-S J., 2010. (E)-2-Styrylchromones as potential anti-Norovirus agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry.* Vol. 18, 12, 4195–4201.

ROCHA-PEREIRA J., JOCHMANS D., DALLMEIERC K., LEYSSENC P., NASCIMENTO M-S-J., NEYTS J., 2012. Favipiravir (T-705) inhibits in vitro Norovirus replication. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* Vol. 424, 4, 777–780.

ROCHA-PEREIRA J., JOCHMANS D., DEBING Y., VERBEKEN E. , NASCIMENTO M- S-J., NEYTS J., 2013. The Viral Polymerase Inhibitor 2′-C-Methylcytidine Inhibits Norwalk Virus Replication and Protects against Norovirus-Induced Diarrhea and Mortality in a Mouse Model. *Journal of Virology.* Vol. 87, 21,11798-11805.

ROCHA PEREIRA J., JOCHMANS D., NEYTS J., 2014a. Prophylactic treatment with the nucleoside analogue 2′-C-methylcytidine completely prevents transmission of Norovirus. *JAC.*

ROCHA PEIRERA J., NASCIMENTO M-S-J., MA Q., HILGENFELD R., NEYTS J., JOCHMANS D., 2014b. The enterovirus protease inhibitor rupintrivir exerts cross-genotypic anti-Norovirus activity and clears cells from the Norovirus replicon.(Lien). *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* Vol. 58, 8, 4675-4681.

ROCHA-PEIRERA J. NEYTS J., JOCHMANS D., 2014c. Norovirus: Targets and tools in antiviral drug discovery. *Biochemical Pharmacology.* Vol. 91, 1, 1-11.

ROHAYEMA J., BERGMANN M., GEBHARDT J., GOULD E., TUCKER P., MATTEVI A., UNGE T., HILGENFELD R., NEYTS J., 2010. Antiviral strategies to control calicivirus infections. *Antiviral Research.* Vol. 87, 162-178.

RONCHETTI A-M., HENRY B., AMBERT BALAY K., POTHIER P., DECROOCQ J., LEBLOND V., ROOS-WEIL D., 2014. Norovirus-related chronic diarrhea in a patient treated with alemtuzumab for chronic lymphocytic leukemia. *BMC Infectious disease.* Vol. 14, 239, 1-4.

RUVOEN-CLOUET N., BELLIOT G., LE PENDU J., 2013. Sensibilité génétique aux infections à Norovirus et protection innée de population. *Virologie.* Vol. 17, 4, 264-277.

RYU S., YOU H-J., KIM Y-W., LEE A., KO G-P., LEE S-J., SONG M-J., 2015. Inactivation of Norovirus and surrogates by natural phytochemicals and bioactive substances. *MNFR.* Vol. 59, 1, 65-74.

SANCHEZ-VARGASA F-M., ABU-EL-HAIJAB A., GOMEZ-DUARTEC O-G., 2011. Salmonella infections: An update on epidemiology, management, and prevention. *Travel Medicine and Infectious Disease.* Vol. 9, 6, 263-277.

SAVIN C., CARNIEL E., 2008. Les diarrhées d'origine bactérienne : le cas de Yersinia enterocolitica. *Revue francophone des laboratoires.* Vol. 38, 400, 49-58.

SCIPINIO A., 2009. Etude génotypique de Norovirus humains et bovins contemporains et mise au point de méthodes rapides de détection et de quantification. Thèse de doctorat de sciences vétérinaires.Liège, Université de Liège, 86 p.

SHIRATO H., 2011. Norovirus and Histo-Blood Group Antigens. *Japanese journal of infectious disease.* Vol. 64, 2, 95-103.

SIDDIQ D-M., KOO H-L., ADACHI J-A., VIOL G-M., 2011. Norovirus gastroenteritis successfully treated with nitazoxanide. *Journal of Infection.* Vol. 63, 5, 394–397.

SIMMONDS P., KARAKASILIOTISI., BAILEY D., CHAUDRY Y., EVANS D-J.,GOODFELLOW I-G., 2008. Bioinformatic and functional analysis of RNA secondary structure elements among different genera of human and animal caliciviruses. *NAR.* Vol. 36, 8, 2530–2546.

SZAJEWSKA H., GUARINO A., HOJSAK I., INDRIO F., KOLACEK S., RAANAN S., VANDENPLAS Y., WEIZMAN Z., 2014. Use of Probiotics for Management of Acute Gastroenteritis: A Position Paper by the ESPGHAN Working Group for Probiotics and Prebiotics. *JPGN.* Vol. 58, 4, 531-539.

TARANTINO D., PEZZULLO M., MASTRANGELO E., CROCI R., ROHAYE J., ROBEL I., BOLOGNESI M., MILANI M., 2014. Naphthalene-sulfonate inhibitors of human Norovirus RNA-dependent RNA-polymerase. *Antiviral Research.* Vol. 102, 23-28.

THEFENNE H., GARNOTEL E., 2013. Choléra. *Maladies infectieuses.* Vol. 10, 4, 1-10.

THORNE L-G., GOODFELLOW I-G., 2014. Norovirus: Gene Expression and Replication. *Journal of general virology.* Vol. 95, 278-291.

TORRES-FRENKIAN A., TOLEDO M., 2014. La biologie moléculaire en diagnostic infectieux. *IRBM News.* Vol. 35, 2, 42-53.

TREANOR J-J., ATMAR R-L., FREY S-E., GORMLEY R., CHEN W-H., FERREIRA J.,GOODWIN R., BORKOWSKI A., CLEMENS R., MENDELMAN P-M., 2014. A novel intramuscular bivalent Norovirus virus-like particle vaccine candidate-reactogenicity, safety, and immunogenicity in a phase 1 trial in healthy adults. *JID.* Vol. 210, 11, 1763-1771.

TUNG G., MACINGA D., ARBOGAST J., JAYKUS L-A., 2013. Efficacy of commonly used disinfectants for inactivation of human Noroviruses and their surrogates. *Journal of food protection.* 7, 1120-1299.

VESIKARI T., BLAZEVIC V., 2014. Norovirus Vaccine: One Step Closer. *JID.* 1-3.

VIMONT A., FLISS I., JEAN J., 2014. Study of the Virucidal Potential of Organic Peroxyacids Against Norovirus on Food-Contact Surfaces. *Food and Environmental Virology.*

WANG G., SHEN Z., QIAN F., LI Y., YUAN Z., ZHANG J., 2014. Genetic diversity of sapovirus in non-hospitalized adults with sporadic cases of acute gastroenteritis in Shanghai, China. *JCV.* Vol. 59, 4, 250-254.

WANG D., TIAN P., 2014. Inactivation conditions for human Norovirus measured by an in situ capture-qRT-PCR method. *IJFM.* Vol. 172, 17, 76-82.

WINGFIELD T., GALLIMORE C I., XERRY J., GRAY J J., KLAPPER P., GUIVER M., BLANCHARD T J., 2010. Chronic Norovirus infection in an HIV positive patient with persistent diarrhoea : a novel cause. *JCV.* Vol. 49, 219-222.

YANA Y., WANGA H-H, GAOA L., JIA J-M., GEA Z-J., ZHUN X-Q., HEA P-Y., CHENA Z-W., 2013. A one-step multiplex real-time RT-PCR assay for rapid and simultaneous detection of human Norovirus genogroup I, II and IV. *Journal of Virological Methods.* Vol. 189, 2, 277-282.

ZAIDI M-B., D. M., ESTRADA-GARCIA T., 2014. Shigella: A Highly Virulent and Elusive Pathogen. *Current Tropical Medicine Reports.* Vol. 1, 2, 81-87.

ZAKHOUR M., 2009. Spécificités glycanniques des souches de Norovirus humaines et animales : Apport pour l'évaluation du risque de transmission inter-espèces.Thèse de Doctorat d'université. Nantes : Université de Nantes.

ZAMAN M., CHANDRUDU S., TOTH I., 2013. Strategies for intranasal delivery of vaccines. *Drug Delivery and Translational Research.* Vol. 3, 1, 100-109.

ZHANG X-F., TAN M., CHHABRA M., DAI Y-C., MELLER J., JIANG X.,. 2013. Inhibition of Histo-blood Group Antigen Binding as a Novel Strategy to Block Norovirus Infections, disponible sur : http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0069379 (page consultée le 14 octobre 2014).

ZIMMER C. 2014. Norovirus: The Perfect Pathogen Emerges From the Shadows-Phenomena: The Loom, disponible sur : http://phenomena.nationalgeographic.com/2014/11/06/norovirus-the-perfect-pathogen-emerges-from-the-shadows/ (page consultée le 29 décembre 2014).

Webographie

AFSSA (Agence française de sécurité sanitaire des aliments), 2006. *Yersinia enterocolitica, Yersinia pseudotuberculosis* : Agent de la yersiniose, pseudotuberculose. 4p disponible sur : http://www.afssa.fr/Documents/MIC-Fi-Yersinia.pdf (page consultée le 21 mars 2014)

AFSSA (Agence française de sécurité sanitaire des aliments), 2011. Norovirus. Fiche de description de danger biologique transmissible par les aliments. 3p, disponible sur : http://www.afssa.fr/Documents/MIC-Fi-Novovirus.pdf (page consultée le 15 septembre 2014)

AMELI, 2014a. Comment reconnaître rapidement les signes d'une déshydratation ? disponible sur : http://www.ameli-sante.fr/deshydratation/comment-reconnaitre-rapidement-les-signes-dune-deshydratationnbsp.html (page consultée le 15 décembre 2014)

AMELI, 2014b. Gastroentérite de l'adulte (dernière mise à jour le 4 février 2014) disponible sur : http://www.ameli-sante.fr/gastroenterite-de-ladulte/symptomes-causes-evolution.html (page consultée le 20 mars 2014)

ANSES (Agence nationale de sécurité sanitaire) 2011. Norovirus. 3 p, disponible sur : http://www.anses.fr/Documents/MIC-Fi-Novovirus.pdf (page consultée le 2 mars 2014)

ANSM, 2014a. Lettre aux professionnels de santé : Médicaments contenant de la dompéridone : Nouvelles recommandations visant à minimiser, disponible sur : file:///C:/Users/ClicDepann/Downloads/DHPC-Domperidone-140901%20(1).pdf. (age consultée le 16 décembre 2014)

ANSM, 2014b. Primperan et ses génériques (métoclopramide) : Actualisation des indications et de la posologie pour diminuer le risque d'effets indésirables - Point d'Information, disponible sur : http://ansm.sante.fr/S-informer/Points-d-information-Points-d-information/Primperan-et-ses-generiques-metoclopramide-Actualisation-des-indications-et-de-la-posologie-pour-diminuer-le-risque-d-effets-indesirables-Point-d-Information (page consultée le 16 décembre 2014)

CDC 2014. Preventing Norovirus Infection. *Centers for disease control and prevention,* disponible sur : http://www.cdc.gov/norovirus/preventing-infection.html (page consultée le 15 décembre 2014)

CHU-DIJON, 2014. Evaluation des Tests ICG pour la détection des Norovirus, disponible sur : http://www.chu-dijon.fr/page.php?url=directory/centre-national-de-reference-des-virus-enteriques/tests-ICG-norovirus (page consultée le 9 septembre 2014)

EUREKA SANTE 2014. Les traitements des douleurs abdominales, disponible sur : http://www.eurekasante.fr/maladies/estomac-intestins/mal-ventre-adulte.html?pb=traitements (page consultée le 16 décembre 2014)

eVidal, 2014a. Gastro-entérite de l'enfant, disponible sur : http://evidal.fr/showReco.html?recoId=1662 (page consultée le 16 décembre 2014)

eVidal, 2014b. Imodium, disponible sur : http://evidal.fr/showProduct.html?productId=8568 (page consultée le 16 décembre 2014)

eVidal, 204c. Motilium, disponible sur : http://evidal.fr/showProduct.html?productId=11259 (page consultée le 16 décembre 2014)

eVidal, 2014d. Vogalène, disponible sur : http://evidal.fr/showProduct.html?productId=17835 (page consultée le 16 décembre 2014)

GENOUEST PROTEOME. Peptides Aqua. *Proteome Genouest,* disponible sur : http://proteome.genouest.org/index.php/prestations/proteomique-ciblee/peptides-aqua (page consultée le 27 janvier 2015)

INPES (Institut national de prévention et d'éducation pour la santé), 2014. Quand la gastro-entérite rôde, comment l'éviter ? (dernière mise à jour le 12 février 2014), disponible sur : http://www.inpes.sante.fr/30000/actus2014/010-gastro-enterite.asp (page consultée le 20 mars 2014)

INPES (Institut national de prévention et d'éducation pour la santé), 2012a. Guide des vaccinations, disponible sur : http://www.inpes.sante.fr/10000/themes/vaccination/guidevaccination2012/pdf/GuideVaccinations2012_Vaccination_contre_le_Rotavirus.pdf (page consultée le 22 mars 2014)

INPES (Institut national de prévention et d'éducation pour la santé), 2012b. La gastro-entérite est arrivée : le lavage des mains est le principal geste de prévention, c'est pourtant loin d'être une habitude systématique chez tous, disponible sur : http://www.inpes.sante.fr/70000/cp/12/cp120124.asp (page consultée le 13 janvier 2015)

InVS (Institut national de veille sanitaire), 2014. Fiche 1 : principales caractéristiques des Norovirus, disponible sur : www.invs.sante.fr/content/download/56210/.../1/.../norovirus_fiche1.doc (page consultée le 23 mars 2014)

OXOID, 2013. IDEIA Norovirus, disponible sur : http://www.thermoscientific.com/content/dam/tfs/SDG/MBD/MBD%20Documents/Instructions%20For%20Use/IDEIA/Norovirus/X7844-FR.pdf (page consultée le 30 août 2014)

R-BIOPHARM AG, 2010. RIDASCREEN® Norovirus 3ème génération, disponible sur : http://www.r-biopharm.com/wp-content/uploads/items/ridascreen-norovirus-3rdgeneration-3851/C1401-Norovirus-10-08-10_FR.pdf (page consultée le 30 août 2014)

R-BIOPHARM AG, 2012. RIDA®QUICK Norovirus, disponible sur : http://www.r-biopharm.com/wp-content/uploads/items/ridaquick-norovirus-2-15404/N1402_RIDAQUICK-Norovirus-12-10-26_FR.pdf (page consultée le 9 septembre 2014)

SANTE GOUV., 2009. Trichinellose (2009), disponible sur : http://www.sante.gouv.fr/trichinellose.html (page consultée le 20 mars 2014)

WEB SENTI., 2015. Réseaux sentinelles, Série temporelle - Diarrhée aiguue, disponible sur : https://websenti.u707.jussieu.fr/sentiweb/?page=serie

DEMANDE D'IMPRIMATUR

Date de soutenance : 10 juin 2015

DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

présenté par : Cécile MULLER

Sujet : Connaissances actuelles et place du Norovirus parmi les agents de diarrhées infectieuses virales. Serait-il un agent pathogène émergent parfait?

Jury :

Président : Pr Chantal FINANCE, PU-PH

Directeur : Pr Chantal FINANCE, PU-PH
Juges : Pr Raphaël DUVAL, Professeur des Universités
Dr Gérard BELEY, pédiatre
Dr Hervé BLAJMAN, pharmacien

Vu,
Nancy, le 11 Mai 2015

Le Président du Jury Directeur de Thèse

Pr. C. FINANCE

M. M.

Vu et approuvé,
Nancy, le 11.05.2015

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

Béatrice FAIVRE
Vice-Doyen

Francine PAULUS

Vu,
Nancy, le 15 MAI 2015

Le Président de l'Université de Lorraine,

Université de Lorraine

Pierre MUTZENHARDT

N° d'enregistrement : 6703

TITRE

Connaissances actuelles et place du Norovirus parmi les agents de diarrhées infectieuses virales. Serait-il un agent pathogène émergent parfait?

Thèse soutenue le 10 juin 2015

Par Cécile MULLER

RESUME :

Les Norovirus sont responsables des principales gastroentérites aiguës communautaires, non bactériennes, dues à la consommation d'eau et d'aliments contaminés. D'autres symptômes extradigestifs ont également été décrits dans la littérature.

Les patients immunodéprimés sont plus vulnérables à ces infections et peuvent développer une infection chronique. Les Norovirus touchent toutes les populations d'âge et sévissent particulièrement dans les collectivités (crèches, maisons de retraite, bateau de croisière...). Toutefois, depuis la commercialisation des vaccins anti-Rotavirus en 2006, l'incidence des infections à Norovirus chez les moins de 5 ans augmente.

Les Norovirus sont des virus à ARN à polarité positive, non enveloppés et ainsi très résistants dans l'environnement, ce qui facilite leur transmission. De plus, leur important pouvoir antigénique permet l'apparition de nouvelles épidémies. Il existe une susceptibilité génétique de l'hôte liée aux antigènes de groupes sanguins.

Le diagnostic de routine des Norovirus repose sur des méthodes immunologiques, notamment par l'immunochromatographie ou par un test *ELISA.*

Actuellement il n'existe aucun traitement spécifique, mais de nombreuses molécules antivirales sont en étude. Ainsi, à ce jour, le traitement repose principalement sur la réhydratation. Au niveau de la prévention, un vaccin candidat est en cours de développement. Les mesures hygiéno-diététiques restent primordiales pour limiter les infections à Norovirus.

MOTS CLES : Norovirus, gastroentérites virales, épidémiologie, symptomatologie, susceptibilité à l'infection, immunocompétence et immunodépression, virus émergent

Directeur de thèse	Intitulé du laboratoire	Nature
Chantal FINANCE	**Laboratoire de virologie**	**Expérimentale** ☐ **Bibliographique** x **Thème** ☐

Thèmes **1 – Sciences fondamentales** **(2) – Hygiène/Environnement**

3 – Médicament **4 – Alimentation – Nutrition**

(5) – Biologie **6 – Pratique professionnelle**