



MISE AU POINT D'UNE MÉTHODE MOLÉCULAIRE POUR L'ANALYSE DE  
VIRUCIDES

Par Stéphane Bernier

Mémoire présenté à la Faculté des Sciences en vue  
de l'obtention du grade maître ès sciences (M.Sc.)

FACULTÉ DES SCIENCES  
UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

Sherbrooke, Québec, Canada, 10 août 2020

Le 10 août 2020

le jury a accepté le mémoire de Monsieur Stéphane Bernier dans sa version finale.

Membres du jury

Professeure Nancy Dumais  
Directrice de recherche  
Département de biologie

Professeur François Malouin  
Évaluateur interne  
Département de biologie

Professeur Nicolas Gévry  
Président-rapporteur  
Département de biologie

## SOMMAIRE

Les infections nosocomiales sont une cause majeure de complications dans les établissements de santé et représentent une grande partie des complications possibles chez les patients. Les norovirus ont été identifiés comme une source non négligeable d'infections nosocomiales. Cependant, il n'existe pas de traitement efficace pour ce type d'infection. Ainsi, la meilleure façon de combattre ces infections est la prévention de la transmission, souvent par le biais de désinfectants.

Les méthodes actuelles d'analyse de désinfectants ne tirent pas avantage des avancées effectuées en biologie moléculaire. La plupart des analyses de désinfectants se basent sur une méthode permettant de calculer le titre viral par l'observation des effets cytopathiques sur une population de cellules hôtes nommée *50% Tissue Culture Infectious Dose* (TCID<sub>50</sub>). Cependant, cette technique s'avère fastidieuse et des techniques plus récentes et sensibles de mesure du titre viral ont été développées. La méthode d'ICC (*Integrated Cell Culture*) qRT-PCR est une méthode moléculaire par laquelle le matériel génétique viral est extrait d'une population de cellule hôte, pour ensuite être amplifié par qPCR en utilisant des amorces capables d'amplifier l'ARNm viral.

Ce projet de maîtrise avait pour but de développer une méthode efficace d'analyse de désinfectants contre le norovirus en utilisant la méthode ICC qRT-PCR. Par la méthode TCID<sub>50</sub>, nous avons évalué l'efficacité d'une série de désinfectants dans le but de les comparer à la méthode moléculaire. Par conséquent, un protocole a été développé pour permettre l'amplification du matériel génétique du calicivirus félin, virus substitut du norovirus. Cependant, les désinfectants utilisés semblent avoir un effet sur la qualité de l'extraction de l'ARN viral, ce qui est un problème pour le développement de la méthode

ICC qRT-PCR. Des études utilisant différents désinfectants pourraient permettre de vérifier la validité de la méthode pour l'analyse de l'efficacité des virucides.

Mots clés : Norovirus, calicivirus félin, CRFK, ICC-qRT-PCR

## REMERCIEMENTS

Tout d'abord, j'aimerais remercier Pr Nancy Dumais, Ph. D., pour avoir accepté ma proposition de maîtrise. Merci pour le support constant et surtout d'avoir cru en moi.

J'aimerais aussi remercier mes conseillers, Pr Nicolas Gévry, Ph. D. et Pr François Malouin, Ph. D., pour leur écoute et contributions lors de nos rencontres, vos recommandations ont été grandement appréciées.

Je remercie également nos collaborateurs, l'organisme Mitacs ainsi que l'entreprise Sani-Marc (plus particulièrement André Côté, M.Sc et Alexandre Romanens, M.Sc) sans qui ce projet n'aurait jamais été possible. Merci pour tout.

Je tiens aussi à remercier les membres du laboratoire Dumais, passé et présent. Ce fut une joie de vous côtoyer. Un merci spécial à Mme Marie-Yolande Borget qui a dû m'endurer pendant 2 ans.

Finalement, je remercie les membres de ma famille (mon père Larry, ma mère Lynda et mon frère Alexandre) pour leur soutien et encouragement à travers les années. Ce projet n'aurait jamais été possible sans vous.

## TABLE DES MATIÈRES

<b>SOMMAIRE .....</b>	<b>iv</b>
<b>REMERCIEMENTS.....</b>	<b>vi</b>
<b>LISTE DES ABBRÉVIATIONS.....</b>	<b>x</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX .....</b>	<b>xii</b>
<b>LISTE DES FIGURES.....</b>	<b>xiv</b>
<b>CHAPITRE 1 INTRODUCTION GÉNÉRALE.....</b>	<b>1</b>
1.1 Mise en contexte.....	1
1.2 Norovirus.....	2
1.2.1 Structure .....	2
1.2.2 Cycle réplicatif .....	4
1.2.3 Interactions avec la cellule hôte.....	8
1.2.4 Assemblée et sortie de la cellule hôte.....	9
1.2.5 Pathologies .....	9
1.2.6 Immunité.....	11
1.2.6.1 Vaccination.....	12
1.2.7 Prévention.....	13
1.3 Désinfection.....	13
1.3.1 Méthodes d'analyse des désinfectants .....	15
1.3.1.1 Méthodes traditionnelles .....	15

1.3.1.2	Méthodes moléculaires .....	16
1.3.2	Analyse des désinfectants .....	17
1.4	Hypothèse et objectifs .....	19
<b>CHAPITRE 2 MATÉRIEL ET MÉTHODES .....</b>		<b>20</b>
2.1	Culture cellulaire .....	20
2.2	Production virale .....	20
2.3	Détermination du titre viral .....	21
2.4	Évaluation des désinfectants.....	21
2.5	RT-qPCR.....	22
2.6	Extraction d'ARN au phénol-chloroforme.....	24
<b>CHAPITRE 3 RÉSULTATS .....</b>		<b>25</b>
3.1	Détermination de l'efficacité de désinfectants par TCID <sub>50</sub> .....	25
3.1.1	Efficacité du désinfectant PNA WW contre le calicivirus félin.....	27
3.1.2	Efficacité du désinfectant Complete 6000 contre le calicivirus félin.....	28
3.1.3	Efficacité du désinfectant Complete 7000 contre le calicivirus félin.....	31
3.1.4	Efficacité du désinfectant Complete 8 000 contre le calicivirus félin.....	33
3.1.5	Efficacité du désinfectant Complete 9 000 contre le calicivirus félin.....	35
3.1.6	Efficacité du désinfectant Complete 10 000 contre le calicivirus félin.....	35
3.2	Détection/amplification de l'ARN viral par RT-qPCR.....	37
3.2.1	Extraction du matériel génétique viral des cellules épithéliales félines .....	37
3.2.2	RT-qPCR .....	38

<b>CHAPITRE 4 DISCUSSION GÉNÉRALE .....</b>	<b>44</b>
<b>CHAPITRE 5 CONCLUSION GÉNÉRALE .....</b>	<b>50</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>51</b>

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

VP1	Protéine virale 1, de l'anglais « <i>Viral Protein 1</i> »
VP <sub>g</sub>	Protéine virale liée au génome, de l'anglais « <i>Viral Protein genome-linked</i> »
ORF	Cadre de lecture ouvert, de l'anglais « <i>Open Reading Frame</i> »
ORF1	Cadre de lecture ouvert 1, de l'anglais « <i>Open Reading Frame 1</i> »
ORF2	Cadre de lecture ouvert 2, de l'anglais « <i>Open Reading Frame 2</i> »
ORF3	Cadre de lecture ouvert 3, de l'anglais « <i>Open Reading Frame 3</i> »
VP2	Protéine virale 2, de l'anglais « <i>Viral Protein 2</i> »
HBGA	De l'anglais « <i>Histo Blood Group Antigens</i> »
HuNV	Norovirus humain, de l'anglais « <i>Human Norovirus</i> »
eIF4F	Facteur d'initiation eucaryote 4A, de l'anglais « <i>Eukaryotic Initiation Factor-4A</i> »
MNV	Norovirus murin, de l'anglais « <i>Murine Norovirus</i> »
PTB	De l'anglais « <i>Polypyrimidine Tract-binding Protein</i> »
PABP	De l'anglais « <i>Poly (A)-Binding Protein</i> »
NS	Non structurelle, de l'anglais « <i>Non-structural</i> »
COPII	Protéine deDe l'anglais « <i>Coat Protein II</i> »
RdRp	De l'anglais « <i>RNA-dependent RNA polymerase</i> »
FCV	Calicivirus félin, de l'anglais « <i>Feline calicivirus</i> »
VLP	Particules pseudo-virales, de l'anglais « <i>Virus-like Particles</i> »
PBMC	De l'anglais « <i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i> »
IFN $\gamma$	Interféron gamma
IL-2	Interleukine 2
IL-5	Interleukine 5
TCID <sub>50</sub>	De l'anglais « <i>50% Tissue Culture Infective Dose</i> »

ICC	Intégré à la culture cellulaire, de l'anglais « <i>Integrated Cell Culture</i> »
qRT-PCR	De l'anglais « <i>Quantitative Reverse transcription polymerase chain reaction</i> »
ELISA	De l'anglais « <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> »
CRFK	De l'anglais « <i>Crandell-Reese Feline Kidney cells</i> »
PBS	Tampon phosphate salin, de l'anglais « <i>Phosphate Buffered Saline</i> »

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1	Logarithmes de réduction et leur signification chez un désinfectant virucide.....	20
Tableau 2	Séquences des amorces utilisées lors des essais PCR.....	25
Tableau 3	Efficacité du PNA WW (5 000 ppm) durant 1 minute de contact déterminée par TCID <sub>50</sub> .....	27
Tableau 4	Logarithmes de réduction du titre viral obtenus en fonction de la concentration du désinfectant PNA WW pour un temps de contact de 60 secondes.....	28
Tableau 5	Efficacité du Complete (6 000 ppm) durant 1 minute de contact déterminée par TCID <sub>50</sub> .....	30
Tableau 6	Efficacité du Complete (6 000 ppm) durant 3 minutes de contact, déterminée par TCID <sub>50</sub> .....	31
Tableau 7	Logarithmes de réduction du titre viral obtenus en fonction du temps de contact avec le désinfectant Complete 6000.....	32
Tableau 8	Efficacité du Complete (7 000 ppm) durant 3 minutes de contact, déterminée par TCID <sub>50</sub> .....	33
Tableau 9	Logarithmes de réduction du titre viral obtenus en fonction du temps de contact avec le désinfectant Complete 7000.....	34

Tableau 10	Efficacité du Complete (8 000 ppm) durant 60 secondes de contact, déterminée par TCID <sub>50</sub> .....	35
Tableau 11	Logarithmes de réduction du titre viral obtenus en fonction du temps de contact avec le désinfectant Complete 8000.....	35
Tableau 12	Logarithmes de réduction du titre viral obtenus en fonction du temps de contact avec le désinfectant Complete 9000.....	36
Tableau 13	Efficacité du Complete (10 000 ppm) durant 30 secondes de contact, déterminée par TCID <sub>50</sub> .....	37
Tableau 14	Concentration et pureté des échantillons d'ARN extraits avec le kit de Qiagen, mesurées au Nanodrop.....	39

## LISTE DES FIGURES

Figure 1	Structure et symétrie de la capsidie des norovirus.....	3
Figure 2	Organisation génomique du norovirus humain.....	4
Figure 3	Mécanismes de la synthèse d'ARN sous-génomique chez les norovirus....	8
Figure 4	: Amplification de la protéine virale VP1 obtenue au cours des premiers essais qPCR.....	40
Figure 5	Amplification de la protéine virale VP1 par qPCR.....	41
Figure 6	Gel d'agarose montrant les produits qPCR obtenus lors de l'amplification de l'ARN du calicivirus félin.....	42
Figure 7	Gel d'agarose de l'ARN extrait au phénol-chloroforme après incubation chez cellules CRFK.....	43



# CHAPITRE 1

## INTRODUCTION GÉNÉRALE

### 1.1 Mise en contexte

Les infections nosocomiales sont définies comme étant des infections contractées dans un établissement de soins de santé. Celles-ci constituent une cause majeure de complications des soins de santé avec, comme impacts, une augmentation de la mortalité et de la morbidité, une prolongation de l'hospitalisation et une majoration importante des coûts de santé (Dancer SJ. 2014). Les infections nosocomiales virales sont un problème préoccupant dans les hôpitaux puisqu'elles touchent des populations particulièrement vulnérables telles que les nouveaux nés prématurés, les personnes ayant des maladies chroniques ou dégénératives, les patients immunosupprimés ainsi que les personnes âgées (Dancer SJ. 2014). Dans les établissements de santé québécois, on évalue qu'entre 80 000 et 90 000 personnes sont atteintes d'une infection nosocomiale, ce qui correspond à 10% des admissions (ministère de la Santé et des Services sociaux. 2010). Dans ce contexte, il est alors urgent de mettre en place des mesures appropriées permettant de limiter la propagation des infections en milieu hospitalier.

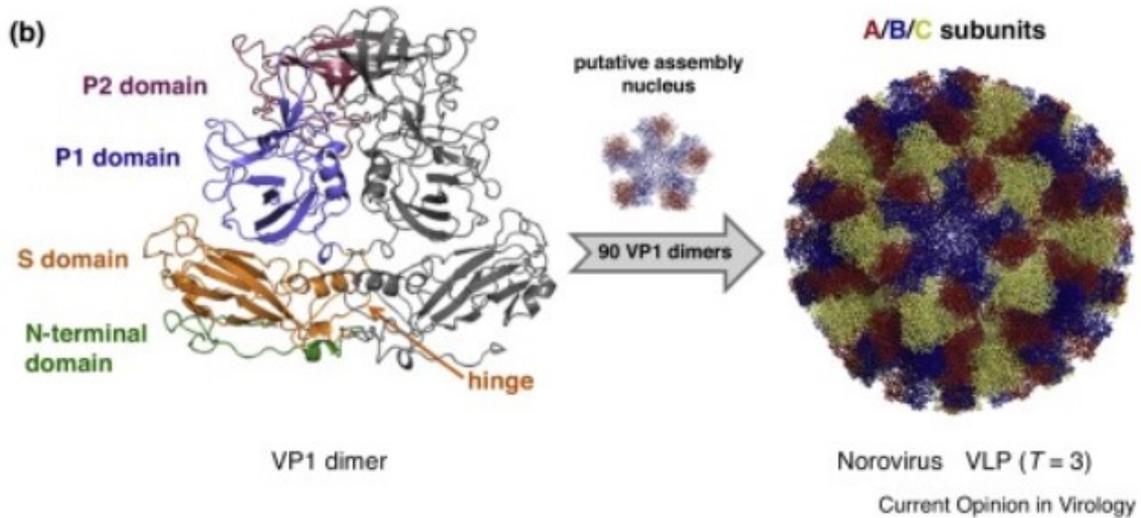
Parmi les microorganismes causant des infections nosocomiales, les norovirus ont été identifiés comme des virus importants. Ces virus sont membres de la famille des Caliciviridae qui est sous-divisée en 5 genres: Norovirus, Sapovirus, Vesivirus, Lagovirus et Nebovirus (Green *et al.* 2000). Les norovirus sont des virus à ARN à polarité positive (ARN+) qui causent des gastro-entérites sévères chez les humains et des cas sporadiques d'épidémies (Iturriza-Gómara et Lopman, 2014). Aux États-Unis, 96% des épidémies de gastro-entérites sont associées au norovirus (Iturriza-Gómara et Lopman, 2014). Bien que l'infection soit de

courte durée chez les individus en santé, certaines populations sont vulnérables au norovirus (personnes âgées ou immunosupprimées) et se retrouvent avec des complications importantes. Le problème de santé publique des gastro-entérites dû au norovirus est exacerbé par le fait que l'on retrouve de fortes charges virales dans les selles et les vomissures des personnes infectées, que le nombre de particules virales requis pour causer une infection est faible et que le virus est stable dans l'environnement.

## **1.2 Norovirus**

### *1.2.1 Structure*

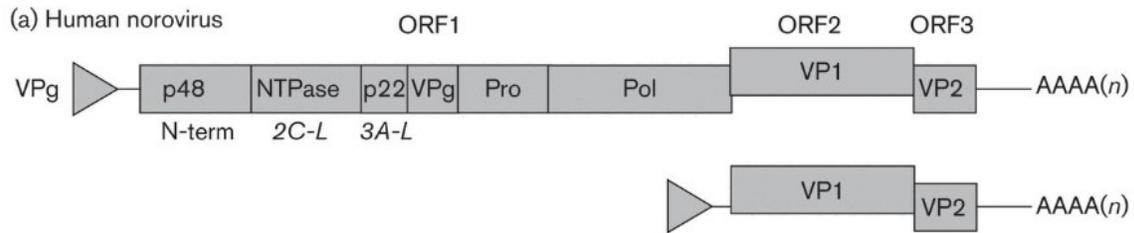
Chez le virus de Norwalk, virus typique de cette famille, la capsid du virus mesure entre 38 et 40 nanomètres de diamètre et possède une symétrie icosaédrique où le nombre de triangulations (T) est égal à 3 (figure 1). Ce nombre représente la complexité de l'icosaèdre. Un nombre de triangulations de 3 signifie que la capsid est formée de 60 sous-unités, chacune d'elles étant formée de 3 protéines VP1, pour un total de 180 protéines VP1 par capsid.



**Figure 1 : Structure et symétrie de la capsid des norovirus**

Adapté de Norovirus assembly and stability, Pogan et al, 2018.

Le génome des Norovirus varie entre 7.3 et 7.5 kb. L'extrémité 5' de l'ARN génomique est liée de façon covalente à une protéine appelée VP<sub>g</sub>, tandis que l'extrémité 3' est polyadénylée (Gutiérrez-Escolano *et al*, 2000; Karst S. M *et al*, 2003). Le génome est organisé en trois cadres de lectures ouverts. Chez tous les Norovirus, l'ORF1 est traduite en une large polyprotéine, qui est éventuellement clivée par des protéases virales en au moins six protéines matures (Sosnovtsev S. V *et al*, 2006). Les cadres de lecture ouverts ORF2 et ORF3 sont traduits à partir d'ARN sous-génomique et encodent VP1 et VP2, les protéines majeures et mineures de la capsid. L'ARN sous-génomique est identique aux derniers 2.4 kb du génome et est attaché de manière covalente à VP<sub>g</sub> (Herbert T. P. *et al*. 1997). L'organisation génomique chez *Human Norovirus* (HuNV) est représentée dans la Figure 2.



**Figure 2 : Organisation génomique du norovirus humain**

Adapté de Thorne et Goodfellow, 2014

L'interaction des norovirus avec la surface cellulaire implique des structures carbohydatées, mais le processus exact n'a pas encore été élucidé pour la plupart des Norovirus. Une étude récente a étudié le rôle des *Histo Blood Group Antigens* (HBGAs) avec HuNV ainsi que la façon dont cette interaction permettait l'entrée du virus chez la cellule hôte (Donaldson E. F. *et al.* 2008).

### 1.2.2 Cycle de réplication

Lorsque le génome viral est relâché dans le cytoplasme d'une cellule hôte, sa première tâche est d'agir en tant que brin matrice pour la première ronde de traduction de l'ARN viral. Pour ce faire, des facteurs d'initiation de traduction doivent reconnaître l'ARN viral pour ensuite le traduire en protéines virales.

La protéine VP<sub>g</sub> est fortement impliquée dans la traduction du génome des norovirus. En effet, il a été démontré chez HuNV que VP<sub>g</sub> interagit avec différentes composantes du complexe de facteurs d'initiation de la traduction eIF4F (Chaudhry Y. *et al.* 2006; Goodfellow I. *et al.* 2005). Certaines études sur *Murine Norovirus* (MNV) ont confirmé que

l'ARN génomique nécessitait le facteur d'initiation EIF4A ainsi que l'ARN hélicase eIF4F, des composantes avec lesquelles VP<sub>g</sub> interagit (Chaudhry *et al.* 2006). Bien que l'interaction ne soit pas complètement comprise, les résultats semblent montrer l'importance de VP<sub>g</sub> dans son interaction avec le complexe d'initiation de la traduction, bien que certaines composantes ne semblent pas être nécessaires à la traduction de l'ARN viral; par exemple, la présence de eIF4F n'est pas requise pour la traduction de l'ARN de MNV dans un lysat de réticulocytes chez le lapin (Chaudhry *et al.* 2006).

Les extrémités des génomes des calicivirus contiennent des structures d'ARN qui interagissent avec des facteurs cellulaires chez l'hôte. Ces interactions permettent la promotion de la réplication et de la traduction virale (Simmonds *et al.* 2008). Les extrémités 5' et 3' du génome du virus de Norwalk interagissent avec les protéines cellulaires PTB et PABP, des protéines étant identifiées comme pouvant se lier à certaines structures d'ARN présentes dans le génome de MNV (Gutiérrez-Escolano *et al.* 2000b, Vashist *et al.*, 2012). La liaison de ces structures, aidées par d'autres facteurs encore inconnus, pourrait servir à bonifier la traduction de protéines virales, possiblement par la stabilisation des interactions entre différents ARN à longue distance qui permettent la circularisation du génome du norovirus, un processus qui stimule la traduction d'ARNm viral par la cellule hôte (Wells *et al.*, 1998).

La traduction de VP1 et VP2 provient principalement d'ARN sous-génomique. Cela est probablement dû au fait qu'il faut 180 copies de VP1 pour former une seule capsidie icosaédrique, puisque l'ARN sous-génomique est présent en plus grandes concentrations dans les cellules infectées comparativement à l'ARN génomique (Prasad *et al.*, 1994). Lorsque les ribosomes ont terminé la traduction de ORF2 (VP1), ils demeurent associés à l'ARN pour recommencer avec l'ORF3 (VP2). Ceci est rendu plus facile par le chevauchement d'un codon « stop » chez ORF2 et d'un codon « start » chez ORF3.

La traduction de la polyprotéine provenant de ORF1 est suivie par un clivage post-traductionnel par la protéase virale NS6 (Belliot *et al.*, 2005). Cela mène à la libération des protéines virales NS, qui seront requises pour la formation du complexe de réplication. La structure et la fonction de la protéase de HuNV ont été étudiées extensivement, et le site actif (selon les études les plus récentes) se situerait à la jonction de trois acides aminés, soit H (histidine) 30, E (acide glutamique) 54 et C (cystéine) 139 (Someya *et al.*, 2002; Zeitler *et al.*, 2006). Certaines études sur la protéase NS6 chez MNV ont démontré qu'elles sont plutôt similaires et que la triade catalytique se ressemble, changeant seulement l'acide glutamique pour un acide aspartique en position 54, supposant ainsi qu'elles possèdent une fonction similaire (Leen *et al.*, 2012).

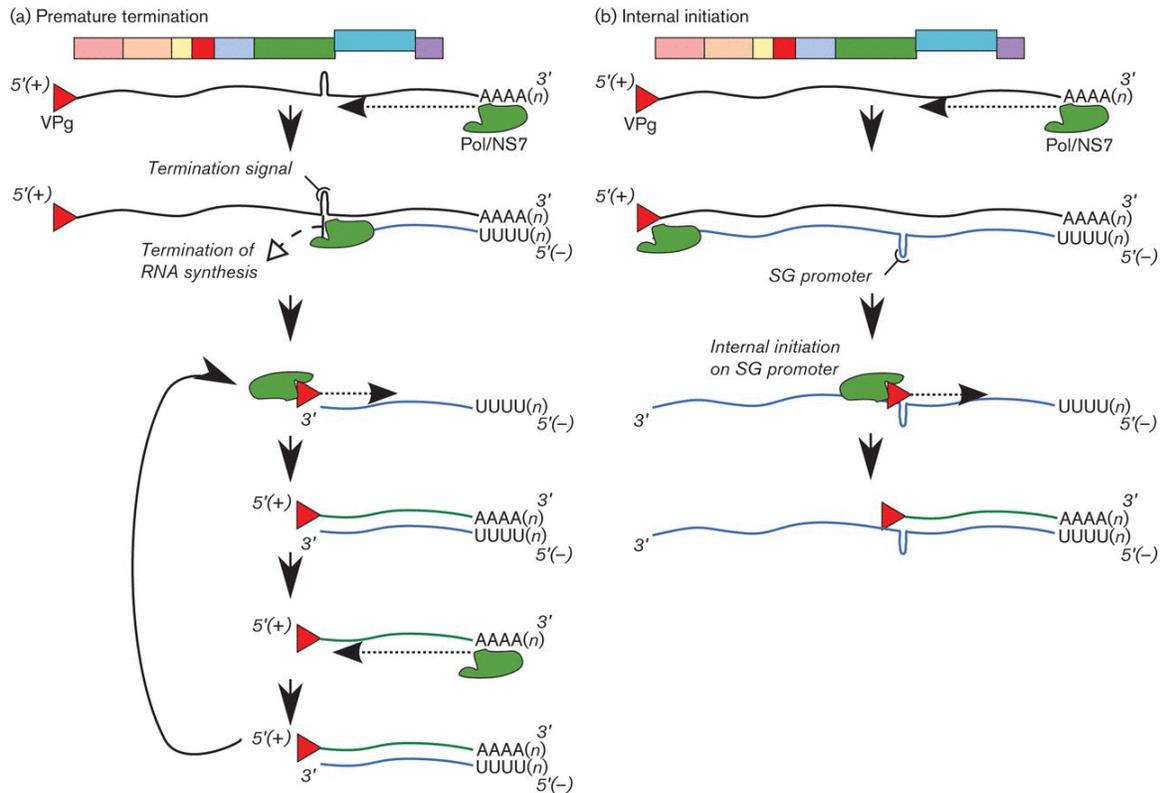
La réplication chez les norovirus se déroule dans le cytoplasme, en association avec des complexes membranaires dérivés de la cellule hôte (Belov & van Kuppeveld, 2012; Wobus *et al.*, 2004). Des recherches sur MNV ont démontré que l'infection induit la formation de vésicules membranaires chez les cellules infectées. La prolifération de la polymérase à ARN NS7 ainsi que de l'ARN double brin (un intermédiaire de réplication) se déroule dans la région périnucléaire. Les protéines NS, ainsi que l'ARN double brin et NS7, se dirigent ensuite vers l'endroit pour former le complexe de réplication (Hyde & Mackenzie, 2010; Thorne *et al.*, 2012).

Le mécanisme par lequel les norovirus recrutent des membranes cellulaires pour établir le complexe de réplication demeure incompris. Pour le MNV, NS1/2 et NS4 sont généralement responsables de ce rôle (Hyde & Mackenzie, 2010). De plus, NS4 peut induire le désassemblage de l'appareil de Golgi et inhibe la sécrétion de protéines, ce qui montre sa capacité à influencer les membranes cellulaires (Sharp *et al.*, 2012). Chez HuNV, l'équivalent de NS4 est nommé p22. Cette dernière peut aussi inhiber la sécrétion de protéines. De plus, p22 contient un signal d'exportation pour le réticulum endoplasmique qui permet son absorption dans des vésicules COPII (COPII est un type de vésicule qui

transporte de protéines du réticulum endoplasmique rugueux vers l'appareil de Golgi), ce qui interrompt le trafic normal vers le Golgi, menant ainsi à son désassemblage (Sharp *et al.*, 2010). Les études sur HuNV se sont concentrées sur la disruption du processus de sécrétion de protéines, mais il n'est pas clair si les réarrangements membranaires sont une conséquence ou une contribution au recrutement de membranes cellulaires pour la formation du complexe de réplication.

La réplication du génome chez les norovirus requiert un intermédiaire anti-sens et le processus est pris en charge par des *RNA-dependent RNA polymerase* (RdRp) virales (nommées NS7 chez MNV et d'autres norovirus) (Högbom *et al.*, 2009). Suite à la première ronde de traduction du génome parent, l'ARNm matriciel synthétisé est utilisé pour former une forme répllicative à double brin (RF pour « replicative form »). À partir de cet instant, la synthèse de l'ARN génomique et sous-génomique peut se dérouler. Durant le processus, la RdRp NS7 débute la synthèse d'ARN en attachant VP<sub>g</sub> au nucléotide initiateur via un lien phosphodiester, un processus appelé « VP<sub>g</sub> nucleotidylation » (Subba-Reddy *et al.*, 2011). La liaison se forme entre la guanine en 5' à l'extrémité du génome et un résidu tyrosine chez VP<sub>g</sub>, une liaison essentielle pour l'infectivité du virus (lorsque VP<sub>g</sub> est enlevé par quelque méthode, l'infectivité du norovirus chute de façon significative) (Chaudhry *et al.*, 2006).

Deux modèles ont été proposés pour expliquer le mécanisme de synthèse d'ARN sous-génomique chez les norovirus (figure 3). Chez le premier, une terminaison prématurée lors de la synthèse du brin d'ARN génomique anti-sens permettrait au brin ainsi synthétisé de servir de matrice pour la synthèse d'ARN sous-génomique à polarité positive. Chez le second, une structure d'ARN secondaire en amont de l'ORF2 dans l'ARN génomique anti-sens agirait comme promoteur pour la synthèse d'ARN sous-génomique à polarité positive. Dans les deux cas, une fois que la synthèse d'ARN génomique/sous génomique à polarité positive est débutée, plusieurs rondes de traduction des nouveaux ARN se produisent, suivies par d'autres rondes de synthèses d'ARN. Les modèles sont illustrés dans la figure 3.



**Figure 3 : Mécanismes de la synthèse d'ARN sous-génomique chez les norovirus.**

Adapté de Thorne et Goodfellow, 2014

### 1.2.3 Interactions avec la cellule hôte

Pendant leur réplication, les norovirus dérangent parfois certaines voies de signalisation cellulaire (possiblement pour créer un environnement plus propice à la réplication). Chez HuNV, des études ont montré que le virus peut altérer les voies de synthèse du cholestérol et des carbohydrates (Chang, 2009). Il a été démontré que la diminution de la synthèse de cholestérol avait un effet positif sur la réplication virale. D'autres voies de signalisation peuvent également être dérangées (Kuyumcu-Martinez *et al.*, 2004). Chez le calicivirus félin (FCV), l'infection cause un mouvement de la protéine PTB du noyau vers le cytoplasme, ce

qui régulerait de façon négative la traduction chez FCV. Ce mouvement se déroulerait juste avant l'exportation du matériel nucléaire de FCV (Willcocks *et al.*, 2004).

#### 1.2.4 Assemblée et sortie de la cellule hôte

Le procédé d'encapsidation chez les norovirus est encore largement inconnu. VP1 est capable d'auto assemblage en *Virus-like Particles* (VLPs), des particules qui sont morphologiquement identiques aux virions (Bertolotti-Ciarlet *et al.*, 2002). Bien que VP2 ne soit pas nécessaire à ce procédé, elle est essentielle dans la production de virions infectieux (Bertolotti-Ciarlet *et al.*, 2002; Sosnovtsev *et al.*, 2005). Il a donc été proposé que VP2 soit impliqué dans le processus d'encapsidation via une interaction avec l'ARN viral. Les études d'interaction entre VP1 et VP2 ont placé VP2 à l'intérieur de la capsid, soulignant ainsi son rôle dans l'encapsidation (Vongpunsawad *et al.*, 2013).

Très peu d'études fournissent des indications sur les mécanismes de sortie des virions lorsque le cycle répliatif touche à sa fin. L'idée la plus populaire est l'induction de l'apoptose chez la cellule hôte, hypothèse renforcée par l'accumulation de cellules apoptotiques dans les biopsies de patients infectés (Alonso *et al.*, 1998; Bok *et al.*, 2009; Sosnovtsev *et al.*, 2003).

#### 1.2.5 Pathologies

Comme mentionné précédemment, les norovirus sont des agents pathogènes importants, étant responsable pour un grand nombre de cas de gastro-entérites. La période d'incubation se situe normalement entre 24 et 48 heures, et les symptômes se font sentir pendant 12-72 heures, dépendamment des cas. Cependant, chez les patients âgés/immunosupprimés, la période symptomatique peut être plus longue (Estes *et al.* 2007). Les patients peuvent excréter des particules virales jusqu'à trois semaines après la résolution des symptômes.

Les travaux effectués sur les norovirus ont révélé que ces derniers infectent les cellules du système immunitaire (système immunitaire inné et adaptatif) ainsi que les entérocytes (Wobus *et al.*, 2004; Jones *et al.*, 2014). Le modèle courant d'infection veut que les virions utilisent les cellules M (Microfold cells, des cellules du tissu lymphoïde associé au tube digestif) pour violer l'épithélium intestinal. En effet, ceux-ci utiliseraient la capacité des cellules M à transporter du matériel présent dans l'appareil digestif vers les agrégats immunitaires sous-jacents (Karst and Wobus, 2015).

Plusieurs changements histologiques ont été remarqués chez des patients atteints; élargissement des villosités intestinales, raccourcissement des microvillosités, grossissement des mitochondries, œdème intercellulaire, plus grande vacuolisation cytoplasmique et hyperplasie des cryptes du colon (Dolin *et al.*, 1975; Blacklow *et al.*, 1972; Schreiber *et al.*, 1973). L'infection peut aussi causer une inflammation de la lamina propria (Blacklow *et al.*, 1972). Une étude a également montré une augmentation du nombre de cellules cytotoxiques T dans le duodénum des patients, quelques jours après le début des symptômes (Troeger *et al.*, 2009). Il a aussi été démontré que les norovirus causent l'apoptose des entérocytes chez l'humain (Troeger *et al.*, 2009).

Les infections causées par les norovirus sont généralement courtes, mais certaines conditions peuvent allonger l'infection. Bien que les symptômes s'estompent après quelques jours, il est possible pour les personnes atteintes de répandre des particules virales pendant plusieurs semaines. Chez des patients immunosupprimés, les symptômes peuvent durer plusieurs semaines, voir même plusieurs mois. Les raisons pour cette infection prolongée ne sont présentement pas bien comprises. L'une des raisons proposées est la difficulté pour le système immunitaire à complètement éradiquer les virus infectieux. Des études chez des souris n'ayant aucune cellule B ou T ont montré des niveaux très élevés de MNV-1, même après plusieurs mois d'infection (Chachu *et al.*, 2008). Il a été démontré que le génome du FCV peut acquérir des mutations à des endroits généralement considérés comme étant

importants pour la reconnaissance par le système immunitaire (Radford *et al.*, 1998). Malheureusement, les mécanismes par lesquels les norovirus maintiennent l'infection chez les patients demeurent largement inconnus.

### 1.2.6 Immunité

Il est difficile d'interpréter l'immunité aux norovirus. En effet, l'immunité ne semble pas être permanente, et la susceptibilité varie beaucoup entre les patients. En effet, certains patients ne développent pas d'immunité (même après plusieurs infections) tandis que d'autres demeurent résistants. Ces résultats pourraient laisser croire que certains individus ne réussissent pas à générer une réponse immunitaire spécifique au norovirus. Cependant, des données provenant de patients qui ont été exposés au virus montrent que les individus infectés développent des anticorps spécifiques, mais que leur présence ne garantit pas une protection (Johnson *et al.*, 1990; Lindesmith *et al.*, 2003; Baron *et al.*, 1984). Des immunoglobulines G (IgG) spécifiques au virus ont été retrouvées dans le sérum des patients plusieurs mois après l'infection, tandis que la réponse des IgA et des IgM semblait plus courte. Étant donné qu'il n'existe pas de systèmes de culture cellulaire pour les norovirus humains, il est impossible de tester l'effet neutralisant des anticorps générés.

Une étude collectant les cellules mononucléaires du sang périphérique (de l'anglais « *Peripheral Blood Mononuclear Cells* » (PBMC)) de patients avant et après infection a tenté d'évaluer la réponse des cellules T lors de l'infection. Après récolte des cellules, celles-ci ont été incubées avec des VLPs de norovirus humains, suivis d'une mesure des cytokines produites par les PBMCs (Lindesmith *et al.*, 2005). Les auteurs de l'étude ont noté une augmentation de la sécrétion des cytokines IFN $\gamma$ , IL-2 et IL-5. Cependant, des augmentations similaires ont été observées chez les PBMCs de patients avant l'incubation avec des VLPs, ce qui peut remettre en question les contrôles utilisés. Ce résultat met en évidence les difficultés présentées par l'étude de la réponse immunitaire face à une infection

par le norovirus. L'impossibilité de déterminer l'exposition préalable des patients rend l'interprétation des résultats complexe.

#### *1.2.6.1 Vaccination*

Les efforts pour designer des vaccins pour les norovirus humains se concentrent sur l'expression des protéines de capsides par différents vecteurs. Le résultat attendu est l'assemblage des protéines de capsides en VLPs immunogènes (Green *et al.*, 2007). Ce type de vaccin suscite une réponse au niveau des IgG dans le sérum ainsi que des IgA dans la muqueuse intestinale, mais la durée et l'efficacité de ces réponses n'ont pas été quantifiées. De plus, plusieurs autres facteurs doivent être considérés lors de l'élaboration d'un vaccin.

Des vaccins similaires, utilisés sur des félins, ne protègent pas les animaux contre l'infection et la persistance (Radford *et al.*, 2006). La présence d'une immunité qui ne peut neutraliser le virus peut mener à l'émergence de souches virulentes, les animaux vaccinés n'étant pas protégés contre de telles souches lors d'une étude sur le sujet. Ainsi, les vaccins doivent être capables de cibler les infections cliniques ainsi que les infections prolongées. De plus, la grande variabilité génétique des norovirus représente un obstacle significatif pour l'élaboration d'un vaccin efficace. Le besoin d'inclure plusieurs souches dans le vaccin est un autre facteur à considérer. Finalement, l'infection par les norovirus ne développe pas chez tous les patients une immunité persistante, ce qui complique le développement du vaccin. Étant donné qu'il existe plusieurs barrières à la vaccination, des alternatives sont nécessaires pour combattre les norovirus.

### 1.2.7 Prévention

Le virus peut se transmettre de façon directe de personne à personne, généralement par aérosols. Il peut également être transmis de façon indirecte par des aliments ou de l'eau contaminée. Il est difficile de contrôler la propagation directe, mais la transmission indirecte peut être mitigée par un lavage rigoureux des mains ainsi qu'avec l'utilisation de désinfectants. La désinfection est particulièrement importante puisque le norovirus peut demeurer sur une surface jusqu'à 7 jours (D.Souza *et al.*, 2006).

## 1.3 Désinfection

Par définition, un désinfectant est une substance que l'on applique sur une surface ferme dans le but de détruire certains microorganismes. Un désinfectant virucide est un désinfectant possédant la capacité de réduire de façon significative une population virale lorsqu'il est appliqué. Plusieurs réactifs sont efficaces contre les virus, bien que certains mécanismes ne soient pas encore bien compris. Par exemple, certains alcools ont été utilisés avec succès contre des virus, mais plusieurs virus non enveloppés se sont montrés résistants. Ainsi, les alcools ne sont pas considérés comme étant des virucides efficaces (Klein *et al.*, 1983).

Le glutaraldéhyde est un puissant agent virucide. Il a été démontré que celui-ci était efficace contre des particules de poliovirus, mais que l'ARN du virus pouvait y résister (Bailly *et al.*, 1991). Ainsi, les connaissances actuelles suggèrent que la neutralisation du poliovirus par le glutaraldéhyde était causée par des changements apportés à la capsid. En effet, des recherches ont montré que ce virucide peut interagir avec les protéines présentes sur la capsid de différents virus (Chambon *et al.*, 1992).

Les composés à base de chlore comme l'hypochlorite de sodium ou le dioxyde de chlore sont des désinfectants immensément populaires. Ceux-ci sont utilisés, entre autres, dans la désinfection de déversements de sang contenant le virus de l'immunodéficience humaine. Cependant, des études avec des résultats contradictoires sur l'effet des produits chlorés sur le poliovirus indiquent que de plus amples recherches sont requises pour bien comprendre leurs mécanismes d'action (Olivieri *et al.*, 1975; Floyd *et al.*, 1979).

L'étude des mécanismes d'action des désinfectants efficaces contre les virus permet reconnaître trois cibles potentielles pour les virucides : l'enveloppe lipidique (lorsqu'applicable), la capsid et le génome. De façon générale, les virus enveloppés sont plus faciles à neutraliser (Klein *et al.*, 1983). Ainsi donc, lors du développement de virucides, la majorité des tests sont effectués sur des virus ne possédant pas d'enveloppe. La philosophie derrière ce choix est simple; si un virucide peut neutraliser un virus non enveloppé, il pourra neutraliser un virus enveloppé. Les capsides sont, pour la plupart, formées de protéines. Il a donc été suggéré que des biocides comme le glutaraldéhyde, l'oxyde d'éthylène et certains produits chlorés, qui réagissent avec les groupements amines ou sulfhydryle, possèderaient une activité virucide. Cependant, il est possible que la destruction de la capsid ne neutralise pas complètement le virus, puisque cela peut relâcher des acides nucléiques infectieux dans le milieu.

L'entrée des désinfectants dans différents types de virus ainsi que leurs interactions avec les composantes virales sont des phénomènes peu étudiés pour l'instant, bien que des travaux aient été effectués sur des bactériophages (Maillard *et al.*, 1997). Ces travaux ont révélé qu'il était possible pour certains d'entre eux de développer une résistance à la désinfection par des produits chlorés (Wu *et al.*, 1990). Des chercheurs ont suggéré que les réovirus possèdent la capacité d'effectuer de la recombinaison génétique. En effets, deux (ou plus) génomes viraux endommagés peuvent interagir à l'intérieur d'une cellule hôte pour former un génome viable (Maillard, 1998).

Un autre mécanisme de résistance proposé implique la formation d'agrégats viraux. Ceux-ci peuvent être formés dans la cellule hôte pendant la réplication virale, mais ils peuvent également être produits hors de la cellule hôte, en réponse à des changements environnementaux. Des études suggèrent que la formation de ces structures pourrait conférer une résistance à certains désinfectants (Keswick *et al.*, 1985; Bates *et al.*, 1977).

### *1.3.1 Méthodes d'analyse des désinfectants*

Il existe plus d'une façon de quantifier les virus suite à l'application d'un désinfectant sur une surface. Elles peuvent être séparées en 2 catégories; les méthodes « traditionnelles » et les méthodes dites moléculaires. Par exemple, chez les méthodes traditionnelles, on retrouve les essais par plaques, les essais de dose létale médiane ainsi que des essais protéiques.

#### *1.3.1.1 Méthodes traditionnelles*

Les essais en plaques visent à déterminer le nombre d'unités formatrices de plaques (PFU) dans un échantillon. Pour ce faire, une couche de cellules hôtes est cultivée et ensuite incubée avec plusieurs dilutions du virus à quantifier. Le tout est ensuite recouvert d'un milieu semi-solide pour éviter que le virus ne se répande sur l'ensemble du Petri. Les cellules infectées vont lyser et répandre l'infection aux autres cellules, formant ainsi des plaques visibles (avec ou sans microscope). Les plaques sont ensuite comptées pour ensuite estimer le montant d'unités formatrices de plaques par millilitres d'un échantillon. Cette méthode peut prendre jusqu'à deux semaines avant la prise de résultat, dépendamment du virus utilisé.

L'essai de dose létale permet de déterminer la quantité de virus requise pour produire des effets cytopathiques chez 50% des cellules infectées (ainsi, le terme dose létale est inexacte pour ce type d'essai). Pour ce test, des cellules sont cultivées en plaques et des dilutions du

virus y sont ajoutées. Après incubation, les cellules sont observées et la présence/absence d'effets cytopathiques est notée, puis utilisée pour calculer la dose nécessaire pour obtenir 50% d'effets cytopathiques chez une population cellulaire donnée (TCID<sub>50</sub>). L'apparition des effets cytopathiques peut prendre plusieurs jours.

#### *1.3.1.2 Méthodes moléculaires*

La méthode moléculaire la plus populaire pour mesurer un titre viral utilise la PCR quantitative. Le but est d'amplifier l'ARN (ou l'ADN) viral jusqu'à ce qu'il soit détectable/quantifiable par fluorescence. La plupart du temps, la quantification fait appel à des dilutions de standards aux concentrations connues pour estimer la concentration de l'échantillon inconnue. Il est à noter que le nombre de copies produites n'est pas nécessairement représentatif du nombre de virus dans l'échantillon, car les acides nucléiques et les protéines ne sont pas produits à un ratio 1 :1. Cette PCR peut être couplée à la culture cellulaire pour permettre de générer un grand nombre d'échantillons. Des cellules hôtes sont cultivées, puis incubées avec du virus dont le titre est déjà connu. Après un temps d'incubation préalablement établi, les cellules sont récoltées et l'acide nucléique en est extrait. Après extraction, le matériel génétique viral peut ensuite être utilisé en réaction qRT-PCR pour quantification. La méthode combinant culture cellulaire et PCR quantitative se nomme ICC qRT-PCR.

L'un des avantages de cette méthode est sa rapidité; les résultats sont accessibles en quelques heures. D'autres méthodes moléculaires incluent la cytométrie de flux ainsi que les essais ELISA. En effet, il est possible de procéder à des essais ELISA avec des anticorps spécifiques contre certains virus pour en détecter la présence dans un échantillon (Zelnik *et al.*, 2004).

### *1.3.2 Analyse des désinfectants*

Actuellement, l'analyse de l'efficacité des nouveaux désinfectants s'effectue selon les recommandations de la « Canadian General Standards Board » reposant sur une méthode conventionnelle basée sur l'observation des effets cytopathiques d'un virus donné sur une culture cellulaire permettant de calculer les TCID<sub>50</sub>. Les tests doivent être effectués sur des virus non enveloppés (voir section précédente pour une explication). Pour le norovirus, le substitut accepté par l'organisme est le calicivirus félin.

En effet, il est difficile de mesurer l'efficacité d'un virucide contre le norovirus puisqu'il n'existe pas de modèle cellulaire permettant de cultiver le virus. Ainsi donc, le calicivirus félin du genre Vesivirus est utilisé puisqu'il représente un modèle adéquat pour l'inactivation du norovirus par des désinfectants (Health Canada, 2014). En effet, le calicivirus félin partage la même organisation génomique, la même architecture de la capsid ainsi que les mêmes propriétés biochimiques.

De façon générale, l'efficacité d'un désinfectant est mesurée en effectuant plusieurs tests de TCID<sub>50</sub>, l'idée étant de comparer les valeurs obtenues pour des échantillons avec et sans désinfectant. Après application du désinfectant, un neutralisant est ajouté au mélange. Un neutralisant est une solution qui peut stopper les effets d'un produit biocide. Dans le cas d'un test de désinfectant, le neutralisant doit pouvoir contrebalancer les propriétés virucides du désinfectant. Cette propriété est importante, car elle permet de stopper l'application du virucide, un facteur important dans l'analyse. En effet, pour être considéré efficace, un désinfectant doit agir rapidement (aux alentours de 60 secondes); un désinfectant qui requiert 5 minutes pour être efficace n'est pas attrayant. Ainsi donc, l'utilisation de neutralisant est cruciale lors de l'analyse de désinfectants.

Il existe plusieurs méthodes pour neutraliser des désinfectants, les plus populaires étant la dilution et la neutralisation chimique. Certains désinfectants sont très peu affectés par la concentration à laquelle ils sont utilisés; la dilution n'est donc pas recommandée pour ceux-ci. La dilution est aussi évitée chez les désinfectants qui peuvent se fixer aux cellules.

Certains critères d'efficacité doivent être respectés lors de la soumission d'un virucide à la « Canadian General Standards Board ». Les critères sont :

- 1- Le  $\log_{10}$  de réduction doit être plus grand que 4 lorsque l'on compare les tests entre le désinfectant et le contrôle viral (voir tableau 1).
- 2- Les cellules des puits de contrôles cellulaires (« Cell Control ») doivent être viables et attachées au fond des puits de la plaque de culture.
- 3- Le milieu doit être exempt de contamination, et ce, pour tous les puits.
- 4- Lorsqu'il y a évidence de cytotoxicité, une réduction d'au minimum  $3\log_{10}$  doit être démontrée sous le niveau de cytotoxicité.

**Tableau 1 : Logarithmes de réduction et leur signification chez un désinfectant virucide.**

$\leq 1\log_{10}$	Non significatif
$1-2 \log_{10}$	Indicatif
$2-4 \log_{10}$	Modéré
$> 4 \log_{10}$	Hautement significatif

Ces lignes directrices visent à garantir l'efficacité des désinfectants virucides disponibles sur le marché. Ainsi donc, pour obtenir la mention virucide, un désinfectant doit être capable de neutraliser 99,99% de la population virale d'un échantillon donné.

#### **1.4 Hypothèse et objectifs**

La lutte contre les infections nosocomiales passe souvent par la prévention, ce qui implique l'utilisation de désinfectants efficaces. Cependant, le processus de validation des désinfectants par la méthode standard, qui consiste à évaluer l'efficacité du désinfectant en observant l'apparition d'effets cytopathiques du virus, est une méthode lente et les résultats obtenus ne sont pas toujours fiables. La disponibilité d'une méthode sensible, rapide et fiable pourrait permettre de faciliter l'étude de l'efficacité virucide de désinfectants tout en permettant de réduire le temps d'obtention des résultats.

Dans ce projet de maîtrise, nous proposons de mettre au point de développer une méthode qui permettra d'analyser l'efficacité virucide des désinfectants de façon plus rapide et plus précise. Cette méthode, basée sur la technique ICC-qRT-PCR (*Integrated cell culture-quantitative reverse transcription polymerase chain reaction*) sera testée sur le calicivirus félin, virus substitut au norovirus. Pour arriver à ce but, trois objectifs ont été établis :

- 1- Déterminer le temps de contact ainsi que la concentration optimale de plusieurs désinfectants en développement par la méthode conventionnelle.
- 2- Mettre au point la technique de détection par ICC qRT-PCR pour le calivirus félin, le virus substitut utilisé.
- 3- Comparer l'efficacité de la méthode moléculaire avec la méthode conventionnelle.

## **CHAPITRE 2**

### **MATÉRIEL ET MÉTHODES**

#### **2.1 Culture cellulaire**

Les cellules CRFK (ATCC CCL-94) ont été cultivées dans des flaques T25, puis T75 lorsque leur population était suffisamment élevée (environ 80% de confluence). Le milieu de culture EMEM (Wisent #320-005-CL) a été utilisé, supplémenté de sérum chevalin (Gibco #26-050-070) et antibiotique-antimycotique (Gibco #15240062). Les cellules étaient examinées chaque jour et passées lorsque la confluence approchait 80% avec trypsine (Wisent # 325-043-CL) et PBS (Wisent, #311-012-LL).

#### **2.2 Production virale**

Les cellules CRFK ont été cultivées en flasques T75 jusqu'à confluence d'environ 80%. Ensuite, elles ont été inoculées avec 500 $\mu$ L de virus ( $10^7$  TCID<sub>50</sub>/mL) (ATCC VR-782) pendant 48 heures. Suite à l'incubation, elles ont été soumises à un processus de gel-dégel (2 cycles de 50 minutes), puis placées en tubes 50 mL pour centrifugation (15 minutes, 4°C). Le surnageant a ensuite été récolté dans des vials pour congélation (-80 °C, 500  $\mu$ L par vial).

### 2.3 Détermination du titre viral

Des cellules CRFK ont été cultivées en plaques de 24 puits (40 000 cellules par puits) jusqu'à l'obtention d'une confluence d'environ 90%. Ensuite, 200 µL de virus a été dilué dans 1.8 mL de milieu de culture (voir section 2.1). Le virus a ensuite été dilué en série (facteur de dilution de 10, de  $10^{-2}$  à  $10^{-7}$ ). Le milieu de culture des cellules CRFK a ensuite été retiré, puis elles ont été inoculées avec 100 µL de dilution virale, à raison de 4 puits par dilution. Après avoir ajouté 900 µL de milieu de culture dans chaque puits, les cellules ont été incubées pendant 7 jours. À la fin de cette période, les puits ont été observés afin de déterminer la présence/absence d'effets cytopathiques sur la population de cellule de chaque puits. Les résultats ont été notés puis utilisés pour calculer le titre viral du stock produit. Le titre viral a été calculé en utilisant la méthode de Reed-Muench pour le calcul de TCID<sub>50</sub>. Cette méthode est utilisée pour calculer la concentration virale requise pour que la moitié des cellules d'un échantillon montrent des effets cytopathiques. La formule veut que le log<sub>10</sub> de la dilution médiane, c'est-à-dire la dilution où 50% des cellules montrent des effets cytopathiques, soit égaux à : log<sub>10</sub> de la dilution montrant plus de 50% d'effets cytopathiques, auquel on soustrait le produit de la différence des logarithmes par le facteur de dilution utilisé (Reed *et al.*, 1938).

### 2.4 Évaluation des désinfectants

Les désinfectants « Complete » et « PNA WW » ont été utilisés pour traiter VR-782 pendant un temps d'exposition variable (entre 30 et 300 secondes). Pour le désinfectant « Complete », les concentrations ont varié entre 6 000 et 10 000 ppm, tandis que la concentration du désinfectant « PNA WW » est demeurée à 5 000 ppm pour tous les tests. 200 µL de VR-782 ont été déposés dans des Petri de verre de 100 mm, puis sécher à l'air libre. L'inoculum a ensuite été mis en contact avec 1,8 mL de milieu de désinfectant pour le temps d'exposition

désiré (entre 30 et 300 secondes). Dans les cas où le contrôle ne nécessitait pas de désinfectant, du milieu de culture a été utilisé. Après cette étape, les mélanges ont été neutralisés avec 18 mL d'agent neutralisant (Bouillon neutralisant Dey-Engley, #D3435-500G, Sigma). Le protocole de détermination du titre viral a ensuite été répété avec ces échantillons, c'est-à-dire que la préparation a été diluée en série, puis déposée sur les cellules CRFK préalablement cultivées dans des plaques 24 puits, pour une inoculation de 7 jours. Les différents contrôles utilisés visent à garantir qu'aucune des composantes (autres que le virus) ne contribue au développement d'effets cytopathiques visibles chez les cellules.

Les résultats ont été pris après 7 jours, en observant les effets cytopathiques causés par le virus. La présence/absence d'effets cytopathiques a été utilisée pour calculer le TCID<sub>50</sub>.

## 2.5 RT-qPCR

Les cellules CRFK ont été cultivées en plaques 6 puits jusqu'à confluence d'environ 80%, puis inoculées 6 heures avec 100 µL de VR-782 (10<sup>7</sup> TCID<sub>50</sub>/mL). Elles ont ensuite été lavées avec du PBS, trypsinisées et centrifugées. Le précipité a été placé dans un tampon de lyse (500 µL tampon RLT du kit qiagen avec 1% v/v de β-mercaptoéthanol), puis conservé au congélateur à -80 °C.

L'ARN a été décongelé, puis extrait des cellules en suivant les instructions du kit qiagen (RNeasy, #74104), puis la concentration des échantillons a été mesurée à l'aide de l'instrument Nanodrop. 2 µg d'ARN (dilué dans 10 µL d'eau DEPC) ont ensuite subi un processus de transcription inverse avec l'enzyme RT M-MLV-RT de Promega (M1701), en utilisant l'appareil T gradient (Biometra). Le protocole de synthèse de l'ADNc consiste en une dénaturation initiale à 70 °C, suivi d'une synthèse à 42°C pour 60 minutes. Une dernière étape à 70°C (15 minutes) sert ensuite à inactiver toute transcriptase inverse. La réaction PCR

a été effectuée avec l'appareil CFX connect de Bio-Rad (#1855201). Les amorces obtenues de l'article de Park *et al* (2010) sont visibles dans le Tableau 2.

**Tableau 2 : Séquences des amorces utilisées lors des essais PCR.**

Amorce	Forward	Reverse
FCV	5'-GCC AAT CAG CAT GTG GTA GTA ACC-3'	5'-GCA CAT CAT ATG CGG CTC TG-3'
HMBS-1	5'-CAA ACA GAC AGT GTG GTG GCA G-3'	5'-AGA ATC TTG TCC CCT GTG GTG G-3'
RPS7	5'-GTC CCA GAA GCC GCA CTT TGA C-3'	5'-CTC TTG CCC ACA ATC TCG CTC G-3'

Les réactions qPCR contenaient les réactifs suivants : 100 ng d'ADN matrice, 5 µL de tampon « Advanced qPCR MasterMix » de Wisent (800-431-UL), 0,4 µL (10 µM) d'amorce « Forward » et « Reverse ». Le tout était complété à 10 µL avec de l'eau DEPC.

L'amplification s'est effectuée en 40 cycles constitués d'une dénaturation à 95°C de 3 secondes, suivi de 20 secondes d'appariement (57°C). Une dernière étape à 72°C (20 secondes) a été effectuée pour confirmer l'amplification. La dernière étape du protocole qPCR consiste en une analyse de la courbe de dénaturation thermique (65°C à 95°C, incréments de 0,5 °C). Après chaque cycle, l'appareil a mesuré la fluorescence produite par la liaison du réactif Supergreen™ à l'ADN double-brin pour jauger l'accumulation de produits PCR. Ceux-ci ont été analysés avec le CFX Connect real-time PCR Detection System (Bio-Rad, Mississauga, ON, Canada).

## **2.6 Extraction d'ARN au phénol-chloroforme**

Les cellules CRFK ont été cultivées en plaques 6 puits (40 000/puits) jusqu'à confluence d'environ 80%, puis inoculées 6 heures avec 100 µL de VR-782. Elles ont ensuite été lavées avec du PBS, puis décollées avec le réactif QIAzol (qiagen # 141291476). Après ajout de chloroforme, le mélange a été centrifugé (15 minutes à 4°C), la phase aqueuse a été transférée dans un nouveau tube, auquel 500 µL d'isopropanol ont été ajoutés. Après une autre centrifugation (10 minutes, 4 °C), le culot a été lavé à l'aide d'éthanol 75%, puis centrifuger une troisième fois (5 minutes, 4°C). Le culot a ensuite été séché à l'air libre, puis suspendu dans 30 µL d'eau DEPC. L'ARN a ensuite été mis sur gel d'agarose (1% agarose), migré à 100V. L'agent intercalant GelRed (Biotium, Scarborough, ON) a été utilisé pour la visualisation des résultats.

## CHAPITRE 3

### RÉSULTATS

#### 3.1 Détermination de l'efficacité de désinfectants par TCID<sub>50</sub>

La première étape du projet consistait à tester un nombre de désinfectants afin de comparer l'efficacité de la méthode ICC qRT-PCR développée durant le projet (objectif 2). Cette étape a aussi permis d'élaborer un protocole de TCID<sub>50</sub> robuste pouvant être utilisé lors de comparaison avec la méthode moléculaire.

Les contrôles présents visent à éliminer toute forme de biais dans les résultats. Le premier contrôle (contrôle sans désinfectant, Tableau 3) contient du calicivirus félin (souche VR-782), du milieu de culture et du neutralisant; cela permet d'établir le titre de l'échantillon viral. Le contrôle de neutralisant contient VR-782, du désinfectant ainsi que du neutralisant (bouillon Dey-Engley). Il est à noter que le bouillon Dey-Engley a été choisi comme neutralisant, car celui-ci a la capacité de neutraliser un vaste spectre de désinfectants tels que les ammoniums quaternaires, les produits à base de phénol, les produits chlorés, les aldéhydes et plusieurs autres. Étant donné la nature incertaine des désinfectants utilisés, ce choix semblait le plus prudent. Pour ce contrôle, l'échantillon viral est ajouté après la neutralisation du désinfectant. Ce contrôle permet de confirmer l'efficacité du neutralisant envers le désinfectant utilisé. Le contrôle de cytotoxicité contient du désinfectant ainsi que du neutralisant; son but est d'enrayer les possibilités de faux positifs, dans le cas où le neutralisant pourrait altérer les cellules d'une façon que l'on pourrait confondre avec des effets cytopathiques. Le contrôle de population initiale contient VR-782 ainsi que du neutralisant, mais VR-782 est présent en concentration différente au contrôle de neutralisant (500 µL dilués dans 4,5 mL de neutralisant). Ce contrôle vise à s'assurer que le virus n'est

pas complètement perdu au cours des différentes dilutions. La dernière colonne du Tableau 3 représente le contrôle de culture cellulaire; les cellules sont simplement incubées avec le milieu de culture, sans modifications. La mention « ok » signifie que les cellules ne présentent pas d'anomalies visibles. Les contrôles ont été effectués pour chacun des essais réalisés au cours de cette étude.

**Tableau 3 : Efficacité du PNA WW (5 000 ppm) durant 1 minute de contact, déterminée par TCID<sub>50</sub>**

Dilution VR-782 (-Log <sub>10</sub> )	Contrôle sans désinfectant		Test		Contrôle de neutralisation	Contrôle de cytotoxicité	Contrôle de population initiale	Contrôle de culture cellulaire
2	4 (0)	4 (0)	2 (0)	3 (1)	4 (0)	0 (0)	4 (0)	OK
3	4 (0)	4 (0)	0 (0)	0 (0)	4 (0)	0 (0)	4 (0)	N/A
4	4 (0)	4 (0)	0 (0)	0 (0)	4 (0)	0 (0)	4 (0)	
5	4 (0)	4 (0)	0 (0)	0 (0)	4 (0)	0 (0)	4 (0)	
6	3,3 (0,6)	4 (0)	0 (0)	0 (0)	4 (0)	0 (0)	4 (0)	
7	3 (0)	4 (0)	0 (0)	0 (0)	4 (0)	0 (0)	4 (0)	
TCID <sub>50</sub>	>7	>7	2	2,3	>7	<2	>7	
TCID <sub>50</sub> moyen	7		2,2		N/A			N/A
<small>Nombre de puits présentant des effets cytopathiques, sur un maximum possible de 4. Les valeurs moyennes de 3 essais TCID<sub>50</sub> sont affichées, avec leurs écarts-types entre parenthèses.</small>								
Réduction en Log <sub>10</sub>	4,8		-	-				

### *3.1.1 Efficacité du désinfectant PNA WW contre le calicivirus félin*

Les protocoles de production virale et de TCID<sub>50</sub> ont d'abord été testés sur un désinfectant nommé PNA WW (Sanimarc, Victoriaville). Des concentrations variant de 500 ppm à 5000 ppm ont été testées. Ces différentes concentrations ont été en contact avec le virus pendant 1 minute.

Les résultats obtenus avec la première concentration testée (5 000 ppm) sont présentés dans le Tableau 3. Pour cette dilution, le logarithme de réduction du titre viral était au-dessus de 4 (4,8 pour 5000 ppm). Il est possible qu'il soit encore plus élevé, puisque les limites du test ne permettent pas d'estimer précisément le titre viral de l'échantillon. En effet, les résultats obtenus pour le contrôle du virus, du neutralisant et de population initiale indiquent qu'il est possible que le titre viral évalué par TCID<sub>50</sub> soit supérieur à 7, même si les dilutions effectuées dans le cadre de l'expérience ne permettent pas de l'évaluer.

De nouveaux essais de TCID<sub>50</sub> ont ensuite été effectués en conservant le même temps de contact (60 secondes), mais en variant la concentration de 500 à 3000 ppm. Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau 4. Ceux-ci montrent que la concentration idéale pour un temps de contact de 60 secondes est de 750 ppm, puisqu'elle permet d'obtenir un logarithme de réduction suffisant, soit plus de 4. En effet, 750 ppm est la concentration la plus faible qui permet néanmoins de se conformer aux normes établies par la « Canadian General Standards Board ».

**Tableau 4 : Logarithmes de réduction du titre viral obtenus en fonction de la concentration du désinfectant PNA WW pour un temps de contact de 60 secondes**

Concentration (ppm)	Log de réduction obtenu (moyenne)
5000	4,8
3000	4,5
1500	4,3
1000	4,2
750	4,2
666	3,1
500	2,65

### *3.1.2 Efficacité du désinfectant Complete 6000 contre le calicivirus félin*

Par la suite, des essais de TCID<sub>50</sub> ont été réalisés avec le désinfectant Complete (SaniMarc, Victoriaville). Des concentrations se situant entre 6 000 et 9 000 ppm de ce produit ont été testées pour leur capacité virucide envers le calicivirus félin à l'aide d'essais TCID<sub>50</sub>. De plus, différents temps de contacts, de 30 secondes à 5 minutes, avec le virus ont été testés. Bien que la composition exacte de ce désinfectant nous soit inconnue, nous savons qu'il est à base d'hypochlorite de sodium.

Le Tableau 5 montre les premiers résultats de tests TCID<sub>50</sub> obtenus avec le désinfectant Complete 6000. Cependant, ceux-ci ne pouvaient être utilisés. En observant le tableau, on peut voir que certains puits dans le contrôle de cytotoxicité ont démontré des effets cytopathiques, un résultat surprenant considérant que ces puits ne contiennent pas de virus. Le contrôle étant invalide, ces résultats ont été rejetés.

**Tableau 5 : Efficacité du Complete (6 000 ppm) durant 1 minute de contact, déterminée par TCID<sub>50</sub>**

Dilution VR-782 (-Log <sub>10</sub> )	Contrôle sans désinfectant		Test		Contrôle de neutralisation	Contrôle de cytotoxicité	Contrôle de population initiale	Contrôle de culture cellulaire
2	4	4	3	3	4	3	4	OK
3	4	4	2	3	4	2	4	N/A
4	4	4	1	1	4	1	4	
5	4	4	0	0	4	0	4	
6	3	1	0	0	3	0	3	
7	2	0	0	0	3	0	3	
TCID <sub>50</sub>	6,5	5,3	3	3,5	>7	3	>7	
TCID <sub>50</sub> moyen	5,9		3,3		N/A			
Réduction en Log <sub>10</sub>	2,6		-	-				

Nombre de puits présentant des effets cytopathiques, sur un maximum possible de 4.

Le Tableau 6 montre les résultats obtenus avec le Complete 6000 après 3 minutes d'exposition au désinfectant. Bien que le logarithme de réduction soit suffisant dans ce cas, un temps de contact de 3 minutes n'est pas idéal dans un contexte de désinfection. Ainsi donc, d'autres tests ont été effectués avec le Complete 6000.

**Tableau 6 : Efficacité du Complete (6 000 ppm) durant 3 minutes de contact, déterminée par TCID<sub>50</sub>**

Dilution VR-782 (-Log <sub>10</sub> )	Contrôle sans désinfectant		Test		Contrôle de neutralisation	Contrôle de cytotoxicité	Contrôle de population initiale	Contrôle de culture cellulaire
2	4 (0)	4 (0)	2,4 (0,5)	0 (0)	4 (0)	2,2 (0,4)	4 (0)	OK
3	4 (0)	4 (0)	2 (0,7)	0 (0)	4 (0)	0 (0)	4 (0)	N/A
4	4 (0)	4 (0)	0 (0)	0 (0)	4 (0)	0 (0)	4 (0)	
5	4 (0)	3 (1,2)	0 (0)	0 (0)	4 (0)	0 (0)	4 (0)	
6	4 (0)	2,2 (0,4)	0 (0)	0 (0)	4 (0)	0 (0)	4 (0)	
7	2,8 (0,4)	2 (0,7)	0 (0)	0 (0)	4 (0)	0 (0)	4 (0)	
TCID <sub>50</sub>	>7	7	3	<2	>7	2	>7	
TCID <sub>50</sub> moyen	7		2,5		N/A			
Réduction en Log <sub>10</sub>	4,5		-	-				

Nombre de puits présentant des effets cytopathiques, sur un maximum possible de 4. Les valeurs moyennes de 5 essais TCID<sub>50</sub> sont affichées, avec leurs écarts-types entre parenthèses.

Le test suivant, au cours duquel le virus a été exposé au désinfectant pendant 2 minutes, n'a pas été concluant (voir Tableau 7). En effet, le logarithme de réduction obtenu (2,1) n'était pas suffisant pour qualifier le produit comme étant un désinfectant virucide efficace.

**Tableau 7: Logarithmes de réduction du titre viral obtenus en fonction du temps de contact avec le désinfectant Complete 6 000**

Temps d'exposition (en secondes)	Log de réduction obtenu
300	5
180	4,6
120	2,1
60	0,8

Les essais se sont donc dirigés vers une concentration plus élevée dans le but de satisfaire les exigences commerciales du produit, soit une capacité virucide après 30 secondes de contact.

### *3.1.3 Efficacité du désinfectant Complete 7000 contre le calicivirus félin*

Le Tableau 8 montre les résultats d'un protocole de TCID<sub>50</sub> avec le désinfectant Complete 7000 (SaniMarc, Victoriaville) pour 3 minutes d'exposition. Le logarithme de réduction obtenu était plus grand que 4. Ainsi, d'autres temps de contact ont été testés dans le but d'optimiser la période d'exposition.

Même avec une concentration plus élevée que les 6 000 ppm testées précédemment, 2 minutes d'exposition (Tableau 9) n'étaient pas suffisantes pour obtenir un logarithme de réduction suffisant. D'autres tests ont néanmoins été effectués avec des temps de contact encore plus court, car le temps d'attente entre les manipulations et la prise de résultats est de sept jours. Des essais avec différentes dilutions ont été effectués avant que les résultats pour 2 minutes soient disponibles dans le but d'économiser du temps. Le logarithme de réduction n'était pas satisfaisant pour un désinfectant commercial, et les tests ont continué avec une concentration plus grande. En effet, le logarithme de réduction obtenu pour 30 secondes de contact n'était que de 2,3 ce qui ne respecte pas les normes établies par la « Canadian General Standards Board » pour un désinfectant virucide.

**Tableau 8 : Efficacité du Complete (7 000 ppm) durant 3 minutes de contact, déterminée par TCID<sub>50</sub>**

Dilution VR-782 (-Log <sub>10</sub> )	Contrôle sans désinfectant		Test		Contrôle de neutralisation	Contrôle de cytotoxicité	Contrôle de population initiale	Contrôle de culture cellulaire
2	4 (0)	4 (0)	0 (0)	0 (0)	4 (0)	0 (0)	4 (0)	OK
3	4 (0)	4 (0)	0 (0)	0 (0)	4 (0)	0 (0)	4 (0)	N/A
4	4 (0)	4 (0)	0 (0)	0 (0)	4 (0)	0 (0)	4 (0)	
5	4 (0)	4 (0)	0 (0)	0 (0)	4 (0)	0 (0)	4 (0)	
6	4 (0)	4 (0)	0 (0)	0 (0)	4 (0)	0 (0)	4 (0)	
7	4 (0)	4 (0)	0 (0)	0 (0)	4 (0)	0 (0)	4 (0)	
TCID <sub>50</sub>	>7	>7	<2	<2	>7	<2	>7	
TCID <sub>50</sub> moyen	7		2		N/A			
Réduction en Log <sub>10</sub>	5		-	-				

Nombre de puits présentant des effets cytopathiques, sur un maximum possible de 4. Les valeurs moyennes de 4 essais TCID<sub>50</sub> sont affichées, avec leurs écarts-types entre parenthèses.

**Tableau 9 : Logarithmes de réduction du titre viral obtenus en fonction du temps de contact avec le désinfectant Complete 7000.**

Temps d'exposition (en secondes)	Log de réduction obtenu
300	5
180	5
120	3,7
60	2,4
30	2,3

#### *3.1.4 Efficacité du désinfectant Complete 8 000 contre le calicivirus félin*

Les tests avec le Complete 8000 ont semblé plus prometteurs, étant donné le log de réduction obtenu avec un temps de contact de 120 secondes (voir Tableau 10). Le test avec 60 secondes d'exposition a également montré un log de supérieur à 4, indiquant que la concentration plus élevée (comparée à 7000 ppm) a un effet sur l'efficacité du désinfectant, car elle permet de réduire le temps de contact requis pour réduire de façon satisfaisante la population virale (tableau 11). Cependant, le log de réduction obtenu après 30 secondes (3,1) ne correspondait pas au résultat désiré pour un produit virucide. Bien que les logarithmes de réduction soient supérieurs à ceux produits par la concentration précédente (7 000 ppm), ils demeuraient insuffisants. Ainsi, des essais ont été faits avec une concentration plus élevée que 8 000 ppm.

**Tableau 10 : Efficacité du Complete (8 000 ppm) durant 60 secondes de contact, déterminée par TCID<sub>50</sub>**

Dilution VR-782 (-Log <sub>10</sub> )	Contrôle sans désinfectant		Test		Contrôle de neutralisation	Contrôle de cytotoxicité	Contrôle de population initiale	Contrôle de culture cellulaire
2	4 (0)	4 (0)	0 (0)	0 (0)	4 (0)	0 (0)	4 (0)	OK
3	4 (0)	4 (0)	0 (0)	0 (0)	4 (0)	0 (0)	4 (0)	N/A
4	4 (0)	4 (0)	0 (0)	0 (0)	4 (0)	0 (0)	4 (0)	
5	4 (0)	4 (0)	0 (0)	0 (0)	4 (0)	0 (0)	4 (0)	
6	4 (0)	2,8 (0,4)	0 (0)	0 (0)	4 (0)	0 (0)	4 (0)	
7	4 (0)	2 (0,7)	0 (0)	0 (0)	4 (0)	0 (0)	4 (0)	
TCID <sub>50</sub>	>7	7	<2	<2	>7	<2	>7	
TCID <sub>50</sub> moyen	7		2		N/A			
Réduction en Log <sub>10</sub>	5		-	-				

Nombre de puits présentant des effets cytopathiques, sur un maximum possible de 4. Les valeurs moyennes de 5 essais TCID<sub>50</sub> sont affichées, avec leurs écarts-types entre parenthèses.

**Tableau 11 : Logarithmes de réduction du titre viral obtenus en fonction du temps de contact avec le désinfectant Complete 8000.**

Temps d'exposition (en secondes)	Log de réduction obtenu
120	5
60	5
30	3,1

### 3.1.5 Efficacité du désinfectant Complete 9 000 contre le calicivirus félin

Les résultats obtenus avec le Complete 9000 (SaniMarc, Victoriaville) indiquent que le produit se conforme aux directives prévues par la « Canadian General Standards Board » ; cette concentration permet de réduire le titre viral d'un échantillon par un facteur de plus de 10 000, ce qui est suffisant pour un désinfectant (Tableau 12).

**Tableau 12 : Logarithmes de réduction du titre viral obtenus en fonction du temps de contact avec le désinfectant Complete 9000.**

Temps d'exposition (en secondes)	Log de réduction obtenu
120	5
60	5
30	4,7

### 3.1.6 Efficacité du désinfectant Complete 10 000 contre le calicivirus félin

Des tests ont été effectués avec le Complete 10 000 (SaniMarc, Victoriaville), dans le but de possiblement accélérer le processus, au cas où le Complete 9 000 n'aurait pas généré les résultats attendus après 30 secondes. Le logarithme de réduction obtenu pour 10 000 ppm était acceptable (5), même après seulement 30 secondes d'exposition (voir Tableau 13).

L'évaluation de la capacité virucide de plusieurs désinfectants en développement nous a permis de déterminer d'une part leur valeur de TCID<sub>50</sub> respectifs contre le calicivirus félin. D'autre part, nous avons que le désinfectant Complete à une concentration de 9 000 ppm serait utilisé lors du développement de la méthode moléculaire.

**Tableau 13 : Efficacité du Complete (10 000 ppm) durant 30 secondes de contact, déterminée par TCID<sub>50</sub>**

Dilution VR-782 (-Log <sub>10</sub> )	Contrôle sans désinfectant		Test		Contrôle de neutralisation	Contrôle de cytotoxicité	Contrôle de population initiale	Contrôle de culture cellulaire
2	4 (0)	4 (0)	0 (0)	0 (0)	4 (0)	0 (0)	4 (0)	OK
3	4 (0)	4 (0)	0 (0)	0 (0)	4 (0)	0 (0)	4 (0)	N/A
4	4 (0)	4 (0)	0 (0)	0 (0)	4 (0)	0 (0)	4 (0)	
5	4 (0)	4 (0)	0 (0)	0 (0)	4 (0)	0 (0)	4 (0)	
6	4 (0)	4 (0)	0 (0)	0 (0)	4 (0)	0 (0)	4 (0)	
7	4 (0)	4 (0)	0 (0)	0 (0)	4 (0)	0 (0)	4 (0)	
TCID <sub>50</sub>	>7	>7	<2	<2	>7	<2	>7	
TCID <sub>50</sub> moyen	7		2		N/A			
Réduction en Log <sub>10</sub>	5		-	-				

Nombre de puits présentant des effets cytopathiques, sur un maximum de 4. Les valeurs moyennes de 4 essais TCID<sub>50</sub> sont affichées, avec leurs écarts-types entre parenthèses.

## 3.2 Détection/amplification de l'ARN viral par RT-qPCR

Après avoir déterminé les paramètres optimaux pour l'utilisation du désinfectant Complete, la prochaine étape était la mise au point de la méthode ICC qRT-PCR. Pour ce faire, une méthode d'extraction de l'ARN de calicivirus félin devait tout d'abord être développée. Une fois cela accompli, l'optimisation de la réaction RT-qPCR pourrait avoir lieu.

### 3.2.1 *Extraction du matériel génétique viral des cellules épithéliales félines*

Les cellules CRFK ont été cultivées à confluence suffisante (80-90%), puis été incubées avec 100 µL de calicivirus félin (titre de  $10^7$ ) dans le but d'extraire l'ARN viral. Après extraction avec le kit de Qiagen, les concentrations d'ARN étaient minimales (aux alentours de 10 ng/µL). Plusieurs paramètres du protocole ont donc été modifiés afin d'optimiser les conditions expérimentales.

Afin d'augmenter la quantité de matériel nucléaire disponible, les plaques de 24 puits utilisées dans les tests de TCID<sub>50</sub> ont été changées pour des plaques de 6 puits. Le temps de contact entre les cellules et le virus avant l'ajout de milieu de culture a été allongé de 20 à 60 minutes afin d'augmenter le temps de contact et d'infection du virus avec les cellules cibles. De plus, la période d'incubation a été modifiée, passant de 4 à 6 heures. Cette modification a été effectuée pour laisser plus de temps au virus pour infecter des cellules, et ainsi répliquer son ARN. Finalement, le kit utilisé pour l'extraction a été changé pour le kit de qiagen (RNeasy), en remplacement du kit de l'entreprise BioLynx.

Un exemple de résultat obtenu lors d'une extraction du matériel génétique avec le kit RNeasy de Qiagen peut être visualisé au Tableau 14. Les 3 premiers échantillons ont été incubés avec VR-782, tandis que les 2 derniers échantillons (les contrôles) ne contiennent que des

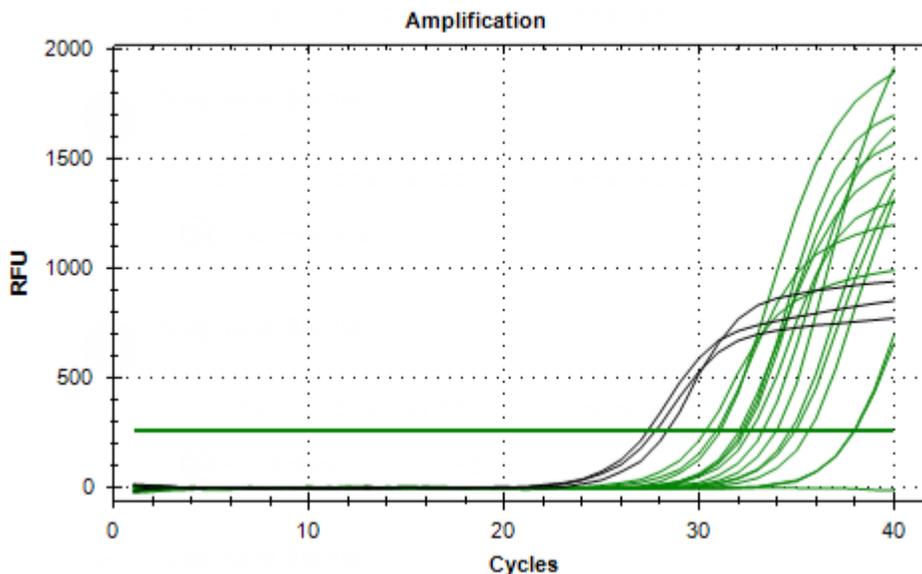
cellules CRFK ainsi que leur milieu de culture (milieu EMEM). Ces optimisations du protocole d'extraction ont donc permis d'obtenir suffisamment d'ARN viral pour pouvoir mettre au point la réaction de RT-qPCR.

**Tableau 14 : Concentrations et pureté des échantillons d'ARN extraits avec le kit de Qiagen, mesuré au Nanodrop**

Échantillon	Concentration (ng/μL)	Ratio 260/280
VR-782 1	184,9	2,04
VR-782 2	172,1	2,05
VR-782 3	163,7	2,03
Contrôle 1	140,1	2,00
Contrôle 2	165,4	2,05

### 3.2.2 RT-qPCR

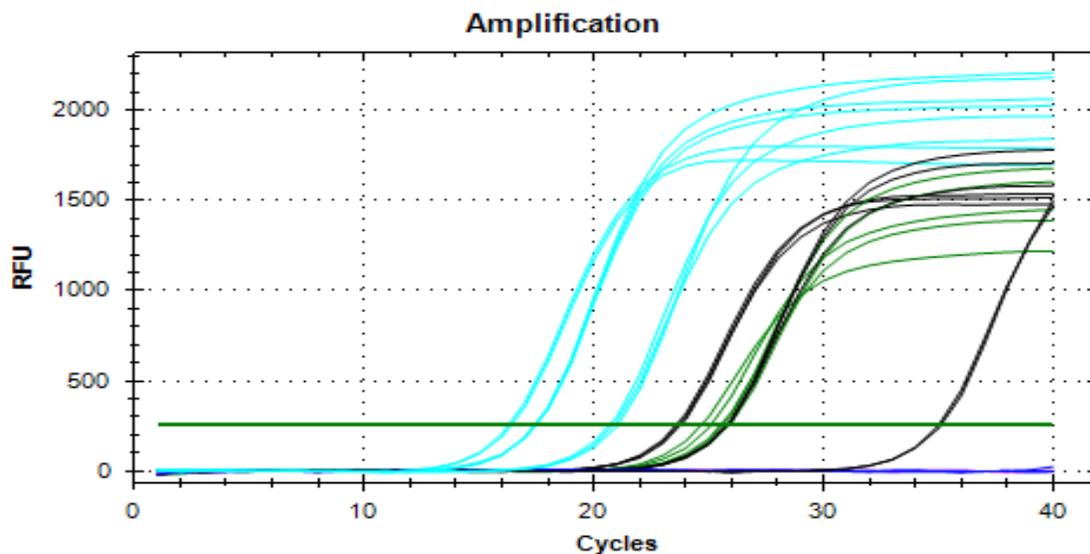
L'étape suivante consistait à amplifier de l'ARN viral par réaction RT-qPCR. Pour ce faire, des amorces ciblant la protéine VP1 du calicivirus félin ont été utilisées. En effet, l'amplification de VP1 signifie que le virus est en état actif de production de particules virales. Les premiers essais PCR ne contenaient pas de désinfectant; l'objectif était d'arriver à amplifier l'ARN viral. La Figure 4 montre les premiers résultats qPCR obtenus. Il est à noter que ces résultats ne contiennent pas de gènes de référence, étant donné que le seul but était de réussir à détecter la présence de VR-782 dans l'échantillon.



**Figure 4 : Amplification de la protéine virale VP1 obtenue au cours des premiers essais qPCR.** Les cellules CRFK ont été incubées avec 100  $\mu$ L de calicivirus félin ( $10^7$  TCID<sub>50</sub>) pendant 4 heures, puis l'ARN en a été extrait pour ensuite subir un processus de qRT-PCR pour détecter la présence de VP1.  
Lignes vertes : Amorce FCV. Lignes noires : Contrôle négatif

Les premières amplifications n'ont pas donné les résultats escomptés; le contrôle sans matrice a montré une amplification anormale. De plus, l'amplification de l'ARN viral n'était pas satisfaisante. En effet, les mesures de C<sub>q</sub> obtenues étaient relativement élevées en plus de contenir beaucoup de variation dans les triplicatas. Ainsi, certains changements ont été apportés au protocole. Les courbes de fusions obtenues après les essais PCR possédaient plusieurs pics (souvent plus que deux), soulevant la possibilité d'amplification non spécifique. Ainsi, la température d'hybridation a été augmentée légèrement, de 55 °C à 57°C. La concentration d'ADNc utilisée a également été augmentée de 50 ng à 100 ng puisque les mesures de C<sub>q</sub> obtenues étaient relativement élevées, aux alentours de 30 cycles et plus. Cette modification a été effectuée pour obtenir une valeur de C<sub>q</sub> plus basse dans le but d'écarter la

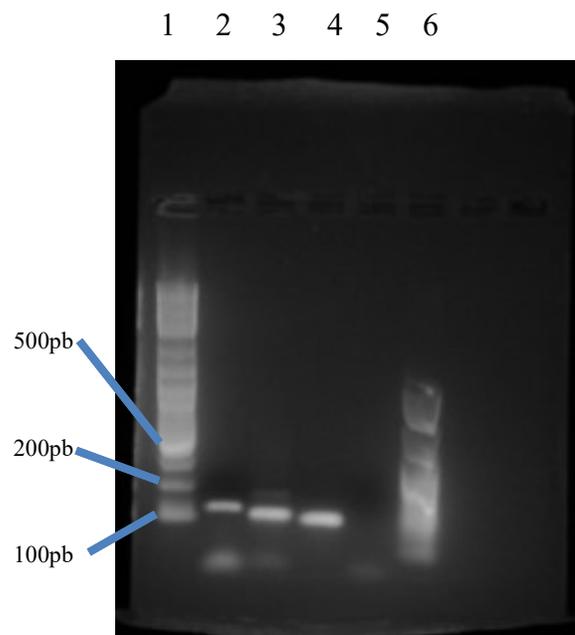
possibilité d'une amplification non spécifique et/ou une contamination. Aussi, les gènes de références ont été changés. Au départ, les gènes de références utilisées étaient PPIB (Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B) et SDHA-1 (Succinate dehydrogenase complex, subunit A), des gènes généralement utilisés lors de travaux sur des cellules immunitaires humaines (Paradis *et al.*, 2016). Cependant, les CRFK sont des cellules de foie, de provenance féline. D'autres gènes de références ont donc été choisis pour contrer l'irrégularité dans l'expression de PPIB et SDHA, soit HMBS et RPS7 (Penning *et al.* 2007). Les résultats PCR ont éventuellement montré qu'il était possible d'amplifier le matériel génétique de VR-782 avec les nouvelles conditions (Figure 5).



**Figure 5 : Amplification de la protéine virale VP1 par qPCR.** Les cellules CRFK ont été incubées avec 100µL de calicivirus félin ( $10^7$  TCID<sub>50</sub>) pendant 6 heures, puis l'ARN en a été extrait pour ensuite subir un processus de qRT-PCR pour détecter la présence de VP1.

Lignes vertes : Amorces FCV. Lignes Cyans : Amorces HMBS (gène de référence). Lignes Noires : Amorces RPS7 (gène de référence). Ligne Blue : Contrôle négatif (H<sub>2</sub>O).

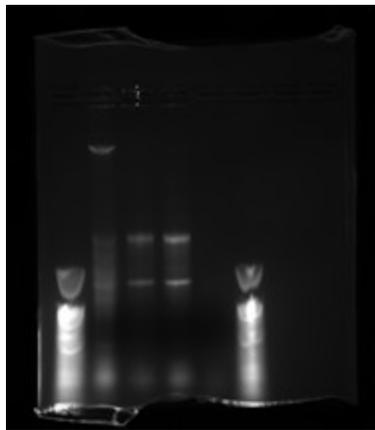
Afin de vérifier la pureté des amplicons, les échantillons ont été mis sur gel d'agarose 1% (Figure 6). Les puits 2, 3 et 4 représentent les résultats obtenus suite à l'amplification avec différentes amorces, soit FCV, HMBS et RPS7. Les tailles attendues de ces amplicons sont de 112 bp pour FCV, 92 pour HMBS et 81 pour RPS7. Les bandes les plus intenses aux alentours de 100 bp indiquent que les produits ont été et bien été amplifiés. L'échantillon dans le cinquième puits ne contenait pas d'ARN viral; l'absence d'amplification et de bande visible sur gel était donc un résultat attendu. Cependant, des bandes floues à faible poids moléculaire dans le deuxième et troisième puits révèlent la présence possible de dimères d'amorces.



**Figure 6 : Gel d'agarose montrant les produits qPCR obtenus lors de l'amplification de l'ARN du calicivirus félin.**

Gel d'agarose (1%), révélé avec l'agent intercalant GelRed. À partir de la droite; Lignes 1 et 6 : 100 bp DNA Ladder (NEB). Lignes 2 : Produits PCR, amorce FCV. Ligne 3 : Produits PCR, amorce HMBS. Ligne 4 : Produits PCR, amorce RPS7. Ligne 5 : Produits PCR, contrôle sans virus, amorce FCV. Chaque puits contient 20 ng de brin matrice.

Dans le but de développer la méthode ICC qRT-PCR, des essais ont été effectués en incorporant du désinfectant (100<sup>1</sup>µL de VR-782, titre de 10<sup>7</sup> TCID<sub>50</sub>) dans les plaques de 6 puits servant à cultiver les cellules. Cependant, l'addition de désinfectant aux échantillons a eu des effets inattendus. En effet, l'amplification par qPCR ne fonctionnait plus et les concentrations obtenues au NanoDrop après extraction étaient excessivement faibles, celles-ci étant de l'ordre 10-20 ng/µL. Considérant qu'il soit possible que le désinfectant soit demeuré dans les colonnes lors du protocole d'extraction pour ensuite être élué avec l'ARN, il a été décidé qu'une extraction d'ARN au phénol-chloroforme serait effectuée après l'incubation du calicivirus félin dans les cellules CRFK. L'ARN extrait fut porté sur gel d'agarose 1% pour en déterminer la qualité. (Figure 7).



**Figure 7 : Gel d'agarose de l'ARN extrait au phénol-chloroforme après incubation chez cellules CRFK.**

Gel d'agarose (1%), révéillé avec l'agent intercalant GelRed. À partir de la droite; Lignes 1 et 6 :100 bp DNA Ladder (NEB). Ligne 2 : VR-782, traité avec désinfectant Complete et neutralisant. Ligne 3 : VR-782 et neutralisant. Ligne 4 : VR-782. Ligne 5 : Cellules traitées avec désinfectant Complete. Les puits 2 à 5 contiennent 10 µL de l'ARN extrait.

Les concentrations/quantités de virus, de neutralisant et de désinfectant utilisées pour la préparation des extraits sont les mêmes que celles utilisées lors des tests de TCID<sub>50</sub>. La concentration de 9 000 ppm a également été retenue, de même que le temps de contact de 60 secondes.

Les résultats indiquent que les cellules incubées avec du virus puis traitées avec le désinfectant (ligne 2) et les cellules traitées avec le désinfectant (ligne 5) montrent des signes de contamination et/ou de médiocre qualité de l'ARN. En effet, la ligne 2 comporte une longue traînée dans laquelle il est difficile de distinguer les bandes représentant les ARN 16S et 28S. La ligne 5 ne montre presque rien, un résultat prévisible puisque lors de l'extraction, aucun culot n'était visible après centrifugation. Pour écarter la possibilité que le bouillon Dey-Engley soit responsable de la dégradation de l'ARN, un contrôle avec le calicivirus félin et du neutralisant (ligne 3) a été effectué. Bien qu'il semble y avoir dégradation de l'ARN dans ce puits, les ARN 16S et 28S y sont visibles, ce qui n'est pas le cas pour les puits contenant du désinfectant. Un autre contrôle ne comportant que le calicivirus félin incubé dans les cellules (ligne 4) montre un résultat très similaire au puits 3. Les résultats ainsi que les contrôles semblent indiquer que c'est l'ajout de désinfectant qui compromet la qualité de l'ARN extrait.

Les résultats obtenus montrent que la méthode développée permet d'extraire l'ARN viral du calicivirus félin après incubation chez des cellules CRFK. Celle-ci permet également la détection de cet ARN par réaction RT-qPCR. La détection de l'intermédiaire répliatif de VP1 indique aussi que le virus est en mode de production de protéines virales, une information qu'un protocole de TCID<sub>50</sub> ne permet pas d'obtenir. Cependant, l'ajout du désinfectant Complete aux échantillons semble dégrader l'ARN, mis en évidence par l'évaluation de la qualité de l'ARN par gel d'agarose.

## CHAPITRE 4

### DISCUSSION GÉNÉRALE

L'analyse de désinfectants est une étape critique du processus de mise au point de méthodes de préventions d'infections virales. Il n'existe à l'heure actuelle aucun traitement pour les patients souffrant d'une infection par le norovirus, rendant les méthodes de prévention encore plus importantes. Ainsi, la désinfection demeure la méthode de lutte la plus efficace en milieu hospitalier. Cependant, la validation de désinfectants par la méthode traditionnelle de mesure de TCID<sub>50</sub> peut s'avérer fastidieuse et lente, ce qui limite l'efficacité du processus. Des méthodes utilisant des techniques de biologie moléculaire ont été développées afin d'éviter les désavantages que comporte la méthode traditionnelle. L'une de ces méthodes, nommée ICC qRT-PCR, se propose d'utiliser l'incubation d'échantillon viral à l'intérieur de cellules hôtes pour produire de l'ARN/ADN viral qui sera ensuite détectable par RT-qPCR. L'élaboration d'un protocole ICC qRT-PCR pour l'analyse de désinfectants virucides envers le norovirus était le but de ce projet.

Le premier objectif de cette étude était d'optimiser les conditions d'applications de certains désinfectants en développement. La méthode de détection traditionnelle par observation d'effets cytopathiques est une méthode encore utilisée aujourd'hui pour certains virus (Kim *et al*, 2019). En effet, la méthode d'évaluation de TCID<sub>50</sub> est utilisée pour la comparaison avec d'autres méthodes (Sikawze *et al*, 2020), ou encore pour tester l'efficacité de désinfectants contre certains virus (Jaemwimol *et al*, 2019). La capacité du calicivirus félin à causer des effets cytopathiques visibles chez les cellules hôtes a donc été utilisée pour mettre au point un protocole permettant de déterminer l'efficacité des désinfectants. Les essais de TCID<sub>50</sub> avec le désinfectant PNA WW ont montré que ce dernier est conforme aux normes fixées par la « Canadian General Standards Board », c'est-à-dire qu'il permettait

d'obtenir une réduction de plus de quatre  $\log_{10}$ , soit une réduction de plus de 99,99% du titre viral initial. En effet, le logarithme de réduction du titre viral obtenu lorsqu'il est appliqué sur une surface pendant 1 minute à une concentration de 750 ppm est de 4,8 pour le PNA WW (Figure 4). Les essais se sont ensuite dirigés vers le désinfectant « Complete ». Pour ce produit, plusieurs concentrations et temps de contact ont été mis à l'essai. Pour ce désinfectant, le temps d'exposition idéal pour la commercialisation est de 30 secondes. Les tests avec le Complete 6000, 7000 et 8000 n'ont pas permis de réduire de façon hautement significative la charge virale présente dans les cellules CRFK. Cependant, les essais à 9000 ppm (Tableau 12) montrent que cette concentration du désinfectant Complete se conforme aux normes fixées par la « Canadian General Standards Board » lorsqu'appliqué pendant 30 secondes. Il est à noter que les contrôles ont tous donné les résultats attendus. Le contrôle du virus présentait des effets cytopathiques dans chaque puits, indiquant ainsi une infection des cellules par le virus. Le contrôle de cytotoxicité ne montrait pas d'effets cytopathiques, un résultat attendu puisqu'il ne contient pas de virus. Ce contrôle nous indique aussi que le neutralisant utilisé n'a pas d'effets visibles sur nos cellules, évitant ainsi de faux positifs. Le troisième contrôle (contrôle du neutralisant) montre que le bouillon Dey-Engley n'a pas d'effets sur l'observation d'effets cytopathiques; ceux-ci sont visibles dans tous les puits. Le contrôle de population initiale a également donné le résultat escompté. Finalement, les cellules dans le contrôle de culture cellulaire ne présentaient pas de caractéristiques visibles anormales.

Bien que la méthode développée ait permis d'obtenir un nombre suffisant de résultats, certains paramètres du protocole auraient pu être altérés pour améliorer la précision des données obtenues lors de ces essais. Le spectre des dilutions utilisées aurait pu être agrandi. En effet, étant donné que le facteur de dilution varie entre  $10^2$  et  $10^7$ , il est impossible d'obtenir un logarithme de réduction plus grand que 5 (7-2). Les limites du test ne permettent pas d'apprécier l'efficacité de concentrations et/ou temps d'exposition différents. Ces mêmes limites rendent le calcul du titre viral exact impossible puisque chaque échantillon qui montre des effets cytopathiques dans tous les puits se voit attribuer le même titre. Cette limitation

se fait donc sentir lors du calcul du logarithme de réduction; il est possible que des concentrations efficaces aient été exclues par le fait que le test ne permettait pas d'évaluer le titre exact d'un échantillon. Cette limitation est cependant présente dans d'autres études, où les auteurs se contentent d'un logarithme de réduction de 5, cette valeur étant assez élevée pour garantir une désinfection efficace (Jaemwimol *et al*, 2019). Le nombre de puits pour chaque dilution pourrait aussi être changé afin d'obtenir une plus grande précision dans les résultats. L'addition d'un ou plusieurs puits pour chaque dilution permettrait de situer avec plus de précision la concentration virale requise pour infecter 50% de la population cellulaire. En effet, certaines études utilisent plus de quatre échantillons par dilution pour calculer les valeurs de TCID<sub>50</sub> (Petit *et al*, 2017).

Le second objectif était le développement de la méthode ICC qRT-PCR pour la détection du calicivirus félin. Nous avons démontré qu'il est possible d'amplifier du matériel génétique extrait de cellules en cultures infectées par un virus. La méthode ICC qRT-PCR a permis de détecter la présence d'ARN viral dans un échantillon de cellules préalablement infectées par VR-782. En effet, la cible de l'amorce utilisée, VP1, est une région bien conservée dans le génome de VR-782. La mise sur gel a également confirmé que le bon fragment a été amplifié (la taille attendue de l'amplicon est de 112 bp), bien qu'une bande présente vers le bas du gel révèle la possibilité d'amplification non spécifique. La détection du calicivirus félin ainsi que d'autres virus par qRT-PCR est une méthode bien documentée dans la littérature (Balkin *et al*, 2015; Sykes *et al*, 2001; Ryu *et al*, 2015; Fong *et al*, 2005). En effet, des essais pour différents types de virus ont été développés pour faciliter la détection de virus dans divers échantillons.

La méthode ICC qRT-PCR possède un nombre d'avantages sur l'essai de TCID<sub>50</sub> traditionnel. Le temps d'attente entre l'infection et la prise de résultats est d'environ 10 heures si on prend en compte les différents temps d'attente et manipulations impliquées (incubation, extraction du matériel génétique, qRT-PCR). De plus, elle permet de contourner

une des faiblesses de la méthode de TCID<sub>50</sub>, c'est-à-dire le biais apporté par l'observateur. Il n'est pas toujours simple d'identifier les effets cytopathiques causés par un virus puisque certains virus ne provoquent pas d'effets cytopathiques visibles, rendant le TCID<sub>50</sub> inutilisable (Fong *et al*, 2005). La méthode permet aussi de confirmer la présence d'un virus dans un échantillon inconnu, même en présence d'autres virus. La détection par qRT-PCR permet d'isoler une souche virale dans un échantillon pouvant en contenir plusieurs. En effet, il est impossible de distinguer un type de virus précis à partir d'un échantillon provenant de l'environnement (comme des plans d'eau), puisqu'il est possible que de multiples virus produisent des effets cytopathiques chez la population de cellules hôtes. Une fois les souches virales isolées, on peut utiliser la culture en cellules permissives pour en analyser la concentration dans l'échantillon (Girardi *et al*, 2018). Finalement, avec une amorce ciblant un intermédiaire répliatif, la méthode ICC qRT-PCR permet de confirmer que le virus cible est bel et bien en phase répliatif, une propriété qui a déjà été exploitée dans d'autres études (Jiang *et al*, 2004). Cette information est importante lors de la formulation d'un diagnostic chez un patient.

Le troisième et dernier objectif visait à comparer la méthode développée à celle de mesure du TCID<sub>50</sub>. Cependant, l'ajout du désinfectant Complete aux cellules a donné des résultats inutilisables lors des réactions de RT-qPCR. Les réactions précédentes montraient qu'il était bel et bien possible d'extraire l'ARN viral et de l'amplifier par PCR, un résultat qui n'a pas pu être répliatif après l'ajout de désinfectant Complete aux échantillons. Étant donné les faibles concentrations obtenues au NanoDrop lors de l'extraction avec le kit de Qiagen, des extractions au phénol/chloroforme ont été effectuées pour essayer de contourner le problème. Cependant, lors de l'extraction, les puits contenant des échantillons qui avaient été exposés au désinfectant Complete ne formaient pas de culot visible, une anomalie dans ce type d'extraction. Plusieurs études utilisent des méthodes d'extraction similaires (extraction sur colonne de silice) à celle utilisée dans ces travaux (Ryu *et al*, 2018; Bortagaray *et al*, 2019; Qiu *et al*, 2018). Cependant, plusieurs de ces études ne portent pas sur l'inactivation virale, une différence importante. Les quelques études portant sur la désinfection utilisent souvent

d'autres méthodes, comme l'exposition aux rayons ultraviolets (Qiu *et al*, 2018; Ryu *et al*, 2018). Le traitement différent pourrait expliquer l'absence de problèmes rencontrés à l'étape d'extraction.

Plusieurs protocoles RT-qPCR retrouvés dans la littérature n'utilisent pas d'agents intercalant (comme le *SYBR Green*), mais optent plutôt pour l'hydrolyse de sondes (*Taqman assay*). Étant donné que la sonde ne s'hybride qu'à un brin spécifique d'ADN, cette façon de faire permet de garantir que le brin cible a été et bien été amplifié. Cette méthode de détection pourrait donc être préférable dans un contexte d'amplification d'ARN viral (Alidjinou *et al*, 2017; Sedji *et al*, 2018; Schijven *et al*, 2019).

Lorsque l'ARN extrait a été mis sur gel d'agarose, des trainées étaient présentes, mais ce type de trainée n'est pas anormal dans ce contexte; les ARN extraits peuvent avoir des tailles qui varient beaucoup. Notamment, des bandes pouvant être interprétées comme étant les ARN 16S et 28S pouvaient être observées (il est difficile de confirmer avec certitude que les bandes plus fortes correspondent sans doute possibles aux ARN 16S et 28S, car l'échelle utilisée n'était pas conçue pour la concentration d'agarose utilisée). Cependant, les échantillons contenant le désinfectant Complete ne montrent pas de bandes qui pourraient être associées aux ARN 16S et 28S. Ce résultat pourrait laisser supposer que l'ARN présent a été dégradé par le désinfectant, ce qui expliquerait les difficultés rencontrées. Bien que cet essai particulier n'ait pas fonctionné, des travaux similaires ont connu plus de succès lors de l'utilisation de la méthode ICC qRT-PCR pour la validation de désinfectants, notamment avec l'adénovirus (Ryu *et al*, 2015; Ding *et al*, 2017). Ainsi, les résultats obtenus ne reflètent pas ce que l'on peut retrouver dans la littérature. Cependant, ces articles utilisent le rayonnement ultraviolet dans le but de réduire le titre viral présent dans les échantillons testés. Il est donc impossible de comparer directement les résultats obtenus puisque la méthode de désinfection est différente.

Il est possible qu'une composante présente dans le désinfectant interagisse soit avec l'ARN extrait, soit avec des réactifs présents dans les multiples manipulations nécessaires pour obtenir un résultat par PCR, que ce soit à l'extraction du matériel génétique ou à l'étape de transcription inverse. En effet, une étude sur les effets de plusieurs désinfectants sur la détection du virus de l'influenza aviaire a montré que les désinfectants à base de chlore et de peroxyde pouvaient endommager l'ARN viral au point où il n'était plus détectable par PCR (Suarez *et al*, 2003). Cela peut être expliqué par le fait que les désinfectants halogénés sont des produits oxydants, et que ceux-ci peuvent affecter les protéines, lipides et acides nucléiques (Dychdala *et al*, 2001). Ainsi, bien que le désinfectant Complete soit capable d'inactiver le calicivirus félin, il est possible qu'il en empêche également la détection par ICC qRT-PCR.

## **CHAPITRE 5**

### **CONCLUSION GÉNÉRALE**

Dans un premier temps, cette étude a permis de confirmer les propriétés virucides de deux produits, soit le PNA et le « Complete ». Grâce au protocole développé, les conditions d'utilisation de ceux-ci ont pu être optimisées pour qu'ils soient le plus attrayants possible pour la commercialisation, tout en respectant les directives établies par la Canadian General Standards Board. Dans un deuxième temps, l'ARN de VR-782 a été amplifié avec succès par ICC qRT-PCR. En effet, la présence du virus a pu être confirmée dans une population de cellules CRFK préalablement incubées pendant six heures. Cependant, l'évaluation de l'efficacité du désinfectant Complete par essais PCR n'a pas été possible, l'addition du produit ayant un effet sur les résultats obtenus par PCR. Il serait intéressant de développer un protocole ICC qRT-PCR pour un virus qui n'en possède présentement aucun, car la méthode peut être utile dans l'avancement des recherches et/ou dans la détection de virus dans un échantillon. D'autres méthodes moléculaires pourraient être utilisées pour tenter d'évaluer le titre viral d'un échantillon, comme la cytométrie en flux ou encore un protocole ELISA. Bien que les résultats obtenus lors de cette étude ne permettent pas de conclure qu'il serait possible d'appliquer la méthode ICC qRT-PCR dans un contexte d'analyse de désinfectants à base d'hypochlorite de sodium, il est possible que d'autres types de désinfectants (comme des alcools) n'interfèrent pas avec les données PCR. La méthode utilisée dans cette étude pourrait aussi être utilisée dans la validation de différents moyens d'inactivation de virus, comme le rayonnement UV ou l'acidification. Ainsi, plus d'études sur l'applicabilité de la méthode ICC qRT-PCR dans l'analyse de l'efficacité de désinfectants seraient nécessaires pour en juger l'utilité.

## BIBLIOGRAPHIE

Alidjinou, E. K., Sane, F., Lefevre, C., Baras, A., Moumna, I., Engelmann, I., Vantghem, M-C., Hober, D. (2017) Enteroviruses in blood of patients with type 1 diabetes detected by integrated cell culture and reverse transcription quantitative real-time PCR. *Acta Diabetol*, 54(11), 1025-1029

Alonso C. , Oviedo J.M. , Martín-Alonso J.M. , Díaz E. , Boga J. A., Parra F. (1998). Programmed cell death in the pathogenesis of rabbit hemorrhagic disease. *Arch Virol* 143; 321-332.

Baron RC, Greenberg HB, Cukor G, Blacklow NR. Serological responses among teenagers after natural exposure to Norwalk virus. *J Infect Dis*. 1984;150:531–534.

Bates R. C., Schaffer P. T. B., Sutherland S. M.(1977) Development of poliovirus having increased resistance to chlorine inactivation. *Appl. Environ. Microbiol*. 3:849–853.

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

Belov G. A. , van Kuppeveld F. J. M. . ( 2012; ). (+)RNA viruses rewire cellular pathways to build replication organelles. . *Curr Opin Virol* 2:, 740—747.

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

Blacklow NR, Dolin R, Fedson DS, Dupont H, Northrup RS, Hornick RB, Chanock RM. Acute infectious nonbacterial gastroenteritis: etiology and pathogenesis. *Ann Intern Med*. 1972;76:993–1008.

Bok K. , Prikhodko V. G. , Green K. Y. , Sosnovtsev S. V. . ( 2009; ). Apoptosis in murine norovirus-infected RAW264.7 cells is associated with downregulation of survivin. . J Virol 83:, 3647—3656.

Bortagaray, V., Lizasoain,A., Piccini, C., Gillman, L., Berois, M., Pou, S., Diaz, MDP., Tort, FL., Colina, R., Victoria,M.(2019) Microbial Source Tracking Analysis Using Viral Indicators in Santa Lucia and Uruguay Rivers, Uruguay. Food and Environment Virology, Sep; 11(3), 259-267.

Chachu KA, LoBue AD, Strong DW, Baric RS, Virgin HW.(2008) Immune Mechanisms Responsible for Vaccination against and Clearance of Mucosal and Lymphatic Norovirus Infection. PLoS Pathog. 2008;4:e1000236.

Chambon M., Bailly J.-L., Peigue-Lafeuille H.(1992) Activity of gluteraldehyde at low concentrations against capsid proteins of poliovirus type 1 and echovirus type 25. Appl. Environ. Microbiol. 58:3517–3521.

Chang K.-O. . ( 2009; ). Role of cholesterol pathways in norovirus replication. . J Virol 83:, 8587—8595.

Chaudhry Y. , Nayak A. , Bordeleau M.E. , Tanaka J. , Pelletier J. , Belsham G.J. , Roberts L. O. , Goodfellow I. G. . ( 2006; ). Caliciviruses differ in their functional requirements for eIF4F components. . J Biol Chem 281:, 25315—25325.

Dancer SJ. 2014. Controlling hospital-acquired infection: focus on the role of the environment and new technologies for decontamination. Clin Microbiol Rev. 27(4):665-690.

Ding, N., Craik, S. A., Pang, X., Lee, B., & Neumann, N. F. (2017). Assessing UV Inactivation of Adenovirus 41 Using Integrated Cell Culture Real-Time qPCR/RT-qPCR. Water Environment Research, 89(4), 323–329.

Dolin R, Levy AG, Wyatt RG, Thornhill TS, Gardner JD. Viral gastroenteritis induced by the Hawaii agent. Jejunal histopathology and serologic response. *Am J Med.* 1975;59:761–768.

Donaldson E. F. , Lindesmith L. C. , Lobue A. D. , Baric R. S. . (2008;). Norovirus pathogenesis: mechanisms of persistence and immune evasion in human populations. . *Immunol Rev* 225:, 190—211.

D.Souza D.H., Sair A., Williams K., Papafragkou E, Jean J., Moore C., Jaykus L. ,2016. Persistence of caliciviruses on environmental surfaces and their transfer to food, *Int J Food Microbiol.*; 108 (1) 84-91

Dychdala, G.R. Chlorine and chlorine compounds. (2001) In: *Disinfection, sterilization, and preservations*, S. S. Block, ed. Williams and Wilkins, Philadelphia, PA. pp 135-157

Estes MK, Prasad BV, Atmar RL. Noroviruses everywhere: has something changed. *Curr Opin Infect Dis.* 2006;19:467–474.

Fong, T.-T., & Lipp, E. K. (2005). Enteric Viruses of Humans and Animals in Aquatic Environments: Health Risks, Detection, and Potential Water Quality Assessment Tools. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 69(2): 357–371.

Floyd R. D., Sharp G., Johnson J. D. (1979) Inactivation by chlorine of single poliovirus particles in water. *Environ. Sci. Technol.* 13:438–442.

Girardi, V., Mena, K. D., Albino, S. M., Demoliner, M., Gularte, J. S., de Souza, F., Riggoto, C., Quevedo, D.M., Schneider, V.E., Paesi, S.O., Tarwater, P.M., Spilki, F.R. (2018) Microbial risk assessment in recreational freshwaters from southern Brazil. *Science of the Total Environment*, 651: 298-308

Goodfellow I. , Chaudhry Y. , Gioldasi I. , Gerondopoulos A. , Natoni A. , Labrie L. , Laliberté J.-F. , Roberts L. . ( 2005; ). Calicivirus translation initiation requires an interaction between VPg and eIF4E. . *EMBO Rep* 6:, 968—972.

Green KY, Ando T, Balayan MS, Berke T, Clarke IN, Estes MK, Matson DO, Nakata S, Neill JD, Studdert MJ, Thiel HJ. 2000. Taxonomy of the caliciviruses. *J Infect Dis.* 181 Suppl 2:S322-30.

Green KY. *Fields Virology*. Lippincott Williams and Wilkins; Philadelphia, PA, USA: 2007. Caliciviridae: The Noroviruses; pp. 949—979.

Gutiérrez-Escolano A. L., Brito Z. U., del Angel R. M., Jiang X. 2000 Interaction of cellular proteins with the 5' end of Norwalk virus genomic RNA. *J Virol* 74: 8558-8562.

Gutiérrez-Escolano A.L. , Vázquez-Ochoa M. , Escobar-Herrera J. , Hernández-Acosta J. . ( 2003; ). La, PTB, and PAB proteins bind to the 3' untranslated region of Norwalk virus genomic RNA. . *Biochem Biophys Res Commun* 311:, 759—766.

Health Canada. Guidance document - Safety and efficacy requirements for hard surface disinfectant drugs. January 2014. Section 2.1.3.2.

Herbert T. P., Brierley I. , Brown T. D. . 1997. Identification of a protein linked to the genomic and subgenomic mRNAs of feline calicivirus and its role in translation. . *J Gen Virol* 78:, 1033–1040

Högbom M. , Jäger K. , Robel I. , Unge T. , Rohayem J. . ( 2009; ). The active form of the norovirus RNA-dependent RNA polymerase is a homodimer with cooperative activity. . *J Gen Virol* 90:, 281—291.

Hyde J. L. , Mackenzie J. M. . ( 2010; ). Subcellular localization of the MNV-1 ORF1 proteins and their potential roles in the formation of the MNV-1 replication complex. . *Virology* 406:, 138—148.

Iturriza-Gómara M1, Lopman B. 2014. Norovirus in healthcare settings. *Curr Opin Infect Dis.* 27(5): 437-443.

Jaemwimol, P., Sirikanchana, K., Tattiyapong, P., Mongkolsuk, S., & Surachetpong, W. (2019). Virucidal effects of common disinfectants against tilapia lake virus. *Journal of Fish Diseases.*

Jiang, Y.-J., Liao, G.-Y., Zhao, W., Sun, M.-B., Qian, Y., Bian, C.-X., & Jiang, S.-D. (2004). Detection of infectious hepatitis A virus by integrated cell culture/strand-specific reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Journal of Applied Microbiology*, 97(5), 1105–1112.

Johnson PC, Mathewson JJ, DuPont HL, Greenberg HB. Multiple-challenge study of host susceptibility to Norwalk gastroenteritis in US adults. *J Infect Dis.* 1990;161:18–21.

Jones MK, Grau KR, Costantini V, Kolawole AO, de Graaf M, Freiden P, Graves CL, Koopmans M, Wallet SM, Tibbetts SA, Schultz-Cherry S, Wobus CE, Vinje J, Karst SM. Human norovirus culture in B cells. *Nat Protoc.* 2015;10:1939–1947.

Kim, H. J., Kwon, S. R., & Yuasa, K. (2019). Establishing the optimal fetal bovine serum concentration to support replication of cyprinid herpesvirus 3 in CCB and KF-1 cell lines. *Journal of Virological Methods*, 113733.

Karst S. M., Wobus C. E., Lay M., Davidson J., Virgin H. W. IV .2003. STAT1-dependent innate immunity to a Norwalk-like virus. . *Science* 299:, 1575-1578.

Karst SM, Wobus CE. A working model of how noroviruses infect the intestine. *PLoS Pathog.* 2015;11:e1004626.

Keswick B. H., Satterwhite T. K., Johnson P. C., DuPont H. L., Secor S. L., Bitsura J. A., Gary G. W., Hoff J. C. (1985) Inactivation of Norwalk virus in drinking water by chlorine. *Appl. Environ. Microbiol.* 50:261–264.

Klein M., Deforest A. (1983) Principles of viral inactivation. Disinfection, sterilization and preservation, ed Block S. S. (Lea & Febiger, Philadelphia, Pa), 3rd ed. pp 422–434.

Kuyumcu-Martinez M. , Belliot G. , Sosnovtsev S.V., Chang K.-O., Green K.Y., Lloyd R.E. (2004). Calicivirus 3C-like proteinase inhibits cellular translation by cleavage of poly(A)-binding protein. *J Virol.* 78 (15): 8172-82.

Leen E. N. , Baeza G. , Curry S. . ( 2012; ). Structure of a murine norovirus NS6 protease-product complex revealed by adventitious crystallisation. . *PLoS ONE* 7:, e38723.

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

Lindesmith L, Moe C, LePendu J, Frelinger JA, Treanor J, Baric RS. Cellular and Humoral Immunity following Snow Mountain Virus Challenge. *J Virol.* 2005;79:2900–2909.

Maillard J.-Y., Russell A. D. (1997) Viricidal activity and mechanisms of action of biocides. *Sci. Progr.* 80:287–315.

Maillard, J.-Y. 1998. Mechanisms of viricidal action. In A. D. Russell, W. B. Hugo, and G. A. J. Ayliffe (ed.), *Principles and practice of disinfection, preservation and sterilization*, 3rd ed., du journal. Blackwell Science, Oxford, England.

Olivieri V. P., Kruse C. W., Hsu Y. C., Griffiths A. C., Kawata K.(1975) The comparative mode of action of chlorine, bromine, and iodine of f2 bacterial virus. in *Disinfection-water and wastewater.* ed Johnson J. D. (Ann Arbor Science, Ann Arbor, Mich), pp 145–162.

Park GW, Barclay L, Macinga D, Charbonneau D, Pettigrew CA, Vinjé J. 2010. Comparative efficacy of seven hand sanitizers against murine norovirus, feline calicivirus, and GII.4 norovirus. *J Food Prot* 73:2232–2238. doi:10.4315/0362-028X-73.12.2232.

Petit, B. M., Almeida, F. C., Uchiyama, T. R., Lopes, F. O. C., Tino, K. H., & Chewins, J. (2017). Evaluating the efficacy of hydrogen peroxide vapour against foot-and-mouth disease virus within a BSL4 biosafety facility. *Letters in Applied Microbiology*, 65(4), 281–284.

Penning LC., Vrieling HE., Brinkhog B., Riemers FM., Rothuizen J., Rutteman GR., Hazewinkel HA. (2007) A validation of 10 feline reference genes for gene expression measurements in snap-frozen tissues. *Vet Immunol Immunopathol.* 120 (3-4):212-22.

Prasad B. V. , Rothnagel R. , Jiang X. , Estes M. K. . ( 1994; ). Three-dimensional structure of baculovirus-expressed Norwalk virus capsids. . *J Virol* 68:, 5117—5125.

Publications du ministère de la Santé et des Services sociaux. 2010. Les infections nosocomiales - Plan d'action sur la prévention et le contrôle des infections nosocomiales

Qiu, Y., Li, Q., Lee, B. E., Ruecker, N. J., Neumann, N. F., Ashbolt, N. J., & Pang, X. (2018). UV inactivation of human infectious viruses at two full-scale wastewater treatment plants in Canada. *Water Research*, 147, 73–81.

Radford AD, Turner PC, Bennett M, McArdle F, Dawson S, Glenn MA, Williams RA, Gaskell RM. Quasispecies evolution of a hypervariable region of the feline calicivirus capsid gene in cell culture and in persistently infected cats. *J Gen Virol.* 1998;79:1–10.

Radford AD, Dawson S, Coyne KP, Porter CJ, Gaskell RM. The challenge for the next generation of feline calicivirus vaccines. *Vet Microbiol.* 2006;117:14–18.

Reed L.J, Muench H., A simple method of estimating fifty per cent endpoints, *American Journal of Epidemiology.* 1938; Vol 27 (3); 493-497

Ryu, H., Cashdollar, J. L., Fout, G. S., Schrantz, K. A., & Hayes, S. (2015). Applicability of integrated cell culture quantitative PCR (ICC-qPCR) for the detection of infectious adenovirus type 2 in UV disinfection studies. *Journal of Environmental Science and Health.* 2015; 50(8); 777-87

Ryu, H., Schrantz, K. A., Brinkman, N. E., & Boczek, L. A. (2018). Applicability of integrated cell culture reverse transcriptase quantitative PCR (ICC-RTqPCR) for the simultaneous detection of the four human enteric enterovirus species in disinfection studies. *Journal of Virological Methods*, 258, 35–40.

Schijven, J., Teunis, P., Suylen, T., Ketelaars, H., Hornstra, L., & Rutjes, S. (2019). QMRA of adenovirus in drinking water at a drinking water treatment plant using UV and chlorine dioxide disinfection. *Water Research* 158, 34-45

Schreiber DS, Blacklow NR, Trier JS. The mucosal lesion of the proximal small intestine in acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *N Engl J Med*. 1973;288:1318–1323.

Sedji, M. I., Varbanov, M., Meo, M., Colin, M., Mathieu, L., & Bertrand, I. (2018). Quantification of human adenovirus and norovirus in river water in the north-east of France. *Environmental Science and Pollution Research*. Oct;25 (30), 30497-30507

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

Sharp T.M. , Crawford S.E. , Ajami N.J. , Neill F.H. , Atmar R.L. , Katayama K. , Utama B., Estes M. K. . ( 2012; ). Secretory pathway antagonism by calicivirus homologues of Norwalk virus nonstructural protein p22 is restricted to noroviruses. . *Virology* 9:, 181.

Sikazwe, C. T., Levy, A., Speers, D., & Smith, D. W. (2020). An efficient, reproducible and accurate RT-qPCR based method to determine mumps specific neutralizing antibody. *Journal of Virological Methods*, 277, 113817.

Simmonds P. , Karakasiliotis I. , Bailey D. , Chaudhry Y. , Evans D.J. , Goodfellow I.G. ( 2008; ). Bioinformatic and functional analysis of RNA secondary structure elements among different genera of human and animal caliciviruses. . *Nucleic Acids Res* 36:, 2530—2546.

Someya Y. , Takeda N. , Miyamura T. . ( 2002; ). Identification of active-site amino acid residues in the Chiba virus 3C-like protease. . J Virol 76:, 5949—5958.

Sosnovtsev S.V. , Prikhod'ko E. A. , Belliot G. , Cohen J. I. , Green K. Y. . ( 2003; ). Feline calicivirus replication induces apoptosis in cultured cells. . Virus Res 94:, 1—10.

Sosnovtsev S. V., Belliot G., Chang K.-O. , Prikhodko V. G., Thackray L. B. , Wobus C. E., Karst S. M., Virgin H. W., Green K. Y. 2006. Cleavage map and proteolytic processing of the murine norovirus nonstructural polyprotein in infected cells. J Virol 80:, 7816–7831.

Subba-Reddy C. V. , Goodfellow I. , Kao C. C. . ( 2011). VPg-primed RNA synthesis of norovirus RNA-dependent RNA polymerases by using a novel cell-based assay. J Virol 85:, 13027—13037.

D. L. Suarez, E. Spackman, D. A. Senne, L. Bulaga, A. C. Welsch, K. Froberg (2003). The Effect of Various Disinfectants on Detection of Avian Influenza Virus by Real Time RT-PCR.

Sykes, J. E., Allen, J. L., Studdert, V. P., & Browning, G. F. (2001). Detection of feline calicivirus, feline herpesvirus 1 and Chlamydia psittaci mucosal swabs by multiplex RT-PCR/PCR. Veterinary Microbiology, 81(2), 95–108.

Thorne L. , Bailey D. , Goodfellow I. . ( 2012; ). High-resolution functional profiling of the norovirus genome. . J Virol 86:, 11441—11456.

Thorne L., Goodfellow I. 2014. Norovirus gene expression and replication. J Virol 95; 278-291.

Troeger H, Loddenkemper C, Schneider T, Schreier E, Epple H, Zeitz M, Fromm M, Schulzke J. Structural and functional changes of the duodenum in human norovirus infection. Gut. 2009;58:1070–1077.

Vashist S. , Ureña L. , Chaudhry Y. , Goodfellow I. . ( 2012; ). Identification of RNA–protein interaction networks involved in the norovirus life cycle. . J Virol 86:, 11977—11990.

Vongpunsawad S. , Venkataram Prasad B. V. , Estes M. K. . ( 2013; ). Norwalk virus minor capsid protein VP2 associates within the VP1 shell domain. . J Virol 87:, 4818—4825.

Wells S. E. , Hillner P. E. , Vale R. D. , Sachs A. B. . ( 1998; ). Circularization of mRNA by eukaryotic translation initiation factors. . Mol Cell 2:, 135—140.

Willcocks M. M. , Carter M. J. , Roberts L. O. . ( 2004; ). Cleavage of eukaryotic initiation factor eIF4G and inhibition of host-cell protein synthesis during feline calicivirus infection. . J Gen Virol 85:, 1125—1130.

Wobus CE, Karst SM, Thackray LB, Chang K-O, Sosnovtsev SV, Belliot G, Krug A, Mackenzie JM, Green KY, Virgin HW. Replication of norovirus in cell culture reveals a tropism for dendritic cells and macrophages. PLoS Biol. 2004;2:e432.

Wu Z. C., Jiang X. J. (1990) The effects of chlorine disinfection on the resistance of bacteriophage f2 in water. Chung Hua Yu Fang I Hsueh Tsa Chih 24:196–198.

Zeitler C. E. , Estes M. K. , Venkataram Prasad B. V. . ( 2006; ). X-ray crystallographic structure of the Norwalk virus protease at 1.5-Å resolution. . J Virol 80:, 5050—5058.

Zelnik V, Harlin O, Fehler F *et al.* An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of Marek’s disease virus-specific antibodies and its application in an experimental vaccine trial. J Vet Med B 2004;51:61–67.

