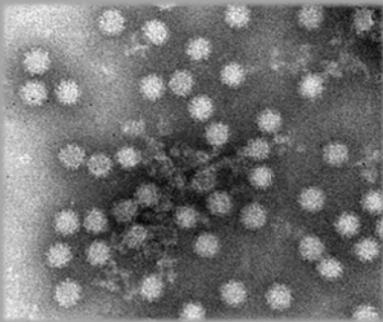
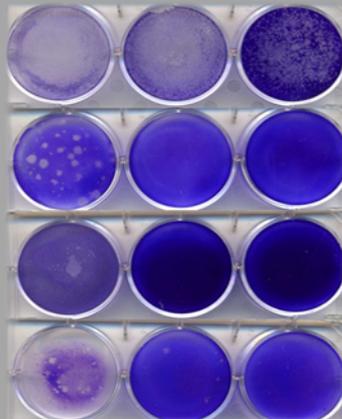


Étude des effets virucides de désinfectants sur le norovirus murin et le calicivirus félin, virus substitués du norovirus humain



Study of virucidal effects of disinfectants
against murine norovirus and feline
calicivirus, surrogates of human norovirus



William ZONTA

Thèse présentée en vue de l'obtention du grade
de Docteur en Sciences Vétérinaires

Année académique 2015-2016



**ACADEMIE UNIVERSITAIRE WALLONIE-EUROPE
UNIVERSITE DE LIEGE
FACULTE DE MEDECINE VETERINAIRE
DEPARTEMENT DES MALADIES INFECTIEUSES et PARASITAIRES
SERVICE DE VIROLOGIE VETERINAIRE et MALADIES VIRALES ANIMALES**

**Étude des effets virucides de désinfectants sur le norovirus murin et le
calicivirus félin, virus substitués du norovirus humain**

**Study of virucidal effects of disinfectants against murine norovirus and
feline calicivirus, surrogates of human norovirus**

William ZONTA

**THESE PRESENTEE EN VUE DE L'OBTENTION DU GRADE DE
Docteur en Sciences Vétérinaires**

ANNEE ACADEMIQUE 2015-2016

Illustrations en couverture:

Pseudo-particule de norovirus GII.10 en cryo-microscopie électronique, avec le domaine S en jaune/vert et le domaine P en violet/bleu. Réf. : Hansman, G. S., Taylor, D. W., McLellan, J. S., Smith, T. J., Georgiev, I., Tame, J. R., Park, S-Y., Yamazaki, M., Gondaira, F., Miki, M., Katayama, K., Murata, K., & Kwong, P. D. (2012). Structural basis for broad detection of genogroup II noroviruses by a monoclonal antibody that binds to a site occluded in the viral particle. *J Virol*, **86**, 3635-3646.

Particules de norovirus murin (MNV) observées en microscopie électronique. Réf. : Lou, F., Neetoo, H., Chen, H., & Li, J. (2011). Inactivation of a human norovirus surrogate by high-pressure processing: effectiveness, mechanism, and potential application in the fresh produce industry. *Appl Environ Microbiol*, **77**, 1862-1871.

Couverture du « Journal of Virology » (2010, volume 84) représentant les structures d'une sous-unité de la capsid et d'un virion intact du calicivirus félin (FCV) et un chat, Elizabeth, hôte du FCV. Réf. : Ossiboff, R. J., Zhou, Y., Lightfoot, P. J., Prasad, B. V., & Parker, J. S. (2010). Conformational changes in the capsid of a calicivirus upon interaction with its functional receptor. *J Virol*, **84**, 5550-5564 et montage réalisé par Lexy Roberts.

Plages de lyse permettant de calculer le titre viral de MNV et FCV après contact entre la suspension virale et un désinfectant. Réf. : Image personnelle.

Appareil de nébulisation (Hyspray®) utilisé pour la désinfection de surfaces/de locaux. Réf. : http://www.hymetec.net/docs/OHyspray_EN.pdf

REMERCIEMENTS

Cette aventure n'aurait pas pu commencer sans le soutien et la présence de mon promoteur, le Professeur Etienne Thiry, et de ma co-promotrice Katelijne Dierick. Merci Prof. Thiry pour votre accueil au sein du laboratoire, pour le temps consacré à cette thèse et pour vos commentaires, toujours précis et justes, qui ont permis d'améliorer sans cesse mon travail. Merci Katelijne pour votre bienveillance à mon égard, votre accueil à l'ISP et vos remarques pertinentes tout au long de cette thèse.

Merci à l'ensemble du service des Pathogènes Alimentaires de l'ISP : Nadine, Sarah et toute l'équipe technique, Elke, Warda, Donia, Astrid, Véronique... Un merci tout particulier à mes collègues de bureau, Marie, Alexandra, Wesley et Elodie pour la bonne ambiance, votre écoute et vos conseils.

Merci à toute l'équipe, passée et actuelle, du service de virologie : Axel, Damien, Ana, Edmilson et Louisa. Vous avez toujours été là lorsque j'avais besoin d'aide ou de conseils. Je retiendrais entre autre les précieuses corrections d'anglais de Louisa, les congrès à Paris et à Madrid avec Damien, et les nombreuses conversations très souvent scientifiques, parfois politiques, religieuses ou philosophiques, mais toujours intéressantes avec Axel alias « Papi ». Et bien-sûr, je n'oublie pas ma « petite Ana » : sans toi, ce doctorat n'aurait pas été le même. Merci pour cette belle amitié, pour ton soutien et ta franchise: garde ce caractère bien trempé qui te caractérise tant et que j'adore.

La science n'a pas de frontière et je tiens donc à remercier chaleureusement tous les « voisins » d'immunologie et de vaccinologie pour la bonne ambiance et la convivialité qui règnent au sein des bureaux et des labos grâce à vous tous. Merci à Alain, Laurent et Benjamin et l'ensemble de leurs équipes respectives : je me risque à citer les noms de ceux que j'ai côtoyé durant mon doctorat (pardon d'avance si j'en oublie certains) : Béné, Bérengère, Bilal, Caroline, Catherine, Cédric (alias « CD » !), Céline, Christine, Emeline et Emeline, Françoise, Joanna, Justine, Kris, Léa, Marion, Mickaël, Océane.

Certains de mes collègues sont devenus, au fil des années, mes « préférés », mes « chouchous » et de véritables amis. Lorène, merci pour ta gentillesse, ta disponibilité et ton sourire qui m'ont accompagné pendant toutes ces années et qui font du bien. Xtina, merci pour ton écoute, ta franchise et tes attentions à mon égard qui m'ont très souvent reboosté quand j'en avais besoin. Max, merci pour tous ces moments mêlant travail et humour, réflexion et « déconnade », tu es un mec doué, j'espère que tu le sais. Et enfin, Maygane, merci pour cette belle amitié, pour ton

dynamisme et ta joie de vivre si communicatifs et pour toutes ces discussions dans les couloirs du labo qui me permettaient toujours d'y voir plus clair concernant des problèmes (plus ou moins) scientifiques !

Je remercie ceux qui ont subventionné ce travail : le Service Public Fédéral Santé Publique, Sécurité de la Chaîne alimentaire et Environnement (projets Travifood et PupWelfare) et l'Université de Liège.

J'adresse un très grand merci au Professeur Frédéric Farnir pour sa disponibilité et son aide concernant les statistiques de mes deux études.

Je souhaitais également remercier tous mes amis, ceux « hors labo » qui m'ont permis de décompresser, de grandir et de m'épanouir dans ma vie privée pour mieux affronter la vie professionnelle. Il y a les « premiers » amis, de l'époque du lycée en France que je vois malheureusement trop peu mais qui ont une place particulière dans mon cœur : merci à Sylvie, Anne-Lise, Mich et Dominique d'être là depuis plus de 17 ans. Il y a bien-sûr les amis « vété » rencontrés pendant les études à Liège et qui sont pour moi une deuxième famille : Emi, Fanny, Bryce, Nad, Boulet, Chacha, Paulette, Guigui, Tom, Cloclo et toutes vos moitiés, merci d'être toujours présents malgré les kilomètres, je vous adore. Enfin, il y a mes amis à Liège : Steph, Benja et leurs adorables monstres (Maxence et ma filleule, Marine), Julie, Oli et mon filleul Lorent, Emi alias PiouPiou, Jef, mon binôme de cinéma, et Delphine ma « cokoteuse ». Vous m'avez toujours soutenu durant cette thèse, je sais que je peux compter sur vous, votre amitié est un cadeau : merci à tous.

Un immense merci à tous les membres de ma famille pour leur force et leur soutien. J'ai beaucoup de chance de vous avoir. Je ne pourrais jamais assez remercier mes deux plus grands supporters, mes parents. Merci pour tout ce que vous faites pour moi, merci pour la confiance que vous me portez et pour tout ce que vous m'avez transmis.

Merci à Sarah : tu es une amie extraordinaire avec une personnalité riche et complexe, on ne s'ennuie jamais avec toi, tu m'as rendu accro au sport, ton énergie me booste, tes fragilités me touchent. Merci d'avoir croisé ma route au laboratoire et de faire à présent partie de ma vie.

Merci à mon Topher : tu as toutes les qualités et valeurs que je recherchais chez quelqu'un. Merci pour ta présence à mes côtés depuis un an, ton soutien sans faille et tes nombreuses attentions qui font de toi un homme que j'aime.

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES	1
LISTE DES ABREVIATIONS	3
CHAPITRE 1 : INTRODUCTION	5
Préambule	6
1.1. Les norovirus humains	6
1.1.1. Caractéristiques.....	6
1.1.2. Cycle réplcatif des norovirus humains.....	8
1.1.3. Epidémiologie et transmission	11
1.1.4. Toxi-infections environnementales et d'origine alimentaire	12
1.1.5. Pathogénie et aspects cliniques	13
1.1.6. Traitement et prévention	14
1.1.7. Vaccination	15
1.2. Les substituts des norovirus humains	16
1.2.1. Le norovirus murin	17
1.2.1.1. Caractéristiques	17
1.2.1.2. Génome et capsid e	18
1.2.1.3. Cycle viral : étapes d'attachement et d'internalisation	18
1.2.1.4. Aspects cliniques.....	18
1.2.1.5. Méthodes moléculaires de détection : PCR et séquençage.....	19
1.2.2. Le calicivirus félin.....	19
1.2.2.1. Caractéristiques	19
1.2.2.2. Aspects cliniques.....	20
1.2.2.3. Méthodes de détection moléculaire.....	20
1.3. Familles de désinfectants et produits virucides	21
1.4. Les différents types de tests de virucidie et la nébulisation	25
CHAPITRE 2: OBJECTIFS	27
CHAPITRE 3 : SECTION EXPERIMENTALE	30
3.1. Etude de l'effet virucide de désinfectants sur le norovirus murin et le calicivirus félin, virus substituts des norovirus humains	31
3.1.1. Effets virucides de sept désinfectants sur le norovirus murin et le calicivirus félin, lors de tests en suspension, sur gants et sur disques en inox	31
3.1.2. Evaluation de l'effet virucide du peroxyde d'hydrogène contre le norovirus murin et le calicivirus félin via un système de nébulisation	46
3.2. Evaluation qualitative de l'effet de substances virucides sur le norovirus murin durant la phase d'attachement du norovirus murin	57

CHAPITRE 4 : DISCUSSION	66
4.1. Effet virucide.....	69
4.1.1. Effets virucides des halogénés	69
4.1.2. Effets virucides des agents oxydants.....	71
4.1.3. Effets virucides d'un désinfectant composé d'ammoniums quaternaires, d'alcool et d'un aldéhyde	73
4.1.4. Effets virucides des alcools.....	74
4.2. L'optimisation des tests de virucidie	75
4.2.1. Choix des virus substitués	75
4.2.2. Comparaison entre les différents types de tests virucides	75
4.2.3. Les conditions du test virucide	76
4.2.4. Le type de désinfectant	77
4.3. L'interprétation des résultats	78
4.3.1. L'extrapolation des résultats	78
4.3.2. L'effet sur les copies génomiques	78
4.3.3. La réduction du titre viral	78
4.4. Hypothèses sur les mécanismes d'action des désinfectants sur les virus	80
CHAPITRE 5 : CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	83
CHAPITRE 6 : RESUME – SUMMARY.....	87
CHAPITRE 7 : BIBLIOGRAPHIE	92
CHAPITRE 8 : ANNEXE	109

LISTE DES ABREVIATIONS

aHP : peroxyde d'hydrogène aérosolisé (*aerosolized hydrogen peroxide*)

BAC : chlorure de benzalkonium (*Benzylammonium-chloride*)

CDC : Centre pour le contrôle et la prévention des maladies (*Centers for Disease Control and Prevention*)

CrFK : cellules rénales de chat (*Crandell feline kidney cells*)

DAC : chlorure de didécylidiméthylammonium (*didecyldimethyl-ammoniumchloride*)

DMEMc : *Dulbecco's modified Eagle's medium complemented*

EPA : Agence de protection environnementale (Etats-Unis)

EtOH : étahnol

FCS: serum foetal de veau (*foetal calf serum*)

FCV : Calicivirus félin

G : génogroupe

HAV : virus de l'hépatite A

H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène

HBGAs : Antigènes tissulaires de groupes sanguins (*Histo-Blood Group Antigens*)

HPV : vapeur de peroxyde d'hydrogène (*hydrogen peroxide vapour*)

HuNoV : Norovirus humains

ICTV : Comité international de taxonomie des virus (*International Committee on Taxonomy of Viruses*)

Ig : Immunoglobulines

JAM-1 : molécule d'adhésion jonctionnelle 1

Kb : kilobases

MNV : Norovirus murin

MEMc : *Eagle's minimal essential medium complemented*

NEAA : acides aminés non-essentiels (*non-essential amino acids*)

NoV : Norovirus

ORF : cadre ouvert de lecture (*open reading frame*)

P : *protruding domain*

PAA : acide peracétique

RdRp : ARN polymérase ARN-dépendante

S : *shell domain*

TCID₅₀ : Dose infectieuse en culture tissulaire 50 % (*Tissue culture infectious dose 50*)

TV : virus Tulane

RT-PCR : réaction de polymérisation en chaîne (PCR) après une transcription inverse (RT)

RT-qPCR : RT-PCR quantitative/en temps réel

UV : rayonnement ultra-violet

VF1 : facteur de virulence 1

VHP : *vaporised hydrogen peroxide*

VP1 : protéine virale 1

VP2 : protéine virale 2

VPg : protéine virale liée au génome (*viral genome-linked protein*)

VLP : pseudo-particule virale (*virus-like particle*)

Introduction

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION

Préambule

La famille des *Caliciviridae* comprend actuellement 5 genres officiellement reconnus selon l'International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) : les *Lagovirus*, les *Nebovirus*, les *Norovirus*, les *Sapovirus* et les *Vesivirus* (Figure 1) (Green 2013). Le nom de cette famille provient du mot latin *calix* qui signifie coupe ou calice, en raison des 32 dépressions en forme de coupe à la surface de la capsid (Green et al. 2000). Les *Caliciviridae* regroupent des virus possédant un génome à ARN de simple brin, de polarité positive, d'une longueur d'environ 7,5 kb et d'un diamètre allant de 27 à 40 nm. L'arrangement caractéristique des cadres ouverts de lecture (ORF) les différencie d'une autre famille proche, les *Picornaviridae* (Clarke and Lambden 1997). Les norovirus humains et murin appartiennent au genre *Norovirus*, tandis que le calicivirus félin appartient au genre *Vesivirus*.

1.1. Les norovirus humains

Une épidémie de gastro-entérite humaine d'origine non bactérienne a eu lieu en 1968 dans la ville de Norwalk, dans l'Ohio, aux Etats-Unis. En 1972, le micro-organisme responsable de l'épidémie a été identifié et nommé virus de Norwalk (Kapikian et al. 1972). En 2001, les virus de type Norwalk devenaient les norovirus selon l'ICTV (Green et al. 2001).

1.1.1. Caractéristiques

Les Norovirus (NoV) appartiennent à la famille des *Caliciviridae* et sur base de la séquence en acides aminés de la protéine de capsid VP1, sont divisés en 6 génogroupes (GI à GVI). GI, GII et GIV affectent les humains (Zheng et al. 2006) ; GII contient aussi des souches porcines de génotypes spécifiques (Mauroy et al. 2008; Scipioni et al. 2008) ; GIII infecte les bovins (Oliver et al. 2003; Mauroy et al. 2014; Di Felice et al. 2016) ; GV inclut le norovirus murin (MNV) (Karst et al. 2003) et GVI les norovirus canins (Mesquita et al. 2010; Martella et al. 2011) (Figure 1). Une proposition d'un septième génogroupe (GVII) a été faite récemment et concerne des souches de NoV isolées dans des matières fécales de chiens (Tse et al. 2012; Vinjé 2015). La variabilité génétique provient principalement de mutations induites par le taux d'erreur élevé des enzymes de réplication. Les événements de recombinaison participent aussi à cette variabilité (Mathijs et al. 2010; Mathijs et al. 2011). La grande diversité et l'évolution continue des NoV sont dues entre autres à la pression de sélection exercée par le système immunitaire (Lindesmith et al. 2012) et à un taux de mutation généralement élevé dû à la faible fidélité de l'ARN polymérase et à l'absence d'une enzyme avec une activité de relecture (Duffy et al. 2008; Bull and White 2011).

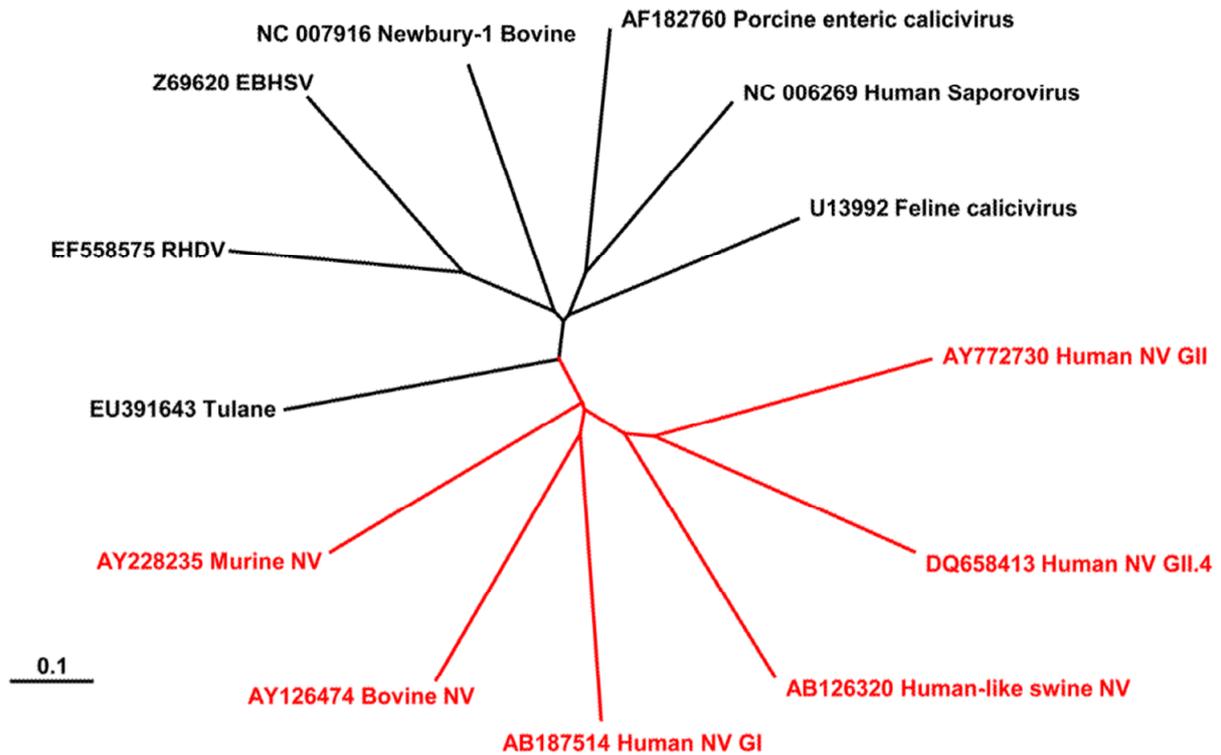


Figure 1: Arbre phylogénétique comparant les séquences du génome complet de 13 virus de la famille *Caliciviridae*.

Les virus du genre norovirus sont en rouge. La longueur des branches est proportionnelle au degré de divergence entre les séquences. Une échelle représentant les substitutions par position et les numéros d'accèsion des séquences sont indiqués.

RHDV : rabbit hemorrhagic disease virus (Maladie hémorragique virale du lapin), EBHSV : European brown hare syndrome virus (syndrome du lièvre brun européen), NV : norovirus.

Adapté de Vashist *et al.* (2009).

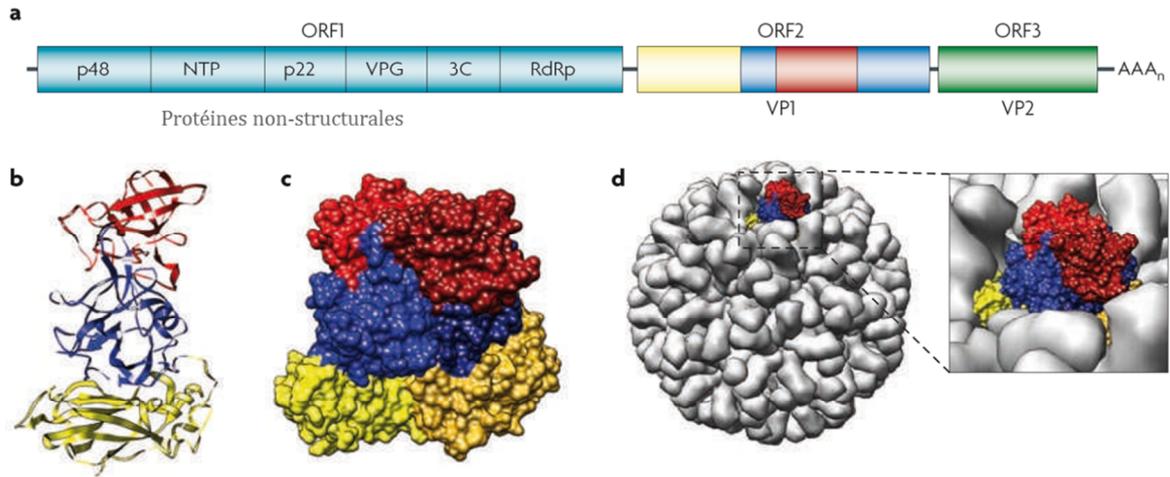


Figure 2: Organisation du génome et structure de la capsidie du norovirus humain.

a. Le génome de norovirus est composé de trois open reading frame (cadre ouvert de lecture, ORF). L'ORF1 correspond aux deux premiers tiers du génome et code une polyprotéine d'environ 200 kDa qui est clivée par la protéase virale 3C afin d'obtenir les protéines virales non-structurales essentielles pour la réplication du virus. Les protéines obtenues sont : la protéine p48 (dont la fonction intervient peut-être dans la formation du complexe de réplication), la protéine NTP, la protéine p22, la protéine VPG, l'ARN polymérase ARN-dépendante (RdRp). L'ORF2 code la protéine majeure de capsidie, la protéine virale 1 (VP1). VP1 est divisée en 2 domaines, le domaine « shell » (en jaune) et le domaine « protruding », divisé en deux sous-domaines, P1 (en bleu) et P2 (en rouge). ORF3 code la protéine mineure de capsidie, VP2.

b. La structure d'un monomère de VP1 est illustrée avec les différents domaines dans les couleurs de la partie **a**.

c. Deux monomères de la protéine de capsidie forment un dimère A-B permettant au domaine P2 de dépasser de la protéine virale.

d. La pseudo-particule virale est formée de 180 monomères de la protéine de capsidie assemblés sous forme de dimères. Le dimère A-B, en couleur, dépasse de la capsidie et présente la région se liant au récepteur et le site de variation antigénique. Dans la particule virale, les VP2 sont incorporés en petite quantité.

Adapté de Donaldson *et al.* (2010).

Les NoV sont très résistants dans l'environnement (virus non enveloppés) et persistent ainsi plusieurs jours sur les surfaces et les objets inertes. Les norovirus humains (HuNoV) peuvent survivre environ une semaine sur des surfaces et la nature de la surface testée ne semble pas avoir d'influence sur la persistance de NoV (D'Souza et al. 2006) même si l'utilisation de surfaces poreuses pourrait influencer la persistance en retenant le virus par absorption au sein de la surface, comme avec l'exemple d'une surface en bois inoculée avec MNV (Kim et al. 2014). La persistance des virus dans l'environnement varie en fonction des différences entre espèces et souches de virus et des conditions expérimentales comme la quantité d'inoculum, le taux d'humidité et la température (Kramer et al. 2006; Kim et al. 2012a).

La capside virale est composée de 180 copies (arrangées sous forme de 90 dimères) de la protéine majeure de capside, la protéine virale 1 (VP1) et d'une ou de deux copies de la protéine mineure de structure, VP2 (Figure 2). Elle possède une symétrie icosaédrique d'ordre 3. Le génome viral est constitué de 3 ORF, avec à l'extrémité 5' la protéine virale liée au génome, VPg et à l'extrémité 3' une queue poly-adénylée.

L'ORF 1 code une polyprotéine qui est clivée en 6 protéines non-structurales par la protéase virale 3C-like : la protéine p48, la NTPase, la protéine p22, la protéine VPg, la protéase 3C-like et l'ARN polymérase ARN-dépendante (RdRp). La protéine VPg est importante pour la réplication virale et intervient dans l'initiation de la traduction via le recrutement de ribosomes (Daughenbaugh et al. 2003). La protéase 3C-like est nommée ainsi en raison de sa similarité avec la protéase 3C des picornavirus.

L'ORF 2 code VP1, une protéine structurale avec un rôle important dans la réplication du virus : assemblage de la capside, reconnaissance du récepteur, spécificité d'hôte, diversité de souches et immunogénicité (Chen et al. 2004). Cette protéine est composée du domaine S (pour *shell domain*) et du domaine P (pour *protruding domain*) qui est exposé à la surface de la capside et subdivisé en 2 sous-domaines, P1 et P2 (Zheng et al. 2006) (Figure 2). P2 présente une grande variabilité génétique et correspond au lieu de fixation au récepteur cellulaire (Tan and Jiang 2005).

L'ORF 3 code pour VP2 qui joue un rôle sur l'expression et la stabilité de la protéine de capside VP1 (Bertolotti-Ciarlet et al. 2003).

1.1.2. Cycle réplcatif des norovirus humains

Le cycle réplcatif d'un virus commence par l'attachement de celui-ci aux récepteurs de la cellule hôte et implique donc une reconnaissance spécifique de ces récepteurs par le virus (Figure 3).

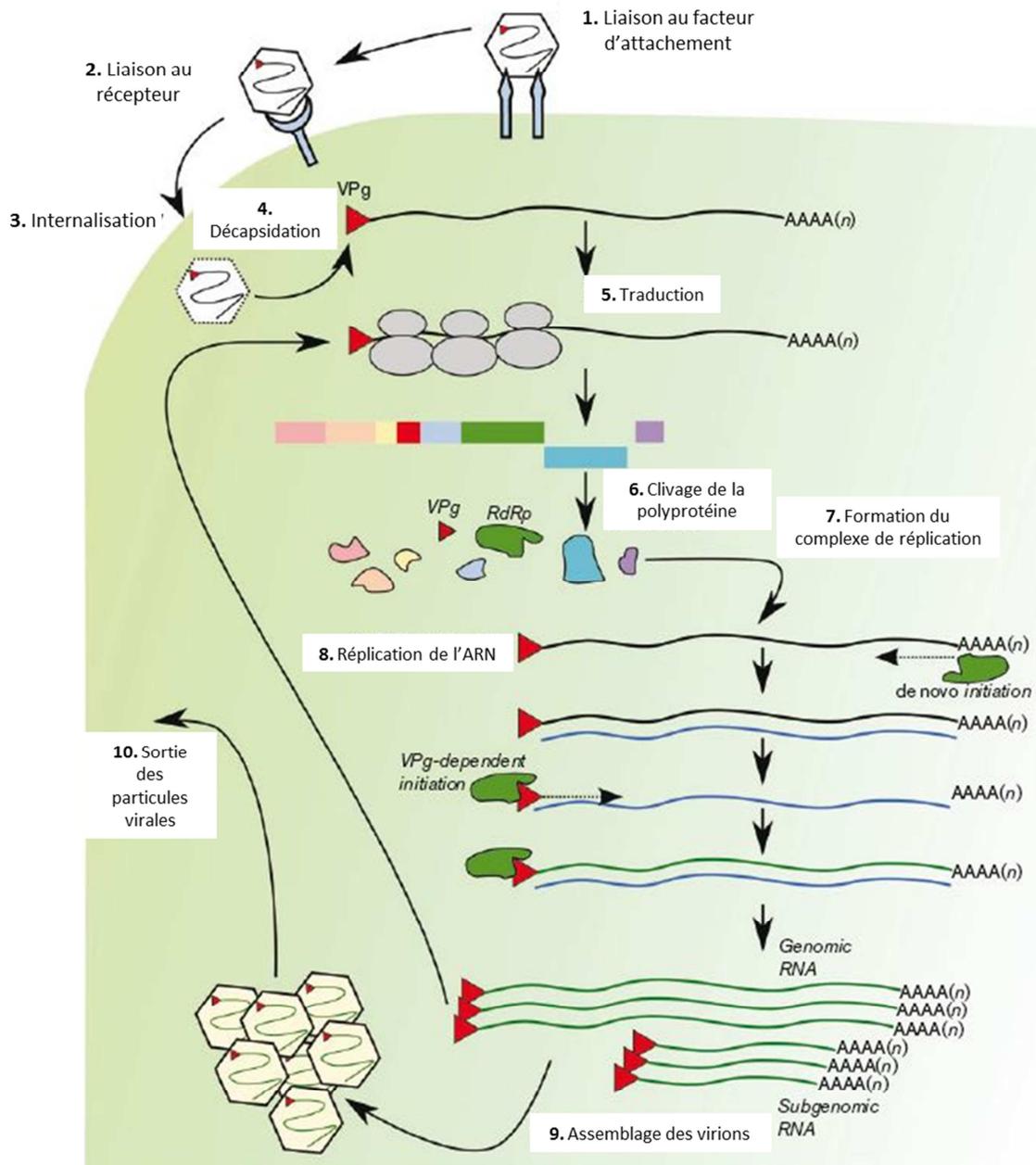


Figure 3 : Cycle des norovirus.

1. Les norovirus humains (HuNoV) et le norovirus murin s'attacheraient à la surface cellulaire en utilisant des facteurs d'attachement tels que les glycanes des antigènes tissulaires. **2.** Pour entrer dans la cellule, un attachement à un récepteur non identifié est requis. **3.** Internalisation dans la cellule. **4.** Décapsulation par un mécanisme encore inconnu. **5.** Le génome viral est traduit via des interactions avec VPg à l'extrémité 5' du génome (triangle rouge) et la machinerie cellulaire de traduction. **6.** La polyprotéine de l'ORF1 est clivée par la protéase virale 3C. **7.** Le complexe de réplication est formé par le recrutement des membranes cellulaires de la région périnucléaire de la cellule, via des interactions avec la protéine p48 et la protéine p22. **8.** La réplication du génome fait intervenir un brin négatif intermédiaire et les ARN génomique et subgénomique sont générés par l'ARN polymérase ARN-dépendante (RdRp). **9.** Les nouveaux génomes générés sont soit traduits soit entourés d'une capsid, assemblés en virions et sortent de la cellule (**10.**).

Adapté d'après Thorne *et al.* (2014).

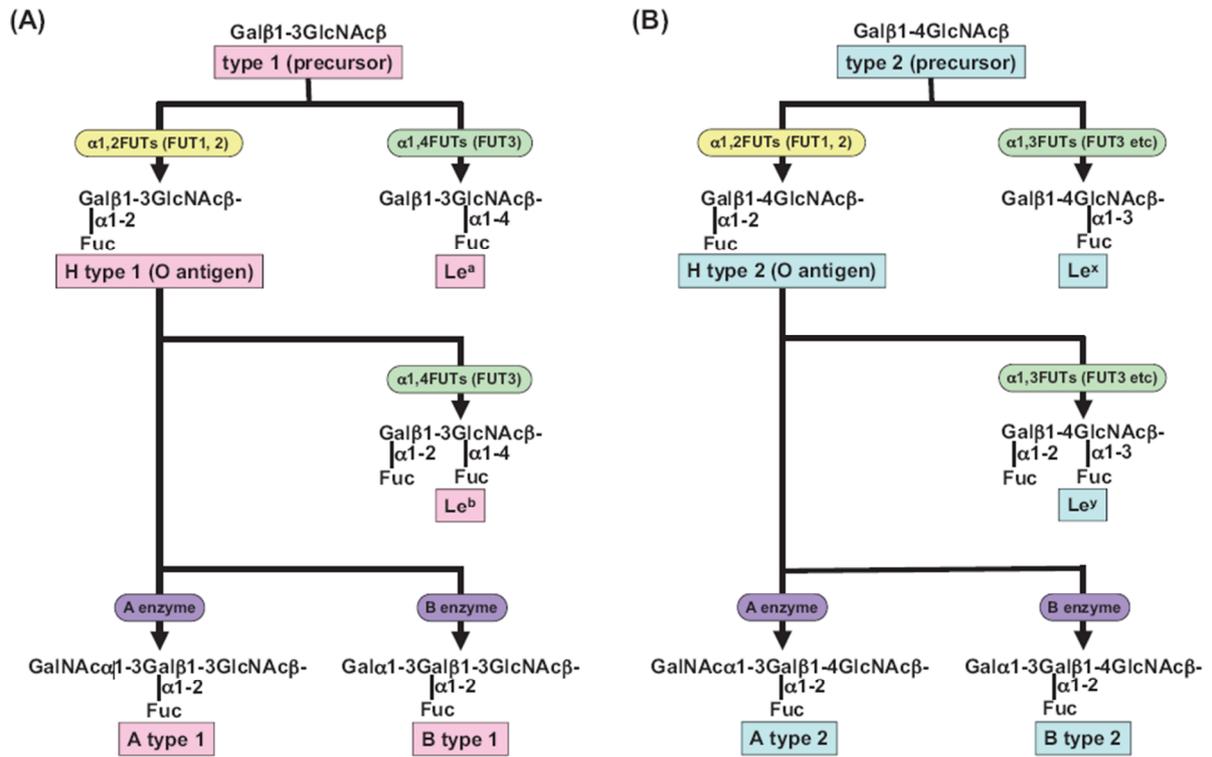


Figure 4 : Diagramme de la synthèse des structures glycaniques appartenant à la famille des antigènes tissulaires de groupes sanguins (HBGAs).

Les antigènes du système ABH et de Lewis sont synthétisés via des réactions enzymatiques transférant des résidus glucidiques, à partir d'un précurseur de type 1 (A) ou de type 2 (B)

Gal : galactose ; GalNAc : N-acétyl-galactose ; GlcNAc : N-acétyl-glucose; Fuc: fucose; FUT: fucosyl transférase ; Le : antigène de Lewis

Adapté d'après Shirato *et al.*(2011).

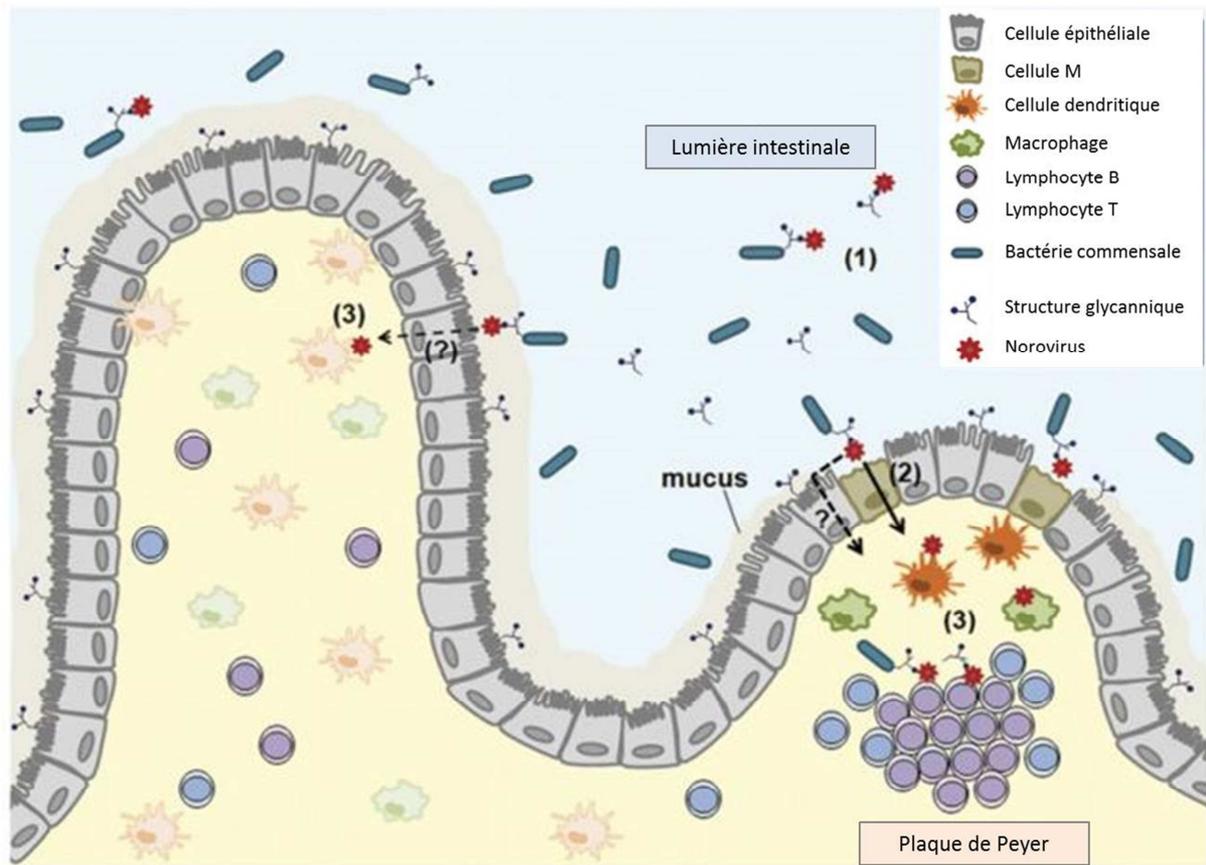


Figure 5 : Modèle fonctionnel d'une infection par les norovirus humains au niveau intestinal.

1. Les glucides, exprimés à la surface des entérocytes ou des bactéries entériques et sécrétés dans la lumière intestinale, se lient aux norovirus (NoV).

2. Les NoV traversent l'épithélium intestinal par transcytose via les cellules M (flèche pleine) et d'autres voies encore non identifiées (flèche en pointillé).

3. Après la transcytose, les NoV infectent les cellules dendritiques, les macrophages et les lymphocytes B.

Adapté d'après Karst et Wobus (2015).

Les glycanes qui constituent les antigènes tissulaires de groupe sanguin ABH et Lewis sont retrouvés au niveau des cellules épithéliales intestinales dans la lumière intestinale et à la surface des globules rouges notamment (Ravn and Dabelsteen 2000; Pringle et al. 2015). Tous les individus ne possèdent pas de récepteurs glycaniques et plusieurs motifs glycaniques existent, ce qui explique les variations individuelles observées vis-à-vis des infections aux HuNoV : certains individus sont résistants, d'autres sont réceptifs et parmi eux certains sont protégés, d'autres infectés (Marionneau et al. 2001; Lindesmith et al. 2003). Les HuNoV utilisent les structures glycaniques appartenant à la famille des antigènes tissulaires de groupes sanguins (HBGAs pour *Histo-Blood Group Antigens*) pour s'attacher (Tan and Jiang 2011; Karst and Wobus 2015) (Figure 4). Les virus traversent ensuite l'épithélium intestinal par transcytose via les cellules M et par d'autres processus encore non identifiés (Karst and Wobus 2015) (Figure 5). Il a été démontré expérimentalement chez des souris déficientes en cellules M (pour *microfold*) que les titres viraux étaient diminués ce qui suggère l'existence d'autres facteurs d'attachement et d'internalisation (Gonzalez-Hernandez et al. 2014). D'autres récepteurs ou co-récepteurs ont été mis en évidence au sein des *Caliciviridae*, comme les acides sialiques pour le virus de Tulane (TV)(Tan et al. 2015), le MNV (Taube et al. 2009), les NoV bovins (Mauroy et al. 2011) et pour les HuNoV (Rydell et al. 2009).

Des motifs glycaniques de type HBGAs ont également été retrouvés à la surface de cellules intestinales bovines (Zakhour et al. 2009) et de cellules intestinales d'huîtres et cette découverte expliquerait l'accumulation de particules de NoV dans les tissus digestifs des mollusques (Tian et al. 2006). Cet attachement ne proviendrait donc pas d'un piégeage physique du virus mais serait dû à une interaction spécifique entre le virus et son récepteur (Tian et al. 2006).

La réplication des NoV comporte encore plusieurs incertitudes. L'infection des cellules épithéliales intestinales n'a été démontrée que pour des infections *in vivo* de souris immunodéprimées infectées par MNV (Mumphrey et al. 2007) et des veaux (gnotobiotiques ou non) avec des souches de NoV humains ou bovins (Souza et al. 2008; Otto et al. 2011).

Les lymphocytes B infectés *in vitro* ne produisent que de faibles quantités de virus. Une des hypothèses expliquant les grandes quantités de virus excrétées dans les matières fécales est que ces modèles *in vitro* ne reflètent pas exactement les propriétés des lymphocytes B infectés *in vivo* (Karst and Wobus 2015). De plus, les cellules dendritiques et les macrophages intestinaux sont des cellules permissives aux infections à NoV et le taux de réplication virale élevé au sein de ces cellules pourrait expliquer les charges virales trouvées dans les matières fécales. Une autre hypothèse est que la réplication des NoV se ferait dans un autre site que l'intestin grêle, comme le caecum ou le côlon, soit dans un site extra-intestinal tel que le foie avec excrétion via la bile (Karst and Wobus 2015).

1.1.3. Epidémiologie et transmission

Les HuNoV sont la principale cause des épidémies de gastroentérites aiguës non bactériennes chez l'homme au niveau mondial et environ 20 % de l'ensemble des gastroentérites aiguës sont dues aux Norovirus (De Wit et al. 2001; Ahmed et al. 2014; da Silva Poló et al. 2016). La voie de transmission primaire est la voie féco-orale via le contact de personne à personne, via la consommation d'aliments ou d'eau contaminés, et via le contact avec des surfaces contaminées (Mathijs et al. 2012; Bitler et al. 2013) (Figure 6). Les aliments consommés crus tels que les fruits et les légumes sont contaminés via les eaux de surfaces ou par les préparateurs durant la récolte, l'emballage ou la préparation des aliments (Butot et al. 2009).

La transmission inter-individuelle des NoV est assez facile en raison de trois facteurs. Le premier concerne la grande résistance du virus dans l'environnement, pendant plusieurs jours voire plusieurs semaines. De plus l'excrétion des particules virales infectieuses se fait en grandes quantités et il a été démontré qu'un gramme de matières fécales pouvait contenir jusqu'à 10^9 copies génomiques de NoV (Atmar et al. 2008). Chez des patients âgés, l'excrétion de NoV est parfois prolongée et peut être $\geq 10^4$ copies génomiques/g de matières fécales plus de 2 semaines après le début des symptômes. Enfin, seule une faible dose de virus est nécessaire pour entraîner l'infection d'un individu et cette dose infectieuse à 50 % en culture tissulaire (TCID₅₀) oscille entre 18 et 1015 ou 1320 et 2800 équivalents génomiques suivant les études et la méthodologie utilisée (Teunis et al. 2008; Atmar et al. 2014).

Les animaux sont infectés par des souches spécifiques de NoV. Aucune transmission zoonotique n'a été rapportée pour les NoV humains et les espèces animales ne sont pas actuellement identifiées comme réservoir de NoV (Mathijs et al. 2012; Karst and Baric 2015; Wilhelm et al. 2015).

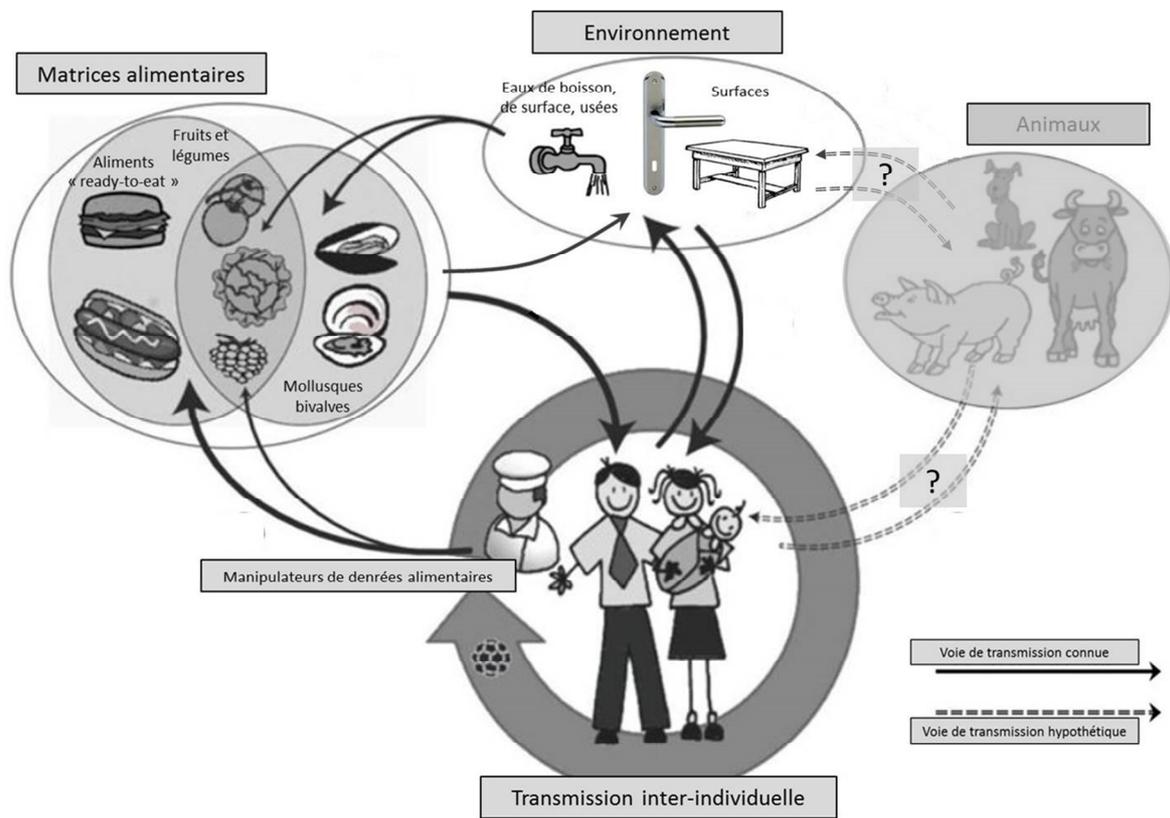


Figure 6 : Présentation schématique des voies de transmission des norovirus.
 L'épaisseur des flèches est proportionnelle à la probabilité de la voie de transmission.
 Adapté d'après Mathijs *et al.* (2012).

1.1.4. Toxi-infections environnementales et d'origine alimentaire

L'environnement joue un rôle important de réservoir qui permet la transmission de virus et constitue un facteur contribuant à la propagation de l'épidémie (Wu et al. 2005; Otter et al. 2011). Les établissements de santé sont régulièrement confrontés à des contaminations dues aux HuNoV avec comme conséquences un nombre élevé d'individus atteints et un risque d'infection nosocomiale pour les patients de ces établissements (Verbelen et al. 2004; Weber et al. 2010; Wikswa et al. 2015). Des méthodes de détection et de génotypages sont nécessaires afin de clarifier les voies de transmission inter-individuelle et via les aliments, l'eau et l'environnement. La méthode moléculaire principale utilisée pour la détection des NoV est la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) après une transcription inverse (RT) (RT-PCR) (Stals et al. 2012). La détection de NoV par RT-PCR jusqu'à 7 jours après dépôt sur différentes surfaces telles que de l'acier, du formica et de la céramique et le transfert de NoV à partir de surfaces contaminées vers des aliments démontrent l'importance de l'environnement comme voie de transmission des NoV (D'Souza et al. 2006) (Figure 6).

Aux États-Unis, parmi les épidémies d'origine alimentaire, les NoV représentent le pathogène le plus important avec environ 58 % des cas (Scallan et al. 2011). En Belgique, en France et au Canada, la prévalence de NoV dans des produits frais (fruits rouges, légumes verts à feuilles, tomates) varie de 6,7 % à 55,5 % (Baert et al. 2011).

Les aliments contaminés par les HuNoV peuvent être divisés en deux groupes. Le premier inclut les mollusques bivalves tels que les huîtres et les moules, impliqués dans plus de la moitié des épidémies dues à la consommation de fruits de mer (Bellou et al. 2013). Ces mollusques se nourrissent par filtration de l'eau via leurs branchies. Ainsi ils accumulent les virus dans leurs tissus et la concentration virale peut être jusqu'à 99 fois plus importante dans leurs organes par rapport à l'eau de leur milieu (Lees 2000). Ils peuvent être contaminés par les eaux usées durant leur développement en eau de mer ou dans les bassins de purification qui sont des bassins d'eau de mer dans lesquels les mollusques sont placés afin que leur processus de filtration commence et qu'ils éliminent les contaminants et les pathogènes (Lee et al. 2008; Love et al. 2010).

Le second groupe inclut d'autres types d'aliments tels que les fruits et légumes (frais et sous forme congelée) et les aliments « prêts à être consommés » (« ready-to-eat food »). Ces aliments peuvent être contaminés par des eaux usées contaminées (Wei and Kniel 2010), via un manque d'hygiène au niveau de l'environnement, ou via les préparateurs infectés, durant la récolte, la préparation ou la vente de ces aliments (Baert et al. 2009b; Escudero et al. 2012; Rodriguez-Lazaro et al. 2012).

Les préparateurs sont impliqués dans plus de la moitié des épidémies d'origine alimentaire dues à HuNoV (Baert et al. 2009b). L'augmentation de la consommation de ces types d'aliments entraîne une augmentation des épidémies d'origine alimentaire (Sivapalasingam et al. 2004).

1.1.5. Pathogénie et aspects cliniques

Les NoV infectent les personnes de tout âge et sont responsables de gastroentérites aiguës. La période d'incubation est relativement courte, 24 à 48 heures, avec une moyenne de 1,2 jour (intervalle de confiance de 95 % situé entre 1,1 et 2,2 jours) et l'excrétion virale varie de 2 jours à 3 semaines (Lee et al. 2013). Les deux symptômes majeurs de l'infection à norovirus sont les vomissements et la diarrhée pendant une période d'environ deux jours. A ces symptômes peuvent s'ajouter des nausées, des douleurs abdominales et de la fièvre (Green et al. 2001).

Généralement bénignes à l'âge adulte, les gastroentérites à norovirus peuvent être plus dangereuses chez les patients très jeunes, très âgés ou immunodéprimés. La durée moyenne de la maladie est deux fois plus longue chez les enfants de moins de 2 ans par rapport à ceux âgés de 2 à 5 ans (Murata et al. 2007). L'âge avancé est aussi un facteur de risque, provoquant des gastroentérites plus graves avec déshydratation et parfois hospitalisation du patient. Le taux de mortalité dû aux NoV augmente aussi significativement avec l'âge (Van Asten et al. 2012). Les patients immunodéprimés infectés par des NoV présentent aussi des symptômes plus sévères. Des diarrhées chroniques et une excrétion virale persistante ont été observées chez ces patients (Westhoff et al. 2009; Schorn et al. 2010; Schwartz et al. 2011). Paradoxalement, les infections à NoV peuvent aussi être asymptomatiques, notamment chez les enfants (Huynen et al. 2013).

En l'absence de la preuve de l'infection des entérocytes, plusieurs mécanismes sont proposés pour expliquer la gastro-entérite (Karst et al. 2014; Karst and Wobus 2015). Les cellules immunitaires infectées pourraient libérer des cytokines proinflammatoires d'une part et les NoV pourraient coder une entérotoxine virale d'autre part, causant un dysfonctionnement au niveau de l'épithélium intestinal et de la diarrhée, comme les rotavirus avec l'entérotoxine NSP4 (Ball et al. 2005; Lorrot and Vasseur 2007; Kopic and Geibel 2010). Les NoV pourraient aussi stimuler la transcytose de bactéries commensales qui, en conditions normales, n'atteignent pas l'épithélium intestinal. Enfin les macrophages intestinaux, lorsqu'ils sont infectés par NoV, pourraient altérer la fonction motrice de l'intestin via des interactions avec le système nerveux entérique (Muller et al. 2014; Karst and Wobus 2015).

La protection induite par la réponse immunitaire après infection est de courte durée et il ne semble pas exister d'immunité à long terme puisque de nombreux individus peuvent être réinfectés par les NoV (Kocher and Yuan 2015; Pringle et al. 2015). Certains individus ne sont pas infectés par des NoV et ne développent pas d'anticorps dirigés contre le virus. Cette particularité est due à des facteurs génétiques de l'hôte qui dépendent notamment du type de récepteurs glycaniques des cellules intestinales. En fonction du motif glycanique appartenant à la famille des HBGAs, le NoV pourra ou non se fixer à son récepteur (Marionneau et al. 2002). En fonction de la souche de norovirus, le motif glycanique reconnu sera différent ce qui explique les variations individuelles observées lors des épidémies ou des expérimentations. Ainsi 20 % de la population appartient au groupe des individus non sécréteurs, c'est-à-dire ne possédant pas les glycanes nécessaires à la fixation du norovirus. Les NoV ne pouvant pas se fixer à la surface des cellules de ces individus, ceux-ci ne développent pas de symptômes, pas d'excrétion virale ni de réponse immunitaire. Il existe 2 sous-groupes parmi les 80 % d'individus dits sécréteurs : 45 % de la population totale représentant les patients infectés, avec symptômes (50 %), excrétion virale et une réponse immunitaire tardive (Immunoglobuline (Ig) A et Ig G) ; 35 % de la population totale représentant les individus protégés, qui sont asymptomatiques, n'excrètent pas de virus et ont une réponse immune en Ig A (Lindesmith et al. 2003).

1.1.6. Traitement et prévention

Il n'y a pas de traitement spécifique pour les infections aux NoV, seul un traitement de soutien existe. Il vise à rétablir l'équilibre électrolytique et l'hydratation du patient. La prévention passe essentiellement par des mesures sanitaires strictes afin d'éviter une propagation rapide du virus entre individus sur les lieux d'une épidémie. Les zones de production alimentaires ou les zones hydriques doivent être contrôlées afin de détecter rapidement une contamination à NoV (Koopmans and Duizer 2004). Le respect des règles d'hygiène doit être appliqué pour éviter une contamination des aliments ou entre individus afin de limiter la diffusion du virus (Siegel et al. 2007; MacCannell et al. 2011). Les surfaces doivent être désinfectées à l'aide de produits virucides ayant démontré une activité contre les NoV ou des virus substitués et en veillant à respecter les règles d'utilisation de ceux-ci (concentration et temps de contact) (Tung et al. 2013).

1.1.7. Vaccination

L'absence de système de culture cellulaire et la grande diversité des NoV font partie des obstacles qui rendent le développement d'un vaccin contre NoV difficile (Robilotti et al. 2015). Les études cherchant à développer un vaccin contre les NoV se focalisent sur les pseudo-particules virales (VLP) (Richardson et al. 2013; Kocher and Yuan 2015; Robilotti et al. 2015). Les phases I et II d'essais cliniques chez l'homme de vaccins à partir de pseudo-particules virales de NoV sont en cours et démontrent une réduction des signes cliniques et de l'infection (Tan and Jiang 2014). Une protection croisée semble exister entre les virus d'un même génogroupe tandis qu'entre deux génogroupes différents (notamment GI et GII), la protection croisée est faible (Pringle et al. 2015). Ainsi pour conférer une protection efficace contre les NoV, l'utilisation d'un vaccin multivalent est envisagée. Pour cela, la connaissance des souches circulant au niveau mondial est une étape indispensable dans le processus de développement d'un vaccin. La vaccination pourrait être utilisée pour protéger les populations les plus sensibles et diminuer les formes sévères de la maladie. L'impact économique serait également très important. La durée de l'immunité, les doses et valences utilisées, les voies d'administration sont autant de paramètres qui doivent encore être étudiés afin de développer un vaccin contre les HuNoV.

	Norovirus humain	Calicivirus félin	Norovirus murin	Virus Tulane	Coliphage MS2	HAV
Famille	<i>Caliciviridae</i>				<i>Leviviridae</i>	<i>Picornaviridae</i>
Genre	<i>Norovirus</i>	<i>Vesivirus</i>	<i>Norovirus</i>	<i>Recovirus*</i>	<i>Levivirus</i>	<i>Hepatovirus</i>
Excrétion fécale	Oui	Non	Oui	Oui	Non /Oui**	oui
Enveloppe	Non					
Diamètre du virion	27-38 nm	35-39 nm	35-39 nm	35-37 nm	27 nm	27-32 nm
Récepteur, corécepteur	HBGAs, héparane sulfate	JAM-1, Acide sialique	Acide sialique, glycoprotéines	HBGAs	F-pilus	HAVcr-1 (plgR)
Composition du génome	Simple brin d'ARN (+)					
Taille du génome	7,5 kb			6,7 kb	3,5 kb	7,5 kb
Organisation du génome	3 ORF	3 ORF	4 ORF	3 ORF	4 ORF	1 ORF

Tableau 1 : Caractéristiques des virus substitués des norovirus humains

*Proposition du nouveau genre *Recovirus* pour rhesus enteric calicivirus par Farkas et al. (2008).

** Le bactériophage infecte *E. coli* et donc indirectement a une excrétion fécale

HBGAs : Histo-Blood group antigens (Tan and Jiang 2011); JAM-1 : molécule d'adhésion jonctionnelle 1 (*Makino et al.* 2006); HAV : virus de l'hépatite A; HAVcr-1 : récepteur cellulaire 1 à HAV (Feigelstock et al. 1998) ; plgR : polymeric immunoglobulin receptor (*Dotzauer et al.* 2005); ORF : cadre ouvert de lecture.

Adapté d'après Hoelzer et al. (2013) et Kniel et al. (2014)

1.2. Les substituts des norovirus humains

Les HuNoV étant difficilement cultivables via un système de culture *in vitro*, l'utilisation de virus substituts des HuNoV est la principale méthode permettant d'étudier par extrapolation les effets de la désinfection sur les HuNoV (Kniel 2014). L'hypothèse pour expliquer la difficulté de créer un système de culture cellulaire *in vitro* serait que plusieurs étapes de la réplication des NoV sont cruciales et nécessitent des conditions spécifiques, conditions qui ne sont pas toutes présentes dans les différents modèles *in vitro* testés (Duizer et al. 2004b). Le type de récepteurs, notamment les récepteurs de types HBGA, influence l'étape d'attachement des NoV et pourrait aussi expliquer en partie les échecs de culture *in vitro*. Enfin des événements intervenant après la phase d'attachement (étape d'internalisation par exemple) pourraient aussi participer à la difficulté de mise en place d'un système de culture cellulaire *in vitro*. Le premier système de culture cellulaire de HuNoV a été mis au point en 2015 (Jones et al. 2015). Bien que cette découverte soit un pas important vers une meilleure compréhension du mécanisme de réplication des NoV, le système récemment mis en place a, comme principales limitations, un faible taux de production de virus (de 0,5 à 3,5 log₁₀) et la reproductibilité dans d'autres laboratoires qui semble difficile. Excepté ce système de culture cellulaire à partir de lymphocytes B, il n'existe actuellement aucun autre système de culture cellulaire pour HuNoV. Le choix d'un virus substitut des HuNoV doit prendre en compte plusieurs critères comme la facilité de mise en place du modèle, les similitudes génétiques et les propriétés d'attachement.

Chez les *Caliciviridae*, la relation entre la structure (les calices formés à la surface de la capsid) et la fonction est importante (Kniel 2014). Afin d'étudier les HuNoV, le choix d'un virus substitut se dirige donc naturellement vers un virus substitut appartenant à la même famille (Tableau 1). De nombreuses études ont utilisés le calicivirus félin (FCV) et plus récemment le MNV et le virus Tulane (TV) (Doultree et al. 1999; Cannon et al. 2006; Hirneisen and Kniel 2013; Tian et al. 2013; Kniel 2014). D'autres virus n'appartenant pas à la famille des *Caliciviridae* (rotavirus et sapovirus porcin) ainsi que des virus n'affectant pas les animaux (les bactériophages et les VLP) ont aussi été utilisés comme substituts des HuNoV (Kniel 2014). La comparaison entre deux virus substituts et entre virus substituts et HuNoV est difficile en raison des nombreuses variables présentes dans chaque étude. D'après une revue systématique sur les substituts des HuNoV, le MNV et le bactériophage MS2 seraient significativement plus résistants à la désinfection que le FCV mais les différences absolues en réduction du titre viral sont modestes (Hoelzer et al. 2013).

Le virus Tulane (TV) a été découvert en 2008 dans des matières fécales de singes macaques rhésus (Farkas et al. 2008). D'après ses caractéristiques génomiques et physicochimiques telles que

l'organisation du génome en trois ORF, des séquences en acides aminés caractéristiques des calicivirus et la taille et la morphologie des virions, le TV fait partie de la famille des *Caliciviridae* et est plus proche des norovirus que des autres calicivirus. Sur base d'une étude phylogénétique, ce nouveau calicivirus serait placé dans un nouveau genre *Recovirus* (Farkas et al. 2008). Ce genre n'a pas encore été reconnu par l'ICTV. Le TV peut se cultiver *in vitro* dans une lignée de cellules rénales de macaque rhésus (les cellules LLC-MK2) ce qui est une différence significative par rapport aux HuNoV et qui permet au TV d'être considéré comme un virus substitut des HuNoV et a donc été récemment utilisé dans des études de virucidie (Hirneisen and Kniel 2013; Tian et al. 2013).

Lors du choix d'un virus substitut, les paramètres à prendre en considération sont la stabilité de celui-ci vis-à-vis du pH, de la chaleur et sa persistance dans l'environnement. Concernant le pH, le MNV semble être le virus substitut le plus résistant (Hirneisen and Kniel 2013). Les MNV, TV et FCV semblent avoir une résistance à la chaleur similaire (Cannon et al. 2006; Hirneisen and Kniel 2013). Comparé aux HuNoV, le MNV présente une similitude génétique plus élevée au niveau de la protéine de la polymérase tandis que le TV présente une similitude plus élevée au niveau de la protéine de capsid VP1 (Farkas et al. 2008; Kniel 2014).

1.2.1. Le norovirus murin

1.2.1.1. Caractéristiques

La découverte du MNV date de 2003 (Karst et al. 2003) et le MNV-1 est le premier norovirus à infecter une proportion significative de souris de laboratoire, aussi bien des souris de type sauvage que des souris immunodéficientes (Henderson 2008). Le MNV, comme le norovirus humain, se transmet par la voie féco-orale et peut être transmis à une souris à partir d'une souris infectée ou d'une litière contaminée (Wobus et al. 2006). Généralement les souris immunocompétentes infectées par MNV ne montrent pas de signes cliniques (Wobus et al. 2006). Le MNV infecte probablement les macrophages et des cellules dendritiques *in vivo* et les cellules de macrophages murins RAW 264.7 ont permis le développement d'une méthode de plages de lyse et le premier système de culture cellulaire *in vitro* (Wobus et al. 2004). Le MNV est particulièrement résistant dans l'environnement. Des particules infectieuses peuvent encore être retrouvées plusieurs jours voire plusieurs semaines après leur dépôt sur différentes surfaces (Fallahi and Mattison 2011; Escudero et al. 2012; Kim et al. 2014).

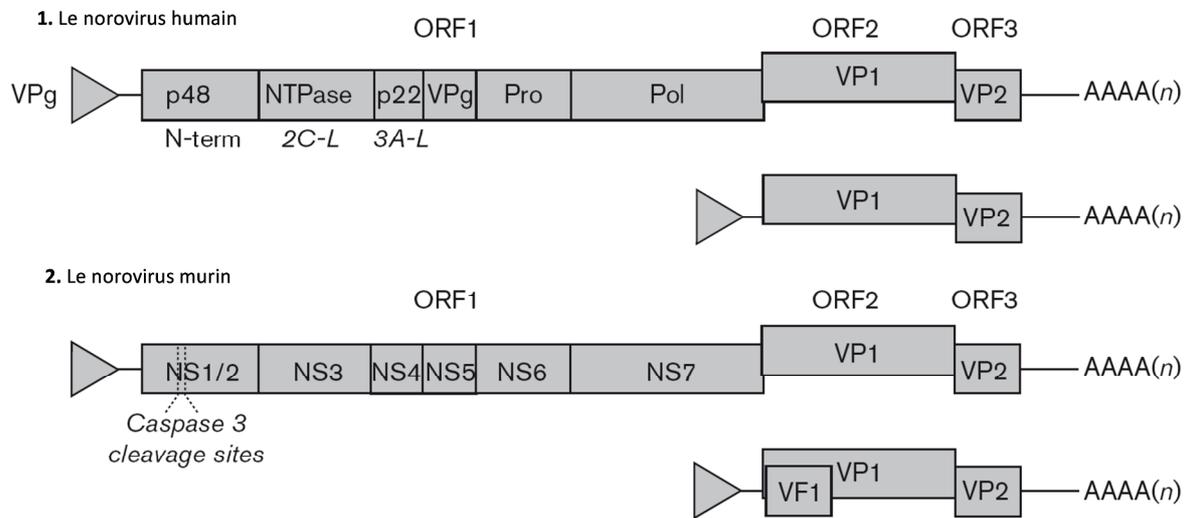


Figure 7 : Organisation des génomes du norovirus humain et du norovirus murin.

1. Le génome du norovirus humain est attaché de manière covalente à son extrémité 5' à la protéine VPg, a une queue poly-adénylée à l'extrémité 3' et est divisé en 3 cadres ouverts de lecture (ORF), communs à tous les norovirus. **2.** Le norovirus murin partage une organisation similaire du génome et a un ORF4 en plus. L'ORF4 chevauche l'ORF2 et est traduit à partir de l'ARN subgénomique en protéine de facteur de virulence 1 (VF1).

Adapté de Thorne *et al.* (2014).

1.2.1.2 Génome et capsid

Le MNV partage de nombreuses propriétés biochimiques et génétiques avec les HuNoV. Cependant, le MNV possède un quatrième ORF alternatif. L'ORF 4 est traduit à partir d'un cadre de lecture alternatif dans l'ORF 2 et code une protéine, le facteur de virulence VF1 (McFadden et al. 2011) (Figure 7). Le facteur VF1 a plusieurs fonctions dont la modulation de la réponse immunitaire innée de l'hôte.

1.2.1.3 Cycle viral : étapes d'attachement et d'internalisation

Les étapes d'attachement et d'internalisation du MNV ne sont pas entièrement comprises mais sont probablement des processus à plusieurs étapes faisant intervenir plusieurs récepteurs. De nombreux virus, enveloppés et non-enveloppés, dont les NoV utilisent les glycoprotéines, les glycolipides et les protéoglycane présents à la surface cellulaire pour établir de faibles liaisons avec leur capsid (Olofsson and Bergström 2005; Nasir et al. 2015). Les acides sialiques contenus dans les gangliosides exprimés à la surface cellulaire hôte sont utilisés comme récepteurs par certaines bactéries et toxines bactériennes et par certains virus dont MNV (Taube et al. 2009), FCV (Stuart and Brown 2007) et HuNoV (Han et al. 2014). MNV adhère aussi à des glycoprotéines à la surface des macrophages et des préférences pour des glycanes spécifiques existent en fonction de la souche de MNV d'après un mécanisme similaire des HuNoV avec les HBGAs expliqué dans le paragraphe 1.1.5. (Taube et al. 2012). Cependant l'infection n'a lieu qu'après fixation à un récepteur d'entrée, aussi, d'autres molécules doivent intervenir et jouer un rôle de récepteur d'entrée pour permettre l'internalisation de MNV et ensuite l'infection (Taube et al. 2009).

Lors d'infection avec MNV, les cellules M participent à la transcytose du virus à travers les entérocytes mais il semble aussi que cette voie ne soit pas l'unique route utilisée par le virus pour traverser la barrière intestinale (Gonzales-Hernandez, Liu, 2014).

L'internalisation de MNV dans les cellules RAW 264.7 est un processus qui ne dépend ni de la clathrine ni de la cavéoline mais qui dépend du cholestérol et de la dynamine (Gerondopoulos et al. 2010).

1.2.1.4 Aspects cliniques

Les souris immunocompétentes infectées ne présentent pas de signes cliniques alors que l'ARN viral est retrouvé dans le foie, la rate et l'intestin grêle 1 jour après inoculation *per os* et dans les matières fécales pendant au moins 7 jours après inoculation (Hsu et al. 2005; Wobus et al. 2006).

1.2.1.5 Méthodes moléculaires de détection : PCR et séquençage

Le MNV est scrupuleusement surveillé dans les populations de souris immunodéficientes en raison de sa forte prévalence et du risque élevé d'épidémies (Henderson 2008). La plupart des souris de laboratoire sont maintenant dépistées pour le MNV. Des tests sérologiques et de détection moléculaire (RT-PCR) sont donc mis au point afin de tenter d'éradiquer le MNV de ces populations (Henderson 2008). Lors d'infections virales, après élimination du virus par l'organisme, seuls les tests sérologiques détectant les anticorps dirigés contre le virus, sont utilisés afin d'indiquer une infection précédente. Dans le cas des infections à MNV chez les souris, certaines souches virales peuvent infecter de manière prolongée ou persistante l'hôte : l'ARN viral est ainsi toujours détectable et la détection moléculaire par RT-PCR est donc possible et utilisée (Thackray et al. 2007; Henderson 2008; Besselsen et al. 2012). Afin de déterminer les régions hautement conservées du génome de MNV, il est important de séquencer de nombreuses souches différentes de MNV (Henderson 2008). Trois régions sont maintenant connues comme étant des régions hautement conservées. La première correspond à l'extrémité 5' du génome, la deuxième est située à la jonction de l'ORF 1 et de l'ORF 2 tandis que la troisième région chevauche l'ORF 2 et l'ORF 4 (Thackray et al. 2007).

1.2.2. Le calicivirus félin

1.2.2.1. Caractéristiques

Le calicivirus félin (FCV) est un pathogène hautement infectieux largement répandu dans la population féline (Radford et al. 2007). Le virus cause généralement une maladie aiguë de la cavité buccale et des voies respiratoires supérieures mais peut aussi être associé à des gingivo-stomatites chroniques et récemment une forme systémique plus sévère a aussi été découverte (Radford et al. 2009). Le génome, simple brin d'ARN de polarité positive et d'une longueur de 7,7 kb contient 3 ORF: l'ORF 1 code les protéines non-structurales, l'ORF 2 la protéine majeure de capsid et l'ORF 3 une protéine structurale mineure. Malgré une grande variabilité génétique, la similitude entre isolats est suffisante pour les classer dans un seul sérotype.

Le FCV est spécifique de son hôte et infecte les félidés (Pesavento et al. 2008). Cependant dans plusieurs études, le FCV a été isolé dans d'autres espèces. Ainsi des souches virales hautement similaires au FCV ont été trouvées chez le chien (Martella et al. 2002; Di Martino et al. 2009) et des ARN de vésivirus ont été détectés dans des échantillons sanguins chez l'homme (Smith et al. 2006).

Un système de culture cellulaire pour l'infection par le FCV existe et a ainsi permis au FCV de servir de modèle pour la biologie moléculaire des calicivirus. La lignée cellulaire la plus souvent utilisée pour multiplier le FCV est la lignée de cellules rénales de chat (Crandell feline kidney, CrFK) (Crandell et al. 1973; Slomka and Appleton 1998; Doultree et al. 1999) et une méthode standardisée

de plaque de lyses a été mise en place (Bidawid et al. 2003). Deux récepteurs sont connus pour le FCV : une molécule d'adhésion jonctionnelle 1 (JAM-1) (Makino et al. 2006) et un acide sialique alpha-2,6 (Stuart and Brown 2007).

1.2.2.2. Aspects cliniques

Les signes cliniques d'une infection à FCV diffèrent en fonction de plusieurs critères dont la virulence de la souche infectante et l'âge du chat infecté (Radford et al. 2007; 2009). Dans la majorité des cas apparaît une lésion ulcéreuse au niveau de la cavité buccale et une forme légère de maladie respiratoire avec souvent du jetage nasal et oculaire. Après 2 à 10 jours d'incubation, les principaux signes cliniques sont les ulcérations orales (accompagnées parfois d'une hypersalivation), l'éternuement et le jetage nasal, accompagnés parfois de fièvre et d'anorexie. Les cas les plus sévères peuvent évoluer en pneumonie (dyspnée, toux, fièvre et abattement). Le chaton infecté par le FCV peut aussi présenter une boiterie transitoire. Enfin, certaines souches hypervirulentes peuvent induire un syndrome systémique sévère avec de la fièvre, des œdèmes cutanés, de la coagulation intravasculaire disséminée, des lésions ulcéreuses de la peau et des pattes et des atteintes hépatiques (ictère), rénales et respiratoires (œdème pulmonaire), pouvant entraîner la mort de l'animal dans presque deux tiers des cas (Foley et al. 2006). Le virus est excrété majoritairement dans les sécrétions orales et nasales en phase aiguë (Radford et al. 2009). Après rétablissement, beaucoup de chats continuent d'excréter le virus pendant une période allant de 30 jours (majorité des animaux) à plusieurs années (une minorité) et deviennent des animaux porteurs asymptomatiques. Le vaccin contre le FCV fait partie des vaccins essentiels et fournit une protection efficace mais qui dépend du virus infectant et qui n'empêche pas l'infection ou l'excrétion.

1.2.2.3. Méthodes de détection moléculaire

Le diagnostic de FCV se fait soit par isolement du virus soit par RT-PCR. L'isolement du virus est moins sensible que la RT-PCR. L'ARN viral peut être retrouvé après extraction à partir d'écouvillons conjonctivaux ou oraux, de prélèvements sanguins, de raclage cutané ou de tissu pulmonaire puis amplifié par RT-PCR classique, de niche ou quantitative (RT-qPCR). La RT-qPCR a l'avantage de permettre la quantification de la charge virale : plus la charge virale est importante plus le risque de propagation du virus est grand. Cependant la très grande variabilité du génome de FCV rend difficile l'utilisation d'une RT-PCR ciblant toutes les souches de FCV. Des régions très conservées du génome sont donc recherchées et une portion du gène p30 dans l'ORF1 de FCV en est une (Helps et al. 2002; Scansen et al. 2004). Dans le cadre de cette thèse, la détection moléculaire du FCV a été réalisée par une RT-PCR en temps réel en une étape en utilisant l'amorce « sens » de

Résistance aux désinfectants	Type d'agent pathogène	Famille de virus
 <p>La plus grande</p> <p>La plus faible</p>	Prions	
	Spores bactériennes	
	Mycobactéries	
	Petits virus non-enveloppés (25-35 nm)	<i>Astroviridae</i> <i>Caliciviridae</i> <i>Parvoviridae</i> <i>Picornaviridae</i>
	Bactéries Gram -	
	Champignons	
	Grands virus non-enveloppés (40-70 nm)	<i>Adenoviridae</i> <i>Papillomaviridae</i> <i>Polyomaviridae</i> <i>Reoviridae</i>
	Bactéries Gram +	
	Virus enveloppés	<i>Hepadnaviridae</i> * <i>Poxviridae</i> *
		<i>Coronaviridae</i> <i>Flaviviridae</i> <i>Herpesviridae</i> <i>Orthomyxoviridae</i> <i>Rhabdoviridae</i> <i>Retroviridae</i>

Tableau 2 : Hiérarchie de la résistance des agents pathogènes aux désinfectants.

La hiérarchie de la résistance peut varier en fonction des désinfectants, du nombre d'agents pathogènes et de la présence de matières organique et inorganique.

* Les virus des familles *Hepadnaviridae* et *Poxviridae* sont plus résistants que la plupart des autres virus enveloppés

Adapté de McDonnell *et al* (2007) ; Sattar *et al.*(2007) ; Maillard *et al.*(2012)

Scansen (2004) et l'amorce « anti-sens » de Helps (2002) et une sonde fluorescente de Zicola (communication personnelle) avec la technologie d'hydrolyse de sondes (Poitras and Houde 2002).

1.3. Familles de désinfectants et produits virucides

D'après la norme Afnor NF T 72-101 (AFNOR 1981) un désinfectant est un produit ou procédé utilisé pour la désinfection ou la décontamination dans des conditions définies et un virucide est un produit ayant la propriété d'inactiver les virus dans des conditions définies (si le produit est sélectif, ceci doit être précisé) ; la désinfection est l'opération au résultat momentané qui permet d'éliminer les microorganismes et/ou d'inactiver les virus indésirables portés par des milieux inertes contaminés, en fonction des objectifs fixés. Le résultat de cette opération est limité aux microorganismes et/ou aux virus présents au moment de l'opération. La désinfection est précédée d'une étape de nettoyage avec un produit détergent qui permet d'éliminer les souillures (Rutala and Weber 2008). Certains détergents peuvent avoir des propriétés bactéricides ou virucides et, dans ce cas, l'étape de nettoyage peut être qualifiée de pré-désinfection. Les principes actifs principaux des détergents sont les tensioactifs. Les détergents ne doivent pas être utilisés pour l'étape de désinfection (Walker 2014).

Les désinfectants agissent par contact direct avec la particule virale et ont trois cibles d'action : l'enveloppe (dans le cas de virus enveloppés), la capsid et le génome du virus. Les virus enveloppés sont d'une manière générale moins résistants que la plupart des virus non-enveloppés (excepté certains virus enveloppés comme les poxvirus et les hepadnavirus) (Tableau 2). L'ensemble des virus utilisés dans le cadre de cette thèse sont des virus non-enveloppés. Le désinfectant peut donc agir sur la capsid virale et/ou sur le génome viral. Le désinfectant peut modifier la structure protéique de celle-ci ou totalement la détruire. Le désinfectant peut également pénétrer la capsid en conservant l'intégrité de celle-ci et dégrader le génome viral.

L'inactivation des virus entériques et de FCV est certainement due à des modifications de la capsid et/ou des effets sur le génome viral bien que les mécanismes exacts d'action des désinfectants sur les virus ne soient toujours pas élucidés (Cliver 2009; Wigginton et al. 2012 ; Hoelzer et al. 2013). La compréhension de ces mécanismes est également compliquée par le fait que des virus apparentés entre eux montrent une sensibilité différente à un même désinfectant ce qui laisse présager que de faibles variations au niveau de la structure ou du génome des virus peuvent avoir un impact sur le degré de résistance d'une souche virale à un désinfectant (Wigginton et al. 2012).

Les halogénés chlorés

Les produits halogénés sont utilisés depuis très longtemps comme désinfectants et le plus connu d'entre eux est l'eau de Javel. Le degré chlorométrique de Gay-Lussac correspond au nombre de litres de chlore gazeux qu'un litre de solution est capable de dégager en présence d'un acide dans des conditions normales de température et de pression. Un degré chlorométrique équivaut à 3,17 g de chlore actif par litre. L'eau de Javel est composée d'hypochlorite de sodium pur (NaClO) et de sel (NaCl).

Le mode d'action de l'hypochlorite de sodium entraînant l'inactivation des bactéries n'est pas clairement établi (McDonnell and Russell 1999; Fatica and Schneider 2009). Les halogénés chlorés possèdent un pouvoir oxydant qui contribue probablement à détruire les protéines structurales et enzymatiques et ils peuvent entraîner des clivages de l'ADN (Rutala and Weber 2008). Le pouvoir oxydant de l'hypochlorite de sodium provoque la destruction des protéines de la capsid, démontrée dans le cas de plusieurs virus non-enveloppés dont le FCV (Shirai et al. 2000; Nuanualsuwan and Cliver 2003) et une destruction de l'acide nucléique de certains virus (Shirai et al. 2000). Ces observations ont été confirmées par l'étude de Wigginton *et al.* (2012) sur le bactériophage MS2 : l'hypochlorite de sodium a provoqué des altérations à la fois au niveau du génome et au niveau des protéines de la capsid. Une suspension à base de chlore (10 mg/L) et pendant un temps de contact de 30 et 60 min a permis l'inactivation totale du HAV tandis que le génome était toujours détecté dans 6 des 7 régions testées et représentatives de l'entièreté du génome de HAV (Li et al. 2002). La région non détectée était la région non codante en 5' (5' NTR) ce qui laisse supposer que certaines régions du génome peuvent être plus sensibles aux halogénés que d'autres et que cette région du génome de HAV joue un rôle important dans l'inactivation du virus (Li et al. 2002).

Les oxydants

Les deux principaux oxydants utilisés en tant que désinfectants sont l'acide peracétique et le peroxyde d'hydrogène. Bien que le peroxyde d'hydrogène soit de plus en plus utilisé en tant que bactéricide et virucide, peu d'informations concernant son mécanisme d'action sont connues (Linley et al. 2012). Le peroxyde d'hydrogène agit comme un oxydant via la production de radicaux libres (radicaux hydroxyles) altérant les lipides, les protéines et l'ADN (McDonnell and Russell 1999). L'acide peracétique est produit à partir d'une réaction de l'acide acétique avec le peroxyde d'hydrogène. Il a un fort pouvoir oxydant et est actif en suspension et sous forme de vapeur.

Il détruit probablement les radicaux sulfhydryles (S-H) et les ponts disulfures des protéines virales (McDonnell and Russell 1999) et altère la capsid virale, effet qui a été démontré sur l'adénovirus de type 2 et le poliovirus de type 1 (Wutzler and Sauerbrei 2000; Sauerbrei et al. 2007). L'acide peracétique, par l'intermédiaire de radicaux libres, affecterait également le génome de certains virus notamment l'adénovirus humain, à une certaine concentration (0,5 %) et après 60 min de temps de contact (Sauerbrei et al. 2004).

Les aldéhydes

La grande majorité des aldéhydes est utilisée en association avec des ammoniums quaternaires. Le mécanisme d'action n'est pas entièrement connu. Cependant l'ARN de poliovirus est résistant tandis que les particules virales perdent leur infectivité après contact avec le glutaraldéhyde (< 2%) donc l'hypothèse du mécanisme d'action serait au niveau de la capsid avec une dénaturation des protéines (Chambon et al. 1992; McDonnell and Russell 1999; McDonnell 2007). Suite à l'observation des propriétés de fixation du glutaraldéhyde (notamment sur des instruments médicaux tels que des endoscopes) et de sa toxicité, il est dorénavant recommandé de choisir une alternative au glutaraldéhyde, comme l'acide peracétique par exemple (Pineau et al. 2008; Rey et al. 2011). Des traitements successifs avec le glutaraldéhyde entraînent une accumulation et/ou une fixation des protéines plus importante qu'avec des solutions à base d'acide peracétique et démontre également l'importance de la phase de nettoyage pour réduire le plus possible le taux de protéines au moment de la désinfection (Pineau et al. 2008).

Les biguanides

Les biguanides sont généralement utilisés sous forme de digluconate ou diacétate de chlorhexidine. L'activité de la chlorhexidine est dépendante du pH et est fortement réduite en présence de matière organique (McDonnell and Russell 1999). Leur activité virucide est limitée avec une activité envers les virus enveloppés via rupture de l'enveloppe et peu d'activité envers les virus non-enveloppés (Maillard 2001; McDonnell 2007). La chlorhexidine est inefficace pour inactiver les rotavirus, le HAV ou le poliovirus (Mbithi et al. 1990; McDonnell and Russell 1999).

Les alcools

Les alcools (éthanol et isopropanol) entrent aussi dans la composition d'autres désinfectants qu'ils potentialisent. L'effet potentialisant a été démontré avec l'ajout d'éthanol à de l'acide peracétique sur l'adénovirus de type 2 (Wutzler and Sauerbrei 2000). L'alcool inactiverait les virus soit via une destruction de l'enveloppe virale soit via une dénaturation des protéines de la capsid (Block 2001; McDonnell 2007; Rutala and Weber 2008; Hoelzer et al. 2013). Le spectre d'activité dépend du type et de la concentration d'alcools. Des concentrations entre 60 et 90 % d'alcool sont les plus efficaces (Gehrke et al. 2004; Cromeans et al. 2014). Des concentrations supérieures à 90 % s'avèrent moins efficaces du fait que les protéines sont difficilement dénaturées en absence d'eau. L'éthanol est largement virucide tandis que l'activité de l'isopropanol serait limitée aux virus contenant des lipides soit les virus enveloppés (Kampf and Kramer 2004). Les virus non-enveloppés sont généralement hydrophiles et certains virus présentent un caractère hydrophile moins marqué. L'éthanol est plus efficace que le propanol face aux virus non-enveloppés hydrophiles, tandis que le propanol devrait être plus efficace vis-à-vis des virus non-enveloppés avec une composante hydrophile réduite (Gehrke et al. 2004). L'éthanol agirait en altérant la capsid virale tandis que l'ARN génomique ne serait pas dégradé après la désinfection (Belliot et al. 2008). Cependant l'effet sur l'ARN génomique reste incertain puisque certaines études ont démontré une diminution du nombre de copies génomiques, de manière plus importante et plus fréquente pour le MNV que pour le FCV (Park et al. 2010).

Les ammoniums quaternaires

Les ammoniums quaternaires (QAC) entrent dans la composition de nombreux produits désinfectants en raison de leur pouvoir détergent. Les ammoniums quaternaires interagissent avec la membrane cytoplasmique des bactéries, leur activité hydrophobe les rend efficace contre les virus contenant des lipides (les virus enveloppés principalement) et ils peuvent aussi inactiver certains virus non-enveloppés (Mbithi et al. 1990; Gerba 2015), le mode d'application du désinfectant pouvant avoir un effet sur l'activité virucide (Bolton et al. 2013). L'activité virucide des QAC proviendrait d'une dénaturation des protéines de capsid (Shirai et al. 2000; Hoelzer et al. 2013) et d'une dégradation des acides nucléiques (McDonnell and Russell 1999; Gerba 2015). Les QAC peuvent aussi entraîner la formation de micelles de particules virales avec plus ou moins d'effet sur l'infectiosité en fonction du virus (Shirai et al. 2000).

1.4. Les différents types de tests de virucidie et la nébulisation

Parmi les tests de virucidie, deux grandes catégories de tests peuvent être utilisées : les tests en suspension et les tests sur support.

Les tests de suspension placent le désinfectant dans des conditions optimales pour agir contre les particules virales. Dans ces conditions, le virus et le produit désinfectant sont largement en contact et les biais liés à la dessiccation ou à l'attachement du virus sont réduits. L'inconvénient du test en suspension est que le virus est mélangé à un large volume de désinfectant ce qui augmente le nombre de contacts entre le virus et le désinfectant avec comme conséquence une inactivation du virus par le désinfectant qui pourrait être plus aisée (Rabenau et al. 2014). Les tests de suspension ne reflètent donc pas les conditions réelles d'utilisation des désinfectants (Rabenau et al. 2014).

La contamination des surfaces environnementales joue un rôle clé dans la transmission des virus (Wu et al. 2005; Li et al. 2011) et peut être la source de nouvelles épidémies (Wu et al. 2005). Plus le virus arrive à résister dans l'environnement, plus la probabilité pour un individu de rencontrer ce virus est grande et donc plus le risque d'infection est important (Dancer 2014). Les tests sur support permettent donc de simuler les conditions pratiques d'utilisation des désinfectants et représentent des moyens plus adaptés pour illustrer les conditions de terrain dans lesquelles les virus sont présents et les désinfectants utilisés. Les résultats obtenus sur des tests sur support sont meilleurs pour prédire l'efficacité d'un désinfectant (Sattar et al. 2003). Dans les tests sur support, le virus sèche sur le support à température ambiante avant l'ajout du désinfectant qui doit donc pénétrer l'inoculum pour atteindre les particules virales (Sattar et al. 2003). Ces tests sur support sont importants pour comprendre comment prévenir la transmission des virus (Li et al. 2011). Contrairement aux tests bactéricides, il n'y a pas de standards européens pour évaluer la virucidie dans des conditions simulant les conditions pratiques telles que des tests sur des supports variés (Rabenau et al. 2014).

Les supports testés peuvent être soit de réels supports *in situ* (sol, mur, matériel médical ou non) soit des matériaux utilisés pour imiter les réels supports (tests *in vitro*). Les études *in situ* concernent surtout des tests bactéricides ou des évaluations de la persistance des virus dans le temps (Andersen et al. 2006; Clay et al. 2006; Orlando et al. 2008; Pereira et al. 2015). Les surfaces testées *in vitro* sont variées et représentent les types de surfaces rencontrées dans les différents établissements susceptibles d'être contaminés par des virus et les surfaces en contact avec les aliments.

Certaines études s'intéressent à l'effet virucide d'un ou plusieurs désinfectants tandis que d'autres étudient la persistance du virus sur la surface. Deux types de surfaces peuvent être testées : les surfaces non poreuses telles que l'acier inoxydable, le verre, le carrelage, les matières plastiques (polychlorure de vinyle (PVC), le formica), le caoutchouc et les surfaces poreuses telles que le bois (Kim et al. 2014; Ha et al. 2015; Mormann et al. 2015; Vimont et al. 2015).

Concernant les tests sur support, la nébulisation est un autre type de test et fait partie des systèmes de désinfection par voie aérienne (« touchless technologies » ou « no-touch automated disinfection systems ») (Otter et al. 2014; Doll et al. 2015). Les technologies les plus couramment employées sont les rayons ultra-violets (UV) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) sous forme de vapeur ou sous forme aérosolisée (Otter et al. 2014; Doll et al. 2015). Deux systèmes utilisant la vapeur existent : le premier à base de vapeur, condensée, qui libère du H_2O_2 jusqu'à ce que l'air soit saturé et que H_2O_2 se dépose sur les surfaces (« hydrogen peroxide vapour », HPV) et le second à base de vapeur non-condensée (« vaporised hydrogen peroxide », VHP) (Otter and Yezli 2011; Otter et al. 2013). La confusion des systèmes est présente dans plusieurs articles et certains auteurs tentent donc de définir les différents systèmes afin d'employer la terminologie adéquate (Otter and Yezli 2011; Otter et al. 2013). Le H_2O_2 peut aussi être répandu sous forme d'aérosol (« aerosolized hydrogen peroxide », aHP). Un aérosol est une dispersion en particules très fines d'un liquide, d'une solution ou d'un solide dans un gaz. La nébulisation ne concerne que la projection d'un liquide sous forme de fines gouttelettes dans l'air à l'aide d'un nébuliseur. Dans cette thèse, le système utilisé est la nébulisation d'un aérosol de H_2O_2 . La plupart des solutions nébulisées contiennent 5-7 % de H_2O_2 (Otter et al. 2014) et la dose recommandée est de $6 \text{ mL} / \text{m}^3$ (Andersen et al. 2006; Holmdahl et al. 2011). Les particules émises par les appareils de nébulisation ont une taille variant de 0,5 à $12 \mu\text{m}$ (Orlando et al. 2008; Fu et al. 2012; Otter et al. 2014).

Dans la thèse, quatre types de tests ont été réalisés : les tests en suspension, sur gants, sur acier inoxydable et la nébulisation (sur acier inoxydable et sur verre).

Les rayons gamma peuvent être utilisés afin de détruire les bactéries, les spores et les virus présents dans les aliments ou sur du matériel médical (Hirneisen et al. 2010; Nims et al. 2011; Moore 2012; Vimont et al. 2014). L'effet envers les virus est moins important en raison de la petite taille de leur génome (Hirneisen et al. 2010). Comme les rayons gamma ne sont pas appropriés pour une décontamination environnementale, leur utilisation ne sera donc pas décrite dans cette thèse.

Objectifs

CHAPITRE 2: OBJECTIFS

Les HuNoV sont considérés comme la principale cause de gastro-entérite d'origine non bactérienne chez l'homme dans le monde. La grande résistance du virus dans l'environnement, la charge virale élevée excrétée dans l'environnement et la faible dose infectieuse sont des facteurs permettant une transmission efficace et rapide entre les individus. Bien que les symptômes soient limités en intensité et dans le temps (24 à 48 h) pour la grande majorité de la population, adulte et immunocompétente, les risques sont plus importants pour les individus aux âges extrêmes de la vie et les personnes immunodéprimées. Les conséquences économiques des infections à NoV sont importantes surtout lors d'épidémies affectant un grand nombre de patients. Les NoV constituent donc un sérieux problème de santé publique et leur contrôle passe par la prévention de l'infection et par l'inactivation du virus. La prévention englobe des mesures efficaces de nettoyage et de désinfection dans tous les lieux où la contamination à NoV pourrait se produire. Les règles d'hygiène de base et une gestion correcte du personnel pendant et après des épidémies à NoV permettent de réduire le nombre de cas. L'inactivation repose sur l'utilisation de désinfectants dont l'activité virucide s'avère efficace sur les HuNoV et sur une meilleure compréhension de leur mécanisme d'action afin de mieux cibler leur utilisation en fonction du contexte.

L'objectif général de la thèse est de déterminer les effets des désinfectants sur les HuNoV, virus pouvant être potentiellement rencontrés dans les industries agro-alimentaires et les établissements de santé. Le récent modèle cellulaire pour étudier le norovirus humain étant actuellement difficile à mettre en place et à reproduire, l'utilisation de virus substituts du norovirus humain a été le moyen utilisé pour obtenir des informations sur l'effet des désinfectants. Les effets des désinfectants sur les norovirus ont été jusqu'à présent étudiés en testant une ou plusieurs conditions parmi les suivantes : le virus substitut (MNV, FCV, TuV, MS2 et HAV), le désinfectant (une ou plusieurs familles de désinfectants), l'effet évalué (sur le titre viral ou sur l'intégrité du génome) et les conditions de tests (en suspension ou sur support). L'originalité de la première et de la deuxième études réside dans une évaluation simultanée des effets de plusieurs désinfectants et modes de désinfection, systématiquement sur deux virus substituts (MNV et FCV), dans différents types de tests (en suspension et sur supports) et via deux paramètres, le titre viral infectieux d'une part et le nombre de copies génomiques d'autre part.

Le premier objectif de la thèse est d'évaluer l'effet virucide de désinfectants sur deux virus substituts du HuNoV, le MNV et le FCV. Les désinfectants testés représentent différentes familles de désinfectants afin d'avoir un panel des désinfectants couramment employés. Les tests de virucidie sont réalisés d'une part dans des tests en suspension, d'autre part dans des tests sur supports. Les tests en suspension ont pour but de rassembler les conditions requises dans les normes Afnor de virucidie et représenter en quelque sorte des conditions optimales pour le désinfectant tandis que les tests sur supports se rapprochent le plus possible des conditions de terrain. L'effet sur le titre viral infectieux reflète des informations concernant préférentiellement la capsidie virale tandis que l'effet sur le nombre de copies génomiques est plus représentatif de l'intégrité des génomes. L'effet sur le nombre de copies génomiques a aussi pour but de démontrer si un facteur de corrélation existe entre une réduction du titre viral et une réduction du nombre de copies génomiques et si cet effet peut être utilisé comme critère d'évaluation de l'effet virucide d'un désinfectant.

Le deuxième objectif de la thèse est d'évaluer un système de désinfection à base de peroxyde d'hydrogène appliqué par un appareil de nébulisation et de comparer les résultats par rapport à une désinfection conventionnelle afin de déterminer si la nébulisation apporte une amélioration dans la désinfection des établissements confrontés au risque d'infection aux NoV. Afin de mimer les conditions de terrain, les effets sur le titre viral infectieux et l'intégrité du génome de MNV et FCV sont évalués sur deux supports différents, le verre et l'inox.

Enfin, le troisième objectif de la thèse est d'explorer le mécanisme d'action des désinfectants sur MNV. En effet, bien que la désinfection des surfaces avec des produits virucides soit un outil important pour lutter contre la propagation d'infections au sein d'établissements variés tels que les industries agro-alimentaires et les établissements de santé, les connaissances sur les mécanismes d'action de ces désinfectants d'un point de vue virucidie sont encore mal connus. Explorer l'effet des désinfectants sur la phase d'attachement de MNV, grâce à la mise en place d'un système basé sur une technique d'immunofluorescence, permet de disposer de données supplémentaires pour mieux comprendre si cette étape du cycle viral est empêchée. L'exploration de ces mécanismes d'action permet de proposer des hypothèses sur le mécanisme d'action des désinfectants pour mieux cibler et développer les désinfectants efficaces afin d'établir des recommandations de désinfection utiles et applicables en cas d'épidémies à NoV.

Section expérimentale

CHAPITRE 3 : SECTION EXPERIMENTALE

3.1. Etude de l'effet virucide de désinfectants sur le norovirus murin et le calicivirus félin, virus substitués des norovirus humains

3.1.1. Effets virucides de sept désinfectants sur le norovirus murin et le calicivirus félin, lors de tests en suspension, sur gants et sur disques en inox

Préambule

Les effets de désinfectants appartenant à différentes familles comme les alcools, les halogénés, les agents oxydants, les ammoniums quaternaires (QAC), les aldéhydes et les biguanides ont été étudiés sur virus substitués des HuNoV. L'effet de ces désinfectants a été évalué sur deux paramètres : le titre viral infectieux déterminé par une méthode des plages de lyse et l'intégrité du génome via le nombre de copies génomiques déterminé par RT-qPCR. Connaître les désinfectants efficaces pour les mains et les surfaces est une aide précieuse pour les établissements de santé et de l'industrie alimentaire et fournit des informations utiles pour la Santé publique.

L'unique modèle de culture *in vitro* pour les HuNoV, développé récemment, ne permet la production de virus qu'en petite quantité et a une faible reproductibilité. Pour ces raisons, l'utilisation de virus substitués des HuNoV est un outil efficace afin d'estimer les effets des désinfectants sur les HuNoV par extrapolation des résultats obtenus avec les virus substitués.

Dans cette étude, les deux principaux virus substitués des HuNoV ont été utilisés, le norovirus murin (MNV) et le calicivirus félin (FCV), dans des tests en suspension, sur gants et sur acier inoxydable.

L'étude a permis de démontrer que trois classes de désinfectants permettaient d'obtenir une réduction du titre viral des deux virus substitués supérieure à $3 \log_{10}$ dans les trois types de tests évalués : les désinfectants composés soit d'halogénés, soit d'agents oxydants soit d'un mélange de QAC avec un alcool et un aldéhyde. Ces trois désinfectants ont aussi montré un effet significatif sur la réduction du nombre de copies génomiques des deux virus substitués dans les trois types de tests.

Le résultat de cette première étude démontre qu'un halogéné, des agents oxydants et un mélange de QAC, d'alcool et d'aldéhyde peuvent être des désinfectants efficaces sur deux virus substitués des HuNoV et leur utilisation est donc recommandée pour la désinfection de surfaces ou de matériels potentiellement contaminés par les HuNoV.

Ce chapitre reprend l'article « Comparative Virucidal Efficacy of Seven Disinfectants Against Murine Norovirus and Feline Calicivirus, Surrogates of Human Norovirus » publié en 2016 dans « Food and Environmental Virology » avec modifications.

Comparative Virucidal Efficacy of Seven Disinfectants Against Murine Norovirus and Feline Calicivirus, Surrogates of Human Norovirus

Food and Environmental Virology (2016)

William Zonta, Axel Mauroy, Frédéric Farnir and Etienne Thiry

Introduction

Noroviruses (NoV), small icosahedral non-enveloped enteric viruses, are members of the family *Caliciviridae* and human noroviruses (HuNoV) are divided into six genogroups (Green 2013). HuNoV are considered to be one of the most common causes of acute nonbacterial gastroenteritis worldwide in humans and are detected in approximately 50% of acute gastroenteritis outbreaks across Europe and the USA (De Wit et al. 2001; Green 2007; Patel et al. 2008; Scallan et al. 2011; Hall et al. 2013b; Ramani et al. 2014). They are also considered to be the leading global cause of foodborne outbreaks, the main involved products being mixed food, seafood, buffet meals and commodities such as fruits and vegetables (EFSA and ECDC 2011; 2012; 2013; Hannah Gould et al. 2013; Hall et al. 2014).

The primary transmission route is the faecal-oral one, either via person-to-person contact or by consumption of contaminated food or water (Lopman et al. 2003; Siebenga et al. 2007; Kroneman et al. 2008; Scallan et al. 2011; Mathijs et al. 2012). Noroviruses are very resistant and can persist for several days in the environment (D'Souza et al. 2006). Due to this high persistence on various inanimate surfaces and on food, coupled with the prolonged shedding of high amounts of virus in faeces and the low infectious dose, person-to-person transmission is very efficient and noroviruses constitute a serious public health issue (Mathijs et al. 2012). Alternatively, food can be contaminated with HuNoV either at the source in the growing or harvesting areas by contaminated irrigation water or during handling or preparation of meals (Tuan Zainazor et al. 2010; Mathijs et al. 2012). Foodhandlers have been involved in almost half of all reported outbreaks and this proportion is probably underestimated (Koopmans and Duizer 2004; Baert et al. 2009b; Tuan Zainazor et al. 2010; Rodriguez-Lazaro et al. 2012; Bellou et al. 2013). HuNoV are commonly identified in closed or semi-closed communities such as hospitals, nursing homes, cruise ships, military and holiday camps, restaurants and catered functions (Glass et al. 2009; Tuan Zainazor et al. 2010; EFSA and ECDC 2012).

The infective dose is not clearly determined, but studies have suggested that about 10 to 100 virus particles are sufficient to induce infection (De Wit et al. 2001; Seymour and Appleton 2001; Bresee et al. 2002; Green 2007; Organization 2008; Doré et al. 2010). More recently, the 50% human infectious dose was estimated to lie between 18 and 1000 viral particles or between 1320 and 2800 genome equivalents for the HuNoV prototype Norwalk strain (Teunis et al. 2008; Glass et al. 2009; Atmar et al. 2014). This infectious dose could vary depending on both the involved strain and the experimental methodology.

No robust cell culture system is available for HuNoV although norovirus RNA is infectious in mammalian cells and a recent study showed the development of an *in vitro* infection model for human noroviruses in human B cells (Duizer et al. 2004b; Malik et al. 2005; Guix et al. 2007; Jones et al. 2014). Due to the complexity and the specific requirements for this new *in vitro* cell culture system for HuNoV, the use of viral surrogates is still required. The murine norovirus (MNV) and the feline calicivirus (FCV) are good candidates as HuNoV surrogates as they can grow in cell culture, are genetically related and share similar physiochemical characteristics (Jiang et al. 1993; Wobus et al. 2006; Kniel 2014). Tulane virus could be considered as an alternative candidate as HuNoV surrogate. However Tulane virus does not belong to the genus *Norovirus* and is less resistant than MNV which is currently considered to be a better surrogate for HuNoV (Hirneisen and Kniel 2013). First isolated in 2003, MNV belongs to genogroup V and infects mice (Karst et al. 2003; Wobus et al. 2006). Although, FCV is a respiratory virus and is more susceptible to low pH and high temperature than MNV, it is also used as HuNoV surrogate (Slomka and Appleton 1998; Doultree et al. 1999; Clarke and Lambden 2000; Green et al. 2000; Bidawid et al. 2003; Nuanualsuwan and Cliver 2003; Malik et al. 2006). The degree of resistance of HuNoV being unknown, the effect of a biocide on HuNoV was inferred from the results obtained on the most resistant HuNoV surrogates.

Preventive methods to control outbreaks of HuNoV are non-specific. They consist of appropriate hygienic measures among foodhandlers and in environmental decontamination (Baert et al. 2009b; Glass et al. 2009; Atmar 2010; Hirneisen et al. 2010). Disinfectants are biocide substances that destroy microorganisms or inhibit their activity on inanimate objects or surfaces (McDonnell and Russell 1999). Previous studies (Doultree et al. 1999; Duizer et al. 2004a; Radford et al. 2007) concluded that ethanol and quaternary ammonium-based products were ineffective disinfectants of FCV and the inactivation of FCV required high concentrations of sodium hypochlorite. MNV is sensitive both to alcohols and to bleach and its resistance to basic and acidic pHs as well as its long-term resistance at room temperature is higher than that of FCV (Cannon et al. 2006; Belliot et al. 2008; Park and Sobsey 2011).

The aim of this study was to infer the efficacy of biocides on HuNoV surrogates from the screening of seven products as virucidal agents by measuring their effect on infectious viral titre and genomic copy number of MNV and FCV in suspension, on gloves and on stainless steel discs. These biocides (six disinfectants and one hand sanitiser) are commercial products and belong to different major biocide groups such as alcohols, halogens, oxidizing agents, quaternary ammonium compounds (QAC), aldehydes, and biguanides (McDonnell and Russell 1999; Maillard 2001).

Table 1: Biocides (substances and commercial products) and their conditions of use during the biocide testing. Products A to F are intended for the disinfection of surfaces and product G for hand disinfection.

	Product	Biocide group	Active ingredient	Final concentration (%) used in this study	Contact time ^a (min)
A	Ethanol	Alcohol	Ethanol	70	5
B	Kenochlore®	Halogen	Sodium hypochlorite	0.5	5
C	Kenocid 2100-S®	Oxidizing agents	Peracetic acid and hydrogen peroxide	0.05 0.2	5
D	Virocid®	Quaternary ammonium compounds Alcohol Aldehyde	Benzylammonium-chloride Didecyldimethyl-ammoniumchloride Isopropanol Glutaraldehyde	0.5	15
E	Kenocid 210®	Quaternary ammonium compound Alcohol Aldehyde	Didecyldimethyl-ammoniumchloride Isopropanol Glutaraldehyde	0.25	15
F	Alcocid®	Alcohol Biguanide	Isopropanol Chlorhexidine	70 0.1-1	To dryness
G	Kenosept G®	Alcohol Biguanide	Isopropanol Chlorhexidine	70 0.5	To dryness

^a: Contact time recommended by manufacturer's instructions

Materials and methods

Viruses and cells

CW1 strain of MNV-1 was propagated in RAW 264.7 cells (ATCC TIB-71) maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (Invitrogen) complemented (DMEMc) with 10% heat-inactivated foetal calf serum (FCS) (BioWhittaker), 2% penicillin (5000 U ml⁻¹) and streptomycin (5000 mg ml⁻¹) (PS; Invitrogen), 1% of a non-essential amino acids preparation (NEAA) (Invitrogen) and 1% HEPES buffer (1 M; Invitrogen).

F9 strain of FCV was propagated in Crandell's feline kidney (CRFK) cells (ATCC CCL-94) (Crandell et al. 1973) maintained in Eagle's minimal essential medium (Invitrogen) complemented (MEMc) with 10% heat-inactivated FCS (BioWhittaker), 2% PS (Invitrogen) and 1% NEAA (Invitrogen).

MNV-1 (CW1) and FCV (F9) were grown for 72 h at 37 °C and 5% CO₂ until cytopathic effect was observed. Viruses were harvested after three freezing/thawing cycles of the cells and the suspensions were centrifuged at 1000 x *g* for 20 min to remove cell debris. Supernatants were collected and purified by ultracentrifugation on a 30% sucrose cushion in a SW28 rotor (Beckman Coulter) at 112000 x *g* for 4 h at 4 °C. Pellets were suspended in phosphate-buffered saline (PBS) overnight at 4°C, aliquoted and stored at - 80°C.

Biocides

Group, substance, final concentration used in the biocide testing and contact time, for each biocidal product, are listed in Table 1. The contact times used were those recommended by the manufacturer's instructions for achievement of a virucidal effect, namely 5 and 15 min. in order to better mimic field conditions.

Cytotoxicity tests

Cytotoxicity of biocidal products was tested by two different ways.

First, a quantitative evaluation of cell viability and metabolism after exposure to biocidal products was performed using Thiazolyl blue (MTT). In this MTT test, the initial biocide concentration was either the undiluted biocide for biocides A, F and G (initial concentration of 100%) or a 1:1 (vol/vol) dilution in cell culture medium for biocides B, C, D and E (initial concentration of 50%). Thus, for the MTT tests, initial concentrations differed from concentrations recommended by the manufacturer in that they were always higher. However, the concentrations used during later biocide testing corresponded to those of manufacturer's instructions (Table 1). Consequently, during the MTT test, cell cultures were exposed to the initial concentration and the nine 10-fold factor dilutions of the biocides. The optical density of the wells was determined at a test wavelength of 570 nm with background subtraction at 630 nm.

Table 2: Primer and probe sets and concentrations used to detect murine norovirus (MNV) and feline calicivirus (FCV) by RT-qPCR; both probes labelled 5' 6-carboxyfluorescein (FAM) and 3' MGB (minor groove binder)

Virus	Primer and probe	Final concentration	Sequence (5'-3')	Location (bp) ^a	Ref.
MNV	FW-ORF1/ORF2	100 nM	CACGCCACCGATCTGTTCTG	4972-4991	(Baert et al. 2008)
	RV-ORF1/ORF2	100 nM	GCGCTGCGCCATCACTC	5064-5080	
	MGB-ORF1/ORF2	200 nM	CGCTTTGGAACAATG	5001-5015	
FCV	p30F	500 nM	TGGATGAACTACCCGCCA	2415-2432	(Scansen et al. 2004)
	p30R	500 nM	CATATGCGGCTCTGATGGCTTGAAACTG	2507-2534	(Helps et al. 2002)
	P30P	200 nM	TCGGTGTTTGATTTGGCCTG	2456-2475	^b

^a Nucleotide positions based on MNV (GenBank access NC_008311.1) and FCV sequences (GenBank access NC_001481.2).

^b Zicola A., personal communication.

For the second evaluation of cytotoxicity, monolayers of RAW 264.7 or CRFK cells were inoculated with three ten-fold dilutions starting from biocide concentrations corresponding to those recommended in manufacturers' instructions (Table 1). After 1h at 37°C, cell monolayers were overlaid with agarose for 72h and incubation continued at the same temperature. Thereby, the biocide dilutions used in this second cytotoxicity test were the same as those used during the following biocide testing. Alteration of cell monolayers was checked after fixation and staining as described in the "infectivity assay" section.

Biocide interaction with virus infectivity

A test of cell sensitivity to biocidal products was performed. To check if exposure to a biocide decreases the cell sensitivity to a virus, virus titrations were performed on either untreated cells or cells treated with biocides. The same dilutions as the ones used in the biocide testing were added to cell monolayers for each biocidal product to have the same contact time of 1 hour as used during the infectivity assay. After washing twice with PBS, cells were inoculated with dilutions of viral suspensions and the viral titre was determined by plaque assay. In parallel, cell monolayers without contact with biocides were inoculated with dilutions of viral suspension. A difference of less than one \log_{10} between the viral titre obtained from infected cells in contact with biocides and from those without contact with biocides indicates an absence of cell sensitivity to biocidal products.

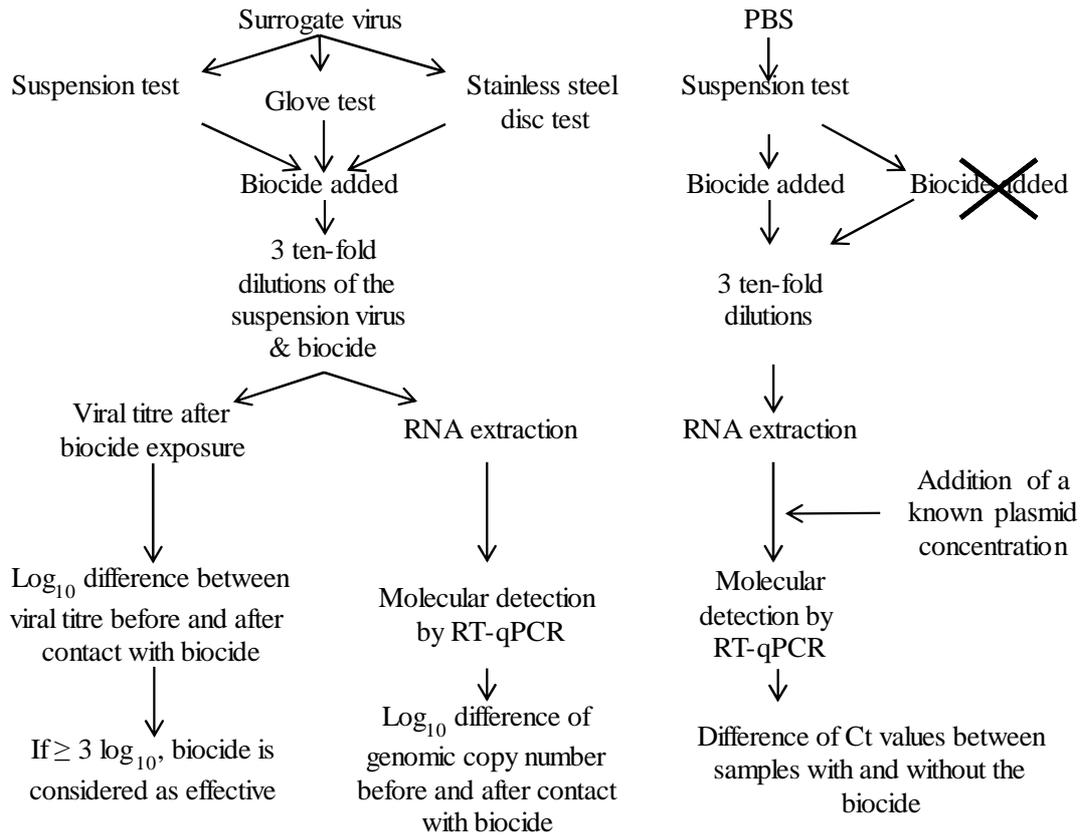
Infectivity assay

Titres of each virus were determined by plaque assay (Hyde et al. 2009). Briefly, cells were split into six-well plates at a density of 10^6 cells per well. On the following day, cells were inoculated with 10-fold dilutions of virus in DMEM (MNV) or MEM (FCV). After 1 hour at 37 °C, the inoculum was removed and the cells were overlaid with 2 ml DMEMc (or MEMc) with 0.5% SeaPlaque agarose. Plates were stored at room temperature for 20 min and then incubated at 37 °C and 5% CO₂ for 72 h. To count the plaques, the overlaying medium was removed and cells were fixed by adding 1 ml of 4% formaldehyde/well for 30 min and then stained with 2 ml of 0.3% crystal violet at room temperature. The same protocol was used to determine the viral titre after biocide exposure.

Molecular detection by RT-qPCR

RNA was extracted from 100 µl of each sample, using the QIAamp viral RNA kit (Qiagen) and following manufacturer's instruction. Total RNA was diluted in 60 µl of elution buffer and stored at -80°C before use. One step RT-qPCR was performed with a C1000 Touch thermocycler (Biorad) on a final volume mix of 25 µl following manufacturing instructions. The RT-qPCR reaction for MNV or FCV consisted of 12.5 µl of 2 x RT-qPCR reaction mix (iScript™ One-Step RT-PCR Kit for Probes, Biorad), MNV primers and probe (at the final concentrations of 100 nM and 200 nM respectively) or

Fig.1 Protocol and steps of the study.



FCV primers and probe (at the final concentrations of 500 nM and 200 nM respectively), 0.5 µl of iScript reverse transcriptase, 5 µl of RNA template and water to 25 µl.

Cycle conditions were as follows: 10 min at 50°C, 5 min at 95°C and 45 cycles of 10 seconds at 95°C and 30 seconds at 60°C. The primers and probes used to detect MNV and FCV are detailed in Table 2. For quantification, each amplicon (FCV and MNV) was first cloned into pGEM-T easy (Promega®). Cloning reactions were analysed by sequencing after plasmid purification with the High pure plasmid isolation kit (Roche). Plasmid DNA was quantified via nanodrop and converted into genomic copies. Serial dilutions were then prepared (from 10⁻⁵ to 10⁻⁹) and tested for the determination of standard curves for MNV-1 and FCV quantification.

Biocide testing

In this experiment, we used two different surrogate viruses, MNV and FCV, and three different tests, i.e. suspension, glove and stainless steel disc tests. The method was adapted from the AFNOR norm EN 14476 and is illustrated in Fig. 1 (AFNOR 2007). Clean conditions were simulated by addition of 0.3% bovine serum albumin (BSA). BSA mimicked the presence of organic load that could be present in field conditions on surfaces and could interfere with the activity of the disinfectant.

For each experiment, a sample without biocidal product was used as a control sample, following the same steps as described for the other samples, and was used for comparison with the samples containing one of the seven biocidal products.

For suspension tests, the average initial virus titre for MNV and FCV was 1.4x10⁷ and 1.1x10⁸ pfu/ml respectively and the inoculum volume was 10 or 15 µl. For suspension tests, a mixture containing 10% of the virus (either MNV or FCV), 10% of BSA (to reach a final concentration of 0.3%) and 80% of the biocidal product at the specific concentration, recommended by the manufacturer's instructions (Table 1), was prepared. After determination of a contact time for each biocidal product (Table 1), the tested suspension was diluted three times by a 10-fold factor in cell culture media (at 4°C) in order to reduce both the activity of the biocide and the cytotoxic effect. From these three dilutions of virus-biocide suspensions, a first aliquot was used for an infectivity assay (500 µl as inoculum in a 6-well plate) and a second aliquot was used for molecular detection (100 µl for the RNA extraction followed by the one-step RT-qPCR).

A biocidal product with a log₁₀ reduction equal to or higher than three was equivalent to a 99.9% decrease of infectious titre and was considered effective following the Guidelines on the application of general principles of food hygiene to the control of viruses in food (Codex Alimentarius 2012). Each biocidal product was tested in three independent experiments.

The efficiency of a disinfectant could vary depending on the test. Suspension tests for virucidal activity do not exactly reflect field conditions. To better mimic these field conditions, two other experiments were performed using gloves and stainless steel discs as tested surfaces. For the gloves and stainless steel discs tests, a mixture containing 10% of the virus (either MNV or FCV) and 10% of BSA (to reach a final concentration of 0.3%) was deposited at the centre of the surface (either glove or stainless steel disc) and allowed to dry for 30 min under a laminar flow.

Stainless steel discs were washed and sterilized by autoclaving before use. Fingers of sterile latex gloves (KimtechPure, Kimberly-Clark) were used to form a tube and were inverted to mix virus and biocide on the external surface of the glove. Then the biocide was deposited on the same area during a biocide-dependent contact time (Table 1). In the glove test, cell culture media was directly added on the gloves and pipetted several times to recover the virus. In the stainless steel disc test, the discs (Stainless steel disc, AISI 304 cold rolled, Laserflash sa) were placed into 6-well plates and DMEMc (for MNV) or MEMc (for FCV) was added to dilute the biocide and to stop its effect. The plate was placed on a rocking platform for 15 min at 4°C. From this first dilution, two further 10-fold dilutions were performed and finally, all dilutions were used for the infectivity assay and for the quantification of genomic copies as previously described for the suspension tests.

To evaluate the putative inhibitory effect of each biocide on the RT-qPCR, all the steps of the biocide test were also performed, starting with a suspension of one of the seven biocidal products, the BSA and PBS instead of the surrogate virus. After the extraction process on the three dilutions, a RT-qPCR was performed on these samples, containing a part of the extraction and a part of the DNA plasmid corresponding to the surrogate virus. The Ct values were compared with the Ct values of RT-qPCR performed only with the DNA plasmid without any remaining part of the biocides.

Data analysis

Each assay was performed in three independent experiments and, within each experiment, three replicates were tested by RT-qPCR. For the same test, samples treated with a disinfectant and untreated samples were compared and the results were expressed as log reduction. Thus, the virus elution efficiency should not interfere with our results and statistical analyses. Log reduction was expressed as mean \pm standard deviation. Statistical analyses were performed using SAS software, version 9.3. Genomic copy number and infectivity were modelled using a linear model involving two factors - namely, the biocide, the virus and their interaction - for each condition. Differences between biocides were assessed using least square means and their standard errors, using a Tukey correction for multiple comparisons. Results were considered significant when the associated p-values were lower than 0.05 or 0.01.

Table 3: Determination of the cytotoxicity of biocides in Raw and CrFK cells by MTT test. Results represent the average optical density (O.D.) measured in 8 wells at 570 nm with background subtraction at 630 nm.

Biocide group	Biocide	Cells	O.D. for initial biocide concentration ^c	O.D. for ten-fold dilutions of the initial biocide concentration ^{ab}									O.D. for reference (untreated cells)	
				10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹		
Alcohol	A	Raw	0.08	0.09	<u>0.27</u>	0.60	0.47	0.54	0.50	0.39	0.36	0.34	0.26	0.37
		CrFK	0.09	0.10	<u>0.20</u>	0.55	0.41	0.39	0.39	0.29	0.31	0.27	0.21	0.31
Halogen	B	Raw	0.08	0.13	<u>1.88</u>	1.76	1.62	1.36	1.12	1.87	1.41	1.41	1.34	1.02
		CrFK	0.04	0.13	0.52	<u>0.94</u>	0.92	0.91	0.93	0.98	0.92	0.72	0.66	0.63
Peracetic acid, hydrogen peroxide	C	Raw	0.05	0.10	<u>1.73</u>	2.01	1.92	1.72	1.80	1.40	1.70	1.70	1.19	0.96
		CrFK	0.05	0.10	0.36	<u>0.92</u>	0.93	0.98	0.92	0.87	0.95	0.92	1.02	0.59
Quaternary ammonium compounds, alcohol, aldehyde	D	Raw	0.26	0.11	0.07	0.08	<u>0.82</u>	1.88	1.49	1.43	1.88	2.23	1.82	0.85
		CrFK	0.26	0.11	0.19	<u>0.90</u>	0.97	0.93	0.98	0.96	1.01	1.00	0.87	0.88
	E	Raw	0.23	0.11	0.09	0.09	<u>1.97</u>	2.38	2.14	1.80	2.27	1.86	1.44	1.84
		CrFK	0.05	0.11	0.36	<u>0.87</u>	0.90	0.89	0.93	0.82	0.92	0.89	1.00	0.58
Alcohol, biguanide	F	Raw	0.07	<u>1.76</u>	1.91	1.44	1.63	1.80	1.30	1.68	1.55	1.57	1.19	1.16
		CrFK	0.06	0.06	0.11	<u>0.37</u>	0.47	0.58	0.63	0.57	0.61	0.52	0.47	0.37
	G	Raw	0.08	0.14	<u>1.98</u>	1.88	1.37	1.43	1.32	1.72	1.34	1.46	1.43	1.13
		CrFK	0.08	<u>0.94</u>	1.05	1.01	0.93	1.03	0.79	0.98	0.57	0.49	0.77	0.65

^a The underlined O.D. correspond to the highest non-cytotoxic biocide concentration.

^b O.D. in bold correspond to the biocide concentration used in the biocide testing to determine the log reductions of both pfu and genomic copy number.

^c The initial concentration was either the undiluted biocide (biocides A, F and G) or the biocide mixed 1:1 with cell culture media in 50% (vol/vol) suspension (biocides B, C, D and E).

Results

Evaluation of biocide cytotoxicity

The highest non-cytotoxic concentrations of biocides after quantitative evaluation of cell viability and metabolism with MTT were 10^{-1} (biocide F), 10^{-2} (biocides A, B, C and G) and 10^{-4} (biocides D and E) on RAW 264.7 cells and 10^{-1} (biocide G), 10^{-2} (biocide A) and 10^{-3} (for biocides B, C, D, E and F) on CRFK cells (Table 3).

The biocide dilutions used in the following biocide testing were the 100- and 1000-fold dilutions of biocides which had already been diluted to concentrations recommended for use by the manufacturer (presented in Table 1).

Since these 100- and 1000-fold dilutions corresponded to concentrations lower than (or equal to) the non-cytotoxic ones previously evaluated by MTT test (Table 3), they were logically also not cytotoxic.

The microscopic examination of the cell monolayers confirms the results obtained with the MTT test.

Biocide interaction with virus infectivity

When the residual effect of biocidal products was tested on the virus infectivity, the difference between infectious viral titres determined on cells in contact with biocides and cells without biocides was lower than $1 \log_{10}$, showing that, in the infectivity assay, a reduction of infectious viral titre reflects biocide effect only on the virus.

Biocide interaction with molecular detection

The Ct values were compared for samples containing either plasmids and biocide or only plasmids. Theoretically, delta Ct lower than 3.3 means a difference of genomic copy number lower than $1 \log_{10}$. In our study, the mean delta Ct were 1.5 ± 1.3 and 1.2 ± 0.7 for MNV and FCV, respectively. These findings showed that the presence of biocide residue within the experiment assay had non-significant effect on neither MNV nor FCV molecular detection.

Biocide efficacy

The log reduction and standard deviation of both the infectious viral titre and the genomic copy number of MNV and FCV during the three different tests are given in Table 4. According to both Codex Alimentarius and Afnor Norm 14476, a biocide was considered effective when the log reduction of the infectious viral titre was $\geq 3 \log_{10}$ (AFNOR 2007, Codex Alimentarius 2012).

Table 4: Results on log reduction and standard deviation of infectious viral titre and of genomic copy number of murine norovirus (MNV) and feline calicivirus (FCV) in suspension (s), on gloves (g) and on stainless steel discs (d)

Biocide group	Biocide	Test	Log ₁₀ reduction of			
			MNV		FCV	
			Infectious viral titre	Genomic copy number	Infectious viral titre	Genomic copy number
Alcohol	A	s	≥ 3.85 ± 0.0*	2.14 ± 1.4	≥ 3.52 ± 0.1*	0.03 ± 0.1
		g	≥ 5.18 ± 0.0*	2.94 ± 1.4	≤ 2.35 ± 0.2	0.42 ± 1.1
		d	≥ 3.69 ± 0.5*	2.08 ± 0.4	≤ 2.15 ± 0.4	0.04 ± 0.3
Halogen	B	s	≥ 3.85 ± 0.0*	6.07 ± 1.9	≥ 4.70 ± 0.0*	3.88 ± 2.4
		g	≥ 4.87 ± 0.5*	2.65 ± 1.4	≥ 4.47 ± 0.3*	2.68 ± 1.2
		d	≥ 3.69 ± 0.5*	2.3 ± 0.7	≥ 3.77 ± 0.8*	2.39 ± 1.1
Peracetic acid, hydrogen peroxide	C	s	≥ 3.85 ± 0.0*	0.68 ± 0.4	≥ 4.70 ± 0.0*	2.30 ± 0.3
		g	≥ 4.36 ± 0.1*	0.43 ± 0.3	≥ 4.72 ± 0.8*	1.18 ± 0.8
		d	≥ 3.69 ± 0.5*	1.63 ± 0.2	≥ 4.77 ± 0.8*	1.04 ± 0.1
Quaternary ammonium compounds, alcohol, aldehyde	D	s	≥ 3.85 ± 0.0*	0.62 ± 0.3	≥ 4.48 ± 0.4*	2.08 ± 0.3
		g	≥ 5.18 ± 0.0*	1.22 ± 0.3	≥ 4.09 ± 0.8*	0.63 ± 0.9
		d	≥ 3.69 ± 0.5*	1.19 ± 0.7	≥ 4.36 ± 1.1*	0.08 ± 0.2
Alcohol, biguanide	E	s	≥ 3.85 ± 0.0*	0.58 ± 0.3	≥ 3.70 ± 1.7*	1.46 ± 0.8
		g	≥ 4.54 ± 0.6*	0.81 ± 0.4	≤ 2.50 ± 0.3	0.38 ± 0.7
		d	≥ 3.32 ± 0.2*	0.79 ± 0.6	≤ 2.89 ± 1.6	0.06 ± 0.2
Alcohol, biguanide	F	s	≥ 3.85 ± 0.0*	-0.37 ± 0.4	≥ 3.94 ± 0.2*	0.07 ± 0.1
		g	≤ 2.95 ± 0.8	-0.02 ± 0.3	≤ 2.25 ± 0.3	-0.11 ± 0.6
		d	≥ 3.69 ± 0.5*	-0.92 ± 0.5	≤ 2.51 ± 0.8	0.02 ± 0.3
Alcohol, biguanide	G	s	≥ 3.85 ± 0.0*	1.29 ± 1.2	≤ 1.80 ± 0.2	0.42 ± 0.6
		g	≤ 2.85 ± 1.2	0.68 ± 0.3	≤ 2.25 ± 0.3	0.24 ± 0.5
		d	≥ 3.69 ± 0.5*	1.02 ± 0.8	≤ 2.15 ± 0.4	0.21 ± 0.6

* log₁₀ reduction of infectious viral titre > 3 log₁₀

≥ indicates that the virus titre was below the detection limit

Effect on MNV infectivity

In suspension and in stainless steel disc tests, the \log_{10} reduction of MNV infectious viral titre was between 3.32 and 3.85 for the biocidal products A, B, C, D, E, F and G (Table 4). In the glove tests, the \log_{10} reduction of MNV infectious viral titre was higher than 4.36 \log_{10} for the biocidal products A, B, C, D and E and lower than 2.95 \log_{10} for the biocidal products F and G (Table 4). In both suspension tests and disc tests, no significant difference was observed between the biocides. For the glove tests, the \log_{10} reduction of biocides A to E was significantly different ($P < 0.01$) from biocides F and G (Fig. 2).

Effect on MNV genome integrity

The average reduction of genomic copy number was higher than 2 \log_{10} for biocidal products A and B, between 1 and 2 \log_{10} for biocidal products D and G and lower than 1 \log_{10} for biocidal products C and E. For the biocidal product F, there was no \log_{10} reduction (Table 4). The effect of all biocidal products on MNV genomic copy number was significant ($P < 0.01$) in comparison to the control sample (Fig. 3). There was no significant difference between biocides C, D, E and G. On the contrary, the effect on MNV genomic copy number of biocides C, D, E and G was significantly different to biocides A and B on the one hand and to biocide F on the other hand ($P < 0.01$) (Fig. 3).

Effect on FCV infectivity

The \log_{10} reduction with biocidal products B, C and D was higher than 4.09 \log_{10} in the three different tests, except in the case of biocide B on disc tests with a 3.77 \log_{10} reduction (Table 4). The \log_{10} reduction with biocides A, E, and F ranged from 3.52 to 3.94 in suspension tests and was lower than 2.89 \log_{10} in glove and disc tests. The \log_{10} reduction with the biocidal product G was lower than 2.25 \log_{10} in the three different tests. In suspension tests, the \log_{10} reduction of biocides A, B, C, D, E and F was significantly different to the \log_{10} reduction of biocide G ($P < 0.01$) and the \log_{10} reduction of biocides B and C was also significantly different to the \log_{10} reduction of biocides A ($P < 0.01$), E and F ($P < 0.05$) (Fig. 2). The \log_{10} reduction of biocide D was significantly different to the \log_{10} reduction of biocides A ($P < 0.05$) and G ($P < 0.01$). For the glove tests the \log_{10} reduction of biocides B, C and D was significantly different to the \log_{10} reduction of biocides A, E, F and G ($P < 0.01$). For the disc tests, the \log_{10} reduction of biocides B ($P < 0.05$), C ($P < 0.01$) and D ($P < 0.01$ with A and G; $P < 0.05$ with F) was significantly different to the \log_{10} reduction of biocides A, F and G and the \log_{10} reduction of biocide C was also significantly different to the \log_{10} reduction of biocide E ($P < 0.05$) (Fig. 2).

Fig.2 : Comparison of the effect of the biocidal products (A to G) on MNV and FCV titres. S: significant difference with p-values < 0.01 (**) or < 0.05 (*); NS: no significant difference; A: Ethanol; B: Sodium hypochlorite; C: Peracetic acid and hydrogen peroxide; D: Benzylammoniumchloride, didecydimethylammonium chloride, isopropanol and glutaraldehyde; E: Didecydimethylammonium chloride, isopropanol and glutaraldehyde; F: Isopropanol and chlorhexidine; G: Isopropanol and chlorhexidine.

	MNV	FCV																																																																																																																																
Suspension tests	No significant difference between biocide products	<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>A</th> <th>B</th> <th>C</th> <th>D</th> <th>E</th> <th>F</th> <th>G</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <th>A</th> <td></td> <td>S**</td> <td>S**</td> <td>S*</td> <td>NS</td> <td>NS</td> <td>S**</td> </tr> <tr> <th>B</th> <td></td> <td></td> <td>NS</td> <td>NS</td> <td>S*</td> <td>S*</td> <td>S**</td> </tr> <tr> <th>C</th> <td></td> <td></td> <td></td> <td>NS</td> <td>S*</td> <td>S*</td> <td>S**</td> </tr> <tr> <th>D</th> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td>NS</td> <td>NS</td> <td>S**</td> </tr> <tr> <th>E</th> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td>NS</td> <td>S**</td> </tr> <tr> <th>F</th> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td>S**</td> </tr> <tr> <th>G</th> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table>		A	B	C	D	E	F	G	A		S**	S**	S*	NS	NS	S**	B			NS	NS	S*	S*	S**	C				NS	S*	S*	S**	D					NS	NS	S**	E						NS	S**	F							S**	G																																																																							
	A	B	C	D	E	F	G																																																																																																																											
A		S**	S**	S*	NS	NS	S**																																																																																																																											
B			NS	NS	S*	S*	S**																																																																																																																											
C				NS	S*	S*	S**																																																																																																																											
D					NS	NS	S**																																																																																																																											
E						NS	S**																																																																																																																											
F							S**																																																																																																																											
G																																																																																																																																		
Glove tests	<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>A</th> <th>B</th> <th>C</th> <th>D</th> <th>E</th> <th>F</th> <th>G</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <th>A</th> <td></td> <td>NS</td> <td>NS</td> <td>NS</td> <td>NS</td> <td>S**</td> <td>S**</td> </tr> <tr> <th>B</th> <td></td> <td></td> <td>NS</td> <td>NS</td> <td>NS</td> <td>S**</td> <td>S**</td> </tr> <tr> <th>C</th> <td></td> <td></td> <td></td> <td>NS</td> <td>NS</td> <td>S**</td> <td>S**</td> </tr> <tr> <th>D</th> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td>NS</td> <td>S**</td> <td>S**</td> </tr> <tr> <th>E</th> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td>S**</td> <td>S**</td> </tr> <tr> <th>F</th> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td>NS</td> </tr> <tr> <th>G</th> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table>		A	B	C	D	E	F	G	A		NS	NS	NS	NS	S**	S**	B			NS	NS	NS	S**	S**	C				NS	NS	S**	S**	D					NS	S**	S**	E						S**	S**	F							NS	G								<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>A</th> <th>B</th> <th>C</th> <th>D</th> <th>E</th> <th>F</th> <th>G</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <th>A</th> <td></td> <td>S**</td> <td>S**</td> <td>S**</td> <td>NS</td> <td>NS</td> <td>NS</td> </tr> <tr> <th>B</th> <td></td> <td></td> <td>NS</td> <td>NS</td> <td>S**</td> <td>S**</td> <td>S**</td> </tr> <tr> <th>C</th> <td></td> <td></td> <td></td> <td>NS</td> <td>S**</td> <td>S**</td> <td>S**</td> </tr> <tr> <th>D</th> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td>S**</td> <td>S**</td> <td>S**</td> </tr> <tr> <th>E</th> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td>NS</td> <td>NS</td> </tr> <tr> <th>F</th> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td>NS</td> </tr> <tr> <th>G</th> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table>		A	B	C	D	E	F	G	A		S**	S**	S**	NS	NS	NS	B			NS	NS	S**	S**	S**	C				NS	S**	S**	S**	D					S**	S**	S**	E						NS	NS	F							NS	G							
	A	B	C	D	E	F	G																																																																																																																											
A		NS	NS	NS	NS	S**	S**																																																																																																																											
B			NS	NS	NS	S**	S**																																																																																																																											
C				NS	NS	S**	S**																																																																																																																											
D					NS	S**	S**																																																																																																																											
E						S**	S**																																																																																																																											
F							NS																																																																																																																											
G																																																																																																																																		
	A	B	C	D	E	F	G																																																																																																																											
A		S**	S**	S**	NS	NS	NS																																																																																																																											
B			NS	NS	S**	S**	S**																																																																																																																											
C				NS	S**	S**	S**																																																																																																																											
D					S**	S**	S**																																																																																																																											
E						NS	NS																																																																																																																											
F							NS																																																																																																																											
G																																																																																																																																		
Stainless steel disc tests	No significant difference between biocide products	<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>A</th> <th>B</th> <th>C</th> <th>D</th> <th>E</th> <th>F</th> <th>G</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <th>A</th> <td></td> <td>S*</td> <td>S**</td> <td>S**</td> <td>NS</td> <td>NS</td> <td>NS</td> </tr> <tr> <th>B</th> <td></td> <td></td> <td>NS</td> <td>NS</td> <td>NS</td> <td>S*</td> <td>S*</td> </tr> <tr> <th>C</th> <td></td> <td></td> <td></td> <td>NS</td> <td>S*</td> <td>S**</td> <td>S**</td> </tr> <tr> <th>D</th> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td>NS</td> <td>S*</td> <td>S**</td> </tr> <tr> <th>E</th> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td>NS</td> <td>NS</td> </tr> <tr> <th>F</th> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td>NS</td> </tr> <tr> <th>G</th> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table>		A	B	C	D	E	F	G	A		S*	S**	S**	NS	NS	NS	B			NS	NS	NS	S*	S*	C				NS	S*	S**	S**	D					NS	S*	S**	E						NS	NS	F							NS	G																																																																							
	A	B	C	D	E	F	G																																																																																																																											
A		S*	S**	S**	NS	NS	NS																																																																																																																											
B			NS	NS	NS	S*	S*																																																																																																																											
C				NS	S*	S**	S**																																																																																																																											
D					NS	S*	S**																																																																																																																											
E						NS	NS																																																																																																																											
F							NS																																																																																																																											
G																																																																																																																																		

Effect on FCV genome integrity

The \log_{10} reductions of FCV genomic copy number with the biocide product B were highest, ranging from 2.39 to 3.88 depending on the different tests (Table 4). The \log_{10} reductions of FCV genomic copy number with biocidal products C, D and E ranged from 1.04 to 2.30, 0.08 to 2.08 and 0.06 to 1.46 respectively (Table 4). The effects of biocidal products B, C, D and E on FCV genomic copy number were significant ($P < 0.01$) (Fig. 3). The \log_{10} reductions of FCV genomic copy number with biocidal products A, F and G ranged from 0.03 to 0.42, from -0.11 to 0.07, and from 0.21 to 0.42 respectively (Table 4).

Biocidal products A, F and G had no significant effect on genomic copy number (Fig. 3).

Discussion

Two HuNoV surrogates, namely MNV and FCV, were used to evaluate the biocidal effect of seven fully formulated products, representing the major groups of disinfectants.

When, as criteria of efficacy, a log reduction > 3 of the infectious viral titre on both surrogates and in the three tests is used, the most efficacious disinfectants in this study appeared to be biocidal products B, C and D, representing the halogens, the oxidizing agents group and a mix of QAC, alcohol and aldehyde, respectively. In addition, these three disinfectants also elicited a significant effect on genomic copy number for both surrogate viruses and in all three tests.

Biocide B, containing sodium hypochlorite, is often used to disinfect water and environmental surfaces. Its significant effect on infectious viral titre and genomic copy number confirms results of other studies which also revealed a significant effect on HuNoV genome integrity (Girard et al. 2010; Lim et al. 2010; Park and Sobsey 2011; Hirneisen and Kniel 2013; Tung et al. 2013).

Biocide C contains peracetic acid (PAA) and hydrogen peroxide (H_2O_2), representing the oxidizing agents and reduced the MNV and the FCV viral titres by more than 3 and 4 \log_{10} respectively; these findings are consistent with several studies (Baert et al. 2009c; Fraisse et al. 2011; Vimont et al. 2015). The effect on the genomic copy number was significant but lower than that of other biocidal products such as sodium hypochlorite for example; again, this finding is in accordance with the results of Fraisse et al. (2011). FCV seems to be more sensitive to sodium hypochlorite and to PAA than MNV (Gulati et al. 2001; Baert et al. 2009c; D'Souza and Su 2010; Fraisse et al. 2011; Park and Sobsey 2011; Kim et al. 2012b; Vimont et al. 2015); therefore FCV could overestimate the effect of these two biocides on HuNoV.

Biocide D, composed of glutaraldehyde, QAC and isopropanol, significantly reduced the infectious viral titre and the genomic copy number of both surrogates. Previously published results may be controversial, reporting a significant effect either on MNV or FCV infectious titres (Doultree et al. 1999; Jimenez and Chiang 2006; Belliot et al. 2008; Girard et al. 2010; Whitehead and McCue 2010; Su and D'Souza 2012). These apparently contradictory results could be explained by the biocide concentrations, the kind of QAC, the contact time and the nature of the surfaces tested. The difference between biocide D (significant reduction of both MNV and FCV infectious titres) and biocide E (significant reduction of MVN infectious titre only) could be explained by the chemical composition of the QAC used. Glutaraldehyde significantly reduced MNV and FCV titres by $\geq 6 \log_{10}$ at a 2% concentration (D'Souza and Su 2010) while the reduction in MNV and in FCV titres was $\leq 3 \log_{10}$ after the use of QAC (Belliot et al. 2008; Girard et al. 2010; Whitehead and McCue 2010). In this study, biocide D, a mixture containing glutaraldehyde, QAC and isopropanol, showed a significant effect on the infectious titre with a log reduction $\geq 3 \log_{10}$ on both surrogates and in the three tests, as well as a significant effect on the genome integrity ($P < 0.01$). Therefore, interactions between different substances, e.g. providing synergistic or antagonistic effects, are likely to exist and should be taken into account. Comparisons between studies on biocidal products are difficult due to the large number of disinfectants and the variety of conditions of use: concentration, contact time, test set-up and surrogate virus.

The mechanisms of action of these disinfectants showing a significant efficiency on both MNV and FCV surrogates are not fully clarified. Previous studies demonstrated a virucidal activity of halogens by a modification of capsid integrity as it is observed with PAA and glutaraldehyde (O'Brien and Newman 1979; McDonnell and Russell 1999). H_2O_2 acts as an oxidant on lipids, proteins and DNA (McDonnell and Russell 1999; Wutzler and Sauerbrei 2000). After PAA and H_2O_2 treatments of HuNoV faecal samples, HuNoV binding was only reduced by less than $1 \log_{10}$. These results suggest that binding was not affected and capsids were not altered by these oxidizing agents (Kingsley et al. 2014). The mechanisms of action of glutaraldehyde on viruses are still unknown but probably also involve cross-linking of proteins, RNA and DNA (Chambon et al. 1992; McDonnell and Russell 1999). QAC have an effect on lipids and enveloped viruses and, in studies on bacteriophages, QAC had an effect on infectivity but did not affect the genomic DNA (Doultree et al. 1999; McDonnell and Russell 1999).

Alcohols and chlorhexidine associated with alcohol had differing effects on the two surrogates in the three tests. Biocide A (alcohol) had a significant effect on infectious viral titre and genomic copy

number of MNV but no significant effect on these same parameters of FCV, thus confirming previous studies (Park et al. 2010; Tung et al. 2013). The biocide products F and G are an association of alcohol and chlorhexidine (which is a major member of the biguanide group). They produced a significant effect on MNV in suspensions and stainless steel disc tests but not on FCV (except biocide F in the suspension test). Several studies (Park et al. 2010; Iwasawa et al. 2012; Matsuhira et al. 2012) showed poor effects of chlorhexidine on both MNV and FCV viral titres. Our results are in accordance with this with regard to FCV. The short contact time used in previous studies (< 5 min) could explain the absence of any significant effect of alcohol (D'Souza and Su 2010) and of chlorhexidine (Park et al. 2010; Iwasawa et al. 2012; Matsuhira et al. 2012) on the infectious titre of MNV and FCV. Our results as well as previous studies confirmed that MNV is more susceptible to alcohol and chlorhexidine than FCV (Park et al. 2010; Tung et al. 2013; Cromeans et al. 2014). These data also suggest differences between MNV and FCV regarding viral capsid integrity (Cannon et al. 2006; Park et al. 2010).

While the results above present useful information with regard to effects of disinfectants on HuNoV surrogates, it must be noted that this work has some limitations. Obviously, results extrapolated from HuNoV surrogates should always be carefully interpreted, as they are not directly obtained for HuNoV. However since these surrogates are genetically related to HuNoV, they still remain the best approach for evaluation of the effect of disinfectants on HuNoV. Information obtained from other existing HuNoV surrogates (e.g. Tulane virus) could contribute to a better understanding of disinfectant effects against HuNoV. The second limitation is the use of only one parameter per test condition as a fixed temperature, contact time and disinfectant concentration were maintained per disinfectant. It could be interesting to comprehensively analyse a possible effect of different conditions of application on infectious viral titre and genomic copy number. Thus, determination of a shorter efficient contact time could be interesting for practical use.

In conclusion, halogen compounds, oxidizing agents and a combination of QAC, alcohol and aldehyde showed the best biocide activity for the disinfection of surfaces and materials. The information on the lowest efficient concentration and the shortest contact time of these three biocides on HuNoV surrogates will be useful during selection of the most appropriate disinfectant against HuNoV. Both harmonisation and standardisation of test conditions could be beneficial to compare biocide efficacy. In addition, hand and surface disinfection are not the only targets to control and reduce HuNoV contamination in food industry and human healthcare centres. These measures should be combined

with an optimal management of foodhandlers hygiene and with optimised detection of HuNoV at critical points of possible contamination.

Acknowledgments

We thank Professor Herbert Virgin and Dr Larissa Thackray (Washington University, St Louis, MO, USA) for providing the MNV isolates and RAW 264.7 cells; Dr Elisabeth Mathijs and Lorène Dams for their help with MNV and FCV cell cultures, respectively and Dr Louisa Ludwig and Dr Léa Morvan for the careful English proofreading of the manuscript. This project was funded by the Federal Public Service (FPS) Health, Food Chain Safety and Environment, in Belgium (RT 10/6 TRAVIFOOD) and by the research funds of the University of Liège.

The biocides (except the biocide A) were kindly provided by the Cid Lines company (Ieper, Belgium).

Conflict of Interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

CHAPITRE 3 : SECTION EXPERIMENTALE

3.1. Etude de l'effet virucide de désinfectants sur le norovirus murin et le calicivirus félin, virus substitués des norovirus humains

3.1.2. Evaluation de l'effet virucide du peroxyde d'hydrogène contre le norovirus murin et le calicivirus félin via un système de nébulisation

Préambule

Après avoir déterminé les désinfectants efficaces sur les deux principaux virus substitués des HuNoV, MNV et FCV, dans des conditions de tests en suspension et sur support, un autre type de désinfection, la nébulisation de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), a été évaluée. Les surfaces contaminées sont une source d'infection et participent à la transmission des virus et du HuNoV en particulier.

La nébulisation de H₂O₂ est un outil de désinfection complémentaire au processus traditionnel de désinfection réalisé dans les établissements de santé et les industries agro-alimentaires. L'effet de la nébulisation a été évalué sur les deux principaux virus substitués des HuNoV, le MNV et le FCV.

Ces virus ont été déposés puis laissés séchés sur deux types de surfaces (le verre et l'acier inoxydable) afin de simuler les conditions de terrain. Le nombre de particules infectieuses et le nombre de copies génomiques présentes avant et après la nébulisation a été déterminé et les résultats exprimés sous forme de log de réduction.

La nébulisation est efficace et peut être considérée comme virucide puisque la réduction moyenne du titre viral des deux virus substitués est supérieure à 4 log₁₀. Les réductions du nombre de copies génomiques ont été relativement peu importantes et confirment donc que ce paramètre n'est pas un outil utile dans la détermination de l'efficacité virucide d'un désinfectant à base de peroxyde d'hydrogène.

La nébulisation de peroxyde d'hydrogène induit un effet virucide sur les deux virus substitués du HuNoV, MNV et FCV et sur deux supports différents. La nébulisation devrait être plus fréquemment utilisée comme moyen de désinfection, de manière complémentaire à une désinfection manuelle conventionnelle dans les établissements de santé et les industries agro-alimentaires afin de réduire la charge virale potentiellement présente et le risque de contamination.

Ce chapitre reprend l'article «Virucidal efficacy of a hydrogen peroxide nebulization against murine norovirus and feline calicivirus, surrogates of human norovirus » publié en 2016 dans « Food and Environmental Virology » avec modifications.

Virucidal efficacy of a hydrogen peroxide nebulization against murine norovirus and feline calicivirus, surrogates of human norovirus

Food and Environmental Virology (2016)

William Zonta, Axel Mauroy, Frédéric Farnir and Etienne Thiry

Virucidal efficacy of a hydrogen peroxide nebulization against murine norovirus and feline calicivirus, surrogates of human norovirus

1. Introduction

Noroviruses (NoV), small icosahedral non-enveloped enteric viruses, are members of the family *Caliciviridae* and are divided into six genogroups, of which GI, GII and GIV include human noroviruses (HuNoV) and GV encompasses murine noroviruses (MNV) (Green 2013). HuNoV are amongst the worldwide leading causes of acute gastroenteritis (Patel et al. 2008; Yen et al. 2011; Pringle et al. 2015).

Due to the stability of NoV in the environment, their low infectious dose and the shedding of high amounts of virus in faeces coupled with a short term immunity after infection, NoV transmission is very efficient and NoV constitutes a serious public health issue (Teunis et al. 2008; Mathijs et al. 2012; Atmar et al. 2014; Pringle et al. 2015).

The primary transmission route is the faecal-oral one, either via person-to-person contact or by consumption of contaminated food or water (Lopman et al. 2003; Siebenga et al. 2007; Kroneman et al. 2008; Scallan et al. 2011; Mathijs et al. 2012) or via contact with a contaminated surface (Otter et al. 2011).

Currently, despite the recent development of a cell culture system for HuNoV, no easily usable cell culture system exists for HuNoV (Jones et al. 2015). Due to the complexity and the specific requirements for the new *in vitro* cell culture system for HuNoV, the use of viral surrogates is still required. MNV is used as surrogate for HuNoV due to their shared structural similarities and tissue tropism (Magulski et al. 2009; Park et al. 2010; Hirneisen and Kniel 2013). While feline calicivirus (FCV) seems to be more sensitive to disinfectants than MNV (Belliot et al. 2008; Park and Sobsey 2011) and demonstrates a different tissue tropism than MNV, it is a well-established surrogate of HuNoV and its usefulness has been established by various studies (Malik et al. 2006; Bae and Schwab 2008; Lages et al. 2008).

Food handlers have been shown to be a major contributing factor during NoV outbreaks (Widdowson et al. 2005; Baert et al. 2009b). In health care-associated infections, 20 to 40% of nosocomial infections have resulted from cross-infection via the hands of health care personnel (Weinstein 1991; Weber et al. 2010; Stals et al. 2013). The contamination of the hands can result from either direct patient contact or indirect contact with contaminated environmental surfaces or food (Kramer et al. 2006; Weber et al. 2010). Contaminated surfaces can be found in industrial and food processing facilities and in healthcare settings (hospitals, care homes) and contribute to the transmission of viruses (Otter et al. 2011).

The non-porous surfaces, typically found in such surroundings, do not seem to affect the persistence of the caliciviruses, NoV and FCV (Clay et al. 2006; D'Souza et al. 2006; Kramer et al. 2006; Ha et al. 2015). It has been demonstrated that patients admitted in a hospital room previously occupied by a patient infected with nosocomial pathogens had an increased risk of being contaminated by these pathogens (Otter et al. 2011; Otter et al. 2013).

The main parameters for the choice of a disinfectant are the efficacy of reducing the load of the infectious agents and the absence of harmful effects on human health or corrosive effects on surfaces (Orlando et al. 2008). Effective and thorough cleaning and disinfection of contaminated surfaces is necessary to prevent spread of viral contamination (Rutala and Weber 2013).

The most common no-touch automated room disinfection systems use aerosolised hydrogen peroxide, hydrogen peroxide vapour and ultraviolet radiation (Otter et al. 2014). The hydrogen peroxide vapour systems are divided in two different systems: vaporised hydrogen peroxide, vapour and non-condensing, and hydrogen peroxide vapour, vapour and condensing (Otter and Yezli 2011). In this study, an aerosolised hydrogen peroxide system was tested and the term nebulization is used. Hydrogen peroxide (H_2O_2) acts as an oxidant against bacteria and viruses by producing hydroxyl free radicals which attack proteins, lipids and nucleic acids (McDonnell and Russell 1999). These modifications inhibit the infection and replication process of the viruses by impeding the correct functioning of proteins and nucleic acids (McDonnell and Russell 1999). Previous studies using H_2O_2 suspension, demonstrated that the viral titre of MNV and FCV was reduced at least by a \log_{10} reduction factor of more than 3 in suspension, on stainless steel discs and on gloves (Fraisie et al. 2011; Vimont et al. 2015; Zonta et al. 2016). H_2O_2 breaks down to water and oxygen and thus constitutes a low environmental risk. The aim of the study was to assess the efficacy of a nebulization system spraying H_2O_2 on two HuNoV surrogates, MNV and FCV, on cover glasses and on stainless steel discs. The efficacy was evaluated by comparing the number of infectious viral particles and genomic copies before and after the nebulization.

2. Materials and methods

2.1. Viruses and cells

The CW1 strain of MNV was propagated in RAW 264.7 cells (ATCC TIB-71) maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (Invitrogen) complemented (DMEMc) with 10% heat-inactivated foetal calf serum (FCS) (BioWhittaker), 2% penicillin (5000 U ml^{-1}) and streptomycin (5000 mg ml^{-1}) (PS; Invitrogen), 1% of a non-essential amino acids preparation (NEAA) (Invitrogen) and 1% HEPES buffer (1 M; Invitrogen) (Wobus et al. 2004). The F9 strain of FCV was propagated in Crandell's feline kidney

(CrFK) cells (ATCC CCL-94) maintained in Eagle's minimal essential medium (Invitrogen) complemented (MEMc) with 10% heat-inactivated FCS (BioWhittaker), 2% PS (Invitrogen) and 1% NEAA (Invitrogen) (Crandell et al. 1973). The viruses were harvested as previously described in Zonta et al.(2016).

2.2. Infectivity assay

Titres of each virus were determined by plaque assay (Bidawid et al. 2003; Hyde et al. 2009) as described in Zonta et al.(2016). Briefly, cells were split into six-well plates at a density of 10^6 cells per well. On the following day, cells were inoculated with 10-fold dilutions of virus in DMEM (MNV) or MEM (FCV). After 1 hour at 37 °C, the inoculum was removed and the cells were overlaid with 2 ml DMEMc (or MEMc) with 0.5% SeaPlaque agarose. Plates were stored at room temperature for 20 min and then incubated at 37 °C and 5% CO₂ for 72 h. To count the plaques, the overlaying medium was removed and cells were fixed by adding 1 ml of 4% formaldehyde/well for 30 min and then stained with 2 ml of 0.3% crystal violet at room temperature. The same protocol was used to determine the viral titre after the nebulization.

2.3. Biocide testing / Disinfection by hydrogen peroxide nebulization

The two surrogate viruses, MNV and FCV, were used on two different supports, i.e. cover glasses and stainless steel discs of 2.5 cm. Clean conditions were simulated by the addition of bovine serum albumin (BSA). Specifically, BSA was intended to mimic the presence of a potential organic load on surfaces in field conditions which might interfere with the disinfection. A mix with 10 µl of the surrogate virus (either MNV or FCV at a mean concentration of 3.1×10^8 and 5.1×10^8 pfu/ml respectively) and 10 µl of BSA (0.3 %) was placed on the support and was allowed to dry inside a microbiological safety cabinet.

For direct exposure to the aerosolised solution, the samples were placed in a test area composed of a 4 m³ large, hermetically sealed room and the nebulization process was launched. The method used a nebulization machine aerosolizing a solution of 7 % of hydrogen peroxide (H₂O₂) for 90 sec and the room was not opened during the following hour. The dose used was 6.6 ml/m³, as recommended by the manufacturer.

After this, the cover glasses and the stainless steel discs were placed into 6-well plates and DMEMc (for MNV) or MEMc (for FCV) was added to dilute the H₂O₂ and to stop its effect. The plate was placed on a rocking platform for 15 min at 4°C. From this first dilution, two further 10-fold dilutions were performed. From these three dilutions of virus-biocide suspensions, a first aliquot was used for

an infectivity assay (500 µl as inoculum in a 6-well plate) and a second aliquot was used for molecular detection (100 µl for the RNA extraction followed by the one-step RT-qPCR).

A detector (Hycontrol®) measured the concentration of H₂O₂, the temperature and humidity in the room during the nebulizations.

For each experiment, the samples were compared with a positive control which followed the same steps as other samples except the nebulization process (1h inside a microbiological safety cabinet). The disinfection efficacy was evaluated by comparing the log₁₀ reduction of the infectious viral titre and the genomic copy number between the samples treated by nebulization and the untreated samples.

A biocidal product with a log₁₀ reduction factor of four was equivalent to a 99.99% decrease of the infectious titre and was considered as effective by following the Guidelines on the application of general principles of food hygiene to the control of viruses in food of the Codex Alimentarius CAC/GL 79-2012 and the Afnor norm (EN 14476) (AFNOR 2007; Codex Alimentarius 2012). The nebulization system was tested in three independent experiments for each surrogate.

2.4. Molecular detection by RT-qPCR

RNA was extracted from 100 µl of each sample, using the QIAamp viral RNA kit (Qiagen), and one-step RT-qPCR was performed with a C1000 Touch thermocycler (Biorad) on a final volume mix of 25 µl. The composition of the RT-qPCR reaction for MNV (Baert et al. 2008) or FCV (Helps et al. 2002; Scansen et al. 2004) (mix, primers and probes), the cycle conditions and the materials used for the quantification are the same as those described in Zonta et al. (2016).

2.5. Hydrogen peroxide nebulization interaction with virus infectivity

A negative control composed of 10 µl of PBS (instead of the considered surrogate virus) and 10 µl of BSA was also prepared, deposited on the carrier and placed in the room where the nebulization was performed. This control was used to determine if any remaining biocidal product was present on the carrier after the nebulization and could affect the cells during the infectivity assay. The viral suspension was added after the nebulization in the 6-well plate containing the carrier in cell culture medium. Two further 10-fold dilutions were performed and an infectivity assay was performed to determine the viral titre. The viral titre was compared with that of the positive control. A log₁₀ reduction factor of 1 or lower between the viral titres obtained from carriers infected after nebulization and from positive controls was considered to indicate an absence of cell sensitivity to H₂O₂ and an absence of effect of the carrier on the virus recovery.

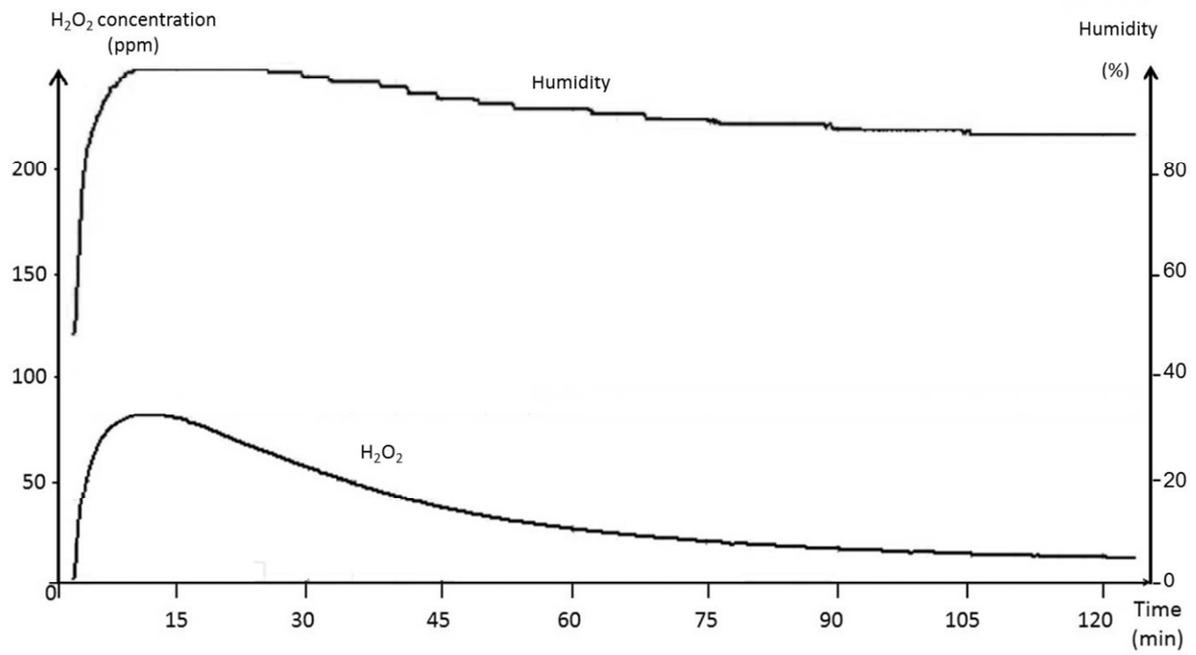


Figure 1. Measurement of H₂O₂ concentration (ppm) and humidity level (%) in the room during the nebulization.

2.6. Data analysis

Each nebulisation was performed in three independent experiments and from these, three replicates were tested by RT-qPCR. For the same nebulisation, samples treated with a nebulisation and untreated samples were compared and the results were expressed as \log_{10} reduction. Thus, the virus elution efficiency should not interfere with our results and statistical analyses. \log_{10} reduction was expressed as mean \pm standard deviation. Statistical analyses were performed using SAS software, version 9.3. Genomic copy number and infectivity were modelled using a linear model involving two factors - namely, the virus and the carrier - for each condition. Differences between the nebulisations were assessed using least square means and their standard errors, using a Tukey correction for multiple comparisons. Results were considered significant when the associated p-values were lower than 0.01.

3. Results

3.1. Hydrogen peroxide nebulization interaction with virus infectivity

A \log_{10} reduction factor of 1 or lower between the viral titres obtained from carriers infected after nebulization and from positive controls was obtained for both the viruses, MNV and FCV. This result indicates an absence of cell sensitivity to H_2O_2 and an absence of effect of the carrier on the virus recovery.

3.2. Control of the parameters during the nebulizations

The detector measured the concentration of H_2O_2 , the temperature and the level of humidity in the room in order to control the operation of the nebulization system (Fig. 1). The average of the maximal H_2O_2 concentration was 77.2 ± 8.8 ppm, the humidity level ranged from 56.7 to 100 % and the average temperature was 19.5 ± 3.5 °C during the nebulizations.

3.3. Biocide efficacy

3.3.1. Effect on MNV and FCV infectivity

For MNV, the infectious viral titre showed a \log_{10} reduction factor equal to or higher than 4.84 for tests on cover glasses (average 5.16 ± 0.28) and equal to or higher than 3.90 for tests on stainless steel discs (average 4.69 ± 0.76) (Fig. 2).

For FCV, the infectious viral titre showed a \log_{10} reduction factor equal to or higher than 4.85 for tests on cover glasses (average 5.13 ± 0.49) and equal to or higher than 5.30 for tests on stainless steel discs (average 5.30 ± 0.00) (Fig. 2). No significant difference was observed between the two viruses and the two carriers.

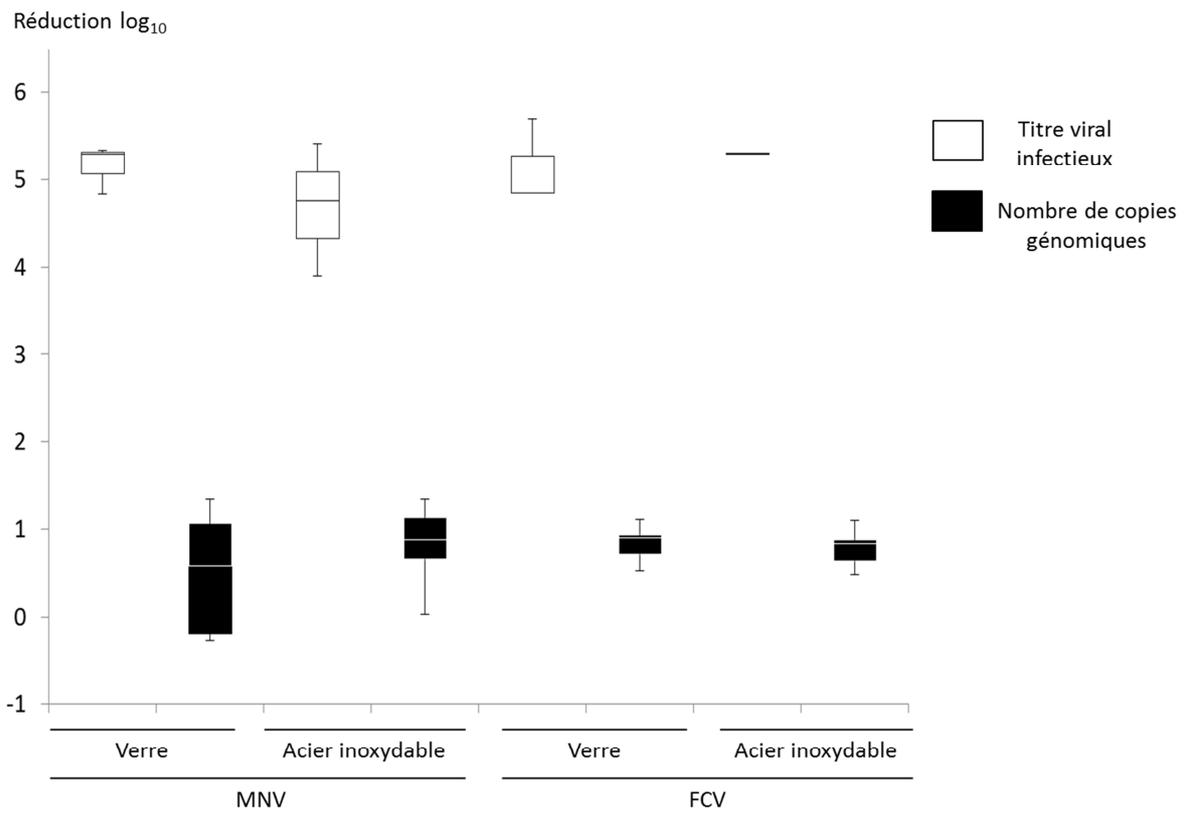


Figure 2. Reduction of infectious viral titres and genomic copy numbers of murine norovirus (MNV) and feline calicivirus (FCV) on cover glasses and stainless steel discs by the nebulization of H₂O₂ expressed as log₁₀ reduction. The bar represents the standard deviation.

3.3.2. Effect on MNV and FCV genome integrity

For MNV and FCV, the genomic copy numbers showed a \log_{10} reduction factor of 0.39 ± 0.54 and 0.83 ± 0.19 respectively for tests on cover glasses and a \log_{10} reduction factor of 0.85 ± 0.42 and 0.78 ± 0.21 respectively for tests on stainless steel discs (Fig. 2). The \log_{10} reduction on genomic copy numbers of MNV on cover glass was significantly different of the three other conditions but it was very low and less than a factor of 10^1 .

4. Discussion

Carrier tests on cover glasses and on stainless steel discs were used to show the effect of nebulization on the infectious viral titre and genomic copy number of two HuNoV surrogates, MNV and FCV. A clear virucidal efficacy of the nebulization on MNV and FCV on both carriers was demonstrated since the infectious viral titre was reduced at least by a factor of 10^4 .

The virucidal efficacy of hydrogen peroxide vapour has previously been demonstrated on both MNV and FCV in other studies (Bentley et al. 2012; Tuladhar et al. 2012; Goyal et al. 2014). Improving the efficacy of the disinfection of the environment reduces the propagation of the virus via the contaminated surfaces and could contribute to prevent transmission of the virus and subsequent infection.

The significant virucidal effect observed on these two HuNoV surrogates suggests that the nebulization of H_2O_2 could likely be efficacious against HuNoV surface contamination (Tuladhar et al. 2012). Previous studies also demonstrated efficacy against other non-enveloped viruses, such as rotavirus, poliovirus, adenovirus, and a large range of bacteria (Orlando et al. 2008; Choi et al. 2012; Fu et al. 2012).

The detection of viral RNA by RT-qPCR does not necessarily reflect the MNV and FCV infectious viral titre. In comparison with the infectious viral titre, the reduction in genomic copy numbers seems to be a poor indicator of the virucidal effect as also reported in a previous study (Tuladhar et al. 2012). This emphasizes the importance of infectivity assays for the evaluation of the efficacy of disinfectants. From these results, a hypothesis about the mechanism of action of the disinfectant can be proposed.

H_2O_2 could exhibit its virucidal effect by altering the capsid proteins of the viral particle.

The capsid could be partially altered and continue to protect the genome of the effect of H_2O_2 (Tuladhar et al. 2012; Zonta et al. 2016). Although H_2O_2 as an oxidant could theoretically alter nucleic acids (McDonnell and Russell 1999), another hypothesis is that the integrity of the genome is not affected by H_2O_2 even if the capsid is totally degraded by H_2O_2 .

The no-touch automated room disinfection systems offer several advantages. The key limitation of efficacy of conventional cleaning and disinfection is the reliance on a human operator to choose an appropriate biocide and to correctly apply it to potentially contaminated surfaces. The use of an aerosolised system removes this reliance and decreases the potential for human error (Falagas et al. 2011; Otter et al. 2014).

H₂O₂ has a low toxicity for the staff and the environment and is compatible with most of the surfaces and materials used in hospitals and food industry facilities (McDonnell 2006; Falagas et al. 2011).

In healthcare environments, nebulization allows a better distribution of H₂O₂ throughout a room than a conventional disinfection (Andersen et al. 2006; Tuladhar et al. 2012; Otter et al. 2014).

However, despite an optimal spread of H₂O₂ throughout a room, closed areas might still not be reached and require the use of conventional means of disinfection (Tuladhar et al. 2012).

Dried viruses are less susceptible to disinfectants than viruses in suspension (Sattar et al. 2003; Terpstra et al. 2007). For this reason, the suspension test might overestimate the efficacy of disinfectants and the carrier tests as used in this study better reflect the field situation.

According to Bentley (2012), amongst different types of surfaces such as stainless steel, glass, vinyl flooring, ceramic and PVC plastic, inoculated with FCV and exposed to H₂O₂ vapour, a reduction in viral titre took longest on stainless steel. The lowest MNV recovery rate has been reported for wood, probably because this surface is more porous than the other materials (Kim et al. 2014; Ha et al. 2015). Moreover the MNV recovery rates from ceramic or stainless steel have been shown to be significantly different to those from glass or plastic (Kim et al. 2014). For these reasons, we decided to work with stainless steel and glass surfaces to more closely represent field conditions and the surfaces typically in contact with foodstuff. The investigation of porous surfaces such as wood or textiles and self-disinfecting surfaces was not undertaken in this study (Humphreys 2014). The latter exhibit specific properties (e.g. copper), while textiles (e.g. work clothing) are involved in laundry practices and procedures (Warnes and Keevil 2013; Mitchell et al. 2015).

While our results present useful information about the effects of nebulization on virus surrogates, it must be noted that this work has certain limitations. Firstly our results are extrapolated from HuNoV surrogates and should be always carefully interpreted. Despite the development of a new cell culture system for HuNoV (Jones et al. 2015), the use of the HuNoV surrogates, MNV and FCV, currently remains the best system to evaluate the effect of the nebulization on HuNoV. European standards and Codex Alimentarius guidelines decree that a 4 log₁₀ reduction in viral titre is necessary to consider a disinfectant as a virucide (AFNOR 2007; Codex Alimentarius 2012). Considering that for some viruses (e.g. NoV), infectious doses can be as low as 10-100 viral particles (Atmar et al. 2014),

a \log_{10} reduction factor of above 4 could not be sufficient and could result in a residual viral concentration sufficient to cause infection via the contaminated environment (Tuladhar et al. 2012). Conversely, a 4 \log_{10} reduction or less can be sufficient to ensure minimal environmental viral contamination when cleaning steps precede the use of a disinfection system such as nebulization.

5. Conclusions

In conclusion, the nebulization of H_2O_2 showed a clear virucidal effect on both HuNoV surrogates, MNV and FCV, on two different carriers. Nebulization, by reducing the viral load of the environment, contributes to the decrease of the risk of transmission of virus via contaminated surfaces. Nebulization is an additional tool for the disinfection of areas susceptible to contamination by HuNoV, such as food processing facilities and healthcare settings, and should be promoted in complementarity with cleaning practices, hand hygiene and conventional disinfection methods.

Acknowledgments

We thank Professor Herbert Virgin and Dr Larissa Thackray (Washington University, St Louis, MO, USA) for providing the MNV isolates and RAW 264.7 cells; Dr Elisabeth Mathijs and Lorène Dams for their help with MNV and FCV cell cultures, respectively and Dr Louisa Ludwig for the careful English proofreading of the manuscript. The nebulization system, the H_2O_2 suspension and the Hycontrol® were kindly provided by Hymetec (Isnes, Belgium).

Funding: This work was supported by the research funds of the University of Liège.

CHAPITRE 3 : SECTION EXPERIMENTALE

3.2. Evaluation qualitative de l'effet de substances virucides sur l'attachement du norovirus murin sur les cellules RAW 264.7

Préambule

Les deux premières études ont permis d'évaluer les effets de plusieurs désinfectants sur le titre viral et le nombre de copies génomiques de deux virus substitués des HuNoV, le MNV et le FCV. Les résultats obtenus avec ces virus substitués permettent de prédire par extrapolation l'effet probable sur les HuNoV. La réduction sur le titre viral permet de déterminer si le désinfectant peut être considéré comme virucide ou non.

Explorer les interactions entre le virus et le désinfectant permet de comprendre le mécanisme d'action impliqué dans la réduction du titre viral. Un système d'observation par microscopie en fluorescence a été utilisé et permet de détecter les particules virales de MNV attachées à la surface de cellules RAW 264.7 via un immunomarquage indirect. Les anticorps primaires reconnaissent spécifiquement les particules virales de MNV et les anticorps secondaires sont dirigés contre les anticorps spécifiques de MNV (primaires) et sont marqués par un fluorochrome.

La phase d'attachement est la première étape du cycle répliatif du virus. L'hypothèse de cette étude est qu'une inhibition de cette phase d'attachement viral pourrait empêcher l'infection de la cellule par MNV et expliquerait le mécanisme d'action de certains désinfectants.

L'effet de plusieurs substances entrant dans la composition de désinfectants a été exploré sur la phase d'attachement du MNV sur les cellules RAW 264.7.

Suite au contact du MNV avec des alcools (éthanol et isopropanol), du peroxyde d'hydrogène, de la chlorhexidine, du chlorure de benzalkonium (BAC), du chlorure de didécyl diméthylammonium (DAC) 0,08 %, ou du glutaraldéhyde, l'attachement du virus n'était plus observé. Suite au contact avec l'hypochlorite de sodium ou le DAC 0,04 %, l'attachement viral est encore partiellement observé. Les désinfectants testés agissent probablement sur la capsid virale en modifiant celle-ci avec comme conséquence une inhibition partielle ou totale de la phase d'attachement.

Les méthodes permettant de déterminer si la phase d'attachement du virus est inhibée totalement ou partiellement par un désinfectant pourraient donc être envisagées comme des alternatives pour déterminer l'efficacité d'un désinfectant, notamment dans les situations où il est difficile voire impossible de déterminer le titre infectieux d'un virus via des méthodes de plaque de lyse comme les HuNoV par exemple.

Effect of disinfectants on the attachment of murine norovirus on RAW 264.7 cells

Article en préparation

William Zonta, Axel Mauroy and Etienne Thiry

Effect of disinfectants on the attachment of murine norovirus on RAW 264.7 cells.

Introduction

Human noroviruses (HuNoV) are the worldwide leading cause of acute nonbacterial gastroenteritis in humans (Ahmed et al. 2014). The effects of disinfectants on HuNoV and on their surrogates are increasingly being studied (Cromeans et al. 2014). Since the recently developed novel cell culture system for HuNoV necessitates specific conditions and still has a poor reproducibility (Jones et al. 2015), the use of surrogates remains a useful tool to study the effect of disinfectants on HuNoV.

The murine norovirus (MNV), belonging to the norovirus (NoV) genus, is genetically and morphologically close to HuNoV and, together with the feline calicivirus (FCV) and the Tulane virus, is one of the most-used HuNoV surrogates (Hirneisen and Kniel 2013; Cromeans et al. 2014; Kniel 2014).

The different steps of the HuNoV replicative cycle, particularly early events such as virus attachment to host cells, virus entry and genome release, have not yet been fully elucidated (Vashist et al. 2009). For HuNoV, binding of attachment factors and receptors constitutes the first step of the replicative cycle and involves carbohydrate structures such as histo-blood group antigens (HBGAs) which interact with cell surfaces (Donaldson et al. 2008; 2010). HBGAs are carbohydrates expressed on the surfaces of red blood cells and mucosal epithelium of the respiratory, genito-urinary and digestive tracts and secreted in biological fluids like milk, saliva and intestinal contents (Ravn and Dabelsteen 2000; Pringle et al. 2015).

In addition, other carbohydrates such as acid sialic residues (Rydell et al. 2009) and glycosaminoglycan heparan sulfate (Tamura et al. 2004) function as attachment molecules for HuNoV. Supplementary molecules probably act as receptors or co-receptors but remain yet to be determined (Karst et al. 2014).

MNV replicates well in tissue culture, binds cells via sialic acid, glycolipids and glycoproteins (Taube et al. 2009; Taube et al. 2012) and has been more studied *in vitro* and *in vivo*, resulting in a better elucidation of its viral replicative cycle.

The effects of several disinfectants on the viral titre and the genomic copy numbers of MNV are now known (Park and Sobsey 2011; Tung et al. 2013; Zonta et al. 2016) however their precise role needs to be elucidated.

In this study, we investigate the effect of different disinfectants on the attachment of MNV, in order to better understand and make informed assumptions about the mechanisms of action of disinfectant agents against noroviruses.

Table 1: Disinfectant and their conditions of use on murine norovirus.

Disinfectant group	Disinfectant	Final concentration (%) used in this study	Contact time ^a (min)
Alcohol	Ethanol	70	5
	Isopropanol	70	
Halogen	Sodium hypochlorite	0.5	
Oxidizing agents	hydrogen peroxide	0.2	
Biguanide	Chlorhexidine	0.5	
Quaternary ammonium compounds	Benzylammonium-chloride	0.09	
	Didecyldimethyl-ammoniumchloride	0.04	
		0.08	
Aldehyde	Glutaraldehyde	0.025	

^a: Contact time recommended by manufacturer's instructions

Materials and methods

Virus and cells

The CW1 strain of MNV was propagated in RAW 264.7 cells (ATCC TIB-71) maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (Invitrogen) complemented (DMEMc) with 10% heat-inactivated foetal calf serum (FCS) (BioWhittaker), 2% penicillin (5000 U ml⁻¹) and streptomycin (5000 mg ml⁻¹) (PS; Invitrogen), 1% of a non-essential amino acids preparation (NEAA) (Invitrogen) and 1% HEPES buffer (1 M; Invitrogen).

MNV was grown for 72 h at 37 °C and 5% CO₂ until a cytopathic effect was observed. Viruses were harvested after three freezing/thawing cycles of the cells and the suspension was centrifuged at 1000 x g for 20 min to remove cell debris. Supernatant was collected and purified via ultracentrifugation on a 30% sucrose cushion in a SW28 rotor (Beckman Coulter) at 112000 x g for 4 h at 4 °C. Pellets were suspended in phosphate-buffered saline (PBS) overnight at 4°C, aliquoted and stored at - 80°C.

Disinfectants

Active ingredients, final concentration and contact time are listed in Table 1. Each active ingredient belongs to a group of disinfectants which are generally included in the composition of commercially available biocide products.

Antibodies

Two New Zealand rabbits were immunized subcutaneously with either antigen or a negative control (MNV or PBS, respectively). Two additional immunizations were carried out at intervals of 21 days with equal amounts of antigens diluted in PBS. Rabbits were euthanized by exsanguination 21 days after the last immunization. Sera (called rabbit anti-MNV and rabbit-negative) were heat-inactivated (30 min at 56 °C). All experimental procedures were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee at the University of Liège (protocol number 1239).

Anti-Rabbit secondary antibodies, Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG mAb (GAR-488), were affinity-purified antibodies with well-characterized specificity for rabbit immunoglobulins and purchased from Invitrogen.

Disinfectants testing

In this experiment, we used MNV in suspension tests. The method was adapted from the AFNOR norm EN 14476 (AFNOR 2007).

A sample without disinfectant was used as a control sample, consistently following the same steps as described for other samples, and was used for comparison with the samples containing one of the eight disinfectants. The inoculum volume of MNV was 20 µl with an average initial virus titre of

1×10^9 pfu / ml. A mixture containing 20% of the virus (MNV) and 80% of the disinfectant at a specific concentration (Table 1) was prepared. After determination of a contact time for each disinfectant (Table 1), the suspension of the disinfectant with MNV or, in the case of the positive control, only MNV was filtered through a Microspin S-400 HR column (GE Healthcare) to ensure complete neutralisation (Eterpi et al. 2009). The collected volume was incubated on a coverslip with RAW 264.7 cells and an indirect immunofluorescence assay was performed for the binding step. Each disinfectant was tested in three independent experiments for the binding assay.

Indirect immunofluorescence assay for the attachment step

The technique involves formation of an antigen-antibody complex which is labelled with fluorescein-conjugated anti-immunoglobulin antibodies.

Confluent monolayers of RAW 264.7 cells were maintained on coverslips in 24-well plates the day before their use in the experiment. Following this, the medium was removed and cells were incubated for 30 min in PBS supplemented with heat inactivated fetal calf serum at 10% (v/v) (PBS-FCS). Coverslips were placed on ice and incubated with the collected volume after filtration on a Microspin column for 45 min at 4° C on a rocking platform. The supernatants were removed and cells were then washed three times with PBS-FCS and fixed for 45 min at 4° C with a 2% solution of paraformaldehyde (PAF) in PBS. After three washes with PBS, cells were incubated with the 500-fold PBS diluted rabbit anti-MNV serum for 1 h at 37° C. Coverslips were washed three times with PBS-FCS and then incubated for 1 h at 37° C with an Alexa Fluor 488 conjugated, 5000-fold PBS diluted, goat antirabbit IgG. Cells were washed three times with PBS-FCS and coverslips were mounted with ProLong gold anti-fade reagent (Invitrogen) before epifluorescent microscopy analysis, performed with a Nikon Eclipse TC2000 microscope equipped with an X-Cite120 Fluorescence Illumination System and a DC300F camera (Leica).

The same assay was also performed on RAW 264.7 cells incubated with the 500-fold PBS diluted rabbit-negative serum instead of the 500-fold PBS diluted rabbit anti-MNV serum for 1 h at 37° C. This assay was used to control the specificity of the rabbit anti-MNV serum.

Indirect immunofluorescence assay for the internalization steps

The same assay was also performed on RAW 264.7 cells on coverslips incubated with the collected volume after filtration on a Microspin column for 45 min at 37° C instead of 4° C on a rocking platform to allow the internalization of MNV. Then the same steps as the binding assay were followed: incubation with the 500-fold PBS diluted rabbit anti-MNV serum for 45 min at 37° C,

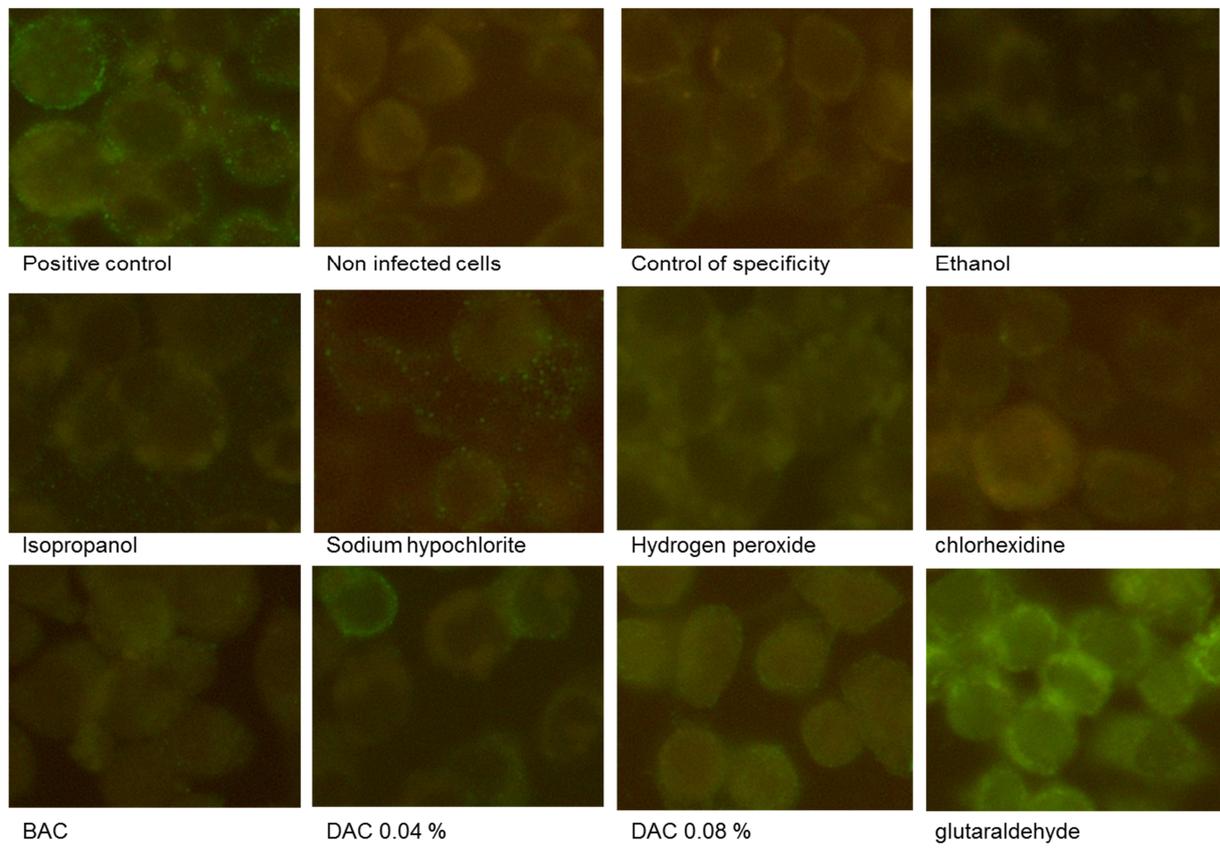


Fig.1: Indirect immunofluorescence staining on binding assay of MNV on RAW 264.7 cells. Cells were incubated for 45 min with MNV (Positive control) or MNV previously incubated with ethanol, isopropanol, sodium hypochlorite, hydrogen peroxide, chlorhexidine, Benzylammonium-chloride (BAC), Didecyldimethyl-ammoniumchloride (DAC) 0.04 %, DAC 0.08 %, and glutaraldehyde; “Non infected cells” represent cells incubated with primary and secondary antibodies, without the step of infection by MNV; Control of specificity represent cells infected by MNV, incubated with the rabbit serum deleted of anti-MNV antibodies.

fixation for 45 min at 4 °C with a 2% solution of PAF, incubation with a 0.1 % solution of NP-40 in PBS and finally the same incubations as those performed during the binding assay with the 500-fold PBS diluted rabbit anti-MNV serum and with the Alexa Fluor 488 conjugated, 5000-fold PBS diluted, goat antirabbit IgG. Cells were washed three times with PBS-FCS and coverslips were mounted with ProLong gold anti-fade reagent (Invitrogen) before epifluorescent microscopy analysis, performed with a Nikon Eclipse TC2000 microscope equipped with an X-Cite120 Fluorescence Illumination System and a DC300F camera (Leica).

Results

Contact with ethanol, isopropanol, hydrogen peroxide, chlorhexidine, Benzylammonium-chloride (BAC), didecyldimethyl-ammoniumchloride (DAC) 0.08 %, or glutaraldehyde inhibited attachment of MNV on RAW 264.7 cells as illustrated by the absence of fluorescence spots on cell monolayers (Fig.1). After contact with the glutaraldehyde, no specific fluorescent point representative of MNV attachment could be differentiated from the measured background.

When the internalization assay was performed no further effect of these disinfectants could be observed because the previous attachment step was already impeded (Fig.2).

Viral attachment was still observed after contact with sodium hypochlorite or DAC at 0.04 % on MNV but less frequently than on positive controls (Fig.1).

No viral internalization of MNV was observed after the contact of MNV with both of these disinfectants (Fig.2).

Discussion

Two disinfectants, sodium hypochlorite and DAC (0.04 %), partially inhibited the attachment step and totally inhibited the internalization step on MNV on RAW 264.7 cells.

Ethanol, isopropanol, hydrogen peroxide, chlorhexidine, BAC, DAC (0.08 %), and glutaraldehyde completely inhibited the attachment step and consequently no further effect on the internalization step could be observed.

The absence of visualisation of the viral attachment or internalization is a consequence of the disinfectant effect on the virus and allows making hypotheses about the mechanisms of action of these disinfectants.

Thus, the disinfectants could likely damage the capsid, completely or partially and resulting conformational changes in capsid proteins could affect attachment to cellular receptors.

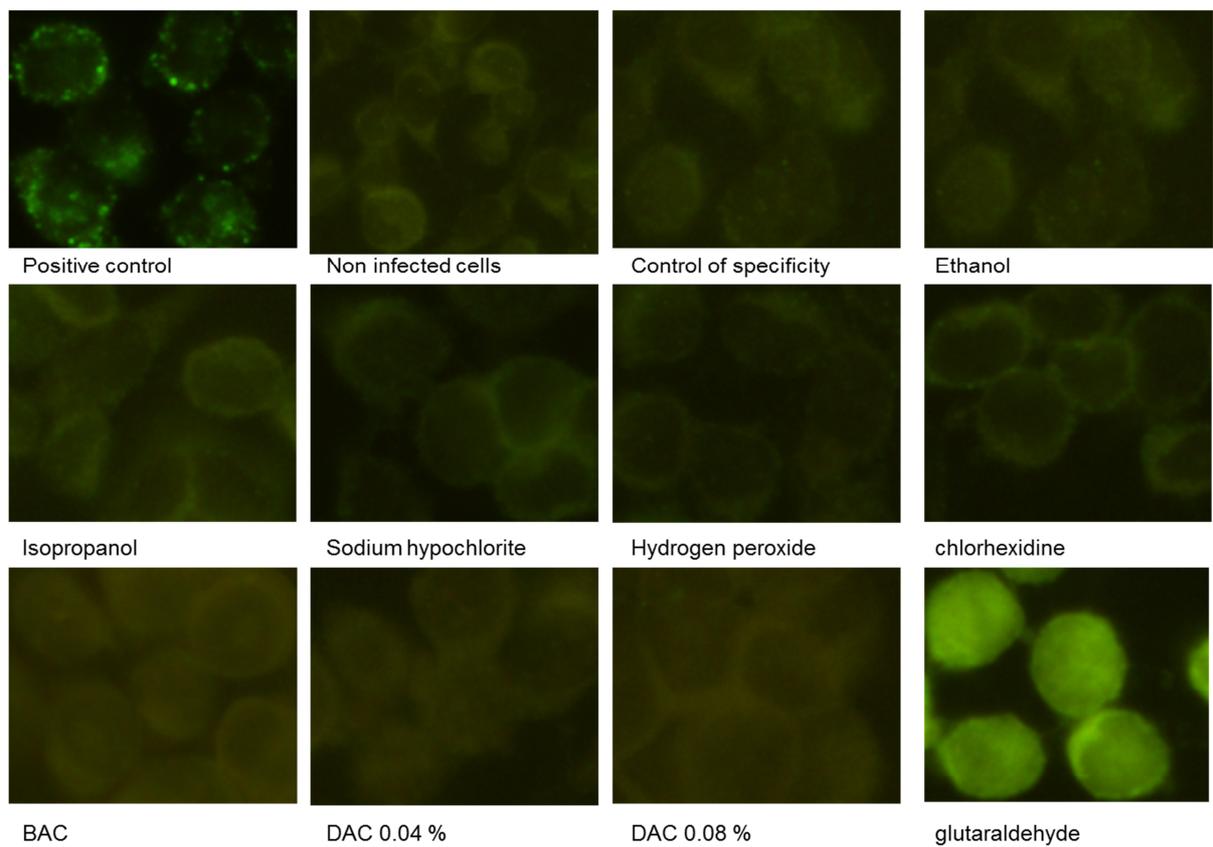


Fig.2: Indirect immunofluorescence staining on internalization assay of MNV on RAW 264.7 cells. Cells were incubated for 45 min with MNV (Positive control) or MNV previously incubated with ethanol, isopropanol, sodium hypochlorite, hydrogen peroxide, chlorhexidine, Benzylammonium-chloride (BAC), Didecyldimethyl-ammoniumchloride (DAC) 0.04 %, DAC 0.08 %, and glutaraldehyde; “Non infected cells” represent cells incubated with primary and secondary antibodies, without the step of infection by MNV; Control of specificity represent cells infected by MNV, incubated with the rabbit serum deleted of anti-MNV antibodies..

Such modifications would have to be sufficient to interact in sites implicated in viral attachment, preventing binding of MNV to sialic acid (Taube et al. 2009) or other carbohydrates (e.g. in porcine gastric mucin) (Hirneisen and Kniel 2012).

Another mechanism of action could be that a binding of the disinfectant on the capsid, might impede correct attachment between virus and cell. Two studies have demonstrated that citrate alters HuNoV capsid morphology by binding to the P domain of the HuNoV capsid and can impeded HuNoV infection (Hansman et al. 2012; Koromyslova et al. 2015).

While sodium hypochlorite has been shown to inactivate some viruses (poliovirus, hepatitis A virus and FCV) by inhibiting their ability to bind to host cells (Nuanualsuwan and Cliver 2003), in our study this inhibition was only partial. Sodium hypochlorite acts as an oxidant and targets capsid proteins of non-enveloped viruses such as FCV (Shirai et al. 2000; Nuanualsuwan and Cliver 2003). Other studies have demonstrated that free chlorine did not affect the binding of human adenovirus type 2 (Gall et al. 2015), suggesting an interference to occur after attachment (Page et al. 2010). Chlorine and ethanol have been shown to diminish the ability of HuNoV to bind to its receptors by 3 and 2 log₁₀ respectively (Wang and Tian 2014). The results of the internalization assay indicate that no viral particles were observed during the internalization step after contact of MNV with each of the disinfectants, including the sodium hypochlorite and the DAC 0.04 %. We can thus suppose that, similarly to what has been described for adenoviruses (Page et al. 2010), hypochlorite sodium has a mechanism of action at a point after attachment or during internalization of MNV. We can also infer that the disinfectant action of sodium hypochlorite is virus specific, with differing mechanisms depending on the targeted virus.

Several studies have demonstrated the low efficacy of the quaternary ammonium compounds against MNV (Belliot et al. 2008; Girard et al. 2010) and are in accordance with our results with the DAC at 0.04%, since viral attachment is still observed and could explain the inefficacy of this disinfectant. Conversely, the results with the DAC at 0.08% and the BAC show an absence of the attachment and could demonstrate an interaction with the capsid of MNV. Associated with an alcohol (isopropanol) and the glutaraldehyde, the quaternary ammonium compounds have shown a virucidal effect on MNV depending on the method of application (Bolton et al. 2013; Zonta et al. 2016). The effect of QAC could be dose-dependent (DAC 0.04 % versus DAC 0.08 %) and synergic with other disinfectants such as alcohol and aldehyde.

The primary mechanism of action proposed for alcohol-based disinfectants is capsid protein denaturation (Belliot et al. 2008; Hoelzer et al. 2013). This could explain the disappearance of MNV attachment after the use of ethanol in our study; however several questions remain unresolved at the molecular level. Glutaraldehyde has been shown to react strongly with capsid proteins and to induce loss of infectivity (Chambon et al. 1992; 1999; McDonnell and Russell 1999). The observed effects could be due to the fixative property of glutaraldehyde (Pineau et al. 2008). The antiviral activity of chlorhexidine is known to be variable and is probably also restricted to viral capsid proteins (Ranganathan 1995; McDonnell and Russell 1999). Hydrogen peroxide produces hydroxyl-free radicals which, amongst other targets, attack proteins (McDonnell and Russell 1999). While a capsid modification via this route seems likely, the virucidal mechanism of hydrogen peroxide at the molecular level remains unresolved (Linley et al. 2012).

Conclusion

The absence of visualisation of MNV attachment after contact with disinfectants such as ethanol, isopropanol, hydrogen peroxide, chlorhexidine, BAC, DAC (0.08 %), and glutaraldehyde allows the postulation of certain hypotheses concerning their mechanisms of action. These disinfectants likely alter the viral capsid and consequently impede the binding of MNV on RAW 264.7 cells. Viral binding was not completely inhibited with the use of the sodium hypochlorite and the DAC at a concentration of 0.04 %, while viral internalization however was inhibited. These data suggest that the two disinfectants either partially modify the MNV capsid or have another mechanism of action after the attachment step and before or during internalization. Further studies will be necessary to explore this mechanism and to lead to a better understanding of the effects of disinfectants on viruses.

Discussion

CHAPITRE 4 : DISCUSSION

Les norovirus humains sont la principale cause de gastroentérites aiguës non-bactériennes chez l'homme au niveau mondial et constituent un réel problème de santé publique (Koopmans et al. 2003; Svraka et al. 2007; Baert et al. 2009b; Hall et al. 2013b; Ahmed et al. 2014). Aux Etats-Unis, le Centre pour le contrôle et la prévention des maladies (CDC) estime que, chaque année, environ 20 millions de cas de gastroentérite aiguë sont dus aux NoV (Hall et al. 2013a). Parmi ces cas, environ 10 % iraient consulter un médecin, 0,03 % seraient hospitalisés et le nombre de décès serait inférieur à 800 individus par an et toucherait des individus très jeunes ou très âgés. L'impact économique qui en découle est lui aussi important et comprend différents paramètres comme le nombre de lits d'hôpitaux occupés, la fermeture de certains services et la gestion du personnel (médical ou travaillant avec des denrées alimentaires) (Lopman et al. 2004; Johnston et al. 2007). Ces données motivent à explorer des méthodes de désinfection efficaces contre cet agent viral afin de les mettre en place soit en routine soit lors de situations d'épidémie afin d'enrayer sa propagation.

Connaître l'efficacité des désinfectants sur ces virus permettrait de sélectionner les désinfectants adaptés aux infections à NoV et ainsi disposer de d'outils efficaces afin de diminuer la charge virale présente dans l'environnement. Ainsi les risques de propagation de l'infection et le nombre de patients atteints seraient probablement réduits. La mise en place d'un système de culture cellulaire *in vitro* pour les HuNoV étant difficile, des virus substituts des HuNoV sont utilisés afin d'estimer les effets des désinfectants sur HuNoV. Malgré le développement récent d'un système de culture cellulaire pour HuNoV, l'équipement requis spécifique et la faible reproductibilité du système empêchent encore de tester directement l'effet de désinfectants sur les HuNoV (Jones et al. 2014; Jones et al. 2015). Ainsi l'utilisation de virus substituts des HuNoV reste la méthode de choix la plus employée pour déterminer l'effet virucide de désinfectants.

La première étude a permis d'évaluer l'effet de plusieurs désinfectants appartenant à des familles de désinfectants différents sur le MNV et le FCV, deux virus substituts des HuNoV. Trois types de tests ont été réalisés : les tests en suspension pour s'inspirer des normes de virucidie existantes et les tests sur supports, l'acier et les gants, afin de se rapprocher des conditions retrouvées sur le terrain, à savoir dans des industries du secteur alimentaire ou des établissements de santé. Le premier paramètre pris en considération a été l'effet sur le titre viral. Une réduction de 3 ou 4 \log_{10} suivant les normes ou recommandations appliquées est nécessaire afin de pouvoir qualifier le désinfectant de virucide. Le second paramètre étudié a été l'effet des désinfectants sur l'intégrité

du génome, via la détection de l'ARN viral par RT-qPCR spécifique de chaque virus substitut. Les désinfectants ayant eu un effet significatif sur le titre viral infectieux des deux virus substitués dans les trois conditions de tests sont les désinfectants composés soit d'halogénés, soit d'agents oxydants soit d'un mélange composé de QAC, d'alcool et d'aldéhyde. Ces trois désinfectants ont aussi montré un effet significatif sur le nombre de copies génomiques de MNV et FCV dans les trois types de tests.

La seconde étude a démontré qu'un appareil nébulisant du peroxyde d'hydrogène sous forme d'aérosol permettait d'obtenir plus de $4 \log_{10}$ de réduction du titre viral de MNV et FCV sur des surfaces en verre et en acier inoxydable. Par extrapolation des résultats, l'effet virucide de la nébulisation du peroxyde d'hydrogène peut être proposé pour les HuNoV et l'utilisation de cette technique de désinfection en complément d'une désinfection conventionnelle est recommandée dans les lieux où les surfaces pourraient jouer un rôle dans la transmission des HuNoV.

Enfin la troisième étude permet d'explorer le mécanisme d'action des désinfectants. Les résultats préliminaires obtenus posent l'hypothèse que les désinfectants, en modifiant la capsid virale, interfèrent avec la phase d'attachement de MNV, première étape nécessaire pour l'infection virale.

Le choix des virus substitués est crucial et compliqué et plusieurs virus substitués des HuNoV existent (Kniel 2014). En effet il doit respecter plusieurs conditions afin de remplir correctement son rôle et de permettre ainsi d'extrapoler les résultats obtenus. Les propriétés physico-chimiques et les caractéristiques génomiques des virus substitués doivent se rapprocher le plus possible de celles des HuNoV (Doultree et al. 1999; Wobus et al. 2006; Bae and Schwab 2008; Sattar et al. 2011). HuNoV, MNV et FCV appartiennent à la famille des *Caliciviridae*, sont non-enveloppés et ont un génome composé d'un ARN simple brin de polarité positive et d'une longueur de 7,5 kb, (Hoelzer et al. 2013). L'organisation du génome entre FCV et HuNoV d'une part (Green et al. 2000) et MNV et HuNoV d'autre part (Wobus et al. 2006) présente une grande similitude. Un système de culture cellulaire doit exister et être efficace et reproductible (Bidawid et al. 2003; Wobus et al. 2004).

Les virus couramment utilisés comme substitués sont le FCV, le MNV, le TV et le bactériophage MS2 (Sattar et al. 2011; Hirneisen and Kniel 2013; Kniel 2014). Trouver un virus rassemblant toutes les qualités d'un virus substitut des HuNoV est difficile et n'est peut-être pas le but. Chaque virus substitut comporte des avantages et des inconvénients, et utiliser plusieurs virus substitués est un moyen d'obtenir un plus grand nombre de données et d'extrapoler ainsi des résultats qui se rapprocheront plus du comportement réel des HuNoV face aux désinfectants. Les HuNoV présentent une grande diversité. Utiliser différents virus substitués permet de refléter la diversité des souches de HuNoV qui n'est pas systématiquement présente chez un seul virus

substitut. Dans les deux premières études de cette thèse, les deux virus substitués choisis ont été le FCV et le MNV. Le FCV a été choisi d'une part pour ses similitudes avec les HuNoV (même famille, composition, taille et organisation similaire du génome) et d'autre part pour une raison historique (premier virus substitut des HuNoV utilisé) permettant ainsi de comparer les résultats avec un grand nombre de publications scientifiques. Suite à la découverte du MNV appartenant au même genre que les HuNoV humains mais dans un génogroupe différent (G. V) et pour les autres critères cités plus haut, son utilisation est adéquate (Karst et al. 2003). De plus, disposant d'un système de détection indirecte des anticorps dirigés contre MNV, l'exploration du mécanisme d'action des désinfectants durant la phase d'attachement du cycle viral était possible et constitue la troisième étude de la thèse.

4.1. Effet virucide

Les désinfectants permettant d'obtenir une réduction du titre viral supérieur à 3 log₁₀ avec les deux virus substitués dans les trois types de tests sont des désinfectants appartenant aux familles des halogénés (hypochlorite de sodium), des agents oxydants (peroxyde d'hydrogène et acide peracétique) et un désinfectant composé d'un mélange de QAC, d'alcool et d'aldéhyde (BAC et DAC, isopropanol et glutaraldéhyde). Ces trois désinfectants ont aussi eu un effet significatif sur la réduction du nombre de copies génomiques, ce qui démontre un effet simultané sur la capsid virale de MNV et FCV et dans une moindre mesure sur le génome viral ce qui est en accord avec certaines études de la littérature concernant l'effet de ces désinfectants sur d'autres virus.

4.1.1. Effets virucides des halogénés

L'hypochlorite de sodium appartenant à la famille des halogénés est largement utilisé pour la désinfection de l'eau et des surfaces environnementales. L'hypochlorite de sodium induit une diminution du titre infectieux et du nombre de copies génomiques pour MNV et FCV. L'effet significatif sur le titre infectieux est en accord avec plusieurs études ayant aussi testé un désinfectant halogéné sur ces deux virus substitués (Jimenez and Chiang 2006; Park and Sobsey 2011; Kim et al. 2012b). La réduction en log₁₀ du titre viral est en général plus importante avec les particules infectieuses du FCV par rapport à celles du MNV même si la comparaison peut être difficile si les concentrations initiales en virus sont différentes (D'Souza and Su 2010; Fraisse et al. 2011; Park and Sobsey 2011).

L'hypochlorite de sodium a entraîné une importante réduction du nombre de copies génomiques détectées par RT-qPCR pour MNV et pour FCV et cette observation est corrélée par d'autres études utilisant FCV et MNV (Duizer et al. 2004a; Jimenez and Chiang 2006; de Abreu Correa et al. 2012). L'effet sur le nombre de copies génomiques de HuNoV peut être évalué par RT-qPCR

mais les résultats dans la littérature sont contradictoires. Des études indiquent que l'ARN de HuNoV n'est pas très résistant à l'hypochlorite de sodium et que ce désinfectant a un effet significatif sur l'intégrité du génome (Duizer et al. 2004a; Shin and Sobsey 2008; Girard et al. 2010; Lim et al. 2010; Park et al. 2010). Une autre étude a démontré un effet de l'hypochlorite de sodium sur la souche GII.4 du HuNoV uniquement à la plus forte concentration testée (1000 ppm) et aucun effet sur la souche GII.2 du HuNoV (Tung et al. 2013). Il pourrait exister plusieurs profils d'inactivation pour les NoV humains comme cela est suggéré dans l'étude de Cromeans *et al* (2014) où des différences de sensibilité aux alcools (éthanol et isopropanol) et à l'hypochlorite de sodium sont observées entre souches de HuNoV. La diversité en génotypes ou génogroupes en tant que telle n'est pas responsable des différences de sensibilité au désinfectant. Ce sont les modifications génétiques, liées à des mutations, observées entre différentes souches de HuNoV, qui pourraient conférer à certaines souches de HuNoV un profil d'inactivation différent.

Le mécanisme d'action des halogénés sur les virus n'est pas entièrement élucidé et ses effets sur les HuNoV ne sont pas encore connus. Concernant le mécanisme d'action sur d'autres virus, l'inactivation du poliovirus par l'hypochlorite de sodium n'induit aucun changement majeur dans la conformation de la capsid virale et entraîne une libération et une dégradation de l'ARN viral (O'Brien and Newman 1979). Après l'inactivation de l'adénovirus de type 2 par l'hypochlorite de sodium, le virus est toujours capable de se fixer aux récepteurs CAR mais ne forme plus de plage de lyse ; l'ADN provenant de virions inactivés est détecté suggérant que le génome n'est pas atteint, au moins dans la région du génome amplifiée par PCR. Le mécanisme d'inactivation serait donc dû à une inhibition d'événements après l'attachement, telle que l'expression de protéine virale précoce (Page et al. 2010). Concernant le virus de l'hépatite A (HAV), le mécanisme d'action serait dû à l'effet sur la région non traduite en 5' qui serait plus sensible à l'hypochlorite de sodium. Les dommages causés dans cette région du génome entraînent l'inactivation de l'infectiosité du HAV (Li et al. 2002). Les halogénés agiraient donc sur le génome et les protéines en fonction des virus (Li et al. 2002; Nuanualsuwan and Cliver 2003; Page et al. 2010; Wigginton et al. 2012). Dans la troisième étude portant sur l'attachement, l'hypochlorite de sodium a partiellement réduit l'attachement de MNV à la surface des cellules RAW 264.7. Une modification conformationnelle de la capsid pourrait donc se produire, notamment au niveau de la zone d'attachement de MNV à son récepteur cellulaire. Associé à l'effet sur le nombre de copies génomiques dans la première étude, les halogénés pourraient donc aussi agir sur les protéines de capsid et sur le génome viral de MNV. L'extrapolation pour HuNoV est plus difficile et on pourrait suspecter une différence d'efficacité en fonction de la souche concernée (Tung et al. 2013).

4.1.2. Effets virucides des agents oxydants

Les agents oxydants testés sont l'acide peracétique (PAA) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) dans les tests en suspension, sur gants et sur inox et uniquement le H_2O_2 dans les tests de nébulisation sur lamelle en verre et sur inox.

L'association de PAA et de H_2O_2 permet d'obtenir une réduction du titre viral supérieure à 3,69 et 4,70 \log_{10} pour MNV et FCV respectivement. Ces observations sont en corrélation avec d'autres études (Baert et al. 2009c; Fraisse et al. 2011; Vimont et al. 2015). L'effet sur le nombre de copies génomiques est significatif mais plus faible que celui observé après contact avec l'hypochlorite de sodium (Fraisse et al. 2011).

Le FCV apparaît plus sensible aux produits halogénés et aux agents oxydants que le MNV (Gulati et al. 2001; Baert et al. 2009c; D'Souza and Su 2010; Fraisse et al. 2011; Park and Sobsey 2011; Kim et al. 2012b; Vimont et al. 2015; Zonta et al. 2016). Dans l'hypothèse que les HuNoV se comportent comme le MNV, alors utiliser uniquement le FCV comme virus substitut pourrait entraîner une surestimation de l'effet de ces deux désinfectants sur les HuNoV.

H_2O_2 est faiblement toxique pour l'environnement et le personnel et a l'avantage d'être compatible avec la plupart des surfaces et du matériel utilisés dans les établissements de santé et les industries liées à l'industrie alimentaire (McDonnell 2006; Falagas et al. 2011).

La nébulisation de H_2O_2 permet une réduction supérieure ou égale à 3,90 et 4,85 \log_{10} pour le MNV et le FCV respectivement. Aucune différence significative dans la réduction des titres viraux n'a été observée ni entre virus substitués ni entre surfaces. Ces résultats sont contradictoires avec une étude étudiant l'effet d'un aérosol de H_2O_2 sur MNV où la réduction du titre viral était $\leq 1 \log_{10}$ (Li et al. 2011). Cette différence peut s'expliquer par la concentration en H_2O_2 plus faible (2,52 %) et le temps d'action moins long (5 min) par rapport à notre étude. Par contre, trois autres études testant l'effet de la vapeur de H_2O_2 ont démontré une activité virucide sur MNV et FCV (Bentley et al. 2012; Tuladhar et al. 2012; Goyal et al. 2014).

L'aérosolisation de H_2O_2 est une des technologies de désinfection par voie aérienne (Otter et al. 2014; Doll et al. 2015). Plusieurs technologies de désinfection par voie aérienne existent dont les principales sont les systèmes à base de H_2O_2 (sous forme d'aérosol ou de vapeur), le rayonnement ultra-violet (UV) et les surfaces « auto-désinfectantes ». Les surfaces auto-désinfectantes utilisent plusieurs approches pour limiter la présence d'agents pathogènes sans modifier les propriétés initiales des matériaux : limiter l'adhérence ou la multiplication des agents pathogènes, recouvrir la surface avec un composé antimicrobien, utiliser un revêtement avec une activité anti-biofilm ou désinfectante (Humphreys 2014). Les surfaces contenant du cuivre ont aussi démontré une

diminution du titre viral infectieux de MNV, proportionnelle au pourcentage de cuivre dans le matériau et cette diminution est due aux ions du cuivre qui agiraient directement sur l'inactivation du virus en provoquant une agrégation des particules virales et l'ARN viral serait aussi dégradé (Warnes and Keevil 2013). Une seconde technologie de désinfection par voie aérienne est l'utilisation des rayons UV dont l'un des avantages est un délai plus court pour chaque cycle mais l'inconvénient est une réduction en \log_{10} des agents pathogènes (souvent testés sur des bactéries) moins importante que celle obtenue avec des systèmes de nébulisation (Rutala and Weber 2013).

L'inconvénient du H_2O_2 aérosolisé par rapport au H_2O_2 sous forme de vapeur est une moins bonne distribution au sein de la pièce et présente plus de risque de dépasser la limite d'exposition à court terme (Fu et al. 2012). En comparant le H_2O_2 aérosolisé avec le H_2O_2 sous forme de vapeur, ce dernier a induit une inactivation complète de plusieurs types de bactéries (*Staphylococcus aureus* résistant à la pénicilline, *Clostridium difficile*, *Actinobacter* et des indicateurs biologiques) tandis que l'inactivation avec le système sous forme de H_2O_2 aérosolisé n'a été que partielle (Fu et al. 2012). Cependant une autre étude a démontré qu'il n'y avait pas de différence significative d'efficacité entre ces deux systèmes (Blazejewski et al. 2015). Les systèmes à base de vapeur de H_2O_2 ont démontré leur efficacité sur MNV et FCV (Bentley et al. 2012; Tuladhar et al. 2012; Goyal et al. 2014) et également sur d'autres agents pathogènes tels que le rotavirus, le poliovirus, l'adénovirus et plusieurs bactéries (Orlando et al. 2008; Choi et al. 2012; Fu et al. 2012). Réduire la charge virale de l'environnement permet de diminuer le risque de propagation des virus via les surfaces contaminées et prévient donc le risque de transmission des virus et réduit le risque d'infection. L'effet virucide des systèmes de désinfection à base de H_2O_2 observé sur les deux principaux virus substituts des HuNoV laisse présager également un effet similaire sur les HuNoV (Tuladhar et al. 2012).

La compatibilité des systèmes de désinfection à base d'aérosol de peroxyde d'hydrogène n'a pas été spécifiquement étudiée vis-à-vis des appareils électroniques. Cependant aucune étude issue de la revue de Doll et al. (2015) n'a rapporté de détérioration suite à l'utilisation de peroxyde d'hydrogène sous forme aérosolisée ou vaporisée. La tolérance des composants informatiques et électroniques soumis à un traitement à base de vapeur de peroxyde d'hydrogène est bonne selon l'agence de protection environnementale des États-Unis (EPA) bien que l'effet ait été étudié sur une durée et un nombre de cycles limités (Blazejewski et al. 2014).

L'effet de l'aérosolisation de H_2O_2 sur le nombre de copies génomiques est faible puisque la réduction est $< 1 \log_{10}$. Comme pour les tests en suspension et sur support, la réduction du nombre de copies génomiques ne reflète pas la réduction du titre viral (Tuladhar et al. 2012). L'effet démontré sur le titre infectieux n'est pas corrélé avec un effet sur le nombre de copies génomiques. L'effet sur le nombre de copies génomiques est donc un paramètre difficile à utiliser pour démontrer un effet de H_2O_2 sur les virus substituts. Extrapoler un effet virucide, à partir de l'effet obtenu sur

l'ARN des HuNoV, risque de sous-estimer l'effet de la nébulisation de H₂O₂ sur les HuNoV. Evaluer l'activité virucide d'un désinfectant à partir de l'effet sur le titre viral apparaît donc plus approprié.

Avec un effet sur le titre viral mais pas ou peu d'effet sur le nombre de copies génomiques (Tuladhar et al. 2012; Zonta et al. 2016), on peut supposer que le H₂O₂ modifie la capsid virale, inhibant partiellement ou totalement l'attachement et rendant donc la poursuite du cycle viral et l'infection de la cellule hôte impossible. La capsid pourrait être partiellement altérée et continuer de protéger l'ARN viral ce qui expliquerait l'effet peu significatif sur le nombre de copies génomiques détectées par RT-qPCR. La seconde hypothèse est que l'ARN viral ne serait pas affecté par le H₂O₂ même en cas de capsid totalement détruite.

Selon que le H₂O₂ est utilisé sous forme liquide ou sous forme gazeux, son mode d'action semble différent : les interactions avec les acides aminés et les protéines pourraient être différentes selon la forme de H₂O₂ utilisée (Linley et al. 2012).

Même si la désinfection est parfois incomplète après utilisation de ces technologies par voie aérienne, elles permettent cependant de réduire la contamination résiduelle présente après un nettoyage et une désinfection standard (Doll et al. 2015). La nébulisation constitue un moyen complémentaire de la désinfection classique notamment en diminuant la dépendance vis-à-vis d'un opérateur qui constitue un des facteurs limitants d'une désinfection efficace (Falagas et al. 2011; Otter et al. 2014).

4.1.3. Effets virucides d'un désinfectant composé d'ammoniums quaternaires, d'alcool et d'un aldéhyde

Le désinfectant composé d'ammoniums quaternaires (BAC et DAC), d'isopropanol et de glutaraldéhyde a démontré un effet virucide sur MNV et FCV dans la première étude. Les études dans la littérature ont des résultats parfois contradictoires avec des résultats significatifs uniquement pour MNV ou uniquement pour FCV (Doultree et al. 1999; Jimenez and Chiang 2006; Belliot et al. 2008; Girard et al. 2010; Whitehead and McCue 2010; Su and D'Souza 2012). Ces contradictions peuvent en partie s'expliquer par des concentrations et des temps d'action différents et reflètent la complexité de comparer plusieurs études entre elles. Les virus substitués et les types de surfaces testées sont également des paramètres qui varient entre les études scientifiques. Il y aurait un réel avantage à harmoniser les tests de virucidie sur support via l'élaboration de tests standardisés de désinfection sur surfaces avec notamment une liste de types de surfaces à tester et des temps d'action à tester, appropriés aux conditions réelles d'utilisation des désinfectants dans les industries alimentaires et les établissements de santé. Les produits testés sont généralement des produits commerciaux avec des compositions différentes en fonction du produit. Cette différence de composition est illustrée entre le désinfectant D contenant entre autre deux QAC différents (BAC et DAC) et le désinfectant E n'en

contenant qu'un seul (DAC). Cette différence de composition peut expliquer l'effet virucide différent exercé sur FCV.

La concentration du principe actif peut aussi avoir un effet sur le virus. Dans la troisième étude, l'utilisation de DAC 0,04 % n'a entraîné qu'une inhibition partielle de l'attachement de MNV tandis que le DAC à 0,08 % a entraîné une inhibition totale de l'attachement.

Les effets virucides des QAC sur le MNV et le FCV sont contradictoires puisque le titre viral n'a pas été réduit de plus de 3 log₁₀ dans certaines études (Belliot et al. 2008; Girard et al. 2010; Whitehead and McCue 2010), tandis que dans d'autres un effet virucide est démontré (Jimenez and Chiang 2006; Bolton et al. 2013; Hoelzer et al. 2013; Gerba 2015). Cette contradiction sur l'effet virucide des QAC peut s'expliquer par le fait que les formulations des produits évoluent et les QAC de dernière génération ont un spectre virucide qui a évolué incluant certains virus non enveloppés (Gerba 2015). De plus la méthode d'application peut aussi influencer l'effet virucide de désinfectant à base de QAC (Bolton et al. 2013). L'utilisation de glutaraldéhyde a déjà prouvé son effet virucide dans une précédente étude (D'Souza and Su 2010). Les interactions entre des produits entrant dans la composition d'un désinfectant devraient être plus étudiées en raison de l'effet de synergie positive qui peut en résulter.

Les QAC interagissent avec la membrane cytoplasmique des bactéries et leur activité hydrophobe agit contre les virus enveloppés contenant des lipides (Gerba 2015). En fonction de leur composition, ils peuvent aussi agir sur des virus non enveloppés comme le NoV. Ils pourraient réagir avec les protéines de la capsid et dégrader l'ARN viral (Bolton et al. 2013; Hoelzer et al. 2013; Gerba 2015).

4.1.4. Effets virucides des alcools

Le type d'alcool (éthanol ou isopropanol), la concentration de celui-ci (70 ou 90 %) et le temps de contact sont trois paramètres déterminant l'effet virucide et ces effets sont variables en fonction du virus substitut. Dans la première étude, l'éthanol (EtOH), à une concentration de 70 %, a un effet significatif sur le titre infectieux et le nombre de copies génomiques de MNV tandis que l'effet au niveau des paramètres de FCV est non significatif. Avec des résultats similaires, Park *et al.* (2010) conclut qu'il existe une corrélation significative entre la réduction de l'infectiosité et la diminution du nombre de copies génomiques pour le MNV mais qu'elle n'existe pas pour le FCV. Dans l'étude de Tung *et al.* (2013), les effets de l'EtOH 70 % ne sont visibles que sur le MNV, les réductions du titre infectieux et du nombre de copies génomiques de FCV sont quasi nulles. Cette absence d'effet sur FCV peut s'expliquer par le temps de contact très court (30 sec) avec l'EtOH.

D'après l'étude de Cromeans *et al.*, l'EtOH est plus efficace que l'isopropanol, le MNV est plus sensible à l'EtOH 90 % que 70 % et FCV est plus sensible à l'EtOH 70 % que 90°C (Cromeans *et al.* 2014).

L'ARN de MNV est aussi plus affecté que l'ARN de plusieurs souches de HuNoV par l'EtOH, et les souches de HuNoV présentent des degrés d'inactivation différents entre elles (Cromeans *et al.* 2014). Le MNV est donc plus sensible que le FCV aux désinfectants contenant de l'alcool (Park *et al.* 2010; Tung *et al.* 2013; Cromeans *et al.* 2014). Les différences obtenues entre MNV et FCV suggèrent aussi une différence au niveau de l'intégrité de leur capsid (Cannon *et al.* 2006; Park *et al.* 2010). La région de la capsid qui se lie au récepteur cellulaire contient de nombreux résidus hydrophiles dans le cas de MNV et hydrophobes dans le cas de FCV. L'EtOH affectant les acides aminés hydrophiles, ceci pourrait expliquer l'effet plus important de l'EtOH sur MNV démontré au cours de cette étude et par Sattar *et al.* (2011).

4.2. L'optimisation des tests de virucidie

Une des grandes difficultés dans les tests de virucide est l'absence d'harmonisation entre les études due en partie au grand nombre de paramètres variables. Les conditions des tests peuvent varier à de nombreux niveaux.

4.2.1 Choix des virus substitués

Le choix des virus substitués a déjà été discuté au début de ce chapitre. Utiliser différents virus substitués permet d'accroître les résultats obtenus et les différences entre substitués permettent peut-être de mieux refléter la diversité entre les souches de HuNoV. Le choix du substitut dépend aussi des conditions testées (notamment la température, le pH et l'humidité relative) et du type de procédé de désinfection (chimique ou physique). L'objectif est de choisir un virus substitut dont les propriétés physico-chimiques et le comportement se rapprochent le plus possible des HuNoV pour que les résultats ne soient ni surestimés ni sous-estimés.

4.2.2. Comparaison entre les différents types de tests virucides

Les virus déposés sur une surface et laissés séchés sont plus résistants aux désinfectants par rapport aux virus testés en suspension (Sattar *et al.* 2003; Terpstra *et al.* 2007). Les tests en suspension présentent donc le risque de surestimer l'efficacité d'un désinfectant. Dans la première étude, les résultats des tests en suspension ne surestiment pas systématiquement les effets virucides. Multiplier les types de tests et les supports permet d'apporter une information plus complète sur l'effet du désinfectant. Parmi les différents types de surfaces testées, la création d'un

standard permettrait d'établir une liste de surfaces de référence et permettre ainsi une comparaison plus aisée entre les différentes études.

La nébulisation présente des avantages par rapport à la désinfection conventionnelle notamment une meilleure distribution du désinfectant dans la pièce traitée (Andersen et al. 2006; Tuladhar et al. 2012; Otter et al. 2014). Cependant il a aussi été démontré que les compartiments fermés n'étaient pas atteints, la désinfection conventionnelle reste donc nécessaire pour atteindre certains emplacements (Tuladhar et al. 2012).

4.2.3. Les conditions du test virucide

Les conditions du test peuvent varier à plusieurs niveaux et avoir un impact sur l'effet virucide et rendre la comparaison entre les études moins aisée.

La concentration choisie pour un désinfectant dépend généralement des recommandations faites par le fabricant. Cependant les recommandations pour un effet virucide peuvent être indisponibles (non fournies par le fabricant ou inexistante dans la littérature scientifique) ou disponibles mais concernant d'autres virus ou disponibles avec plusieurs concentrations en fonction du virus cible.

Le titre initial de l'inoculum testé doit être suffisamment élevé, même après séchage, pour qu'une réduction de 3 ou 4 \log_{10} soit déterminée et le volume de l'inoculum doit aussi être dans des proportions adéquates par rapport au volume du désinfectant. Le titre viral initial peut avoir une influence sur l'activité virucide du désinfectant comme cela a été démontré pour l'EtOH sur HuNoV (Wang and Tian 2014).

Le temps de contact peut avoir une influence. Même s'il est admis en règle générale que l'efficacité augmente avec le temps de contact, l'efficacité atteint généralement un plateau après un certain temps. Réduire le temps de contact d'un désinfectant en conservant son efficacité permet une utilisation pratique et compatible avec les conditions de terrain.

La persistance dans l'environnement est parfois spécifique du type de surface. Les différences sont significatives lorsqu'il s'agit de surfaces aux propriétés différentes : surfaces poreuses, non poreuses ou auto-désinfectantes. La persistance de MNV, FCV et HuNoV n'est pas affectée par des surfaces de type non poreux telles que l'acier et le plastique (Mormann et al. 2015). Une conclusion similaire a été démontrée pour le FCV et les HuNoV, détectés jusqu'à 7 jours post-inoculation sur trois types de surfaces différentes telles le formica, l'acier et la céramique (D'Souza et al. 2006). Dans une autre étude, la persistance de FCV est de maximum trois jours et est significativement plus longue sur le téléphone (combiné et touches) que sur les autres surfaces

testées (≤ 2 jours) (Clay et al. 2006). La persistance de MNV varie en fonction des études : maximum 5 jours (Cannon et al. 2006), entre 14 et 21 jours (Escudero et al. 2012) voire plus de 42 jours (Fallahi and Mattison 2011). La diversité des résultats peut s'expliquer par le type de milieu dans lequel est resuspendu le virus, la présence ou non de matières fécales, la méthode pour récupérer les virus, le fait que le virus soit dans des conditions humides (en suspension) ou sèches (inoculum séché sur la surface testée) et la présence d'aliments (Cannon et al. 2006; Takahashi et al. 2011; Escudero et al. 2012). Lors d'études sur des surfaces poreuses comme le bois ou des surfaces comme le cuivre, les résultats peuvent être significativement différents par rapport aux surfaces non poreuses en raison de l'absorption d'une partie de l'inoculum pour les premières et d'une activité antimicrobienne due aux ions pour les secondes (Warnes and Keevil 2013; Ha et al. 2015).

La température et l'humidité relative influencent sur la persistance des virus. Pour la plupart des virus, leur persistance à faible température est plus grande (Kramer et al. 2006). La résistance de MNV et FCV à température ambiante est inférieure à 7 jours tandis qu'à 7 °C, elle est prolongée jusqu'à 70 jours et MNV est plus stable dans ces conditions (Mormann et al. 2015). L'humidité relative n'a pas eu d'effet significatif sur la persistance de MNV (Kim et al. 2012a) tandis qu'une autre étude suggère que HuNoV est plus résistant à haute humidité relative ($> 80\%$) (Girard et al. 2010).

La présence d'aliment permet aux virus de résister plus longtemps d'une part et interfère avec l'activité virucide d'autre part (Takahashi et al. 2011). Des conditions humides ou la présence de matières fécales permettent aussi aux virus de persister plus longtemps (Cannon et al. 2006; Fallahi and Mattison 2011; Escudero et al. 2012).

4.2.4. Le type de désinfectant

Les désinfectants disponibles sur le marché sont parfois une association de désinfectants issus de différentes familles de désinfectants. Les effets observés sont donc difficilement attribuables à une famille de désinfectant en particulier. De plus une synergie positive peut avoir lieu entre deux ou plusieurs désinfectants. Néanmoins, l'avantage de tester un désinfectant présent sur le marché permet de déterminer son effet virucide sur des virus substitués de HuNoV et d'apporter une réponse fiable aux utilisateurs de ces désinfectants et de conclure à son utilisation dans des industries agro-alimentaires ou des établissements de santé susceptibles de rencontrer des HuNoV.

4.3. L'interprétation des résultats

La seconde difficulté dans les études sur la virucidie concerne l'interprétation des résultats.

4.3.1. L'extrapolation des résultats

Les résultats des tests de virucidie sont obtenus à partir du MNV et du FCV et doivent être prudemment interprétés en cas d'extrapolation pour les HuNoV. Cependant tant que la répllication *in vitro* des HuNoV n'est pas aisément reproductible et ne produit pas des titres infectieux suffisamment élevés (Jones et al. 2015), l'utilisation de virus substitués reste la méthode principale permettant d'évaluer l'effet des désinfectants sur les HuNoV.

4.3.2. L'effet sur les copies génomiques

L'effet sur les copies génomiques est déduit d'une RT-qPCR réalisée sur une petite portion du génome. Les résultats sont extrapolés pour l'ensemble du génome alors que l'effet du désinfectant pourrait être différent suivant les régions du génome détectées par RT-PCR. De plus, les réductions sur le nombre de copies génomiques des virus substitués sous-estiment toujours les effets observés sur les titres infectieux ce qui est compréhensible puisque les critères étudiés ne sont pas les mêmes. Les réductions de copies génomiques des HuNoV sont aussi toujours plus faibles que celles des virus substitués suggérant une résistance plus élevée de l'ARN de HuNoV comparé à l'ARN des virus FCV et MNV (Knight et al. 2016).

4.3.3. La réduction du titre viral

Aux Etats-Unis, les virucides sont réglementés par l'agence de protection environnementale (EPA). Pour que le désinfectant soit considéré comme virucide, l'EPA requiert soit l'inactivation complète du virus à toutes les dilutions de l'essai, soit une réduction de trois \log_{10} du titre viral en cas de cytotoxicité. Dans les directives sur l'application des principes généraux d'hygiène alimentaire pour la maîtrise des virus dans les aliments du Codex Alimentarius de 2012, les désinfectants démontrant une réduction du titre viral $> 3 \log_{10}$ peuvent être considérés comme virucides (Codex Alimentarius 2012). Dans la norme Afnor EN 14476 concernant l'essai virucide quantitatif de suspension pour les antiseptiques et désinfectants chimiques utilisés en médecine, la réduction du titre viral doit être d'au moins $4 \log_{10}$ (AFNOR 2007). Une réduction du titre viral de 3 ou $4 \log_{10}$ correspond respectivement à une réduction de la charge virale de 99,9 à 99,99 % ce qui réduit le risque d'infection. Cependant cela ne garantit pas une absence totale de particules virales infectieuses. La réduction du nombre de particules infectieuses peut donc être insuffisante pour

empêcher la transmission du virus via un contact avec l'environnement contaminé (Otter et al. 2011; Tuladhar et al. 2012). La dose infectante des HuNoV semble être relativement peu importante, de l'ordre de 18 à 2800 équivalents génomiques suivant les études (Teunis et al. 2008; Atmar et al. 2014; Kirby et al. 2015). L'excrétion de particules virales par des individus infectés est très importante, de l'ordre de 10^9 particules infectieuses par gramme de matières fécales. Une réduction de $4 \log_{10}$ pourrait donc sembler relativement insuffisante.

Cependant les conditions dans lesquelles ces méthodes de désinfection sont utilisées peuvent laisser présumer que des taux de particules virales aussi élevés ne sont probablement pas systématiquement rencontrés. En effet, une étape préliminaire de nettoyage est réalisée. La phase de nettoyage permet de réduire la charge virale présente et de diminuer le taux de matières organiques. Dans le cas de la nébulisation, cette étape devrait toujours intervenir après une étape de nettoyage ou après le nettoyage et une première désinfection par une méthode conventionnelle. L'importance du nettoyage, l'amélioration de la désinfection et la diminution de l'excrétion virale permettent de diminuer le risque de transmission d'agents pathogènes aux individus via l'environnement. La réduction de l'extension de la contamination virale intervient aussi grâce à la détection et l'identification rapide des individus infectés et asymptomatiques et à leur gestion (Otter et al. 2011).

Dans le cadre des matrices alimentaires, la décontamination des produits frais et la purification des mollusques bivalves permettent de diminuer la charge virale de ces aliments et d'augmenter la sécurité alimentaire vis à vis du consommateur. Réduire la charge virale initialement présente permet après désinfection et utilisation d'un produit virucide (avec une réduction de $4 \log_{10}$) d'obtenir une charge virale résiduelle faible. Les moyens de décontaminations des produits frais sont le lavage à l'eau, la chloration et l'utilisation d'autres agents chimiques. En général, 1 à $2 \log_{10}$ de réduction de la charge en micro-organismes et notamment en virus peuvent être obtenus grâce au lavage des fruits et légumes frais avec de l'eau (Gulati et al. 2001; Baert et al. 2009a; Baert et al. 2009c). Une suspension d'hypochlorite de sodium (halogénés) dans de l'eau (chloration) permet de diminuer la charge virale présente à la surface des aliments et empêche la contamination entre les produits lors des processus de rinçage à l'eau (Casteel et al. 2008; Baert et al. 2009c). D'autres agents oxydants tels que le H_2O_2 et l'acide peracétique peuvent également diminuer la charge virale présente à la surface d'aliments frais (Baert et al. 2009a; Baert et al. 2009c). Baert *et al.* conclut que l'avantage de l'utilisation de désinfectants dans l'eau de lavage n'est pas la réduction d'un ou $2 \log_{10}$ de la charge virale mais est de conserver une eau de rinçage de qualité, sans agents pathogènes afin d'empêcher les contaminations croisées entre eau de lavage et produits frais (Baert et al. 2009c). Les mollusques bivalves sont parfois placés dans des bassins d'eau de mer propre appelés bassins de dépuración afin qu'ils reprennent leur activité de filtration et expulsent les

contaminants microbiens. L'efficacité de ces bassins a été démontrée pour les bactéries, mais reste limitée voire inexistante concernant les virus (HAV et HuNoV) (Lee et al. 2008; Baert et al. 2009a). L'eau nécessaire pour alimenter ces bassins peut parfois être traitée avec des désinfectants. Ces désinfectants doivent non seulement être efficaces contre les microorganismes mais également compatibles avec les micro-organismes des biofiltres et les matériaux des bassins (Lee et al. 2008). Toutes ces méthodes participent à diminuer la charge virale des aliments concernés et indirectement à diminuer la charge virale de l'environnement avec lequel ils pourraient être en contact.

4.4. Hypothèses sur les mécanismes d'action des désinfectants sur les virus

Les mécanismes d'action des désinfectants sur les virus ne sont pas encore complètement élucidés, notamment envers les virus non enveloppés, par définition plus résistants que les virus enveloppés et les données récoltées sont parfois contradictoires (Maillard 2001). Le type de désinfectant et son mécanisme d'action conditionnent son effet virucide (Wigginton et al. 2012). Les deux principales cibles des désinfectants pour les virus non enveloppés sont la capsid et le génome du virus. Dans le cas des virus enveloppés, la cible principale des désinfectants est l'enveloppe virale. Les hypothèses des mécanismes d'action ne concernent dans cette thèse que des virus non enveloppés.

Le désinfectant peut avoir un effet sur la capsid en la modifiant de manière totale ou partielle. En cas de destruction totale de la capsid, on peut supposer que la particule virale ne pourra plus s'attacher aux cellules cibles et que le processus d'infection ne peut se poursuivre. En cas de destruction partielle, l'infectivité de la particule virale peut être altérée en fonction de la région modifiée de la capsid. Si la région modifiée est impliquée dans l'attachement à un récepteur ou à un co-récepteur et que cette phase est altérée alors on peut supposer une réduction de l'infectivité. Dans le cas d'une altération de la capsid dans une région non requise pour l'attachement, cette étape pourrait donc se réaliser et cela suppose que les étapes suivantes du cycle viral pourraient potentiellement se produire, conduisant à l'infection de la cellule.

Un autre type d'interaction du désinfectant avec la capsid virale serait la fixation du désinfectant lui-même sur la capsid virale dans les régions normalement impliquées dans la phase d'attachement du virus sur la cellule hôte. La particule virale ainsi associée au désinfectant serait incapable de s'attacher aux récepteurs des cellules hôtes, inhibant la poursuite du cycle viral. Il a été démontré que le citrate modifiait la morphologie des VLP de NoV et pouvait se fixer sur le domaine P du NoV GII.10 (Hansman et al. 2012; Koromyslova et al. 2015).

La deuxième cible des désinfectants peut être le génome viral. En observant l'effet d'un désinfectant sur l'intégrité génomique via la réduction du nombre de copies génomiques détectées par RT-qPCR, des informations sur le mécanisme d'action peuvent être obtenues. Les données

obtenues via l'effet des désinfectants sur le nombre de copies génomiques ne sont pas toujours en corrélation avec l'effet sur le titre infectieux. En effet, soit cette corrélation est spécifique du virus ou du désinfectant étudiés soit la réduction du nombre de copies génomiques n'est pas systématiquement associée à une réduction du titre viral. Dans le cadre de l'évaluation de l'efficacité d'un désinfectant, un des inconvénients de la RT-qPCR est de ne cibler qu'une fraction du génome. En cas d'absence d'effet visible via la RT-qPCR, l'effet sur les autres parties du génome que celle ciblée par les amorces de la PCR, reste inconnu même si l'action chimique du désinfectant est supposée s'effectuer de manière identique sur l'entièreté du génome. Certaines études développent des RT-qPCR sur des longs fragments de génome (*long range RT-qPCR*) afin de maximiser les chances d'observer un effet sur l'ARN viral (Li et al. 2014).

Via des études sur d'autres virus, il a été démontré que les halogénés n'affectaient ni le génome ni l'attachement de l'adénovirus de type 2 (Page et al. 2010; Gall et al. 2015). Le mécanisme d'action des halogénés sur l'adénovirus humain de type 2 interviendrait durant une étape post-attachement et avant la synthèse des protéines virales précoces. La cible des halogénés serait donc les protéines virales responsables de l'entrée du virus, de la décapsidation ou de la libération de l'ARN dans le noyau cellulaire (Gall et al. 2015). L'effet sur les HuNoV est différent puisque les halogénés affectent la structure de la capsid et entraîne une incapacité du virus à se fixer au récepteur cellulaire (Wang and Tian 2014).

Les désinfectants à base d'alcool ont tendance à diminuer le titre viral de MNV et FCV. En fonction des conditions du test, du type d'alcool et du virus substitut, la diminution est parfois suffisante pour que le désinfectant soit considéré comme virucide vis-à-vis du virus substitut et donc vis-à-vis de HuNoV par extrapolation. La diminution du nombre de copies génomiques se produit aussi mais dans une moindre mesure. Le mécanisme d'action des virucides à base d'alcools semble donc être une dénaturation des protéines de la capsid même si le fonctionnement précis n'est pas encore connu (Belliot et al. 2008; Park et al. 2010; Hoelzer et al. 2013).

Discussion générale sur le désinfectant le mieux adapté en fonction des conditions d'utilisation

D'après McDonnell (2007), les trois critères dans le choix d'un désinfectant sont l'efficacité, la sécurité et la compatibilité. L'efficacité du désinfectant est démontrée via une réduction du titre viral de minimum 3-4 \log_{10} . Idéalement le virus testé devrait être le virus susceptible d'être rencontré sur le terrain ou un virus substitut de résistance similaire aux virus potentiellement rencontrés. La sécurité doit prendre en compte les risques liés à l'utilisation du désinfectant, les résidus sur les surfaces ou dans les produits traités, les réactions avec d'autres produits et les dangers pour

l'environnement. Enfin le désinfectant doit être compatible avec le type de surface traitée en évitant de causer des dommages (corrosions par exemple) ou des effets indésirables en cas de contact avec des aliments.

Dans le secteur agro-alimentaire, le H_2O_2 peut être utilisé en raison de sa dégradation rapide en composés inoffensifs pour les hommes et pour l'environnement. Il possède également une activité sporicide, intéressante dans le cadre de désinfection des surfaces et de l'eau (McDonnell 2007). Le H_2O_2 utilisé sous forme d'aérosol ou de vapeur est plus efficace contre le MNV et le FCV et permet d'obtenir une désinfection uniforme du local traité, et peut aussi être employé dans des processus de désinfection et de stérilisation (McDonnell 2007; Linley et al. 2012). La toxicité des halogénés, dépendant de la concentration d'utilisation, doit être prise en compte en fonction du domaine d'application (contact avec des aliments et toxicité pour le personnel). Les désinfectants à base d'alcool sont inhibés par la présence de matières organiques et sont donc recommandés uniquement associés à d'autres substances détergentes ou désinfectantes.

Conclusions et perspectives

CHAPITRE 5 : CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Les résultats présentés dans cette thèse fournissent des informations sur l'effet virucide de plusieurs désinfectants sur deux virus substituts majeurs des HuNoV, le MNV et le FCV. Les NoV représentent un réel problème de santé publique dans le monde. Disposer de moyens efficaces de désinfection des lieux sujets aux contaminations par les NoV permet de limiter le risque d'infection des individus via les surfaces contaminées ou les matrices alimentaires et d'améliorer indirectement la santé des individus (consommateurs, patients, personnel d'établissements de soins de santé ou d'industries agro-alimentaires).

L'effet virucide d'un désinfectant dépend de plusieurs paramètres : le virus substitut utilisé, le type de test ou de surface testée, la concentration et le temps de contact du désinfectant évalué. Dans cette thèse, les désinfectants appartenant aux familles des halogénés (hypochlorite de sodium), des agents oxydants (peroxyde d'hydrogène seul en nébulisation ou associé à l'acide peracétique) et un désinfectant composé d'un mélange de QAC, d'alcool et d'aldéhyde (BAC et DAC, isopropanol et glutaraldéhyde) sont les familles de désinfectants avec un effet virucide plus marqué sur MNV et FCV. L'utilisation de ces trois désinfectants est donc recommandée pour la désinfection de surfaces potentiellement contaminées par les HuNoV.

L'effet sur le nombre de copies génomiques fournit des informations supplémentaires au niveau du mécanisme d'action et de la cible du désinfectant mais ce seul paramètre ne permet pas toujours de définir l'efficacité virucide du désinfectant. En cas de réduction importante du nombre de copies génomiques du virus substitut, on peut suspecter un effet virucide via la dégradation du matériel génétique du virus nécessaire à son infectivité d'une part et via un effet supposé sur la capsidie si celle-ci a été altérée d'autre part. A contrario, en cas d'absence d'effet significatif sur le nombre de copies génomiques, aucune conclusion sur l'effet virucide ne peut être tirée.

Par extrapolation des résultats obtenus sur le MNV et le FCV, un effet similaire sur les HuNoV peut être suggéré. Cependant si la capsidie et l'ARN des HuNoV s'avéraient plus résistants que ceux des virus substituts, les résultats obtenus sur les virus substituts pourraient surestimer l'effet virucide des désinfectants testés. Ce risque doit être pris en compte et justifie en partie l'utilisation de deux ou plusieurs virus substituts afin de multiplier les résultats.

D'après les résultats obtenus lors de la deuxième étude portant sur la nébulisation, cet outil de désinfection complémentaire des systèmes de désinfection conventionnels s'avère efficace contre les deux principaux virus substituts des HuNoV et son utilisation devrait continuer à être promue au sein d'établissements confrontés à des virus résistants dans l'environnement. La nébulisation peut être utilisée en routine en l'intégrant dans les protocoles de désinfection et ponctuellement lors

d'épidémies pour enrayer celles-ci plus rapidement, limiter les nombres de cas et réduire les coûts économiques engendrés.

La troisième étude a permis d'observer que la phase d'attachement du MNV était modifiée par de nombreux désinfectants suggérant que la perte d'infectivité de MNV soit provoquée par l'inhibition de l'attachement du virus aux récepteurs cellulaires, compromettant la suite du cycle viral nécessaire à l'infection des cellules.

Le développement récent d'un système de culture cellulaire sur lymphocytes B pour les HuNoV permet d'entrevoir de nombreuses perspectives (Jones et al. 2015). En effet, l'étude des effets virucides pourra se faire directement sur les particules virales et permettra ainsi de calculer une réduction du titre viral et savoir d'une part quels désinfectants sont efficaces contre les HuNoV et d'autre part comparer les résultats obtenus entre les différents virus : entre les HuNoV et leurs virus substitués et entre HuNoV de différents génogroupes.

En parallèle du développement d'un système de culture *in vitro* pour les HuNoV, les études sur les VLP de NoV permettent d'obtenir des informations importantes concernant l'effet des virucides sur la capsid virale. Cependant l'inconvénient majeur de ces techniques provient du fait que des particules virales ayant perdu leur infectivité peuvent encore posséder une capsid (intégrale ou partiellement intégrale) avec un site d'attachement au récepteur intact. En comptabilisant toutes les particules virales attachées comme des virus infectieux alors qu'une partie pourrait ne plus l'être, les méthodes d'attachement viral à la surface des cellules risquent donc de surestimer le nombre de virus infectieux.

En préalable à la désinfection, la phase de nettoyage est essentielle. Par des moyens physiques et chimiques, le nettoyage permet d'enlever les matières organiques (des lipides, des protéines et des glucides) et inorganiques (certains métaux comme le fer) présentes, de fragiliser et ou détruire le biofilm bactérien et de diminuer la charge virale initialement présente sur les surfaces. Tous ces facteurs peuvent interférer avec l'activité du désinfectant. L'étape de nettoyage précède l'étape de désinfection et reste un principe fondamental des règles d'hygiène.

Afin de limiter les risques d'épidémies dues aux NoV, de nombreux moyens de prévention existent et peuvent être mis en place à différents niveaux. L'hygiène des mains du personnel et des patients dans les établissements de santé et des employés travaillant au contact de denrées alimentaires devrait être scrupuleusement appliquée et respectée. Une identification et une mise en congé des employés malades permettent de limiter la transmission virale et, d'après les recommandations de la littérature, les employés atteints de gastroentérite due aux HuNoV ne devraient revenir travailler que minimum 48 à 72 heures après la fin des symptômes (Koo et al. 2010; Weber et al. 2010).

Les matrices alimentaires étant parfois à l'origine d'épidémies aux HuNoV, l'investigation des moyens pour réduire la charge virale dans les aliments permet d'améliorer la sécurité alimentaire. Par exemple, l'application d'un système de hautes pressions hydrostatiques sur des matrices alimentaires est prometteuse puisque sous certaines conditions, une réduction du titre viral de plusieurs \log_{10} a pu être obtenus sur différents virus comme le HAV ou des substituts des HuNoV sans entraîner une altération du goût ou de la texture de l'aliment (Kingsley 2012; Cromeans et al. 2014). De nouvelles études sont nécessaires afin d'évaluer le comportement des HuNoV et de leurs virus substituts en fonction des paramètres testés, tels que la pression exercée, la durée de celle-ci, la température, le type de virus testé, le type d'aliment (Baert et al. 2009a; Kingsley 2012; Cromeans et al. 2014).

Assez peu d'informations étaient finalement connues concernant l'effet des désinfectants sur les virus non enveloppés, les données issues de cette thèse peuvent donc être utiles pour approfondir l'effet de virucides efficaces contre MNV et FCV sur des modèles d'attachement des HuNoV ou des VLP de HuNoV. Les nouveaux résultats obtenus fourniraient ainsi des informations complémentaires sur le comportement des capsides virales des HuNoV vis-à-vis des désinfectants.

Résumé - Summary

CHAPITRE 6 : RESUME – SUMMARY

RÉSUMÉ

Les norovirus humains (HuNoV) sont une des causes majeures de gastro-entérites aiguës non-bactériennes chez l'homme et constituent un réel problème de santé publique impliquant chaque année et dans le monde entier, de nombreux individus avec des conséquences médicales, sanitaires et économiques importantes. Les effets des désinfectants sur les virus et plus particulièrement sur des virus très résistants dans l'environnement tels que les HuNoV sont assez peu connus.

L'objectif de cette thèse est d'évaluer l'effet des désinfectants sur les HuNoV. La culture *in vitro* de ces derniers étant très difficile et à un stade préliminaire, l'utilisation de virus substitués, proches génétiquement et morphologiquement des HuNoV, est un moyen indirect d'obtenir des informations sur l'effet virucide des désinfectants. Les deux virus substitués des HuNoV, couramment utilisés et pour lesquels un système de culture *in vitro* et une méthode de détermination des plages de lyse existent, sont le norovirus murin (MNV) et le calicivirus félin (FCV).

Dans la première étude, l'effet virucide de sept désinfectants a été évalué au niveau de deux paramètres, le titre viral infectieux et le nombre de copies génomiques, dans des tests en suspension et dans deux tests sur support (l'acier inoxydable et le latex de gants). Cette première étude a permis de démontrer que trois classes de désinfectants permettaient d'obtenir une réduction de plus de trois \log_{10} du titre viral des deux virus substitués dans les trois types de tests évalués : les désinfectants composés soit d'un halogéné, soit d'agents oxydants soit d'un mélange d'ammoniums quaternaires (QAC) avec un alcool et un aldéhyde. Ces trois désinfectants ont aussi montré un effet significatif sur le nombre de copies génomiques des deux virus substitués dans les trois types de tests. Le résultat de cette première étude démontre qu'un halogéné, des agents oxydants et un mélange de QAC, d'alcool et d'aldéhyde sont des désinfectants efficaces sur deux virus substitués des HuNoV et leur utilisation est donc recommandée pour la désinfection de surfaces ou de matériels potentiellement contaminés par les HuNoV.

L'utilisation de technologies de désinfection par voie aérienne est en plein essor, du fait de leur automatisation (l'erreur due au facteur humain est limitée), de la sécurité d'utilisation et de son gain économique (le personnel est disponible pour d'autres tâches). De plus, l'environnement et les surfaces contaminées des établissements de santé, des industries de production et de

transformation (où des denrées alimentaires sont manipulées) sont une source d'infection et participent à la transmission des HuNoV au sein de la population humaine.

La nébulisation de H₂O₂ est un système répartissant une solution de H₂O₂ sous forme de gouttelettes dans l'air et le but de cette deuxième partie est d'évaluer l'effet de la nébulisation sur les deux principaux virus substituts des HuNoV, MNV et FCV, sur deux types de surface, le verre et l'acier inoxydable, représentatives de surfaces rencontrées dans les conditions de terrain. La nébulisation est efficace et peut être considérée comme virucide puisque la réduction moyenne du titre viral des deux virus substituts est supérieure à 4 log₁₀. Les réductions des nombres de copies génomiques ont été relativement peu importantes et confirment donc que ce paramètre n'est pas un outil adéquat dans la détermination de l'efficacité virucide d'un désinfectant à base de peroxyde d'hydrogène. La nébulisation de H₂O₂ devrait être fréquemment recommandée et utilisée comme moyen de désinfection, de manière complémentaire à une désinfection conventionnelle dans les lieux potentiellement contaminés par les HuNoV afin de réduire le risque de contamination et d'augmenter la sécurité des consommateurs, des patients et des employés.

Après l'évaluation des effets de plusieurs désinfectants sur le MNV et le FCV au niveau du titre viral et du nombre de copies génomiques, l'investigation de l'effet des désinfectants s'est poursuivie en explorant l'effet de ces substances sur la phase d'attachement du MNV aux cellules RAW 264.7. L'objectif de cette troisième étude était d'identifier si la phase d'attachement, première étape du cycle viral, était modifiée après utilisation de désinfectants sur le MNV et si ce mécanisme d'action expliquait l'effet virucide constaté dans les études précédentes. Via une observation par microscopie en fluorescence et un immunomarquage indirect, l'attachement du virus n'était plus observé après contact entre le MNV et des alcools (éthanol et isopropanol), du peroxyde d'hydrogène, de la chlorhexidine, du chlorure de benzalkonium (BAC), du chlorure de didécyl diméthylammonium (DAC) 0,08 %, ou du glutaraldéhyde. L'attachement viral est encore partiellement observé après contact entre le MNV et l'hypochlorite de sodium ou le DAC 0,04 %. Tous les désinfectants testés inhibent donc partiellement ou totalement la phase d'attachement, probablement suite à une modification ou une destruction de la capsid de MNV.

En conclusion, il est recommandé que les désinfectants utilisés dans des procédés de désinfection conventionnelle contiennent soit un produit halogéné, soit des agents oxydants soit un mélange de QAC, d'alcool et d'aldéhyde afin de garantir un effet virucide sur des virus tels que les HuNoV. La nébulisation de peroxyde d'hydrogène devrait être promue et proposée dans les établissements sujets aux contaminations par les HuNoV, de manière préventive ou pour enrayer une épidémie à NoV. La modification de la phase d'attachement du MNV semble être un des mécanismes d'action des virucides suggérant une altération de la conformation de la capsid virale.

SUMMARY

Human noroviruses (HuNoV) are amongst the leading causes of acute non-bacterial gastroenteritis in humans and annually constitute a global public health problem involving numerous people with great medical, sanitary and economic consequences. The effects of disinfectants against viruses and more specifically against highly resistant viruses such as HuNoV in the environment are little known and data, sometimes empirically obtained, originate from effects observed with bacteria or enveloped viruses.

The aim of this thesis is to evaluate disinfectant effects against HuNoV. Since *in vitro* culture of HuNoV remains difficult, genetically and morphologically similar viral surrogates, are utilised as indirect tools to obtain data about the virucidal effects of disinfectants. The murine norovirus (MNV) and feline calicivirus (FCV) are two frequently used HuNoV surrogates, for which an *in vitro* cell culture system and a plaque assay protocol exist.

In the first study, the virucidal effect of seven disinfectants was evaluated in suspension tests and in two carriers tests (stainless steel and the latex gloves), using two parameters, the infectious viral titre and the genomic copy number. This first study demonstrated that three disinfectants were able to induce a viral titre reduction of more than three \log_{10} for the two surrogates in all three kinds of tests. The disinfectants were halogen, an oxidizing agent and a mix composed of quaternary ammonium compounds (QAC), an alcohol and an aldehyde. The three disinfectants also showed a significant effect on the genomic copy number of MNV and FCV in all three kinds of tests. In conclusion, this first study demonstrates that the three disinfectants should be considered as disinfectants with likely efficiency against the HuNoV and that their use should be recommended for disinfection of surfaces or materials potentially contaminated by the HuNoV.

The use of touchless disinfection technologies is gaining increasing importance due to their automatization (limited reliance on human factors), safe use and beneficial economic impact (staff is available for other work). It has been conclusively demonstrated that the environment and contaminated surfaces of health institutes and food processing industries can be a source of infection and have been involved in HuNoV transmission amongst the population in numerous instances.

H₂O₂ nebulization is a system that aerosolizes a solution, causing it to form liquid droplets in the air. The goal of the second part of this thesis is to evaluate the effect of nebulization on the two main HuNoV surrogates, MNV and FCV, on two different surfaces, i.e. glass and stainless steel, representing the surfaces typically present in field conditions. The H₂O₂ nebulization was shown to be efficient, mediating a mean viral titre reduction of both surrogates of more than 4 \log_{10} , and should

henceforth be considered as virucidal. The reductions of genomic copies were relatively low, confirming that this parameter is not an adequate tool for the determination of virucidal efficiency of a system nebulizing H₂O₂. In order to reduce the risk of contamination and increase the security of consumers, patients and employees, the nebulization of H₂O₂ should be recommended for use as a disinfection system, complementing conventional disinfection processes in places potentially contaminated by HuNoV.

After the evaluation of the effects of several disinfectants against the MNV and the FCV on the viral titre and the genomic copy number, investigation of the effect of disinfectants was continued by exploring the effect of these disinfectants on the binding step of MNV on RAW 264.7 cells. The aim of this third study was to identify whether the binding step, the first step of the viral replicative cycle, was modified after the use of disinfectants on MNV and whether this mechanism explained the virucidal effect observed in the previous studies. Via epifluorescent microscopy analysis and an indirect immunofluorescence assay, viral attachment was not observed after contact of MNV with alcohol (ethanol and isopropanol), H₂O₂, chlorhexidine, benzylammonium-chloride (BAC), didecyldimethyl-ammoniumchloride (DAC) at a concentration of 0.08 % or glutaraldehyde. Viral attachment was still partially observed after contact of MNV with the sodium hypochlorite or DAC at a concentration of 0.04 %. All tested disinfectants partially or totally inhibit the binding step, probably due a modification or a destruction of the MNV capsid.

In conclusion, any disinfectants utilized in a disinfection process should include either a halogen product, oxidizing agents or a mix of QAC with an alcohol and an aldehyde in order to guarantee a virucidal effect against viruses such as the HuNoV. The nebulization of hydrogen peroxide should be employed both preventively and in the course of HuNoV outbreaks in places with HuNoV contamination. Amongst different mechanisms of action of virucidal disinfectants, one mechanism against MNV could be the inhibition of cellular receptor binding via structural modification of the viral capsid.

Références bibliographiques

CHAPITRE 7 : BIBLIOGRAPHIE

A

- AFNOR (1981). NF T 72 101: Antiseptiques et désinfectants, vocabulaire. (pp. 3): Association Française de Normalisation.
- AFNOR (2007). EN 14476 Antiseptiques et désinfectants chimiques. (pp. 34): Association Française de Normalisation.
- Ahmed, S. M., Hall, A. J., Robinson, A. E., Verhoef, L., Premkumar, P., Parashar, U. D., Koopmans, M., & Lopman, B. A. (2014). Global prevalence of norovirus in cases of gastroenteritis: A systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis*, **14**, 725-730.
- Andersen, B. M., Rasch, M., Hochlin, K., Jensen, F. H., Wismar, P., & Fredriksen, J. E. (2006). Decontamination of rooms, medical equipment and ambulances using an aerosol of hydrogen peroxide disinfectant. *J Hosp Infect*, **62**, 149-155.
- Atmar, R. L. (2010). Noroviruses: State of the Art. *Food Environ Virol*, **2**, 117-126.
- Atmar, R. L., Opekun, A. R., Gilger, M. A., Estes, M. K., Crawford, S. E., Neill, F. H., & Graham, D. Y. (2008). Norwalk virus shedding after experimental human infection. *Emerg Infect Dis*, **14**, 1553-1557.
- Atmar, R. L., Opekun, A. R., Gilger, M. A., Estes, M. K., Crawford, S. E., Neill, F. H., Ramani, S., Hill, H., Ferreira, J., & Graham, D. Y. (2014). Determination of the 50 % human infectious dose for Norwalk virus. *J Infect Dis*, **209**, 1016-1022.
- B
- Bae, J., & Schwab, K. J. (2008). Evaluation of murine norovirus, feline calicivirus, poliovirus, and MS2 as surrogates for human norovirus in a model of viral persistence in surface water and groundwater. *Appl Environ Microbiol*, **74**, 477-484.
- Baert, L., Debevere, J., & Uyttendaele, M. (2009a). The efficacy of preservation methods to inactivate foodborne viruses. *Int J Food Microbiol*, **131**, 83-94.
- Baert, L., Mattison, K., Loisy-Hamon, F., Harlow, J., Martyres, A., Lebeau, B., Stals, A., Van Coillie, E., Herman, L., & Uyttendaele, M. (2011). Review: Norovirus prevalence in Belgian, Canadian and French fresh produce: A threat to human health? *Int J Food Microbiol*, **151**, 261-269.
- Baert, L., Uyttendaele, M., Stals, A., van Coillie, E., Dierick, K., Debevere, J., & Botteldoorn, N. (2009b). Reported foodborne outbreaks due to noroviruses in Belgium: The link between food and patient investigations in an international context. *Epidemiol Infect*, **137**, 316-325.
- Baert, L., Vandekinderen, I., Devlieghere, F., Van, E. C., Debevere, J., & Uyttendaele, M. (2009c). Efficacy of sodium hypochlorite and peroxyacetic acid to reduce murine norovirus 1, B40-8, *Listeria monocytogenes*, and *Escherichia coli* O157:H7 on shredded iceberg lettuce and in residual wash water. *J Food Prot*, **72**, 1047-1054.
- Baert, L., Wobus, C. E., Van Coillie, E., Thackray, L. B., Debevere, J., & Uyttendaele, M. (2008). Detection of murine norovirus 1 by using plaque assay, transfection assay, and real-time reverse transcription-PCR before and after heat exposure. *Appl Environ Microbiol*, **74**, 543-546.
- Ball, J. M., Mitchell, D. M., Gibbons, T. F., & Parr, R. D. (2005). Rotavirus NSP4: A multifunctional viral enterotoxin. *Viral Immunol*, **18**, 27-40.
- Belliot, G., Lavaux, A., Souihel, D., Agnello, D., & Pothier, P. (2008). Use of murine norovirus as a surrogate to evaluate resistance of human norovirus to disinfectants. *Appl Environ Microbiol*, **74**, 3315-3318.
- Bellou, M., Kokkinos, P., & Vantarakis, A. (2013). Shellfish-borne viral outbreaks: A systematic review. *Food Environ Virol*, **5**, 13-23.

- Bentley, K., Dove, B. K., Parks, S. R., Walker, J. T., & Bennett, A. M. (2012). Hydrogen peroxide vapour decontamination of surfaces artificially contaminated with norovirus surrogate feline calicivirus. *J Hosp Infect*, **80**, 116-121.
- Bertolotti-Ciarlet, A., Crawford, S. E., Hutson, A. M., & Estes, M. K. (2003). The 3' End of Norwalk Virus mRNA Contains Determinants That Regulate the Expression and Stability of the Viral Capsid Protein VP1: A Novel Function for the VP2 Protein. *J Virol*, **77**, 11603-11615.
- Besselsen, D. G., Franklin, C. L., Livingston, R. S., & Riley, L. K. (2012). Lurking in the shadows: Emerging rodent infectious diseases. *ILAR J*, **53**, 277-290.
- Bidawid, S., Malik, N., Adegbunrin, O., Sattar, S. A., & Farber, J. M. (2003). A feline kidney cell line-based plaque assay for feline calicivirus, a surrogate for Norwalk virus. *J Virol Methods*, **107**, 163-167.
- Bitler, E. J., Matthews, J. E., Dickey, B. W., Eisenberg, J. N. S., & Leon, J. S. (2013). Norovirus outbreaks: A systematic review of commonly implicated transmission routes and vehicles. *Epidemiol Infect*, **141**, 1563-1571.
- Blazewski, C., Wallet, F., Rouzé, A., Le Guern, R., Ponthieux, S., Salleron, J., & Nseir, S. (2015). Efficiency of hydrogen peroxide in improving disinfection of ICU rooms. *Crit Care*, **19**, 30-37.
- Block, S. S. (2001). *Disinfection, sterilization, and preservation* Lippincott Williams & Wilkins.
- Bolton, S. L., Kotwal, G., Harrison, M. A., Law, S. E., Harrison, J. A., & Cannon, J. L. (2013). Sanitizer efficacy against murine norovirus, a surrogate for human norovirus, on stainless steel surfaces when using three application methods. *Appl Environ Microbiol*, **79**, 1368-1377.
- Bresee, J. S., Widdowson, M. A., Monroe, S. S., & Glass, R. I. (2002). Foodborne viral gastroenteritis: Challenges and opportunities. *Clin Infect Dis*, **35**, 748-753.
- Bull, R. A., & White, P. A. (2011). Mechanisms of GII.4 norovirus evolution. *Trends Microbiol*, **19**, 233-240.
- Butot, S., Putallaz, T., Amoroso, R., & Sánchez, G. (2009). Inactivation of enteric viruses in minimally processed berries and herbs. *Appl Environ Microbiol*, **75**, 4155-4161.
- C**
- Cannon, J. L., Papafragkou, E., Park, G. W., Osborne, J., Jaykus, L. A., & Vinjé, J. (2006). Surrogates for the study, of norovirus stability and inactivation in the environment: A comparison of murine norovirus and feline calicivirus. *J Food Prot*, **69**, 2761-2765.
- Casteel, M. J., Schmidt, C. E., & Sobsey, M. D. (2008). Chlorine disinfection of produce to inactivate hepatitis A virus and coliphage MS2. *Int J Food Microbiol*, **125**, 267-273.
- Chambon, M., Bailly, J. L., & Peigue-Lafeuille, H. (1992). Activity of glutaraldehyde at low concentrations against capsid proteins of poliovirus type 1 and echovirus type 25. *Appl Environ Microbiol*, **58**, 3517-3521.
- Chambon, M., Bailly, J. L., & Peigue-Lafeuille, H. (1999). Antiseptiques, désinfectants chimiques et virus en secteur médical. *Virologie*, **3**, 367-379.
- Chen, R., Neill, J. D., Noel, J. S., Hutson, A. M., Glass, R. I., Estes, M. K., & Prasad, B. V. V. (2004). Inter- and intragenus structural variations in caliciviruses and their functional implications. *J Virol*, **78**, 6469-6479.
- Choi, N. Y., Baek, S. Y., Yoon, J. H., Choi, M. R., Kang, D. H., & Lee, S. Y. (2012). Efficacy of aerosolized hydrogen peroxide-based sanitizer on the reduction of pathogenic bacteria on a stainless steel surface. *Food Control*, **27**, 57-63.
- Clarke, I. N., & Lambden, P. R. (1997). The molecular biology of caliciviruses. *J Gen Mol Virol*, **78**, 291-301.
- Clarke, I. N., & Lambden, P. R. (2000). Organization and expression of calicivirus genes. *J Infect Dis*, **181**, S309-S316.

- Clay, S., Maherchandani, S., Malik, Y. S., & Goyal, S. M. (2006). Survival on uncommon fomites of feline calicivirus, a surrogate of noroviruses. *Am J Infect Control*, **34**, 41-43.
- Cliver, D. O. (2009). Capsid and infectivity in virus detection. *Food Environ Virol*, **1**, 123-128.
- Codex Alimentarius (2012). CAC/GL 79-2012 Guidelines on the application of general principles of food hygiene to the control of viruses in food. Codex Committee on Food Hygiene.
- Crandell, R. A., Fabricant, C. G., & Nelson Rees, W. A. (1973). Development, characterization, and viral susceptibility of a feline (*Felis catus*) renal cell line (CRFK). *In Vitro*, **9**, 176-185.
- Cromeans, T., Park, G. W., Costantini, V., Lee, D., Wang, Q., Farkas, T., Lee, A., & Vinje, J. (2014). Comprehensive comparison of cultivable norovirus surrogates in response to different inactivation and disinfection treatments. *Appl Environ Microbiol*, **80**, 5743-5751.
- D**
- D'Souza, D. H., Sair, A., Williams, K., Papafragkou, E., Jean, J., Moore, C., & Jaykus, L. (2006). Persistence of caliciviruses on environmental surfaces and their transfer to food. *Int J Food Microbiol*, **108**, 84-91.
- D'Souza, D. H., & Su, X. (2010). Efficacy of chemical treatments against murine norovirus, feline calicivirus, and MS2 bacteriophage. *Foodborne Pathog Dis*, **7**, 319-326.
- da Silva Poló, T., Peiró, J. R., Mendes, L. C. N., Ludwig, L. F., de Oliveira-Filho, E. F., Bucardo, F., Huynen, P., Melin, P., Thiry, E., & Mauroy, A. (2016). Human norovirus infection in Latin America. *J Clin Virol*, **78**, 111-119.
- Dancer, S. J. (2014). Cleaning and decontamination of the healthcare environment. In J. T. Walker (Ed.), *Decontamination in Hospitals and Healthcare* (pp. 370-397): Woodhead Publishing.
- Daughenbaugh, K. F., Fraser, C. S., Hershey, J. W. B., & Hardy, M. E. (2003). The genome-linked protein VPg of the Norwalk virus binds eIF3, suggesting its role in translation initiation complex recruitment. *EMBO J*, **22**, 2852-2859.
- de Abreu Correa, A., Carratala A Fau - Barardi, C. R. M., Barardi Cr Fau - Calvo, M., Calvo M Fau - Girones, R., Girones R Fau - Bofill-Mas, S., & Bofill-Mas, S. (2012). Comparative inactivation of murine norovirus, human adenovirus, and human JC polyomavirus by chlorine in seawater. *Appl Environ Microbiol*, **78**, 6450-6457.
- De Wit, M. A. S., Koopmans, M. P. G., Kortbeek, L. M., Wannet, W. J. B., Vinjé, J., Van Leusden, F., Bartelds, A. I. M., & Van Duynhoven, Y. T. H. P. (2001). Sensor, a population-based cohort study on gastroenteritis in the Netherlands: Incidence and etiology. *Am J Epidemiol*, **154**, 666-674.
- Di Martino, B., Di Rocco, C., Ceci, C., & Marsilio, F. (2009). Characterization of a strain of feline calicivirus isolated from a dog faecal sample. *Vet Microbiol*, **139**, 52-57.
- Di Felice, E., Mauroy, A., Pozzo, F. D., Thiry, D., Ceci, C., Di Martino, B., Marsilio, F., & Thiry, E. (2016). Bovine noroviruses: A missing component of calf diarrhoea diagnosis. *Vet J*, **207**, 53-62.
- Doll, M., Morgan, D. J., Anderson, D., & Bearman, G. (2015). Touchless Technologies for Decontamination in the Hospital: a Review of Hydrogen Peroxide and UV Devices. *Curr Infect Dis Rep*, **17**, 1-11.
- 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.
- Donaldson, E. F., Lindesmith, L. C., Lobue, A. D., & Baric, R. S. (2010). Viral shape-shifting: Norovirus evasion of the human immune system. *Nat Rev Microbiol*, **8**, 231-241.

- Doré, B., Keaveney, S., Flannery, J., & Rajko-Nenow, P. (2010). Management of health risks associated with oysters harvested from a norovirus contaminated area, Ireland, February-March 2010. *Euro Surveill*, **15**, 1-4.
- Dotzauer, A., Brenner, M., Gebhardt, U., & Vallbracht, A. (2005). IgA-coated particles of Hepatitis A virus are translocated antivectorially from the apical to the basolateral site of polarized epithelial cells via the polymeric immunoglobulin receptor. *J Gen Mol Virol*, **86**, 2747-2751.
- Doultree, J. C., Druce, J. D., Birch, C. J., Bowden, D. S., & Marshall, J. A. (1999). Inactivation of feline calicivirus, a Norwalk virus surrogate. *J Hosp Infect*, **41**, 51-57.
- Duffy, S., Shackelton, L. A., & Holmes, E. C. (2008). Rates of evolutionary change in viruses: Patterns and determinants. *Nat Rev Genet*, **9**, 267-276.
- Duizer, E., Bijkerk, P., Rockx, B., De Groot, A., Twisk, F., & Koopmans, M. (2004a). Inactivation of caliciviruses. *Appl Environ Microbiol*, **70**, 4538-4543.
- Duizer, E., Schwab, K. J., Neill, F. H., Atmar, R. L., Koopmans, M. P. G., & Estes, M. K. (2004b). Laboratory efforts to cultivate noroviruses. *J Gen Mol Virol*, **85**, 79-87.
- E**
- EFSA, & ECDC (2011). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2009. *EFSA Journal* **2011**, **9**.
- EFSA, & ECDC (2012). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2010. *EFSA Journal* **2012**, **10**.
- EFSA, & ECDC (2013). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2011. *EFSA Journal* **2013**, **11**.
- Escudero, B. I., Rawsthorne, H., Gensel, C., & Jaykus, L. A. (2012). Persistence and transferability of noroviruses on and between common surfaces and foods. *J Food Prot*, **75**, 927-935.
- Eterpi, M., McDonnell, G., & Thomas, V. (2009). Disinfection efficacy against parvoviruses compared with reference viruses. *J Hosp Infect*, **73**, 64-70.
- F**
- Falagas, M. E., Thomaidis, P. C., Kotsantis, I. K., Sgouros, K., Samonis, G., & Karageorgopoulos, D. E. (2011). Airborne hydrogen peroxide for disinfection of the hospital environment and infection control: A systematic review. *J Hosp Infect*, **78**, 171-177.
- Fallahi, S., & Mattison, K. (2011). Evaluation of murine norovirus persistence in environments relevant to food production and processing. *J Food Prot*, **74**, 1847-1851.
- Farkas, T., Sestak, K., Wei, C., & Jiang, X. (2008). Characterization of a rhesus monkey calicivirus representing a new genus of Caliciviridae. *J Virol*, **82**, 5408-5416.
- Fatica, M. K., & Schneider, K. R. (2009). The use of chlorination and alternative sanitizers in the produce industry. *CAB Reviews*, **4**, 1-10.
- Feigelstock, D., Thompson, P., Mattoo, P., Zhang, Y., & G., A. K. G. (1998). The Human Homolog of HAVcr-1 Codes for a Hepatitis A Virus Cellular Receptor. *J Virol*, **72**, 6621-6628.
- Foley, J., Hurley, K., Pesavento, P. A., Poland, A., & Pedersen, N. C. (2006). Virulent systemic feline calicivirus infection: Local cytokine modulation and contribution of viral mutants. *J Feline Med Surg*, **8**, 55-61.
- Fraisse, A., Temmam, S., Deboosere, N., Guillier, L., Delobel, A., Maris, P., Vialette, M., Morin, T., & Perelle, S. (2011). Comparison of chlorine and peroxyacetic-based disinfectant to inactivate Feline calicivirus, Murine norovirus and Hepatitis A virus on lettuce. *Int J Food Microbiol*, **151**, 98-104.

- Fu, T. Y., Gent, P., & Kumar, V. (2012). Efficacy, efficiency and safety aspects of hydrogen peroxide vapour and aerosolized hydrogen peroxide room disinfection systems. *J Hosp Infect*, **80**, 199-205.
- G**
- Gall, A. M., Shisler, J. L., & Mariñas, B. J. (2015). Analysis of the viral replication cycle of adenovirus serotype 2 after inactivation by free chlorine. *Environ Sci Technol*, **49**, 4584-4590.
- Gehrke, C., Steinmann, J., & Goroncy-Bermes, P. (2004). Inactivation of feline calicivirus, a surrogate of norovirus (formerly Norwalk-like viruses), by different types of alcohol in vitro and in vivo. *J Hosp Infect*, **56**, 49-55.
- Gerba, C. P. (2015). Quaternary ammonium biocides: efficacy in application. *Appl Environ Microbiol*, **81**, 464-469.
- Gerondopoulos, A., Jackson, T., Monaghan, P., Doyle, N., & Roberts, L. O. (2010). Murine norovirus-1 cell entry is mediated through a non-clathrin-, non-caveolae-, dynamin- And cholesterol-dependent pathway. *J Gen Mol Virol*, **91**, 1428-1438.
- Girard, M., Ngazoa, S., Mattison, K., & Jean, J. (2010). Attachment of noroviruses to stainless steel and their inactivation, using household disinfectants. *J Food Prot*, **73**, 400-404.
- Glass, R. I., Parashar, U. D., & Estes, M. K. (2009). Norovirus gastroenteritis. *N Engl J Med*, **361**, 1776-1785.
- Gonzalez-Hernandez, M. B., Liu, T., Payne, H. C., Stencel-Baerenwald, J. E., Ikizler, M., Yagita, H., Dermody, T. S., Williams, I. R., & Wobus, C. E. (2014). Efficient norovirus and reovirus replication in the mouse intestine requires microfold (M) cells. *J Virol*, **88**, 6934-6943.
- Goyal, S. M., Chander, Y., Yezli, S., & Otter, J. A. (2014). Evaluating the virucidal efficacy of hydrogen peroxide vapour. *J Hosp Infect*, **86**, 255-259.
- Green, K. Y. (2007). Caliciviridae: The noroviruses. In D. M. Knipe, P. M. Howley, D. E. Griffin, R. A. Lamb, M. A. Martin, B. Roizman, et al. (Eds.), *Fields virology* (5th ed., pp. 949-979). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Green, K. Y. (2013). Caliciviridae: The noroviruses. In D. M. Knipe, P. M. Howley, J. I. Cohen, D. E. Griffin, R. A. Lamb, M. A. Martin, et al. (Eds.), *Fields virology* (6th ed., pp. 583-609). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Green, K. Y., Ando, T., Balayan, M. S., Berke, T., Clarke, I. N., Estes, M. K., Matson, D. O., Nakata, S., Neill, J. D., Studdert, M. J., & Thiel, H. J. (2000). Taxonomy of the caliciviruses. *J Infect Dis*, **181**, S322-S330.
- Green, K. Y., Chanock, R. M., & Kapikian, A. Z. (2001). Human caliciviruses. In D. M. Knipe, P. M. Howley, & D. E. Griffin (Eds.), *Fields virology* (Vol. 1, pp. 841-874). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Guix, S., Asanaka, M., Katayama, K., Crawford, S. E., Neill, F. H., Atmar, R. L., & Estes, M. K. (2007). Norwalk virus RNA is infectious in mammalian cells. *J Virol*, **81**, 12238-12248.
- Gulati, B. R., Allwood, P. B., Hedberg, C. W., & Goyal, S. M. (2001). Efficacy of commonly used disinfectants for the inactivation of calicivirus on strawberry, lettuce, and a food-contact surface. *J Food Prot*, **64**, 1430-1434.
- H**
- Ha, J. H., Kim, M. L., Choi, C., Choi, I. S., Myoung, J., & Ha, S. D. (2015). Recovery of structurally intact norovirus from food-contact surfaces. *Food Control*, **47**, 564-568.
- Hall, A. J., Lopman, B. A., Payne, D. C., Patel, M. M., Gastañaduy, P. A., Vinjé, J., & Parashar, U. D. (2013a). Norovirus disease in the United States. *Emerg Infect Dis*, **19**, 1198-1205.

- Hall, A. J., Wikswø, M. E., Manikonda, K., Roberts, V. A., Yoder, J. S., & Hannah Gould, L. (2013b). Acute gastroenteritis surveillance through the national outbreak reporting system, United States. *Emerg Infect Dis*, **19**, 1308-1309.
- Hall, A. J., Wikswø, M. E., Pringle, K., Gould, L. H., & Parashar, U. D. (2014). Vital signs: Foodborne norovirus outbreaks — United States, 2009-2012. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, **63**, 491-495.
- Han, L., Tan, M., Xia, M., Kitova, E. N., Jiang, X., & Klassen, J. S. (2014). Gangliosides are ligands for human noroviruses. *J Am Chem Soc*, **136**, 12631-12637.
- Hannah Gould, L., Mungai, E. A., Johnson, S. D., Richardson, L. C., Williams, I. T., Griffin, P. M., Cole, D. J., & Hall, A. J. (2013). Surveillance for foodborne disease outbreaks - United States, 2009-2010. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, **62**, 41-47.
- Hansman, G. S., Shahzad-ul-Hussan, S., McLellan, J. S., Chuang, G. Y., Georgiev, I., Shimoike, T., Katayama, K., Bewley, C. A., & Kwong, P. D. (2012). Structural basis for norovirus inhibition and fucose mimicry by citrate. *J Virol*, **86**, 284-292.
- Helps, C., Lait, P., Tasker, S., & Harbour, D. (2002). Melting curve analysis of feline calicivirus isolates detected by real-time reverse transcription PCR. *J Virol Methods*, **106**, 241-244.
- Henderson, K. S. (2008). Murine norovirus, a recently discovered and highly prevalent viral agent of mice. *Lab Animal*, **37**, 314-320.
- Hirneisen, K. A., Black, E. P., Cascarino, J. L., Fino, V. R., Hoover, D. G., & Kniel, K. E. (2010). Viral inactivation in foods: A review of traditional and novel food-processing technologies. *Compr Rev Food Sci Food Saf*, **9**, 3-20.
- Hirneisen, K. A., & Kniel, K. E. (2012). Comparison of ELISA attachment and infectivity assays for murine norovirus. *J Virol Methods*, **186**, 14-20.
- Hirneisen, K. A., & Kniel, K. E. (2013). Comparing human norovirus surrogates: Murine norovirus and Tulane virus. *J Food Prot*, **76**, 139-143.
- Hoelzer, K., Fanaselle, W., Pouillot, R., Van Doren, J. M., & Dennis, S. (2013). Virus inactivation on hard surfaces or in suspension by chemical disinfectants: systematic review and meta-analysis of norovirus surrogates. *J Food Prot*, **76**, 1006-1016.
- Holmdahl, T., Lanbeck, P., Wullt, M., & Walder, M. H. (2011). A head-to-head comparison of hydrogen peroxide vapor and aerosol room decontamination systems. *Infect Control Hosp Epidemiol*, **32**, 831-836.
- Hsu, C. C., Wobus, C. E., Steffen, E. K., Riley, L. K., & Livingston, R. S. (2005). Development of a microsphere-based serologic multiplexed fluorescent immunoassay and a reverse transcriptase PCR assay to detect murine norovirus 1 infection in mice. *Clin Diagn Lab Immunol*, **12**, 1145-1151.
- Humphreys, H. (2014). Self-disinfecting and microbicide-impregnated surfaces and fabrics: What potential in interrupting the spread of healthcare-associated infection? *Clin Infect Dis*, **58**, 848-853.
- Huynen, P., Mauroy, A., Martin, C., Savadogo, L. G. B., Boreux, R., Thiry, E., Melin, P., & De Mol, P. (2013). Molecular epidemiology of norovirus infections in symptomatic and asymptomatic children from Bobo Dioulasso, Burkina Faso. *J Clin Virol*, **58**, 515-521.
- Hyde, J. L., Sosnovtsev, S. V., Green, K. Y., Wobus, C., Virgin, H. W., & Mackenzie, J. M. (2009). Mouse norovirus replication is associated with virus-induced vesicle clusters originating from membranes derived from the secretory pathway. *J Virol*, **83**, 9709-9719.
- I
Iwasawa, A., Niwano, Y., Kohno, M., & Ayaki, M. (2012). Virucidal activity of alcohol-based hand rub disinfectants. *Biocontrol Science*, **17**, 45-49.

J

- Jiang, X., Wang, M., Wang, K., & Estes, M. K. (1993). Sequence and genomic organization of Norwalk virus. *Virology*, **195**, 51-61.
- Jimenez, L., & Chiang, M. (2006). Virucidal activity of a quaternary ammonium compound disinfectant against feline calicivirus: A surrogate for norovirus. *Am J Infect Control*, **34**, 269-273.
- Johnston, C. P., Qiu, H., Ticehurst, J. R., Dickson, C., Rosenbaum, P., Lawson, P., Stokes, A. B., Lowenstein, C. J., Kaminsky, M., Cosgrove, S. E., Green, K. Y., & Perl, T. M. (2007). Outbreak management and implications of a nosocomial norovirus outbreak. *Clin Infect Dis*, **45**, 534-540.
- Jones, M. K., Grau, K. R., Costantini, V., Kolawole, A. O., De Graaf, M., Freiden, P., Graves, C. L., Koopmans, M., Walle, S. M., Tibbetts, S. A., Schultz-Cherry, S., Wobus, C. E., Vinjé, J., & Karst, S. M. (2015). Human norovirus culture in B cells. *Nat Protoc*, **10**, 1939-1947.
- Jones, M. K., Watanabe, M., Zhu, S., Graves, C. L., Keyes, L. R., Grau, K. R., Gonzalez-Hernandez, M. B., Iovine, N. M., Wobus, C. E., Vinjé, J., Tibbetts, S. A., Walle, S. M., & Karst, S. M. (2014). Enteric bacteria promote human and mouse norovirus infection of B cells. *Science*, **346**, 755-759.

K

- Kampf, G., & Kramer, A. (2004). Epidemiologic background of hand hygiene and evaluation of the most important agents for scrubs and rubs. *Clin Microbiol Rev*, **17**, 863-893.
- Kapikian, A. Z., Wyatt, R. G., Dolin, R., Thornhill, T. S., Kalica, A. R., & Chanock, R. M. (1972). Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *J Virol*, **10**, 1075-1081.
- Karst, S. M., & Baric, R. S. (2015). What is the reservoir of emergent human norovirus strains? *J Virol*, **89**, 5756-5759.
- Karst, S. M., & Wobus, C. E. (2015). A Working Model of How Noroviruses Infect the Intestine. *PLoS Pathog*, **11**.
- Karst, S. M., Wobus, C. E., Goodfellow, I. G., Green, K. Y., & Virgin, H. W. (2014). Advances in norovirus biology. *Cell Host Microbe*, **15**, 668-680.
- Karst, S. M., Wobus, C. E., Lay, M., Davidson, J., & Virgin, H. W. (2003). STAT1-dependent innate immunity to a norwalk-like virus. *Science*, **299**, 1575-1578.
- Kim, A. N., Park, S. Y., Bae, S. C., Oh, M. H., & Ha, S. D. (2014). Survival of Norovirus Surrogate on Various Food-Contact Surfaces. *Food Environ Virol*, **6**, 182-188.
- Kim, S. J., Si, J., Lee, J. E., & Ko, G. (2012a). Temperature and humidity influences on inactivation kinetics of enteric viruses on surfaces. *Environ Sci Technol*, **46**, 13303-13310.
- Kim, S. W., Baek, S. B., Ha, J. H., Lee, M. H., Choi, C., & Ha, S. D. (2012b). Chlorine treatment to inactivate norovirus on food contact surfaces. *J Food Prot*, **75**, 184-188.
- Kingsley, D. H. (2012). High Pressure Processing and its Application to the Challenge of Virus-Contaminated Foods. *Food Environ Virol*, **5**, 1-12.
- Kingsley, D. H., Vincent, E. M., Meade, G. K., Watson, C. L., & Fan, X. (2014). Inactivation of human norovirus using chemical sanitizers. *Int J Food Microbiol*, **171**, 94-99.
- Kirby, A. E., Teunis, P. F., & Moe, C. L. (2015). Two human challenge studies confirm high infectivity of norwalk virus. *J Infect Dis*, **211**, 166-167.
- Kniel, K. E. (2014). The makings of a good human norovirus surrogate. *Curr Opin Virol*, **4**, 85-90.
- Knight, A., Haines, J., Stals, A., Li, D., Uyttendaele, M., Knight, A., & Jaykus, L. A. (2016). A systematic review of human norovirus survival reveals a greater persistence of human norovirus RT-qPCR signals compared to those of cultivable surrogate viruses. *Int J Food Microbiol*, **216**, 40-49.

- Kocher, J., & Yuan, L. (2015). Norovirus vaccines and potential antinorovirus drugs: Recent advances and future perspectives. *Future Virology*, **10**, 899-913.
- Koo, H. L., Ajami, N., Atmar, R. L., & DuPont, H. L. (2010). Noroviruses: The leading cause of gastroenteritis worldwide. *Discov Med*, **10**, 61-70.
- Koopmans, M., & Duizer, E. (2004). Foodborne viruses: An emerging problem. *Int J Food Microbiol*, **90**, 23-41.
- Koopmans, M., Vennema, H., Heersma, H., Van Strien, E., Van Duynhoven, Y., Brown, D., Reacher, M., & Lopman, B. (2003). Early identification of common-source foodborne virus outbreaks in Europe. *Emerg Infect Dis*, **9**, 1136-1142.
- Kopic, S., & Geibel, J. P. (2010). Toxin mediated diarrhea in the 21st century: The pathophysiology of intestinal ion transport in the course of ETEC, V. Cholerae and rotavirus infection. *Toxins*, **2**, 2132-2157.
- Koromyslova, A. D., White, P. A., & Hansman, G. S. (2015). Treatment of norovirus particles with citrate. *Virology*, **485**, 199-204.
- Kramer, A., Schwebke, I., & Kampf, G. (2006). How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. *BMC Infect Dis*, **6**.
- Kroneman, A., Verhoef, L., Harris, J., Vennema, H., Duizer, E., Van Duynhoven, Y., Gray, J., Iturriza, M., Böttiger, B., Falkenhorst, G., Johnsen, C., Von Bonsdorff, C. H., Maunula, L., Kuusi, M., Pothier, P., Gallay, A., Schreier, E., Höhne, M., Koch, J., Szücs, G., Reuter, G., Krisztalovics, K., Lynch, M., McKeown, P., Foley, B., Coughlan, S., Ruggeri, F. M., Di Bartolo, I., Vainio, K., Isakbaeva, E., Poljsak-Prijatelj, M., Hocevar Grom, A., Zimsek Mijovski, J., Bosch, A., Buesa, J., Sanchez Fauquier, A., Hernández-Pezzi, G., Hedlund, K. O., & Koopmans, M. (2008). Analysis of integrated virological and epidemiological reports of norovirus outbreaks collected within the Foodborne Viruses in Europe network from 1 July 2001 to 30 June 2006. *J Clin Microbiol*, **46**, 2959-2965.
- L
- Lages, S. L. S., Ramakrishnan, M. A., & Goyal, S. M. (2008). In-vivo efficacy of hand sanitisers against feline calicivirus: a surrogate for norovirus. *J Hosp Infect*, **68**, 159-163.
- Lee, R., Lovatelli, A., & Ababouch, L. (2008). *Bivalve depuration: fundamental and practical aspects*. Rome Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Lee, R. M., Lessler, J., Lee, R. A., Rudolph, K. E., Reich, N. G., Perl, T. M., & Cummings, D. A. T. (2013). Incubation periods of viral gastroenteritis: A systematic review. *BMC Infect Dis*, **13**.
- Lees, D. (2000). Viruses and bivalve shellfish. *Int J Food Microbiol*, **59**, 81-116.
- Li, D., Baert, L., De Jonghe, M., Van Coillie, E., Ryckeboer, J., Devlieghere, F., & Uyttendaele, M. (2011). Inactivation of murine norovirus 1, coliphage Φx174, and bacteroides fragilis phage B40-8 on surfaces and fresh-cut iceberg lettuce by hydrogen peroxide and UV light. *Appl Environ Microbiol*, **77**, 2200.
- Li, D., De Keuckelaere, A., & Uyttendaele, M. (2014). Application of long-range and binding reverse transcription-quantitative PCR to indicate the viral integrities of noroviruses. *Appl Environ Microbiol*, **80**, 6473-6479.
- Li, J. W., Xin, Z. T., Wang, X. W., Zheng, J. L., & Chao, F. H. (2002). Mechanisms of inactivation of hepatitis A virus by chlorine. *Appl Environ Microbiol*, **68**, 4951-4955.
- Lim, M. Y., Kim, J. M., & Ko, G. (2010). Disinfection kinetics of murine norovirus using chlorine and chlorine dioxide. *Water Res*, **44**, 3243-3251.
- Lindesmith, L., Beltramello, M., Donaldson, E. F., Corti, D., Swanstrom, J., Debbink, K., Lanzavecchia, A., & Baric, R. S. (2012). Immunogenetic mechanisms driving norovirus GII.4 antigenic variation. *PLoS Pathog*, **8**.

- Lindesmith, L., Moe, C., Marionneau, S., Ruvoen, N., Jiang, X., Lindblad, L., Stewart, P., Lependu, J., & Baric, R. (2003). Human susceptibility and resistance to Norwalk virus infection. *Nature Med*, **9**, 548-553.
- Linley, E., Denyer, S. P., McDonnell, G., Simons, C., & Maillard, J. Y. (2012). Use of hydrogen peroxide as a biocide: New consideration of its mechanisms of biocidal action. *J Antimicrob Chemother*, **67**, 1589-1596.
- Lopman, B. A., Adak, G. K., Reacher, M. H., & Brown, D. W. G. (2003). Two epidemiologic patterns of Norovirus outbreaks: Surveillance in England and Wales, 1992-2000. *Emerg Infect Dis*, **9**, 71-77.
- Lopman, B. A., Reacher, M. H., Vipond, I. B., Hill, D., Perry, C., Halladay, T., Brown, D. W., Edmunds, W. J., & Sarangi, J. (2004). Epidemiology and cost of nosocomial gastroenteritis, Avon, England, 2002-2003. *Emerg Infect Dis*, **10**, 1827-1834.
- Lorrot, M., & Vasseur, M. (2007). Physiopathologie de la diarrhée à rotavirus. *Journal de Pédiatrie et de Puériculture*, **20**, 330-336.
- Love, D. C., Lovelace, G. L., & Sobsey, M. D. (2010). Removal of Escherichia coli, Enterococcus faecalis, coliphage MS2, poliovirus, and hepatitis A virus from oysters (*Crassostrea virginica*) and hard shell clams (*Mercinaria mercinaria*) by depuration. *Int J Food Microbiol*, **143**, 211-217.
- M**
- MacCannell, T., Umscheid, C. A., Agarwal, R. K., Lee, I., Kuntz, G., & Stevenson, K. B. (2011). Guideline for the prevention and control of norovirus gastroenteritis outbreaks in healthcare settings. *Infect Control Hosp Epidemiol*, **32**, 939-969.
- Magulski, T., Paulmann, D., Bischoff, B., Becker, B., Steinmann, E., Steinmann, J., Goroncy-Bermes, P., & Steinman, J. (2009). Inactivation of murine norovirus by chemical biocides on stainless steel. *BMC Infect Dis*, **9**, 107-113.
- Maillard, J. Y. (2001). Virus susceptibility to biocides: An understanding. *Rev Med Microbiol*, **12**, 63-74.
- Maillard, J. Y., & McDonnell, G. (2012). Selection and use of disinfectants. *In Pract*, **34**, 292-299.
- Makino, A., Shimojima, M., Miyazawa, T., Kato, K., Tohya, Y., & Akashi, H. (2006). Junctional adhesion molecule 1 is a functional receptor for feline calicivirus. *J Virol*, **80**, 4482-4490.
- Malik, Y. S., Maherchandani, S., Allwood, P. B., & Goyal, S. M. (2005). Evaluation of animal origin cell cultures for in vitro cultivation of noroviruses. *J Appl Res*, **5**, 312-317.
- Malik, Y. S., Maherchandani, S., & Goyal, S. M. (2006). Comparative efficacy of ethanol and isopropanol against feline calicivirus, a norovirus surrogate. *Am J Infect Control*, **34**, 31-35.
- Marionneau, S., Cailleau-Thomas, A., Rocher, J., Le Moullac-Vaidye, B., Ruvoën, N., Clément, M., & Le Pendu, J. (2001). ABH and Lewis histo-blood group antigens, a model for the meaning of oligosaccharide diversity in the face of a changing world. *Biochimie*, **83**, 565-573.
- Marionneau, S., Ruvoën, N., Le Moullac-Vaidye, B., Clement, M., Cailleau-Thomas, A., Ruiz-Palacois, G., Huang, P., Jiang, X., & Le Pendu, J. (2002). Norwalk Virus binds to histo-blood group antigens present on gastroduodenal epithelial cells of secretor individuals. *Gastroenterol*, **122**, 1967-1977.
- Martella, V., Pinto, P., & Buonavoglia, C. (2011). Canine Noroviruses. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, **41**, 1171-1181.
- Martella, V., Pratelli, A., Gentile, M., Buonavoglia, D., Decaro, N., Fiorente, P., & Buonavoglia, C. (2002). Analysis of the capsid protein gene of a feline-like calicivirus isolated from a dog. *Vet Microbiol*, **85**, 315-322.
- Mathijs, E., Denayer, S., Palmeira, L., Botteldoorn, N., Scipioni, A., Vanderplasschen, A., Thiry, E., & Dierick, K. (2011). Novel norovirus recombinants and of GII.4 sub-lineages associated with outbreaks between 2006 and 2010 in Belgium. *Virol J*, **8**, 310-322.

- Mathijs, E., Muylkens, B., Mauroy, A., Ziant, D., Delwiche, T., & Thiry, E. (2010). Experimental evidence of recombination in murine noroviruses. *J Gen Mol Virol*, **91**, 2723-2733.
- Mathijs, E., Stals, A., Baert, L., Botteldoorn, N., Denayer, S., Mauroy, A., Scipioni, A., Daube, G., Dierick, K., Herman, L., van Coillie, E., Uyttendaele, M., & Thiry, E. (2012). A review of known and hypothetical transmission routes for noroviruses. *Food Environ Virol*, **4**, 131-152.
- Matsuhira, T., Kaji, C., Murakami, S., Maebashi, K., Oka, T., Takeda, N., & Katayama, K. (2012). Evaluation of four antiseptics using a novel Murine norovirus. *Exp Anim*, **61**, 35-40.
- Mauroy, A., Gillet, L., Mathijs, E., Vanderplasschen, A., & Thiry, E. (2011). Alternative attachment factors and internalization pathways for GIII.2 bovine noroviruses. *J Gen Mol Virol*, **92**, 1398-1409.
- Mauroy, A., Scipioni, A., Mathijs, E., Miry, C., Ziant, D., Thys, C., & Thiry, E. (2008). Noroviruses and sapoviruses in pigs in Belgium. *Arch Virol*, **153**, 1927-1931.
- Mauroy, A., Scipioni, A., Mathijs, E., Ziant, D., Daube, G., & Thiry, E. (2014). Genetic and evolutionary perspectives on genogroup III, genotype 2 bovine noroviruses. *Arch Virol*, **159**, 39-49.
- Mbithi, J. N., Springthorpe, V. S., & Sattar, S. A. (1990). Chemical disinfection of hepatitis A virus on environmental surfaces. *Appl Environ Microbiol*, **56**, 3601-3604.
- McDonnell, G. (2006). Hydrogen peroxide fogging/fumigation. *J Hosp Infect*, **62**, 385-386.
- McDonnell, G. (2007). *Antisepsis, disinfection and sterilization : types, action, and resistance*. Washington Washington : ASM Press.
- McDonnell, G., & Russell, A. D. (1999). Antiseptics and disinfectants: Activity, action, and resistance. *Clin Microbiol Rev*, **12**, 147-179.
- McFadden, N., Bailey, D., Carrara, G., Benson, A., Chaudhry, Y., Shortland, A., Heeney, J., Yarovinsky, F., Simmonds, P., Macdonald, A., & Goodfellow, I. (2011). Norovirus regulation of the innate immune response and apoptosis occurs via the product of the alternative open reading frame 4. *PLoS Pathog*, **7**, 1-24.
- Mesquita, J. R., Barclay, L., Nascimento, M. S. J., & Vinjé, J. (2010). Novel norovirus in dogs with diarrhea. *Emerg Infect Dis*, **16**, 980-982.
- Mitchell, A., Spencer, M., & Edmiston, C., Jr. (2015). Role of healthcare apparel and other healthcare textiles in the transmission of pathogens: A review of the literature. *J Hosp Infect*, **90**, 285-292.
- Moore, M. A. (2012). Inactivation of enveloped and non-enveloped viruses on seeded human tissues by gamma irradiation. *Cell Tissue Bank*, **13**, 401-407.
- Mormann, S., Heißenberg, C., Pfannebecker, J., & Becker, B. (2015). Tenacity of human norovirus and the surrogates feline calicivirus and murine norovirus during long-term storage on common nonporous food contact surfaces. *J Food Prot*, **78**, 224-229.
- Muller, Paul A., Koscsó, B., Rajani, Gaurav M., Stevanovic, K., Berres, M.-L., Hashimoto, D., Mortha, A., Leboeuf, M., Li, X.-M., Mucida, D., Stanley, E. R., Dahan, S., Margolis, Kara G., Gershon, Michael D., Merad, M., & Bogunovic, M. (2014). Crosstalk between Muscularis Macrophages and Enteric Neurons Regulates Gastrointestinal Motility. *Cell*, **158**, 300-313.
- Mumphrey, S. M., Changotra, H., Moore, T. N., Heimann-Nichols, E. R., Wobus, C. E., Reilly, M. J., Moghadamfalahi, M., Shukla, D., & Karst, S. M. (2007). Murine norovirus 1 infection is associated with histopathological changes in immunocompetent hosts, but clinical disease is prevented by STAT1-dependent interferon responses. *J Virol*, **81**, 3251-3263.

Murata, T., Katsushima, N., Mizuta, K., Muraki, Y., Hongo, S., & Matsuzaki, Y. (2007). Prolonged norovirus shedding in infants ≤ 6 months of age with gastroenteritis. *Pediatr Infect Dis J*, **26**, 46-49.

N

Nasir, W., Bally, M., Zhdanov, V. P., Larson, G., & Hook, F. (2015). Interaction of Virus-Like Particles with Vesicles Containing Glycolipids: Kinetics of Detachment. *J Phys Chem B*, **119**, 11466-11472.

Nims, R. W., Gauvin, G., & Plavsic, M. (2011). Gamma irradiation of animal sera for inactivation of viruses and mollicutes - A review. *Biologicals*, **39**, 370-377.

Nuanalsuwan, S., & Cliver, D. O. (2003). Capsid functions of inactivated human picornaviruses and feline calicivirus. *Appl Environ Microbiol*, **69**, 350-357.

O

O'Brien, R. T., & Newman, J. (1979). Structural and compositional changes associated with chlorine inactivation of polioviruses. *Appl Environ Microbiol*, **38**, 1034-1039.

Oliver, S. L., Dastjerdi, A. M., Wong, S., El-Attar, L., Gallimore, C., Brown, D. W. G., Green, J., & Bridger, J. C. (2003). Molecular characterization of bovine enteric caliciviruses: A distinct third genogroup of noroviruses (Norwalk-like viruses) unlikely to be of risk to humans. *J Virol*, **77**, 2789-2798.

Olofsson, S., & Bergström, T. (2005). Glycoconjugate glycans as viral receptors. *Ann Med*, **37**, 154-172.

Organization, W. H. (2008). Viruses in food: Scientific advice to support risk management activities.

Orlando, P., Cristina, M. L., Dallera, M., Ottria, G., Vitale, A., & Badolati, G. (2008). Surface disinfection: Evaluation of the efficacy of a nebulization system spraying hydrogen peroxide. *J Prev Med Hyg*, **49**, 116-119.

Otter, J. A., & Yezli, S. (2011). A call for clarity when discussing hydrogen peroxide vapour and aerosol systems. *J Hosp Infect*, **77**, 83-84.

Otter, J. A., Yezli, S., & French, G. L. (2011). The role played by contaminated surfaces in the transmission of nosocomial pathogens. *Infect Control Hosp Epidemiol*, **32**, 687-699.

Otter, J. A., Yezli, S., Perl, T. M., Barbut, F., & French, G. L. (2013). The role of 'no-touch' automated room disinfection systems in infection prevention and control. *J Hosp Infect*, **83**, 1-13.

Otter, J. A., Yezli, S., Perl, T. M., Barbut, F., & French, G. L. (2014). A guide to no-touch automated room disinfection (NTD) systems. In J. T. Walker (Ed.), *Decontamination in Hospitals and Healthcare* (pp. 413-460): Woodhead Publishing.

Otto, P. H., Clarke, I. N., Lambden, P. R., Salim, O., Reetz, J., & Liebler-Tenorio, E. M. (2011). Infection of calves with bovine norovirus GIII.1 strain Jena virus: An experimental model to study the pathogenesis of norovirus infection. *J Virol*, **85**, 12013-12021.

P

Page, M. A., Shisler, J. L., & Mariñas, B. J. (2010). Mechanistic Aspects of Adenovirus Serotype 2 Inactivation with Free Chlorine. *Appl Environ Microbiol*, **76**, 2946-2954.

Park, G. W., Barclay, L., MacInga, D., Charbonneau, D., Pettigrew, C. A., & Vinjé, J. (2010). Comparative efficacy of seven hand sanitizers against murine norovirus, feline calicivirus, and GII.4 norovirus. *J Food Prot*, **73**, 2232-2238.

Park, G. W., & Sobsey, M. D. (2011). Simultaneous comparison of murine norovirus, feline calicivirus, coliphage MS2, and GII.4 norovirus to evaluate the efficacy of sodium hypochlorite against human norovirus on a fecally soiled stainless steel surface. *Foodborne Pathog Dis*, **8**, 1005-1010.

Patel, M. M., Widdowson, M. A., Glass, R. I., Akazawa, K., Vinjé, J., & Parashar, U. D. (2008). Systematic literature review of role of noroviruses in sporadic gastroenteritis. *Emerg Infect Dis*, **14**, 1224-1231.

- Pereira, S. S., Oliveira, H. M., Turrini, R. N., & Lacerda, R. A. (2015). Disinfection with sodium hypochlorite in hospital environmental surfaces in the reduction of contamination and infection prevention: a systematic review. *Rev Esc Enferm USP*, **49**, 681-688.
- Pesavento, P. A., Chang, K. O., & Parker, J. S. L. (2008). Molecular Virology of Feline Calicivirus. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, **38**, 775-786.
- Pineau, L., Desbuquois, C., Marchetti, B., & Luu Duc, D. (2008). Comparison of the fixative properties of five disinfectant solutions. *J Hosp Infect*, **68**, 171-177.
- Poitras, E., & Houde, A. (2002). La PCR en temps réel: principes et applications. *Rev Biol Biotech*, **2**, 2-11.
- Pringle, K., Lopman, B., Vega, E., Vinje, J., Parashar, U. D., & Hall, A. J. (2015). Noroviruses: Epidemiology, immunity and prospects for prevention. *Future Microbiol*, **10**, 53-67.
- R**
- Rabenau, H. F., Steinmann, J., Rapp, I., Schwebke, I., & Eggers, M. (2014). Evaluation of a virucidal quantitative carrier test for surface disinfectants. *PLoS One*, **9**, e86128.
- Radford, A. D., Addie, D., Belák, S., Boucraut-Baralon, C., Egberink, H., Frymus, T., Gruffydd-Jones, T., Hartmann, K., Hosie, M. J., Lloret, A., Lutz, H., Marsilio, F., Pennisi, M. G., Thiry, E., Truyen, U., & Horzinek, M. C. (2009). Feline calicivirus infection ABCD guidelines on prevention and management. *J Feline Med Surg*, **11**, 556-564.
- Radford, A. D., Coyne, K. P., Dawson, S., Porter, C. J., & Gaskell, R. M. (2007). Feline calicivirus. *Vet Res*, **38**, 319-335.
- Ramani, S., Atmar, R. L., & Estes, M. K. (2014). Epidemiology of human noroviruses and updates on vaccine development. *Curr Opin Gastroenterol*, **30**, 25-33.
- Ranganathan, N. S. (1995). Chlorhexidine. In J. M. Ascenzi (Ed.), *Handbook of disinfectants and antiseptics* (pp. 235-264): CRC Press.
- Ravn, V., & Dabelsteen, E. (2000). Tissue distribution of histo-blood group antigens. *APMIS*, **108**, 1-28.
- Rey, J., Bjorkman, D., Nelson, D., Rey, D., Axon, A., & Sáenz, R. (2011). Désinfection des endoscopes. (pp. 1-14): World Endoscopy Organization.
- Richardson, C., Bargatze, R. F., Goodwin, R., & Mendelman, P. M. (2013). Norovirus virus-like particle vaccines for the prevention of acute gastroenteritis. *Expert Rev Vaccines*, **12**, 155-167.
- Robilotti, E., Deresinski, S., & Pinsky, B. A. (2015). Norovirus. *Clin Microbiol Rev*, **28**, 134-164.
- Rodriguez-Lazaro, D., Cook, N., Ruggeri, F. M., Sellwood, J., Nasser, A., Nascimento, M. S., D'Agostino, M., Santos, R., Saiz, J. C., Rzezutka, A., Bosch, A., Girones, R., Carducci, A., Muscillo, M., Kovac, K., Diez-Valcarce, M., Vantarakis, A., von Bonsdorff, C. H., de Roda Husman, A. M., Hernandez, M., & van der Poel, W. H. (2012). Virus hazards from food, water and other contaminated environments. *FEMS Microbiol Rev*, **36**, 786-814.
- Rutala, W. A., & Weber, D. J. (2008). *Guideline for disinfection and sterilization in healthcare facilities* Centers for Disease Control (États-Unis).
- Rutala, W. A., & Weber, D. J. (2013). Disinfectants used for environmental disinfection and new room decontamination technology. *Am J Infect Control*, **41**, S36-41.
- Rydell, G. E., Nilsson, J., Rodriguez-Diaz, J., Ruvoën-Clouet, N., Svensson, L., Le Pendu, J., & Larson, G. (2009). Human noroviruses recognize sialyl Lewis x neoglycoprotein. *Glycobiology*, **19**, 309-320.
- S**
- Sattar, S. A. (2007). Hierarchy of susceptibility of viruses to environmental surface disinfectants: A predictor of activity against new and emerging viral pathogens. *J AOAC Int*, **90**, 1655-1658.

- Sattar, S. A., Springthorpe, V. S., Adegbunrin, O., Zafer, A. A., & Busa, M. (2003). A disc-based quantitative carrier test method to assess the virucidal activity of chemical germicides. *J Virol Methods*, **112**, 3-12.
- Sauerbrei, A., Eichhorn, U., Scheibenzuber, M., & Wutzler, P. (2007). Hexon denaturation of human adenoviruses by different groups of biocides. *J Hosp Infect*, **65**, 264-270.
- Sauerbrei, A., Sehr, K., Eichhorn, U., Reimer, K., & Wutzler, P. (2004). Inactivation of human adenovirus genome by different groups of disinfectants. *J Hosp Infect*, **57**, 67-72.
- Scallan, E., Hoekstra, R. M., Angulo, F. J., Tauxe, R. V., Widdowson, M. A., Roy, S. L., Jones, J. L., & Griffin, P. M. (2011). Foodborne illness acquired in the United States-Major pathogens. *Emerg Infect Dis*, **17**, 7-15.
- Scansen, B. A., Wise, A. G., Kruger, J. M., Venta, P. J., & Maes, R. K. (2004). Evaluation of a p30 Gene-Based Real-Time Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction Assay for Detection of Feline Caliciviruses. *J Vet Intern Med*, **18**, 135-138.
- Schorn, R., Höhne, M., Meerbach, A., Bossart, W., Wüthrich, R. P., Schreier, E., Müller, N. J., & Fehr, T. (2010). Chronic norovirus infection after kidney transplantation: Molecular evidence for immune-driven viral evolution. *Clin Infect Dis*, **51**, 307-314.
- Schwartz, S., Vergoulidou, M., Schreier, E., Loddenkemper, C., Reinwald, M., Schmidt-Hieber, M., Flegel, W. A., Thiel, E., & Schneider, T. (2011). Norovirus gastroenteritis causes severe and lethal complications after chemotherapy and hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*, **117**, 5850-5856.
- Scipioni, A., Mauroy, A., Vinjé, J., & Thiry, E. (2008). Animal noroviruses. *Vet J*, **178**, 32-45.
- Seymour, I. J., & Appleton, H. (2001). Foodborne viruses and fresh produce. *J Appl Microbiol*, **91**, 759-773.
- Shin, G. A., & Sobsey, M. D. (2008). Inactivation of norovirus by chlorine disinfection of water. *Water Res*, **42**, 4562-4568.
- Shirai, J., Kanno, T., Tsuchiya, Y., Mitsubayashi, S., & Seki, R. (2000). Effects of Chlorine, Iodine, and Quaternary Ammonium Compound Disinfectants on Several Exotic Disease Viruses. *J Vet Med Sci*, **62**, 85-92.
- Shirato, H. (2011). Norovirus and histo-blood group antigens. *Jpn J Infect Dis*, **64**, 95-103.
- Siebenga, J. J., Vennema, H., Duizer, E., & Koopmans, M. P. G. (2007). Gastroenteritis caused by norovirus GGII.4, the Netherlands, 1994-2005. *Emerg Infect Dis*, **13**, 144-146.
- Siegel, J. D., Rhinehart, E., Jackson, M., & Chiarello, L. (2007). 2007 Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Health Care Settings. *Am J Infect Control*, **35**, S65-S164.
- Sivapalasingam, S., Friedman, C. R., Cohen, L., & Tauxe, R. V. (2004). Fresh produce: A growing cause of outbreaks of foodborne illness in the United States, 1973 through 1997. *J Food Prot*, **67**, 2342-2353.
- Slomka, M. J., & Appleton, H. (1998). Feline calicivirus as a model system for heat inactivation studies of small round structured viruses in shellfish. *Epidemiol Infect*, **121**, 401-407.
- Smith, A. W., Iversen, P. L., Skilling, D. E., Stein, D. A., Bok, K., & Matson, D. O. (2006). Vesivirus viremia and seroprevalence in humans. *J Med Virol*, **78**, 693-701.
- Souza, M., Azevedo, M. S. P., Jung, K., Cheetham, S., & Saif, L. J. (2008). Pathogenesis and immune responses in gnotobiotic calves after infection with the genogroup II.4-HS66 strain of human norovirus. *J Virol*, **82**, 1777-1786.
- Stals, A., Mathijs, E., Baert, L., Botteldoorn, N., Denayer, S., Mauroy, A., Scipioni, A., Daube, G., Dierick, K., Herman, L., van Coillie, E., Thiry, E., & Uyttendaele, M. (2012). Molecular Detection and Genotyping of Noroviruses. *Food Environ Virol*, **4**, 153-167.

- Stals, A., Uyttendaele, M., Baert, L., & Van Coillie, E. (2013). Norovirus transfer between foods and food contact materials. *J Food Prot*, **76**, 1202-1209.
- Stuart, A. D., & Brown, T. D. K. (2007). α 2,6-linked sialic acid acts as a receptor for Feline calicivirus. *J Gen Mol Virol*, **88**, 177-186.
- Su, X., & D'Souza, D. H. (2012). Inactivation of human norovirus surrogates by benzalkonium chloride, potassium peroxymonosulfate, tannic acid, and gallic acid. *Foodborne Pathog Dis*, **9**, 829-834.
- Svraka, S., Duizer, E., Vennema, H., De Bruin, E., Van Der Veer, B., Dorresteyn, B., & Koopmans, M. (2007). Etiological role of viruses in outbreaks of acute gastroenteritis in The Netherlands from 1994 through 2005. *J Clin Microbiol*, **45**, 1389-1394.
- I**
- Takahashi, H., Ohuchi, A., Miya, S., Izawa, Y., & Kimura, B. (2011). Effect of food residues on norovirus survival on stainless steel surfaces. *PLoS One*, **6**, e21951.
- Tamura, M., Natori, K., Kobayashi, M., Miyamura, T., & Takeda, N. (2004). Genogroup II Noroviruses Efficiently Bind to Heparan Sulfate Proteoglycan Associated with the Cellular Membrane. *J Virol*, **78**, 3817-3826.
- Tan, M., & Jiang, X. (2005). Norovirus and its histo-blood group antigen receptors: An answer to a historical puzzle. *Trends Microbiol*, **13**, 285-293.
- Tan, M., & Jiang, X. (2011). Norovirus-host interaction: Multi-selections by human histo-blood group antigens. *Trends Microbiol*, **19**, 382-388.
- Tan, M., & Jiang, X. (2014). Vaccine against norovirus. *Hum Vaccin Immunother*, **10**, 1449-1456.
- Tan, M., Wei, C., Huang, P., Fan, Q., Quigley, C., Xia, M., Fang, H., Zhang, X., Zhong, W., Klassen, J. S., & Jiang, X. (2015). Tulane virus recognizes sialic acids as cellular receptors. *Sci Rep*, **5**.
- Taube, S., Perry, J. W., McGreevy, E., Yetming, K., Perkins, C., Henderson, K., & Wobus, C. E. (2012). Murine noroviruses bind glycolipid and glycoprotein attachment receptors in a strain-dependent manner. *J Virol*, **86**, 5584-5593.
- Taube, S., Perry, J. W., Yetming, K., Patel, S. P., Auble, H., Shu, L., Nawar, H. F., Chang, H. L., Connell, T. D., Shayman, J. A., & Wobus, C. E. (2009). Ganglioside-linked terminal sialic acid moieties on murine macrophages function as attachment receptors for murine noroviruses. *J Virol*, **83**, 4092-4101.
- Terpstra, F. G., van den Blink, A. E., Bos, L. M., Boots, A. G. C., Brinkhuis, F. H. M., Gijzen, E., van Remmerden, Y., Schuitemaker, H., & van 't Wout, A. B. (2007). Resistance of surface-dried virus to common disinfection procedures. *J Hosp Infect*, **66**, 332-338.
- Teunis, P. F. M., Moe, C. L., Liu, P., Miller, S. E., Lindesmith, L., Baric, R. S., Le Pendu, J., & Calderon, R. L. (2008). Norwalk virus: How infectious is it? *J Med Virol*, **80**, 1468-1476.
- Thackray, L. B., Wobus, C. E., Chachu, K. A., Liu, B., Alegre, E. R., Henderson, K. S., Kelley, S. T., & Virgin Iv, H. W. (2007). Murine noroviruses comprising a single genogroup exhibit biological diversity despite limited sequence divergence. *J Virol*, **81**, 10460-10473.
- Thorne, L. G., & Goodfellow, I. G. (2014). Norovirus gene expression and replication. *J Gen Mol Virol*, **95**, 278-291.
- Tian, P., Bates, A. H., Jensen, H. M., & Mandrell, R. E. (2006). Norovirus binds to blood group A-like antigens in oyster gastrointestinal cells. *Lett Appl Microbiol*, **43**, 645-651.
- Tian, P., Yang, D., Quigley, C., Chou, M., & Jiang, X. (2013). Inactivation of the Tulane virus, a novel surrogate for the human norovirus. *J Food Prot*, **76**, 712-718.
- Tse, H., Lau, S. K. P., Chan, W. M., Choi, G. K. Y., Woo, P. C. Y., & Yuen, K. Y. (2012). Complete genome sequences of novel canine noroviruses in Hong Kong. *J Virol*, **86**, 9531-9532.

- Tuan Zainazor, C., Noor Hidayah, M. S., Chai, L. C., Tunung, Mohamad Ghazali, F., & Son, R. (2010). The scenario of norovirus contamination in food and food handlers. *J Microbiol Biotechnol*, **20**, 229-237.
- Tuladhar, E., Terpstra, P., Koopmans, M., & Duizer, E. (2012). Virucidal efficacy of hydrogen peroxide vapour disinfection. *J Hosp Infect*, **80**, 110-115.
- Tung, G., Macinga, D., Arbogast, J., & Jaykus, L. A. (2013). Efficacy of commonly used disinfectants for inactivation of human noroviruses and their surrogates. *J Food Prot*, **76**, 1210-1217.

V

- Van Asten, L., Van Den Wijngaard, C., Van Pelt, W., Van De Kastele, J., Meijer, A., Van Der Hoek, W., Kretzschmar, M., & Koopmans, M. (2012). Mortality attributable to 9 common infections: Significant effect of influenza A, respiratory syncytial virus, influenza B, norovirus, and parainfluenza in elderly persons. *J Infect Dis*, **206**, 628-639.
- Vashist, S., Balley, D., Putics, A., & Goodfellow, I. (2009). Model systems for the study of human norovirus biology. *Future Virol*, **4**, 353-367.
- Verbelen, V., Bodéus, M., Garrino, M. G., Scipioni, A., Kabambal, B., Daube, G., Thiry, E., & Goubau, P. (2004). Hospital outbreak of gastroenteritis due to norovirus in Belgium. *Acta Clin Belg*, **59**, 30-33.
- Vimont, A., Fliss, I., & Jean, J. (2014). Inactivation of Foodborne Viruses: Recent Findings Applicable to Food-Processing Technologies. In *Practical Food Safety: Contemporary Issues and Future Directions* (pp. 471-495).
- Vimont, A., Fliss, I., & Jean, J. (2015). Study of the virucidal potential of organic peroxyacids against norovirus on food-contact surfaces. *Food Environ Virol*, **7**, 49-57.
- Vinjé, J. (2015). Advances in laboratory methods for detection and typing of norovirus. *J Clin Microbiol*, **53**, 373-381.
- Walker, J. T. (2014). The importance of decontamination in hospitals and healthcare. In J. T. Walker (Ed.), *Decontamination in Hospitals and Healthcare* (pp. 3-19): Woodhead Publishing.
- Wang, D., & Tian, P. (2014). Inactivation conditions for human norovirus measured by an in situ capture-qRT-PCR method. *Int J Food Microbiol*, **172**, 76-82.
- Warnes, S. L., & Keevil, C. W. (2013). Inactivation of Norovirus on Dry Copper Alloy Surfaces. *PLoS One*, **8**, e75017.
- Weber, D. J., Rutala, W. A., Miller, M. B., Huslage, K., & Sickbert-Bennett, E. (2010). Role of hospital surfaces in the transmission of emerging health care-associated pathogens: Norovirus, *Clostridium difficile*, and *Acinetobacter* species. *Am J Infect Control*, **38**, S25-S33.
- Wei, J., & Kniel, K. E. (2010). Pre-harvest Viral Contamination of Crops Originating from Fecal Matter. *Food Environ Virol*, **2**, 195-206.
- Weinstein, R. A. (1991). Epidemiology and control of nosocomial infections in adult intensive care units. *Am J Med*, **91**, 3B-179S-173B-184S.
- Westhoff, T. H., Vergoulidou, M., Loddenkemper, C., Schwartz, S., Hofmann, J., Schneider, T., Zidek, W., & Van Der Giet, M. (2009). Chronic norovirus infection in renal transplant recipients. *Nephrol Dial Transplant*, **24**, 1051-1053.
- Whitehead, K., & McCue, K. A. (2010). Virucidal efficacy of disinfectant actives against feline calicivirus, a surrogate for norovirus, in a short contact time. *Am J Infect Control*, **38**, 26-30.
- Widdowson, M. A., Sulka, A., Bulens, S. N., Beard, R. S., Chaves, S. S., Hammond, R., Salehi, E. D. P., Swanson, E., Totaro, J., Woron, R., Mead, P. S., Bresee, J. S., Monroe, S. S., & Glass, R. I. (2005). Norovirus and foodborne disease, United States, 1991-2000. *Emerg Infect Dis*, **11**, 95-102.

- Wigginton, K. R., Pecson, B. M., Sigstam, T., Bosshard, F., & Kohn, T. (2012). Virus inactivation mechanisms: Impact of disinfectants on virus function and structural integrity. *Environ Sci Technol*, **46**, 12069-12078.
- Wikswow, M. E., Kambhampati, A., Shioda, K., Walsh, K. A., Bowen, A., & Hall, A. J. (2015). Outbreaks of Acute Gastroenteritis Transmitted by Person-to-Person Contact, Environmental Contamination, and Unknown Modes of Transmission—United States, 2009–2013. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, **64**, 1.
- Wilhelm, B., Waddell, L., Greig, J., Rajić, A., Houde, A., & McEwen, S. A. (2015). A scoping review of the evidence for public health risks of three emerging potentially zoonotic viruses: hepatitis E virus, norovirus, and rotavirus. *Prev Vet Med*, **119**, 61-79.
- Wobus, C. E., Karst, S. M., Thackray, L. B., Chang, K. O., Sosnovtsev, S. V., Belliot, G., Krug, A., Mackenzie, J. M., Green, K. Y., & Virgin Iv, H. W. (2004). Replication of Norovirus in cell culture reveals a tropism for dendritic cells and macrophages. *PLoS Biol* **2**, 2076-2084.
- Wobus, C. E., Thackray, L. B., & Virgin Iv, H. W. (2006). Murine norovirus: A model system to study norovirus biology and pathogenesis. *J Virol*, **80**, 5104-5112.
- Wu, H. M., Fornek, M., Schwab, K. J., Chapin, A. R., Gibson, K., Schwab, E., Spencer, C., & Henning, K. (2005). A norovirus outbreak at a long-term-care facility: The role of environmental surface contamination. *Infect Control Hosp Epidemiol*, **26**, 802-810.
- Wutzler, P., & Sauerbrei, A. (2000). Virucidal efficacy of a combination of 0.2 % peracetic acid and 80 % (v/v) ethanol (PAA-ethanol) as a potential hand disinfectant. *J Hosp Infect*, **46**, 304-308.
- Y
- Yen, C., Wikswow, M. E., Lopman, B. A., Vinje, J., Parashar, U. D., & Hall, A. J. (2011). Impact of an Emergent Norovirus Variant in 2009 on Norovirus Outbreak Activity in the United States. *Clin Infect Dis*, **53**, 568-571.
- Z
- Zakhour, M., Ruvoën-Clouet, N., Charpilienne, A., Langpap, B., Poncet, D., Peters, T., Bovin, N., & Le Pendu, J. (2009). The α Gal epitope of the histo-blood group antigen family is a ligand for bovine norovirus Newbury2 expected to prevent cross-species transmission. *PLoS Pathog*, **5**.
- Zheng, D. P., Ando, T., Fankhauser, R. L., Beard, R. S., Glass, R. I., & Monroe, S. S. (2006). Norovirus classification and proposed strain nomenclature. *Virology*, **346**, 312-323.
- Zonta, W., Mauroy, A., Farnir, F., & Thiry, E. (2016). Comparative Virucidal Efficacy of Seven Disinfectants Against Murine Norovirus and Feline Calicivirus, Surrogates of Human Norovirus. *Food Environ Virol*, **8**, 1-12.

Annexe

Préambule

Cette thèse a été réalisée en partie dans le cadre d'un projet financé pour le service public fédéral santé publique, sécurité de la chaîne alimentaire et environnement (RT 10/6 Travifood).

Un des objectifs de ce projet était d'optimiser et de valider une méthode de quantification du virus de l'hépatite A (HAV) dans les matrices alimentaires à risques telles que les fruits et légumes (les produits frais ou surgelés), les fruits de mer, les aliments « ready-to-eat », l'eau. Détecter et quantifier le HAV dans les matrices alimentaires permet de contrôler la qualité des aliments. En cas d'épidémies d'origine alimentaire, disposer d'outils capables de détecter le HAV permet de discriminer les matrices alimentaires contaminées et non contaminées par le HAV. Détecter les aliments à la source d'une épidémie d'origine alimentaire permet d'identifier les voies de transmission du virus et les facteurs de risques liés à la production, le transport ou la manipulation de ces aliments. Réduire voire supprimer les anomalies durant ces différentes étapes permet in fine d'assurer une meilleure sécurité de la chaîne alimentaire et du consommateur. Même si une copie génomique détectée n'équivaut pas systématiquement à une particule infectieuse, quantifier le nombre de copies génomiques permet de donner une indication sur la quantité possible de particules infectieuses du virus et le risque de transmission du virus au sein d'une population via les contacts entre individus et via les aliments, les mains des préparateurs et les surfaces dans l'environnement.

La détection et la quantification de HAV ont été optimisées par le développement d'une réaction en chaîne par polymérase (PCR) en temps réel (q) après une transcription inverse (RT) (dénommée RT-qPCR dans la suite de l'annexe) avec des amorces et une sonde originales. L'étape d'extraction a aussi été optimisée en testant et comparant différentes méthodes d'extraction pour utiliser finalement celle avec le meilleur rendement. Les résultats de l'optimisation des étapes d'extraction et de détection sont présentés dans cette annexe.

Annexe

Optimalisation d'une méthode de détection moléculaire du virus de l'hépatite A dans les matrices alimentaires

Résumé

Le virus de l'hépatite A (HAV), virus à ARN, monocaténaire et de polarité positive, appartient à la famille des *Picornaviridae* et constitue la seule espèce du genre *Hepatovirus*. La Belgique est un pays de faible prévalence et la population adulte reste donc majoritairement susceptible à l'infection. La principale voie de transmission est la voie oro-fécale et les infections d'origine alimentaire représentent moins de 5% des cas diagnostiqués. Cependant environ 50 % des cas ont une origine indéterminée, aussi le pourcentage d'infection dû à des aliments contaminés est probablement sous-estimé à l'heure actuelle. Les méthodes de détection moléculaire permettent de détecter et de quantifier l'ARN viral présent même en faible quantité. Afin d'optimiser la méthode de détection du HAV dans les matrices alimentaires, une étape préliminaire associant une concentration des particules virales à l'aide du polyéthylène glycol et une centrifugation a été réalisée. Ensuite l'optimisation de la détection via une RT-qPCR avec des amorces et une sonde originales permettra de disposer d'un outil, efficace et complémentaire, pour la détection et/ou la confirmation d'un échantillon positif pour le HAV.

Mots-clés : Virus de l'hépatite A (HAV) - RT-qPCR - Matrices alimentaires – Méthodes moléculaires - Détection

Summary

Hepatitis A virus (HAV) is a RNA virus with single-stranded positive sense genome and the only species of the genus *Hepatovirus* of the *Picornaviridae* family. Belgium is a country with a low prevalence and the majority of adults can be infected. HAV is mainly transmitted by the fecal-oral route and foodborne outbreaks represent <5 % of reported cases per year. Fifty % of reported cases do not have any identified source of infection; therefore part of the foodborne outbreaks is probably underestimated. Molecular detection methods are used to detect and to quantify viral RNA even if a small number of viruses is present. In order to optimize detection method of HAV in food, a preliminary step combining concentration of viral particles with polyethylene glycol and centrifugation has been set up and validated. Therefore optimisation of HAV RNA detection by RT-qPCR with new primers and probe provides an efficient and complementary tool to detect and/or to confirm a HAV positive sample.

Key-words: Hepatitis A virus (HAV) –RT-qPCR – Food – Molecular methods - Detection

Introduction

Le virus de l'hépatite A (HAV) appartient à la famille des *Picornaviridae* et constitue une des 2 espèces du genre *Hepatovirus* (Stanway et al. 2005). Il s'agit d'un virus à ARN, monocaténaire, non-enveloppé, de symétrie icosaédrique et d'une longueur de génome de 7,5 kilobases. Aux 2 extrémités, se trouvent des régions non-codantes : en 3', l'internal ribosome entry site (IRES) permet d'initier la traduction et en 5' une queue poly-adénylée qui constitue moins d'un pourcent de la longueur totale du génome. Entre ces deux extrémités on retrouve 90% du génome représentés par un seul cadre ouvert de lecture avec 3 régions distinctes (P1, P2 et P3) traduit en une polyprotéine. Le fragment P1 contient les 4 protéines structurales (VP1, VP2, VP3 et VP4) et les fragments P2 et P3, les protéines non-structurales requises pour la réplication virale, dont la protéase 3Cpro et la RNA polymérase RNA dépendante, 3Dpol (Hollinger and Emerson 2007).

Les souches du HAV sont réparties en 6 génotypes différents. Les génotypes I, II et III affectent les êtres humains et sont respectivement subdivisés en sous-génotypes IA, IB, IIA, IIB (anciennement génotype VII), IIIA et IIIB, tandis que les génotypes IV, V et VI affectent les primates non-humains (simiens) (Costa-Mattioli et al. 2002; Costa-Mattioli 2003; Cristina and Costa-Mattioli 2007).

En 1973, Feinstone et collaborateurs visualisaient pour la première fois le HAV par microscopie électronique à partir de matières fécales de patients contaminés par le virus (Feinstone et al. 1973). Des méthodes de détection des antigènes spécifiques HAV et des anticorps anti-HAV, Immunoglobulines G (IgG) et IgM, existent mais les méthodes de détection moléculaire sont plus sensibles pour détecter le génome du HAV dans des échantillons de diverses origines (Nainan et al. 2006).

La principale voie de transmission est la voie oro-fécale. Quelques cas de transmission via le sang, lors de transfusions sanguines ou chez des utilisateurs de drogues par injection, ont été rapportés (Grinde et al. 1997; Soucie et al. 1998; Stene-Johansen et al. 1998).

Les modes de transmission sont principalement le contact de personne à personne mais également la consommation d'eau ou d'aliments contaminés (aliments crus ou « ready-to-eat » par exemple) (Fiore 2004). Cette contamination peut provenir de l'eau d'irrigation pour les fruits et légumes, de l'eau de mer pour les mollusques bivalves ou de la manipulation par l'homme lors des différentes étapes intervenant entre la récolte et la consommation du produit. Les mollusques bivalves filtrent l'eau de mer et concentrent jusqu'à 900 fois les particules virales présentes, au niveau de leurs glandes digestives (Goswami et al. 1993).

Les denrées alimentaires comme source de contamination pour le HAV constituent moins de 5% des cas rapportés et parmi l'ensemble des personnes infectées par le HAV, environ la moitié n'a pas de source d'infection identifiée (Fiore 2004). Le nombre de cas provenant de matrices alimentaires contaminées pourraient donc être bien plus important que les données actuelles de la littérature scientifique.

Le Système d'Alerte Rapide pour les Denrées Alimentaires et les Aliments pour Animaux (RASFF en anglais) a signalé en 2011 un lot de dattes positif pour le HAV. Les dattes étaient importées d'Algérie, où la prévalence de HAV est plus importante qu'en Belgique, en raison du lieu et mode de production : conditions d'hygiène moins développées et cueillette et triage réalisés manuellement (Jacobsen and Wiersma 2010).

Lors d'une infection par le HAV, la période d'incubation dure 28 jours en moyenne (Wolff and Schmidt 2008). Or le pic d'excrétion du virus dans les matières fécales a lieu à la fin de cette période, avant les signes cliniques apparents. Il est dès lors souvent difficile d'obtenir des matières fécales en vue d'isoler le virus et de faire le lien avec un aliment consommé plusieurs jours, voire plusieurs semaines auparavant.

Le HAV est un problème de santé publique puisque la Belgique est un pays de faible voire très faible endémicité (Beutels et al. 1997; Jacobsen and Wiersma 2010). En effet seule la moitié de la population présente une immunité après l'âge de 30 ans. Deux tiers des enfants de moins de 6ans infectés par le HAV n'auront pas de symptômes alors que plus de 70 % des adultes infectés présenteront de l'ictère. D'après les laboratoires vigies en Belgique, l'incidence HAV en 2011 était de $1,5 / 10^5$ habitants.

L'objectif principal est de mettre au point une méthode de détection moléculaire du virus de l'hépatite A présent dans les matrices alimentaires avec deux étapes essentielles que sont l'optimisation d'une procédure d'extraction du HAV dans les matrices alimentaires et l'optimisation d'une RT-qPCR pour la détection du HAV.

Matériel et méthodes

Virus et cellules

La souche HM175 du virus de l'hépatite A (HAV) est adaptée à la culture cellulaire de type FRhK4 (lignée de cellules rénales de singe) (Daemer et al. 1981; Robertson et al. 1988) et la concentration initiale de la suspension stock de HAV est égale à 10^8 TCID₅₀/ml (Dose infectieuse en culture de cellules). Des dilutions de cette suspension ont été utilisées pour l'inoculation des matrices alimentaires et l'optimisation de la détection moléculaire.

Le norovirus murin CW1 (MNV) a été utilisé comme « process control » afin de contrôler l'étape d'extraction. La suspension stock de MNV contient 10^4 TCID₅₀/ml. Le plasmide p20.3 sert de contrôle positif de la qPCR (Sosnovtsev et al. 2006). Les amorces et la sonde utilisées ont été mises au point par Baert et collaborateurs en 2008 (Baert et al. 2008b).

Amorce et sondes

Les différentes amorces et sondes utilisées sont reprises dans le tableau I. Via le logiciel DNASTar Lasergene, la recherche des régions hautement conservées du génome de HAV a été effectuée après alignement de 19 souches selon la méthode de type Clustal W (Houde et al. 2007). Les critères de sélection des amorces étaient la température de fusion, le pourcentage de bases G-C et l'absence de formation de boucles (hairpin) ou de dimères d'amorces. Parmi les différents couples d'amorces sélectionnés, 9 binômes de concentrations d'amorces ont été testés : 50-50 nM, 50-300 nM, 50-900 nM, 300-50 nM, 300-300 nM, 300-900 nM, 900-50 nM, 900-300 nM et 900-900 nM pour les concentrations en amorce sens et en amorce anti-sens respectivement.

Extraction des particules virales et de l'ARN viral

Les dattes ont servi de matrice modèle. Cette matrice alimentaire présente des facteurs prédisposant à une contamination par le HAV : la manipulation par l'homme lors de la récolte, de l'emballage ou de la préparation et la consommation crue dans la majorité des cas. De plus, le RASFF a déclaré un cas de lots positifs de dattes en 2011. Le protocole d'extraction est inspiré d'une norme que le Comité Européen de Normalisation est en train d'établir (CEN 2013). Dix grammes de dattes ont été pesés et mis en présence de 20 ml de solution d'élution et 20 µl de pectinase dans un sac avec membrane filtrante. Les solutions d'élution pour l'extraction des particules virales sont des solutions tampon qui doivent permettre le détachement du virus de la surface des aliments. Les trois solutions d'élution utilisées étaient le « Tris glycine Beef Extract » (TGBE 1%), une solution contenant 0,25 M Thréonine et 0,3 M NaCl (solution «Thréonine») et une solution de tampon

phosphate salin (PBS) (Baert et al. 2008a; Moon et al. 2009; de Paula et al. 2010). Des inocula de HAV et de MNV à des concentrations de 10^8 TCID₅₀/ml et 10^4 TCID₅₀/ml respectivement ont été ajoutés à la matrice alimentaire. Le sac avec membrane filtrante est placé une minute dans un broyeur de type « stomacher® » puis le sac est disposé sur une plateforme agitante durant 25 minutes. Le filtrat est récupéré et centrifugé pendant 30 minutes à 10 000 g. Le surnageant est récolté et la solution de polyéthylène glycol (PEG) 6000 (30 % w/v) est ajoutée (la concentration finale de PEG est de 10 %). Le PEG est laissé en présence de l'échantillon durant 1 h sur une plateforme agitante. Ensuite l'échantillon est soit centrifugé soit placé 19 h à 4 °C suivant le protocole utilisé (deux temps d'action du PEG ont été comparés, 1 h et 20 h).

A cette étape d'action du PEG suit une étape de centrifugation où deux paramètres ont variés : l'accélération (4000 g et 10000 g) et la durée (30 min, 1 h heure et 2 h). Après la centrifugation, le culot est suspendu dans 500 µl de PBS. 500 µl de chloroforme : butanol (1 :1) sont ensuite ajoutés. L'échantillon est mélangé au vortex puis laissé 5 min à température ambiante. Une dernière centrifugation de 15 min est ensuite réalisée afin d'obtenir deux phases distinctes : 100 µl sont prélevés dans le surnageant pour réaliser l'extraction de l'ARN viral en suivant les recommandations de la trousse « RNeasy Mini kit » (Qiagen®).

RT-qPCR en deux étapes

Lorsque la RT-qPCR est en deux étapes, l'étape de transcription inverse est réalisée avec la trousse « transcriptor High fidelity cDNA synthesis kit » (Roche®) composée notamment de la « transcriptor high fidelity reverse transcriptase », un mélange d'une enzyme transcriptase inverse et d'une enzyme avec une activité de relecture, et de « random hexamer primer ». Le cycle est constitué d'une première phase de 10 min à 65 °C et d'une seconde phase de 30 min à 42 °C et 5 min à 85 °C avec un volume total de 25 µl dont 5 µl d'échantillon.

Ensuite la qPCR est réalisée soit avec agent se liant à l'ADN double-brin (SYBR Green I) soit avec hydrolyse de sonde (technologie TaqMan).

La trousse Universal Mastermix SYBRGreen (Diagenode®) a été utilisée lorsqu'il s'agissait d'une qPCR avec agent se liant à l'ADN double-brin (SYBRGreen). La technologie de SYBRGreen a permis de comparer les nouveaux couples d'amorces créés pour détecter le HAV, sans avoir besoin à cette étape d'une sonde, relativement coûteuse pour des étapes préliminaires.

Lorsqu'une sonde était disponible pour la détection du HAV ou du MNV, une qPCR avec hydrolyse de sonde (technologie TaqMan) était réalisée. Dans cette configuration, la trousse utilisée était le « TaqMan Universal master mix » (Roche®) avec un des couples d'amorces détectant le HAV ou le MNV. Le protocole d'amplification était 2 min à 50 °C, 10 min à 95 °C (activation de l'AmpliTaq

Gold) et 45 cycles de 15 sec à 95 °C (dénaturation) et 1 min à 60 °C (hybridation et extension) avec un volume total de 25 µl (dont 5 µl d'échantillon).

RT-qPCR en une étape

La trousse « RNA Ultrasense one step Quantitative RT-PCR system » (Invitrogen®) était associée avec les amorces et la sonde appropriées en fonction de la cible détectée (HAV ou MNV). Le protocole d'amplification employé était le suivant : 15 min à 50 °C, 2 min à 95 °C et 45 cycles de 15 sec à 95 °C et 45 sec à 60 °C.

La trousse commerciale « HepatitisA CeeramTools® » a aussi été utilisée pour la détection du HAV par RT-qPCR en une seule étape. Les amorces et sonde sont mentionnées dans l'étude menée par Costafreda et collaborateurs (Costafreda et al. 2006). La trousse possède un contrôle interne d'amplification, un contrôle positif et un contrôle négatif. Le protocole d'amplification était 10 min à 45 °C, 10 min à 95 °C puis 45 cycles de 15 sec à 95 °C et 45 sec à 60 °C.

Les thermocycleurs utilisés ont été l'appareil 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems®) et le thermocycleur Mx3005P (Stratagene®).

Contrôle interne d'amplification

Un contrôle interne d'amplification (IAC) est utilisé afin de contrôler l'inhibition de la matrice testée. Il s'agit du Sybricon019, un plasmide développé par le GMOLab de la Plateforme Biotechnologie et Biologie Moléculaire (PBB) de l'Institut Scientifique de Santé Publique (ISP), contenant un fragment spécifique du gène de tolérance au glyphosate (herbicide) de l'OGM GT73. Les amorces utilisées sont celles développées par le GMOLab du PBB de l'ISP (Barbau-Piednoir et al. 2012). Une sonde spécifique de ce fragment avec un fluorophore de type TAMRA en 5' et un Iowa Black RQ-Sp en 3', a été utilisée lors d'une RT-qPCR duplex.

Résultats et discussion

Optimalisation d'une RT-qPCR pour la détection du HAV dans les matrices alimentaires.

Une sélection des régions les mieux conservées a été effectuée à partir d'une séquence consensus obtenue après l'alignement de 19 séquences de différentes souches de HAV et 5 couples d'amorces originales (n°1 à 5) ont été choisis (Tableau I). Dans un premier temps, chaque couple d'amorces a été testé à une température proche de sa température d'hybridation.

Les couples d'amorces n°3 et n°5 ont été testés à des températures de 46 et 49 °C. Les Ct obtenus étant supérieurs aux Ct obtenus avec les trois autres couples d'amorces, ces 2 couples d'amorces ont rapidement été abandonnés.

Parmi les 9 binômes de concentrations d'amorces, les concentrations de 300 et 900 nM pour les amorces sens et anti-sens permettent d'obtenir des courbes d'amplification avec des Ct plus faibles que les autres binômes à 46 °C.

Les couples d'amorces n°1, n°2 et n°4 ont été utilisés dans des PCR avec deux températures d'hybridation, 54 et 58 °C. A la température d'hybridation de 54 °C, les courbes d'amplification spécifiques d'un couple d'amorces, se superposent malgré les différentes concentrations en amorces. Les Ct moyens pour le couple d'amorces n°1, 2 et 4 sont respectivement de 30,5, 28,8 et 31,7 (Figure 1). D'après les valeurs de Ct avec les différentes concentrations d'amorces, le couple d'amorce n°4 n'a pas été conservé et la concentration choisie pour l'amorce sens et l'amorce anti-sens a été 300nM (Tableau II).

Une troisième température d'hybridation à 60 °C a été testée, sur une dilution d'une suspension de HAV en présence des couples d'amorces n°1 et 2. Le choix a été fait de continuer à travailler avec le couple HAV F2/R2 car il présentait des valeurs de Ct les plus faibles (Tableau II). L'utilisation d'une température d'hybridation élevée permet ainsi de limiter les appariements amorces/cibles aspécifiques et diminue donc le risque d'obtenir des résultats faux positifs.

La sonde HAV P2 est spécifique de l'amplicon délimité par les amorces F2 et R2, elle possède en 5' un émetteur de type FAM et un fluorochrome suppresseur en 3' (Iowa Black® FQ). Les concentrations de 100 et 250 nM ont été testées et la concentration de 250 nM a été choisie car la valeur du Ct était égale à 32,5 au lieu de 34,5 à 100 nM.

Le couple d'amorces HAV F2 / R2 et la sonde P2 sont localisés entre les nucléotides 2000 et 2300 du génome de HAV, dans une région avec peu de variations de nucléotides entre les différentes souches de HAV et codant deux protéines de structure VP1 et VP3 (Brooks et al. 2005). Cette région est différente de la région 5' dans laquelle se situent les amorces de la trousse HepatitisA Ceeram

Cible	Nom des amorces ou des sondes	Localisation (position nucléotidique)	Tm (°C)	Réf.
HAV	FP HAV68	68-85		(1)
	RP HAV240	240-222		
	Sonde HAV150	150-169		
	FP 392	392-410	55,3	(2)
	RP 461	480-461	53	
	Sonde 413	413-441		
	HAV F1	400-500	58	
	HAV R1		60,5	
	HAV F2	2000-2300	54,5	
	HAV R2		58,4	
	HAV P2			
	HAV F3	4700-4800	44,5	
	HAV R3		48,5	
	HAV F4	6600-6700	54,8	
	HAV R4		51,5	
HAV F5	6600-6800	49,2		
HAV R5		49		
MNV	Fw-ORF1/ORF2	4972-4991		(3)
	Rv-ORF1/ORF2	5064-5080		
	Sonde MGB-ORF1/ORF2	5001-5015		

Tableau I : Amorces et sondes détectant le HAV et MNV

Références : (1) Costafreda *et al.* 2006, (2) Jothikumar *et al.* 2005, (3) Baert *et al.* en 2008

T ann. PCR (°C)		54			58			60									
Couple d'amorce		1	2	4	1	2	4	1					2				
HAV : TCID ₅₀		10 ⁶						10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²
Concentration en amorces sens / anti-sens (nM)	300/300	30,6	28,7	31,6	28,8	27	34	27,9	31,3	35,2	35,5	nd	27	30,1	34	35	(48)
	300/900	30,4	28,9	31,6													
	900/300	30,4	28,7	31,7	28,6	26,9											

Tableau II : Ct obtenus en fonction des amorces et de la température d'hybridation lors d'une RT-qPCR en une étape avec la technique du SYBRGreen

T ann. : Température d'hybridation utilisée durant la RT-qPCR one step SYBRGreen

Nd : non déterminé

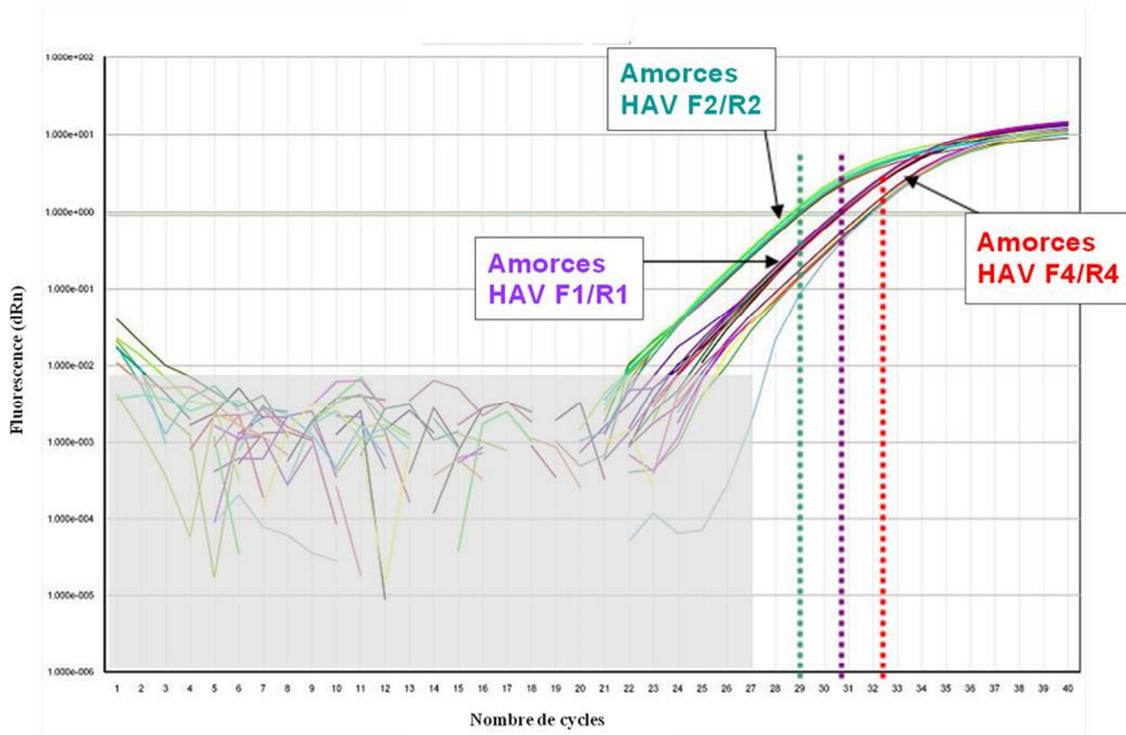


Figure 1 : Courbes de fluorescence de RT-qPCR en une étape avec la technologie de SYBRGreen pour détecter le HAV en utilisant 3 couples d'amorces originales.

Les amorces « sens » HAV F2 et « anti-sens » HAV R2 permettent de détecter le HAV avec des valeurs de Ct inférieures à celles obtenues avec les couples d'amorces HAV F1/R1 et HAV F4/R4.

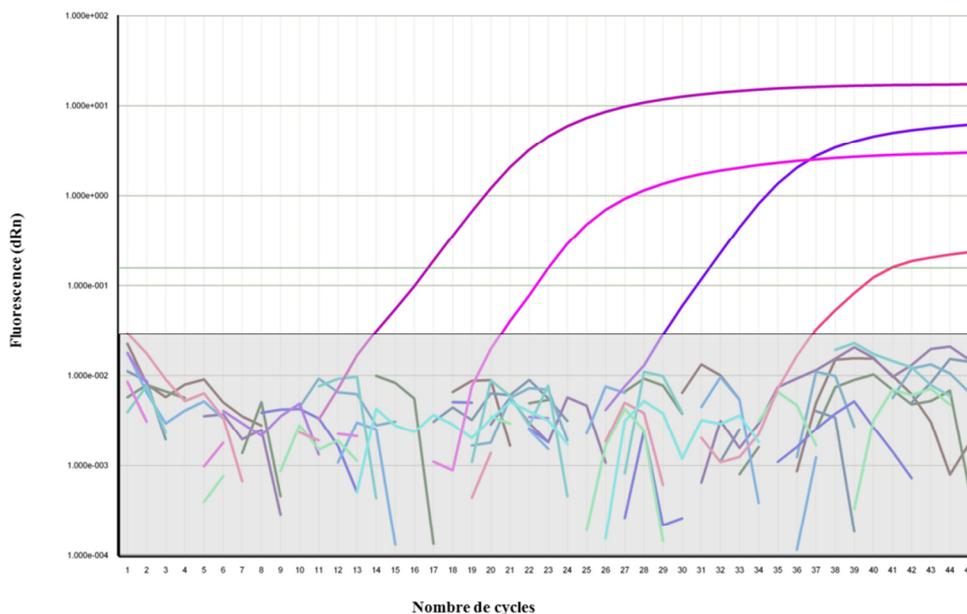


Figure 2 : Détection de 3 génotypes de HAV via une RT-qPCR en une étape avec les amorces HAV F2 / R2 et la sonde HAV P2.

Les courbes correspondantes aux génotypes IB, IA et IIIA sont respectivement en violet, bleu et rouge ; le contrôle positif correspond à la courbe rose.

		Suspension de HAV (10^7 TCID ₅₀) en présence de matrice alimentaire					Suspensions de HAV (TCID ₅₀) Sans matrice alimentaire							
		Sans PEG	Avec PEG				10^7	10^6	10^5	10^4	10^3	10^2	10^1	10^0
RT-qPCR	1step	32	27,8	28,2	27,3	27,9	18,7	22,2	25,7	28,6	32,3	34,5	Nd	Nd
	2step	Nd	39,9	41,2	38,2	38,8	28,8	31,5	35,4	38,7	Nd	Nd	Nd	Nd

Tableau III : Comparaison des valeurs de Ct obtenues par RT-qPCR en une étape ou en deux étapes lors de la détection de HAV avec HAV F2 / R2 et HAV P2 avec ou sans présence de matrice alimentaire.

Tools[®] et les amorces F392 et R461 (Jothikumar et al. 2005; Costafreda et al. 2006). La région 5' est aussi décrite dans la littérature scientifique comme étant une région hautement conservée (Costa-Mattioli et al. 2002; Sánchez et al. 2007).

La spécificité du couple d'amorces HAV F2/R2 et de la sonde HAV P2 a été analysée : l'inclusivité a été testée via la détection de 3 génotypes de HAV, IA, IB et IIIA fournis par le RIVM (Figure 2). L'échantillon de génotype IIIA est détecté positif mais avec un Ct relativement élevé comparé au Ct des échantillons de génotypes IA et IB. Trois sérums humains détectés positifs par RT-PCR nichée (Mannucci et al. 1994), ont été testés avec la trousse hepatitisA CeeramTools[®] et avec le couple d'amorces HAV F2 / R2 et la sonde HAV P2. Le couple HAV F2/R2 a donné des résultats positifs pour 2 échantillons et la trousse hepatitisA CeeramTools[®] a détecté un de ces 2 prélèvements. Le troisième échantillon n'a donné aucune fluorescence. Aucun des deux systèmes ne détecte 100 % des génotypes de HAV (Figure 2). Ces différences de détection moléculaire en fonction du génotype de HAV ont déjà été observées (Jothikumar et al. 2005). L'intérêt d'un second couple d'amorces localisé dans une région très différente de celle correspondant aux amorces de la trousse Ceeram Tools[®] pourrait être une alternative efficace pour détecter un éventail plus large de génotypes de HAV. L'association permettrait probablement d'augmenter le nombre de génotypes détectables. Cela permettrait aussi de disposer d'une méthode de confirmation d'un échantillon positif ou d'un échantillon fortement suspecté d'être positif mais ayant fourni un résultat négatif via un premier système de détection.

L'exclusivité a été testée via l'absence de signal en présence de Picornavirus (Poliovirus sabin-like 3, Human entero-71, Human entero B, Human entero C et Human entero D) et de virus entériques (HEV génotype 3, Rotavirus G1P8, Adenovirus 41 et Astrovirus 1). Aucune amplification n'a été observée lors de cette PCR.

Deux systèmes de RT-qPCR ont été également comparés en utilisant HAV F2/R2/P2 : un système en une étape versus un système en deux étapes. La RT-qPCR en une étape permet d'obtenir des valeurs de Ct significativement inférieures à celles obtenues en 2 étapes (Tableau III). De plus, la RT-qPCR en une seule étape permet de diminuer les risques de contamination des échantillons en ne manipulant les échantillons qu'une seule fois entre le début de l'étape de transcription inverse et l'obtention des résultats via les courbes de fluorescences (Costafreda et al. 2006).

Limite de détection de la RT-qPCR

Une série de 10 dilutions d'un facteur 10 d'une suspension virale de HAV a été réalisée (10^7 à 10^{-2} TCID₅₀/ml). A partir de ces 10 dilutions, l'extraction d'ARN puis une RT-qPCR en une étape

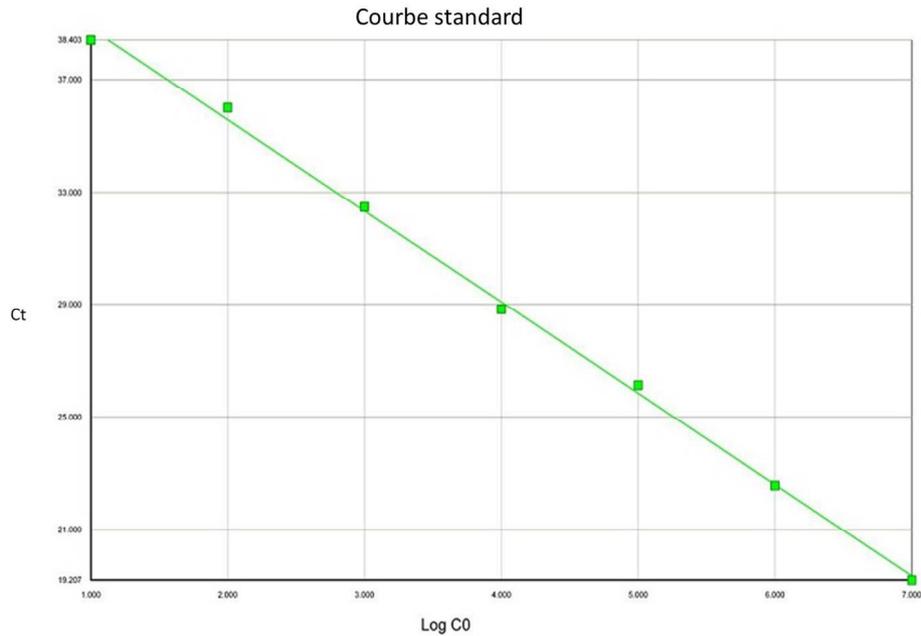


Figure 3 : Courbe standard de la détection du HAV par les amorces HAV F2 / R2 et la sonde HAV P2 dans une RT-qPCR en une étape. La pente de la courbe standard est égale à -3,42 et l'efficacité est égale à 99,8 % ($R^2 = 0,998$).

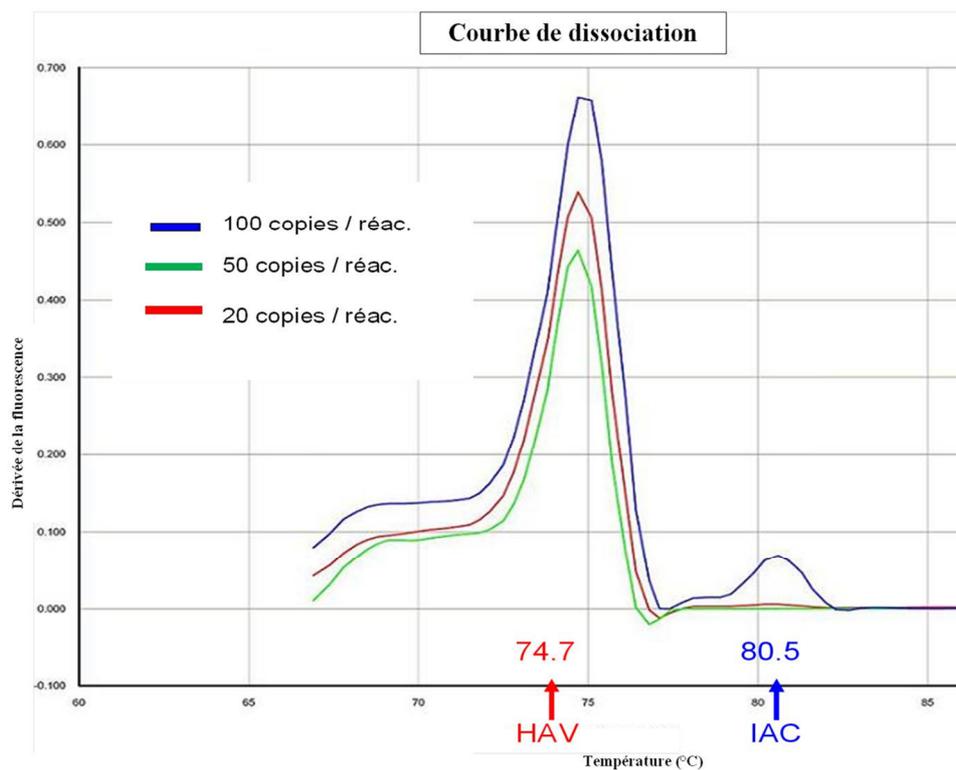


Figure 4 : Courbes de dissociation du HAV (10^6 TCID₅₀) et du IAC avec 3 concentrations différentes de plasmides (100, 50 et 20 copies par réactions).

La concentration de 100 copies de plasmide par réaction a été choisie car elle permet d'avoir amplification à la fois de la cible (HAV) et du IAC.

avec HAV F2 / R2 / P2 ont été réalisées. La limite de détection du couple HAV F2/R2 est de 10^1 TCID₅₀/ml avec un Ct de 38,4. Le logiciel de la qPCR a permis de dessiner une courbe standard et de déterminer mathématiquement la pente de la droite et de calculer l'efficacité de la RT-qPCR en une étape (figure 3).

Contrôle interne d'amplification

La concentration du IAC a été optimisée en SYBR Green et l'absence d'hybridation aspécifique entre les deux couples d'amorces et les deux cibles a été démontrée. Trois concentrations du plasmide utilisé comme IAC ont été testées : 100, 50 et 20 copies de plasmide par réaction. Lorsque la concentration en IAC est trop faible (20 et 50 copies par réaction), seule l'amplification de HAV est détectée. Avec une concentration de 100 copies de plasmide par réaction, l'amplification à la fois de HAV et du IAC est visualisable. La concentration de 100 copies de plasmide par réaction a donc été choisie en raison de son amplification malgré la concentration importante en cible HAV (figure 4). Une sonde spécifique du IAC a ensuite été utilisée à la concentration finale de 250 nM lors d'une RT-qPCR duplex.

Sur les dilutions de HAV de 10^7 à 10^3 TCID₅₀, les différences de Ct entre une dilution avec IAC et une dilution sans IAC ont variés de 0,2 à 0,5. Seule la dernière dilution de HAV (10^2 TCID₅₀) a présenté une différence de Ct de 2. La détection du HAV ne présente aucune différence significative en présence ou en absence de IAC. L'amplification du IAC n'a donc pas d'influence sur l'amplification de la cible HAV.

Optimalisation des procédures d'extraction du HAV dans les matrices alimentaires.

L'ensemble de la méthode d'extraction des particules virales est schématisée dans le tableau IV.

Solutions d'élution

La première étape pour l'extraction des particules virales est l'étape d'élution qui doit permettre le détachement du virus de la surface des aliments. Parmi les 3 solutions testées, la solution de TGBE a été choisie pour les futurs protocoles d'extraction, le culot étant difficile à mettre en suspension avec les 2 autres solutions.

PEG et accélération

A l'étape d'élution suit une étape de concentration, avec deux paramètres testés : le PEG et la centrifugation. Le PEG est un polymère de haute masse moléculaire qui permet la concentration du virus dans le culot de l'échantillon après centrifugation. Les valeurs de Ct les plus faibles ont été

Echantillon	10 g de dattes placés dans sac pour broyeur de type Stomacher®					
	20ml TGBE 3%					
Ajouter	pectinase 20µl + MNV (100 µL) + HAV (100 µL)					
Plateforme agitante	25 min					
	Récouter le filtrat					
Centrifugation (10000 g)	Centrifuger 30min					
	Récouter le surnageant					
	Ajouter 0,5 vol de PEG dans chaque échantillon					
Plateforme agitante	1h					
	Série 1			Série 2 : 20h à 4°C		
Centrifugation (10000 g)	30 min	1h	2h	30 min	1h	2h
	conserver le culot et le suspendre dans 500µl PBS					
	Ajouter 500µl Chloroforme : butanol					
	Vortex puis incubation 5 min					
Centrifugation (10000 g)	15min					
	Prélever 100µL du surnageant pour réaliser l'extraction de l'ARN viral					

Tableau IV : Protocole d'extraction du HAV (tampon TGBE) avec une centrifugation à 10 000 g et des temps de centrifugation de 30min, 1h et 2h.

Les concentrations des suspensions de MNV et HAV sont respectivement de 10^4 et 10^7 TCID₅₀

obtenues avec utilisation du PEG et avec une accélération de 10000 g (par rapport à celle de 4000 g) et une centrifugation de 30 minutes ou 1 heure (comparée à une centrifugation de 2 h) (Tableau V).

Les Ct diminuent de plusieurs unités avec l'utilisation du PEG. Le PEG permet également de réduire considérablement le volume avec lequel il faut travailler (Love et al. 2008). Des volumes de 20 ml ou plus peuvent ainsi être concentrés dans un volume de 500 µl dont 100 µl seront extrait et 5 µl analysés.

La durée d'action du PEG de 20h permet d'obtenir des valeurs de Ct légèrement inférieures à celles obtenues après seulement 1 h d'action : 0,3 à 0,7 unités de Ct (Tableau V). D'un point de vue pratique, si la technique est mise en place dans un laboratoire, il peut être intéressant d'obtenir les résultats plus rapidement en utilisant la durée d'action d'une heure du PEG.

Les valeurs de Ct sont légèrement inférieures avec la centrifugation de 30 minutes par rapport à celle d'1 h.

Application de la méthode optimisée avec et sans matrice alimentaire

Après extraction via le RNeasy mini kit (Qiagen®) d'une suspension de HAV (10^7 TCID₅₀/ml), des dilutions d'un facteur 10 sont réalisées et testées par RT-qPCR. Le système de détection composé de HAV F2 / R2 / P2 détecte la concentration 10^2 TCID₅₀/ml alors que la trousse HepatitisA Ceeram Tools® arrête la détection à 10^3 TCID₅₀/ml (tableau VI).

Des dilutions décroissantes de HAV ont été inoculées dans une matrice de dattes. Ces échantillons ont subi les étapes d'extraction (des particules virales et de l'ARN) puis de détection de l'ARN par RT-qPCR avec HAV F2/R2 et HAV P2 sur thermocycleur 7300 (Applied Biosystem®) et avec la trousse HepatitisA®Ceeram Tools sur thermocycleur Mx3005P (Stratagene®).

Pour les concentrations initiales de 10^7 à 10^5 TCID₅₀ / ml, les valeurs de Ct obtenues avec HAV F2/R2 et HAV P2 sont inférieures par rapport aux valeurs obtenues avec la trousse HepatitisA®Ceeram Tools (Tableau VII).

La limite de détection augmente et correspond à un inoculum avec une concentration initiale égale à 10^5 TCID₅₀ / ml et 10^4 TCID₅₀ / ml pour les amorces HAV F2 / R2 et la sonde HAV P2 et pour la trousse HepatitisA Ceeram Tools® respectivement. Les échantillons avec un inoculum d'une concentration initiale de 10^4 TCID₅₀ / ml sont détectés de manière inconstante avec HAV F2 / R2 et HAV P2. En présence de matrice alimentaire, la trousse HepatitisA Ceeram Tools® détecte les échantillons avec un inoculum dix fois moins concentré par rapport au couple HAV F2 / R2 et HAV P2. La sensibilité de la trousse Ceeram Tools® est donc plus élevée. L'effet de la matrice joue donc un rôle et interfère probablement avec les amorces HAV F2 / R2 et/ou la sonde HAV P2.

Durée action PEG (h)	Temps centrifugation (h)	MNV (10^4 TCID ₅₀)		HAV (10^7 TCID ₅₀)			
		1 étape	2 étapes	1 étape		2 étapes	
		Fw-ORF1/ORF2 Rv-ORF1/ORF2 MGB-ORF1/ORF2		Ceeram Tools®	HAV F2/R2/P2	HAV F2/R2/P2	FP392/ RP 461 Sonde 413
1	0,5	23,5	29,7	30	27,8	39,6	40,2
	1	21,1	33	30,6	28	41,2	41
	2		34,3				41,7
20	0,5	21,9	27,7	30,1	27,1	37	35,6
	1	21,9	28,9	30,5	27,8	38,5	34,6
	2		34,4				49,1
Sans PEG		27,3	31,8	33,2	31,9	indéterminé	36,1

Tableau V : Effet du polyéthylène glycol et du temps de centrifugation (10000 g) sur les valeurs de Ct obtenues pour la détection de MNV et HAV par RT-qPCR.

TCID ₅₀	TCID ₅₀ avant l'étape d'extraction de l'ARN	Extraction ARN	HAV F2/R2 /P2	Trousse HepatitisA Ceeram Tools®
10^7	10^6	$1,25 \cdot 10^5$	20,1	22,4
10^6	10^5	$1,25 \cdot 10^4$	23,2	25,8
10^5	10^4	$1,25 \cdot 10^3$	26,4	29,5
10^4	10^3	$1,25 \cdot 10^2$	29,7	35,2
10^3	10^2	$1,25 \cdot 10^1$	33,1	36,7
10^2	10	$1,25 \cdot 10^0$	35,8	Nd
10	1	$1,25 \cdot 10^{-1}$	Nd	Nd
1	0,1	$1,25 \cdot 10^{-2}$	Nd	Nd

Tableau VI : Comparaison des moyennes des Ct obtenues sur des dilutions d'une suspension de HAV avec 2 systèmes RT-qPCR en une étape.

Lors de l'extraction de l'ARN, on part d'une suspension d'un volume de 100 µl et on obtient 40 µl à la fin du processus d'extraction. Parmi ces 40 µl, 5 µl ont été utilisés pour la RT-qPCR.

Estimation de la TCID ₅₀ dans les volumes prélevés aux différentes étapes de l'extraction				Valeurs de Ct								
TCID ₅₀	TCID ₅₀ dans l'inoculum	Extraction particules virales	Extraction ARN	Trousse HepatitisA Ceeram Tools®			HAV F2/R2 /P2					
				10^7	10^6	2×10^5	$2,5 \cdot 10^4$	30	30,9	32,8	28,4	29,4
10^6	10^5	2×10^4	$2,5 \cdot 10^3$	33,5	33	34,5	32,9	32	31,7	32	32,2	32,7
10^5	10^4	2×10^3	$2,5 \cdot 10^2$	36,3	37,3	36,3	35,2	40,2	35,7	36,1	35	34,4
10^4	10^3	2×10^2	$2,5 \cdot 10^1$	38,6	39,4	40	Nd	Nd	Nd	41,4	Nd	(44,2)
10^3	10^2	2×10^1	$2,5 \cdot 10^0$	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
10^2	10	2×10^0	$2,5 \cdot 10^{-1}$	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd

Tableau VII : Limite de détection du HAV inoculé dans une matrice alimentaire (dattes) via deux systèmes de détection de RT-qPCR en une étape.

Lors de l'extraction des particules virales, le nombre de particules infectieuses est divisé par 5 car seuls 100 µl sur 500 sont prélevés.

A la fin de l'extraction de l'ARN viral sur le volume de 40 µl obtenu, 5 µl sont prélevés et utilisés pour la réaction de RT-qPCR.

La trousse de détection HepatitisA® Ceeram Tools a été utilisée sur un thermocycleur Mx3005P (Stratagene®). Les amorces HAV F2 / R2 et la sonde HAV P2 ont été utilisées avec la trousse « RNA Ultrasense one step Quantitative RT-PCR system » (Invitrogen®) sur un thermocycleur 7300 (Applied Biosystem®).

Nd : non-déterminé

Le pourcentage de recouvrement pour HAV varie beaucoup d'une étude à l'autre car les matrices alimentaires et les méthodes d'extraction ne sont pas identiques. Les comparaisons sont donc difficiles et il semble que chaque catégorie de matrice alimentaire devrait disposer d'un protocole d'extraction spécifique (Dubois et al. 2007; Baert et al. 2008a; Moon et al. 2009) . En 2008, Fino et Kniel rapportent des taux de recouvrement du HAV supérieurs à ceux obtenus avec HAV F2 / R2 / P2 qui varient de 85,2 % à 62,6 % (en fonction du temps de contact entre l'inoculum et la matrice alimentaire) avec des inocula de départ de 10^7 à 10^9 TCID₅₀ / ml. Le taux de recouvrement élevé vient en partie de la méthode d'extraction qui consiste en une étape de plusieurs lavage/rinçage de la surface de l'aliment inoculé avec une solution d'éluion (Fino and Kniel 2008).

Un autre domaine important dans le domaine des virus liés aux matrices alimentaires est la prophylaxie et les méthodes qui peuvent être mises en place pour diminuer le risque de contamination virale durant les processus de préparation des aliments dans les établissements travaillant avec des denrées alimentaires. De nombreux biocides sont actuellement disponibles sur le marché, mais beaucoup d'interrogations persistent au sujet de leur activité virucide. Les différents paramètres d'utilisation des biocides pourraient également être étudiés. Il serait utile de découvrir leurs effets au niveau des virus concernés et quelles étapes de l'infection virales sont modifiées ou inhibées par ces biocides.

Remerciements

Nous remercions le service Pathogènes alimentaires de l'ISP à Bruxelles où l'ensemble des travaux a été réalisé.

La souche HM175 du virus de l'hépatite A (HAV), adaptée à la culture cellulaire de type FRhK4 (lignée de cellules rénales de singe) a été envoyée par le laboratoire de virus entérique, Département de microbiologie, de l'Université de Barcelone.

Des échantillons HAV positifs ont été généreusement fournis par le service des virus entériques de l'Institut National de la Santé Publique et de l'Environnement des Pays-Bas (RIVM) et par le service des Maladies virales de l'ISP.

Références bibliographiques

- Baert, L., Uyttendaele, M., & Debevere, J. (2008a). Evaluation of viral extraction methods on a broad range of Ready-To-Eat foods with conventional and real-time RT-PCR for Norovirus GII detection. *Int J Food Microbiol*, **123**, 101-108.
- Baert, L., Wobus, C. E., Van Coillie, E., Thackray, L. B., Debevere, J., & Uyttendaele, M. (2008b). Detection of murine norovirus 1 by using plaque assay, transfection assay, and real-time reverse transcription-PCR before and after heat exposure. *Appl Environ Microbiol*, **74**, 543-546.
- Barbau-Piednoir, E., Lievens, A., Vandermassen, E., Mbongolo-Mbella, E. G., Leunda-Casi, A., Roosens, N., Sneyers, M., & van den Bulcke, M. (2012). Four new SYBR[®]Green qPCR screening methods for the detection of Roundup Ready[®], LibertyLink[®], and CryIAb traits in genetically modified products. *Eur Food Res Technol*, **234**, 13-23.
- Beutels, M., Van Damme, P., Aelvoet, W., Desmyter, J., Dondeyne, F., Goilav, C., Mak, R., Muylle, L., Pierard, D., Stroobant, A., Van Loock, F., Waumans, P., & Vranckx, R. (1997). Prevalence of hepatitis A, B and C in the Flemish population. *Eur J Epidemiol*, **13**, 275-280.
- Brooks, H. A., Gersberg, R. M., & Dhar, A. K. (2005). Detection and quantification of hepatitis A virus in seawater via real-time RT-PCR. *J Virol Methods*, **127**, 109-118.
- Costa-Mattioli, M. (2003). Evidence of recombination in natural populations of hepatitis A virus. *Virology*, **311**, 51-59.
- Costa-Mattioli, M., Cristina, J., Romero, H., Perez-Bercof, R., Casane, D., Colina, R., Garcia, L., Vega, I., Glikman, G., Romanowsky, V., Castello, A., Nicand, E., Gassin, M., Billaudel, S., & Ferre, V. (2002). Molecular Evolution of Hepatitis A Virus: a New Classification Based on the Complete VP1 Protein. *J Virol*, **76**, 9516-9525.
- Costafreda, M. I., Bosch, A., & Pinto, R. M. (2006). Development, evaluation, and standardization of a real-time TaqMan reverse transcription-PCR assay for quantification of hepatitis A virus in clinical and shellfish samples. *Appl Environ Microbiol*, **72**, 3846-3855.
- Cristina, J., & Costa-Mattioli, M. (2007). Genetic variability and molecular evolution of Hepatitis A virus. *Virus Res*, **127**, 151-157.
- Daemer, R. J., Feinstone, S. M., Gust, I. D., & Purcell, R. H. (1981). Propagation of human hepatitis A virus in African green monkey kidney cell culture: primary isolation and serial passage. *Infect Immun*, **32**, 388-393.
- de Paula, V. S., Gaspar, A. M. C., & Villar, L. M. (2010). Optimization of methods for detecting Hepatitis A virus in food. *Food Environ Virol*, **2**, 47-52.
- Dubois, E., Hennechart, C., Merle, G., Burger, C., Hmila, N., Ruelle, S., Perelle, S., & Ferré, V. (2007). Detection and quantification by real-time RT-PCR of hepatitis A virus from inoculated tap waters, salad vegetables, and soft fruits: Characterization of the method performances. *Int J Food Microbiol*, **117**, 141-149.
- Feinstone, S. M., Kapikian, A. Z., & Purcell, R. H. (1973). Hepatitis A: detection by immune electron microscopy of a viruslike antigen associated with acute illness. *Science*, **182**, 1026-1028.
- Fino, V. R., & Kniel, K. E. (2008). Comparative recovery of foodborne viruses from fresh produce. *Foodborne Pathog Dis*, **5**, 819-825.
- Fiore, A. E. (2004). Hepatitis A Transmitted by Food. *Clin Infect Dis*, **38**, 705-715.
- Goswami, B. B., Koch, W. H., & Cebula, T. A. (1993). Detection of hepatitis A virus in Mercenaria mercenaria by coupled reverse transcription and polymerase chain reaction. *Appl Environ Microbiol*, **59**, 2765-2770.
- Grinde, B., Stene-Johansen, K., Sharma, B., Hoel, T., Jensenius, M., & Skaug, K. (1997). Characterisation of an epidemic of hepatitis A virus involving intravenous drug abusers - Infection by needle sharing. *J Med Virol*, **53**, 69-75.

- Hollinger, F. B., & Emerson, S. U. (2007). Hepatitis A virus. In D. M. Knipe, & P. M. Howley (Eds.), *Fields Virology* (V ed., Vol. I, pp. 911-947). Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins.
- Houde, A., Guévremont, E., Poitras, E., Leblanc, D., Ward, P., Simard, C., & Trottier, Y. L. (2007). Comparative evaluation of new TaqMan real-time assays for the detection of hepatitis A virus. *J Virol Methods*, **140**, 80-89.
- Jacobsen, K. H., & Wiersma, S. T. (2010). Hepatitis A virus seroprevalence by age and world region, 1990 and 2005. *Vaccine*, **28**, 6653-6657.
- Jothikumar, N., Cromeans, T. L., Sobsey, M. D., & Robertson, B. H. (2005). Development and evaluation of a broadly reactive TaqMan assay for rapid detection of hepatitis A virus. *Appl Environ Microbiol*, **71**, 3359-3363.
- Love, D. C., Casteel, M. J., Meschke, J. S., & Sobsey, M. D. (2008). Methods for recovery of hepatitis A virus (HAV) and other viruses from processed foods and detection of HAV by nested RT-PCR and TaqMan RT-PCR. *Int J Food Microbiol*, **126**, 221-226.
- Mannucci, P. M., Gdovin, S., Gringeri, A., Colombo, M., Mele, A., Schinaia, N., Ciavarella, N., Emerson, S. U., & Purcell, R. H. (1994). Transmission of hepatitis A to patients with hemophilia by factor VIII concentrates treated with organic solvent and detergent to inactivate viruses. *Ann Intern Med*, **120**, 1-7.
- Moon, A., Hwang, I. G., & Choi, W. S. (2009). Development of a virus elution and concentration procedure for detecting norovirus in cabbage and lettuce. *Food Sci Biotechnol*, **18**, 407-412.
- Nainan, O. V., Xia, G., Vaughan, G., & Margolis, H. S. (2006). Diagnosis of Hepatitis A Virus Infection: a Molecular Approach. *Clin Microbiol Rev*, **19**, 63-79.
- CEN (2013). Microbiologie des aliments - méthode horizontale pour la recherche des virus de l'hépatite A et norovirus dans les aliments par la technique RT-PCR en temps réel. Partie 1 : Méthode de quantification, pp. 1-31 - partie 2 : Méthode de détection qualitative, pp. 1-28.
- Robertson, B. H., Khanna, B., Brown, V. K., & Margolis, H. S. (1988). Large scale production of hepatitis A virus in cell culture: effect of type of infection on virus yield and cell integrity. *J Gen Virol*, **69**, 2129-2134.
- Sánchez, G., Bosch, A., & Pintó, R. M. (2007). Hepatitis A virus detection in food: Current and future prospects. *Lett Appl Microbiol*, **45**, 1-5.
- 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.
- Soucie, J. M., Robertson, B. H., Bell B. P., McCaustland, K., & Evatt, B. L. (1998). Hepatitis A virus infections associated with clotting factor concentrate in the United States. *Transfusion*, **38**, 573-579.
- Stanway, G., Christian, P., Hovi, T., Hyypiä, T., King, A., Knowles, N., Lemon, S., Minor, P., Pallansch, M., & Palmenberg, A. Taxonomy of the Picornaviridae: current situation and possible future changes. In *XIII Meeting of the European Study Group of of the Molecular Biology of Picornavirus, 2005*
- Stene-Johansen, K., Skaug, K., Blystad, H., & Grinde, B. (1998). Unique hepatitis A virus strain caused an epidemic in Norway associated with intravenous drug abuse. *Scand J Infect Dis*, **30**, 35-38.
- Wolff, M. H., & Schmidt, A. (2008). Hepatitis A infection. In O. a. U. Protzer (Ed.), *Comparative Hepatitis*.

Presses de la Faculté de Médecine vétérinaire de l'Université de Liège

4000 Liège (Belgique)

D/2016/0480/19

ISBN 978-2-87543-091-5

