



HAL
open science

Virus entériques transmissibles par voie alimentaire : détection, typage, pouvoir infectieux et nouvelles technologies

Coralie Coudray-Meunier

► **To cite this version:**

Coralie Coudray-Meunier. Virus entériques transmissibles par voie alimentaire : détection, typage, pouvoir infectieux et nouvelles technologies. Médecine humaine et pathologie. AgroParisTech, 2014. Français. NNT : 2014AGPT0055 . tel-01166044

HAL Id: tel-01166044

<https://pastel.hal.science/tel-01166044>

Submitted on 22 Jun 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



THÈSE

pour obtenir le grade de docteur délivré par

**L'Institut des Sciences et Industries
du Vivant et de l'Environnement
(AgroParisTech)**

Spécialité : Sciences du Vivant

présentée et soutenue publiquement par

Coralie COUDRAY-MEUNIER

le 25 novembre 2014

Virus entériques transmissibles par voie alimentaire : détection, typage, pouvoir infectieux et nouvelles technologies

Directeur de thèse : **Sylvie PERELLE**

Jury

M. Pierre POTHIER, Professeur, Laboratoire de Virologie, Université de Bourgogne

Mme Soizick LE GUYADER, DR, Laboratoire de Microbiologie, IFREMER

Mme Anne-Marie ROQUE-AFONSO, Professeur, INSERM U785, Université Paris Sud

M. Thierry MORIN, Chargé de projet, Unité Pathologie virale des poissons, ANSES

M. Henri-Jean BOULOUIS, Professeur, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort

Mme Sylviane DRAGACCI, DR1, Mission soutien et valorisation de la recherche, ANSES

Mme Sylvie PERELLE, DR2, Unité Virus Entériques, ANSES

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Examineur

Examineur

Directeur de thèse

ANSES

Laboratoire de Sécurité Alimentaire, Unité Virus Entériques

23 bd du Général de Gaulle, 94706 Maisons-Alfort cedex

Je tiens à remercier tout particulièrement Madame le Docteur Sylvie Perelle, qui m'a donné ma chance, qui m'a acceptée dans son équipe, qui m'a fait l'honneur de m'encadrer tout au long de ma thèse, sa confiance et son sens de l'écoute ainsi que ses conseils avisés m'ont été très précieux.

A Audrey Fraisse, avec qui j'ai travaillé tout au long de ces trois années et sans qui rien n'aurait été pareil...

A Madame le Docteur Sandra Martin-Latil, qui m'a beaucoup apporté en précieux conseils ; son amitié et sa gentillesse m'ont accompagnée au cours de cette thèse.

A Catherine Hennechart-Collette, collègue avec qui j'ai beaucoup échangé ainsi que bibliothécaire avisée.

A toute l'équipe Virus Entériques de manière plus générale, pour m'avoir fait une place parmi eux.

A Laurent Laloux, pour m'avoir accueillie au sein du Laboratoire de Sécurité des Aliments.

A l'ANSES, pour avoir financé mon allocation doctorale et ainsi que mes travaux.

A la plateforme IdentityPath, Monsieur le Docteur Patrick FACH en particulier, qui m'a co-encadré et Madame la Docteur Sabine Delannoy, tous deux m'ont aidée, m'ont formée et ont toujours répondu à mes questions.

A Monsieur le Docteur Laurent Guillier, aide précieuse pour comprendre les statistiques et la modélisation, mais aussi compatriote bourguignon jusqu'au bout des ongles !

A l'équipe Support Qualité, pour m'avoir suivie tout au long de ces trois années.

Je tiens à remercier tout particulièrement les membres de mon jury de thèse :

Monsieur le Docteur Pierre Pothier, qui m'a fait l'honneur d'accepter d'être rapporteur. Je le remercie du temps qu'il y a passé.

Madame le Docteur Soizick Le Guyader, qui m'a fait l'honneur d'accepter d'être rapporteur. Je la remercie de ce long travail fastidieux.

Madame le Docteur Anne-Marie Roque-Afonso et Monsieur le Docteur Thierry Morin, pour avoir accepté d'être examinateurs dans mon jury de thèse mais également pour leurs conseils avisés en tant que membres du comité de pilotage de thèse.

Monsieur le Docteur Henri-Jean Boulouis, pour sa participation à mon jury de thèse en tant qu'examineur.

Madame le Docteur Sylviane Dragacci, pour sa participation à mon jury de thèse en tant qu'examineur, mais aussi pour ses conseils lors de la mise en place de la Qualité en Recherche.

Je tiens également à remercier Monsieur le Docteur Gaël Belliot pour avoir fait partie de mon comité de pilotage de thèse, pour son aide, sa présence trois années durant et ses conseils.

A Tiphany Chrun : étudiante studieuse et colocataire de mon bureau, future thésarde à qui je dis « courage et félicitations » !

A ma famille, mes parents qui m'ont soutenue jusqu'à maintenant, ainsi que mes frères à qui j'espère pouvoir démontrer un jour que la biologie a du bon.

A mes amis, et en particulier la future Madame le Docteur Claire Guérillon, amie très chère qui m'a amenée vers la voie de la recherche, pour ses conseils et surtout son soutien.

A mon mari Arnaud, qui est toujours là pour moi, qui me soutient, me comprend et me supporte...

Sommaire

Liste des abréviations-----7

Liste des figures -----9

Liste des tableaux----- 10

I – ETAT DE L'ART ----- 11

1- Virus entériques et transmission alimentaire -----11

1-1 Transmission par voie hydrique -----13

1-2 Transmission par voie alimentaire -----13

1-3 TIAC et impact des virus entériques -----14

1-4 Pathologies -----15

1-5 Virus responsables de pathologies intestinales -----16

1-5-1 Norovirus-----16

1-3-1-1 Description-----168

1-5-1-2 Pathologie-----18

1-5-1-3 TIAC -----19

1-5-2 Sapovirus -----20

1-5-2-1 Description-----20

1-5-2-2 Pathologie-----21

1-5-2-3 TIAC -----21

1-5-3 Aichi virus -----22

1-5-3-1 Description-----22

1-5-3-2 Pathologie-----23

1-5-3-3 TIAC -----24

1-5-4 Rotavirus -----24

1-5-4-1 Description-----24

1-5-4-2 Pathologie-----28

1-5-4-3 TIAC -----30

1-5-5 Astrovirus -----31

1-5-5-1 Description-----31

1-5-5-2 Pathologie-----32

1-5-5-3 TIAC -----33

1-5-6 Adénovirus entériques -----33

1-5-6-1 Description-----33

1-5-6-2 Pathologie-----34

1-5-6-3 TIAC -----35

1-5-7 Picobirnavirus -----35

1-5-7-1 Description-----35

1-5-7-2 Pathologie-----36

1-5-7-3 TIAC	36
1-5-8 Bocavirus	37
1-5-8-1 Description	37
1-5-8-2 Pathologie	37
1-5-8-3 TIAC	38
1-6 Virus responsables d'hépatites	39
1-6-1 Virus de l'hépatite A (VHA)	39
1-6-1-1 Description	39
1-6-1-2 Pathologie	41
1-6-1-3 TIAC	44
1-6-2 Virus de l'hépatite E (VHE)	46
1-6-2-1 Description	46
1-6-2-2 Pathologie	49
1-6-2-3 TIAC	50
1-7 Virus responsables de diverses pathologies	53
1-7-1 Entérovirus et Paréchovirus	53
1-7-1-1 Description	53
1-7-1-2 Pathologie	56
1-7-1-3 TIAC	56
1-7-2 Cosavirus	57
1-7-2-1 Description	57
1-7-2-2 Pathologie	58
1-7-2-3 TIAC	59
1-7-3 Coronavirus humains	59
1-7-3-1 Description	59
1-7-3-2 Pathologie	61
1-7-3-3 TIAC	62
1-7-4 Tick-Borne-Encephalitis Virus (TBEV)	62
1-7-4-1 Description	62
1-7-4-2 Pathologie	63
1-7-4-3 TIAC	64
1-7-5 Parvovirus	66
1-7-5-1 Description	66
1-7-5-2 Pathologie	66
1-7-5-3 TIAC	67
1-7-6 Virus dont la transmission par voie alimentaire est occasionnelle	67
2- Détection des Virus Entériques	69
2-1 Microscopie électronique	69
2-2 Méthodes immunologiques	70
2-3 Méthodes moléculaires	73

2-3-1 Extraction des virus	74
2-3-1-1 A partir des selles	74
2-3-1-2 A partir des eaux et des aliments	74
2-3-1-2-1 Elution	75
2-3-1-2-2 Concentration	76
2-3-1-2-3 Traitement à la protéinase K	79
2-3-1-2-4 Utilisation de billes magnétiques	80
2-3-1-2-5 Extraction des acides nucléiques	83
2-3-2 Détection du génome viral	83
2-3-2-1 Amplification du génome	83
2-3-2-1-1 Principales techniques	83
2-3-2-1-2 RT-qPCR	85
2-3-2-1-3 Contrôles	88
2-3-2-1-3-1 Contrôles de process	89
2-3-2-1-3-4 Contrôles PCR	90
2-3-2-1-3-3 Contrôles d'inhibition	91
2-3-2-2 Puce d'hybridation	92
2-3-2-3 Approches récentes de détection moléculaire et de typage	93
2-3-2-3-1 PCR Array	93
2-3-2-3-2 Digital PCR	93
2-3-2-3-3 NGS	95
2-3-3 Génotypage	96
2-3-4 Normalisation des méthodes de détection	98
2-4 Culture cellulaire	100
2-4-1 Virus entériques cultivables	100
2-4-2 Virus non cultivables	103
2-5 Détection des particules infectieuses pour les virus non cultivables	105
2-5-1 ICC-PCR	107
2-5-2 Génome amplifiable	107
2-5-3 Pré-traitements PCR	108
2-5-3-1 Protéases et nucléases	108
2-5-3-2 PMA/EMA	109
2-5-4 Capture des particules virales infectieuses	110
2-5-5 Mesure des dommages oxydatifs de la capsid	112

II- RESULTATS ----- 113

1- VIRUS ENTERIQUES : Détection, typage et risque infectieux en hygiène alimentaire	115
1-1 Comparaison de deux méthodes de détection du virus de l'hépatite A à partir de la laitue en utilisant le norovirus murin comme contrôle de process	115
1-2 Le sous-génotypage du virus de l'hépatite A par RT-qPCR	125

1-3 Discrimination des particules virales infectieuses du virus de l'hépatite A et du rotavirus par l'utilisation de monoazides et des détergents combinés à la RT-qPCR-----	150
2- VIRUS ENTERIQUES : Développement du diagnostic viral sur un format « PCR on chip »-----	169
2-1 Etude comparative de la Digital RT-PCR et de la RT-qPCR pour la quantification du virus de l'hépatite A et des Norovirus à partir d'échantillons d'eau et de laitue -----	169
2-2 Une nouvelle approche de détection des virus entériques grâce à un système de PCR nanofluidique en temps réel à haut débit-----	200
2-2-1 Introduction -----	200
2-2-2 Matériel et méthodes-----	201
2-2-2-1 Virus et cellules -----	201
2-2-2-2 Virus et selles-----	203
2-2-2-3 Standards ARN et ADN-----	204
2-2-2-4 Extraction des acides nucléiques-----	206
2-2-2-5 Amorces et sondes-----	206
2-2-2-6 Conditions de RT-qPCR sur le CFX96 (Biorad)-----	208
2-2-2-7 Conditions de Digital RT-PCR avec le Biomark™ HD System (Fluidigm) -----	208
2-2-2-8 Conditions de RT-qPCR Array avec le Biomark™ HD System (Fluidigm)-----	209
2-2-3 Résultats-----	211
2-2-3-1 Détection quantitative par RT-qPCR conventionnelle et RT-dPCR-----	211
2-2-3-2 Détection qualitative par RT-qPCR Array -----	212
2-2-3-3 Détection qualitative par RT-qPCR Array, puis quantification par RT-dPCR d'échantillons -----	213
2-2-4 Discussion -----	215
III- DISCUSSION - PERSPECTIVES -----	218
ANNEXE 1 : Mention « Thèse effectuée dans un environnement Qualité »-----	228
ANNEXE 2 : La Digital PCR - fiche technique -----	234
ANNEXE 3 : La qPCR Array - fiche technique -----	237
ANNEXE 4 : Valorisation des travaux -----	2379
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES -----	24141
RESUME -----	2688
ABSTRACT-----	2699

Liste des abréviations

ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ADNc	ADN complémentaire
ANSES	Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
ARN	Acide RiboNucléique
ATCC	American Type Culture Collection
CEN	Comité Européen de Normalisation
cg	Copie-génome
CNR	Centre National de Référence
Ct	Cycle Threshold, cycle seuil
db	double brin
DLP	Double-Layered Particle
DO	Densité Optique
dPCR	Digital PCR
ECP	Effet cytopathique
EAC	External Amplification Control
EMA	Ethidium Monoazide
EIA	Enzyme ImmunoAssay
EIL	Essai Inter-Laboratoire
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FCV	Feline Calicivirus
HBGA	Histo-Blood Group Antigen, antigènes tissulaires de groupes sanguins
hBoV	Bocavirus humain
HRM	High Resolution Melt, courbes de fusion haute résolution
IAC	contrôle interne d'inhibition
ICC-PCR	Integrated cell culture-PCR
ICTV	International Committee on Taxonomy of Viruses
IF	ImmunoFluorescence
IgM	Immunoglobuline de type M
IgG	Immunoglobuline de type G
InVS	Institut de Veille Sanitaire
ISO	International Organization for Standardization
IRES	internal ribosomal entry site
J	Joules
LAMP	Loop Mediated Isothermal Amplification
LOD	Limite de détection (Limit of Detection)
ME	Microscopie Electronique
Mengo	Mengovirus
μl	microlitre
ml	millilitre
MNV	Murine Norovirus
MPa	MégaPascal
NaCl	Chlorure de sodium
NASBA	Nucleic Acid Sequence Based Amplification

NGS	Séquençage de Nouvelle Génération
NoV	Norovirus
nt	nucléotide
NTR	Non translated region
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
ORF	Open Reading Frame
pb	paire de bases
PBS	Phosphate Buffered Saline, tampon phosphate salin
PCR	Réaction de polymérisation en chaîne (Polymerase Chain Reaction)
PEG	PolyEthylène Glycol
PFU	Plaque Forming Unit
PMA	Propidium Monoazide
qPCR	PCR quantitative en temps réel
RdRp	RNA-dependant-RNA-polymerase
RNase	Ribonucléase
RT	Reverse Transcription
sb	simple brin
SLP	Single-Layered Particle
STEP	Station d'épuration
TBEV	Tick-Borne Encephalitis Virus
TCID₅₀	Median Tissue Culture Infective Dose
TIAC	Toxi-Infection d'origine Alimentaire Collective
TBE	Tick-borne Encephalitis
TBEV	Tick-borne Encephalitis Virus
TGEB	Tris-Glycine-Extrait de Bœuf
TLP	Triple-Layered Particle
UTR	Untranslated region
UV	Ultraviolet
VHA	Virus de l'Hépatite A
VHE	Virus de l'Hépatite E
WHO	World Health Organization

Liste des figures

Figure 1 : Voies de transmission des virus entériques	12
Figure 2: Organisation génomique des norovirus	17
Figure 3 : Organisation génomique des sapovirus	20
Figure 4 : Organisation génomique des aichi virus	23
Figure 5 : A : Organisation génomique des rotavirus A ; B : Liste des protéines virales de la souche humaine rotavirus A.....	25
Figure 6 : Estimation de la prévalence globale des maladies à rotavirus	29
Figure 7 : Organisation génomique des astrovirus.....	32
Figure 8 : Organisation génomique (exemple de l'adénovirus humain de type 5).....	34
Figure 9 : Organisation génomique de picobirnavirus	36
Figure 10 : Organisation génomique de HBoV.....	37
Figure 11 : Organisation génomique de VHA.....	39
Figure 12 : Distribution géographique des génotypes de VHA.....	40
Figure 13 : Evolution de la répartition des génotypes de VHA en France.....	41
Figure 14 : Taux d'incidence des cas notifiés d'hépatite A aiguë	43
Figure 15 : Structure du génome du VHE	46
Figure 16 : Arbre phylogénétique basé sur les séquences totales des souches de VHE	47
Figure 17 : Endémicité pour le VHE au niveau mondial.....	49
Figure 18 : Nombre de cas d'hépatites E diagnostiquées par le CNR de 2002 à 2011	51
Figure 19 : Organisation génomique des entérovirus	55
Figure 20 : Organisation génomique de cosavirus	58
Figure 21 : Structure du génome viral de coronavirus	60
Figure 22 : Organisation génomique du TBEV.....	63
Figure 23 : TBE en Europe: Etablissement des zones d'endémies en 2008.....	64
Figure 24 : Organisation génomique des parvovirus.....	66
Figure 25 : Etapes nécessaires et contrôles pour la détection de virus à partir de matrices alimentaires.....	75
Figure 26 : Principe général de la quantification des ADN/ARN par Digital PCR	94
Figure 27 : Schéma des effets (sur la capsid virale, certaines protéines et le génome viral) de cinq agents virucides (température, UV, oxygène, chlore libre et dioxyde de chlore) sur le bactériophage MS2	106

Liste des tableaux

<i>Tableau 1 : Virus transmissibles via les aliments ou l'eau.....</i>	<i>11</i>
<i>Tableau 2 : Pathologies induites par les virus entériques</i>	<i>15</i>
<i>Tableau 3 : Classification simplifiée du genre Enterovirus</i>	<i>54</i>
<i>Tableau 4 : Exemples de trousse EIA commercialisées pour les virus entériques</i>	<i>72</i>
<i>Tableau 5 : Techniques de concentration et de purification utilisées en fonction du type d'aliments contaminés</i>	<i>77</i>
<i>Tableau 6 : Exemples de protocoles mis au point pour la récupération des virus entériques à partir des matrices</i>	<i>80</i>
<i>Tableau 7 : Exemple de multiplexage en détection moléculaire virale</i>	<i>85</i>
<i>Tableau 8 : Région du génome amplifiée par PCR, RT-PCR pour la détection des virus de l'hépatite A et E, norovirus, sapovirus, rotavirus, astrovirus, aichi virus, adénovirus entériques, cosavirus, TBEV, picobirnavirus et bocavirus.....</i>	<i>86</i>
<i>Tableau 9 : Exemples d'utilisation de virus contrôle de process en fonction du virus entérique recherché.....</i>	<i>90</i>
<i>Tableau 10: Quatre différents appareils de digital PCR</i>	<i>94</i>
<i>Tableau 11 : Régions du génome utilisées pour le génotypage des virus de l'hépatite A et E, des norovirus, des rotavirus et des aichi virus.....</i>	<i>96</i>
<i>Tableau 12 : Exemples de lignées cellulaires permettant de répliquer les virus entériques.....</i>	<i>101</i>
<i>Tableau 13 : Construction des plasmides : position de l'insert à partir de la souche de référence et types de plasmides utilisés</i>	<i>204</i>
<i>Tableau 14 : Modèles moléculaires utilisés pour cette étude</i>	<i>206</i>
<i>Tableau 15 : Limites de détection (LOD) obtenues pour les 22 virus testés en RT-qPCR (CFX96), en RT-dPCR (Biomark) et en RT-PCR Array (Biomark) (n=3) et différences de quantification entre la spectrométrie (Nanodrop) et la quantification absolue par RT-dPCR (n=3).....</i>	<i>212</i>
<i>Tableau 16: Détection des échantillons par l'utilisation de la RT-qPCR Array, puis quantification par RT-dPCR et RT-qPCR.....</i>	<i>214</i>

I – ETAT DE L'ART

1- Virus entériques et transmission alimentaire

Les virus sont des agents infectieux et parasites cellulaires obligatoires. La particule virale est constituée d'un génome (ARN ou ADN, simple ou double brin), porteur de l'information génétique et d'une capsidie protéique assurant sa protection dans l'environnement. Dans certains cas, la capsidie peut être entourée d'une deuxième couche externe, l'enveloppe, qui est lipido-protéique. Les virus entériques qui se transmettent par voie digestive peuvent contaminer l'eau ou les aliments (« péril fécal »). Ils appartiennent à différentes familles et peuvent être classifiés en fonction de leur type de génome en utilisant la classification de Baltimore. Le Tableau 1 recense les virus transmissibles par les voies alimentaire et hydrique qui seront ensuite décrits plus précisément.

Classification de Baltimore	Famille	Genre	Virus transmissible par voie alimentaire ou hydrique	Occurrence en TIAC
I	<i>Adenoviridae</i>	Mastadénovirus	adénovirus 40 et 41	Régulièrement
II	<i>Parvoviridae</i>	Erythrovirus	parvovirus B19	Mal connu
		Bocavirus	bocavirus	Mal connu
III	<i>Reoviridae</i>	Rotavirus	rotavirus humains groupe A	Régulièrement
	<i>Picobirnaviridae</i>	Picobirnavirus	picobirnavirus	Mal connu
IV	<i>Caliciviridae</i>	Norovirus	norovirus GG I, II, IV	Très fréquent
		Sapovirus	sapovirus GG I, II, IV, V	Régulièrement
		Hepatovirus	virus de l'hépatite A	Régulièrement
		Kobuvirus	aichi virus	Régulièrement
	<i>Picornaviridae</i>	Enterovirus	poliovirus, coxsackievirus, echovirus, entérovirus	Régulièrement
		Parechovirus	parechovirus humains	Mal connu
		Cosavirus	cosavirus	Mal connu
		Aphthovirus	FMDV	Rare
	<i>Hepeviridae</i>	Hepevirus	virus de l'hépatite E	Régulièrement
	<i>Astroviridae</i>	Mamastrovirus	astrovirus	Régulièrement
	<i>Coronaviridae</i>	Alphacoronavirus	coronavirus humains 229E et NL63	Mal connu
		Betacoronavirus	coronavirus humains OC43 et HKU1	Mal connu
		Betacoronavirus	SARS-coronavirus	Rare
<i>Flaviviridae</i>	Flavivirus	TBEV	Régulièrement	
V	<i>Arenaviridae</i>	Arénavirus	arénavirus	Rare
	<i>Bunyaviridae</i>	Hantavirus	hantavirus	Rare
	<i>Orthomyxoviridae</i>	Influenza virus A	H5N1	Rare
	<i>Paramyxoviridae</i>	Henipavirus	nipah virus	Rare

Tableau 1 : Virus transmissibles via les aliments ou l'eau.

Classification de Baltimore: I = ADN db ; II = ADN sb ; III = ARN db ; IV = ARN sb+ ; V = ARN sb-

Les virus entériques se transmettent et se répandent par la voie féco-orale. Ils entrent dans le tractus gastro-intestinal, survivent à l'acidité de l'estomac et initient leur cycle infectieux. Les particules virales sont ensuite excrétées à forte dose dans les selles (10^7 particules infectieuses par gramme de selles) (FAO/WHO, 2008). Les virus entériques sont caractérisés par leur stabilité en dehors de leur hôte, pouvant généralement résister aux stress environnementaux (avec des variations selon les virus) tels que les acides, la chaleur, la sécheresse, la pression, les désinfectants, les radiations ultra-violettes (FAO/WHO, 2008).

Les virus entériques peuvent être transmis par voie féco-orale directement de personne à personne ou de manière indirecte, *via* la consommation d'eau ou d'aliments contaminés (voir Figure 1). Ils peuvent être à l'origine de toxi-infections alimentaires collectives (TIAC). Une TIAC est définie par la survenue d'« au moins deux cas groupés, d'une symptomatologie similaire, en général digestive, dont on peut rapporter la cause à une même origine alimentaire » (Delmas et al., 2010). Les TIAC sont des maladies à déclaration obligatoire (DO) et tout médecin ou chef de laboratoire d'analyses doit les notifier aux médecins inspecteurs de santé publique de l'Agence régionale de santé (ARS) du département de résidence des cas (Vaillant et al., 2012).

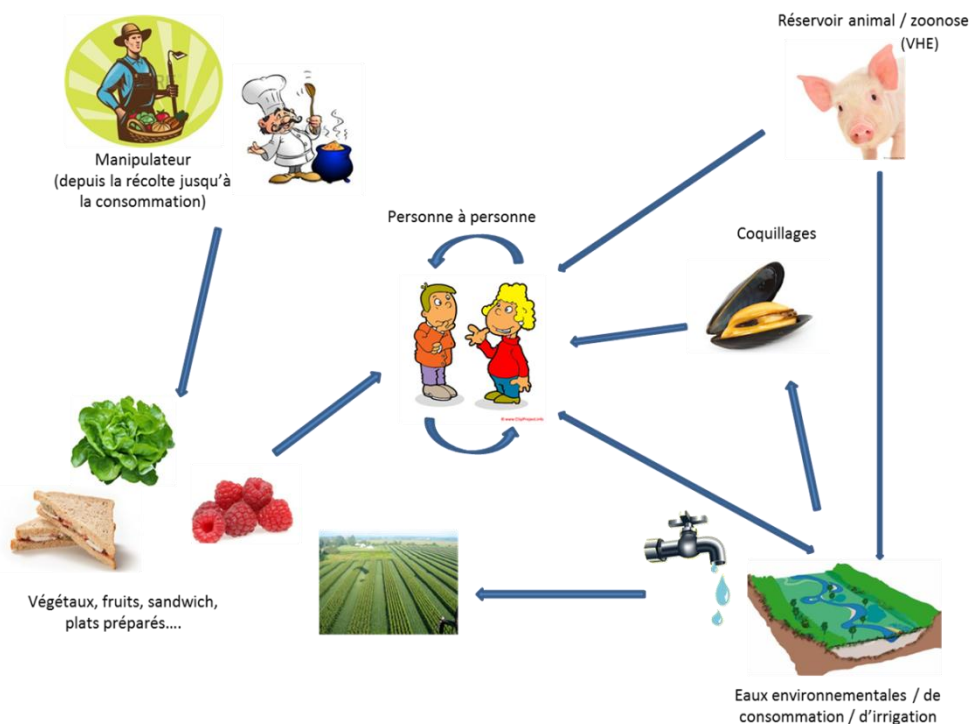


Figure 1 : Voies de transmission des virus entériques

1-1 Transmission par voie hydrique

La transmission hydrique des virus entériques peut être à l'origine d'épidémies dans les pays où les conditions sanitaires sont faibles et de TIAC dans les pays industrialisés.

L'OMS a estimé en 2003 que l'impact de la transmission des pathogènes par voie hydrique (tout pathogène confondu) avait causé 3,4 millions de morts dans le monde tandis que l'UE estime que 13548 enfants de moins de 14 ans meurent chaque année à cause de ces pathogènes transmis par l'eau ; il reste cependant difficile d'estimer l'impact réel des virus parmi tous les pathogènes (Gibson, 2014).

Les virus transmis par la voie hydrique sont fréquemment impliqués dans des épidémies de maladies gastro-intestinales et d'hépatites aiguës. Les épidémies sont associées à l'eau récréative, l'eau potable et l'eau des nappes phréatiques. En fonction du type d'eau, ces épidémies sont principalement dues à l'introduction de matériel fécal dans l'eau ou à un traitement de l'eau potable inadéquat ou interrompu (Gibson, 2014). De plus, le traitement des eaux usées ne permet d'inactiver que 20 à 80% des virus entériques, ce qui permet à une charge virale significative de se retrouver dans l'environnement, incluant l'eau de rivière, l'eau de mer et les nappes phréatiques (La Rosa et al., 2012). Les virus les plus fréquemment transmis par voie hydrique sont les norovirus, les virus de l'hépatite A et E, les adénovirus, les astrovirus, les entérovirus et les rotavirus (Gibson, 2014).

1-2 Transmission par voie alimentaire

Les aliments peuvent être contaminés par les eaux environnementales, les eaux d'irrigation ou à différents stade de leur vie (culture, récolte, stockage, transport, vente, préparation du plat...) *via* une contamination manuportée d'où l'importance du respect des mesures d'hygiène (Koopmans and Duizer, 2004 ; FAO/WHO, 2008). Les végétaux et les fruits peuvent être contaminés *via* la source d'eau d'irrigation (nappes phréatiques ou puits contaminés, eau de réseau contaminée...) ainsi que *via* des engrais biologiques (déjections animales et boues d'épandage n'ayant pas subi de traitement thermique) qui peuvent être utilisés en culture traditionnelle (Morin and Picoche, 2008). L'eau de mer peut être contaminée par une fuite des égouts, ou par des eaux usées mal traitées. Les coquillages (organismes filtreurs)

peuvent alors être contaminés par l'eau de mer qu'ils filtrent induisant la concentration des virus au sein de leurs tissus digestifs.

Dans le cas d'une transmission zoonotique, la contamination s'effectue soit par contact direct avec l'animal infecté soit par la consommation d'aliments provenant d'animaux infectés (consommation de viande ou de produits issus de cet animal). Le pouvoir zoonotique de certains virus a été démontré (comme pour le virus de l'hépatite E transmis par le porc notamment), et il a été suspecté pour quelques autres virus comme les rotavirus et les norovirus (Martella et al., 2010 ; Midgley et al., 2014 ; Bank-Wolf et al., 2010).

1-3 TIAC et impact des virus entériques

En France, 3127 foyers de TIAC ont été déclarés aux autorités sanitaires entre 2006 et 2008, concernant 33 404 malades dont 2302 ont été hospitalisés et 15 décédés (Delmas et al., 2010). L'implication des virus entériques a été confirmée pour 7,4% des TIAC (soit 61 foyers de TIAC et 1492 personnes malades) et suspectée pour 9,4% des TIAC (soit 109 foyers de TIAC et 1852 malades). 75% des TIAC imputées aux virus entériques étaient en lien avec la consommation de coquillages. Dans 1141 foyers de TIAC soit 36,5%, aucun agent étiologique n'a été retrouvé ni suspecté.

En Europe, 5262 TIAC en 2010, 5550 TIAC en 2009 et 5332 TIAC en 2008 ont été déclarées, et les virus entériques ont été estimés responsables pour respectivement 15%, 18,8% et 13,1% des TIAC (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control, 2012). Parmi les 5262 TIAC de 2010, 790 ont été imputées aux virus entériques, mais l'agent pathogène a été identifié dans seulement 87 cas (84 TIAC dues à Norovirus, touchant 2411 personnes ; une TIAC due au virus de l'hépatite A, touchant 13 personnes ; une TIAC due au Rotavirus, touchant 15 personnes ; une TIAC due à un flavivirus, touchant 2 personnes) (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control, 2012).

Les virus entériques (en particulier les Calicivirus) ont un fort impact dans la survenue de TIAC à partir de certains types d'aliments, notamment les produits issus de la mer (35,6% des TIAC sont dues aux virus entériques), les fruits et végétaux (50% des TIAC sont dues aux

virus entériques) et les repas de type buffets (19,6% des TIAC sont dues aux virus entériques) (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control, 2012).

Aux USA, 59% des TIAC sont dues aux virus entériques (dont 58% à Norovirus), et sont responsables de 27% des hospitalisations et de 12% des décès reliés aux TIAC (Scallan et al., 2011). Une étude rétrospective de 270 épidémies de gastro-entérites survenues aux USA de 2000 à 2004 a été menée par Blanton et al., (2006). Ces épidémies avaient pour origine la consommation de nourriture contaminée dans 30% des cas et d'eau contaminée dans 5% des cas. Le virus incriminé était dans 81% des cas un calicivirus. Le CDC estime à 2 milliards de dollars chaque année le coût des hospitalisations et de la perte de productivité dus aux TIAC à Norovirus (www.cdc.gov/norovirus/php/illness-outbreaks.html).

La part non négligeable des virus entériques dans la survenue de TIAC et le nombre de personnes impliquées font que les virus entériques sont aujourd'hui reconnus comme un problème majeur de santé publique. De plus, un grand nombre de TIAC n'est jamais relié à un agent pathogène, ce qui peut laisser penser que l'implication des virus entériques pourrait être encore sous-estimée.

1-4 Pathologies

Le Tableau 2 présente les pathologies induites par les principaux virus entériques.

	Gastro-entérites	Hépatites aiguës	Autres pathologies
Principaux virus	norovirus, rotavirus, sapovirus, aichi virus, entérovirus, astrovirus, adénovirus	virus de l'hépatite A, virus de l'hépatite E	entérovirus, coronavirus, TBEV, parvovirus, cosavirus
Virus suspectés	bocavirus, parvovirus, picobirnavirus, cosavirus, coronavirus	/	/

Tableau 2 : Pathologies induites par les virus entériques

Les maladies humaines associées aux virus entériques sont variées ainsi que la sévérité des symptômes associés. La pathologie la plus souvent associée à une infection par un virus entérique est la gastro-entérite (avec vomissements et/ou diarrhées). Cependant, certains de ces virus peuvent également être responsables de pathologies diverses, telles que hépatite, atteintes respiratoires, conjonctivite, infection du système nerveux central (méningite, encéphalite, poliomyélite), syndromes musculaires (fibromyalgie, myocardite) et être impliqués dans des maladies chroniques telles que diabète et syndrome de fatigue chronique (La Rosa et al., 2012).

1-5 Virus responsables de pathologies intestinales

1-5-1 Norovirus

1-3-1-1 Description

Découverts en 1972, les norovirus, d'abord appelés *Norwalk-virus*, appartiennent à la famille des *Caliciviridae*, qui est composée de quatre genres (Mathijs et al., 2012). Les genres Norovirus et Sapovirus, subdivisés en génogroupes, regroupent essentiellement des virus pathogènes pour l'homme et sont responsables de gastro-entérites, tandis que les genres Vesivirus et Lagovirus, infectent plutôt les animaux (et sont responsables de maladies variées).

Les norovirus sont des virus non enveloppés, dont la capsid est constituée d'une protéine majeure VP1 et dont le génome est constitué d'un ARN simple brin positif.

Le génome des norovirus est composé de trois ORF (Figure 2). L'ORF1 code pour une polyprotéine, se clivant en protéines non structurales (hélicase, protéase et polymérase (RdRp, RNA-dépendant-RNA-polymérase)), l'ORF2 code pour la protéine majeure de capsid (VP1) et l'ORF3 code pour une protéine de structure mineure basique (VP2) (Kohli et al., 2005).

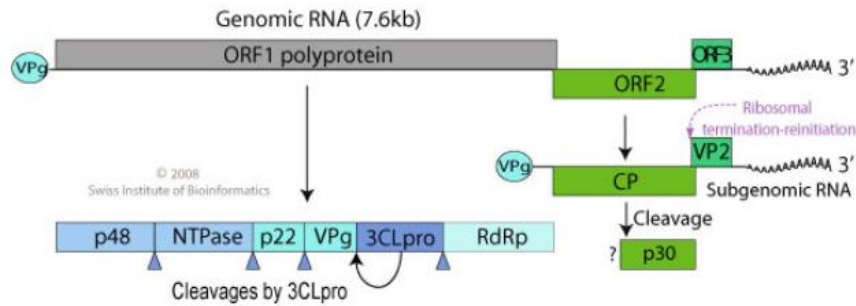


Figure 2: Organisation génomique des norovirus (ViralZone)

Il n'y a pas de types antigéniques clairement définis (Kohli et al., 2005).

Les norovirus sont classifiés en 5 génogroupes, dont les GI, GII et GIV affectent les humains. Ces cinq génogroupes sont subdivisés en plus de 50 génotypes sur la base de la séquence codant pour VP1 (Zheng et al., 2006). Le génotype le plus prévalent depuis les années 2000 est le génotype GII.4 qui est subdivisé en variants et souches (Kohli et al., 2005 ; Zheng et al., 2006). Les souches de génotypes GII.4 sont décrites depuis le milieu des années 1990, avec une accélération de l'émergence de nouvelles souches et variants depuis 2002 (Koopmans, 2009 ; Chen and Chiu, 2012). Les souches de GII.4 évoluent rapidement, par mutation dans le génome viral codant pour les protéines de capsid, permettant de ce fait de changer leur profil antigénique et peut-être également leur liaison à l'hôte humain, ce qui permet d'expliquer l'émergence rapide de nouvelles souches et variants et leur expansion dans le monde entier (Koopmans, 2009).

L'infection des cellules épithéliales par les norovirus dépend de leur fixation à un récepteur dont la partie glucidique est composée d'un antigène tissulaire de groupes sanguins A, B, H et Lewis (HBGA) (Tan and Jiang, 2005). Le statut sécréteur des cellules est dépendant de l'expression du gène FUT2 (fucosyltransferase 2), impliqué dans la synthèse des HBGA. Les personnes non sécrétrices (n'exprimant pas FUT2) étaient résistantes aux infections à norovirus lors de tests expérimentaux (Hutson *et al.*, 2005 ; Lindesmith *et al.*, 2003). Les motifs glycaniques ne sont pas tous reconnus par les différentes souches de norovirus (Harrington *et al.*, 2002 ; Thorven *et al.*, 2005 ; Shirato *et al.*, 2008 ; Ruvoën-Clouet et al., 2013). La liaison des norovirus aux HBGA dépend donc du statut sécréteur de l'hôte, ainsi que du génogroupe des norovirus (Tan and Jiang, 2010).

1-5-1-2 Pathologie

Les norovirus sont la cause la plus fréquente d'épidémies de gastro-entérites quel que soit l'âge. Ils sont responsables de 90% des gastro-entérites virales et d'environ 50% des épidémies à travers le monde, avec une prédominance du génogroupe II (Patel et al., 2009). Les souches appartenant aux différents génotypes ont un comportement différent, les souches GII.4 sont plus souvent retrouvées dans les établissements de santé, surtout depuis 2002 avec l'émergence des nouveaux variants, tandis que les souches de génotype GI sont plus communes dans les épidémies liées aux aliments contaminés ou à l'environnement (Koopmans, 2009).

Les quatre critères de Kaplan sont généralement utilisés pour établir un diagnostic d'épidémie de gastro-entérites à norovirus, à savoir (1) plus de la moitié des personnes infectées souffrent de vomissements, (2) la période moyenne d'incubation est de 24 à 48h, (3) la période moyenne de la maladie est de 12 à 60h, et (4) il y a absence de bactéries pathogènes dans les coprocultures (Patel et al., 2009).

Les principales manifestations sont des nausées, des vomissements (plus fréquents chez les individus de plus de 1 an, présents chez 50% des patients), des diarrhées non sanglantes (plus fréquentes chez les enfants de moins de 1 an), de la fièvre (37 à 45% des patients), des crampes abdominales, des céphalées (Kohli et al., 2005 ; Patel et al., 2009).

Des pathologies plus graves associées aux norovirus ont également été décrites. Chez un enfant de 23 mois présentant une encéphalopathie, la présence d'ARN de norovirus a été mis en évidence dans les selles, le sérum et le liquide cébrospinal (Ito et al., 2006). Des convulsions causées par les norovirus ont été décrites chez des enfants atteints de gastro-entérites (Chen et al., 2009 ; Chan et al., 2011). Le cas d'un enfant de 14 mois présentant une gastro-entérite associée à des convulsions, a permis de mettre en évidence la présence d'ARN de norovirus (souche NoV GII.4 variant 2006b) à la fois dans ses selles et dans son plasma, suggérant une dissémination du virus extra-intestinale et l'hypothèse que les norovirus soient capables de causer des désordres neurologiques (Medici et al., 2010).

L'analyse de 843 épidémies à norovirus (dans 45 pays entre 1993 et 2011) a montré un plus fort taux d'hospitalisations et de décès pour les épidémies dues aux norovirus de génotype

GII.4 comparativement aux autres souches de norovirus, suggérant que ce génotype peut être responsable de pathologies plus sévères (Desai et al., 2012).

Les épidémies à norovirus sont souvent rapportés avec une sévérité importante des symptômes dans les lieux de promiscuité entre les individus comme les établissements de santé (maisons de retraites, hôpitaux), les crèches, mais aussi les hôtels, restaurants et lors de croisières en bateau (Koopmans, 2009 ; Patel et al., 2009 ; Desai et al., 2012). La dose infectieuse est inférieure à 100 particules virales (Patel et al., 2009). Bien que reportées tout au long de l'année, les infections à norovirus atteignent un pic durant les mois d'hiver.

1-5-1-3 TIAC

Les norovirus sont maintenant reconnus comme le premier agent étiologique responsable de gastro-entérites transmises par les aliments.

Aux **USA** entre 2001 et 2008, le CDC rapporte que 32% des TIAC sont reliées au norovirus, dont 4% (soit 364 épidémies) ont été attribuées à la consommation d'un aliment identifié, en particulier les végétaux (33%), les fruits et noix (16%), et les mollusques (13%) (Hall et al., 2012). L'analyse des 3960 épidémies à norovirus déclarées sur le réseau CaliciNet entre 2009 et 2013 aux USA montre que 16,1% d'entre elles (soit 465 épidémies, avec en moyenne 11 personnes atteintes par épidémie) ont pour origine la consommation d'aliments contaminés et 0,1% (soit 5 épidémies) ont été transmises par l'eau (Vega et al., 2014). Parmi les différents génotypes retrouvés, les génotypes GI.3, GI.6, GI.7, GII.3, GII.6 et GII.12 sont plus souvent retrouvés dans les épidémies liées à la consommation d'aliments, et particulièrement les génotypes GI.7 et GII.12 qui sont respectivement 7 fois et 4 fois plus souvent transmis lors des épidémies par voie alimentaire que par personne à personne (Vega et al., 2014).

Le système d'alertes RASFF (Rapid Alert System for Food and Feed), mis en place pour signaler les problèmes relatifs aux produits agroalimentaires dans **l'Union européenne**, a notifié entre 2007 et 2014 54 TIAC imputées à des norovirus, dont les aliments mis en cause sont des coquillages à 56%, des crustacés à 7% et des fruits et végétaux à 37%.

Au **Japon**, une étude rétrospective réalisée sur les selles de 286 patients impliqués dans 88 TIAC associées à la consommation d'huitres a mis en évidence la présence de norovirus dans 96,6% des épidémies et dans 68,9% des échantillons cliniques (Iritani et al., 2014).

Ainsi, les norovirus sont responsables de TIAC dans le monde entier et les aliments incriminés sont les coquillages (et particulièrement les huitres), les salades, les fruits (particulièrement les fruits rouges comme les fraises et les framboises) et légumes frais et congelés, les sandwichs et les pâtisseries (Kohli et al., 2005 ; Patel et al., 2009 ; Mathijs et al., 2012).

1-5-2 Sapovirus

1-5-2-1 Description

Les sapovirus appartiennent au genre Sapovirus au sein de la famille des *Caliciviridae*. Le virion infectieux consiste en un génome à ARN positif, de 7,5kb de longueur, non segmenté et polyadénylé en 3' terminal, contenu dans une capsidie de symétrie icosaédrique d'un diamètre de 35 à 40nm.

Le génome est constitué de trois ORF. L'ORF1 code pour les gènes de protéines non structurales (c'est-à-dire l'hélicase, la protéase et la polymérase), ainsi que pour la protéine majeure de la capsidie (VP1). L'ORF2 code pour la protéine structurale mineure basique (VP2). Une troisième ORF de fonction inconnue (au niveau 5' du gène de capsidie) est décrite dans la plupart des souches (Kohli et al., 2005) (voir Figure 3).

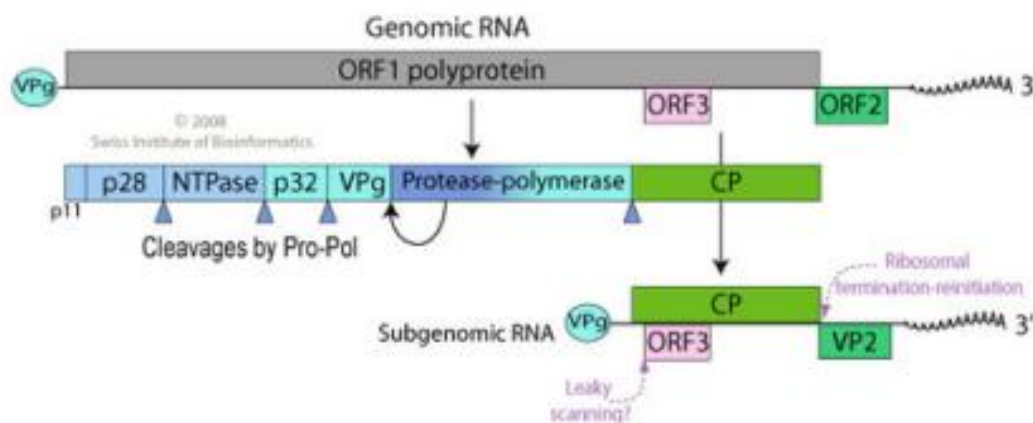


Figure 3 : Organisation génomique des sapovirus (ViralZone)

Il n'y a pas de définition claire des types antigéniques des sapovirus (Kohli et al., 2005).

Les souches sont classifiées en cinq génogroupes subdivisés en géotypes, les génogroupes I, II, IV et V regroupant les souches humaines et le génogroupe III regroupant les souches animales, sur la base de la séquence partielle ou complète de la capsid (Farkas et al., 2004 ; Oka et al., 2012).

1-5-2-2 Pathologie

Les épidémies à sapovirus sont moins fréquentes que celles à norovirus, mais on observe une augmentation des identifications de sapovirus comme agent de gastro-entérites (Kobayashi et al., 2012), avec par exemple 11% de selles positives pour sapovirus chez des enfants avec des diarrhées ou des vomissements (Logan et al., 2006) ou 3,3% des selles des patients atteints de gastro-entérite positives pour sapovirus (Chan et al., 2006). Les particules virales sont excrétées jusqu'à 15 jours après le début des symptômes chez 14% des patients (Kohli et al., 2005).

1-5-2-3 TIAC

Les sapovirus sont responsables d'épidémies de gastro-entérites liées à la consommation d'aliments contaminés et se retrouvent dans les eaux environnementales, notamment au Japon. Deux études y ont été menées pour déterminer la présence des sapovirus dans des rivières et les affluents et effluents de stations d'épuration d'eaux usées, démontrant une prévalence des sapovirus dans des rivières comprise entre 20% et 64%, et la présence des sapovirus dans les affluents et dans 58 % des effluents de stations d'épuration (Haramoto et al., 2008 ; Kitajima et al., 2010). La présence du virus est fonction de la saisonnalité puisqu'il est retrouvé principalement d'octobre à juin. La concentration moyenne des sapovirus retrouvée dans les rivières est plus élevée en hiver ($6,5 \cdot 10^3$ copies-génome par litre en été et de $6,2 \cdot 10^4$ copies-génome par litre en hiver) (Haramoto et al., 2008). Parmi les prélèvements d'eaux de rivière, 17% des virus détectés étaient du génogroupe GI, 8% du génogroupe GII et 3% du génogroupe GIV (Kitajima et al., 2010).

La transmission des sapovirus par la voie alimentaire a été reportée dans plusieurs études notamment au Japon. Ainsi, en 2008, une TIAC touchant 65 personnes d'un même groupe a

été potentiellement attribuée à la consommation de nourriture contaminée par une souche de sapovirus de génogroupe GIV retrouvée également dans les selles d'un manipulateur asymptomatique (Usuku et al., 2008).

En 2012, une large épidémie de gastro-entérite d'origine alimentaire reliée à la consommation de panier-repas a été décrite au Japon, touchant 655 personnes dans 3 villes. La présence de sapovirus de génogroupe I.2 a été retrouvée dans les selles de patients et de manipulateurs (malades ou asymptomatiques), suggérant une propagation du virus par voie manuportée (Kobayashi et al., 2012).

Les sapovirus sont également retrouvés dans d'autres pays, comme aux USA ou dans la Péninsule arabe, où une épidémie de gastro-entérites survenue chez des militaires anglais a conduit à l'incrimination de salade contaminée par trois virus, dont les sapovirus (Gallimore et al., 2005 ; Blanton et al., 2006).

Ainsi, les sapovirus sont retrouvés dans les eaux environnementales et sont à l'origine de TIAC, dont la transmission est souvent manuportée.

1-5-3 Aichi virus

1-5-3-1 Description

Au sein de la famille des *Picornaviridae*, les aichi virus appartiennent au genre Kobuvirus. Parmi ce genre, trois espèces sont décrites : les kobuvirus bovins, les kobuvirus porcins et les aichi virus.

Décrits depuis les années 90, les aichi virus sont des virus non enveloppés, dont la capsid est constituée de 3 protéines (VP1 à VP3), protégeant le génome simple brin à ARN positif.

Son génome d'environ 8300 nucléotides (nt) contient une seule ORF, codant pour une polyprotéine (Figure 4), encadrée d'une longue région 5'NTR (576 à 808 nt) présentant de probables structures secondaires, et d'une longue région 3'NTR (167 à 237 nt) suivie d'une queue poly-A (Reuter et al., 2011). Après clivage de la polyprotéine, la région P1 regroupe les trois protéines structurales et les régions P2 et P3 les sept protéines non structurales (Reuter et al., 2011).

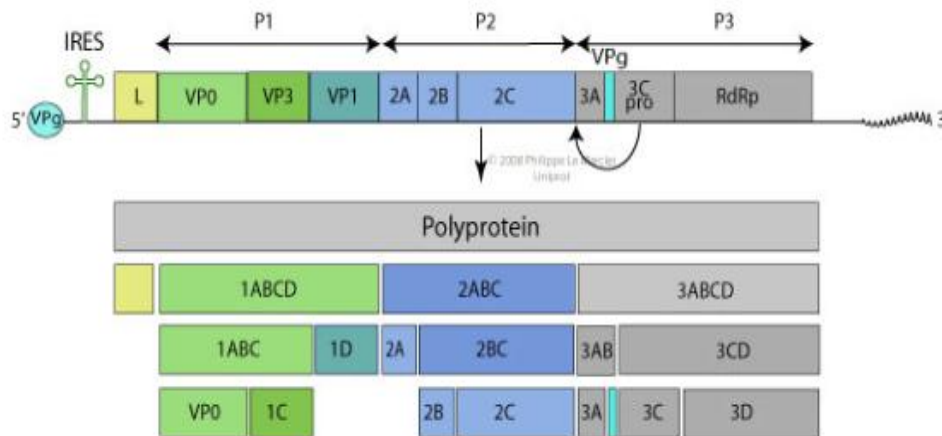


Figure 4 : Organisation génomique des aichi virus (ViralZone)

La jonction 3CD a été évaluée pour le génotypage des souches des aichi virus et a conduit à la description de deux génotypes, appelé A et B (Yamashita et al., 2000). Un troisième génotype (C) a ensuite été décrit, basé sur les analyses phylogénétiques des régions VP1 et 3CD (Ambert-Balay et al., 2008).

Ce virus est ubiquitaire dans le monde et se retrouve en Asie (Yamashita et al., 2000 ; Kitajima et al., 2013), Europe (Ambert-Balay et al., 2008 ; Le Guyader et al., 2008 ; Drexler et al., 2011), Amérique (Alcala et al., 2010) et Afrique. Il semblerait que le génotype A soit plutôt présent en Europe et en Asie, le génotype B en Amérique, en Asie et en Europe et le génotype C en Afrique (Ambert-Balay et al., 2008 ; Alcala et al., 2010 ; Reuter et al., 2011).

1-5-3-2 Pathologie

Une contamination par les aichi virus entraîne une gastro-entérite aiguë avec les symptômes suivants : diarrhées, douleurs abdominales, nausées, vomissements, fièvre (Drexler et al., 2011 ; Reuter et al., 2011). L'incidence de ce virus est assez faible (0,9% en pédiatrie en France) (Ambert-Balay et al., 2008).

Les aichi virus sont retrouvés peu fréquemment dans les selles de patients atteints de diarrhées (0 à 3%), mais une haute séroprévalence (80 à 95%) est observée à l'âge de 30-40 ans ce qui indique que ce virus circule communément et infecte les individus (Reuter et al., 2011).

1-5-3-3 TIAC

Les aichi virus ont été retrouvés dans l'environnement au Japon. Les aichi virus (majoritairement de génotype A) sont présents dans 100% des échantillons d'eaux usées non traitées ainsi que dans 92% des échantillons après leur traitement, et dans 60% des échantillons d'eaux de rivières, avec des charges virales élevées particulièrement en hiver et au printemps (Kitajima et al., 2011 ; Kitajima et al., 2013). Les aichi virus ont également été détectés au Venezuela dans 5 des 11 échantillons de rivières, polluées par le rejet d'eaux usées (Alcala et al., 2010).

Les aichi virus sont impliqués dans la survenue de TIAC, principalement reliées à la consommation de coquillages et d'huitres. Ainsi, l'analyse rétrospective de 268 selles de patients de 37 épidémies de gastro-entérites au Japon a mis en évidence l'implication des aichi virus dans douze épidémies (dont 11 dues au génotype A), avec 55% des selles des 99 patients impliquées dans ces 12 TIAC positives pour aichi virus ; 11/12 TIAC sont associées à la consommation d'huitres (Yamashita et al., 2000). En France en 2006, la consommation d'huitres après une contamination du bassin de production a entraîné une TIAC de grande ampleur (205 personnes touchées), avec 50% des selles analysées positives pour les aichi virus (Le Guyader et al, 2008). Parmi 110 épidémies de gastro-entérites survenues en France entre janvier 2006 et avril 2007, six ont pour agent les aichi virus (principalement de génotype A), toujours retrouvé en combinaison avec un autre agent infectieux, dont cinq sont reliées à la consommation d'huitres, et la dernière à d'autres types de coquillages (Ambert-Balay et al., 2008).

Ainsi, les aichi virus sont retrouvés dans les eaux environnementales et sont à l'origine de TIAC principalement reliées à la consommation de coquillages.

1-5-4 Rotavirus

1-5-4-1 Description

Les rotavirus tirent leur nom de leur aspect en forme de roue, observé en microscopie électronique (Flewett et al., 1974). Le genre Rotavirus appartient à la famille des *Reoviridae*.

Il est constitué de 7 sérogroupes, les rotavirus A à G, dont les rotavirus A, B et C infectent les humains, majoritairement le groupe A.

Les particules virales matures sont non enveloppées, d'environ 100 nm de diamètre et possèdent trois couches protéiques concentriques, composée d'une capsid interne (« core ») icosaédrique, d'une capsid intermédiaire et d'une capsid externe (Estes and Cohen, 1989 ; Mathis et al., 2010). Les particules virales matures composées des trois couches protéiques sont appelées TLP (triple-layered particle), les particules virales dénuées de la couche protéique la plus externe sont appelées DLP (double-layered particle), celles à qui il manque les deux couches externes sont appelées SLP (single-layered particle), les DLP et SLP étant non infectieuses (Jayaram et al., 2004).

Le génome viral consiste en 11 segments d'ARN double brin (Figure 5), classés par taille, allant de 667 à 3302 nt, pour une taille complète de 18522 nt, et chaque segment code pour une protéine virale, excepté le segment 11 qui code pour deux protéines différentes (Estes and Cohen, 1989 ; Hoshino and Kapikian, 2000 ; Jayaram et al., 2004). Chacun des segments est constitué d'une ORF encadrée par un 5' et un 3' NTR plus ou moins conservé (Estes and Cohen, 1989). A l'extrémité 5' se trouve une coiffe de guanidine (Estes and Cohen, 1989).

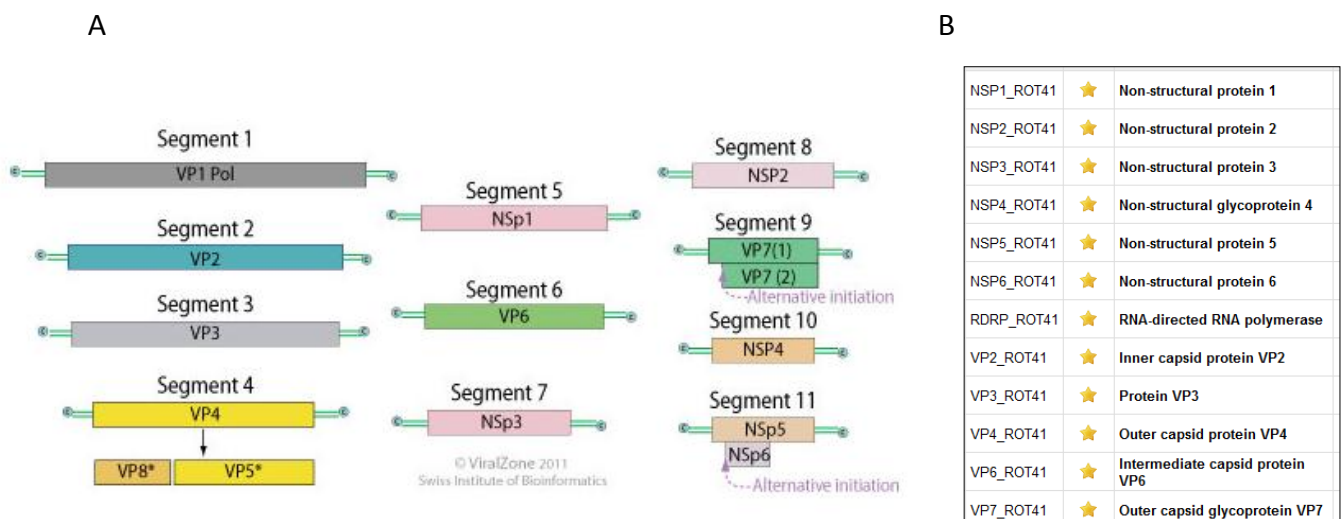


Figure 5 : A : Organisation génomique des rotavirus A (ViralZone) ; B : Liste des protéines virales de la souche humaine rotavirus A (isolate B4106)) (UniProtKB)

Les 12 protéines codées par les 11 segments de rotavirus sont réparties en 6 protéines structurales (VPs) et 6 protéines non structurales (NSPs) (Jayaram et al., 2004). Les protéines

structurales sont impliquées dans le cycle viral infectieux depuis l'entrée du virus dans la cellule jusqu'à la formation d'un transcrit initial ; les protéines non structurales coordonnent ensuite les étapes de la réplication du génome, son encapsidation, l'assemblage de la capsid, jusqu'à la lyse cellulaire (Hu et al., 2012).

VP1 est une ARN-polymérase-ARN-dépendante (RdRp) (Valenzuela et al., 1991).

VP2 est une protéine structurale majoritaire de la couche capsidique la plus interne, elle encapside l'ARN viral, VP1 et VP3 et interagit avec VP6 (Estes and Cohen, 1989 ; Jayaram et al., 2004).

VP3 forme avec VP1 un complexe enzymatique et est impliquée notamment dans la formation de la coiffe 5' des ARN viraux (Bican et al., 1982 ; Liu et al., 1988; Jayaram et al., 2004).

VP4 est une protéine structurale, et forme les spicules de la couche de capsid la plus externe. En présence de trypsine, elle est clivée en VP5* et VP8*, ce qui permet d'augmenter l'infectiosité virale, en augmentant la pénétration du virus dans la cellule (Estes and Cohen, 1989). VP4 est immunogène (Shaw et al., 1987 ; Svensson et al., 1987). Elle joue un rôle majeur dans l'attachement et la pénétration cellulaire, le rang d'hôtes et la virulence (Jayaram et al., 2004 ; UniProtKB).

VP6 est une protéine structurale qui forme la couche capsidique intermédiaire (Estes and Cohen, 1989 ; UniProtKB). VP6 est fortement antigénique et est souvent la cible du diagnostic sérologique (Estes and Cohen, 1989). VP6 détermine les sérogroupes A à G, ainsi que les sous-groupes I et II (Hoshino and Kapikian, 2000).

VP7 est une protéine structurale, il s'agit d'une glycoprotéine formant la capsid externe avec VP4 (Estes and Cohen, 1989). Elle est hautement immunogène et induit la formation d'anticorps neutralisants (Estes and Cohen, 1989). Il s'agit de la protéine d'attachement à la cellule (Estes and Cohen, 1989).

NSP1 (=Non-structural RNA-binding protein 53) : son rôle n'est pas très bien défini, il semblerait que cette protéine ne soit pas essentielle à la réplication du virus en culture cellulaire, elle serait impliquée dans la restriction d'hôte, dans la résistance à la réponse innée de l'hôte et dans la suppression de l'apoptose durant la phase précoce de l'infection (Hu et al., 2012).

NSP2 (=Non-structural RNA-binding protein 35) est impliquée dans la formation du viroplasma, la réplication du génome et son encapsidation, en interaction avec NSP5, VP1 et VP2 (Jayaram et al., 2004 ; Hu et al., 2012).

NSP3 (=Non-structural RNA-binding protein 34) reconnaît la séquence 3' des transcrits viraux et facilite ainsi la traduction des ARNm (Jayaram et al., 2004).

NSP4 (=Non-structural RNA-binding protein 28) est une glycoprotéine transmembranaire et est essentielle pour la réplication, la transcription et la morphogénèse du rotavirus ; sa forme excrétée est impliquée dans l'induction de la diarrhée (Hu et al., 2012).

NSP5 (=Non-structural RNA-binding protein 26) : malgré plusieurs rôles potentiels, le seul fermement établi est son interaction avec NSP2 pour la formation des viroplastes. Elle interagit également avec VP1, VP2, NSP6 et de l'ARN double brin indépendamment de sa séquence, et serait donc impliquée dans plusieurs processus tels que la dynamique et la régulation des viroplastes ainsi que la réplication et l'encapsidation du génome viral (Jayaram et al., 2004 ; Hu et al., 2012).

NSP6 : son rôle n'est pas élucidé, elle n'est pas codée par les génomes de toutes les souches de rotavirus (même segment d'ARN que NSP5 mais cadre de lecture décalé), elle serait localisée au niveau du viroplasma (Mattion et al., 1991 ; Graff et al., 2007 ; Hu et al., 2012).

Les rotavirus peuvent être classés en sérogroupes (A à G) et en sous-groupes (I et II) en fonction de VP6 ou en sérotypes / génotypes sur la base des protéines G (VP7) et P (VP4) (Hoshino and Kapikian, 2000). Les protéines G (pour glycoprotéine) et P (pour protéase-sensible) sont immunogènes et permettent un classement en sérotypes grâce à des anticorps neutralisants, ainsi qu'un classement en génotypes sur la base de leur séquences nucléotidiques ; les sérotypes G et P et les génotypes G et P sont en complète concordance (Hoshino and Kapikian, 2000).

En se basant sur un typage des souches selon VP6, le sous-groupe majoritairement retrouvé dans les selles d'enfants en Suède comme en Amérique Centrale est le sous-groupe II (84%) par rapport au sous-groupe I (22%) (Nordgren et al., 2010).

En se basant sur un typage des souches selon VP4 et VP7, les génotypes retrouvés chez des enfants hospitalisés pour des diarrhées au Canada sont les génotypes G1 (89%), G2 (10%) et G4 (1%) (Pang et al. 2004), uniquement du génotype G1 en Finlande (Logan et al., 2006),

majoritairement G4P[8] (38%) et G1P[8] (36,6%) en Albanie (Kota et al., 2014). Les génotypes majoritaires en France sont G1 et G9 d'une part, en association avec P[8] d'autre part (de Rougemont Alexis, 2008).

Un groupe de surveillance européen EuroRotaNet, comprenant 16 laboratoires dans 15 pays européens, a analysé 8879 selles positives en rotavirus, collectées entre 2005 et 2008 pour en réaliser le génotypage G et P. Trente combinaisons de G et P ont été retrouvées, mais 90% des infections ont été causées par les génotypes G1[P8], G2[P4], G3[P8], G4[P8] et G9[P8] (Iturriza-Gomara et al., 2009). Le génotype G1[P8] reste le génotype majoritaire en Europe avec une incidence d'infection de plus de 50% (allant même jusqu'à 62% pendant la saison 2007-2008). Le deuxième génotype majoritaire est le G9[P8] (Iturriza-Gomara et al., 2009). En 2000, 90% des rotavirus circulant dans le monde étaient de génotypes G1, G2, G3 et G4, les autres peu prévalents (G5, G6, G8, G9, G10, G12) étaient détectés dans divers lieux (Hoshino and Kapikian, 2000). Ceci confirme l'émergence en 2004 du génotype G9, qui représentait moins de 5% des souches circulantes avant 2004 (de Rougemont et al., 2008).

De multiples génotypes G et P peuvent co-circuler dans la même région à un temps donné, pouvant entraîner 3,5% d'infections croisées, sachant qu'ils sont capables de réassortiments génétiques ; et leur prévalence peut varier dans le temps et l'espace (Estes and Cohen, 1989 ; Hoshino and Kapikian, 2000 ; Iturriza-Gomara et al., 2009).

1-5-4-2 Pathologie

Les rotavirus sont un des principaux agents viraux de gastro-entérites et sont présents dans le monde entier (Estes and Cohen, 1989). Les symptômes sont diarrhées, crampes abdominales, fièvre, vomissements, maux de tête, déshydratation, perte d'appétit, arthralgie, fatigue, frisson, vertige (Gallay et al., 2006 ; Koroglu et al., 2011 ; Mellou et al., 2014).

Chaque année (voir Figure 6), les rotavirus sont responsables de 111 millions de cas de gastro-entérites chez les enfants de moins de 5 ans (Parashar et al., 2003).

Dans les pays en voie de développement, l'infection à rotavirus est responsable de diarrhées aqueuses pouvant être sévères et persistantes (plusieurs semaines), entraînant selon les estimations de l'OMS en 2008 près de 453 000 décès par an chez les enfants de moins de 5

ans (www.who.int/ith/diseases/rotavirus/en/). Cette mortalité infantile est liée à la déshydratation notamment chez les nouveau-nés et les jeunes enfants, les personnes sous-alimentées et celles dont l'immunité est affaiblie. La mortalité infantile par déshydratation est supérieure dans les pays en voie de développement, pour des raisons de malnutrition et un manque d'accès aux soins (Parashar et al., 2003).

Dans les pays développés, la gravité est moindre en termes de mortalité, cependant la morbidité est responsable d'un coût économique important (nombreuses hospitalisations...).

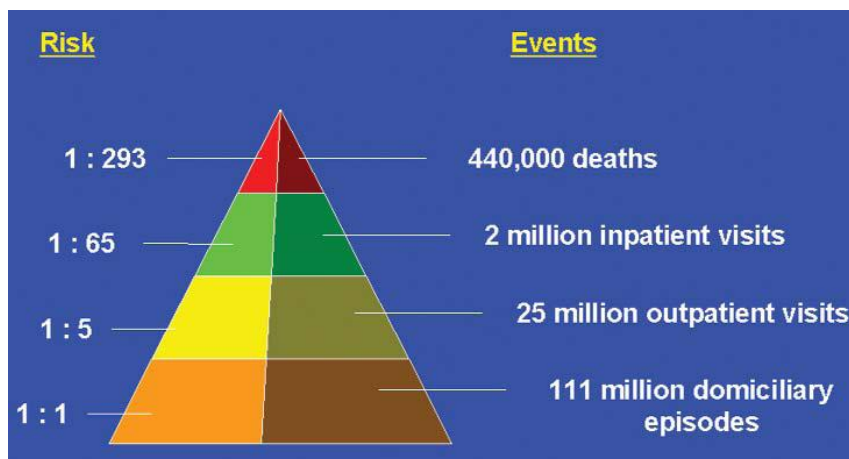


Figure 6 : Estimation de la prévalence globale des maladies à rotavirus (Parashar et al., 2003)

La grande majorité des infections symptomatiques à rotavirus observées dans 21 pays européens et 3 pays caucasiens se retrouve chez les enfants de moins de 2 ans et demi (81,5%), avec un pic entre 6 et 18 mois (Iturriza-Gomara et al., 2009). En Italie, une étude réalisée dans un service hospitalier a montré que le rotavirus est le troisième agent étiologique responsable de gastro-entérite virale quelque soit la classe d'âge (15,5%) mais il est le plus fréquemment retrouvé chez les enfants de moins de cinq ans (24,5%) (Rovida et al., 2013a). Les enfants de moins de 5 ans représentaient 70% des hospitalisations suite à une épidémie en Turquie attribuée au rotavirus (58% des selles analysées positives) (Koroglu et al., 2011). En Albanie, le rotavirus est responsable de gastro-entérites chez 21% des enfants de moins de 5 ans avec une majorité des cas chez les enfants de moins de 2 ans (80,8%) (Kota et al., 2014).

Les infections à rotavirus sont dépendantes de la saisonnalité en Europe, avec cependant quelques variations en fonction des pays ; les infections sont fréquentes en automne, en hiver et au printemps, avec des pics épidémiques observés entre février et avril pour les saisons 2005-2006, 2006-2007 et 2007-2008 (Iturriza-Gomara et al., 2009).

L'OMS recommande la vaccination contre les rotavirus des enfants le plus tôt possible à partir de l'âge de six semaines, dans le monde entier et particulièrement dans les pays d'Asie du Sud et du Sud-Est et d'Afrique Sub-saharienne. Deux vaccins oraux (souches vaccinales atténuées) sont disponibles : Rotarix™ et RotaTeq™. Leur impact significatif en santé publique a été montré avec une diminution du nombre d'hospitalisations liées à une gastro-entérite aux USA, et une diminution de 50% des décès dus aux diarrhées à Mexico (www.who.int/immunization/topics/rotavirus/en/).

1-5-4-3 TIAC

Les TIAC à rotavirus ont souvent l'eau comme vecteur de transmission. Une étude sur les eaux de surface et les sources d'eau souterraine dans toute la Slovénie (Steyer et al., 2011) a estimé le risque d'une transmission virale par cette voie : 30,3% des échantillons d'eau potable analysés sont positifs, ainsi que 37,5% des échantillons d'eau potable issus des eaux souterraines analysés et 17,3% des eaux de surface. Le génotype majoritaire circulant est le type G1. Toutes ces eaux contaminées et potentiellement utilisées comme sources d'eau potable sont autant de risques de contamination de la population par le rotavirus (Steyer et al., 2011).

En France, en Turquie et en Grèce, trois épidémies de gastro-entérites suite à la consommation d'eau potable ont eu lieu (Gallay et al., 2006 ; Koroglu et al., 2011 ; Mellou et al., 2014). Ces épidémies ont notamment été caractérisées par le très grand nombre de personnes touchées, avec entre 2400 et 2900 malades en France, 9907 malades en Turquie et 3600 malades en Grèce ; le rotavirus de groupe A a été retrouvé par RT-PCR chez 71% des patients en France (souche de génotype G1P[8]), 87% des patients en Turquie et 84,4% des patients en Grèce (souches commune G3P[8] et rare G2P[8]) (Gallay et al., 2006 ; Koroglu et al., 2011 ; Mellou et al., 2014). Au cours de l'épidémie en France, le fait de boire l'eau potable augmentait de trois fois le risque d'être malade ; en Grèce, la consommation de

l'eau potable a été significativement reliée au risque de développer la maladie (Gallay et al., 2006 ; Mellou et al., 2014). Dans les trois cas, la source d'eau avait été contaminée par des matières fécales et un défaut de traitement au chlore a été mis en évidence en France et en Turquie ; les épidémies se sont résolues à partir du moment où des mesures sanitaires ont été mises en place (Gallay et al., 2006 ; Koroglu et al., 2011 ; Mellou et al., 2014).

La consommation de coquillages peut également être une source de contamination par les rotavirus. En France en 2006, une TIAC impliquant plusieurs virus dont des rotavirus a été déclarée suite à la consommation de coquillages dont le bassin de production avait été contaminé fécalement. Des souches de rotavirus de génotypes G1P[8] et G9P[8] ont été identifiées par RT-PCR dans 17% des selles des malades analysées et dans les coquillages incriminés. Des rotavirus ont pu être détectés dans 15 échantillons prélevés au cours des quatre semaines suivant la contamination du bassin (Le Guyader et al, 2008).

Ainsi, les TIAC à rotavirus sont essentiellement reliées à la consommation d'eau ou de coquillages contaminés.

1-5-5 Astrovirus

1-5-5-1 Description

Les astrovirus humains appartiennent à la famille des *Astroviridae*. Ce sont des virus non enveloppés, de petite taille et de structure ronde, avec une capsidie icosaédrique. Leur génome est constitué d'un brin unique d'ARN de polarité positive (voir Figure 7).

La famille des *Astroviridae* a été subdivisée en 2002 par l'ICTV en deux genres : les Mamastrovirus qui infectent les animaux (dont l'astrovirus humain) et les Avastrovirus qui infectent les oiseaux.

Le génome des astrovirus est constitué d'un ARN génomique de 6797 nt organisé en trois ORF (1a, 1b, 2) (Jiang et al., 1993). Les ORF1a et ORF1b codent pour la protéase virale et la polymérase virale respectivement. L'ORF2 située en 3' terminus du génome code pour le précurseur de la protéine de capsidie (Wilhelmi et al., 2003).

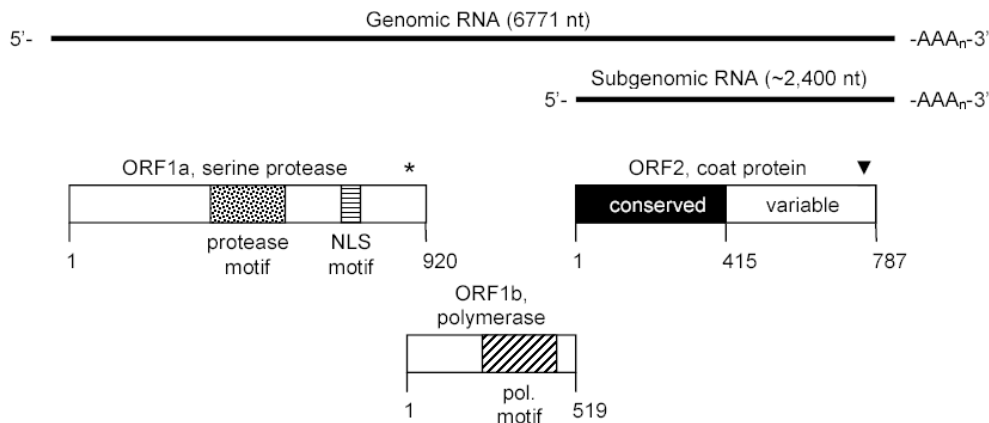


Figure 7 : Organisation génomique des astrovirus (exemple de l'astrovirus humain de type 1 (HAstv-1)) (Krishna, 2005)

Les astrovirus peuvent être classés en sérotypes ou en génotypes. La classification en génotypes est basée sur l'analyse d'une séquence de 348 nt dans la région ORF2, et cette classification est en assez bonne corrélation avec la classification par sérotypes. Huit génotypes sont ainsi décrits, et le génotype 1 est le plus prévalent (Wilhelmi, 2003).

1-5-5-2 Pathologie

Les astrovirus sont responsables de gastro-entérites, principalement chez les enfants. Cependant, il semble que la majorité des infections à astrovirus soient asymptomatiques (Le Cann et al., 2004).

Une étude sur des patients atteints de gastro-entérite a été menée par Van Maarseveen et al., 2010. Elle révèle que sur 239 échantillons de selles, 6% étaient positives pour les astrovirus. De plus, sur 1570 échantillons fécaux analysés, 69% des échantillons positifs pour les astrovirus ont été retrouvés chez des enfants de moins de cinq ans. Enfin, des astrovirus ont été détectés en présence de NoV GII ou adénovirus. Une autre étude sur des selles de patients atteints de gastro-entérites dans un hôpital en Italie révèle la détection des astrovirus humains dans 2,5% des cas (Rovida et al., 2013a).

1-5-5-3 TIAC

Les astrovirus se retrouvent dans les eaux environnementales et sont impliqués dans des TIAC suite à la consommation de coquillages et d'eau.

En France, les astrovirus ont été détectés dans des eaux usées avant et après leur traitement (prélèvements effectués pendant un an dans une station d'épuration), indiquant que le traitement des eaux usées n'est pas suffisamment efficace pour éliminer le virus (Le Cann et al., 2004).

En France, une étude a montré que 10,3% des échantillons d'eaux environnementales et 1,5% des échantillons d'eau potable sont positifs pour les astrovirus, et que la présence d'ARN d'astrovirus dans les eaux est significativement associée à un risque supérieur de problèmes digestifs (Gofti-Laroche et al., 2003).

Les astrovirus ont été associés à 1% des épidémies d'origine hydrique en Angleterre et au Pays de Galles entre 1992 et 2003 (Smith et al., 2006).

En France, en 2006, l'implication des astrovirus dans une TIAC ayant pour origine la consommation d'huitres a été montrée avec la mise en évidence des astrovirus dans 25 % des selles de patients ainsi que dans 94% et 78% des échantillons de fruits de mers prélevés respectivement une et deux semaines après l'épisode de TIAC (Le Guyader et al., 2008).

Ainsi, même si l'importance des astrovirus dans les gastroentérites virales semble moindre que celle des norovirus, les astrovirus ont été incriminés dans des épisodes de TIAC suite à la consommation d'eau et de fruits de mer.

1-5-6 Adénovirus entériques

1-5-6-1 Description

Les adénovirus appartiennent au genre Mastadenovirus au sein de la famille *Adenoviridae*. Leur génome est constitué d'ADN double brin linéaire. Les adénovirus sont des particules d'un diamètre de 60 à 90 nm, sans enveloppe, dont la capsid est formée de 252 capsomères (240 hexons et 12 pentons).

Le génome d'ADN double brin, de 26 à 45kb environ, code pour une quarantaine de protéines, dont les protéines de la capside, les protéines de cores et les protéines nécessaires au cycle viral infectieux (Figure 8).

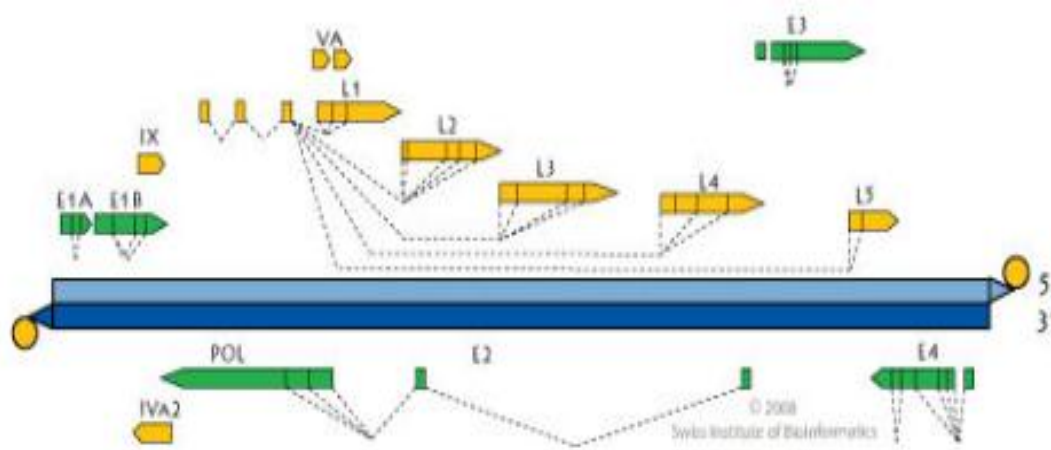


Figure 8 : Organisation génomique (exemple de l'adénovirus humain de type 5) (ViralZone)

1-5-6-2 Pathologie

Les adénovirus humains sont responsables de pathologies respiratoires, ophtalmiques et entériques. Les adénovirus humains sont subdivisés en six sous-groupes (A à F) comprenant 51 sérotypes. Le sous-groupe F comprend deux sérotypes 40 et 41, qui sont très proches génétiquement, et qui sont impliqués dans des pathologies entériques (Uhnou et al, 1984). Les adénovirus des sérotypes 40 et 41, appelés adénovirus entériques, sont responsables de gastro-entérites aiguës, surtout chez les enfants. Considéré comme un pathogène émergent, il a été ajouté à la liste « Candidate contaminant List (CCL3 et 4) » de l'«US Environmental Protection Agency» en 2004.

La période d'incubation est de 3 à 10 jours, et les symptômes sont notamment fièvre, diarrhées, vomissements, douleurs abdominales et possiblement des symptômes respiratoires. L'infection dure environ 10 jours.

Lors d'une étude réalisée dans un hôpital, Rovida et al., (2013a) ont démontré que les adénovirus entériques étaient les premiers agents responsables de gastro-entérites avec 17,5% des cas qui leur étaient attribués. Ils sont détectés tout au long de l'année mais plus fréquemment sur les périodes d'octobre-novembre et janvier-février.

1-5-6-3 TIAC

Les adénovirus ont été détectés dans des eaux usées dans le monde entier (Mena and Gerba, 2009). Ils ont notamment été détectés dans des eaux usées, des eaux de rivières et des eaux de mer en Espagne (Pina et al., 1998), dans des eaux usées en sortie de station d'épuration en Suisse (Masclaux et al., 2013), dans 99% des échantillons d'eaux usées après traitement et 100% de leurs effluents au Japon (Katayama et al., 2008). En Italie, ils ont été détectés dans 96% des échantillons d'eaux usées avant traitement mais également dans 76% des échantillons des effluents des STEP (La Rosa et al., 2010a).

Une étude réalisée dans des chaînes de production de baies (en Finlande, Serbie, Pologne et République Tchèque) par Maunula et al (2013) a montré la présence d'adénovirus entériques humains dans 6 à 10% des échantillons d'eaux d'irrigation ainsi que sur les mains du personnel manipulant les fruits. Aux points de ventes, la prévalence du virus était de 0,7% à 3% sur les fraises et framboises congelées ou non.

Les adénovirus sont parfois impliqués dans des toxi-infections alimentaires collectives, à l'origine d'épidémies de gastro-entérites aux Pays-Bas par exemple (Svraka et al, 2007).

Ainsi, les adénovirus entériques sont retrouvés dans les eaux environnementales et peuvent contaminer les fruits et légumes pendant leur irrigation.

1-5-7 Picobirnavirus

1-5-7-1 Description

Découvert chez le rat en 1988, ce virus a été appelé picobirnavirus, de « pico » car il est de petite taille (virion de 35 nm) et « birna » car son génome est un ARN double brin (Pereira et al., 1988). Il appartient à la famille *Picobirnaviridae*, composée d'un seul genre Picobirnavirus, avec deux espèces : picobirnavirus humain et lapin (Fregolente and Gatti, 2009). Il s'agit d'un virus non enveloppé.

Son génome (Figure 9) est constitué de deux segments, un grand segment (2,2 à 2,7kb) codant pour deux ORF, la première codant pour un précurseur de la capsid (la deuxième n'est pas encore caractérisée), et un petit segment (1,2 à 1,9kb) avec une seule ORF codant pour l'ARN polymérase ARN dépendante (RdRp) (Rosen et al., 2000 ; Wakuda et al., 2005).

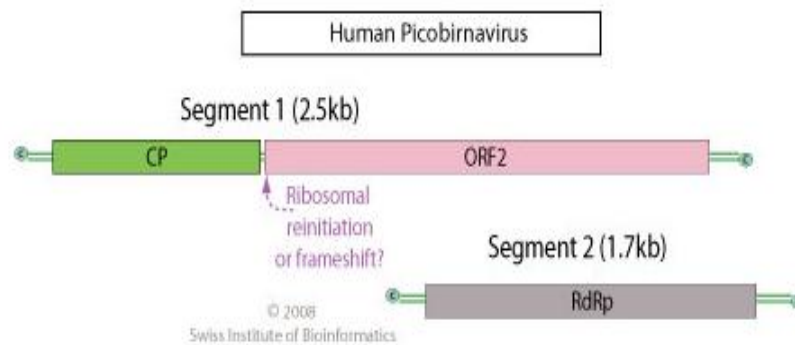


Figure 9 : Organisation génomique de picobirnavirus (ViralZone)

Deux génogroupes (GI et GII) sont décrits sur la base de la séquence de la RdRp (Fregolente and Gatti, 2009).

1-5-7-2 Pathologie

Le picobirnavirus a été détecté dans les selles d'animaux ou d'humains, présentant ou non une diarrhée, parfois en présence d'autres agents pathogènes entériques, et est ainsi qualifié de virus opportuniste (Gallimore et al. 1995 ; Rosen et al., 2000 ; Bányai et al., 2003 ; Fregolente et al. 2009). Les picobirnavirus sont excrétés dans les selles pendant une longue période (45 jours à 7 mois) (Kapusinszky et al., 2012).

Le picobirnavirus est cependant détecté comme virus majoritaire dans les selles de personnes venant du Vénézuéla, de la Chine, des USA et de l'Argentine (Rosen et al., 2000). Il a été identifié dans des échantillons provenant de deux épidémies de gastro-entérite dans des maisons de retraite en Floride (Rosen et al., 2000), comme unique agent pathogène chez des patients atteints de gastro-entérites (Cascio et al., 1996), ainsi que chez 20% de patients hollandais avec des gastro-entérites (picobirnavirus GI) (Van Leeuwen et al., 2010). Sa prévalence au Royaume Uni est estimée entre 9 et 13% (Gallimore et al. 1995).

1-5-7-3 TIAC

Les picobirnavirus ont été détectés dans des eaux usées (Hamza et al., 2011a). Ils sont classés dans la classe des « virus potentiellement transmis par voie hydrique » (Leclerc et al., 2002).

1-5-8 Bocavirus

1-5-8-1 Description

La famille des *Parvoviridae* est subdivisée en deux sous-familles, les *Densinovirinae* infectant les arthropodes et les *Parvovirinae* infectant les oiseaux et les mammifères. Au sein de la sous-famille *Parvovirinae*, cinq genres sont décrits, dont les Bocavirus. Le bocavirus humain a été récemment découvert dans des prélèvements respiratoires (naso-pharyngaux) de jeunes suédois. Le bocavirus humain (HBoV) est la deuxième espèce virale de la sous-famille *Parvovirinae* connue pour être pathogènes pour les humains, après le parvovirus B19 (Allander et al., 2005).

Les bocavirus humains sont des virus à ADN simple brin, non enveloppés.

La taille de son génome est d'environ 5,3kb, et comprend trois ORF (voir Figure 10), deux codant pour deux protéines non structurales (NS1 et NP1) et une ORF codant pour deux protéines structurales (VP1 et VP2) (Allander et al., 2005).

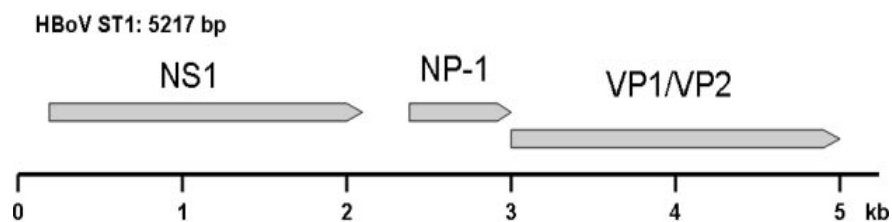


Figure 10 : Organisation génomique de HBoV
(Allander et al., 2005)

1-5-8-2 Pathologie

La transmission est féco-orale et aérienne. Le HBoV est retrouvé dans des échantillons respiratoires de patients hospitalisés pour des troubles respiratoires (Allander et al. (2005). La première étude décrivant la présence de HBoV dans des selles d'enfants présentant une gastro-entérite a identifié ce virus comme étant le seul pathogène et donc le seul responsable de la pathologie (Vicente et al., 2007). Depuis, trois autres espèces de bocavirus humains ont été décrites : HBoV2 (Kapoor et al., 2009 ; Arthur et al., 2009), HBoV3 (Arthur et al., 2009) et HBoV4 (Kapoor et al., 2010). La séquence génomique de HBoV2 varie de 23% par rapport à celle de HBoV, tandis que celle de HBoV3 varie de 18% par rapport à celles de HBoV et HBoV2 (Arthur et al., 2009).

Le bocavirus humain associé le plus souvent aux symptômes de gastro-entérites est le HBoV2 (Arthur et al., 2009) et est plus rarement détecté dans les échantillons respiratoires. Une étude sur des patients atteints de gastro-entérites a démontré que le bocavirus humain était impliqué comme agent pathogène dans 2% des cas de gastro-entérites à l'hôpital (Rovida et al., 2013a). HBoV est fréquemment détecté dans les selles d'enfants et d'adultes malades ou sains, ce qui suggère l'idée que la période de relargage du virus est longue et qu'il y ait de fréquentes réinfections, souvent en co-infections (Kapoor et al., 2010).

Des données épidémiologiques indiquent une infection précoce par le virus, avec une séroprévalence de 90% à l'âge de 5 ans (Endo et al., 2007). HBoV a été détecté dans des échantillons cliniques et/ou environnementaux dans toutes les régions du globe : Europe (Allander et al., 2005 ; Kapoor et al., 2009 ; Hamza et al., 2009 ; Vicente et al., 2007), Asie (Kapoor et al., 2009 ; Endo, 2007 ; Kapoor et al., 2010), Afrique (Kapoor et al., 2010), Australie (Arthur et al., 2009), Amérique (Kapoor et al., 2010). Les différentes espèces de HBoV semblent avoir une distribution mondiale (Kapoor et al., 2010).

1-5-8-3 TIAC

A ce jour, les bocavirus n'ont pas été identifiés comme étant à l'origine de TIAC. Leur forte présence dans les eaux environnementales suggère la nécessité d'une surveillance accrue pour ces virus. La détection de HBoV2 dans des selles et non dans les tissus respiratoires a permis d'émettre l'hypothèse d'une répllication entérique et d'une dissémination du virion *via* les selles (Vicente et al., 2007). La dissémination du virus est effectué *via* l'eau, avec par exemple une détection des HBoV dans le Rhin et la Rhur (Allemagne) dans 40,8% des échantillons collectés (Hamza et al., 2009). Aux USA, les HBoV ont été retrouvés dans 81% des échantillons d'eaux usées testés (HBoV1-2-3) (Blinkova et al, 2009). Ce haut niveau de détection a été possible car la particule virale est très stable dans l'environnement (Hamza et al., 2009).

1-6 Virus responsables d'hépatites

1-6-1 Virus de l'hépatite A (VHA)

1-6-1-1 Description

Le virus de l'hépatite A (VHA) appartient à la famille des *Picornaviridae* et est classifié dans le genre *Hepatovirus*. Il s'agit d'un virus non enveloppé et constitué d'une capsidie icosaédrique. Son génome d'environ 7500 nt est constitué d'un ARN monocaténaire à polarité positive.

Il est constitué de deux régions non codantes situées aux extrémités 5' et 3' NTR, ainsi que d'une unique ORF comprenant la région P1, codant pour les protéines structurales VP1, VP2 et VP3 (VP4 putative), qui constituent la capsidie, et les régions P2 et P3, codant pour des protéines non structurales impliquées dans la réplication du virus (voir Figure 11), notamment la protéine 3B, aussi appelée VPg, qui se lie au 5'NTR et joue probablement un rôle d'amorce pour la synthèse d'ARN ; la protéine 3C est une protéase ; la protéine 3D est une RNA-polymérase-RNA-dépendant (RdRp) (Cristina and Costa-Mattioli, 2007).

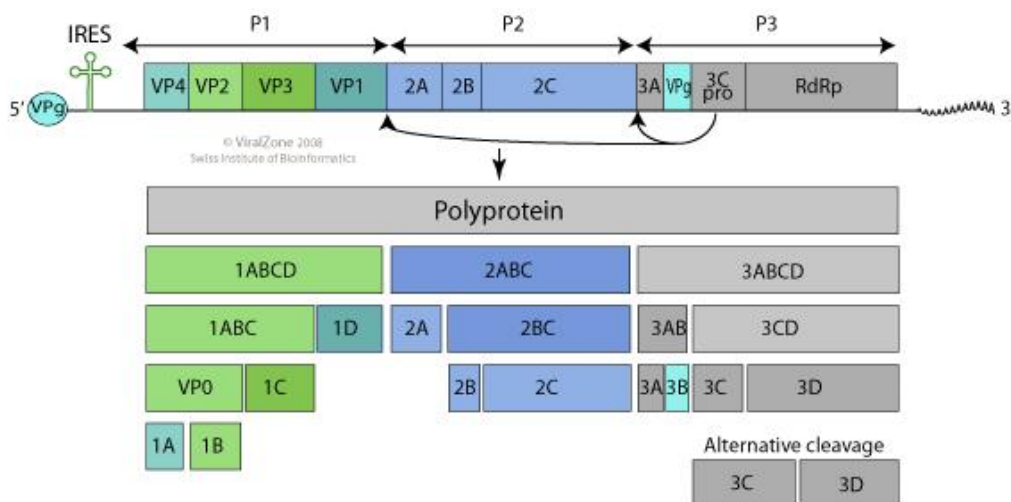


Figure 11 : Organisation génomique de VHA (ViralZone)

Un seul sérotype de VHA a été identifié mais plusieurs génotypes sont décrits. Le génotypage basé sur la séquence de la jonction VP1-2A a permis de distinguer 7 génotypes (Robertson et al., 1992), les génotypes I, II, III et VII infectant les humains, et les génotypes IV, V et VI les

singes. Plus récemment, Costa-Mattioli et al. (2002) et Lu (2004) ont proposé une nouvelle classification basée sur l'analyse complète des 900 nt de la séquence de la protéine VP1 : les génotypes I et III sont chacun divisés en deux sous-génotypes A et B, tandis que les anciens génotypes II et VII sont regroupés en sous-génotypes IIA et IIB respectivement.

Les différents génotypes de VHA ont une distribution géographique différente (Nainan et al., 2006) et le sous-génotype IA est majoritairement prévalent dans le monde (Figure 12).

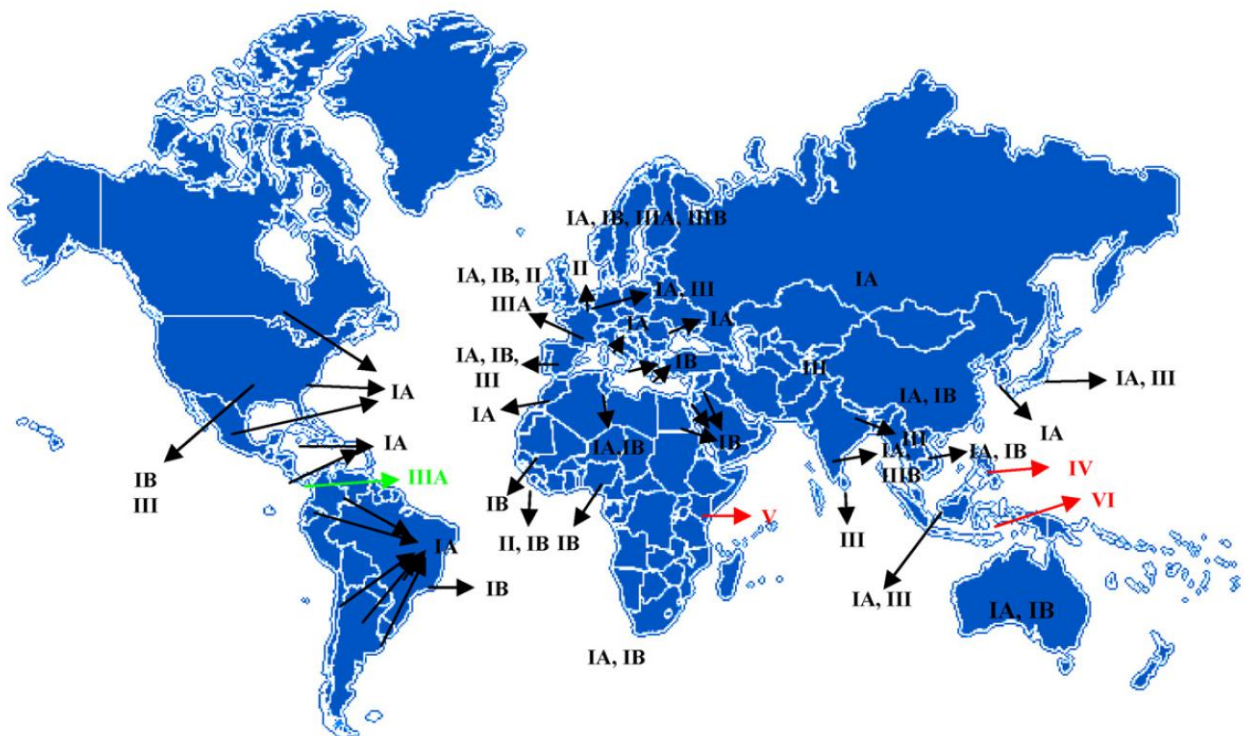


Figure 12 : Distribution géographique des génotypes de VHA (en noir, les génotypes isolés chez les humains, en rouge ceux isolés chez les singes, en vert la souche PA21, d'abord identifiée chez le singe mais étant une souche humaine) (Cristina and Costa-Mattioli, 2007)

En France, les génotypes majoritaires retrouvés sont les génotypes IA, IB et IIIA, mais des souches de sous-génotypes IIA sont également régulièrement identifiées (Roque-Afonso et al., 2010) (voir Figure 13).

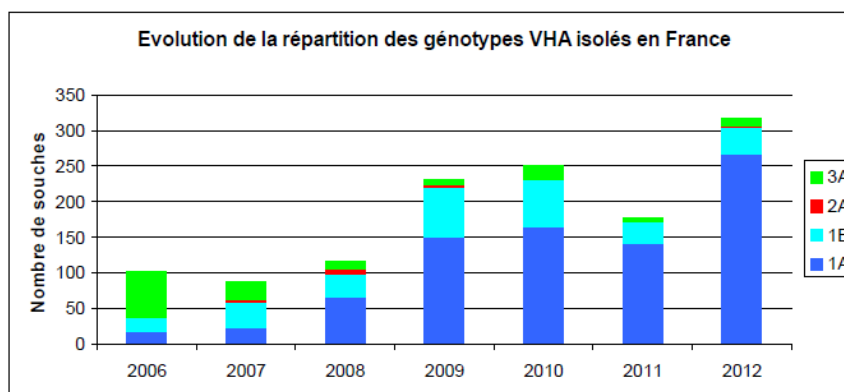


Figure 13 : Evolution de la répartition des génotypes de VHA en France (Rapport annuel d'activité 2012 du CNR VHA/VHE, disponible sur www.cnrvha-vhe.org/)

Le phénomène de recombinaison est, avec les mutations ponctuelles, un des moyens d'évolution des souches du VHA. La recombinaison nécessite la co-circulation de souches dans une ère géographique donnée, ainsi qu'une co-infection des cellules hôtes. Des co-circulations de souches de sous-génotypes IA et IB ont été observées en Afrique du Sud, en Amérique du Sud et du Nord et en Europe ; des co-circulations de souches de génotypes IA et IIIA ont été observées en Inde (Cristina and Costa-Mattioli, 2007). Des recombinaisons entre souches d'un même sous-génotype (entre deux souches de sous-type IA ou entre deux souches de sous-type IIIA) ont été décrites (Belalov et al., 2011) ; des recombinaisons entre souches d'un même génotype (entre une souche de sous-type IA et une souche de sous-type IB) ont été rapportées (Liu et al., 2009 ; Belalov et al., 2011). La souche 9F94 semble issue d'une recombinaison entre deux souches de génotypes différents (IB et IIB) au niveau de VP1 (Costa-Mattioli et al., 2003a).

1-6-1-2 Pathologie

Le nombre de cas d'hépatites A survenant chaque année dans le monde est estimé à environ 1,5 million (Franco et al., 2012). Le taux d'incidence de l'hépatite A est fortement relié au niveau socio-économique et aux conditions sanitaires des pays (Jacobsen and Wiersma, 2010). Les régions à faibles revenus (Afrique Sub-saharienne et une partie de l'Asie du Sud) ont un niveau d'endémicité élevé, avec un taux de séroprévalence proche de 90% avant l'âge de 10 ans ; les régions à revenus moyens ont des niveaux d'endémicité du VHA faibles

ou intermédiaires ; les régions à hauts revenus (Europe de l'Ouest, Australie, Nouvelle-Zélande, Canada, USA, Japon, République de Corée et Singapour) ont un taux d'endémicité du VHA très faible. Dans les pays développés le taux de séroprévalence est faible ce qui augmente le risque d'épidémies dans des populations adultes où la maladie est plus sévère (Jacobsen and Wiersma, 2010).

Le virus de l'hépatite A est responsable d'hépatite aiguë. La sévérité des symptômes augmentent avec l'âge : 70% des infections chez les enfants de moins de 6 ans sont asymptomatiques, tandis que 70% des infections chez les adultes entraînent une jaunisse (Nainan et al., 2006).

La période d'incubation est comprise entre 15 et 50 jours, avec une moyenne de 30 jours. Le virus de l'hépatite A a un tropisme hépatique, il se réplique dans le foie puis se dissémine dans le sang, et est excrété dans l'urine et les selles des personnes infectées ; les selles peuvent contenir jusqu'à 10^9 virions infectieux par gramme (Nainan et al., 2006). Le tableau clinique typique présente une semaine de symptômes de type grippe et gastro-entérite (malaise, fièvre, douleurs abdominales, anorexie, nausées, vomissements, urines noires), suivie par plusieurs semaines de jaunisse, puis plusieurs semaines de convalescence (Nainan et al., 2006 ; Jacobsen and Wiersma, 2010). Les hépatites A fulminantes (insuffisance hépatique aiguë) restent relativement rares, de même que les décès (0,015 à 0,5%) (Nainan et al., 2006). Il n'y a pas de traitement spécifique contre le virus de l'hépatite A mais un traitement visant à réduire l'importance des symptômes, c'est-à-dire améliorer le confort des patients et remplacer les pertes liquidiennes suite aux vomissements et diarrhées (www.who.int/mediacentre/factsheets/fs328/fr/).

En France, 900 à 1500 cas d'hépatite A ont été déclarés chaque année entre 2006 et 2013 (www.invs.sante.fr/Dossiers-thematiques/Maladies-infectieuses/Hepatites-virales/Hepatite-A/Donnees-epidemiologiques).

Depuis décembre 2005, l'hépatite A est une maladie à déclaration obligatoire en France, devant être notifiée par le médecin ou le laboratoire d'analyses à l'Agence régionale de santé (ARS), permettant de lancer une investigation si nécessaire autour du cas et de mettre en place les mesures de prévention si nécessaire (www.invs.sante.fr/Dossiers-thematiques/Maladies-infectieuses/Hepatites-virales/Hepatite-A/Points-d-actualite).

En France, le taux d'incidence d'hépatite A varie selon les départements de 0 à 13 cas d'hépatite A déclarée / 100 000 habitants (données INVS, voir Figure 14).

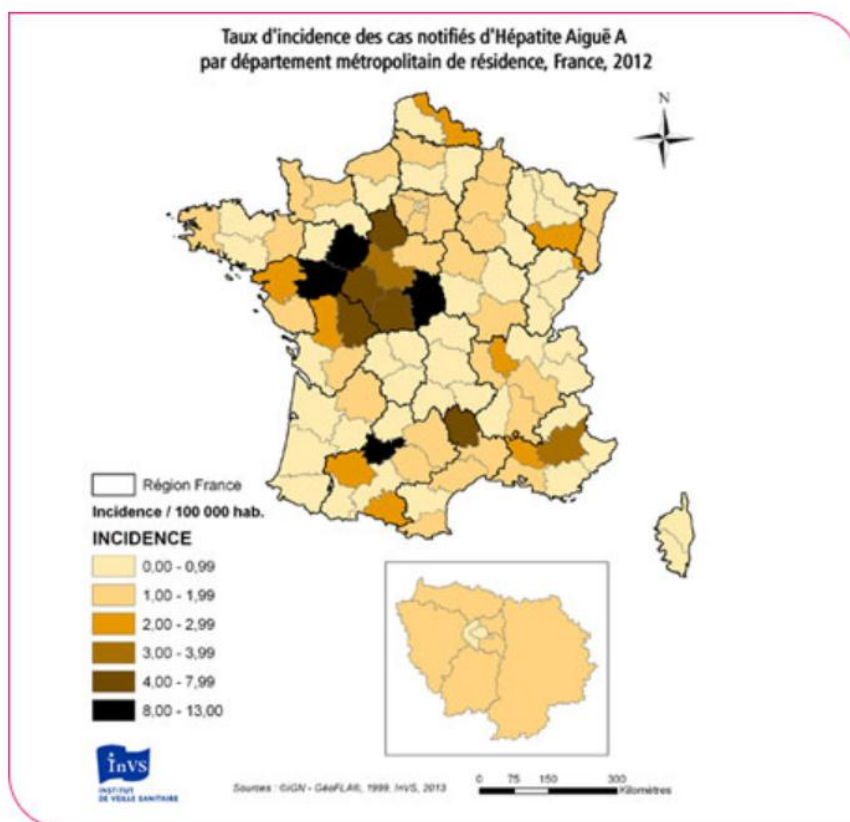


Figure 14 : Taux d'incidence des cas notifiés d'hépatite A aiguë par département métropolitain de résidence, France, 2012 (www.invs.sante.fr/Dossiers-thematiques/Maladies-infectieuses/Hepatites-virales/Hepatite-A/Points-d-actualite)

Depuis 1992, des vaccins sont disponibles mais sont sous-utilisés (FitzSimons et al., 2010). Deux vaccins sont disponibles en France (Havrix et Avaxim). Ils sont fortement immunogènes et confèrent une protection d'au moins 15 ans suite aux deux injections nécessaires (avec un intervalle de 6 à 12 mois). Les pays ou régions ayant suivi une politique de vaccination (USA, Israël, Catalogne en Espagne) ont observé un impact positif sur l'incidence de l'hépatite A (FitzSimons et al., 2010). Afin de réduire significativement l'impact de l'hépatite A, l'OMS recommande un usage optimal de la vaccination, qui dépend du niveau d'endémicité des pays (World Health Organization, 2000). Dans les pays fortement endémiques, la vaccination préventive n'est pas recommandée, car les infections asymptomatiques survenant chez les

enfants de moins de 5 ans leur confèrent une immunité de longue durée (Vaughan et al., 2013a). Dans les pays de moyenne endémicité, la vaccination à grande échelle des enfants est considérée comme bénéfique. Enfin, dans les pays à faible endémie, la vaccination est recommandée pour les individus à risque, comme les voyageurs se rendant dans des régions endémiques (World Health Organization, 2000).

1-6-1-3 TIAC

La transmission du virus de l'hépatite A peut être directe (interhumaine) ou indirecte. Dans les pays industrialisés, 10 à 15% des cas d'hépatite A sont observés chez les voyageurs de retour de zone d'endémie (Maroc, Pakistan, Egypte...) (Costa-Mattioli et al., 2003b ; Tjon et al., 2007). Il existe aussi des risques de transmission du VHA par voie sexuelle dans les communautés homosexuelles et par voie parentérale lors de l'utilisation de produits sanguins labiles ou d'aiguilles contaminées pour la consommation de drogues illicites (Nainan et al., 2006 ; Tjon et al., 2007).

Enfin, la transmission du virus peut être liée à l'ingestion d'eaux ou d'aliments contaminés. Aux Pays-Bas, une étude sur 2 ans a montré l'importance de réaliser le génotypage des souches du VHA dans les serum de patient pour mieux évaluer la part de la transmission par la voie alimentaire (Petrignani et al., 2014).

Aux USA, la contamination de l'eau par le VHA a été à l'origine de dix-huit épidémies ayant touché 757 personnes dans les années 50, vingt-neuf épidémies ayant touché 896 personnes dans les années 60, seize épidémies dans les années 70, onze épidémies dans les années 80 et deux épidémies entre 1991 et 2002 (Leclerc et al., 2002).

Les principaux aliments incriminés dans les cas de TIAC sont les coquillages, les fruits et les végétaux consommés crus. Le système d'alertes RASFF (Rapid Alert System for Food and Feed) mis en place pour signaler les problèmes relatifs aux produits agroalimentaires dans l'Union européenne a notifié en 2013 cinq TIAC imputées au VHA ayant pour origine des moules, des huitres et des baies surgelées. En France dans une école en 2006, une TIAC comprenant 10 cas primaires et 5 cas secondaires d'infections a été causée par une souche de VHA IB suite à la consommation de pâté de foie (Schwarz et al., 2008). Egalement, en France, une épidémie touchant 111 personnes en 2007 a été imputée à la consommation de coquillages crus (huitres) contaminés par la même souche de VHA IIIA que celle retrouvée

chez les patients (Guillois-Bécel et al., 2009). En Espagne, une TIAC ayant affecté 183 personnes a été reliée à la consommation de coquillages, avec 75% des coquillages analysés positifs pour le VHA (Bosch et al., 2001).

Récemment, le VHA a été à l'origine de TIAC de grande ampleur, véhiculé par des fruits (tomates séchées et fruits rouges congelés). Des tomates séchées ont été la source d'épidémies d'hépatite A entre 2009-2010 dans trois pays (Australie, Pays-Bas, France) et ces épidémies pourraient avoir une origine commune car elles ont été causées par des souches de génotype IB hautement similaires (Anonymous, 2009 ; Gallot et al., 2011 ; Pettrignani et al., 2014). En 2012-2013, une TIAC a touché des individus dans plusieurs pays (Danemark, Finlande, Norvège et Suède), trois souches ont été identifiées, appartenant au génotype VHA IB et étant très proches (avec un maximum de différence nucléotidique de 2%), le véhicule alimentaire n'est pas connu mais serait dû à la consommation de fraises congelées (Gillesberg Lassen et al., 2013). En 2013, une TIAC ayant pour origine des graines de grenade importées de Turquie a touché 162 personnes dans 10 Etats aux USA, la souche identifiée est de génotype IB (www.cdc.gov/hepatitis/outbreaks/2013/A1b-03-31/index). Depuis le 1 janvier 2013, 1315 cas d'hépatite A ont été notifiés par 11 pays européens, au départ tous reliés à un voyage en Italie, mais depuis d'autres cas sans historique de voyage ont été déclarés en France, Allemagne, Irlande, Norvège, Pays-Bas, Suède et Royaume-Uni. L'analyse de 240 échantillons a démontré que la même souche de VHA de sous-génotype IA était en cause. Les investigations tendent à imputer l'origine de cette unique TIAC à la consommation de baies surgelées (European Centre for Disease Prevention and Control and the European Food Safety Authority, 2014).

Ainsi, le VHA est responsable d'hépatite aiguë et est régulièrement impliqué dans des TIAC suite à la consommation de divers aliments.

1-6-2 Virus de l'hépatite E (VHE)

1-6-2-1 Description

Le virus de l'hépatite E (VHE) a été découvert dans les années 1980 comme l'agent des hépatites virales non-A et non-B transmises par voie féco-orale (Wong et al., 1980 ; Khuroo et al., 1980). Il a été classifié en 2004 comme le seul membre du genre *Hepevirus*, dans la famille *Hepeviridae*.

Le VHE est un virus non enveloppé, à capsidie icosaédrique, de 27 à 30nm de diamètre. Son génome est constitué d'un simple brin d'ARN de polarité positive, d'environ 7300 nt (Tam et al., 1991 ; Aye et al., 1992 ; Reyes et al., 1993). Trois ORF sont décrites (voir Figure 15), se chevauchant partiellement, entourées d'une part d'un 5' non codant et d'une coiffe nécessaire à sa viabilité, et d'autre part d'un 3' non codant, suivi d'une queue polyA (Reyes et al., 1991 ; Pelosi and Clarke, 2008 ; Smith et al., 2013). Les séquences codantes recouvrent 95% du génome du VHE (Smith et al., 2013).

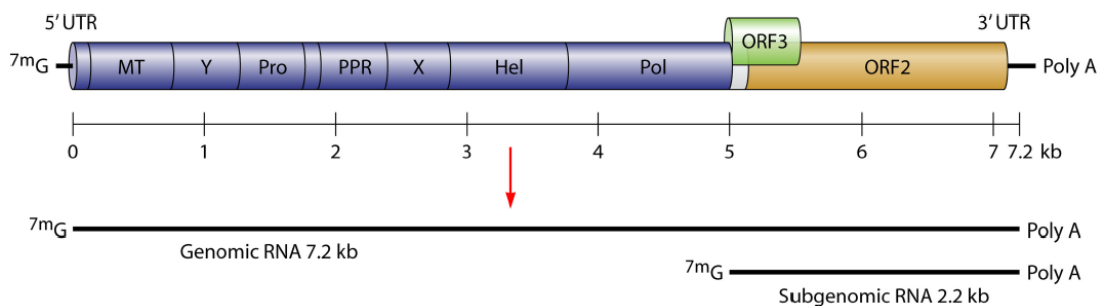


Figure 15 : Structure du génome du VHE
(Kamar et al., 2014)

L'ORF 1, longue d'environ 5kb, code pour une polyprotéine non structurale, impliquée dans la réplication du génome viral et la fabrication des protéines virales (méthyltransférase, hélicase, RNA-dependent-RNA-polymerase (RdRp) et protéase) (Pelosi and Clarke, 2008 ; Yugo and Meng, 2013). L'ORF 2, longue d'environ 2kb, code pour la protéine de capsidie (qui interagit notamment avec le 3' de l'ARN viral pour son encapsidation, et contient un signal peptidique de réticulum endoplasmique ainsi que des sites de glycosylation) (Pelosi and Clarke, 2008 ; Yugo and Meng, 2013). L'ORF 3, plus petite, chevauche en partie l'extrémité 5'

de l'ORF2, et code pour une phosphoprotéine dont la fonction est encore mal connue, mais qui pourrait être impliquée dans la modulation de la signalisation cellulaire en s'associant avec la protéine de capsid et le cytosquelette (Pelosi and Clarke, 2008 ; Smith et al., 2013).

Les analyses phylogénétiques de l'ensemble de la séquence génomique du VHE ont conduit à la définition de 4 principaux génotypes pour le VHE touchant les mammifères (Figure 16).

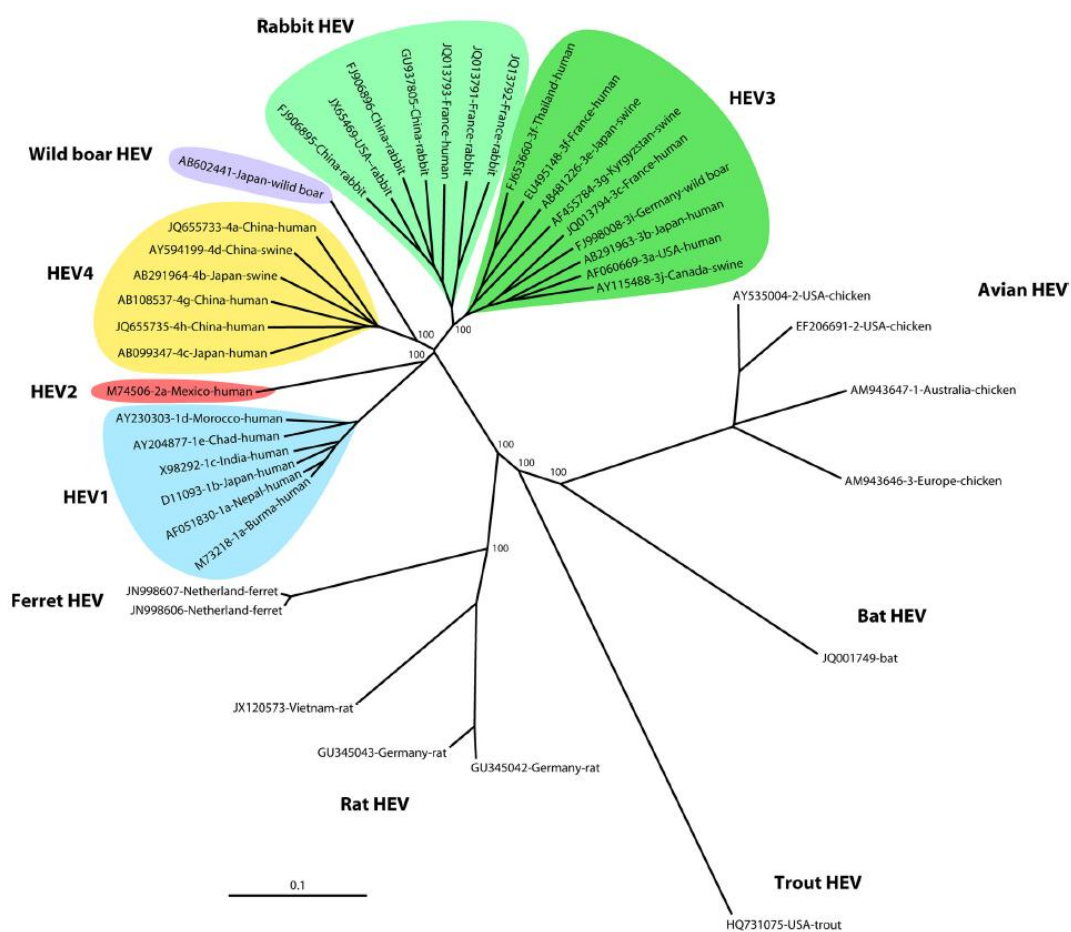


Figure 16 : Arbre phylogénétique basé sur les séquences totales des souches de VHE (Kamar et al., 2014)

Cependant, le nombre de sous-types dans chacun de ces génotypes n'est pas encore défini, et deux régions sont principalement utilisées pour les analyses phylogénétiques : une séquence de 301 nt en 5' de l'ORF2, et une région de 306 nt dans la RdRp dans l'ORF1 (Lu et

al., 2006a ; Zhai et al., 2006). Cette région de RdRp a été démontrée par Zhai et al. (2006) comme étant la seule sur les 24 régions testées à identifier les quatre mêmes génotypes que lors de l'analyse de la séquence virale complète, ce qui montre également la variabilité génétique du VHE. En se basant sur l'analyse phylogénétique de la séquence de RdRp, les souches au sein d'un génotype ont un minimum de 80% d'identité nucléotidique (Zhai et al., 2006). Le génotype 1 est sous-divisé en cinq sous-types (de a à e), le génotype 2 en deux sous-types (de a et b), le génotype 3 en dix sous-types (de a à j) et le génotype 4 en sept sous-types (de a à g) (Lu et al., 2006a).

Le VHE a une distribution mondiale. Il est endémique dans les régions où les conditions sanitaires sont faibles, responsable d'épidémies d'hépatite virale à grande échelle (Pelosi and Clarke, 2008). Il est également retrouvé dans les pays développés mais est à l'origine de cas sporadiques. Les génotypes du VHE ont des distributions géographiques différentes. Le génotype 1 est endémique en Asie et est retrouvé en Afrique, et le génotype 2 a été initialement identifié avec une souche responsable d'une épidémie à Mexico et depuis se retrouve principalement en Afrique. Le génotype 3 est associé à des cas sporadiques, principalement dans les pays industrialisés malgré sa distribution mondiale, et le génotype 4 est associé à des cas sporadiques et circule principalement en Asie (Okamoto, 2007 ; Pelosi and Clarke, 2008 ; Yugo and Meng, 2013). Environ 150 cas d'hépatite virale à VHE sont signalés chaque année en France, 50 à 100 en Allemagne et 30 en Italie, la séroprévalence est de 6% aux Pays-Bas, de 7,3% pour les adultes en Espagne et de 15 à 30% aux USA (Fitzsimons et al., 2010).

Le niveau mondial d'endémicité du VHE est reporté dans la Figure 17.

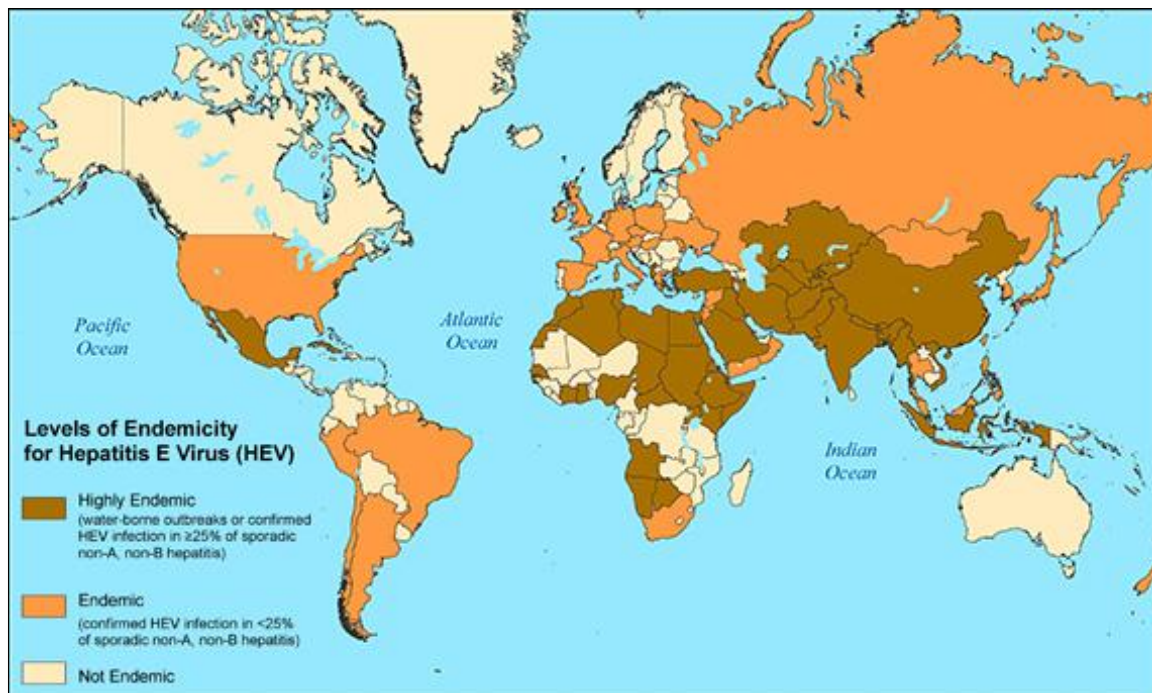


Figure 17 : Endémicité pour le VHE au niveau mondial (CDC, disponible sur www.cdc.gov/hepatitis/HEV/HEVfaq.htm)

1-6-2-2 Pathologie

La plupart des infections sont asymptomatiques. La période d'incubation est de 2 à 10 semaines, avec une moyenne de 40 jours (Pelosi and Clarke, 2008). Le tableau clinique est le même que pour les autres hépatites virales : des prodromes d'une dizaine de jours de type grippe et gastro-entérite (semblables à ceux causés par le VHA), suivis d'une jaunisse. L'infection aiguë dure une à quatre semaines, mais quelques patients développent des formes plus longues avec cholestase hépatique. Des formes chroniques commencent à être décrites, affectant des patients immunodéprimés et devenant un problème clinique significatif (Yugo and Meng, 2013). Une petite proportion de patients peut développer une forme fulminante d'hépatite avec un fort taux de mortalité due à une nécrose du foie. Les formes fulminantes ont été décrites dans le monde entier et semblent affecter particulièrement les femmes enceintes, notamment lors du 3^e trimestre de grossesse avec un taux de mortalité de 20% en régions endémiques (Pelosi and Clarke, 2008 ; Yugo and Meng, 2013). Des complications pour la mère comme pour le fœtus sont décrites, ainsi qu'une transmission virale mère-fœtus (Yugo and Meng, 2013). Récemment il a été

démontré qu'une répllication du VHE pourrait être possible dans le placenta, ce qui pourrait expliquer la pathogénicité de ce virus pour cette population particulière (Bose et al., 2014).

Le VHE représente un risque de santé publique ainsi qu'un risque économique. Le développement d'un vaccin est attendu pour réduire l'incidence de cette maladie (Pelosi and Clarke, 2008). Deux vaccins candidats sont en phase d'essais (phases II et III), mais aucun n'est encore mis sur le marché (FitzSimons et al., 2010).

1-6-2-3 TIAC

Le VHE se transmet principalement par voie hydrique et alimentaire, rarement de personne à personne, occasionnellement par transfusion sanguine et de manière verticale de la mère au fœtus dans 33% des cas lorsque la mère est contaminée lors de sa grossesse (Pelosi and Clarke, 2008 ; Yugo and Meng, 2013).

Le VHE présente deux profils épidémiologiques distincts en fonction du niveau de développement du pays concerné.

Dans les pays en voie de développement, le virus de l'hépatite E est endémique et les principaux génotypes circulants sont les génotypes 1 et 2 (Pelosi and Clarke, 2008). Les épidémies touchent un grand nombre de personnes et sont transmises *via* la consommation d'eau contaminée (Pelosi and Clarke, 2008). Ainsi, une des premières épidémies de VHE a eu lieu en 1955-1956 à New-Delhi en Inde, d'abord attribuée à VHA puis rétrospectivement attribuée au VHE, elle a touché 29300 personnes (Fitzsimons et al., 2010 ; Kamar et al., 2012). Une autre épidémie de VHE en Inde a touché 79091 personnes dans la ville de Kanpur, dont l'origine suspectée était l'eau de boisson consommée par les habitants de cette ville (Naik et al., 1992). LE VHE a été récemment à l'origine d'une épidémie au Bangladesh touchant près de 3000 personnes (Fitzsimons et al., 2010). Les épidémies sont plus fréquentes lors de la mousson, l'eau destinée à la consommation étant plus souvent fécalement contaminée après les inondations (Pelosi and Clarke, 2008). Entre deux périodes épidémiques, le VHE est transmis de manière sporadique. En Inde, le VHE représente 30 à 70% des hépatites aiguës sporadiques (Arankalle et al., 1993 ; Pelosi and Clarke, 2008).

Dans les pays développés, des épidémies sporadiques d'hépatite E ont été décrites chez des patients avec ou sans antécédent de voyage dans les zones à risques (Pelosi and Clarke, 2008). En France, en Italie et en Ecosse, il a été observé que les patients présentant une hépatite E liée à un voyage en zone à risque (Inde, Asie) étaient majoritairement infectés par une souche de génotype 1 et ponctuellement de génotype 4 (Mansuy et al., 2009 ; La Rosa et al., 2011 ; Ramalingam et al., 2013 ; Jeblaoui et al., 2013). En revanche, dans ces mêmes pays, les patients n'ayant pas voyagé étaient tous infectés par une souche de génotype 3 ou 4 (Mansuy et al., 2009 ; La Rosa et al., 2011 ; Ramalingam et al., 2013 ; Jeblaoui et al., 2013).

La part des cas autochtones et des cas importés suite à un voyage en zone à risque au cours des dernières années en France est présentée dans la Figure 18. Il y a une tendance à l'augmentation de la part des cas autochtones par rapport aux cas importés, qui peut être expliquée par une augmentation réelle du nombre de cas mais également par une amélioration du diagnostic. En effet, le nombre de prélèvements reçus par le CNR est plus élevé en 2011 qu'en 2002. En France, la moitié des cas autochtones provient des régions du sud de la France (Opinion of the French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety 2013).

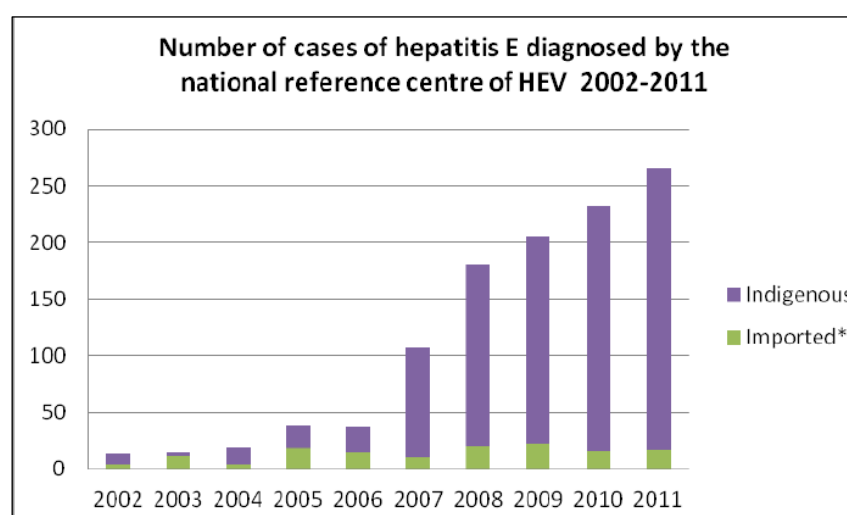


Figure 18 : Nombre de cas d'hépatites E diagnostiquées par le CNR de 2002 à 2011
 Comparaison des cas autochtones et des cas importés. (Kooh, 2013)

* Voyage dans une zone endémique dans les 3 mois précédant le début de la maladie

L'augmentation des cas d'hépatite E **non associés à des voyages en zones à risque** a amené à s'interroger sur les voies de transmission impliquées. Les patients atteints d'hépatite E sont principalement infectés par le génotype 3 et dans une moindre mesure par le génotype 4. Ces deux génotypes se retrouvent également chez un nombre important d'animaux, tels que les cochons, sangliers, poulets, rats, singes, lapins, furets, mangoustes, chauve-souris, truites, qui sont des hôtes naturels du VHE mais qui pourraient également jouer le rôle de réservoirs pour le VHE. De plus, il a été observé que les personnes (chasseurs, bucherons, éleveurs de porcs, vétérinaires) travaillant à proximité d'un réservoir animal présentent une séroprévalence plus élevée que le reste de la population (Carpentier et al., 2012 ; Yugo and Meng, 2013). En effet, une séroprévalence supérieure à 60% a été rapportée dans les régions d'élevages porcins (Van der Poel, 2014).

Récemment, la transmission zoonotique du virus suite à la **consommation de viande animale contaminée** a été montrée. Ainsi, la consommation des organes et tissus d'animaux infectés crus ou peu cuits est un facteur de risque. Un certain nombre d'exemples ayant conduit à des TIAC a été rapporté: consommation de porc peu cuit au barbecue au Japon dans un restaurant, consommation de porc en Inde, consommation de sanglier au Japon, en Allemagne, en Corée du Sud, consommation de cerf au Japon, consommation de figatelles en France (avec une correspondance des séquences virales de VHE retrouvées dans les figatelles et chez les patients) (Yugo and Meng 2013).

La **viande de porc** est particulièrement impliquée. Ainsi, en France, la consommation de figatelles crues ou de saucisses de foie de porc a été à l'origine de plusieurs TIAC (Couturier, 2010). En République Tchèque, la moitié des patients atteints d'hépatite E ont mangé de la viande, des abats ou d'autres produits d'origine porcine (Chalupa et al., 2014). Dans le cadre d'un plan de surveillance en 2011, environ un tiers des figatelles et des saucisses de porc analysées ont été détectées positives pour le VHE (Martin-Latil et al. 2014). Une évaluation de la prévalence du VHE dans des chaînes de production de porc en République Tchèque, en Italie et en Espagne a permis de montrer une forte présence du virus dans des foies et de la viande, ainsi que sur des saucisses destinées à la vente (Di Bartolo et al., 2012). Enfin, en Indonésie, il a été observé que la séroprévalence du VHE est dix fois supérieure chez les Hindous que chez les musulmans, soulignant le rôle de la consommation de porc (Fitzsimons et al., 2010).

Dans les pays développés, la **présence du VHE dans les eaux** (eaux usées, eaux de rivières ou eaux de mer) pourrait également être à l'origine de cas de transmission du VHE. En effet, le VHE a été détecté dans des eaux usées en Italie, en Espagne, en France, en Suisse, au Japon et aux USA, ainsi que dans des eaux de mers au Japon (Clemente-Casares et al., 2003 ; La Rosa et al., 2010b ; Ishida et al., 2012 ; Masclaux et al. 2013). Le VHE pourrait également être transmis *via* la consommation de **coquillages** (Okamoto, 2007), et des prélèvements de moules à différents endroits en Ecosse montrent qu'effectivement, 55 à 92% des prélèvements sont positifs pour le VHE (Crossan et al., 2012). En revanche, en France le VHE n'a pas été détecté dans des coquillages prélevés sur quinze sites différents contaminés (présence d'*E. Coli*) le long des côtes françaises, et sur deux sites potentiellement contaminés par des sangliers ou des porcs (Grodzki et al., 2014).

L'eau **d'irrigation** peut également être une source de contamination des produits cultivés (fruits, légumes....) (Brassard et al., 2012). Le VHE a d'ailleurs été retrouvé sur des **framboises** congelées prélevées sur des chaînes de production de quatre pays européens (République Tchèque, Finlande, Pologne et Serbie) (Maunula et al, 2013).

Ainsi, dans les pays développés, la transmission du VHE est plutôt zoonotique et se fait principalement suite à un contact direct avec un animal infecté ou *via* la consommation de viandes crues ou peu cuites (viande, foie...) de porcs, daims, sangliers... (Pelosi and Clarke, 2008). La relative conservation des génotypes 1 et 2 correspond à leur rang d'hôte limité (hommes), tandis que la diversité des génotypes 3 et 4 est en corrélation avec leur potentiel zoonotique et leur variété d'hôtes (Lu et al., 2006a).

1-7 Virus responsables de diverses pathologies

1-7-1 Entérovirus et Paréchovirus

1-7-1-1 Description

Le genre Enterovirus regroupe trois espèces de rhinovirus (ayant un tropisme strictement respiratoire), cinq espèces d'entérovirus humains (entérovirus humains A à D et poliovirus) et trois entérovirus animaux (simien, bovin et porcine) comme le montre le Tableau 3 (Bailly

et al., 2008 ; Tapparel et al., 2013). Le genre Parechovirus regroupe les anciennes espèces echovirus 22 et 23 qui étaient initialement classées dans le genre Entérovirus (ICTV, 7th report) ; les caractéristiques de ces virus sont très proches et ils seront regroupés dans ce chapitre.

Les entérovirus humains regroupent des virus appartenant à 90 sérotypes décrits en 2008 (dont 68 alors reconnus officiellement par l'ICTV), présentant un grand polymorphisme antigénique et une diversité génétique importante (Bailly et al., 2008).

Espèces	Sérotypes
Poliovirus (PV)	3 sérotypes : PV1, PV2, PV3
Entérovirus humains A (HEV-A)	13 sérotypes : - Coxsackievirus A (CA-) 2 à 8, 10, 12, 14, 16 - Entérovirus (EV-)71 et 76 - Entérovirus 89 à 92
Entérovirus humains B (HEV-B)	41 sérotypes : - Coxsackievirus (CA-) 9 - Coxsackievirus B (CB-) 1 à 6 - Echovirus (E-) 1 à 7, 9, 11 à 21, 24 à 27, 29 à 33 - Entérovirus (EV-) 69, 73 à 75, 77 et 78 - Entérovirus 79 à 88, 93, 97, 98, 100 et 101
Entérovirus humains C (HEV-C)	9 sérotypes : - Coxsackievirus A (CA-) 1, 11, 13, 17, 19, 20 à 22, 24 - Entérovirus 95, 96, 99 et 102
Entérovirus humains D (HEV-D)	2 sérotypes : - Entérovirus (EV-) 68 et 70 - Entérovirus 94
Entérovirus bovins (BEV)	2 sérotypes
Entérovirus porcins A (PEV-A)	1 sérotype
Entérovirus porcins B (PEV-B)	2 sérotypes
Entérovirus simiens A (SEV-A)	5 sérotypes

Tableau 3 : Classification simplifiée du genre Enterovirus (Bailly et al., 2008)

Seuls les entérovirus humains A à D et les poliovirus sont transmissibles par la voie alimentaire et/ou hydrique. Le site primaire de réplication de ces entérovirus est le tractus intestinal (Tapparel et al., 2013).

Comme tous les *Picornaviridae*, les entérovirus sont des virus à ARN simple brin positif et non enveloppés. Leur capsidie icosaédrique est constituée de quatre protéines structurales (VP1 à VP4).

Le génome des entérovirus compte environ 7500 nt et code pour 11 protéines virales (voir Figure 19). A l'extrémité 5' peut se fixer la protéine VPg (remplaçant la coiffe), clivée après l'entrée du virus dans la cellule, tandis qu'à l'extrémité 3' on note la présence d'une queue polyA (Bailly et al., 2008). Deux régions non codantes (5'NTR et 3'NTR) encadrent l'unique ORF codant pour la polyprotéine, composée de trois régions : la région P1 code pour les protéines structurales, les régions P2 et P3 codent pour les protéines non structurales associées à la réplication.

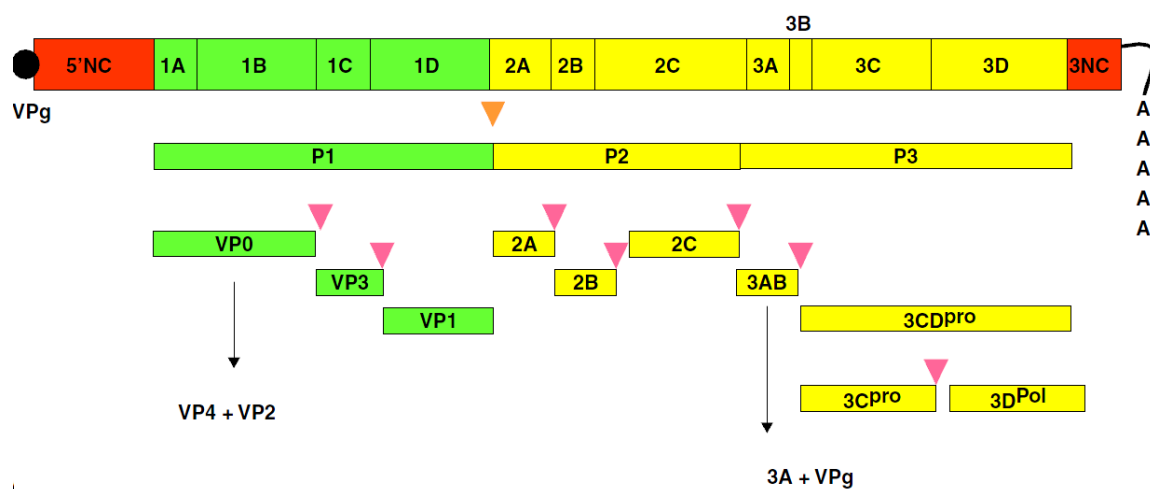


Figure 19 : Organisation génomique des entérovirus
(Bailly et al., 2008)

Les souches d'entérovirus peuvent être analysées par séroneutralisation ou RFLP mais seul le génotypage permet d'identifier les souches précisément (Bailly et al., 2008). Plusieurs régions du génome peuvent être utilisées pour développer des méthodes d'identification moléculaire, comme les régions VP1-2A, VP1, VP3-VP1, VP1-2C, 5'-VP1. Un consensus a finalement été trouvé avec le gène 1D codant pour la protéine de capsid VP1, permettant une bonne concordance entre sérotype et génotype du fait que VP1 soit une protéine en partie extérieure et portant plusieurs épitopes antigéniques (Bailly et al., 2008).

Il ne semble pas y avoir de relation entre un génotype et une région géographique particulière (Bailly et al., 2008). Les souches d'un même génotype peuvent se retrouver dans différents pays, de même que peuvent circuler simultanément plusieurs souches d'un même génotype au sein d'une même région (Bailly et al., 2008). Cette co-circulation s'accompagne

du phénomène de succession de variants prédominants au cours du temps avec un remplacement des génotypes et des variants jusqu'à leur extinction (Bailly et al., 2008).

1-7-1-2 Pathologie

Les entérovirus humains (espèces A à D et poliovirus) sont responsables de pathologies diverses dont les encéphalites, paralysies, atteintes musculaires, méningites, maladie pied-main-bouche, maladies des tractus respiratoires haut et bas, pleurodynie, herpangine, conjonctivites, gastro-entérites, pancréatites, hépatites, atteintes du myopéricarde, diabètes de type 1 (Tapparel et al., 2013).

Le poliovirus est responsable de la poliomyélite flasque aiguë. La campagne de vaccination contre le poliovirus au niveau mondial a permis de réduire depuis 1988 le nombre de cas de 99%, passant selon les estimations de 350 000 cas dans plus de 125 pays d'endémie à 406 cas notifiés en 2013. En 1994, la Région OMS des Amériques a été certifiée exempte de poliomyélite, suivie en 2000 par la Région du Pacifique occidental puis, en juin 2002, par la Région européenne de l'OMS. En janvier 2011, la poliomyélite a été éradiquée d'Inde et la Région OMS de l'Asie du Sud-Est a été certifiée exempte de poliomyélite en mars 2014. En 2014, la maladie ne sévit plus de manière endémique que dans certaines parties de trois pays (Afghanistan, Nigéria et Pakistan) (www.who.int/mediacentre/factsheets/fs114/fr/).

1-7-1-3 TIAC

Les intoxications alimentaires dues aux entérovirus ont essentiellement pour origine la consommation d'eau contaminée. Les entérovirus (poliovirus, coxsackievirus, echovirus) peuvent être retrouvés dans les eaux de rivières et/ou de mer contaminées par les eaux usées (Le Guyader et al, 2008 ; Fuhrman et al., 2005 ; Klement et al., 2013 ; Lee et al., 2014). Une étude menée en Italie révèle la présence d'entérovirus dans les eaux usées avant leur traitement (96% des échantillons sont positifs), mais également après leur traitement dans les effluents des STEP (84% des échantillons sont positifs). La désinfection de l'eau est typiquement réalisée avec une filtration, une sédimentation primaire, un traitement biologique secondaire et une désinfection finale au chlore, et son efficacité est estimée à

seulement 35% pour les entérovirus, ce qui augmente les risques sanitaires (La Rosa et al., 2010b).

Des contaminations par les entérovirus *via* des eaux récréatives ont notamment été observées, avec trois épidémies à coxsackievirus (aux USA en 1972, en France en 1974 et au Mexique en 2004) et dix épidémies à echovirus entre 1992 et 2004 (Irlande, Italie, Roumanie, Afrique du Sud, Allemagne, USA, Russie et Mexique) (Sinclair et al., 2009). La consommation d'huitres en France est à l'origine d'une TIAC ayant touché 205 personnes en 2006 suite à une contamination du bassin de production par des eaux usées après une inondation. Parmi les virus recherchés, les entérovirus ont été retrouvés dans 50% des selles analysées (Le Guyader et al., 2008).

Ainsi, les entérovirus sont présents dans les eaux environnementales et à l'origine de TIAC suite à la consommation d'eaux ou de coquillages.

1-7-2 Cosavirus

1-7-2-1 Description

Les cosavirus appartiennent à la famille des *Picornaviridae* et sont classifiés dans le genre Cosavirus. Le génome viral est constitué d'un ARN simple brin de polarité positive.

Le cosavirus a été récemment identifié par deux équipes : au Pakistan dans des selles d'enfants atteints de paralysie flasque aiguë non reliée à du poliovirus (Kapoor et al., 2008), et en Australie dans les selles d'un enfant avec une diarrhée aiguë (Holtz et al., 2008).

Appelé cosavirus humain A1 pour **common stool associated picornavirus** espèce A genotype 1 (HCoV-A1), ce virus possède un génome d'une longueur de 7634 nt, codant pour une polyprotéine de 2124 acides aminés (Kapoor et al., 2008). Il possède la même organisation génomique que les autres *Picornavirus*, ainsi que les mêmes types de protéines : les protéines de capsides, une hélicase à ARN, une 3C cysteine protease, une ARN-polymérase-ARN-dépendante (Holtz et al., 2008).

Le génome est constitué de deux régions non codantes situées aux extrémités : les 5' et 3' NTR, ainsi que d'une ORF unique comprenant la région P1, codant pour les protéines

structurales VP1, VP2 et VP3 (VP4 putative), qui constituent la capside, et les régions P2 et P3, codant pour des protéines non structurales impliquées dans la réplication du virus (Holtz et al., 2008) (voir Figure 20).

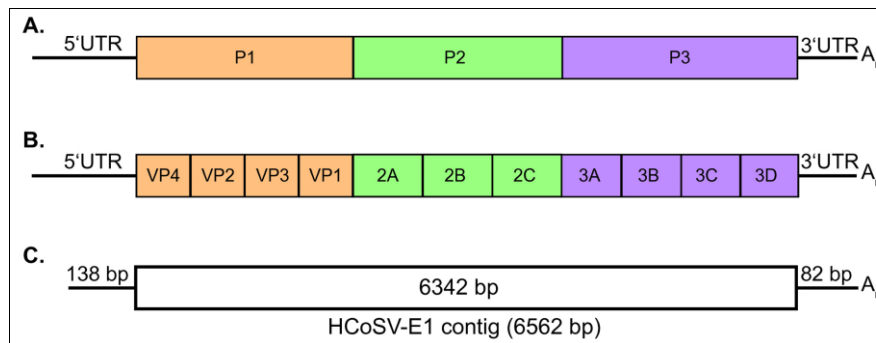


Figure 20 : Organisation génomique de cosavirus

(A : Schéma des régions protéiques initiales P1, P2, et P3 ; B : Polyprotéine ; C : Séquence génomique d'une souche de génotype Cosavirus E1) (Holtz et al., 2008)

L'analyse phylogénétique du 5'NTR ainsi que de la séquence de la polymérase, met en évidence la présence de 4 groupes génétiques distincts, qui ont ensuite été proposés comme 4 espèces de Cosavirus humains A à D, l'espèce A contenant au moins 3 génotypes différant par VP1 (Kapoor et al., 2008). L'analyse phylogénétique de la séquence de la polyprotéine a permis d'ajouter une cinquième espèce, le Cosavirus humain E (Holtz et al., 2008).

1-7-2-2 Pathologie

Les cosavirus sont à l'origine de pathologies gastro-intestinales mais également de pathologies musculaires. Au Pakistan (où il a été décrit pour la première fois), 40% des enfants atteints de paralysie flasque aiguë non reliée au poliovirus (non-polio AFP) sont positifs pour le cosavirus (Kapoor et al., 2008), En revanche, il est peu détecté au Royaume Uni, sans doute dû à la différence des conditions d'hygiène entre ces deux pays. La présence des cosavirus a depuis été recherchée par d'autres équipes. En Italie, il a été identifié comme agent dans les selles de 0,5% des patients atteints de gastro-entérites, ainsi qu'au Brésil où les selles de 3,6% des enfants avec gastro-entérites contiennent Cosavirus (Stöcker et al., 2012 ; Rovida et al., 2013a). Cependant, les cosavirus ont aussi été identifiés au Brésil chez

des patients sains. Cette étude montre de plus de fréquentes co-infections impliquant les cosavirus, et de faibles concentrations d'ARN viral détecté (absence de réplication ?).

1-7-2-3 TIAC

Les cosavirus ont été retrouvés dans des eaux environnementales. Aux Etats-Unis, l'analyse d'eaux usées a mis en évidence la présence de cosavirus A et D dans 38% des échantillons analysés, avec une prédominance de l'espèce D (Blinkova et al., 2009). Au Japon, les cosavirus de différents génotypes ont été retrouvés dans 71% des eaux usées, 29% des eaux usées traitées et 29% des eaux de rivières, à des concentrations allant jusqu'à $2,80.10^6$ copies/L (Haramoto and Otagiri, 2014).

Ainsi, le cosavirus a été détecté en Asie, en Europe, en Australie, au Japon, en Amérique du Sud et du Nord. Il est retrouvé chez des patients atteints de gastro-entérites et de non-polio AFP. Il est également retrouvé dans les eaux usées et les eaux de rivières. Ses modes de contamination sont encore mal connus, même si la voie féco-orale est maintenant avérée.

1-7-3 Coronavirus humains

1-7-3-1 Description

Les coronavirus tirent leur nom de la couronne autour des virions observées en microscopie électronique (Vabret et al., 2009).

La famille *Coronaviridae* est divisée en deux sous-familles, les *Coronavirinae* et les *Torovirinae* (ICTV, 2009).

Les coronavirus, appartenant à la sous-famille *Coronavirinae*, sont subdivisés en trois groupes (1-3) sur des bases sérologiques et moléculaires, les groupes 1 et 2 infectant les mammifères et le groupe 3 les oiseaux.

Les coronavirus humains (HCoV) sont au nombre de cinq : 229E, OC43 (tous deux décrits depuis 1960), SRAS-CoV (Syndrome respiratoire aigu sévère, décrit depuis l'épidémie de 2003), NL63 (décrit en 2004) et HKU1 (décrit en 2005) (Drosten et al., 2003 ; Rota et al., 2003; van der Hoek et al., 2004 ; Woo et al., 2005 ; Vabret et al., 2009). Les coronavirus ont

été reclassifiés en quatre genres en 2009 par l'ICTV, notamment le genre Alphacoronavirus comprenant 229E et NL63, et le genre Betacoronavirus comprenant HKU1, OC43 et SRAS-CoV. En 2012, un nouveau Coronavirus a émergé au Moyen-Orient, nommé le MERS-CoV (Middle East Respiratory Syndrome).

Les coronavirus sont des particules virales enveloppées de diamètre compris entre 60 et 200 nm (Vabret et al., 2009).

L'enveloppe est constituée des glycoprotéines M, E et S (la protéine S est une protéine membranaire s'organisant en trimère pour former les spicules) et l'hémagglutinine-estérase HE (seulement pour les coronavirus de groupe 2). La capside virale est constituée de la protéine N (liée à l'ARN viral) et est de forme hélicoïdale (Vabret et al., 2009). Le tropisme tissulaire et le spectre d'hôte sont déterminés en grande partie par la protéine S, qui est responsable de l'attachement du virion au récepteur cellulaire et permet la fusion membranaire (Vabret et al., 2009).

L'organisation génomique des coronavirus est très conservée. Leur génome est constitué d'un ARN positif linéaire, non segmenté, de 27kb à 31kb de long. C'est l'ARN viral de plus longue taille connu (Vabret et al., 2009).

La Figure 21 montre l'organisation génomique. En 5', deux ORF 1a et 1b codent pour deux précurseurs protéiques, clivés ultérieurement en 15 à 16 fragments codant pour le complexe de réplication, puis se trouvent les gènes codant pour les protéines structurales HE, S, E, M et N. Le génome code également pour des protéines non structurales dont la fonction n'est pas encore connue (Vabret et al., 2009).

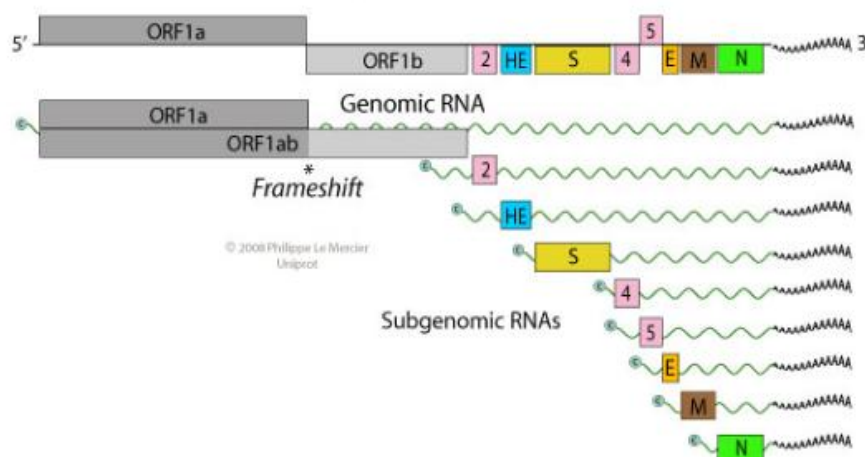


Figure 21 : Structure du génome viral de coronavirus (ViralZone)

La réplication est intracytoplasmique et est effectuée par une ARN polymérase ARN dépendante (RdRp) dépourvue de système de correction d'erreur, ce qui explique la génération de nombreux mutants et la présence d'une population virale composée de quasi-espèces (Vabret et al., 2009).

1-7-3-2 Pathologie

Les quatre coronavirus humains (229E, HKU1, NL63 et OC43) font partie des principaux agents d'infections respiratoires hautes et basses, quel que soit l'âge du patient. Il n'existe pas de traitement. Le coronavirus se transmet par contact direct, lors de contacts rapprochés avec une personne présentant les symptômes respiratoires du virus, et probablement par voie aérienne lors notamment d'épisodes de toux ou de postillons (Vabret et al., 2009). L'implication des coronavirus dans les pathologies digestives et neurologiques n'est pas encore complètement prouvée. Vabret et al., (2009) rappelle cependant que des coronavirus animaux sont responsables de maladies entériques graves. De plus, les coronavirus sont excrétés dans les selles de patients ayant des troubles digestifs associés à des symptômes respiratoires (Vabret et al., 2009 ; Kuypers et al., 2007 ; Jevšnik et al., 2013). Une étude menée sur des patients atteints de gastro-entérites a mis en évidence la présence de coronavirus humains dans les selles de 2% des patients (Rovida et al., 2013a).

La durée d'incubation est de trois jours environ pour les coronavirus humains et de deux à dix jours pour le SRAS-Coronavirus qui est responsable d'un syndrome respiratoire aigu sévère (Vabret et al., 2009). Il peut y avoir une primo-infection puis une réinfection avec des symptômes dans 45% des cas (Vabret et al., 2009). La durée d'incubation du MERS-Coronavirus est de 5 jours environ, avec des symptômes respiratoires qui évoluent rapidement en pneumonie, et un taux de mortalité de 58% (Cunha and Opal, 2014).

Les quatre coronavirus humains (229E, HKU1, NL63 et OC43) co-circulent avec des variations d'espèces selon les années et la géographie. Il semble y avoir un caractère épidémique avec des infections plus fréquentes en hiver-printemps (Vabret et al., 2009 ; Gaunt et al., 2010 ; Jevšnik et al., 2012 ; Kuypers et al., 2007) et des infections persistantes à coronavirus sont parfois suspectées.

1-7-3-3 TIAC

Les coronavirus humains n'ont pas été décrits comme cause avérée d'une TIAC, ils sont cependant classés dans les « virus potentiellement transmis par voie hydrique » (Leclerc et al., 2002).

Le **SRAS-Coronavirus** est quant à lui un virus zoonotique et peut être transmis *via* la préparation et la consommation de viande animale peu cuite (FAO/WHO, 2008 ; EFSA (BIOHAZ), 2011). Le MERS-Coronavirus est un virus zoonotique, qui serait transmis uniquement par contact direct avec les chameaux, dromadaires et chauve-souris (Cunha and Opal, 2014).

1-7-4 Tick-Borne-Encephalitis Virus (TBEV)

1-7-4-1 Description

Le TBEV (Tick Borne Encephalitis Virus) appartient à la famille des *Flaviviridae* et au genre *Flavivirus*. Il est transmis aux mammifères *via* les tiques.

Il s'agit d'un virus de petite taille, enveloppé, de structure sphérique, d'un diamètre compris entre 40 et 60 nm (Mansfield et al, 2009). Son enveloppe est constituée d'une membrane lipidique contenant deux glycoprotéines, E (pour enveloppe) et M (pour membrane). Sa capsid est constituée de la protéine C (Gritsun et al., 2003).

Son génome consiste en un ARN positif linéaire simple brin, de 11 kb environ, avec une coiffe en 5', mais ne présente pas de queue polyadénylée (Mansfield et al., 2009).

Une seule ORF est décrite (Figure 22), codant pour trois protéines structurales et sept protéines non structurales (Mansfield et al., 2009), encadrée d'un 5' et d'un 3' non codant (Gritsun et al., 2003).

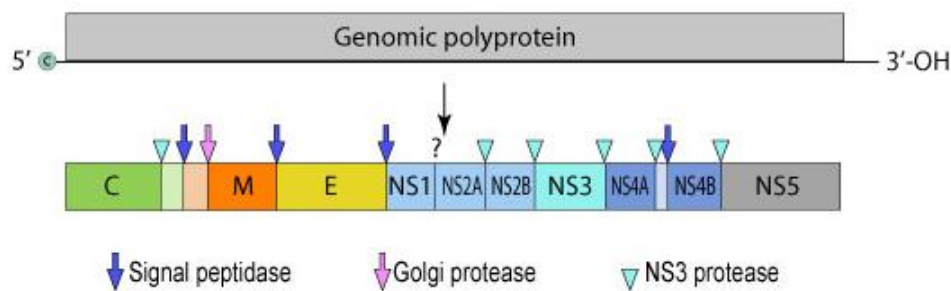


Figure 22 : Organisation génomique du TBEV
(ViralZone)

Trois sous-types de TBEV sont décrits, dont les génotypes et sérotypes sont étroitement reliés : les sous-types Européen, Sibérien et Extrême-Oriental. Le TBEV européen est plutôt transmis par la tique *Ixodes ricinus*, et les TBEV Sibérien et Extrême-Oriental par *I. persulcatus* (Mansfield et al, 2009 ; Süss, 2011).

1-7-4-2 Pathologie

Le TBEV est l'agent infectieux responsable de l'encéphalite transmise par les tiques (Tick-born encephalitis, TBE), qui est une infection neurologique potentiellement fatale. Le virus est présent en Asie et en Europe, avec une augmentation de sa présence en Europe et une expansion de sa couverture avec seize pays européens touchés en 2009. Il est endémique du nord de la Chine et du Japon à la Russie et l'Europe (Mansfield et al, 2009). Récemment, de nouveaux cas de TBE ont été décrits en France, Italie, Suède, Grèce, Norvège, Danemark, Finlande et Allemagne (Roelandt et al., 2010).

La période d'incubation est de 11 jours en moyenne. Les symptômes sont fièvre, mal de tête, malaise occasionnel, symptômes respiratoires et/ou abdominaux, avant l'apparition de méningite, méningoencéphalite ou méningoencéphalomyélite. La pathologie peut devenir chronique avec des manifestations neurologiques (épilepsie, formes paralytiques, hyperkinésie, atrophie musculaire voire détérioration physique et mentale jusqu'au décès). Il n'existe pas de traitement (Mansfield et al, 2009).

L'importance des TBE a augmenté en termes de santé publique, notamment en Europe (Süss, 2011) où cette zoonose émergente est de plus en plus étudiée. La présence de TBEV dans des zones à risques a été évaluée en Allemagne, et les souches cliniques ainsi que les souches retrouvées dans les tiques ont été caractérisées (Klaus et al., 2010a ; Klaus et al., 2010b ; Kupča et al., 2010). En Suisse, la prévalence de TBEV ainsi que les zones à risques ont été caractérisées (Gaumann et al., 2010). En Italie, le nombre de cas de TBE a augmenté depuis 1992 et les zones à risques, la prévalence et la variabilité génétique du TBEV ont été étudiées (Carpi et al., 2009). La carte (Figure 23) réalisée par Roelandt et al, 2010 permet de visualiser les zones d'endémies du TBEV en Europe en 2008.

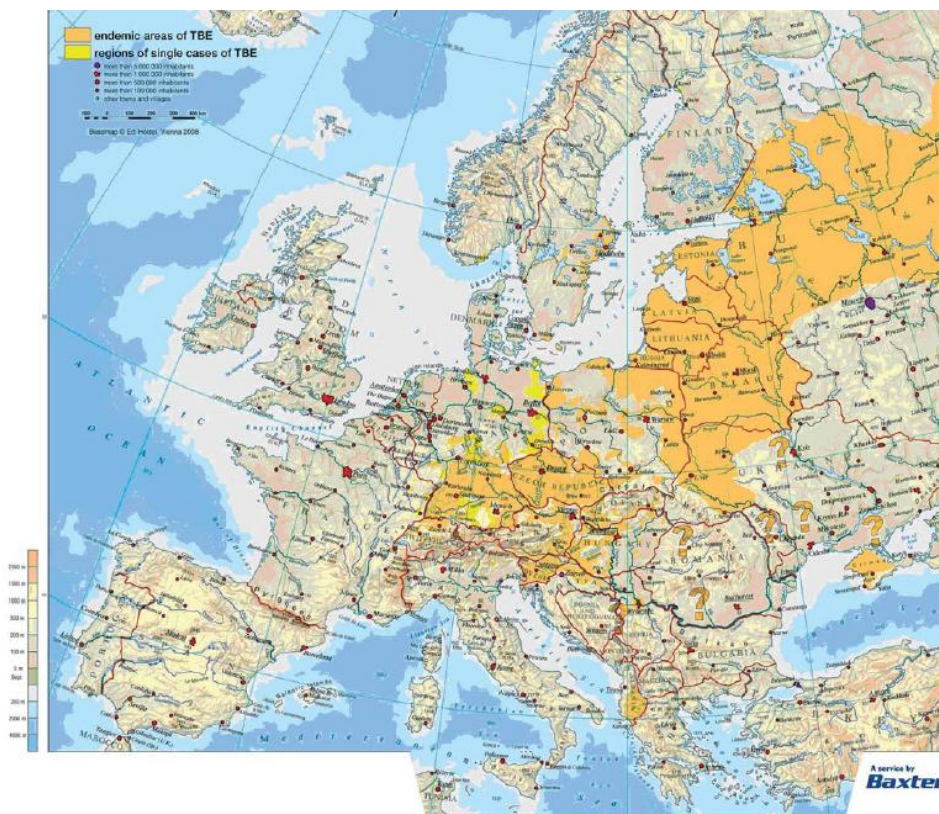


Figure 23 : TBE en Europe: Etablissement des zones d'endémies en 2008 (Roelandt et al., 2010)

1-7-4-3 TIAC

La transmission zoonotique du TBEV s'effectue *via* la morsure d'une tique infectée ou occasionnellement *via* la consommation de produits laitiers contaminés non pasteurisés (Gritsun et al., 2003 ; Mansfield et al, 2009 ; Süss, 2011).

Les tiques peuvent être contaminées par le TBEV lorsqu'elles se nourrissent du sang d'un hôte infecté. La présence du virus dans les glandes salivaires de la tique infectée est à l'origine de la transmission du virus chez un nouvel hôte lorsque celle-ci fait un nouveau repas de sang (Mansfield et al., 2009). Ainsi, la tique infectée peut transmettre le virus aux mammifères (hommes, rongeurs principalement mais aussi oiseaux, grands mammifères comme daims et chevaux, ruminants comme moutons, vaches et chèvres) (Mansfield et al., 2009 ; Roelandt et al., 2010 ; Süs, 2011). Après infection par morsure de tique, le virus se réplique au niveau de la morsure, puis dans les ganglions lymphatiques drainant la blessure. La dissémination du virus par la voie sanguine permet l'infection de nombreux organes tels que rate, foie et moelle osseuse et le passage de la barrière hémato encéphalique permet l'invasion du système nerveux central (Mansfield et al., 2009).

Les cas de transmission alimentaire répertoriés entre 2000 et 2010 ont augmenté en Europe, notamment en Slovaquie, Lituanie, Pologne, Russie, Albanie, Autriche, République Tchèque et Hongrie (Süs, 2011).

En Pologne, la prévalence de TBEV dans du lait cru a été étudiée dans les zones à risque et il a été montré que le TBEV est présent dans 11,1% du lait cru de vache, 20,7% du lait cru de chèvre et 22,2% du lait cru de brebis, confirmant que le lait non pasteurisé est un aliment à risque (Cisak et al., 2010). En Hongrie en 2007, la consommation de lait cru de chèvre venant de la même ferme est à l'origine d'une épidémie de TBE ayant touché 25 personnes sur les 154 exposées (Balogh et al., 2010). En Autriche en 2009, la consommation de fromages de chèvre au lait cru a entraîné une TBE chez 6 des 7 consommateurs (Holzmann et al., 2009). Enfin, en Slovénie en 2012, la consommation de lait cru de chèvre a été à l'origine d'une TIAC touchant 4 personnes (Hudopisk et al., 2013).

Ainsi, le TBEV est à l'origine de TIAC en lien avec la consommation de produits à base de lait cru (lait, fromage). Bien que le virus soit essentiellement présent dans les zones d'endémies en Europe de l'Est, il a été retrouvé dans d'autres pays européens dont Allemagne, la Suisse et l'Italie (Carpi et al., 2009 ; Gaumann et al., 2010 ; Kupča et al., 2010). La gravité de la maladie induite (encéphalite) explique la nécessité d'étudier et de surveiller cette zoonose.

1-7-5 Parvovirus

1-7-5-1 Description

Les parvovirus appartiennent à la sous-famille des *Parvovirinae* au sein de la famille des *Parvoviridae*. Parmi cette sous-famille, cinq genres sont décrits dont les Erythrovirus. Le parvovirus B19 est le seul parvovirus connu pour infecter les hommes. Il s'agit d'un virus non enveloppé de 18 à 26 nm de diamètre.

Son génome est constitué d'un ADN simple brin de petite taille (4 à 6 kb). Le génome des parvovirus est constitué de deux ORF, l'une codant pour la protéine non structurale NS1, et l'autre codant pour les deux protéines de capsid (VP1 et VP2) (Figure 24).

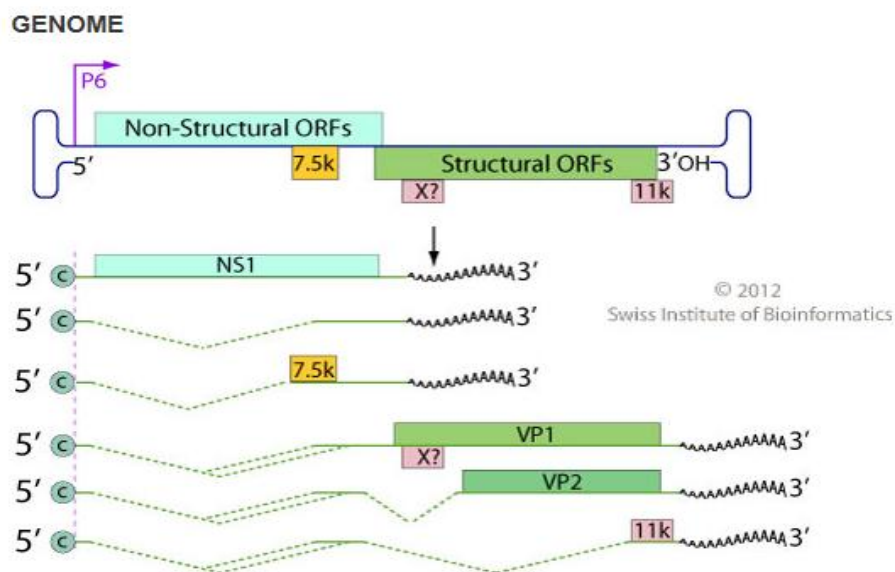


Figure 24 : Organisation génomique des parvovirus (ViralZone)

1-7-5-2 Pathologie

Les parvovirus sont des agents d'éruptions cutanées le plus souvent infantiles, appelés la « cinquième maladie », provoquant fièvre et rash. Chez les adultes, il s'agit le plus souvent d'atteintes articulaires ou d'anémies. Il peut y avoir d'autres pathologies induites de manière

beaucoup plus rares, telles qu'œdèmes, hépatites fulminantes, méningites, encéphalites atteintes rénales ou cardiaques (Bihari et al., 2013).

1-7-5-3 TIAC

Les infections par le parvovirus B19 sont communes chez les enfants. Le virus est transmis principalement par les gouttelettes respiratoires mais aussi par contact de personne à personne. Il peut être agent d'infections nosocomiales ou être transmis par le sang (Bihari et al., 2013). Il semblerait que le parvovirus puisse être transmis par les aliments (mollusques et crustacés) (Santé Canada, 2004). Enfin, ils sont classés dans la classe « des virus potentiellement transmis par voie hydrique » (Leclerc et al., 2002).

1-7-6 Virus dont la transmission par voie alimentaire est occasionnelle

Les cas d'intoxications alimentaires par des virus cités ci-dessous sont des événements très peu fréquents, mais qui peuvent avoir de forts impacts sur la santé, ainsi que des conséquences importantes en termes de dissémination virale ultérieure (Vasickova et al., 2005 ; FAO/WHO, 2008 ; EFSA (BIOHAZ), 2011).

Le **virus Hautement Pathogène Influenza Aviaire (HPA-H5N1)** (famille *Orthomyxoviridae*, virus à ARN) est responsable de la grippe aviaire. Il peut être transmis *via* la viande de canard (congelée ou non), la consommation de sang frais de canard (plat traditionnel coréen), la volaille insuffisamment cuite en général et les œufs crus (FAO/WHO, 2008 ; EFSA (BIOHAZ), 2011).

Le **nipah virus** (famille *Paramyxoviridae*, virus à ARN) peut être transmis *via* la consommation de fruits contaminés par la salive de chauves-souris frugivores porteuses du virus. Trois TIAC au Bangladesh ont pour origine la consommation de jus de dattes fraîches. Le nipah virus est aussi connu pour affecter les personnes vivants proches d'abattoirs de

porc (FAO/WHO, 2008 ; EFSA (BIOHAZ), 2011). Ce virus est responsable de maladies neurologiques et respiratoires pouvant être mortelles.

Les **Arénavirus** (famille *Arenaviridae*, virus à ARN) peuvent être transmis *via* la consommation d'aliments contaminés par le contact d'animaux (rongeurs majoritairement) contaminés ou leurs excréments. Ce virus est responsable de fièvre hémorragique (Vasickova et al., 2005).

Les **Hantavirus** (famille *Bunyaviridae*, virus à ARN) peuvent être transmis *via* la consommation d'eau ou d'aliments contaminés par le virus qui est présent dans l'urine, la salive ou les excréments de la souris sylvestre et de certains autres rongeurs sauvages infectés. Ce virus est responsable du syndrome pulmonaire à Hantavirus ou de fièvre hémorragique accompagnée de syndromes rénaux (Vasickova et al., 2005).

Le **FMDV** (Foot-and-Mouth Disease Virus) (famille *Picornaviridae*, virus à ARN) est un virus à potentiel zoonotique, la transmission à l'homme reste rare du fait de sa difficulté à passer la barrière d'espèce. Il est excrété dans le lait de vache et se retrouve dans le lait cru et les produits laitiers pouvant être consommés. Ce virus est responsable de fièvres, malaises, vomissements, lésions rouges ulcérales des tissus oraux et parfois de lésions vésiculaires (Vasickova et al., 2005).

2- Détection des Virus Entériques

Les techniques de détection utilisées en routine et en recherche en virologie clinique et alimentaire doivent être adaptées au virus entérique recherché et à la matrice.

Dans cette deuxième partie sont présentées les principales techniques de détection des virus entériques utilisées (la microscopie électronique, et les méthodes immunologiques, de biologie moléculaire, de culture cellulaire), les approches méthodologiques décrites pour la détection de particules virales infectieuses non cultivables et enfin le potentiel des nouvelles technologies (PCR (Polymerase Chain Reaction) Arrays, Digital PCR, NGS) qui pourraient être utilisées dans le diagnostic viral.

2-1 Microscopie électronique

Dans les années 1930, le premier microscope électronique a permis d'accélérer l'acquisition de connaissances dans le domaine de la virologie fondamentale et clinique. En effet, la microscopie électronique (ME) permet d'observer et d'identifier les virus sur la base de la morphologie de leur capsid. La ME a permis la découverte de nouveaux virus, notamment le poliovirus en 1952, le norovirus en 1971, le virus de l'hépatite A en 1973, le parvovirus B19 en 1975 (Goldsmith and Miller, 2009 ; Zhang et al., 2013). Elle a également permis d'identifier le rotavirus comme virus majeur des gastro-entérites aiguës endémiques (Biel and Gelderblom, 1999).

La ME peut être utilisée pour le diagnostic clinique des gastro-entérites virales, car aucun des principaux virus responsables n'est facilement cultivable (Goldsmith and Miller, 2009). De plus, les échantillons de selles peuvent ainsi être directement analysés, permettant un diagnostic assez rapide et la mise en évidence des co-infections (Arcangeletti et al., 2005). La ME est notamment utilisée en diagnostic clinique pour la détection de norovirus, sapovirus, adénovirus et rotavirus dans les selles (Koopmans and Duizer, 2004 ; Arcangeletti et al., 2005).

Cependant, bien que la ME soit un outil important en diagnostic microbiologique, elle a été progressivement remplacée au cours de ces dernières années par des méthodes immunologiques et moléculaires pour le diagnostic viral de routine. La ME reste une technique relativement compliquée, coûteuse, difficile à mettre en place pour un diagnostic de masse, nécessitant des équipements et du personnel qualifié (Biel and Gelderblom, 1999 ; Zhang et al., 2013). Sa limite de détection est de l'ordre de 10^6 particules virales/ml et elle est significativement moins sensible que les techniques de RT-PCR et d'essais immunoenzymatiques (Castriciano et al., 2007). De plus, la ME ne peut pas différencier les souches virales au sein d'une même espèce, de même que les espèces virales ayant un même type de capsid (Castriciano et al., 2007). La ME peut produire des artéfacts ou des faux négatifs (Zhang et al., 2013).

Pour finir, la ME n'est pas appropriée pour un diagnostic à partir d'échantillons environnementaux et alimentaires du fait de leurs faibles taux de contamination virale (Koopmans and Duizer, 2004).

2-2 Méthodes immunologiques

Les méthodes immunologiques sont basées sur la réaction spécifique entre un anticorps et un antigène. La bonne affinité de l'anticorps (produit par l'organisme suite à une infection par le virus) pour son antigène viral explique que ces interactions soient hautement spécifiques.

Les méthodes immunologiques permettent la mise en évidence de la présence d'un anticorps spécifique (diagnostic indirect) ou de la présence d'un antigène viral (diagnostic direct). Les méthodes les plus utilisées en diagnostic microbiologique sont les immunoessais enzymatiques (EIA), l'immunofluorescence (IF), les réactions d'agglutination.

Parmi les EIA, la technique d'ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) est particulièrement utilisée en routine en virologie clinique pour les diagnostics directs comme indirects. Une autre méthode d'EIA couramment utilisée en raison de sa rapidité est

l'immunochromatographie, basée sur la migration de l'antigène ciblé par des anticorps spécifiques le long d'une bandelette et visualisé par l'apparition d'une ligne colorée.

La recherche des virus entériques responsables de gastro-entérites (rotavirus de groupe A, adénovirus, astrovirus et certains norovirus) est effectuée en routine directement sur les selles (Koopmans and Duizer, 2004). Quelques exemples de trousse commercialisées sont rapportés dans le Tableau 4.

La difficulté du diagnostic des **norovirus** est liée à la grande diversité des génotypes. Les trousse de diagnostic EIA commercialisées peuvent être composées de mélanges d'anticorps monoclonaux et/ou polyclonaux pour augmenter la spécificité du test (Castriciano et al., 2007). L'ELISA est une technique spécifique (Battaglioli et al., 2012). Les tests d'immunochromatographie sont également utilisés pour leur rapidité (Khamrin et al., 2008 ; Kirby et al., 2010 ; Battaglioli et al., 2012). La limite de détection des norovirus par immunochromatographie est de 10^7 à 10^8 copies par gramme de selles (Khamrin et al., 2008). Ces méthodes sont plus sensibles que la microscopie électronique mais moins sensibles que les techniques de biologie moléculaire (Castriciano et al., 2007 ; Khamrin et al., 2008 ; Kirby et al., 2010).

La détection des **rotavirus de groupe A** dans les selles peut être réalisée par l'utilisation de trousse de détection commercialisées (Immunochromatographie, ELISA) qui sont très spécifiques, et bien que moins sensibles que la RT-PCR, sont plus sensibles que les tests d'agglutination (Bon et al., 2007 ; Gautam et al., 2013). Parmi ces tests commercialisés se trouvent des trousse d'immunochromatographie permettant à la fois la détection des rotavirus de groupe A mais également des Adénovirus (Bon et al., 2007). Il serait cependant utile de disposer de trousse de diagnostic permettant la détection de tous les agents viraux responsables de gastro-entérites (Rovida et al., 2013b).

Nom du test (fournisseur)	Type de test	Virus ciblé	Type d'échantillon	Référence
HEV IgM et IgG (Wantai)	ELISA	VHE	Sérum	Abravanel et al., 2013
EIAgen HEV IgM et IgG (Adaltis)	EIA	VHE	Sérum	Abravanel et al., 2013
Monolisa anti-HAV IgM EIA et Monolisa anti-HAV EIA (Bio-Rad)	EIA	VHA	Sérum	Arcangeletti et al., 2011
ETI-AB-HAV-IgMK Plus and ETI-AB-HAVK Plus (DiaSorin S.p.A.)	EIA	VHA	Sérum	Arcangeletti et al., 2011
RIDASCREEN Norovirus (R-Biopharm AG)	ELISA	Norovirus GI et GII	Selles	Castriciano et al., 2007 ; Kirby et al., 2010 ; Rovida et al., 2013b
IDEA NLV GI/GII (Dako Ltd)	EIA	Norovirus GI et GII	Selles	Castriciano et al., 2007 ; Kirby et al., 2010
RIDAQUICK Norovirus (R-Biopharm AG)	immunochromatographie	Norovirus (GI) GII	Selles	Kirby et al., 2010 ; Battaglioli et al., 2012
NV-AD (Denka Seiken)	ELISA	Norovirus GI et GII	Selles	Khamrin et al., 2008
NoV-immunochromatography (Denka Seiken)	immunochromatographie	Norovirus GII-3 et GII-4	Selles	Khamrin et al., 2008
Rota Strip (Cypress Diagnostic)	immunochromatographie	Rotavirus A	Selles	Bon et al., 2007
Rotascreen (Microgen)	immunochromatographie	Rotavirus A	Selles	Bon et al., 2007
VIKIA Rota/Adeno (bioMérieux)	immunochromatographie	Rotavirus A et Adenovirus	Selles	Bon et al., 2007 ; de Rougemont et al., 2009
Diarlex (Orion Diagnostica)	immunochromatographie	Rotavirus A et Adenovirus	Selles	Bon et al., 2007
Combo Rota/Adeno (All Diag)	immunochromatographie	Rotavirus A et Adenovirus	Selles	Bon et al., 2007
Rota/Adeno Combi Stick (bmd)	immunochromatographie	Rotavirus A et Adenovirus	Selles	Bon et al., 2007
Argène	ELISA	Rotavirus A	Selles	Bon et al., 2007
Slidex Rotakit (bioMérieux)	Agglutination	Rotavirus A	Selles	Bon et al., 2007
RIDASCREEN Rotavirus (R-Biopharm AG)	ELISA	Rotavirus	Selles	Gautam et al., 2013
Premier Rotaclone (Meridian Bioscience)	EIA	Rotavirus	Selles	Gautam et al., 2013
ProSpecT (Oxoid)	EIA	Rotavirus	Selles	Gautam et al., 2013
IDEIA Rotavirus (Dako)	ELISA	Rotavirus A		de Rougemont et al., 2009
RIDASCREEN Astrovirus (R-Biopharm AG)	ELISA	Astrovirus	Selles	Rovida et al., 2013b
RIDAQUICK Rotavirus /Adenovirus Combi (R-Biopharm AG)	immunochromatographie	Rotavirus A et Adenovirus	Selles	Rovida et al., 2013b

Tableau 4 : Exemples de trousse EIA commercialisées pour les virus entériques

Le diagnostic des virus hépatiques est un diagnostic indirect, reposant sur la recherche d'anticorps dans le sérum des patients. Quelques exemples de trousse commercialisées sont rapportés dans le Tableau 4.

Le diagnostic de **l'hépatite A** est basé sur la détection des IgM anti-VHA, qui apparaissent quelques jours avant le début de la symptomatologie et disparaissent au bout de trois à six mois (www.cnrvha-vhe.org/). Les tests EIA réalisés à partir du sérum des patients peuvent cibler uniquement les IgM, ou cibler à la fois les IgM (infection aiguë) et les IgG (infection passée), notamment pour identifier les individus susceptibles au VHA et candidats à la vaccination (Arcangeletti et al., 2011).

Le diagnostic de **l'hépatite E** peut être réalisé grâce à l'utilisation d'une trousse de détection EIA commercialisée et permettant de détecter les anticorps anti VHE de type IgM et IgG (Abravanel et al., 2013). Les anticorps peuvent être utilisés pour cibler les quatre génotypes de VHE, mais des essais spécifiques des génotypes 3 et 4 ont été développés (Pelosi and Clarke, 2008). Il faut noter cependant que devant un tableau d'hépatite E aiguë, les anticorps peuvent ne pas être détectés, ce qui nécessite la mise en évidence de la présence du génome viral par des méthodes moléculaires (Abravanel et al., 2013).

Les techniques EIA peuvent être facilement utilisées dans les laboratoires en raison de leur simplicité et de leur rapidité. Elles peuvent être utilisées en routine pour des screening rapides et sensibles (Castriciano et al., 2007). Ces techniques peuvent être cependant limitées par la disponibilité en anticorps spécifiques (Boonham et al., 2013) dont la production peut être laborieuse et coûteuse.

2-3 Méthodes moléculaires

Aujourd'hui, les méthodes de biologie moléculaire sont largement utilisées en virologie. Elles nécessitent deux principales étapes: l'extraction du virus à partir de la matrice, puis la détection des génomes viraux (ARN/ADN).

2-3-1 Extraction des virus

Les méthodes d'extraction des particules virales sont différentes en fonction du type de matrice.

2-3-1-1 A partir des selles

Les selles provenant de patients atteints de gastro-entérites ou d'hépatites virales sont éluées dans du PBS (Phosphate Buffered Saline, c'est-à-dire du tampon phosphate salin, qui est une solution isotonique et non toxique) ou de l'eau distillée à 10% (poids/volume), puis soumis à une centrifugation de clarification. Le surnageant contenant les virus entériques est récupéré et subit directement le processus d'extraction du génome viral, puis sa détection.

2-3-1-2 A partir des eaux et des aliments

Les matrices alimentaires peuvent être classées en trois catégories, les eaux (potables, environnementales), les matrices à contamination virale de surface (fruits, végétaux) et les matrices à contamination virale interne (viandes, coquillages).

Le processus d'extraction des virus à partir des matrices alimentaires nécessite trois étapes : l'étape d'éluition des particules virales des matrices, l'étape de concentration des particules virales et l'étape d'extraction des acides nucléiques (Stals et al., 2012). Ces étapes sont résumées dans la Figure 25.

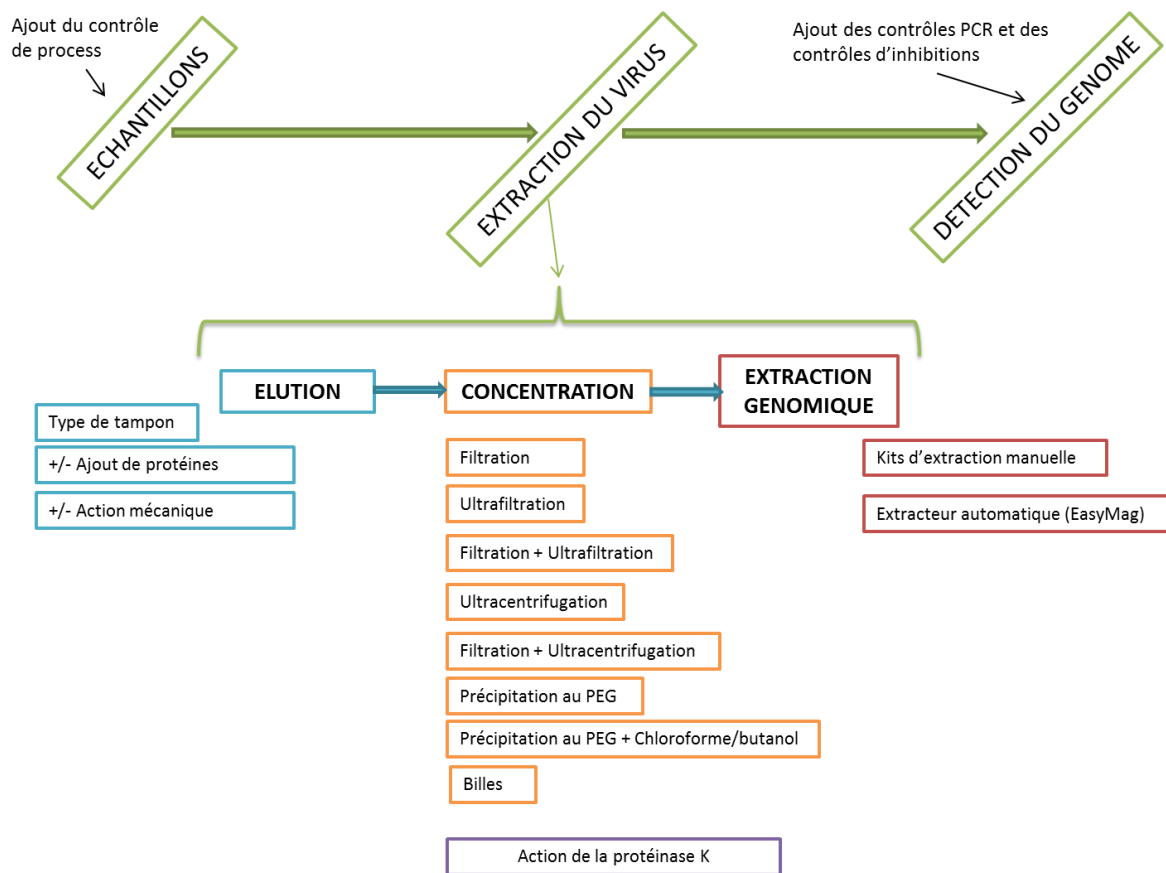


Figure 25 : Etapes nécessaires et contrôles pour la détection de virus à partir de matrices alimentaires

2-3-1-2-1 Elution

La phase d'éluion permet de récupérer les particules virales adhérees à la surface des aliments (par exemple sur les laitues ou les fruits rouges).

L'acidité favorisant la fixation des virus entériques à la matrice alimentaire, les tampons d'éluion utilisés sont généralement de pH neutre ou basique (notamment pour les matrices acides) (Stals et al., 2012). Les plus communs sont l'eau distillée, le PBS et le Tris-Glycine en présence ou non d'extrait de bœuf.

La phase d'éluion est également utilisée pour les aliments dont la contamination virale est interne (ex VHE dans les foies ; virus entériques dans les coquillages). Il est alors nécessaire d'ajouter une action mécanique afin de maximiser l'éluion virale, comme par exemple le

stomacher ou le FastPrep®-24 homogénéiser pour l'élution du VHE dans les saucisses et les figatelles (Martin-Latil et al., 2014).

L'ajout de protéines lors de la phase d'élution permet d'améliorer l'efficacité de cette étape : la glycine qui est capable de réduire l'adsorption non spécifique du virus à la matrice (Dubois et al., 2002 ; Stals et al., 2012) ; l'extrait de bœuf généralement utilisé à une concentration de 1% ou de 3% (poids/volume) qui permet également de réduire l'adsorption non spécifique du virus à la matrice et qui permet de faciliter sa floculation lors de la phase de concentration par le PEG (voir le paragraphe « 2-3-1-2-2 Concentration ») (Dubois et al., 2002 ; Stals et al., 2012 ; Dubois et al., 2007; Blaise-Boisseau et al., 2010 ; Love et al., 2008) ; la poudre de protéine de soja qui permet d'augmenter la libération des virus des matrices alimentaires (Rzezutka et al., 2006) ; la pectinase qui permet de limiter la formation de gelée de fruits lors des étapes ultérieures (Dubois et al., 2002 ; Rzezutka et al., 2006 ; Butot et al., 2007) ; ou des molécules telles que le CatFloc qui permettent de faire flocculer les résidus de matières solides pour les éliminer plus facilement (Rzezutka et al., 2006 ; Le Guyader et al., 2009).

Le choix du tampon en fonction de la matrice et de la technique de concentration utilisée jouent ainsi sur la sensibilité de la méthode qui est évaluée en partie sur les rendements d'extraction viraux obtenus (c'est-à-dire le pourcentage de la quantité de virus détectée après extraction divisée par la quantité de virus présente au départ) (Fino and Kniel, 2008 ; Kim et al., 2008 ; Cheong et al., 2009 ; Butot et al., 2007 ; Dubois et al., 2002 ; Hyeon et al., 2011 ; Pan et al., 2012 ; Martin-Latil et al., 2014).

2-3-1-2-2 Concentration

Après l'élution des particules virales, une étape de concentration des virus est généralement nécessaire, à cause des faibles taux de contamination virale dans les matrices alimentaires. Plusieurs techniques de concentration peuvent être utilisées en fonction de différents paramètres (virus, matrice, volume d'élution, inhibiteurs...).

Les principales techniques de concentration utilisées sont la filtration, l'ultrafiltration, l'ultracentrifugation et la précipitation par le polyéthylène glycol (PEG). Il est possible

d'améliorer la purification des virus en associant ces techniques à une étape de chloroforme/butanol (cf Figure 25 et Tableau 5).

Techniques utilisées	MATRICES		
	Eaux	Contamination virale de surface	Contamination virale interne
Filtration	+	+	
Ultrafiltration	+	+	
Ultracentrifugation	+	+	+
PEG	+	+	+
Chloroforme/butanol		+	
Billes	+	+	
Protéinase K			+

Tableau 5 : Techniques de concentration et de purification utilisées en fonction du type d'aliments contaminés

La technique de **filtration** consiste à filtrer l'eau ou l'éluat tout en recueillant les particules virales à la surface de filtres dont les pores peuvent être de différentes tailles (0,20µm à 0,45µm).

Les filtres (membranes en nitrocellulose, cellulose, polyamide) sont chargés négativement ou positivement afin de créer une interaction électrostatique entre les particules virales chargées et la membrane, ce qui permet de les retenir (Gensberger and Kostic, 2013). Différents types de filtres peuvent être testés en fonction du virus recherché car cela peut avoir une incidence sur les rendements de récupération (Di Pasquale et al., 2010).

La technique de filtration est le plus souvent réalisée pour la recherche des virus entériques avec une membrane électropositive et a été appliquée avec succès aux eaux minérales et eaux de réseau contaminées par VHA, VHE, NoV GI, NoV GII, le bactériophage MS2, MNV (murine norovirus) avec des rendements d'extraction allant de 1% à 100% en fonction du virus étudié et du type d'eau (Perelle et al., 2009 ; Blaise-Boisseau et al., 2010 ; Schultz et al., 2011 ; Martin-Latil et al., 2012b ; Hennechart-Collette et al., 2014). La technique de filtration avec une membrane électronégative a été utilisée pour la recherche du VHA et des adénovirus dans de l'eau distillée, de l'eau de mer, de l'eau d'effluents d'eaux usées traitées,

avec des rendements allant de 10 à 100% et pour la recherche des norovirus et des astrovirus dans les eaux environnementales, avec des rendements allant de 3 à 64% (Rigotto et al., 2009 ; Victoria et al., 2009).

La filtration s'applique généralement aux eaux claires et peu turbides (Gensberger and Kostic, 2013). Pour éviter que le filtre ne colmate avec un éluat trop chargé en particules ou molécules, il est possible de réaliser une pré-filtration sur un filtre dont les pores seraient plus grands.

La technique **d'ultrafiltration** permet de concentrer les molécules en fonction de leur poids moléculaire.

L'association de la filtration et de l'ultrafiltration a été décrite pour la recherche de virus (FCV (calicivirus félin), rotavirus, VHA) dans l'eau et les épinards, ainsi que pour le VHA et les adénovirus dans de l'eau distillée, de l'eau d'effluents d'eaux usées traitées, de l'eau de mer et de l'eau récréative de lagon (Rigotto et al., 2009 ; Di Pasquale et al., 2010 ; Brassard et al., 2011). Les rendements d'extraction varient de 10% et 100%, et dépendent du type d'eau et du type de virus entériques (Rigotto et al., 2009).

La technique d'**ultracentrifugation** peut être utilisée après l'étape d'éluion afin de culotter les virus. Cependant, Stals et al., (2012) fait état de plus faibles pourcentages de rendements de récupération des particules virales qu'avec la technique du PEG, que ce soit pour les fruits, les coquillages, les végétaux, la charcuterie. De plus, les molécules organiques issues de la matrice, pouvant inhiber la détection moléculaire des génomes viraux, sont également récupérées dans le culot avec les particules virales.

L'association de la filtration et de l'ultracentrifugation a été testée pour VHA, FCV, rotavirus et NoV GII dans des eaux, de la laitue, du jambon ; cette technique est simple, sensible et efficace en termes de rendements (Di Pasquale et al., 2010 ; Prata et al., 2012 ; Summa et al., 2012) .

Le **polyéthylène glycol** (PEG) permet de précipiter les particules virales, sans précipiter le matériel organique, permettant la récupération des particules virales dans le culot après centrifugation. Il est nécessaire d'ajouter préalablement du Chlorure de Sodium (NaCl) à haute concentration (0,3 à 0,5M) et de travailler à pH neutre afin que la précipitation des

particules virales soit maximale (Stals et al., 2012). Cette méthode a été utilisée pour la concentration des virus entériques à partir des végétaux (Cheong et al., 2009 ; Scherer et al., 2010 ; Sánchez et al., 2012b ; El-Senousy et al., 2013), des fruits rouges (Cheong et al., 2009 ; Scherer et al., 2010 ; Summa et al., 2012), des tomates séchées (Martin-Latil et al., 2012a), des eaux d'irrigation et des eaux de stations d'épuration (El-Senousy et al., 2013 ; Gensberger and Kostic, 2013), des coquillages (Baert et al., 2007 ; Le Guyader et al., 2009), du jambon (Scherer et al., 2010) et des matrices carnées (Martin-Latil et al., 2014).

Une élution à pH neutre ou basique, suivie d'une concentration au PEG peut donner des rendements d'extraction des virus de l'ordre de 5% à 90% en fonction des matrices alimentaires, de la détection moléculaire et des virus recherchés (Stals et al., 2012).

L'ajout d'une étape de purification par le **chloroforme/butanol** est couramment utilisé pour les matrices les plus complexes (fruits rouges et matrices grasses notamment). Cela permet de s'affranchir de certaines molécules inhibitrices, mais la possibilité de perte de virus lors de cette étape n'est pas négligeable (Summa et al., 2012). Il est donc important de vérifier que cette étape est nécessaire lors de la mise au point d'un protocole. Ainsi, une filtration après l'élution de VHA sur la laitue peut donner de meilleurs résultats que la concentration par le PEG suivie de la purification par le chloroforme-butanol (Hyeon et al., 2011) tandis que cela permet de réduire significativement la présence des inhibiteurs lors de la récupération de VHA dans les coquillages (Atmar et al., 1995).

Cette étape est particulièrement utilisée pour les fruits rouges (Summa et al., 2012 ; Kim et al., 2008 ; Stals et al., 2011) et les tomates séchées (Martin-Latil et al., 2012a).

2-3-1-2-3 Traitement à la protéinase K

Un traitement des matrices alimentaires par la protéinase K, sans réaliser les étapes d'élution / concentration, peut permettre de limiter les possibles pertes du virus lors des centrifugations (Comelli et al., 2008). Ce traitement libère le génome viral après avoir dégradé les capsides virales (Stals et al., 2012). Il est surtout appliqué pour les tissus digestifs des coquillages qui concentrent les virus entériques (Comelli et al., 2008 ; Uhrbrand et al., 2010 ; Lees, 2010).

2-3-1-2-4 Utilisation de billes magnétiques

Une autre technique utilisant des billes magnétiques (conjuguées à des récepteurs ou des anticorps spécifiques des virus ciblés) peut être utilisée pour séparer les particules virales du reste de la matrice et les concentrer. Les virus sont ensuite le plus souvent élués à forte température (95°C pour Yang et al., 2011), ce qui entraîne également l'extraction des génomes viraux.

Ainsi, des billes magnétiques conjuguées à de la **mucine** gastrique de porc, qui contiennent des récepteurs de norovirus, les antigènes tissulaires de groupes sanguins (HBGA, Histo-Blood Group Antigen) (Tan and Jiang, 2005 ; Tian et al., 2008), ont été utilisées pour concentrer les norovirus à partir d'eaux usées ; cette technique permet de concentrer 333 fois les virus, tandis que la technique de filtration ne permet de concentrer que 239 fois le virus (Tian et al., 2011). Les billes magnétiques conjuguées à de la **mucine** gastrique de porc ont également été utilisées pour concentrer et permettre la détection des norovirus à partir de matrices alimentaires (tomates, laitues, myrtilles). Cette méthode a permis d'obtenir des rendements de récupération des norovirus significativement meilleurs (8,75%) que la méthode de concentration utilisant le PEG (1 à 5%) (Pan et al., 2012).

La sensibilité de cette méthode pourrait être liée à la plus faible extraction de molécules inhibitrices de la PCR à partir de la matrice (Gensberger and Kostic, 2013 ; Tian et al., 2008 ; Tian et al., 2011 ; Pan et al., 2012).

De même, des billes magnétiques liées à des **anticorps** ont été utilisées pour concentrer des entérovirus, le VHA, des rotavirus dans des eaux propres et eaux usées, ou après l'étape d'éluion (sur des laitues et des fraises), permettant de limiter l'extraction de molécules inhibitrices de la matrice, ce qui a conduit les auteurs à conclure à une sensibilité satisfaisante, avec une concentration des virus d'un facteur 10 (Bidawid et al., 2000 ; Casas and Sunen, 2002 ; Yang et al., 2011).

Des études reprenant ces techniques de concentration et le traitement à la protéinase K sont reportées dans le Tableau 6 (*pages suivantes*).

Tableau 6 : Exemples de protocoles mis au point pour la récupération des virus entériques à partir des matrices

Matrice	Virus	Méthode de concentration	Rendements / résultats obtenus	Références
Eau	VHA	Filtration	Il n'y a pas d'influence sur les résultats des 4 types de filtres testés (2 électro-négatifs et 2 électro-positifs).	Di Pasquale et al., 2010
Eau minérale et eau de réseau	VHA, MSZ	Filtration	Les rendements d'extraction obtenus pour VHA et MSZ sont respectivement de 12 à 81% et 26 à 64% dans l'eau embouteillée et de 10 à 28% et 8 à 19% dans l'eau de réseau	Blaise-Boisseau et al., 2010
Eau minérale	VHA, Norovirus GI et GII, FCV	Filtration vs ultrafiltration vs ultrafiltration	Les meilleurs rendements d'extraction sont obtenus avec la technique de filtration. La moyenne des rendements est de 51% pour VHA, de 34% pour FCV, de 61% pour NoV GI et 35% pour NoV GII.	Schultz et al., 2011
Eau minérale et eau de réseau	VHE, MNV	Filtration	Les rendements d'extraction obtenus pour VHE et MNV sont respectivement compris entre 51 et 130% et 26 et 64% dans l'eau embouteillée et entre 41% et 120% et 7 et 25% dans l'eau de réseau.	Martin-Latil et al., 2012b
Eau minérale et eau de réseau	NoV GI, NoV GII, MNV	Filtration	Les rendements d'extraction obtenus pour NoV GI, NoV GII et MNV sont compris entre 2 et 44%, 2,4 et 16,4% et 2 et 10% pour l'eau embouteillée et entre 1 et 48%, 1,6 et 17% et 1 et 7% pour l'eau de réseau.	Hennechart-Collet et al., 2014
Eau distillée, eau d'effluents d'eaux usées traitées, eau de mer et eau récréative	VHA et Adénovirus	filtration avec membrane négative puis élution puis ultrafiltration	Les rendements d'extraction obtenus varient de 10% et 100%, et l'efficacité de la méthode dépend du type d'eau et du type de virus entériques	Rigotto et al., 2009
Eau	VHA	Ultrafiltration vs filtration	Les rendements d'extraction sont moindres avec une ultrafiltration qu'avec une filtration (perte des particules virales avec la multiplication des étapes d'extraction)	Perelle et al., 2009
Eau de réseau	VHA	Ultrafiltration	Les rendements d'extraction obtenus pour VHA sont de l'ordre de 20%.	Dubois et al., 2007
Eau	HAV, FCV	filtration + ultrafiltration	Les résultats montrent une mauvaise sensibilité de la technique pour VHA (LOD à 10 ⁵ TCID ₅₀ /1,5L) mais acceptable pour FCV (LOD à 10 ² TCID ₅₀ /1,5L).	Di Pasquale et al., 2010
Eau	FCV, Rotavirus, VHA	filtration + ultrafiltration	Mise au point d'un même protocole pour l'extraction des bactéries et virus, avec une limite de détection de 10 PFU/ml pour FCV, VHA et rotavirus	Brassard et al., 2011
Eaux d'irrigation	Norovirus	PEG	La concentration au PEG est une méthode efficace pour avoir de bons rendements d'extraction (22 à 43% dans les eaux d'irrigation)	El-Senousy et al., 2013
Eaux usées	Entérovirus, VHA	billes magnétiques vs PEG	L'utilisation de ces billes permet de concentrer l'échantillon d'un facteur 10 et est efficace pour s'affranchir des molécules inhibitrices présentes dans la matrice, au contraire de la technique d'élution-concentration utilisant le PEG. La sensibilité obtenue est jugée satisfaisante par les auteurs, avec une limite de détection de 0,1 à 1 PFU pour entérovirus et VHA.	Casas and Sunen, 2002
Eaux propres et eaux usées	Rotavirus	billes immunomagnétiques	L'utilisation de billes immunomagnétiques permet de limiter l'extraction de molécules inhibitrices, mais la sensibilité de la technique est limitée, due à l'utilisation de gel d'agarose en aval (lors de cette étude du moins) (Gensberger and Kostic, 2012)	Gensberger and Kostic, 2013
Eau	VHA + FCV	filtration + ultracentrifugation	La sensibilité de la technique est acceptable pour VHA (LOD à 10 ⁵ TCID ₅₀ /1,5L) et pour FCV (LOD à 10 ¹ TCID ₅₀ /1,5L).	Di Pasquale et al., 2010
Eaux récréationnelles et usées	Rotavirus, Adénovirus	filtration + ultracentrifugation détection des VLP (virus like particle) par épifluorescence	L'association filtration + ultracentrifugation est la technique la plus simple et efficace en termes de rendements d'extraction : 69% dans les eaux usées et 76% dans les eaux récréatives.	Prata et al., 2012

Matrice	Virus	Méthode de concentration	Rendements d'extraction / résultats obtenus	Références
Fruits rouges	Norovirus	PEG + Chloroforme butanol	Les rendements d'extraction obtenus pour Norovirus sont compris entre 6 et 80%.	Kim et al., 2008
Fruits rouges	Norovirus, MNV	PEG + Chloroforme butanol	Une variation des rendements d'extraction est observée en fonction du type de fruits (rendements d'extraction de 7 à 61% pour Norovirus, et de 7 à 75% pour MNV).	Stals et al., 2011
Framboises, fraises	VHA, Norovirus, Rotavirus	Ultrafiltration vs PEG	Les rendements d'extraction obtenus par ultrafiltration sont de l'ordre de 15% pour VHA, de 8% pour Norovirus et compris entre 2 et 15% pour Rotavirus, comparés à des rendements tous inférieurs à 5% en PEG.	Butot et al., 2007
Laitues, fraises	VHA	billes coâtées avec de l'anticorps monoclonal anti-HAV +/- filtration	La minimisation des inhibiteurs de PCR avec type d'extraction permet d'augmenter la sensibilité de l'essai.	Bidawid et al., 2000
Fraises, laitues	Norovirus, Enterovirus, Adenovirus, Rotavirus	PEG vs filtration vs ultrafiltration	La concentration par PEG plus efficace pour Norovirus dans les fraises (rendements d'extraction de 50%) et les laitues (rendements d'extraction de 2,9%). En moyenne, rendements meilleurs en PEG.	Cheong et al., 2009
Tomates, laitues, myrtilles	Norovirus	billes magnétiques-mucine vs PEG	La concentration des virus par les billes donne significativement de meilleurs rendements de récupération des virus (8,75%) que la méthode PEG (1 à 5%).	Pan et al., 2012
Laitues, jambon, framboises	Norovirus	Ultrafiltration vs PEG	L'ultrafiltration permet d'obtenir des rendements d'extraction compris entre 3 et 9%; moindres que ceux obtenus par la technique du PEG, avec des rendements d'extraction de l'ordre de 7 de 24 %.	Scherer et al., 2010
Framboises, laitues et jambon	Norovirus	ultracentrifugation vs PEG + chloroforme butanol	La purification par chloroforme/butanol permet de s'affranchir de certaines molécules inhibitrices, malgré la possibilité de perte de virus lors de cette étape. Les rendements d'extraction obtenus pour NoV Gil avec la technique d'ultracentrifugation sont meilleurs que ceux obtenus avec la technique du PEG + Chloroforme/butanol dans la laitue (respectivement 9% et 5%) et le jambon (respectivement 9% et 7%), au contraire des framboises (respectivement 0,8% et 4%).	Summa et al., 2012
Laitues	VHA	Elution puis Filtration	Les rendements d'extraction obtenus avec la technique de filtration sont meilleurs (47,3%) que ceux obtenus avec la technique PEG + chloroforme/butanol (24,9%).	Hyeon et al., 2011
Epinards	FCV, rotavirus, VHA	filtration + ultrafiltration	Le même protocole a été optimisé pour la récupération des bactéries et des virus, avec une limite de détection de 100 PFU/g pour VHA et 10 PFU/g pour rotavirus (FCV n'est pas détecté)	Brassard et al., 2011
Végétaux	VHA, Norovirus, MNV	PEG	Le même protocole a été optimisé pour la récupération des bactéries et des virus. Les rendements d'extraction obtenus sont respectivement de 9%, de 43% et de 20% pour Norovirus, MNV, et VHA.	Sanchez et al., 2012
Végétaux	Norovirus	PEG	La concentration des virus par PEG est une méthode efficace pour avoir de bons rendements d'extraction (de 28 à 48% dans les salades).	El-Senousy et al., 2013
Tomates séchées	VHA, MNV	PEG + Chloroforme butanol vs ultracentrifugation	Les 2 méthodes ont les mêmes rendements d'extraction et les mêmes LOD (rendements entre 12,61 et 50,92% pour VHA, entre 2,48 et 7,91% pour MNV).	Martin-Latil et al., 2012a
Tissus digestifs des coquillages	Norovirus	protéinase K vs PEG et ultracentrifugation	La méthode d'extraction par protéinase K limite les possibles pertes du virus lors des centrifugations pour les autres méthodes testées. Seule la méthode à la protéinase K permet de détecter G1.3 et G11.4 avec des rendements d'extraction de 3 et 3,5%.	Comelli et al., 2008
Coquillages	VHA, Norovirus, FCV, Mengovirus	protéinase K	L'action de la protéinase K suivie de l'extraction du génome est la meilleure méthode.	Uhrbrand et al., 2010
Saucisses, figatelles de porc	VHE, MNV	PEG	Les rendements d'extraction moyens de VHE et MNV-1 sont respectivement de 3,94% et 2,92% dans les saucisses, et de 18,38% et 13,11% dans les figatelles.	Martin-Latil et al., 2014

2-3-1-2-5 Extraction des acides nucléiques

Après la concentration des particules virales (par élution / concentration) ou le traitement à la protéinase K, une étape d'extraction des acides nucléiques viraux est réalisée. Aujourd'hui, cette étape est souvent réalisée à l'aide de kits d'extraction de génomes commerciaux. Ces kits sont basés sur le principe d'extraction des acides nucléiques décrit par Boom et al. (1990).

Les kits les plus couramment utilisés sont le « kit manuel » QIAamp Viral RNA Mini kit de Qiagen (Comelli et al., 2008 ; Kim et al., 2008 ; Butot et al., 2007 ; Scherer et al., 2010), le « kit manuel » MiniMag NucliSens de Biomérieux (Rutjes et al., 2005 ; Girard et al., 2013) et sa forme automatisée, l'EasyMag NucliSens de Biomérieux (Comelli et al., 2008 ; Martin-Latil et al., 2012a, 2012b, 2014).

Il y a peu de différence en termes de sensibilité entre l'extraction manuelle par le kit de Qiagen et l'extraction automatique par l'EasyMag NucliSens (Perelle et al., 2009 ; Schultz et al., 2011), mais plutôt un gain de temps, une standardisation et une simplification des actes au sein du laboratoire.

2-3-2 Détection du génome viral

2-3-2-1 Amplification du génome

2-3-2-1-1 Principales techniques

Après l'extraction des génomes viraux (ARN, ADN), les virus entériques sont détectés par l'amplification *in vitro* d'une région ciblée du génome, spécifique de l'agent recherché, par les techniques de PCR qui ont révolutionné les méthodes de diagnostic. Ces méthodes sont plus sensibles et plus rapides que les méthodes traditionnelles (culture cellulaire, microscopie, immunologie) (Lévêque et al., 2012).

La technique de PCR classique, qui a été largement adoptée par les laboratoires, consiste à détecter en point final les produits PCR amplifiés par électrophorèse, et dont l'identification peut ensuite être confirmée par Southern Blot ce qui accroît le temps de l'analyse, le nombre de manipulations après-PCR, ainsi que le risque de contamination au sein des laboratoires.

La technique de PCR quantitative en temps réel (qPCR) permet de coupler la réaction de PCR avec une mesure en temps réel des séquences amplifiées (augmentation exponentielle). La détection des amplicons générés à chaque cycle d'amplification nécessite l'utilisation d'agents intercalants se fixant sur les doubles brins d'ADN (par exemple le Sybr Green) ou l'utilisation de sondes fluorescentes s'hybridant sur l'amplicon de manière spécifique (Tse and Capeau, 2003). La quantification de l'ADN est obtenue grâce à la valeur de Ct ("Cycle Threshold" ou cycle seuil), qui correspond au nombre de cycles PCR nécessaire pour que la fluorescence soit détectée par l'appareil dans l'échantillon. Cette valeur de Ct peut être reliée à une quantité d'ADN grâce à l'utilisation d'une gamme étalon ou être comparée à celle d'un gène de référence.

La qPCR a progressivement remplacé la PCR classique, car elle est très reproductible, permet de quantifier l'échantillon et d'éviter toutes les étapes après-PCR (telles que l'électrophorèse, Southern Blot) et limite ainsi le risque de contaminations par les produits d'amplification au sein du laboratoire ainsi que le temps nécessaire à l'analyse (Tse and Capeau, 2003 ; Lees, 2010).

La technique de qPCR multiplex est utilisée lorsque qu'il y a plusieurs cibles à détecter dans un même échantillon, et consiste à analyser les différentes cibles dans une même réaction en ajoutant les différents sets d'amorces et sondes en même temps, ce qui permet de réduire ainsi le volume de l'échantillon utilisé pour les analyses d'une part, et de réaliser des analyses sur un plus grand nombre d'échantillons, permettant ainsi un gain de temps et de moyens.

En (RT-) qPCR, le multiplexage est possible en présence d'agents intercalants (SybrGreen), avec une différenciation des amplicons par HRM (High Resolution Melt= courbes de fusion haute résolution ; c'est-à-dire par l'analyse de la température précise où les deux brins de l'ADNc amplifiés se séparent). Cela peut aussi être réalisé en présence de sondes (ex : sondes TaqMan) qui sont marquées par des fluorophores différents. La limite théorique du nombre de cibles détectées par multiplex est alors fixée par la limite des canaux de lecture de l'appareil ; en pratique il faut également prendre en compte que la sensibilité de la détection ne doit pas être modifiée par la présence de différents modèles moléculaires (non-spécificité, appariement d'amorces). Le Tableau 7 donne des exemples de multiplexage pour les virus entériques.

Type de PCR	Virus	Ref
RT-qPCR duplex	virus cible + contrôle de process : VHA + MNV-1	Martin-Latil et al., 2012a
RT-qPCR duplex	virus cible + contrôle de process : VHE + MNV-1	Martin-Latil et al., 2012b
duplex	cible et son contrôle interne d'inhibition	Dreier et al., 2005 ; D'Agostino et al., 2011 ; Gregory et al., 2006 ; Hata et al., 2011
duplex	2 virus cibles : norovirus GI et GII	Stals et al., 2011 ; Jothikumar et al., 2005
RT-qPCR triplex	deux cibles et un contrôle de process : norovirus GI et GII et MNV-1	Hennechart-Collette et al., 2014
quadriplex	3 virus cibles et un contrôle de process : VHA, norovirus GI et GII et mengovirus	Fuentes et al., 2014
deux RT-qPCR multiplex	Deux multiplex : norovirus genogroupes I et II, rotavirus groupe A, astrovirus, adenovirus groupe F (40 et 41) et sapovirus, en présence d'un contrôle interne de PCR	Van Maarseveen, et al., 2010
Deux RT-qPCR multiplex	pour VP4 : G1, G2, G3, G4 et G9 et pour VP7 : P4 et P8 par RT-qPCR en 2 multiplex (G1-G2-P4-P8 / G3-G4-G9) (Génotypage du rotavirus)	Kottaridi et al., 2012
RT-PCR et RT-qPCR	multiplex pour les 4 coronavirus humains	Gaunt et al., 2012
Multiplex RT-qPCR	rotavirus, norovirus, sapovirus, astrovirus, et enteric adenovirus	Pang et al., 2014

Tableau 7 : Exemple de multiplexage en détection moléculaire virale

D'autres techniques basées sur l'amplification d'acides nucléiques peuvent être utilisées comme alternative à la (q)PCR, telles que la LAMP (Loop Mediated Isothermal Amplification) ou la NASBA (Nucleic Acid Sequence Based Amplification). La LAMP est isothermique et permet l'amplification de l'ADN et de l'ARN (possibilité de réaliser une transcription inverse (reverse transcription, RT)), la détection est réalisée par photométrie. Cette technique est sensible, elle résiste davantage aux inhibiteurs présents dans les échantillons cliniques que la PCR, elle peut être quantitative, mais il est difficile de dessiner les quatre à six amorces nécessaires (Fakruddin et al., 2013). La NASBA permet l'amplification d'ARN principalement (mais peut dans certains cas amplifier également l'ADN), est isothermique, sensible, peut être quantitative mais la taille des amplicons est limitée à 100 à 250 pb (Fakruddin et al., 2013). Ces techniques sont encore peu utilisées en diagnostic et nécessitent souvent d'être améliorées.

2-3-2-1-2 RT-qPCR

La plupart des virus transmissibles par la voie alimentaire sont des virus à ARN, il est donc nécessaire de réaliser une étape de transcription inverse (RT) préalablement à la (q)PCR. La RT-(q)PCR peut être réalisée en deux étapes (Stals et al., 2011) ou en une étape (Uhrbrand et al., 2010, Martin-Latil et al., 2012a, 2012b, 2014).

Les régions ciblées par les modèles moléculaires doivent être suffisamment conservées pour pouvoir amplifier et détecter toutes les souches d'une même espèce virale ciblée.

Le Tableau 8 récapitule les régions génomiques ciblées pour détecter les principaux virus entériques. Ces régions sont spécialement choisies en raison de leur faible variation de séquences entre les souches d'une même espèce.

Virus	Région amplifiée	Référence
VHA	5'NTR ; VP4	Jothikumar et al., 2005 ; Costafreda et al., 2006 ; Joshi et al., 2008 ;
VHE	ORF3 (Protéine de capsid) ; ORF2	Jothikumar et al., 2006 ; Enouf et al., 2006
norovirus GI	jonction ORF1/ORF2	Da Silva et al., 2007 ; Svraka et al., 2007
norovirus GII	jonction ORF1/ORF2	Loisy et al., 2005 ; Kageyama et al., 2003
sapovirus	Jonction Polymérase / Protéine de capsid ; Polyprotéine	Chan et al., 2006 ; Logan et al., 2007
rotavirus	NSP3 ; VP6 ; VP2	Pang et al., 2004, 2011 ; Zeng et al., 2008 ; Logan et al., 2006 ; Gutierrez-Aguirre et al., 2008
astrovirus	3'NTR ; Protéine de capsid ; ORF 1a (protéase)	Le Cann et al., 2004 ; Logan, 2007 ; Van Maarseveen et al., 2010
aichi virus	5' NTR ; région 3CD	Drexler et al., 2011 ; Yamashita et al., 2000
adénovirus	Hexon protein (protéine de capsid)	Van Maarseveen et al., 2010
cosavirus	5'NTR	Kapoor et al., 2008 ; Stöcker et al., 2012
TBEV	gène de l'enveloppe ; 3'NTR	Schwaiger and Cassinoti, 2003 ; Gaumann et al., 2010
picobirnavirus	segment 2	Rosen et al., 2000
bocavirus	gènes NS1 et NP-1	Lu et al., 2006b

Tableau 8 : Région du génome amplifiée par PCR, RT-PCR pour la détection des virus de l'hépatite A et E, norovirus, sapovirus, rotavirus, astrovirus, aichi virus, adénovirus entériques, cosavirus, TBEV, picobirnavirus et bocavirus

La région 5'NTR des *Picornavirus* très conservée, quelles que soient les génotypes des souches d'une espèce virale donnée, est ciblée pour la détection par RT-qPCR, du **VHA**, d'**aichi virus** et de **cosavirus**.

La grande diversité des séquences de **norovirus** implique que les modèles moléculaires de RT-(q)PCR soient spécifiques du génogroupe, et qu'ils soient réactualisés avec les nouvelles

séquences publiées régulièrement. La détection moléculaire des norovirus de génogroupes I et II est réalisée dans la région de la jonction ORF1/ORF2 car seule cette petite région est suffisamment conservée au sein de chaque génogroupe (Vinjé, 2014).

La détection moléculaire des **sapovirus** est réalisée dans la région très conservée au sein de l'espèce de la jonction polymérase / capsid (Chan et al., 2006 ; Logan et al., 2007).

Le diagnostic de **VHE** par biologie moléculaire est réalisé par RT-qPCR. Il est difficile de dessiner les amorces qui soient spécifiques et sensibles vu la grande hétérogénéité génétique des souches. Il n'existe pas de méthode standard et les amorces et sondes utilisées en RT-qPCR pour cibler les quatre principaux génotypes peuvent cibler plusieurs régions génomiques, dont l'ORF2 (Enouf et al., 2006) ou l'ORF3 (Jothikumar et al., 2006). Les diagnostics immunologique et moléculaire sont complémentaires et sont utilisés conjointement en clinique, mais l'analyse des échantillons environnementaux est réalisée par RT-(q)PCR (Pelosi and Clarke, 2008).

Le diagnostic typique des **entérovirus** est réalisé par culture cellulaire, qui est une technique nécessitant plusieurs jours. De plus en plus d'essais RT-qPCR sont développés pour le diagnostic des entérovirus (Monpoeho et al., 2000 ; Mohamed et al., 2004 ; Dierssen et al., 2008 ; Piqueur et al., 2009 ; Jothikumar et al., 2010 ; La Rosa et al., 2010a). La haute diversité des entérovirus doit être prise en compte lors de la mise au point de ces essais (Dierssen et al., 2008 ; Fuhrman et al., 2005). Des essais ont été mis au point afin de détecter conjointement les entérovirus et les parechovirus, qui sont également des Picornaviridae, autrefois echovirus 22 et 23 dans le genre Enterovirus, mais reclassés par l'ICTV en genre Parechovirus depuis 1999 (ICTV, 7th reports ; Selvaraju et al., 2012 ; Nielsen et al., 2013).

Les techniques de biologie moléculaire sont utilisées pour la détection des **coronavirus** humains car ces virus sont difficilement cultivables et il n'existe pas d'anticorps spécifiques (Vabret et al., 2009). Leur détection se fait par RT-PCR suivie d'une PCR nichée ou d'une hybridation moléculaire spécifique, mais est de plus en plus souvent remplacée par le diagnostic par RT-qPCR. La grande variabilité de génomes rend difficile la détection des quatre coronavirus humains (HKU1, NL63, OC43 et 229E), et il est alors nécessaire de

développer des stratégies soit d'amorces dégénérées (Jevšnik et al., 2012), soit de PCR multiplex (Dare et al., 2007 ; Gaunt et al., 2010 ; Kuypers et al., 2007).

Les divergences de génome entre les bocavirus **HBoV** et HBoV2 font que le modèle de détection moléculaire en PCR du HBoV ne peut pas être utilisé pour la détection de HBoV2 (Kapoor et al., 2009), ce qui a nécessité le développement d'un modèle spécifique en qPCR du HBoV2 par Xu et al. (2011).

2-3-2-1-3 Contrôles

La mise en place de contrôles pour la validation des résultats analytiques est une nécessité, dans le but d'éviter les faux positifs ou les faux négatifs. Différents types de contrôle sont utilisés afin de vérifier d'une part le bon déroulement du processus d'extraction dans son ensemble (utilisation de contrôles de process) et d'autre part la faisabilité des réactions de PCR (contrôles de PCR, contrôles de process, contrôles d'inhibition). En effet, même si le développement de méthodes d'extraction virales propres à chaque matrice vise à limiter la présence des inhibiteurs de PCR tout en maximisant l'extraction des particules virales, des molécules inhibitrices peuvent être éluées, concentrées et extraites en même temps que les particules virales (Gensberger and Kostic, 2013).

La (RT-q)PCR est une réaction enzymatique et est donc sensible aux inhibiteurs (substances chimiques hétérogènes, organiques et non organiques), pouvant être issus de la matrice (par exemple les ions calcium, les polysaccharides, les graisses, le glycogène, les minéraux, les enzymes, les protéines, les protéinases...) (Schrader et al., 2012). Ces substances inhibitrices peuvent interférer à différentes étapes de la détection des virus : interférence avec les acides nucléiques, inhibition de la transcription inverse, dégradation ou modification des ADN, hybridation non optimale des amorces ou de la sonde, dégradation, inhibition ou altération de l'ADN polymérase, interférence avec les fluorophores des sondes (Schrader et al., 2012). Ces substances inhibitrices diminuent alors la sensibilité de la réaction PCR et peuvent être à l'origine de faux négatifs en diagnostic (Schrader et al., 2012). Il est donc nécessaire de contrôler la présence des inhibiteurs et leurs effets sur les réactions de PCR (D'Agostino et al., 2011 ; Schrader et al., 2012).

2-3-2-1-3-1 Contrôles de process

Un contrôle négatif et un contrôle positif de process sont nécessaires afin de valider le processus d'extraction dans son ensemble.

Le **contrôle de process négatif** est un échantillon non contaminé qui subit l'ensemble du processus d'extraction et de détection virale, et qui ne doit pas être amplifié lors de la réaction de qPCR, indiquant une absence de contamination virale tout au long du processus analytique (Rodriguez-Lazaro et al., 2013).

Le **contrôle de process** est un virus, ajouté à une concentration connue au tout début du processus d'extraction et qui permet de vérifier que l'extraction virale dans son ensemble s'est déroulée correctement (Lees, 2010 ; Diez-Valcarce et al., 2011). Idéalement, le contrôle de process doit être morphologiquement, physicochimiquement et génétiquement proche du virus humain pathogène recherché, pouvoir être extrait de la même manière et avec la même efficacité que le virus humain pathogène, être facilement cultivable et ne pas se retrouver naturellement dans les matrices alimentaires (Lees, 2010 ; Stals et al., 2012 ; Diez-Valcarce et al., 2011). Plusieurs virus ont été utilisés comme contrôles de process, dont les quatre principaux sont MNV (norovirus murin), FCV (calicivirus félin), mengovirus et MS2 (voir Tableau 9).

Le **FCV** et le **MNV** sont deux virus appartenant à la famille des *Caliciviridae* et infectent respectivement les chats et les souris. Ce sont des virus non enveloppés, à capsid icosaédrique, dont le génome est un brin unique d'ARN positif d'environ 7500 nt. Le MNV a notamment été récemment découvert comme le seul norovirus capable de se répliquer en culture cellulaire (Wobus et al., 2004). Le FCV et le MNV ont aussi été utilisés comme modèles d'études pour évaluer les process industriels de désinfection virale (Fraisie et al., 2011 ; Butot et al., 2008 ; Butot et al., 2009 ; Huang et al., 2014).

Le **MS2** est un bactériophage des entérobactéries. Il appartient à la famille *Leviviridae* et au genre *Levivirus*. Il s'agit d'un virus non enveloppé, sphérique, de diamètre de 26nm environ. Son génome est constitué d'un ARN simple brin positif, d'environ 4000 nt, comprenant quatre ORF codant pour quatre protéines (deux protéines structurales, CP et A, et deux protéines non structurales).

Le **mengovirus** est un membre de la famille des *Picornaviridae* (comme le virus de l'hépatite A, les aichi virus, les cosavirus et les entérovirus) et appartient au genre *Cardiovirus*. C'est un

virus non enveloppé, à capsidre icosahédrique, dont le génome est constitué d'un ARN simple brin positif d'environ 8000 nt (Costafreda et al., 2006).

Virus contrôle de process	Virus entériques	Références
MS2	VHA	Blaise-Boisseau et al., 2010
	NoV GII	Scherer et al., 2010
FCV	VHA	Mattison et al., 2009
	VHA	Di Pasquale et al., 2010
	NoV, VHA	Schultz et al., 2011
MNV	adénovirus	Diez-Valcarce et al., 2011
	NoV GI et GII	Stals et al., 2011
	VHA et NoV	Sánchez et al., 2012b
	NoV GI et GII	Hennechart-Collette, et al., 2014
	VHA	Martin-Latil et al., 2012a,
	VHE	Martin-Latil et al., 2012b, 2014
mengovirus	VHA et NoV	Lees, 2010
	VHA	Costafreda et al., 2006
	NoV GI et GII	Comelli et al., 2008
	NoV GI et GII	Le Guyader et al., 2009
	VHA, NoV GI et GII	Uhrbrand et al., 2010
	NoV GII	Summa et al., 2012

Tableau 9 : Exemples d'utilisation de virus contrôle de process en fonction du virus entérique recherché

Des études sont nécessaires pour choisir le virus contrôle de process en fonction du virus humain pathogène recherché et de la matrice testée. Récemment, une étude visant à déterminer le meilleur contrôle de process en fonction de trois matrices alimentaires a démontré que le MNV semble être le contrôle de process le plus pertinent pour la détection du VHA et des norovirus GII dans l'eau embouteillée, les laitues et les tomates séchées, ainsi que pour la détection des norovirus GI dans les laitues, tandis que le mengovirus semble être plus pertinent pour la détection norovirus GI dans l'eau et les tomates séchées (Hennechart-Collette et al., *manuscript en préparation*).

2-3-2-1-3-4 Contrôles PCR

Le **contrôle négatif** (tous les réactifs de qPCR sauf l'échantillon génomique) permet de vérifier qu'il n'y a pas de faux positifs dus à une contamination de la réaction de qPCR (Rodriguez-Lazaro et al., 2013).

Le **contrôle positif** (tous les réactifs de qPCR + un échantillon de cible à détecter) permet de vérifier que l'amplification de la cible est efficace (Rodriguez-Lazaro et al., 2013).

2-3-2-1-3-3 Contrôles d'inhibition

Les contrôles d'inhibition sont des acides nucléiques ajoutés au moment de la réaction de qPCR, afin d'évaluer l'importance des inhibitions de la réaction de PCR. Deux types de contrôle d'inhibition peuvent être utilisés pour s'affranchir de résultats faussement négatifs: le contrôle interne d'inhibition et le contrôle externe d'inhibition.

Le **contrôle interne d'inhibition (IAC)** est un acide nucléique de concentration connue, dont la séquence est partiellement ou totalement différente de la séquence du virus cible. Il est détecté dans le même puits qPCR que celui où est recherchée la cible, grâce à une détection en duplex de la cible et de l'IAC. Cette approche permet de révéler la présence d'inhibiteurs de la PCR et de la séquence recherchée dans le même tube réactionnel (c'est-à-dire dans le même extrait d'acides nucléiques) (Hoorfar et al., 2004 ; Dreier et al., 2005 ; D'Agostino et al., 2011).

Deux stratégies différentes de construction des IAC sont rapportées dans la littérature : les **IAC compétitifs** (mêmes amorces pour amplifier la cible et le IAC, mais sondes différentes) et les **IAC non compétitifs** (amplification de l'IAC et de la cible avec des amorces et sondes différentes) (Hoorfar et al., 2004). Des inconvénients existent pour ces deux types d'IAC. En ce qui concerne les IAC compétitifs, la compétition pour les amorces peut entraîner une baisse de l'efficacité d'amplification de la cible virale et donc de la sensibilité de la réaction. En ce qui concerne les IAC non compétitifs, l'utilisation de deux modèles moléculaires différents peut conduire à deux efficacités d'amplification différentes selon le niveau d'influence de la présence d'inhibiteurs sur chacune des réactions de PCR. Cela peut donc entraîner un biais dans l'évaluation de l'amplification de la cible (Hoorfar et al., 2004 ; Gregory et al., 2006 ; Hata et al., 2011).

Le **contrôle externe d'inhibition (EAC)**, qui est un ARN ou un ADN de la cible recherchée, est ajouté en quantité connue à la réaction de qPCR contenant l'extrait génomique viral issu de la matrice. L'efficacité d'amplification est alors calculée en tenant compte des résultats de l'amplification de l'EAC seul (D'Agostino et al., 2011 ; Costafreda et al., 2006). Ce contrôle

permet de connaître le niveau d'inhibition de la réaction de PCR spécifique de la cible recherchée. Cependant, cette approche nécessite deux réactions de PCR différentes pour réaliser le contrôle d'inhibition d'une part et la détection de la cible virale d'autre part.

2-3-2-2 Puce d'hybridation

Une puce d'hybridation permet la détection moléculaire de produits d'amplification (obtenus suite à une (RT)-PCR) en les hybridant à des sondes spécifiques fixées à une surface solide (verre, silicium, plastique). L'identification de cibles multiples peut alors être obtenue simultanément (Lévêque et al, 2012).

Les puces d'hybridation à ADN peuvent être de deux types selon la densité des sondes testées. Les **puces à haute densité** permettent de tester des milliers de produits d'amplification de pathogènes potentiels en même temps. Ainsi, une puce de détection et de typage des norovirus par 726 sondes a été développée et utilisée pour l'analyse de selles de patients (Mattison et al., 2011). De même, deux puces d'hybridation avec respectivement 13000 et 91000 sondes ont été mises au point afin de détecter et de génotyper les principaux virus transmis par l'alimentation (VHA, VHE, coxsackievirus A et B, norovirus GI et GII, astrovirus, sapovirus et rotavirus), avec une limite de détection de l'ordre de 10^5 génomes viraux (Ayodeji et al., 2009 ; Chen et al., 2011).

Les **puces d'hybridation à basses densité** (10 à 40 sondes environ) sont utilisées en microbiologie clinique et ont permis la détection et le génotypage de norovirus (génogroupes GI et GII, et de certains génotypes) et d'astrovirus (détection de l'espèce et détection des types 1 à 5) à partir de selles et d'eaux environnementales (Jääskeläinen and Maunula, 2006 ; Brinkman and Fout, 2009) et la détection des principaux virus responsables de gastro-entérites (norovirus, rotavirus, adénovirus et astrovirus) à partir de selles (Kim et al., 2012).

Globalement, cette approche confère une plus grande sensibilité que les méthodes traditionnelles (isolement de virus par culture cellulaire et immunofluorescence) mais sa sensibilité est moindre que celle obtenue en (q)PCR et n'est pas en adéquation avec les faibles quantités de virus retrouvés en virologie alimentaire. De plus, ce sont des techniques

non quantitatives, assez longues, et comprenant plusieurs étapes, avec un risque potentiel de contaminations par des produits d'amplification au sein du laboratoire (Lévêque et al, 2012).

2-3-2-3 Approches récentes de détection moléculaire et de typage

De nouvelles approches de détection et de typage moléculaires sont disponibles grâce aux évolutions récentes des techniques de biologie moléculaire, comme les PCR arrays (ou puce qPCR), la Digital PCR (nouvelle méthode de quantification par qPCR) et les techniques de séquençages de nouvelle génération (NGS).

2-3-2-3-1 PCR Array

La qPCR ne permet la détection que d'un nombre de pathogènes limité par réaction, malgré les développements de qPCR multiplex. Il est donc intéressant de disposer d'outils permettant la détection et la quantification de microorganismes à plus grande échelle. Récemment les innovations dans la miniaturisation des PCR a permis de réaliser des PCR à haut débit (Devonshire et al., 2013), entraînant la réduction du volume réactionnel PCR au niveau du nanolitre et réduisant ainsi les volumes de réactifs et d'échantillons nécessaires. La qPCR à haut débit permet de tester rapidement un grand nombre de marqueurs génétiques et de développer la détection d'un grand nombre de cibles pour le diagnostic clinique et environnemental avec des résultats fiables et rapides.

2-3-2-3-2 Digital PCR

La Digital PCR (dPCR) est une technique de qPCR en point final, décrite depuis les années 1990, permettant une quantification absolue de l'échantillon sans nécessiter l'utilisation de gamme standard (nécessaire en RT-qPCR classique).

Le principe de la dPCR est de partitionner chacun des échantillons en un très grand nombre de micro-réactions de PCR individuelles, de telle sorte que chaque compartiment individuel ait soit une, soit zéro copie de l'ADN d'intérêt (Sedlak et al., 2013 ; Morisset et al., 2013). Le nombre de réactions positives (présence de produit d'amplification de la PCR) et négatives

(absence de produit d'amplification de la PCR) est ensuite compté (cf Figure 26) et permet de calculer directement le nombre de copie-génomés initialement présente dans l'échantillon en se basant sur la loi statistique de Poisson (Sedlak et al., 2013 ; Morisset et al., 2013).

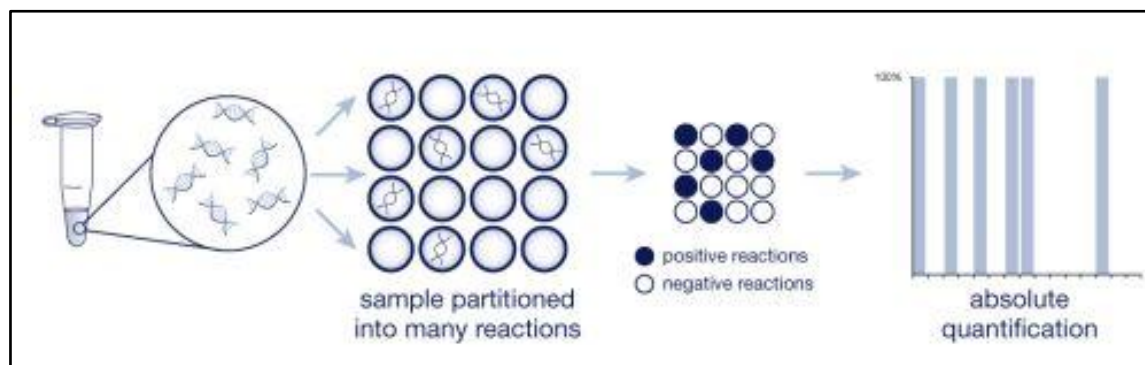


Figure 26 : Principe général de la quantification des ADN/ARN par Digital PCR (www.appliedbiosystems.com/absite/us/en/home/applications-technologies/real-time-pcr/real-time-pcr-instruments/openarray-real-time-pcr-system/digital-pcr-using-openarray.html)

La loi de Poisson permet de prendre en compte les sous-estimations liées au fait que deux molécules d'ADN puissent se trouver simultanément dans le même puits PCR (Sedlak et al., 2013).

Plusieurs types de plateformes de digital PCR sont actuellement disponibles (Tableau 10).

Appareils commercialisés	Système de partitionnement	Nombre d'échantillons	Volume réactionnel et nombre de réactions par échantillon	Nombre total de réactions	Estimation du prix de l'analyse
Biomark Digital Array (Fluidigm)	Plaquette	12 ou 48	6nl x 765 0,85nl x 770	9180 36 960	400\$/ puce
OpenArray (Life Technologies)	Plaquette	1 à 48	Volume final 33nl x 3072 Ajustement du nombre de réactions en fonction du nombre d'échantillons	3072	150\$/ puce
QX100 (Bio-Rad)	Droplet (gouttelette)	8	1nl x 20 000	160 000	3\$/ échantillon
RainDrop (RainDance)	Droplet (gouttelette)	8	5pl x 1-10 millions	80 millions	10 à 30\$/ échantillon

Tableau 10: Quatre différents appareils de digital PCR (Inspiré de Sedlak et al., 2013 ; Devonshire et al., 2013)

Il existe deux types de partitionnement du mix réactionnel contenant l'échantillon, le partitionnement sur une plaque *via* des canaux microfluidiques en micro-chambres individuelles et le partitionnement en gouttelettes lipidiques. Dans les deux cas, des centaines ou des milliers de réactions de qPCR individuelles d'un volume de l'ordre du nanolitre sont réalisés.

Le partitionnement du mix réactionnel permet notamment de réduire la susceptibilité de la PCR aux inhibiteurs, qui est un problème récurrent en microbiologie alimentaire (Hindson et al., 2011 ; Henrich et al., 2012 ; Dingle et al., 2013).

Le potentiel de la digital PCR (partitionnement en gouttelettes) a été exploré pour la détection de l'ARN de rotavirus extrait d'eaux environnementales (Rački et al., 2014). La sensibilité de cette méthode est comparable à celle de la RT-qPCR ainsi que la quantification de l'ARN viral. La digital PCR est moins sensible à la présence des inhibiteurs présents dans les matrices alimentaires et environnementales que la technique de qPCR (Rački et al., 2014 ; Morisset et al., 2013).

2-3-2-3-3 NGS

Le séquençage de nouvelle génération (NGS) existe depuis 2005, avec des appareils proposant différentes technologies et pouvant s'adapter à différents besoins: longues séquences, haut débit, temps nécessaire, coût... (Capobianchi et al., 2012).

En virologie, le NGS peut être utilisé avec plusieurs objectifs (Capobianchi et al., 2012):

- La découverte de nouveaux virus (par métagénomique) ou la caractérisation d'un virome (populations virales dans un environnement donné).
- La construction de la séquence complète d'un génome viral, lorsque celui est inconnu ou mal caractérisé.
- La caractérisation de la variation intra-hôte au cours du cycle viral infectieux, avec l'existence de quasi-espèces.

L'application en virologie alimentaire de ce type de technologie reste cependant difficile du fait des trop faibles concentrations virales retrouvées.

2-3-3 Génomotypage

Les différentes souches virales sont classées au sein des espèces en génogroupes/génotypes/sous-types.

Le séquençage complet des souches n'étant pas adapté à un génotypage de routine, des régions ciblées du génome sont généralement choisies pour être représentatives de la diversité génétique des espèces.

Le génotypage en routine des souches virales est donc classiquement réalisé par le séquençage d'une région définie du génome viral, après son amplification par (RT-)PCR grâce à des amorces conservées au sein de l'espèce. Ainsi, la souche étudiée peut être identifiée précisément avec ses génogroupe/génotype/sous-type et être comparée aux souches déjà identifiées dans les bases de données. Le Tableau 11 donne quelques exemples de régions génomiques utilisées pour le génotypage des souches.

Virus	Région séquencée	Référence
VHA	Jonction VP1/2A (168pb) ; VP1-2B (390pb) ; VP1 ; 2C	Schwarz et al., 2008 ; Nainan et al., 2006 ; Joshi et al., 2008
VHE	une séquence de 301pb en 5' de l'ORF2 ou une région de 306pb dans la RdRp (ORF1)	Pelosi and Clarke, 2008
Norovirus GGI et GGII	VP1 (ORF2) et/ou polymérase (ORF1)	Kroneman et al., 2013
Rotavirus	2 classifications possibles : sous-groupe I et II par VP6 Ou génotypage par VP4 et VP7 (P et G)	Hoshino and Kapikian, 2000
Aichi virus	région 3CD	Kitajima et al., 2013

Tableau 11 : Régions du génome utilisées pour le génotypage des virus de l'hépatite A et E, des norovirus, des rotavirus et des aichi virus

Les conditions de classification en sous-types des différentes souches peuvent varier selon les espèces virales.

Deux souches de **VHA** sont classées dans le même génotype lorsque le pourcentage d'identité nucléotidique basé sur la séquence complète du génome est compris entre 80,7 et 86,2% et dans le même sous-génotype lorsque le pourcentage d'identité nucléotidique basé sur la séquence complète du génome est compris entre 88,9 et 90,4% (Joshi et al., 2008). Les régions localisées entre VP3 et la jonction VP1-2A peuvent être utilisées pour génotyper les

souches du VHA. En utilisant la région VP1/2A (168 nt), les souches sont classifiées en génotypes lorsque les variations nucléotidiques sont supérieures à 15%, et en sous-génotypes lorsque les variations nucléotidiques sont comprises entre 7,5% et 15% (Robertson et al., 1992).

Deux souches du **VHE** sont classées dans deux génotypes différents lorsque la variation de la séquence nucléotidique entière est supérieure à 25% (Okamoto, 2011b). Deux régions (en 5' de l'ORF2 ou dans la séquence génomique codant pour RdRp dans l'ORF1) peuvent être utilisées pour génotyper les souches.

Historiquement, les souches de **norovirus** sont classées dans le même génotype lorsque leurs protéines de capsides présentent plus de 80% d'identité (Green et al., 2001). Actuellement, deux régions génomiques sont utilisées pour génotyper les souches de norovirus (gène de la polymérase dans l'ORF1 et gène de la protéine de capside VP1 dans l'ORF2). Étant donné l'importance de la recombinaison au sein des norovirus, et de la localisation du point de recombinaison entre ces deux ORF, il est important de prendre en compte ces deux zones pour le génotypage des souches et récemment, il a été proposé une double nomenclature, basée sur les séquences partielles du gène de la polymérase (3' ORF1) et du gène de la protéine majeure de capside VP1 (ORF2) (Kroneman et al., 2013).

Le séquençage des produits d'amplification est la méthode standard pour réaliser le génotypage et est classiquement réalisé par la méthode Sanger, qui permet d'obtenir la séquence du type majoritaire contenu dans l'échantillon. Cependant, en cas de co-infection, cette technique ne permet pas de séquencer et ni d'identifier la présence de différentes souches au sein d'un même échantillon.

Ces séquences nucléotidiques virales sont utilisées pour réaliser des analyses phylogénétiques et permettent de faire de l'épidémiologie dans le temps et l'espace, pour étudier la diversité génétique de l'espèce virale et son évolution, ainsi que pour tracer les origines géographiques des souches. L'épidémiologie est également utile en microbiologie clinique pour tenter de retracer l'origine géographique de la transmission et pour comparer les souches retrouvées chez les patients. Enfin, en virologie alimentaire, cela peut permettre de relier différents patients à une même TIAC, et d'identifier l'aliment à l'origine de la contamination. Cependant, les faibles concentrations des ARN viraux extraits des matrices ne permettent pas toujours la détermination du génotype viral *via* le séquençage d'un

produit d'amplification lorsque la détection de l'espèce virale par PCR a été possible (Swinkels et al., 2014).

Des modèles moléculaires de RT-qPCR sont parfois disponibles pour détecter, quantifier et génotyper directement les virus entériques, comme par exemple pour les aichi virus de génotypes A et B dont les amplicons sont situés dans la région VP0, et ce génotypage par RT-qPCR est en accord avec celui de référence par séquençage de la région 3CD (Kitajima et al., 2013). En ce qui concerne les rotavirus, l'identification des génotypes I et II des souches de rotavirus par un test de RT-PCR a été mis au point dans la région VP6 (Nordgren et al., 2010). De même, le développement d'un test de RT-qPCR pour génotyper les rotavirus de groupe A sur la base de VP4 et VP7 permet de différencier les génotypes des protéines P et G respectivement, permettant d'identifier les génotypes G1, G2, G3, G4, G9 en association avec P4 et P8, notamment les génotypes G1[P8], G2[P4], G3[P8], G4[P8] et G9[P8] les plus prévalents (Kottaridi et al., 2012).

2-3-4 Normalisation des méthodes de détection

Le groupe de travail européen CEN/TC275/WG6/TAG4, a été créé en 2004 afin de proposer une méthode normalisée pour la détection des virus entériques dans des matrices alimentaires ciblées (Lees, 2010). Ces méthodes concernent les végétaux, les fruits rouges, l'eau embouteillée, les coquillages et les surfaces, et les virus ciblés sont les norovirus de génogroupes I et II (qui sont les virus majoritairement en cause lors des TIAC) et le virus de l'hépatite A (dont les conséquences de la maladie sont plus sévères). Les protocoles d'extraction du virus varient selon la nature de la matrice, et la détection du génome viral est réalisée par RT-qPCR. Deux spécifications techniques (TS) ont été publiées en 2013 pour une détection qualitative et une détection quantitative des génomes viraux issus des matrices alimentaires (Lees, 2010 ; ISO/TS 15216-1, 2013 ; ISO/TS 15216-2, 2013). Les essais inter-laboratoires (EIL) de validation des méthodes au niveau européen sont actuellement en cours d'analyse.

Pour la matrice « eau », le protocole de récupération du virus préconise une filtration, puis une ultrafiltration ; pour la matrice « végétaux », l'élution est réalisée avec le tampon

basique TGEB et la concentration par précipitation au PEG ; pour la matrice « fruits rouges », l'éluion est réalisée avec le tampon basique TGEB et la concentration par précipitation au PEG, suivie d'une purification au chloroforme-butanol ; pour la matrice « coquillages », les tissus digestifs sont récupérés et hachés, puis soumis à l'action de la protéinase K ; pour les « surfaces », le prélèvement viral est réalisé grâce à un écouvillon imbibé de tampon PBS ; l'étape de l'extraction du génome viral est ensuite réalisée.

La quantification des génomes viraux par RT-qPCR est effectuée avec des gammes de standards externes (ADN plasmidiques quantifiés par spectrométrie).

Les témoins et contrôle demandés dans ces spécifications techniques sont :

- Contrôle de process (pour contrôler l'ensemble du processus d'extraction)

Le choix du virus utilisé comme contrôle de process n'est pas imposé mais il doit respecter les critères suivants : virus cultivable, sans enveloppe, à ARN+ sb, de taille, de persistance dans l'environnement semblable aux virus pathogènes, tout en étant suffisamment différent sur le plan génétique des virus cibles (pour éviter les réactions PCR croisées), et non présent dans les aliments à l'état naturel. Le virus proposé dans les spécifications techniques est la souche MC₀ du mengovirus.

Le seuil de rendement d'extraction du virus contrôle de process doit être supérieur à 1% (en testant l'ARN extrait pur ou dilué au 1/10^e) afin de valider l'essai.

- Témoin externe d'amplification (pour vérifier les inhibitions de la RT-PCR dans un échantillon individuel)

Un ARN contrôle positif externe (du virus cible) est utilisé pour vérifier les inhibitions de la réaction de RT-qPCR, pour chacun des échantillons testés.

L'efficacité d'amplification du témoin positif externe doit être supérieure à 25% (ARN extrait pur ou dilué au 1/10^e) afin de valider l'essai.

2-4 Culture cellulaire

Les virus étant des parasites cellulaires obligatoires, des lignées cellulaires sont utilisées en routine pour amplifier les virus et pour mettre en évidence leur infectiosité par l'observation d'un effet cytopathogène, le plus souvent lié à la lyse des cellules hôtes infectées.

La culture cellulaire est peu coûteuse et reste la méthode de référence pour la mise en évidence des virus infectieux (Landry, 1991 ; Hamza et al., 2011b). Cependant, des lignées cellulaires permissives ne sont pas disponibles pour tous les virus entériques qui restent pour la plupart encore non cultivables.

2-4-1 Virus entériques cultivables

La culture cellulaire est une méthode limitée aux virus capables de se répliquer en culture de cellules tels que les souches de VHA adaptées à la culture, ainsi que les rotavirus, astrovirus, entérovirus, adénovirus et récemment le VHE (Koopmans and Duizer, 2004 ; Afssa, 2007 ; Okamoto, 2011b).

Voici quelques exemples de lignées cellulaires utilisées en virologie : des lignées issues de cellules de reins de singes (BGM, Vero, FrhK-4, MA-104, BS-C-1), des lignées issues de cellules humaines : cellules épithéliales de type 2 (Hep-2), cellules de carcinome primaire de foie (PLC/PRF/5), cellules de carcinome de poumon (A549), cellules de carcinome de colon (CaCo-2) ou cellules de rhabdomyosarcome (RD), cellules humaines de rein embryonnaire (293) (Brown et al., 1992 ; Hamza et al., 2011b).

Les principaux virus entériques capables de se répliquer et d'induire un ECP sont reportés dans le Tableau 12.

Virus	Lignées cellulaires	Références
VHA* (HM175, HAS-15, LSH/S)	FRhK-4, A549, BS-C-1, Caco-2	Cromeans et al., 1987 ; Wales et al., 2012 ; Blank et al., 2000
Rotavirus simien SA11 et humain Wa*	MA-104	Smith et al., 1979
Astrovirus	Caco-2	Guix et al., 2007
Entérovirus **	BGM, Caco-2, RD, MRC-5, MK	Chonmaitree et al., 1988 ; Hamza et al., 2011b
Adénovirus **	293(++), A549, PLC/PRF5, Caco-2, HeLa	Kim et al., 2010 ; Brown et al., 1992
Aichi virus	BS-C-1 et Vero	Reuter et al., 2011
VHE	PLC/PRF/5, A549	Okamoto, 2011b ; Takahashi et al., 2012

Tableau 12 : Exemples de lignées cellulaires permettant de répliquer les virus entériques

** : Souches adaptées à la culture cellulaire et utilisée comme modèles en laboratoire de recherche.*

*** : Plusieurs lignées cellulaires différentes sont nécessaires pour pouvoir cultiver les différents sous-types de virus appartenant à ces espèces virales.*

Des souches de **VHA** adaptées à la culture cellulaire, telles que HM175, HAS-15 et LSH/S peuvent se répliquer sur des lignées cellulaires FRHK4 et A549 et utilisées en laboratoire (Wales et al., 2012). La lignée cellulaire Caco-2 permet la réplication du VHA mais sans production d'ECP (Blank et al., 2000).

Les souches de **rotavirus** animaux (simien, porcine et bovine) peuvent se répliquer dans la lignée cellulaire MA-104 et induire un ECP. Les souches humaines sont plus difficiles à cultiver. Parmi elles, la souche Wa est utilisée au laboratoire comme souche modèle et peut se répliquer et induire un ECP modéré.

Il est parfois nécessaire d'utiliser plusieurs lignées cellulaires pour détecter l'ensemble des souches d'une même espèce, comme par exemple BGM, Caco-2, RD, MRC-5 ou MK pour les **entérovirus** qui regroupent les poliovirus, les coxsackievirus A et B, les echovirus et d'autres souches encore (Chonmaitree et al., 1988 ; Hamza et al., 2011b).

Les **adénovirus** sont classés en 7 espèces dont l'espèce F qui contient les sérotypes 40 et 41, appelés adénovirus entériques, dont la réplication est fastidieuse et produit un faible ECP sur les cellules 293 principalement (Brown et al., 1992). La construction d'une nouvelle lignée

cellulaire exprimant la protéine CMV IE1 (viral transactivator proteins cytomegalovirus (CMV) IE1) a été établie à partir de la lignée 293 et a montré une augmentation de la détection de l'ADN viral de 574% à 619% par rapport à la lignée cellulaire 293 conventionnelle (Kim et al., 2010). Cette nouvelle lignée a été testée avec des adénovirus entériques provenant d'échantillons environnementaux (eaux usées et eau de source) et a permis leur réplication et leur détection (Polston et al., 2014).

LE **VHE** a un tropisme hépatique et se réplique dans le cytoplasme des hépatocytes (Van der Poel, 2014). La présence du brin négatif de l'ARN, marqueur d'une réplication cellulaire, a pu être détectée dans des tissus hépatiques et extra-hépatiques d'animaux infectés expérimentalement (Yugo and Meng, 2013). Des essais de culture et de réplication *in vitro* ont été réalisés sur des lignées d'hépatocytes primaires de primates, sur des lignées cellulaires humaines variées dérivées de cellules embryonnaires de foie, de poumon, de fibroblastes, de cellules de cancer du foie, du colon, du poumon... (Okamoto et al., 2011a). Cependant aucune de ces lignées cellulaires n'a permis de répliquer le VHE à un titre élevé, ni d'induire un ECP (Okamoto et al., 2011a).

Récemment, deux lignées cellulaires PLC/PRF/5 (cellules de carcinome hépatocellulaire) et A549 (cellules de cancer du poumon) ont permis la réplication du VHE (avec un titre élevé d'ARN viral dans le surnageant de culture) de génotypes 3 et 4, issus des selles ou du sérum de patients (Okamoto, 2011b). Ces deux lignées cellulaires PLC/PRF/5 et A549 ont été utilisées pour tester l'infectivité de VHE issus de foies de porcs et de sangliers infectés et ont effectivement permis la réplication de VHE, prouvant ainsi que le virus présent dans le foie vendu comme aliment était infectieux (Takahashi et al., 2012). Enfin, la lignée cellulaire PLC/PRF/5 a également été utilisée pour réaliser une culture en 3-D des VHE issus de foie de porc et a permis de produire des virions infectieux et de démontrer la présence de VHE infectieux dans des saucisses de foie de porc destinées à la consommation en France (Berto et al., 2013a ; Berto et al., 2013b). Deux lignées cellulaires, issues de foie humain (HepaRG) et dérivées de cellules souches embryonnaires porcines (PICM-19), ont récemment été testées (Rogée et al., 2013). Ces deux lignées ont une morphologie et des propriétés fonctionnelles proches des hépatocytes et ont permis la culture *in vitro* de VHE avec une réplication du génome et le relargage d'ARN encapsidés.

2-4-2 Virus non cultivables

La culture cellulaire ne permet pas la détection des norovirus et des sapovirus (Afssa, 2007). Bien que les souches adaptées de VHA puissent se répliquer en culture cellulaire et induisent un ECP, les **souches cliniques de VHA** sont difficilement cultivables (réplication très lente avec détection des nouveaux virions formés pour certains génotypes à partir de 45 jours (données du CNR VHA (www.cnrvha-vhe.org/)). Une mutation dans la protéine non structurale 2B (Ala en Val 216) est connue pour avoir des conséquences importantes sur la réplication en culture cellulaire (Cristina and Costa-Mattioli, 2007).

De même, les **souches cliniques de rotavirus** sont difficilement cultivables et ne produisent pas ou peu d'ECP. Cependant, récemment, des organoïdes intestinaux humains formés grâce à la différenciation des cellules souches pluripotentes ont été utilisés comme modèles de tissu intestinal *in vitro* pour la culture des **rotavirus** (souche SA11 de laboratoire, puis souches cliniques issues de selles humaines) (Finkbeiner et al., 2012). Ce modèle cellulaire a permis la réplication des rotavirus et la production de virion infectieux.

La réplication cellulaire *in vitro* des **norovirus** représente un challenge depuis des années. Les recherches restent cependant infructueuses et aucune lignée cellulaire ne permet actuellement la culture cellulaire des norovirus en routine de façon reproductible (Duizer et al., 2004). Vingt-sept lignées cellulaires dérivées d'hôtes humains ou animaux (incluant notamment Caco-2, Ht-29, CRFK, FRhK-4, HeLa, Véro et MA-104) ont été évaluées pour leur permissivité vis-à-vis des norovirus en testant différentes conditions (conditions de maintien des monocouches des cellules, additifs dans le milieu de culture, méthodes d'inoculation des cellules, préparation de l'inoculum viral, génotypes du virus ...) mais aucun effet cytopathique n'a pu être observé, de même que la présence de norovirus (détection par RT-PCR) après plusieurs passages sur cellules (Duizer et al., 2004). Il semblerait que la culture *in vitro* des norovirus soit possible grâce à un modèle en 3-D d'épithélium humain de l'intestin grêle, avec observation d'ECP pour norovirus de génogroupes I et II (Straub et al., 2007). La lignée cellulaire INT 407 (ATCC) a été utilisée comme modèle d'épithélium car après différenciation, les cellules forment des microvillosités apicales qui servent de sites d'attachement initial aux norovirus humains.

Cette même équipe a ensuite développé deux modèles 3-D d'épithélium de colon en utilisant la lignée cellulaire Caco-2 et un de ses clones la lignée C2BBE1, dont les cellules forment des microvillosités apicales et qui ont un statut sécréteur, c'est-à-dire qu'elles expriment le gène FUT2 (fucosyltransférase 2, une des enzymes permettant la synthèse des antigènes tissulaires de groupes sanguins (HBGA, Histo-Blood Group Antigen)) (Straub et al., 2011 ; Straub et al., 2013). L'infection des cellules épithéliales par les norovirus dépend de leur fixation à un récepteur dont la partie glucidique est composée d'un HBGA. L'infection de ces cellules par les norovirus testés (GI.1 et GII.4) a induit la destruction d'une partie des microvillosités apicales et la réplication des norovirus a pu être démontrée par l'augmentation de la détection des ARN viraux par RT-qPCR (Straub et al., 2011 ; Straub et al., 2013). De plus, le modèle 3-D utilisant la lignée C2BBE1 a permis de démontrer que les particules virales de norovirus GII.4 produites étaient infectieuses (Straub et al., 2013).

Cependant ces résultats semblent être difficilement reproduits par d'autres laboratoires (Takanashi et al., 2014). Cela peut être expliqué par le type de lignée cellulaire utilisée (différentiation, statut sécréteur), la manière dont les cellules sont cultivées, la concentration virale inoculée et la proportion de virion infectieux dans l'inoculat.

Un modèle animal (souris BALB/c Rag- γ c-deficient) a récemment été découvert, permettant la réplication de norovirus humains GII.4 (Taube et al., 2013). La réplication des norovirus humains dans ces souris déficientes est dépendante du statut immunodéficient de l'hôte mais pas de la présence de cellules immunes humaines.

Etant donné la difficulté voire l'incapacité de nombreux virus entériques à se répliquer *in vitro*, la culture cellulaire est à ce jour une méthode non utilisable en routine pour le diagnostic viral dans le domaine de la virologie alimentaire (Koopmans and Duizer, 2004 ; Rodriguez et al., 2009 ; Hamza et al., 2011b).

De plus, cette technique est complexe à mettre en place dans le cadre de la virologie alimentaire car d'une part les taux de contamination virale sont très faibles, et d'autre part les virus sont récupérés de la matrice alimentaire qui peut contenir des composants cytotoxiques ou inhibiteurs, pouvant entraîner une baisse de la sensibilité du test voire l'apparition de faux négatifs (Hamza et al., 2011b).

2-5 Détection des particules infectieuses pour les virus non cultivables

Les particules virales infectieuses (=virions) sont constituées d'un génome protégé par une capsidie protéique qui permet également l'interaction avec la cellule hôte et son entrée dans la cellule hôte *via* les récepteurs cellulaires. Un virus est infectieux seulement si le génome viral est intact et si la capsidie virale n'est pas endommagée et conserve ses capacités de fixation au récepteur cellulaire (Rodriguez et al., 2009). Or, les virus entériques peuvent subir différents types de traitements qui peuvent les inactiver avec des efficacités différentes. L'inactivation virale peut résulter de processus naturels subis par les particules virales dans l'environnement (température, sécheresse, acidité) mais elle peut aussi être provoquée par des traitements de désinfection ou traitements technologiques appliqués à l'aliment contaminé au cours de son processus de production jusqu'à sa consommation (Seymour and Appleton, 2001). Les agents d'inactivation virale peuvent être chimiques (acides forts, bases fortes, agents oxydatifs (chlorine), alcools, formaldéhyde, etc), physiques (température, radiations électromagnétiques) et biologiques (enzymes ou produits microbiologiques qui peuvent dégrader la capsidie) (Cliver, 2009).

Chaque type de traitement inactive une ou plusieurs fonctions virales, comme le montre la Figure 27 (Wigginton et al., 2012). La plupart des agents d'inactivation agisse sur la capsidie car elle est directement exposée à l'environnement extérieur, mais peuvent également agir sur le génome viral (Cliver, 2009).

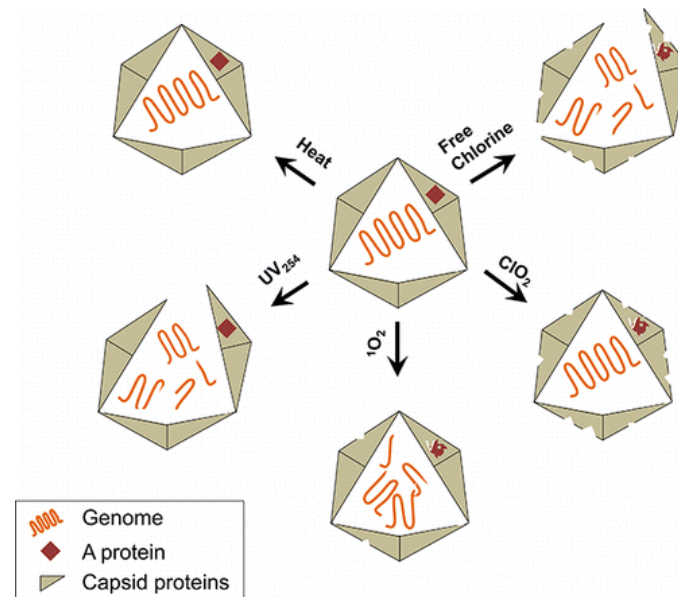


Figure 27 : Schéma des effets (sur la capsid virale, certaines protéines et le génome viral) de cinq agents virucides (température, UV, oxygène, chlore libre et dioxyde de chlore) sur le bactériophage MS2 (Wigginton et al., 2012)

Les virus entériques sont résistants à un pH de 3, mais tolèrent mal les pH élevés, qui les fragilisent et les rendent plus sensibles à leur environnement (Cliver, 2009).

Les agents oxydatifs comme le chlore, de même que les UV, dégradent à la fois la capsid et le génome viral, par exemple en rendant le génome non répliquable d'une part et en causant des clivages site-spécifiques des protéines de capsid, inhibant la libération du génome viral dans la cellule hôte (Cliver, 2009 ; Wigginton et al., 2012).

L'inactivation par la température a un effet sur la capsid, les faibles températures inactivent la capacité à reconnaître et à se lier aux récepteurs cellulaires, tandis que les plus fortes températures détruisent également la capsid protéique (Cliver, 2009 ; Wigginton et al., 2012).

Ces différents types de traitements peuvent jouer sur l'intégrité de la capsid ou du génome viral. Or, à l'heure actuelle, en l'absence de lignée cellulaire permissive pour tous les virus entériques, les meilleures méthodes de détection en virologie sont basées sur la détection du génome viral par les méthodes de biologie moléculaire, en particulier la qPCR, et ne donnent donc aucune indication sur le caractère infectieux de l'agent ; il est alors difficile d'évaluer le risque viral lié à un échantillon positif (par (RT-q)PCR) (Rodriguez et al., 2009 ;

Bosch et al., 2011 ; Gensberger and Kostic, 2013). Le développement de méthode de détection des virus entériques infectieux (non cultivables) apparaît donc aujourd'hui comme un véritable enjeu pour l'évaluation des risques viraux en santé publique et différentes approches méthodologiques ont été testées, comme l'ICC-PCR, la vérification de l'intégrité du génome, l'application de pré-traitements enzymatiques ou chimiques, la capacité à se lier au récepteur cellulaire ou la mesure des dommages oxydatifs de la capsid.

2-5-1 ICC-PCR

Les virus sont considérés comme infectieux lorsqu'ils peuvent pénétrer la membrane cellulaire et exprimer au moins un gène viral ou répliquer leur génome (Hamza et al., 2011b). La technique appelée ICC-PCR (integrated cell culture-PCR) permet de combiner les avantages de la culture cellulaire (détection du pouvoir infectieux) et de la PCR (rapidité, sensibilité). Elle consiste en une courte période de réplication cellulaire, suivie de la détection du génome par PCR (Rodriguez et al., 2009). De plus, lors de la phase de réplication, les brins + et – de l'ARN viral sont répliqués et peuvent être détectés, ainsi que les ARNm des virus à ADN, comme marqueurs de l'infectivité du virion. La technique d'ICC-PCR a été testée pour la détection du VHA et des entérovirus, rotavirus, réovirus, adénovirus et astrovirus (Rodriguez et al., 2009 ; Hamza et al., 2011b). Après inactivation virale, la détection du génome viral reste stable en qPCR classique mais décroît en ICC-qPCR (Gensberger and Kostic, 2013). Par rapport à la culture cellulaire, cette technique a l'avantage de pouvoir détecter également les virus qui ne produisent pas d'ECP mais elle n'est applicable qu'aux virus cultivables.

2-5-2 Génome amplifiable

Le génome des virus est nécessaire à leur réplication. Un moyen d'estimer le potentiel infectieux du virus est de vérifier l'intégrité de son génome. Pour cela, deux approches sont envisageables. La première consiste à amplifier par PCR des séquences de grande taille. En effet, plus la région à amplifier est grande, plus les chances de détecter les dommages sur le génome sont importantes (Hamza et al., 2011b).

La deuxième solution consiste à amplifier des régions du génome fragiles et qui sont les premières dégradées en cas d'inactivation virale (Li et al., 2002 ; Rodriguez et al., 2009). La région 5'NTR des *Picornaviridae*, notamment les 670 premiers nucléotides du génome de VHA, sont les plus sensibles à l'action de la chlorine et sont rapidement dégradés après une désinfection au chlore (Li et al., 2002). Cette région contient notamment l'IRES (internal ribosomal entry site), nécessaire à la traduction de l'ARN viral. Cibler cette région du génome pour sa détection par PCR peut être un bon moyen de corréler détection de l'ARN viral et capacité infectieuse du virus (Li et al., 2002 ; Rodriguez et al., 2009). La région 3'NTR de VHA est également sensible à l'action de la chlorine mais dans une moindre mesure que le 5'NTR, tandis que la région codante y est plus résistante (Li et al., 2002).

2-5-3 Pré-traitements PCR

L'intégrité du génome viral peut être un marqueur de l'état de la capsidie et donc du pouvoir infectieux du virion (Rodriguez et al., 2009). Les particules virales qui ont été inactivées ont leur capsidie partiellement abimée. L'action de traitements enzymatiques ciblant la capsidie et/ou le génome déjà altérés, réalisés préalablement à l'extraction du génome viral, limite l'amplification de leurs génomes par PCR et permet donc d'amplifier sélectivement les génomes des particules virales infectieuses dont la capsidie était intacte.

2-5-3-1 Protéases et nucléases

Une capsidie endommagée est plus susceptible à l'action d'une protéase qu'une capsidie intacte (Nuanualsuwan and Cliver, 2002). L'action de la protéase a notamment comme effet de libérer le génome viral de la capsidie endommagée, qui sera alors dégradé par l'action de la nucléase et ne sera donc plus détecté par l'amplification génomique.

L'action de la Protéinase K puis d'une RNase, appliquée à poliovirus, VHA et FCV, après une inactivation à haute température, par les UV ou par le chlore, permet effectivement de limiter l'amplification génomique par RT-qPCR (Nuanualsuwan and Cliver, 2002). Le traitement par la RNase du VHE permet de réduire le titre moléculaire après une inactivation thermique à 70°C mais surtout après une inactivation thermique à 95°C, et ce traitement reste efficace lorsque le virus est issu d'une matrice alimentaire (foie de sanglier)

(Schielke et al., 2011). Ce type de traitement a été utilisé pour détecter les norovirus GII et MNV infectieux après une inactivation aux UV. Pour la détection du MNV infectieux, l'action de la pronase et de la RNase (seules ou cumulées), suivie de la RT-qPCR a été comparée au titrage par culture cellulaire et le titrage moléculaire après ce traitement enzymatique se rapproche du titrage cellulaire infectieux (Rönnqvist et al., 2013).

En revanche, un traitement par la RNase appliqué au VHA suite à une inactivation thermique reste peu efficace, du fait que l'amplicon détecté par RT-qPCR est situé dans la région 5'NTR, une région riche en structures secondaires qui protégeraient l'ARN de l'action de la RNase (Sánchez et al., 2012a).

2-5-3-2 PMA/EMA

L'utilisation de monoazides photoinductibles comme le propidium monoazide (PMA) ou l'éthidium monoazide (EMA), combinée à la PCR ou la qPCR, a été décrite chez les bactéries, les parasites et les champignons pour distinguer les pathogènes infectieux des non infectieux (Hamza et al., 2011b). Les monoazides ont la capacité de se lier aux doubles hélices de l'ADN après photoactivation, ce qui rend alors impossible son amplification par PCR.

Récemment cette approche a été testée pour la détection des virus entériques infectieux. Cette approche est basée sur le fait que la capsid virale endommagée des virus inactivés permet l'entrée du monoazide (PMA ou EMA) qui peut ensuite se lier aux génomes viraux pour inhiber leur amplification. Le PMA et l'EMA sont des molécules qui se lient aux structures double brin de l'ADN mais la présence de structures secondaires dans les génomes des virus à ARN simple brin pourrait également permettre la liaison des monoazides (Parshionikar et al., 2010). De plus, l'efficacité du traitement PMA/EMA-qPCR pourrait être améliorée en augmentant la taille de l'amplicon (Contreras et al., 2011).

Cette approche a été testée récemment pour certains virus à ARN (virus de l'Influenza aviaire, coxsackievirus B5, poliovirus, echovirus 7, norovirus, MNV) avec plus ou moins de succès selon la souche virale et le type d'inactivation (Parshionikar et al., 2010 ; Graiver et al., 2010 ; Kim et al., 2011). Avec une forte inactivation thermique, les résultats obtenus par PMA-PCR sont satisfaisants car la capsid est plus fortement endommagée et améliore le passage du PMA à l'intérieur de la capsid ; une faible température d'inactivation (19°C ou

37°C selon le virus testé) peut suffire à induire des changements de conformation de la capsid e rendant la particule non infectieuse, mais sans permettre l'entrée du PMA rendant alors inefficace la technique de PMA-PCR (Parshionikar et al., 2010).

Les mêmes résultats sont observés pour un virus à ADN comme le bactériophage T4 ; l'inactivation thermique à 85°C est inefficace pour détruire sa capsid e, entraînant une amplification de son génome malgré le traitement au PMA, tandis qu'une inactivation thermique à 110°C détruit efficacement sa capsid e et permet après action du PMA de diminuer de 8 log₁₀ le titre moléculaire encore détecté (Fittipaldi et al., 2010).

Suite à une inactivation thermique de 20 min à 80°C du MS2 (bactériophage à ARN) et de 10 min à 72°C du MNV (virus à ARN), un traitement par le PMA avant l'amplification des génomes a été réalisé et a permis la discrimination des virions infectieux pour le MS2 mais pas pour le MNV. La différence de résultats obtenus pour ces deux virus peut s'expliquer par les tailles (3569 nt pour MS2 et 7352 nt pour MNV) et les structures secondaires différentes de ces deux génomes (Kim and Ko, 2012). La technique PMA-RT-qPCR appliquée au VHA, avec un amplicon dans la région 5'NTR (zone riche en structures secondaires) peut être efficace suite à une inactivation thermique de 99°C pendant 5 min (Sánchez et al., 2012a).

2-5-4 Capture des particules virales infectieuses

Diverses techniques de capture des particules virales infectieuses basées sur la capacité du virus infectieux à se lier à un anticorps, à un récepteur ou à une protéine ont été testées. Cette liaison spécifique permet d'isoler les particules virales infectieuses, dont le génome est ensuite extrait et détecté par (RT)-(q)PCR.

L'approche de la séparation immunomagnétique, qui consiste à fixer des **anticorps** sur des billes magnétiques, permet de faciliter la récupération et la concentration des virions liés grâce à l'utilisation d'un aimant. La séparation immunomagnétique a été utilisée pour récupérer les norovirus, rotavirus, entérovirus et le VHA issus d'échantillons d'eaux. Cette approche est proposée pour limiter l'extraction des inhibiteurs de PCR (Hamza et al., 2011b). Cependant, les protéines de la capsid e peuvent parfois permettre la liaison avec l'anticorps, malgré le fait que la particule virale ne soit plus infectieuse. Cela a été montré pour le VHA

suite à une inactivation par les UV, le chlore ou la chaleur, rendant ce système incapable de différencier les particules infectieuses des particules inactivées (Nuanualsuwan and Cliver, 2003).

La capacité des virions infectieux à se lier à leur **récepteur** a été utilisée pour séparer les particules infectieuses des particules inactivées. Les virions peuvent se lier à des cellules exprimant leur récepteur ou à des récepteurs qui sont fixés soit sur des microplaques, soit sur des billes magnétiques.

En utilisant la propriété d'adsorption des norovirus **sur les cellules Caco-2**, la détection des NoV après inactivation diminue de 1 à 3 \log_{10} en RT-PCR (Li et al., 2011). Ce type de test a été montré spécifique et sensible pour le poliovirus et le FCV qui ne peuvent plus se lier à leur récepteur cellulaire (respectivement sur les cellules FRhK-4 et CRFK) après inactivation (UV, chlore ou chaleur) et pour le VHA (sur les cellules FRhK-4) après une inactivation thermique ou au chlore (Nuanualsuwan and Cliver, 2003). En revanche, la liaison du VHA à son récepteur cellulaire est encore possible malgré une inactivation virale par les UV (Nuanualsuwan and Cliver, 2003).

La **mucine gastrique de porc** qui contiendrait les récepteurs des norovirus (HBGA) peut être utilisée sur des plaques ELISA ou des billes magnétiques pour lier les particules virales infectieuses de norovirus depuis des matrices alimentaires (laitues, fraises et huitres) (Tian et al., 2008). Cette approche a également pour effet de limiter la présence des inhibiteurs de la PCR (Cf partie « 3-1-2-4-Extraction des acides nucléiques »). La diminution de la liaison mucine/norovirus est observée à partir d'une inactivation thermique de 60°C ou d'une inactivation par pression (réduction de 3 \log_{10} à partir de 400 MPa), avec des ARN viraux qui ne sont alors plus détectés en RT-qPCR (Dancho et al., 2012). L'inactivation par les UV à partir de 1J/cm² entraîne également une perte de la liaison mucine/norovirus, mais aussi une absence de détection par RT-qPCR seule (sans doute due au fait que les UV dégradent l'ARN) (Dancho et al., 2012). Ces trois méthodes d'inactivation (température, pression et ultraviolet) ciblant la capsid virale empêchent la liaison norovirus-mucine, confirmant que la capacité du virus à se lier à la mucine est dépendante d'une capsid non endommagée (Dancho et al., 2012).

2-5-5 Mesure des dommages oxydatifs de la capsid

Une nouvelle approche basée sur la détection directe des dommages oxydatifs des protéines de la capsid virale permet de mesurer l'intégrité des protéines suite à l'exposition à des traitements d'inactivation.

L'intégrité de la capsid virale peut être évaluée en mesurant la production de groupes carbonyles (acides aminés oxydés) sur les protéines de la capsid. Les groupes carbonyles n'existent théoriquement pas sur les protéines intactes de capsid, et leur présence est corrélée avec une perte des fonctions protéiques (Sano et al., 2010). La présence de ces groupements carbonyles peut être utilisée comme marqueur de l'oxydation des protéines (Wigginton et al., 2012).

Les dommages oxydatifs sont détectés par liaison des virions *via* leurs groupements carbonyles avec de la biotine-hydrazide, qui sont ensuite purifiés sur une colonne à chromatographie d'affinité à l'avidine et peuvent ainsi être quantifiés (Sano et al., 2010).

Ainsi, suite à un traitement au chlore, la baisse de l'infectivité d'astrovirus (virus cultivable) est corrélée avec la production de dommages oxydatifs sur la capsid virale, et la quantification de la présence des groupements carbonyles varie en fonction du traitement au chlore effectué (Sano et al., 2010).

Cette technique a été appliquée avec succès à l'évaluation de l'apparition de groupements carbonyles suite à un traitement au chlore chez norovirus, qui est un virus non cultivable (Sano et al., 2010).

En conclusion, ces dommages oxydatifs de la capsid virale peuvent être détectés, quantifiés et utilisés comme indicateurs de l'intégrité du virion, qui est étroitement corrélée avec son pouvoir infectieux.

II- RESULTATS

Les virus entériques sont transmis par voie féco-orale de manière directe (interhumaine) ou de manière indirecte (*via* l'eau et les aliments) et représentent un risque sanitaire important. Les principaux aliments à risque sont les coquillages, les fruits et les végétaux.

Cependant, la détection des virus entériques dans les aliments est rendue difficile par la nature complexe des matrices alimentaires et les faibles niveaux de contamination virale souvent retrouvés même si leur présence est de plus en plus fréquemment mise en évidence grâce au développement de méthodes de biologie moléculaire sensibles comme la PCR quantitative en temps réel. Les méthodes de détection des virus doivent être adaptées selon le type de matrice alimentaire et limiter la présence d'inhibiteurs des réactions d'amplification par PCR. A ce jour, les méthodes de détection des virus par RT-qPCR restent relativement coûteuses. De plus, le typage par séquençage des souches virales issues des matrices alimentaires n'est souvent pas possible du fait de la faible contamination virale ce qui empêche la réalisation d'études phylogénétiques.

Aujourd'hui, le diagnostic viral en hygiène alimentaire repose sur la RT-qPCR qui ne permet pas de différencier les génomes viraux issus de particules virales infectieuses de ceux issus de particules virales inactivées (non infectieuses). Dans ce contexte de difficulté d'appréciation du risque viral pour l'homme, l'AFSSA a proposé dans son « bilan des connaissances relatives aux virus transmissibles à l'homme par voie orale » (2007), un logigramme d'interprétation d'un résultat positif obtenu en RT-PCR, applicable dans le cadre d'épisodes de toxi-infections ou de contrôles qualité sur des produits commercialisés. Pour apprécier le risque infectieux, il est ainsi recommandé d'investiguer plusieurs items complémentaires à la détection du pathogène par biologie moléculaire comme la présence de foyers épidémiques à proximité, les analyses microbiologiques suggérant une contamination fécale... On comprend alors que la détection « sélective » des particules virales infectieuses apporterait une valeur ajoutée au diagnostic viral en permettant de mieux caractériser les échantillons à risque pour l'homme.

Récemment de nouvelles approches de biologie moléculaire ont été décrites, comme la digital PCR (qPCR permettant la quantification absolue des génomes présents dans un échantillon donné) et la qPCR Array (qPCR Nanofluidique, permettant de réaliser plusieurs milliers de réactions de qPCR en une seule plaque). Ces techniques pourraient permettre de contourner les problèmes habituellement rencontrés dans le cadre de la virologie alimentaire : inhibition des réactions d'amplification, quantification des génomes viraux, limitation du nombre de réactions possibles en raison du coût lié aux volumes réactionnels mais aussi du faible volume des extraits de génome viral, l'utilisation du multiplexage restant limité par le nombre restreint d'amplification qu'il est possible de réaliser simultanément.

Les objectifs des travaux de thèse ont porté d'une part sur la détection, le typage et l'évaluation du risque infectieux, avec (i) le développement d'une nouvelle méthode d'extraction du VHA à partir de la laitue ; (ii) le développement du typage moléculaire des souches du VHA ; et (iii) la détection sélective des particules virales infectieuses du VHA et du rotavirus par Monoazide-RT-qPCR. D'autre part, ces travaux ont porté sur le développement du diagnostic viral sur un format « PCR on chip », en particulier sur (iv) l'évaluation de l'apport de la digital RT-PCR pour la quantification absolue des génomes des principaux virus entériques (VHA, NoV) issus de matrices alimentaires (eau, végétaux) ; et sur (v) le développement d'une « PCR on chip » pour la détection moléculaire simultanée de 20 virus entériques.

1- VIRUS ENTERIQUES : Détection, typage et risque infectieux en hygiène alimentaire

1-1 Comparaison de deux méthodes de détection du virus de l'hépatite A à partir de la laitue en utilisant le norovirus murin comme contrôle de process

Comparison of two methods for the detection of hepatitis A virus in lettuces using the murine norovirus as a process control (article publié en 2013 dans Journal of Virological Methods)

Les végétaux sont fréquemment impliqués comme voie de transmission des virus entériques, en particulier les oignons, différents types de salades dont la laitue (Hooper et al., 1977 ; Rosenblum et al., 1990 ; Hernandez et al., 1997 ; Dentinger et al., 2001 ; Wheeler et al., 2005). La contamination peut arriver à tout moment de la vie de l'aliment, depuis sa production jusqu'à sa consommation. Le virus de l'hépatite A (VHA) est stable dans son environnement et peut résister aux désinfectants utilisés dans l'industrie agroalimentaire, c'est pourquoi la consommation des aliments généralement consommés crus peut entraîner un risque pour le consommateur et qu'il est nécessaire de disposer de méthodes de détection fiables de VHA sur ce type de matrice. Etant donné les faibles quantités de virus présents sur les aliments, la technique de RT-qPCR, qui est sensible, spécifique et rapide, est classiquement utilisée. Le bon déroulement du processus d'extraction des virus à partir de la matrice alimentaire est vérifié par l'ajout d'un virus utilisé comme contrôle de process, qui peut également contribuer à évaluer le niveau d'inhibition de la réaction d'amplification.

Cette étude a pour objectifs de développer une nouvelle technique d'extraction du VHA à partir de la laitue, de la comparer à la technique de référence utilisée dans les spécifications techniques publiées en 2013 (ISO/TS 15216-1, 2013 ; ISO/TS 15216-2, 2013) et d'évaluer l'utilisation du virus MNV-1 comme contrôle de process pour la détection du VHA à partir de la laitue.

Les spécifications techniques (ISO/TS 15216-1 ; ISO/TS 15216-21) préconisent une élution des virus entériques en utilisant le TGEB, une clarification par centrifugation, suivie d'une précipitation des particules virales au PEG, et enfin d'une purification des acides nucléiques

issus des particules virales au moyen de billes de silices selon la méthode décrite par Boom et al., (1990) (MiniMag/EasyMag). Une méthode alternative, mise au point au laboratoire, implique une élution au TGEB et une clarification par centrifugation, suivie d'une filtration de l'éluat, avant l'extraction des ARN viraux qui est ensuite réalisée directement à partir du filtre où sont adsorbées les particules virales.

Des échantillons de laitue ont été artificiellement contaminés par des quantités de VHA (de 1, 10, 10², 10³, 10⁴ et 10⁵ PFU) et extraits de la matrice par ces deux méthodes en parallèle (précipitation au PEG vs filtration). Une deuxième série d'inoculation artificielle sur la laitue a été réalisée avec VHA (doses de 1, 10, 10², 10³, 10⁴ et 10⁵ PFU) et MNV-1 (à dose fixe). La détection a ensuite été réalisée par RT-qPCR en une seule étape en duplex.

Les résultats ont montré que les deux méthodes de détection permettent d'obtenir une même limite de détection (LOD₁₀₀) du VHA de 10 à 100 PFU / 25g de laitues. Les rendements d'extraction obtenus en appliquant la méthode de précipitation au PEG sont en moyenne de 0,58% et ceux par la méthode de filtration en moyenne de 1,72% pour le VHA. La dilution au 1/10ème des ARN extraits au moment de la réaction de RT-qPCR a permis d'améliorer les rendements d'extraction du VHA en diluant les inhibiteurs de la RT-qPCR. Ainsi, lors de la détection virale avec les ARN dilués au 1/10ème, les rendements d'extraction pour le VHA sont en moyenne de 5,92% et 4,56% respectivement pour la méthode « précipitation au PEG » et pour la méthode « filtration ».

Les rendements d'extraction de MNV-1 obtenus en appliquant la méthode de précipitation au PEG sont en moyenne de 2,68% et ceux par la méthode de filtration en moyenne de 0,74%. La dilution au 1/10ème des ARN extraits avant la réaction de RT-qPCR a également permis d'améliorer les rendements d'extraction du MNV-1 en diluant les inhibiteurs de la RT-qPCR, avec des rendements d'extraction pour le MNV-1 en moyenne de 20,97% et 3,45% respectivement pour les méthodes « précipitation au PEG » et « filtration ».

Une analyse statistique multiparamétrique a été réalisée sur les résultats obtenus et a permis de montrer que, s'il n'y a pas de différence significative observée entre deux répétitions d'expériences, en revanche des différences significatives de reproductibilité sont observées (pour la détection du VHA comme du MNV). La présence du MNV n'affecte pas le rendement d'extraction du VHA quelle que soit sa concentration, et la présence de

différentes concentrations du VHA n'affecte pas le rendement d'extraction du MNV. En revanche, les rendements d'extraction du VHA varient en fonction de la dose du VHA inoculé, particulièrement au niveau de la limite de détection. La dilution de l'extrait d'ARN augmente significativement le rendement d'extraction du VHA, ainsi que celui du MNV. La méthode de récupération du virus (précipitation au PEG ou filtration) n'affecte pas le rendement d'extraction du VHA mais affecte celui du MNV.

En conclusion, les étapes d'élution-concentration du VHA à partir de laitues peuvent être réalisées selon ces deux méthodes avec des rendements d'extraction du VHA équivalents. Même si la méthode impliquant la précipitation au PEG est préconisée dans les spécifications techniques, la méthode impliquant la filtration est la plus simple et la plus rapide et peut donc être proposée comme une méthode alternative.

Le MNV est un bon contrôle de process pour la détection du VHA sur la laitue car son rendement d'extraction est proche de celui du VHA dans cette matrice. Il permet ainsi de vérifier l'ensemble du processus d'extraction du virus à partir de la matrice ainsi que le niveau d'inhibition d'amplification lors de la RT-qPCR.



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Journal of Virological Methods

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jviromet

Comparison of two extraction methods for the detection of hepatitis A virus in lettuces using the murine norovirus as a process control

Coralie Coudray^a, Ghislaine Merle^a, Sandra Martin-Latil^a, Laurent Guillier^b, Sylvie Perelle^{a,*}

^aANSES, Food Safety Laboratory, Food and Water Virology Unit, 23 Avenue du Général de Gaulle, 94706 Maisons-Alfort cedex, France

^bANSES, Food Safety Laboratory, Modelling of Bacterial Behaviour Unit, 23 Avenue du Général de Gaulle, 94706 Maisons-Alfort cedex, France

A B S T R A C T

Article history:

Received 3 August 2012

Received in revised form 3 April 2013

Accepted 13 May 2013

Available online 20 May 2013

Keywords:

RT-qPCR

Hepatitis A virus

Murine norovirus

Process control

Lettuces

Enteric viruses are important agents of foodborne diseases. In recent years, raw fruits and vegetables have frequently been involved in foodborne transmission of enteric viruses to humans, particularly noroviruses and hepatitis A virus (HAV). Although viral contamination can occur at any stage of food processing, primary production is a critical stage in which prevention measures are essential to minimise the risk of infection to consumers. Due to the low infectious doses and low concentrations of enteric viruses in food samples, an efficient and rapid virus concentration method is required for routine control and risk assessment. In this study, the virus concentration reference method proposed by the CEN/TC275/WG6/TAG4 working group for samples of soft fruits and salad vegetables was compared with a method including a filtration step in order to recover hepatitis A virus (HAV) on lettuces. Murine norovirus (MNV-1) was used as a process control and detected simultaneously with HAV in a one-step duplex RT-qPCR following both procedures. The HAV LOD ranged from 10 to 100 PFU/25 g of lettuce in the presence or absence of MNV-1, regardless of method used. In conclusion, MNV-1 offers a very reliable and simple way to monitor the quality of the detection procedures. Although it has been found that both methods achieved an identical limit of detection, the method including a filtration step requires less processing and could be proposed as an alternative method.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Hepatitis A virus (HAV) is a positive single-stranded RNA virus classified in the *Hepatovirus* genus of the *Picornaviridae* family. HAV infection is the leading worldwide cause of acute viral hepatitis (Koopmans and Duizer, 2004). HAV is transmitted mainly via the faecal-oral route, either by person-to-person transmission or by ingestion of contaminated water and food, particularly shellfish, soft fruits and vegetables (Beuchat, 2006; Butot et al., 2007). HAV infection is common throughout the developing world where infections are most frequently acquired during early childhood and are usually asymptomatic or mild, resulting in a high proportion of adults immune to HAV. In developed countries, HAV infections are less common and low vaccine coverage has led to a high proportion of susceptible individuals, this creates a potential for extended hepatitis A outbreaks when contaminated products are widely distributed (Mohd Hanafiah et al., 2011). Different vegetables and fruits including different types of salads, onions, berries and, more recently, semi-dried tomatoes have been associated with HAV outbreaks (Calder et al., 2003; Carvalho et al., 2012; Gallot et al., 2011;

Hernández et al., 1997; Pettrignani et al., 2010a, 2010b; Rosenblum et al., 1990; Wheeler et al., 2005). Contamination may occur during growth in the field as well as during processing, storage, distribution and final preparation. HAV is stable in the environment and is particularly resistant to disinfectants, heating, pressure and low pH (Koopmans et al., 2002; Koopmans and Duizer, 2004). A rapid technique for detecting the presence of HAV in contaminated food samples is therefore essential to enable potential health risks to be assessed (Sánchez et al., 2007). Detection of HAV on the basis of its infectivity is complicated by the absence of a reliable cell culture method and the low contamination levels of food samples. To date, RT-qPCR has been one of the most promising detection methods due to its sensitivity, specificity, speed and ability to deliver quantitative data. The European Committee for Standardization (CEN) has asked a technical advisory group (TAG) to develop a standard method (qualitative/quantitative) for detection of norovirus and HAV in foodstuffs. The CEN/ISO/TS 15216 is due for publication in the first half of year 2013 and within a year these proposed protocols will be validated and then published as ISO or CEN standard methods. The method includes classical PCR controls and a process control. The latter measures virus recovery during the whole extraction and test procedure using a heterologous non-enveloped positive-sense ssRNA virus spiked into the test sample and assayed in parallel with the target viruses (Lees and CEN WG6 TAG4, 2010).

* Corresponding author. Tel.: +33 (0) 1 49 77 27 99; fax: +33 (0) 1 43 68 97 62.
E-mail address: sylvie.perelle@anses.fr (S. Perelle).

Although the TAG recommended the MC₀ strain of the Mengo virus (Costafreda et al., 2006; Le Guyader et al., 2009), the method allows freedom in the choice of the process control virus. The selected virus should exhibit morphological and physicochemical properties and environmental persistence similar to the target viruses, thus providing comparable extraction efficiency (Lees and CEN WG6 TAG4, 2010). Ideally, process control should be unlikely to contaminate the tested food sample naturally (Baert et al., 2011). Murine norovirus (MNV) is morphologically and genetically similar to human noroviruses, and shows considerable promise as a human norovirus surrogate (Karst et al., 2003; Wobus et al., 2006). Recently, MNV-1 has been successfully tested as a process control when detecting NoV and HAV in some food samples (Martin-Latil et al., 2012a; Stals et al., 2011a, 2011b) and HEV in water (Martin-Latil et al., 2012b). In order to be able to extend the use of a single process control for the detection of the main enteric viruses, the aim of the present study was to investigate the use of MNV-1 as a process control for detecting HAV on lettuce by a one-step duplex RT-qPCR and to compare the efficiency of the CEN procedure with that of a method based on filtration using a positively charged membrane.

2. Materials and methods

2.1. Viruses and cells

HAV strain HM175/18f, clone B (VR-1402), was obtained from the American Type Culture Collection (ATCC). This clone replicates rapidly and has cytopathic effects in cell culture (Lemon et al., 1991). HAV stock was produced by propagation in foetal rhesus monkey kidney (FRhK-4) cells (ATCC, CRL-1688) (Cromeans et al., 1987) and titrated by plaque assay (Dubois et al., 2006). Results were expressed in plaque-forming units/mL (PFU/mL) and HAV stock contained 1.55×10^8 PFU/mL. The correlation with the genomic quantity was $1 \text{ PFU} = 10^5$ genome copies HAV by measuring absorbance at 260 nm of RNA extracts.

MNV-1 (CW1 strain) was provided to the ANSES Fougères Laboratory in France by Dr H. Virgin from Washington University in the USA and was propagated in a mouse leukemic monocyte macrophage cell line (RAW 264.7, ATCC TIB-71) (Cannon et al., 2006). RAW 264.7 was grown at 37 °C in an atmosphere containing 5% CO₂ in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 1% L-Glutamine, 1% non-essential amino acids, 10% foetal bovine serum (HyClone, Invitrogen) and 0.5% penicillin-streptomycin. MNV-1 stock containing 5.62×10^6 TCID₅₀/mL (50% tissue culture infective dose/mL) was produced by the ANSES Fougères Laboratory (France) as previously described (Wobus et al., 2004). The correlation with the genomic quantity was $1 \text{ TCID}_{50} = 2 \times 10^6$ genome copies MNV-1 by measuring absorbance at 260 nm of RNA extracts.

2.2. Inoculation of lettuces

Lettuces were purchased from a local market. For each of four repetitions of experiments, 24 lettuce samples (25 g) were placed in 400 mL polypropylene bags containing a filter compartment (Seward, Norfolk, United Kingdom). Four samples were contaminated with each of the 6 following amounts of HAV: 0, 1, 10, 10², 10³, 10⁴ PFU. Each 100 µL HAV inoculum was distributed to about 20 spots on the surface of each 25 g sample of lettuce and left to dry overnight at 4 °C to increase the number of adhering viral particles. Uninoculated lettuce samples were used as a negative control. For each HAV contamination level, half of the samples (2/4) was also contaminated with 560 TCID₅₀ of murine norovirus, used as a process control and added just before the elution step, which

corresponds to the earliest opportunity prior to virus extraction to monitor the extraction yield. For each HAV contamination level (including 4 lettuce samples), one sample without MNV-1 and one sample with MNV-1 were analysed by both methods (A and B) (Fig. 1).

2.3. Sample processing for recovery of viruses and viral RNA extraction

2.3.1. Initial processing

Each inoculated lettuce sample which was placed in a 400 mL polypropylene bag containing a filter compartment was soaked in 40 mL of elution buffer (Tris-HCl 100 mM, glycine 50 mM, 1% beef extract (TGBE), pH 9.5) covering the sample, for 20 min at room temperature with constant shaking. The rinse fluid was removed via the filter compartment of the bag and was centrifuged at $8500 \times g$ for 30 min at 4 °C to pellet the food sample particles.

2.3.2. Method A

After the initial processing, the pH of the decanted supernatant was adjusted to 7.2 ± 0.2 by the addition of 5 N HCl while the fluid was swirled constantly. The neutralised supernatant was supplemented with 10% (wt/vol) polyethylene glycol (PEG) 6000 (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France), and 0.3 M NaCl, and was then incubated for 2 h at 4 °C. Viruses were concentrated by centrifugation of the solution at $8500 \times g$ for 30 min at 4 °C. The supernatant was discarded and additional centrifugation was carried out at $8500 \times g$ for 5 min at 4 °C to compact the pellet. The method A consists of the elution-concentration method described for vegetables in the "CEN/TC275/WG6/TAG4 viruses in foods" draft document with minor modifications (Fig. 1).

2.3.3. Method B

Method B was used to compare the concentration by PEG versus filtration after virus elution. After the initial processing, viruses were concentrated from supernatant by membrane filtration under vacuum using a Zetapor (Cuno Filtration SAS 3M, Cergy Pontoise, France) 47 mm positive-charged membrane of pore size 0.45 µm. The flow rate used during filtration was approx. 40 mL/6–7 min (Fig. 1).

2.3.4. RNA extraction

The pellet obtained with the method A was resuspended in 3 mL of NucliSens® easyMAG™ lysis buffer (BioMérieux, Marcy l'Etoile, France) for 10 min at room temperature. The filters obtained with the method B were placed in a 60 mm diameter Petri dish and directly incubated with 3 mL of NucliSens® easyMAG™ lysis buffer (BioMérieux) for 10 min at room temperature as described previously by Perelle et al. (2009). The whole 3 mL lysate was then collected and processed using the NucliSens® easyMAG™ platform (BioMérieux) for total nucleic acid purification by the "off-board Specific A protocol" according to the manufacturer's instructions. Nucleic acids were finally eluted in 80 µL of elution buffer and stored at –80 °C.

2.4. RT-qPCR

The primers and the 3'-minor groove binder (MGB) TaqMan® probe targeting the non-coding region at the 5' end (5'-NCR) of HAV used in this study have been described by Costafreda et al. (2006). The primers and the TaqMan® probe targeting the ORF1 polyprotein of the murine norovirus which were designed using Beacon Designer software (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) were previously used by Martin-Latil et al. (2012a). The HAV probe and MNV-1 probe were respectively labelled with the 6-FAM or Cy5 reporter dyes at the 5'-end, and an MGB or BHQ2 at the 3'-end. All

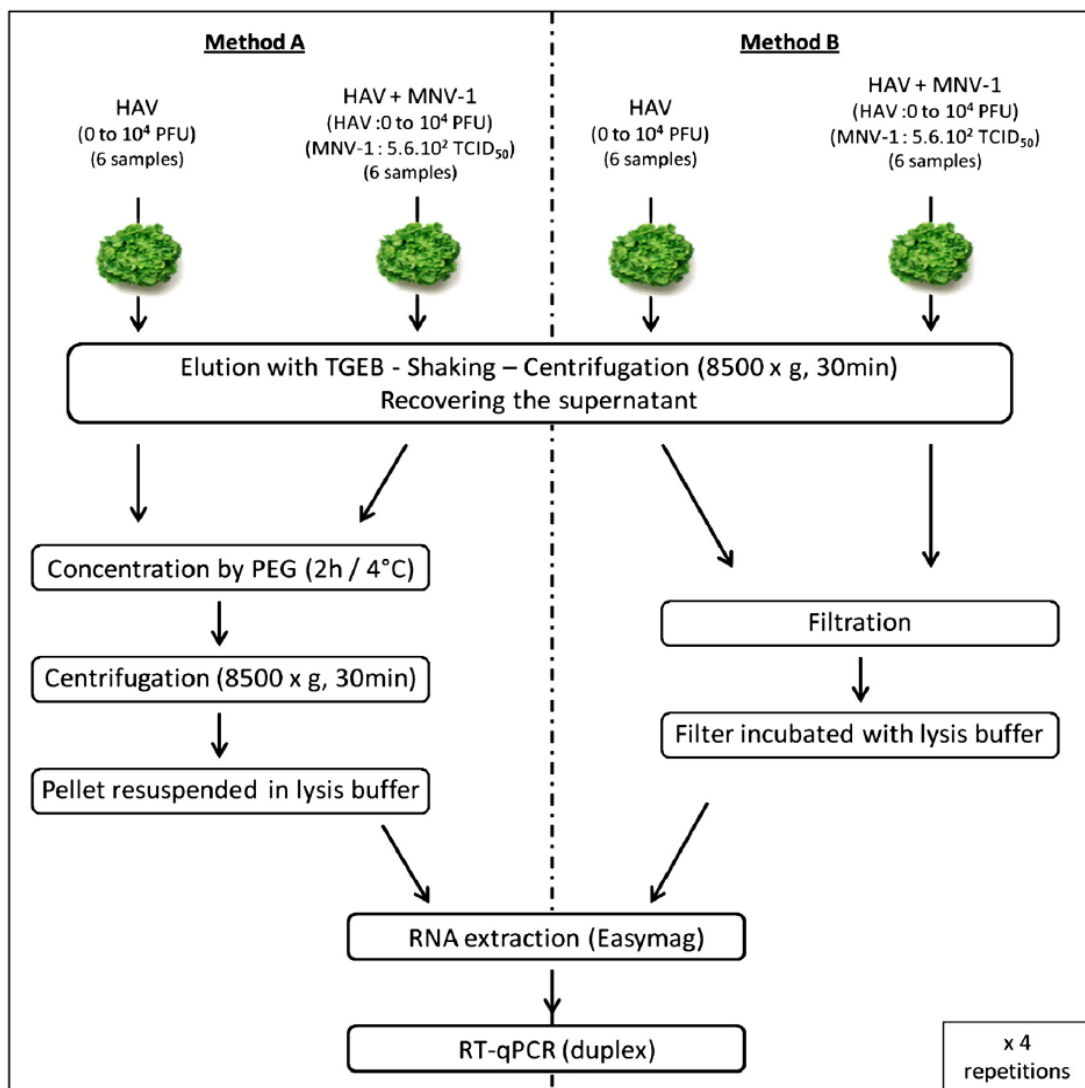


Fig. 1. Flow diagram of methods A and B used to concentrate and detect hepatitis A virus from lettuces.

the primers and probes were purchased from Applied Biosystems (Courtaboeuf, France) or Eurofins (Les Ulis, France).

Quantitative one-step duplex RT-PCR for simultaneous detection of HAV and MNV-1 was carried out as described before by Martin-Latil et al. (2012a) on a CFX96™ real-time PCR detection system from Bio-Rad. Reactions were performed in a 25 µL reaction mixture containing 1X of RNA UltraSense™ master mix and 1.25 µL of RNA UltraSense™ enzyme mix, which are components of RNA UltraSense™ One-Step Quantitative RT-PCR System (Fisher Bioblock Scientific, Illkirch, France), 2 U RNase inhibitor (Applied Biosystems), 5 µg of bovine serum albumine (Ambion), 500 nM of HAV68 forward primer, 900 nM of HAV240 reverse primer, 250 nM of HAV150(-) probe, 600 nM of MNV-3193-F forward primer, 600 nM of MNV-3308-R reverse primer, 250 nM of MNV-3227-T probe and 5 µL of RNA extract. Positive controls containing RNA extracted from virus suspensions and a negative control containing all the reagents except the RNA template were included in each set of reactions. Undiluted and 10-fold diluted RNA extracts obtained from each sample were tested in duplicate.

The one-step RT-qPCR programme involved 60 min reverse transcription of RNA at 55 °C, followed by a 5 min denaturation step at 95 °C, and finally 45 cycles of 15 s at 95 °C, 1 min at 60 °C

and 1 min at 65 °C. Fluorescence was automatically recorded by the instrument at the end of the elongation steps (1 min at 65 °C) for each amplification cycle. All samples were characterised by a corresponding Ct value. Negative samples gave no Ct value. A standard curve for each system was generated using 10-fold dilution of viral suspension. The slopes (S) of the regression lines were used to calculate the amplification efficiency (E) of the RT-qPCR reactions, according to the formula $E = 10^{1/S} - 1$ (Tichopad et al., 2003). HAV and MNV-1 recovery rate percentages in spiked samples were calculated by reference to the corresponding inoculate in the standard curve.

2.5. Statistical analysis for determining the influence of factors on extraction yield

The influence of six factors on extraction yield of HAV was studied: (i) HAV concentration (10,000, 1000, 100, 10 and 1 PFU/25 g), (ii) dilution of the sample (undiluted/10-fold diluted), (iii) inter-assay variability, (iv) method of extraction (A/B), (v) intra-assay variability and (vi) presence of 560 TCID₅₀/25 g of MNV-1. The influence of five factors on extraction yield of MNV-1 was studied: (i) HAV concentration (10,000, 1000, 100, 10 and 1 PFU/25 g),

(ii) dilution of the sample, (iii) inter-assay variability, (iv) method of extraction (A/B) and (v) intra-assay variability. For this, multi-way analysis of variance with STATGRAPHICS software (Centurion XV version) was used.

As there are many group means, there are also many pairs to compare. The alpha value applies to each comparison, so the risk of incorrectly finding a significant difference should increase with the number of comparisons. Instead of ordinary *t*-tests, a multiple comparison procedure was applied to provide an upper bound on the probability that any comparison would incorrectly be found significant. Population marginal means were also computed. In population marginal means, the effect of specific factors on the means is removed. Critical values from Scheffé's *S* procedure, derived from the *F* distribution were used. This procedure provides a simultaneous confidence level for comparisons of all linear combinations of the means.

3. Results

3.1. Duplex real-time RT-qPCR for the detection of HAV in lettuce samples using MNV-1 as a process control

3.1.1. Standard curves

Methods A and B were tested in parallel for the recovery of HAV present in lettuce samples, according to the presence or absence of control process MNV-1. Optimisation experiments showed that the most reliable input per sample for MNV-1 was 560 TCID₅₀ (estimated at 10⁹ genome copies) which enabled both reproducible detection in the range of 26–32 Ct by RT-qPCR with undiluted RNA extract and non-interference with target HAV amplification (data not shown).

In each spiking experiment, the standard curves generated with RNA extracts resulting from serial dilution of viral stock suspension exhibit *R*²-values > 0.98 for MNV-1 and > 0.99 for HAV and efficiencies ranging from 94.7% to 99.8% for MNV-1 and from 96.4% to 101.6% for HAV. The parameters for the curves from the spiked samples with either different concentration sets of HAV, or with different concentration sets of HAV plus process control, are reported in Fig. 2A for method A and Fig. 2B for method B. As expected, no viral RNA was detected in the uninoculated lettuce samples. Taking into account all of the Ct values generated in the whole spiking experiment set with HAV, the mean parameters of the standard curves obtained with undiluted and 10-fold diluted RNA extracts indicated efficiencies of 70.8% and 102.6% respectively with method A and 102.2% and 83.6% respectively with method B. In the same way, the mean parameters of the standard curves obtained with

undiluted and 10-fold diluted RNA extracts resulting from the entire spiking experiment set with HAV plus MNV-1 indicated efficiencies of 64.6% and 93.0% respectively with method A and 79.6% and 86.9% respectively with method B.

3.1.2. Mean virus recoveries

All the experiments with lettuce samples spiked with HAV and MNV-1 showed that the process control was detected consistently in RNA extracts. In lettuce, the mean recovery rate of the MNV-1 process control calculated with undiluted RNA extracts ranged from 1.42% to 4.49% with method A and from 0.41% to 1.07% with method B. The average of HAV recoveries for every level of HAV inoculation calculated with undiluted RNA extracts ranged from 0.07% to 1.12% and from 0.67% to 5.58% for method A and B respectively (Table 1).

Slightly more consistent nucleic acid amplification was observed in the 10-fold diluted RNA samples from both methods, suggesting the presence of PCR inhibitors. The ratio of marginal means showed that 10-fold dilution of RNA extracts improved HAV recoveries by a factor of 10.2 and 2.6 for method A and B respectively. As for HAV, the 10-fold RNA dilution improved MNV-1 recoveries by a factor of 7.8 and 4.7 for method A and B respectively, close to the values observed for HAV. In spite of the increase in mean virus recoveries after dilution of RNA extracts, most of the samples inoculated with the lowest quantities of HAV (1 and 10 PFU) were only detected from undiluted RNA extracts regardless of the method used. Moreover, most of the negative undiluted RNA samples were also found negative after dilution, except for two samples inoculated with 1 PFU of HAV and processed with method A. These results showed that the 10-fold dilution of RNA samples did not significantly improve the sensitivity for both methods, despite PCR inhibitions.

3.1.3. Limits of detection of HAV

The limit of detection (LOD), which was defined as the lowest amount of HAV in a test sample detected in the four sets of experiments, was empirically determined with and without addition of MNV-1 (Table 1). An assay was considered positive if at least one positive Ct determination resulted from two RT-qPCR duplicates within an experiment. Consequently, LOD sometimes occurred with ≥ 4/8 positive Ct determinations. The LOD of HAV was 100 PFU and 10 PFU of HAV/25 g of lettuce sample with or without MNV-1 respectively, with method A. Inversely, the LOD of HAV was 10 PFU and 100 PFU of HAV/25 g of lettuce sample with or without MNV-1 respectively, with method B. At inoculation levels of 1 PFU

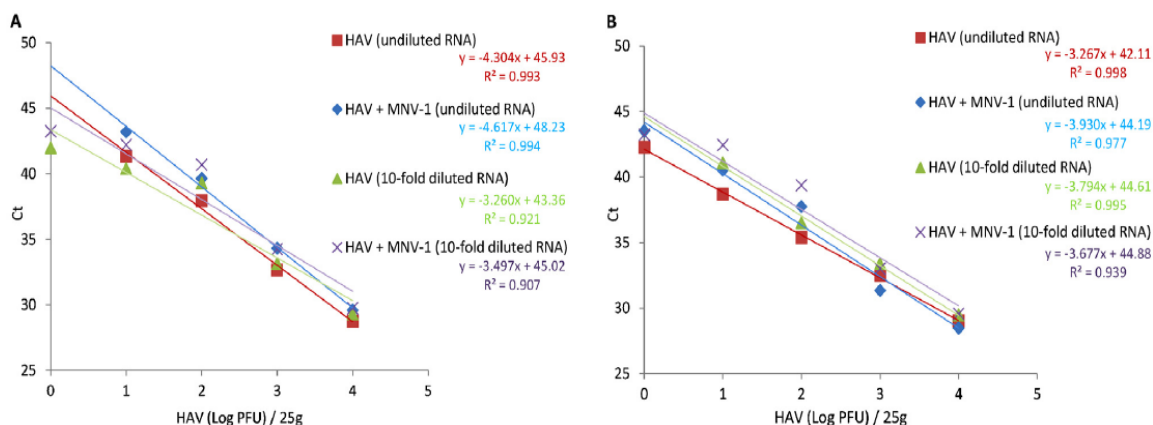


Fig. 2. Characteristics of RT-qPCR amplification curves obtained for HAV detection on spiked lettuces with or without the addition of MNV-1 according to the type of method used. A and B show the data obtained with methods A and B respectively. Results are expressed in Ct mean values as against viral loading expressed in log₁₀ HAV PFU.

Table 1
Mean percentage recovery calculated for HAV and MNV-1 in lettuce with methods A and B. Results are expressed as means ± standard errors. For each inoculation level, four experiments were performed and undiluted and 10-fold diluted RNA extracts were tested twice, resulting in eight Cycle threshold (Ct) values for each sample type. The number of positive Ct determinations is mentioned for HAV. One out of two Ct positive determinations in one experiment set was considered as a positive assay. The mean percentage recovery corresponding to the LOD for each sample type is shown in bold italics. ND: not detected.

Inocula HAV (PFU)	MNV-1 (TCID ₅₀)	(Method A) PEG				(Method B) Filtration			
		Undiluted RNA		10-fold diluted RNA		Undiluted RNA		10-fold diluted RNA	
		HAV recovery (%) ± SD	MNV-1 recovery (%) ± SD	HAV recovery (%) ± SD	MNV-1 recovery (%) ± SD	HAV recovery (%) ± SD	MNV-1 recovery (%) ± SD	HAV recovery (%) ± SD	MNV-1 recovery (%) ± SD
0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
1	0	ND	ND	14.34 (1/8)	ND	1.08 ± 0.71 (4/8)	ND	ND	ND
10	0	0.30 ± 0.44 (7/8)	ND	8.76 ± 10.92 (5/8)	ND	5.58 ± 9.40 (5/8)	ND	2.28 ± 0.07 (2/8)	ND
100	0	0.35 ± 0.30 (8/8)	ND	3.48 ± 3.74 (8/8)	ND	1.30 ± 0.93 (7/8)	ND	5.14 ± 2.42 (8/8)	ND
1000	0	0.71 ± 0.28 (8/8)	ND	4.84 ± 1.32 (8/8)	ND	0.88 ± 0.52 (8/8)	ND	4.81 ± 2.85 (8/8)	ND
10,000	0	1.08 ± 0.49 (8/8)	ND	6.93 ± 2.63 (8/8)	ND	0.91 ± 0.50 (8/8)	ND	6.01 ± 1.45 (8/8)	ND
0	560	ND	4.49 ± 4.58	ND	30.97 ± 28.48	ND	0.75 ± 0.42	ND	3.93 ± 1.30
1	560	ND	2.13 ± 1.79	5.90 (1/8)	20.76 ± 21.49	0.67 ± 0.83 (2/8)	0.60 ± 0.35	5.97 (1/8)	2.92 ± 2.17
10	560	0.07 ± 0.04 (2/8)	2.48 ± 3.00	1.24 ± 0.48 (2/8)	23.31 ± 32.03	2.12 ± 4.07 (6/8)	0.41 ± 0.36	0.72 ± 0.27 (4/8)	3.40 ± 2.84
100	560	0.35 ± 0.49 (8/8)	3.20 ± 4.01	1.01 ± 1.70 (8/8)	19.83 ± 17.38	1.01 ± 1.13 (8/8)	0.97 ± 1.12	3.83 ± 5.74 (8/8)	4.28 ± 2.78
1000	560	0.64 ± 0.82 (8/8)	1.42 ± 1.55	4.23 ± 2.89 (8/8)	13.72 ± 12.32	2.20 ± 1.35 (8/8)	1.07 ± 0.76	5.94 ± 2.03 (8/8)	3.37 ± 2.94
10,000	560	1.12 ± 1.00 (8/8)	2.33 ± 2.39	8.47 ± 6.80 (8/8)	17.26 ± 10.99	1.41 ± 0.75 (8/8)	0.65 ± 0.52	6.29 ± 2.01 (8/8)	2.82 ± 1.85
Average %		0.58	2.68	5.92	20.97	1.72	0.74	4.56	3.45

viral particles/25 g of sample, HAV was more frequently detected with method B.

3.2. Influence of experimental factors on extraction yield of HAV and MNV-1

The results of the multi-way ANOVAs and the multiple comparison tests showed that the difference between reproductions of experiments is significant (p -values $< 10^{-4}$). For HAV and MNV-1, the first experiment was significantly different from experiments 2 to 4 (data not shown). However, it showed that the variability between repetitions of measured extraction is not a significant factor. The presence of different concentrations of HAV did not affect extraction efficiency for MNV-1. The statistical analysis revealed that neither the presence of MNV-1, nor the method of extraction used affect the extraction yield of HAV. The MNV-1 extraction yield obtained with method A was significantly higher than with method B (p -values $< 10^{-4}$). The dilution significantly improves extraction yield of HAV and MNV-1 regardless of the levels of the other factors (p -values $< 10^{-4}$).

4. Discussion

Fresh produce is an important part of a healthy diet. In recent decades, the consumption of fresh produce has increased in many industrialised nations. Fresh produce such as fruits and salads are often consumed raw, putting consumers at risk of infection by contaminating organisms (Berger et al., 2010; Doyle and Erickson, 2008; Mattison et al., 2010; Sivapalasingam et al., 2004). Mechanisms of contamination in these outbreaks have included use of contaminated water and handling of produce by infected individuals at the farm or post harvest stage. Because infectious doses of the enteric viruses are very low, a small amount of virus in contaminated foods is sufficient to infect a human. A rapid technique for detecting the presence of HAV in contaminated food samples is therefore essential to allow potential health risks to be assessed.

There are at present no accepted validated routine methods available for the detection of human enteric viruses in food, although the European Committee for Standardization (CEN) asked the technical advisory group (TAG) to develop a standard method for detection of norovirus and HAV in foodstuffs. Although the technical specification is due for publication in early 2013, the methods will need to be fully-validated prior to publication as a standard (Lees and CEN WG6 TAG4, 2010). The two main challenges to molecular detection of HAV in food products are the low efficiency of the virus extraction method, and the presence of inhibitory substances influencing viral genome amplification by RT-qPCR.

The objective of the present study was to evaluate the sensitivity of two virus concentration methods to recover HAV with the presence or absence of MNV-1 used as the process control in lettuces and to detect HAV and MNV-1 simultaneously by using a one-step duplex RT-qPCR assay that helps reduce costs while maintaining the primers and hydrolysis probe recommended for HAV by the European Committee for Standardization. The virus concentration method described for soft fruits in the CEN proposal (method A) was therefore tested in parallel with a filtration procedure (method B). Both methods tested gave reproducible results with detection limits of HAV in presence of MNV-1 ranging from 10 to 100 PFU/25 g of lettuces. Concentration method A used in this study is similar to the method previously used to detect HAV successfully on spiked raspberries with an LOD estimated between 50 and 100 PFU of HAV/25 g of fruits (Blaise-Boisseau et al., 2010). Differences in viral recoveries are usually observed and may be the result of the type of food matrix, drying conditions, viral strain, sample size or debris such as leaves. Nevertheless, the methods reported in the present study

establish detection limits that are comparable to those determined by other studies (Brassard et al., 2011; Kim et al., 2009).

To overcome PCR inhibition, the dilution of samples before RT-qPCR detection is often useful to dilute the PCR inhibitors, however it also dilutes the RNA targets, which can affect sensitivity of the PCR test (Wilson, 1997). In the present study, virus recovery was found to be higher with the 10-fold diluted RNA samples than with undiluted RNA for both HAV and MNV-1 but sometimes the dilution of the RNA extracts led to a negative result. These data make it even more necessary to perform the RT-qPCR assays with samples of diluted and undiluted RNA.

The presence of inhibitors and partial virus recovery influence the overall sensitivity of the method. A process control is added to each food sample prior to processing in order to check the detection procedure as a whole. It can also indicate the presence of potential inhibitors of the RT-qPCR reaction. Indeed, inhibition level may be evaluated by using the average Ct of the control process obtained from undiluted and from 10-fold diluted samples. Statistical analysis showed that dilution of RNA extracts is a significant factor in improving extraction yields for both viruses, which shows that MNV-1 is not only extremely useful for monitoring the quality of the extraction procedures but also the presence of RT-qPCR inhibitors. Although the use of an RT-qPCR internal control would have been an aid in identifying where the procedure has failed, it was beyond the scope of this study (D'Agostino et al., 2011).

Recently MNV-1 was successfully applied as a control for detecting norovirus in soft red fruits (Stals et al., 2011b), HAV in semi-dried tomatoes (Martin-Latil et al., 2012a) and HEV in water (Martin-Latil et al., 2012b). According to the results of the study, a 2% recovery of MNV-1 used as the control process would make it possible to validate the results of the analysis in lettuce regardless of the method used with 10-fold diluted RNA. Hepatitis A is still a major cause of infection and disease in the world (Franco et al., 2012). In developed countries, the low incidence and low vaccine coverage have led to a high proportion of susceptible individuals, which creates a potential for extended hepatitis A outbreaks should contaminated products be widely distributed. A rapid technique for detecting the presence of HAV in contaminated food samples is therefore essential to assess potential health risks. In conclusion, MNV-1 offers a very reliable and simple way to monitor the quality of detection regardless of the method used. Both detection methods tested, including the virus concentration method for soft fruit and vegetables described by the European Committee for Standardization, provide accurate detection of HAV on lettuces. Method B, based on the filtration step, was faster and easier than method A, which requires viral particle concentration and centrifugation steps. Therefore, method B may be proposed as an alternative method.

Acknowledgements

The authors would like to thank Pierre Maris for providing the MNV-1 stock, as well as the members of the working group of the European Committee for Standardization (CEN/TC275/WG6/TAG4 "Detection of viruses in food") for their helpful advice. This work is part of the thesis by Coralie Coudray, a PhD student who received financial support from ANSES.

References

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.

Berger, C.N., Sodha, S.V., Shaw, R.K., Griffin, P.M., Pink, D., Hand, P., Frankel, G., 2010. Fresh fruit and vegetables as vehicles for the transmission of human pathogens. *Environ. Microbiol.* 12, 2385–2397.

Beuchat, L.R., 2006. Vectors and conditions for preharvest contamination of fruits and vegetables capable of causing enteric diseases. *Br. Food J.* 108, 38–53.

Blaise-Boisseau, S., Hennechart-Collette, C., Guillier, L., Perelle, S., 2010. Duplex real-time qRT-PCR for the detection of hepatitis A virus in water and raspberries using the MS2 bacteriophage as a process control. *J. Virol. Methods* 166, 48–53.

Brassard, J., Guévremont, É., Gagné, M.J., Lamoureux, L., 2011. Simultaneous recovery of bacteria and viruses from contaminated water and spinach by a filtration method. *Int. J. Food Microbiol.* 144, 565–568.

Butot, S., Putallaz, T., Sánchez, G., 2007. Procedure for rapid concentration and detection of enteric viruses from berries and vegetables. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 186–192.

Calder, L., Simmons, G., Thornley, C., Taylor, P., Pritchard, K., Greening, G., Bishop, J., 2003. An outbreak of hepatitis A associated with consumption of raw blueberries. *Epidemiol. Infect.* 131, 745–751.

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.

Carvalho, C., Thomas, H., Balogun, K., Tedder, R., Pebody, R., Ramsay, M., Ngui, S., 2012. A possible outbreak of hepatitis A associated with semi-dried tomatoes, England, 2011. *EuroSurveillance* 17, pii:20083.

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.

Cromeans, T., Sobsey, M.D., Fields, H.A., 1987. Development of a plaque assay for a cytopathic, rapidly replicating isolate of hepatitis A virus. *J. Med. Virol.* 22, 45–56.

D'Agostino, M., Cook, N., Rodriguez-Lazaro, D., Rutjes, S., 2011. Nucleic acid amplification-based methods for detection of enteric viruses: definition of controls and interpretation of results. *Food Environ. Virol.* 3, 55–60.

Doyle, M.P., Erickson, M.C., 2008. Summer meeting 2007 – the problems with fresh produce: an overview. *J. Appl. Microbiol.* 105, 317–330.

Dubois, E., Hennechart, C., Deboosère, N., Merle, G., Legeay, O., Burger, C., Le Calvé, M., Lombard, B., Ferré, V., Traoré, O., 2006. Intra-laboratory validation of a concentration method adapted for the enumeration of infectious F-specific RNA coliphage, enterovirus, and hepatitis A virus from inoculated leaves of salad vegetables. *Int. J. Food Microbiol.* 108, 164–171.

Franco, E., Meleleo, C., Serino, L., Sorbara, D., Zaratti, L., 2012. Hepatitis A: epidemiology and prevention in developing countries. *World J. Hepatol.* 4, 68–73.

Gallot, C., Grout, L., Roque-Afonso, A.-M., Couturier, E., Carrillo-Santisteve, P., Pouey, J., Letort, M.-J., Hoppe, S., Capdepon, P., Saint-Martin, S., De Valk, H., Vaillant, V., 2011. Hepatitis A associated with semidried tomatoes, France, 2010. *Emerg. Infect. Dis.* 17, 566–567.

Hernández, F., Monge, R., Jiménez, C., Taylor, L., 1997. Rotavirus and hepatitis A virus in market lettuce (*Lactuca sativa*) in Costa Rica. *Int. J. Food Microbiol.* 37, 221–223.

Karst, S.M., Wobus, C.E., Lay, M., Davidson, J., Virgin 4th, H.W., 2003. STAT1-dependent innate immunity to a Norwalk-like virus. *Science* 299, 1575–1578.

Kim, H.Y., Park, H.J., Ko, G., 2009. Hollow-fiber ultrafiltration for the concentration and simultaneous recovery of multiple pathogens in contaminated foods. *J. Food Prot.* 72, 2547–2552.

Koopmans, M., von Bonsdorff, C.H., Vinjé, J., de Medici, D., Monroe, S., 2002. Food-borne viruses. *FEMS Microbiol. Rev.* 26, 187–205.

Koopmans, M., Duizer, E., 2004. Foodborne viruses: an emerging problem. *Int. J. Food Microbiol.* 90, 23–41.

Lees, D., CEN WG6 TAG4, 2010. International standardization of a method for detection of human pathogenic viruses in molluscan shellfish. *Food. Environ. Virol.* 2, 146–155.

Le Guyader, F.S., Parnaudeau, S., Schaeffer, J., Bosch, A., Loisy, F., Pommepuy, M., Atmar, R.L., 2009. Detection and quantification of norovirus in shellfish. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 618–624.

Lemon, S.M., Murphy, P.C., Shields, P.A., Ping, L.H., Feinstone, S.M., Cromeans, T., Jansen, R.W., 1991. Antigenic and genetic variation in cytopathic hepatitis A virus variants arising during persistent infection: evidence for genetic recombination. *J. Virol.* 65, 2056–2065.

Martin-Latil, S., Hennechart Collette, C., Guillier, L., Perelle, S., 2012a. Comparison of two extraction methods for the detection of hepatitis A virus in semi-dried tomatoes and murine norovirus as a process control by duplex RT-qPCR. *Food Microbiol.* 31, 246–253.

Martin-Latil, S., Hennechart Collette, C., Guillier, L., Perelle, S., 2012b. Duplex RT-qPCR for the detection of hepatitis E virus in water, using a process control. *Int. J. Food Microbiol.* 157, 167–173.

Mattison, K., Harlow, J., Morton, V., Cook, A., Pollari, F., Bidawid, S., Farber, J.M., 2010. Enteric viruses in ready-to-eat packaged leafy greens. *Emerg. Infect. Dis.* 16, 1815–1817, discussion 1817.

Mohd Hanafiah, K., Jacobsen, K.H., Wiersma, S.T., 2011. Challenges to mapping the health risk of hepatitis A virus infection. *Int. J. Health Geogr.* 10, 57.

Perelle, S., Cavellini, L., Burger, C., Blaise-Boisseau, S., Hennechart-Collette, C., Merle, G., Fach, P., 2009. Use of a robotic RNA purification protocol based on the NcliSens® easyMAG™ for real-time RT-PCR detection of hepatitis A virus in bottled water. *J. Virol. Methods* 157, 80–83.

Petrigiani, M., Verhoef, L., van Hunen, R., Swaan, C., van Steenberghe, J., Boxman, I., Ober, H.J., Vennema, H., Koopmans, M., 2010a. A possible foodborne outbreak

- of hepatitis A in the Netherlands, January–February 2010. *EuroSurveillance* 15 (11), pii:19512.
- Petrignani, M., Harms, M., Verhoef, L., van Hunen, R., Swaan, C., van Steenberghe, J., Boxman, I., Peran i Sala, R., Ober, H., Vennema, H., Koopmans, M., van Pelt, W., 2010b. Update: a food-borne outbreak of hepatitis A in the Netherlands related to semi-dried tomatoes in oil, January–February 2010. *EuroSurveillance* 15 (20), pii:19572.
- Rosenblum, L.S., Mirkin, I.R., Allen, D.T., Safford, S., Hadler, S.C., 1990. A multifocal outbreak of hepatitis A traced to commercially distributed lettuce. *Am. J. Public Health* 80, 1075–1079.
- Sánchez, G., Bosch, A., Pintó, R.M., 2007. Hepatitis A virus detection in food: current and future prospects. *Lett. Appl. Microbiol.* 45, 1–5.
- 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.
- Stals, A., Baert, L., De Keuckelaere, A., Van Coillie, E., Uyttendaele, M., 2011a. Evaluation of a norovirus detection methodology for ready-to-eat foods. *Int. J. Food Microbiol.* 145, 420–425.
- Stals, A., Baert, L., Van Coillie, E., Uyttendaele, M., 2011b. Evaluation of a norovirus detection methodology for soft red fruits. *Food Microbiol.* 28, 52–58.
- Tichopad, A., Dilger, M., Schwarz, G., Plaffl, M.W., 2003. Standardized determination of real-time PCR efficiency from a single reaction set-up. *Nucleic Acids Res.* 31 (20), e122 (Erratum in: *Nucleic Acids Res.* 31(22) (2003) 6688).
- Wheeler, C., Vogt, T.M., Armstrong, G.L., Vaughan, G., Weltman, A., Nainan, O.V., Dato, V., Xia, G., Waller, K., Amon, J., Lee, T.M., Highbaugh-Battle, A., Hembree, C., Evenson, S., Ruta, M.A., Williams, I.T., Fiore, A.E., Bell, B.P., 2005. An outbreak of hepatitis A associated with green onions. *N. Engl. J. Med.* 353, 890–897.
- Wilson, I.G., 1997. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 3741–3751.
- 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, H.W., 2004. Replication of norovirus in cell culture reveals a tropism for dendritic cells and macrophages. *PLoS Biol.* 2, e432.
- Wobus, C.E., Thackray, L.B., Virgin, H.W., 2006. Murine norovirus: a model system to study norovirus biology and pathogenesis. *J. Virol.* 80, 5104–5112.

1-2 Le sous-génotypage du virus de l'hépatite A par RT-qPCR

Hepatitis A virus subgenotyping based on RT-qPCR assays (article en cours de reviewing dans BMC Microbiology)

Le virus de l'hépatite A est divisé en trois génotypes humains, chacun subdivisé en deux sous-types (IA et IB, IIA et IIB, IIIA et IIIB).

En épidémiologie clinique, le génotypage des souches de VHA est réalisé en routine principalement en séquençant la région VP1-2A ou la région VP1 (Gillesberg Lassen et al., 2013 ; Schwartz et al., 2008 ; Guillois-Bécel et al., 2009) après amplification par RT-PCR de l'ARN viral obtenu à partir d'échantillons cliniques (sérum, selles, urine, salive). Cependant, cette approche est difficile à mettre en œuvre en virologie alimentaire puisque les génomes viraux issus d'aliments contaminés sont souvent retrouvés en trop faible quantité pour pouvoir être séquencés, ce qui empêche dans ce cas de relier la souche retrouvée chez les patients à celle retrouvée dans un aliment donné.

Pour proposer une alternative au typage par séquençage, des modèles moléculaires de RT-qPCR spécifiques à chacun de ces six sous-types de VHA ont été dessinés, puis testés sur des gammes d'ARN de VHA IA, IB, IIA, IIB, IIIA et IIIB, et enfin appliqués au typage d'échantillons cliniques.

Pour dessiner les amorces et les sondes spécifiques des six sous-types, des séquences nucléotidiques du VHA disponibles à partir de Genbank (NCBI) ont été alignées (logiciels Muscle et Jalview 2.8). La sonde a été dessinée grâce au logiciel BeaconDesigner afin d'être spécifique d'un sous-type donné en prenant en compte la variabilité génomique au niveau d'un seul nucléotide (=Single Nucleotide Polymorphism, SNP) d'un sous-type donné en regard des cinq autres. Les amorces ont été dessinées afin d'être spécifiques du sous-type ciblé tout en prenant en compte la diversité des séquences à l'intérieur de ce sous-type.

Etant donné la difficulté à obtenir des échantillons naturellement contaminés par du VHA de sous-types IIA, IIB, IIIA et IIIB, des plasmides contenant une séquence spécifique de chacun de ces sous-types ont été construits. Ces séquences nucléotidiques couvrent l'ensemble des modèles moléculaires afin que leurs spécificités puissent être testées.

Des gammes d'ARN ont été réalisées afin de déterminer la sensibilité et la spécificité de ces modèles. Les limites de détection obtenues sont de 50 copies-génomés /réaction de RT-qPCR pour VHA IIB, 500 copies-génomés /réaction pour VHA IA, IB, IIA et IIIB et 5000 copies-génomés /réaction pour VHA IIIA, ce qui est comparable à la limite de détection de 500 copies-génome /réaction obtenus avec le modèle de référence permettant l'amplification de toutes les souches de VHA (pan-VHA) (Costafreda et al., 2006). Ces modèles moléculaires sont tous spécifiques de leur sous-génotype. Le modèle spécifique de VHA IIA peut occasionnellement permettre l'amplification d'ARN VHA IIB, mais cette amplification non spécifique n'est pas observée en présence d'une faible concentration d'ARN VHA IIA (50 copies génome par réaction) et d'une forte concentration de VHA IIB (5.10^4 copies génomes).

Ces modèles moléculaires ont ensuite été testés sur 35 échantillons cliniques (5 selles et 30 sérums provenant du CNR VHA), précédemment génotypés par séquençage de la région VP1/2A, et ont permis la détection de 100% des échantillons cliniques. Les nombres de copies de génome du VHA déterminés par les modèles de RT-qPCR spécifiques de génotype ou par le modèle de référence ciblant l'ensemble des génotypes du VHA (Costafreda et al., 2006) étaient proches. En effet, les différences de quantification observées étaient de l'ordre de 1 log maximum et potentiellement dues aux différences d'efficacité d'amplification entre les modèles moléculaires de RT-qPCR et de biais liés à la quantification des différents ARN (utilisés comme standards) par spectrométrie.

Les deux méthodes de génotypages (par RT-qPCR et par séquençage) sont parfaitement concordantes pour 28 des 35 (80%) des échantillons.

Pour six échantillons, deux sous-types différents ont été détectés par RT-qPCR (IA/IIA dans une selle, IA/IB dans cinq sérums) alors que seul le génotype IA avait été identifié par séquençage, suggérant la présence de co-infections. En effet, la technique de séquençage conventionnelle par la méthode de Sanger ne permet d'identifier que la souche majoritaire car elle ne permet pas de déterminer la séquence de plusieurs souches présentes dans un même échantillon. De plus, des co-circulations de souches de sous-génotypes IA et IB ont été observées en Afrique du Sud, en Amérique du Sud et du Nord et en Europe, et des souches

IIA ont été identifiées en Afrique et en Europe (Nainan et al., 2006 ; Cristina and Costa-Mattioli, 2007).

Cependant, afin de vérifier qu'il ne s'agit pas d'amplifications non spécifiques, il serait intéressant de tester un plus grand nombre d'échantillons avec ces modèles de RT-qPCR, mais aussi d'analyser plus précisément les échantillons suspectés de co-infections pour vérifier cette hypothèse. Bien qu'une amplification non spécifique reste possible, il faut noter que seul un échantillon clinique a montré une co-détection IA-IIA et seuls six échantillons cliniques ont montré une co-détection IA-IB, sur les 15 échantillons cliniques identifiés comme génotype IA par séquençage.

Une identification de génotype discordante a été obtenue par séquençage et par RT-qPCR pour un échantillon de sérum: le génotype est identifié IA en RT-qPCR mais IB en séquençage. Etant donné que les régions ciblées par les deux modèles moléculaires IA et IB ainsi que la région séquencée ne sont pas les mêmes, il a été suggéré que la souche pouvait être une souche recombinante IA-IB, car d'une part ces deux génotypes co-circulent et d'autre part des recombinaisons entre sous-types IA et IB ont déjà été rapportées (Liu et al., 2009 ; Belalov et al., 2011). Etant donné la localisation des modèles IA et IB par rapport à la région VP1/2A qui est séquencée, on peut émettre l'hypothèse que le point de recombinaison soit localisé au niveau de VP1 (comme pour la souche recombinante 9F94 décrite par Costa-Mattioli et al. (2003a)).

En conclusion, ces modèles moléculaires de RT-qPCR peuvent être utilisés en virologie alimentaire afin de pouvoir génotyper les souches présentes dans les matrices, même lorsque leur concentration est trop faible pour un séquençage ultérieur. De plus, ces modèles peuvent être utilisés en virologie clinique afin de mettre en évidence des événements de co-infections, voire de recombinaisons, qui ne peuvent pas être détectés avec le séquençage classique de routine.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24

Hepatitis A virus subgenotyping based on RT-qPCR assays

(Version révisée- soumise le 4 novembre 2014)

Coralie Coudray-Meunier¹, Audrey Fraisse¹, Camélia Mokhtari², Sandra Martin-Latil¹, Anne-Marie Roque-Afonso²⁻³⁻⁴, Sylvie Perelle^{1*}

¹ Université Paris-Est, ANSES, Food Safety Laboratory, Enteric viruses unit, 23 Avenue du Général de Gaulle, 94706 Maisons-Alfort cedex, France.

² AP-HP, Hôpital Paul Brousse, Virologie, Villejuif, 94804 France

³ Univ Paris-Sud, UMR-S 785, Villejuif, 94804 France

⁴ INSERM U785, Villejuif, 94804 France

* Corresponding author: Tel: +33 (0)1 49 77 27 99; fax: +33 (0)1 43 68 97 62.

E-mail address: sylvie.perelle@anses.fr

coralie.coudray@anses.fr;

audrey.fraisse@anses.fr;

camelia.mokhtari@pbr.aphp.fr;

sandra.martin-latil@anses.fr;

anne-

marie.roque@pbr.aphp.fr

Running title: Hepatitis A virus subtyping

25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52

Abstract**Background**

The hepatitis A virus (HAV) is the most frequent cause of viral hepatitis worldwide and is recognized as one of the most widespread foodborne pathogens. HAV genotypes and subtypes differ in their geographic distribution and the incidence of HAV infection varies considerably among countries, and is particularly high in areas with poor sanitation and hygiene. Phylogenetic analyses are traditionally used in clinical microbiology for tracing the geographic origin of HAV strains. In food microbiology, this approach is complicated by the low contamination levels of food samples. To date, real-time *reverse-transcription PCR* has been one of the most promising detection methods due to its sensitivity, specificity and ability to deliver quantitative data in food samples, but it does not provide HAV subtyping information.

Results

Six subtype-specific RT-qPCR assays were developed for human HAV. The limit of detection of HAV was 50 genome copies / assay for subtype IIB, 500 genome copies / assay for IA, IB, IIA and IIIB and 5000 genome copies / assay for IIIA. The specificity of the assays was evaluated by testing reference isolates and *in vitro* HAV RNA transcripts. No significant cross reactivity was observed. Subtyping results concordant with sequencing analysis were obtained from 34/35 clinical samples. Co-infection with a minor strain of a different subtype was suggested in 5 cases and a recombinant event in one case.

Conclusions

These RT-qPCR assays may be particularly useful for accurately tracing HAV in low-level contaminated samples such as food matrices but also to allow co-infection identification in human samples.

Keywords: Hepatitis A virus, RT-qPCR assays, genotyping.

53 Background

54 Hepatitis A virus (HAV) is a small, non-enveloped hepatotropic virus classified into the *Hepatovirus* genus
55 within the *Picornaviridae* family. Its genome consists of an approximately 7.5 kilobase positive single-strand
56 RNA comprising a 5' untranslated region (5'UTR), a single open reading frame (ORF) that encodes both
57 structural and non-structural proteins, and a 3' UTR with a short poly(A) tail. There is only one serotype of HAV.
58 Genomic characterization of HAV has been carried out mainly by sequencing of strains from different
59 geographic regions of the world. Firstly, using a short fragment of the VP1/2A junction region, strains were
60 classified in to seven genotypes on the basis of >15% nucleotide variation between isolates, and the
61 subgenotypes with >7.5% to <15% nucleotide variation [1]. Then, the complete genomic data indicated that
62 genotypes II and VII should be considered a single genotype, based upon the complete VP1 sequence [2; 3]. So,
63 by sequencing of the VP1/2A junction and the VP1 gene, three genotypes (I, II, III) divided in two subtypes (A
64 and B) have been described for humans and three others (IV, V, VI) for primates [1-3].

65 HAV infection is the leading worldwide cause of acute viral hepatitis [4, 5]. There are an annual estimated
66 of 1.5 million cases of hepatitis A worldwide [6]. Optimal use of vaccination can significantly reduce the
67 hepatitis A disease burden and the World Health Organization position on hepatitis A vaccines depend on the
68 level of endemicity in countries. In highly endemic countries, large-scale vaccination programmes are not
69 recommended. In countries of intermediate endemicity, large-scale childhood vaccination may be considered
70 as a supplement to health education and improved sanitation. And in regions of low endemicity, vaccination
71 against hepatitis A is indicated for individuals with increased risk of contracting the infection such as travelers
72 to areas of intermediate or high endemicity [7]. HAV's geographical distribution is dependent on
73 socioeconomic development and sanitation levels. In areas with high and very high endemicity (Africa, Middle
74 East, India, Central and South America), where infections are mostly asymptomatic and epidemics are rare,
75 50% seroprevalence is reached between the ages of 5 and 14 [8]. In areas with moderate endemicity (Eastern
76 Europe and south-eastern Asia), 50% seroprevalence is reached between the ages of 14 and 34 and epidemics
77 can occur within the general population. In areas with low endemicity (North America, Western Europe and
78 Australia), most of the population is still susceptible to HAV, particularly people over 50 years old, and the risk
79 of fulminant hepatitis is higher.

80 HAV is transmitted mainly by the fecal-oral route, either by person-to-person contact or by ingestion of
81 contaminated water and food, particularly shellfish, soft fruits and raw vegetables [9-16]. HAV is stable in the
82 environment and is particularly resistant to disinfectants, heating, pressure and low pH [4, 17]. Contamination
83 may occur during growth in the field as well as during processing, storage, distribution or final preparation. In
84 developed countries, low incidence and low vaccine coverage have led to a high proportion of susceptible
85 individuals, which creates a potential for expanded hepatitis A outbreaks when contaminated products are
86 widely distributed [8].

87 The development of sensitive, reliable techniques for the detection of HAV in food and water samples
88 contributes to the safety of these products [18]. However, detection of HAV on the basis of its infectivity is
89 complicated by the absence of a reliable cell culture method and the low contamination levels of food samples.
90 HAV detection is currently based on nucleic acid testing methods. The International Organization for
91 Standardization / Technical specification (ISO/TS) 15216 standard was published in the first half of 2013 and
92 will be published as ISO standard methods after validation. These protocols target the 5'UTR which shows the
93 lowest diversity across HAV genotypes [19-22]. Currently, HAV genotyping relies on amplification, sequencing
94 and phylogenetic analysis of a portion of the viral genome. However, these techniques are time-consuming and
95 may lack sensitivity, particularly with food samples, where the level of contamination by enteric viruses is often
96 very low. Alternative approaches for HAV genotyping in complex samples (food, environmental) may help to
97 better manage the risk. Indeed, although genotypes I and III are the most frequently reported worldwide, HAV
98 genotypes and HAV strains differ in their geographic distribution [23, 24]; strain genotyping can thus give clues
99 to understanding food contamination routes. Currently, very few studies describe alternatives to sequencing
100 for HAV genotyping. In recent years single-nucleotide polymorphism (SNP) genotyping has become an area of
101 intense investigation and a valuable tool for diagnosing various pathologies. Various methods for SNP detection
102 have been reported including real-time PCR performed with primers and a probe spanning the SNP site [25].

103 The aim of this study was to develop a new approach for the subgenotyping of human HAV based on six
104 simplex SNP genotyping RT-qPCR assays and to apply this approach to human clinical samples.

105
106
107

108 Results

109 Design of HAV subtype RT-qPCR assays

110 The HAV subtype RT-qPCR assays were designed to give subtype-specific amplification on the basis of SNP
111 differentiating the targeted subtype from the others. In other words, at the SNP position, the same nucleotide
112 was found for all the subtypes except for the subtype of targeted HAV. Consequently, different regions of HAV
113 genome were chosen given their subtype specificity and the absence of major nonspecific homologies on
114 BLAST analysis. Moreover, degenerated bases were used to detect genetic variation within a given subtype
115 (Table 1; Table 2; Figure 1).

116

117 Sensitivity of subtype-specific RT-qPCR assays

118 The sensitivity of the simplex subtype-specific RT-qPCR assays was evaluated with serial 10-fold dilutions of *in*
119 *vitro* transcribed RNA for HAV IIA, IIB, IIIA and IIIB and genomic RNA for HAV IA and IB. From 5×10^5 to 5
120 genome copies / assay for IA, IB, IIA, IIB, and IIIB and from 5×10^7 to 5×10^2 genome copies / assay for IIIA were
121 tested. As shown on table 3, mean RT-qPCR efficiency, derived from the slope parameters, ranged from 83.9%
122 for IIIA to 109% for IB. R^2 values were ≥ 0.898 . The limit of detection (LOD) obtained for IA, IB, IIA and IIIB was
123 500 genome copies / assay, whereas the LOD of IIB was 50 genome copies / assay and the LOD of IIIA was 5000
124 genome copies / assay. The LOD of the consensus RT-qPCR assay [19] was in the same range as that of the
125 subtyping RT-qPCR assays at 500 genome copies / assay.

126

127 Specificity of subtype-specific RT-qPCR assays

128 The specificity of the RT-qPCR assays was assessed by testing HAV RNA of each subtype at a concentration of 5
129 $\times 10^4$ genome copies / assay with all the subtype-specific RT-qPCR assays. As shown on table 4, detection of the
130 specific target was observed for all assays with Ct values comprised between 25 and 37, consistent with assay
131 sensitivity. All but one were entirely specific. The IIA-specific assay occasionally allowed amplification of the IIB
132 target. However, this non-specific IIB amplification was not observed when as much as 5×10^4 genome copies /
133 assay of IIB RNA was tested in the presence of a low concentration of the specific IIA target (50 genome copies
134 / assay) (data not shown).

135

136 Fecal and serum samples analysis

137 Human clinical fecal and serum samples were genotyped by sequencing the VP1/2A region, as described [26]
138 and provided by the NRC. Then, they were tested with the consensus RT-qPCR assay [19] and with all the
139 subtype-specific RT-qPCR assays separately (Tables 5 and 6).

140 Four of the five stool samples and 24 out of the 30 sera were detected by a single subtype-specific assay that
141 provided a subtype result consistent with VP1/2A sequencing. The consensus and specific RT-qPCR assays gave
142 similar results with differences of quantification that did not exceed $1.9 \log_{10}$ (genome copies / μL or genome
143 copies / g).

144 In stool sample 1181216151 provided as a IA subtype by the NRC, subtype-specific assays detected both IA and
145 IIA RNA, with a IIA concentration $5.2 \log_{10}$ lower than that of the IA subtype (Table 5). Similarly, in the 5 sera
146 provided as the IA subtype by the NRC, subtype-specific assays detected both IA and IB RNA, with IB
147 concentrations 0.7 to $2 \log_{10}$ lower than IA. A single discrepant result was observed for serum sample
148 1311062298 provided as a IB subtype by VP1/ 2A region sequencing and identified as a IA subtype by the
149 subtype-specific RT-qPCR assays (Table 6).

150 In conclusion, the subgenotyping RT-qPCR assays allowed detecting 100% (35/35) of the clinical samples for the
151 presence of HAV. In total, 80.0 % (28 samples) of the clinical samples were found to correlate with the
152 genotyping by sequencing the VP1/2A region. Furthermore, positivity for more than one genotype identified by
153 sequencing appeared in 17.1 % (6 samples) of the clinical samples and a subtype discrepancy in 2.9 % (1
154 sample) of the clinical samples.

155

156

157 Discussion

158 Although HAV has been shown to possess a single conserved antigenic neutralization site [27] leading to a
159 single serotype, HAV strains isolated from different parts of the world have been classified into six genotypes (I
160 to VI), of which genotype I, II, and III can infect humans. Genotype I is the most prevalent worldwide, and
161 subtype IA is more common than IB. The other human genotypes are infrequent. In areas of low endemicity
162 such as the United States and Western Europe, IA dominates but all genotypes and subtypes have been
163 reported [23, 28, 29]. Genotype II isolates were originally identified in France in 1979 and Sierra Leone in 1988

164 [1] and appear to be limited to West Africa [30]. Genotype III has been reported in many parts of the world [28]
165 but is prevalent in the Indian subcontinent. An increase in genotype IIIA infections has been reported in Korea,
166 Russia, Estonia and in Japan. Moreover, IIIA and IIIB co-circulate broadly with IA and IB strains [5].

167
168 Phylogenetic analysis is useful to trace back the geographical origin of a given strain and for tracking
169 transmissions of HAV. Accurate typing of HAV from food samples could thus be helpful for transmission
170 investigations. However, HAV typing from food samples by a classical sequencing approach is often impaired by
171 the low contamination levels, and does not give access to potential contamination by several strains. Indeed,
172 implicated items (such as seafood, fruits and salads) in foodborne outbreaks can harbour a heterogeneous HAV
173 population that reflects the diversity of the viral strains circulating at the geographic location of item
174 contamination [31].

175 Two commercial quantitative HAV RT-qPCR assays have been described. The detection limit was 2 TCID₅₀ /mL
176 for the Roche kit and 5 TCID₅₀ /mL for the Artus kit. Both kits have been found suitable for detection and
177 quantification of HAV but only the Roche kit allowed the differentiation between genotype IA and IB after
178 melting curve analysis [32]. The present study introduces six RT-qPCR-based assays for specific molecular
179 genotyping of hepatitis A virus. To our knowledge, this is the first time that HAV subtyping has been achieved
180 by specific qPCR probes. This subtype identification method can be implemented in diagnostic and research
181 laboratories, avoiding post-PCR analysis and avoiding the problem of low viral loads in food samples.

182 All subtype assays were found suitable for quantification measurement for comparison with the data obtained
183 with the reference RT-qPCR assay (detecting all genotypes). The minimal variations (around 1log₁₀) observed
184 for the quantification were potentially due to the differences in amplification efficiencies and calibration curves
185 used. Most of the samples were correctly identified with regard to the genotype provided by VP1/2A
186 sequencing. In 6 samples (1 stool and 5 sera), the specific RT-qPCR assay identified a major IA strain, the same
187 one determined by VP1/2A sequencing, also in addition to a second subtype, present in a lower concentration.

188 The conventional genotyping used as a reference assay is a “golden standard assay”. The design of HAV
189 subgenotyping RT-qPCR assays was based on SNP in the probe associated with degenerated bases in the
190 primers to enhance the specificity. Nevertheless, cross-reactivity could be only definitively excluded with the
191 entire genome sequencing for the tested samples. However, co-circulation of the subgenotypes IA and IIIA has

192 been reported in India [33] and of IA, IB and IIIA in Korea [34]. Co-circulation of the subgenotypes IA and IB in
193 South Africa, South America, Europe and the US and the existence of recombination events between
194 subgenotypes have also been observed [35-37]. Indeed, HAV exploits all known mechanisms of genetic
195 variation to ensure its survival, including mutation and recombination [38, 39]. HAV recombination was
196 originally reported in cell culture [40]. Its extent in nature was appreciated only recently [35, 36, 38, 39, 41] and
197 it appears that recombination occurs along the entire length of the genome [38].

198 The present finding from the stool sample of a patient who had not traveled abroad may be due to a co-
199 infection by IA and IIA subtypes. Indeed, HAV IA is the dominant strain in France but IIA strains have been
200 isolated among French travelers returning from Africa as well as from autochthonous cases [30]. A co-infection
201 rather than an event of recombination is suggested because of the huge difference in the concentration of the
202 subtypes. Regarding these two signals, although non-specific amplification due to a very high viral load cannot
203 be excluded, it should be noted that no IIA amplification was detected from any of the 14 HAV IA serum
204 samples.

205
206 The discovery of a major IA signal, combined with a 10- to 100-fold lower IB signal in 5 sera from patients
207 having traveled abroad (at least for three of them) may suggest either an event of recombination or, more
208 likely, a co-infection. For these samples, the genome copy numbers determined by the 5'-UTR assay was not
209 the sum of those determined by subgenotyping RT-qPCR assays together which can be explained by the lack of
210 accurate quantification or by cross reactivity. As conventional Sanger sequencing does not allow accurate
211 identification of multiple species within a sample, the hypotheses could be investigated by cloning and
212 sequencing or by next generation sequencing.

213
214 A single sample from a patient contaminated in Morocco provided a discrepant result by specific RT-qPCR and
215 sequencing; this sample may correspond to an IA/IB recombinant in the P1 region of the HAV genome since IA-
216 specific amplification targets the VP4 region (nt 702 to 820) and sequencing targets the VP1/2A region (nt 2870
217 to 3381). The sequencing of this sample was attempted but has been unsuccessful may be because of the low
218 viral load.

219

220 It was concluded that the RT-qPCR assays developed in this study are suitable tools for quantification of HAV
221 and subtype identification. They need to be validated by testing a larger number of clinical, environmental and
222 food samples. Conventional genotyping used as a reference assay is a “golden standard assay”, and the RT-
223 qPCR assays described here could be recommended as an additional test to the conventional genotyping and
224 for use in cases of failure of the conventional typing method. They may be particularly useful for accurately
225 tracing HAV in samples with low-level contamination such as food matrices, but also can provide easy
226 identification of a co-infection in human samples.

227

228

229 **Materials and methods**

230 **Viral isolates**

231 The genotype IB HM175/18f strain, clone B (VR-1402) was obtained from the American Type Culture Collection
232 (ATCC). This clone replicates rapidly and has cytopathic effects in cell culture [40]. HAV stock was produced by
233 propagation in foetal rhesus monkey kidney (FRhK-4) cells (ATCC, CRL-1688) [42] and titrated by plaque assay
234 [43]. Results were expressed in plaque-forming units/mL (PFU/mL) and HAV stock contained 10^7 PFU/mL.
235 Aliquots of 100 μ L were kept frozen at -80°C for later use.

236

237 **Clinical samples**

238 Ethics statement: Hepatitis A virus infection is a notifiable disease in France. The current system of mandatory
239 reporting was approved by the Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés (deliberation n° 02-082,
240 November 19 2002). Patients receive oral and written information on the finality of the notification and on the
241 modalities of information recording. This information is available on line on the web site of the Institut de Veille
242 Sanitaire (IVS) at
243 http://www.invs.sante.fr/content/download/6498/42945/version/2/file/fiche_info_patient.pdf.

244 All clinical and biological parameters are treated anonymously. The virological surveillance of strain diversity is
245 performed on stored samples obtained for hepatitis A diagnosis (no need for any additional blood draw).

246 Diagnostic laboratories are asked to contribute to HAV strains surveillance by sending samples to the National

247 Reference Centre (NRC) for HAV. All data and samples are anonymously collected and analyzed. The study was
248 conducted in accordance with the ethics principles of the Declaration of Helsinki.

249

250 HAV genotyping from stools and serum samples collected by the French NRC for Hepatitis A was determined by
251 sequencing of the VP1/2A junction region as previously described [26]. Stool samples were suspended in 10
252 mM Phosphate Buffered Saline (PBS), pH 7.4, to obtain a final 10% suspension (w/v), vortexed and centrifuged
253 at 3000 g for 30 min at 4°C. Aliquots of 100 µL supernatant were kept frozen at -80°C for later use. Serum
254 samples were kept frozen at -80°C until later use.

255

256 **Viral RNA extraction**

257 Aliquots of frozen fecal samples or viral stocks were supplemented with NucliSens® easyMAG™ lysis buffer
258 (BioMérieux, Marcy l'Etoile, France) up to 3 mL and subjected to the NucliSens® easyMAG™ platform
259 (Biomérieux) for total nucleic acid extraction by the “off board Specific A protocol” according to manufacturer’s
260 instructions. Nucleic acids were finally eluted in 70 µL of elution buffer and stored at -80°C.

261 Two hundred µL of frozen sera samples were subjected to the NucliSens® easyMAG™ platform (Biomérieux) for
262 total nucleic acid extraction by the “Specific B protocol” according to manufacturer’s instructions. Nucleic acids
263 were then eluted in 50 µL of elution buffer and stored at -80°C.

264

265 **HAV RNA *in vitro* transcripts**

266 **The cDNA corresponding to nucleotides 39-518 (5'UTR)** of the IB genomic sequence (M59808.1) was cloned
267 into the pGEM-T Easy vector (Promega, Charbonnières-les-Bains, France) and propagated in *E. coli* One Shot®
268 TOP10F' (Life technologies, Saint Aubin, France). High quality DNA plasmid containing HAV regions (p-HAV5)
269 was purified using the Qiagen Plasmid midi kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) according to the manufacturer’s
270 protocol.

271 HAV cDNA of genotypes IIA, IIB, IIIA or IIIB corresponding respectively to the 588-3183, 587-3183, 618-3210
272 and 618-3210 positions of the genomic sequence (AY644676.1, AY644670.1, AB279732.1, AB279735.1) were
273 cloned into the pBluescriptIIISK+vector by Genecust (Dudelange, Luxembourg). All recombinant plasmids were
274 purified by Genecust and used to produce RNA transcripts. HAV IIA, IIB, and IIIB DNA plasmids (0,5 µg) were

275 digested with *Hind*III (Life technologies) and HAV 5'UTR and HAV IIIA DNA plasmids were digested with *Spe*I
276 (Life technologies). Digested plasmids were transcribed by using the MEGAscript® kit (Life technologies)
277 according to the manufacturer's protocol. Synthesized RNA was treated twice with Turbo™ DNase (Life
278 technologies) according to the manufacturer's protocol in order to remove the DNA template following
279 transcription, and purified by using the MEGAclean kit (Life technologies) according to manufacturer's
280 instructions. The synthesized RNA was confirmed with RT-qPCR and quantified by measuring absorbance at 260
281 / 280 nm with a Nanodrop ND-100 (Thermoscientific, France) and the free software available on the
282 "<http://endmemo.com/bio/dnacopynum.php>" website. RNA stocks were diluted to contain 10⁹ copies / μL and
283 aliquoted and stored at - 80°C.

284

285 Titers of the clarified fecal suspensions, serum samples and HM175/18f supernatants were obtained by RT-
286 qPCR targeting the 5'UTR (see below), using a standard curve derived from ten-fold dilutions of the 5'UTR
287 transcript RNA from p-HAV5. Titer was expressed in genome copies.

288

289 **Primers and probes**

290 The RT-qPCR assay targeting the 5'UTR described by Costafreda et al. (2006) [19] was used to detect all HAV
291 genotypes. This RT-qPCR assay is referred to as "consensus RT-qPCR". Primers and probe sets were designed by
292 using Beacon Designer software (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) to give subtype-specific amplification
293 on the basis of single nucleotide polymorphisms. To identify genotype-specific conserved regions of HAV,
294 complete sequences available from GenBank (NCBI) were aligned (Table 1) with MUSCLE software [44] and
295 multiple alignment was visualized with JALVIEW software (version 2.8) [45]. Hydrolysis probes were labeled at
296 the 5' end with 6-carboxyfluorescein (FAM) and at the 3' end with black hole quencher 1 (BHQ1) (Table 6 and
297 Figure 1).

298 Primers and probes were purchased from Life Technologies or Eurofins MWG Operon (Les Ulis, France).

299

300 **RT-qPCR conditions**

301 Quantitative one-step RT-PCR for detection of HAV was carried out on a CFX96™ real-time PCR detection
302 system from Bio-Rad. Reactions were performed in a 15 μL reaction mixture containing 1X of RNA UltraSense™

303 master mix and 0.63 µL of RNA Ultrasense™ enzyme mix, which are components of RNA UltraSense™ One-Step
304 Quantitative RT-PCR System (Life technologies), 2 U RNase inhibitor (Life technologies), 5 µg of bovine serum
305 albumin (Life Technologies), 500 nM of forward primer, 900 nM of reverse primer, 250 nM of probe, and 5 µL
306 of sample. A negative control containing all the reagents except the RNA template was included in each set of
307 reactions. The one-step RT-qPCR program involved 60 min reverse transcription of RNA at 55°C, followed by a 5
308 min denaturation step at 95°C, and finally 45 cycles of 15 s at 95°C, 1 min at 56°C and 1 min at 65°C.
309 Fluorescence was automatically recorded by the instrument at the end of the elongation steps (1 minute at
310 65°C) for each amplification cycle. All samples were characterized by a corresponding cycle threshold (Ct)
311 value. Negative samples gave no Ct value. For each specific RT-qPCR assay, a standard curve was generated
312 using 10-fold dilutions of titered RNA corresponding to each subtype. For the consensus RT-qPCR assay, a
313 standard curve was generated using 10-fold dilutions of titered RNA transcripts from p-HAV5. The slopes (S) of
314 the regression lines were used to calculate the amplification efficiency (E) of the RT-qPCR reactions, according
315 to the formula $E = 10^{-1/S} - 1$ [46].

316

317 **Assay performance assessment**

318 Genotype IB HAV RNA obtained from HM175/18f, genotype IA RNA obtained from a fecal sample (stool
319 number 128061099) and genotype IIA, IIIA, IIB, IIIB RNA transcripts were used to determine the sensitivity and
320 the specificity of the subgenotyping RT-qPCR assays. All samples were analyzed in duplicate in three different
321 experiments resulting from 6 Ct values.

322

323 **List of abbreviations**

324 ATCC, American Type Culture Collection; BLAST, Basic Local Alignment Search Tool; CEN, European Committee
325 for Standardisation; cDNA, Complementary DNA; DNA, Deoxyribonucleic acid; HAV, hepatitis A virus; ISO/TS,
326 International Organization for Standardization/Technical Specification; LOD, limit of detection; ORF, open
327 reading frame; NCBI, National Center for Biotechnology Information; NRC, National Reference Centre; PBS,
328 phosphate-buffered saline; PFU, plaque-forming units; RNA, Ribonucleic acid; RT-qPCR, quantitative reverse
329 transcriptase PCR; SNP, Single Nucleotide Polymorphism; UTR, untranslated region.

330

331 **Competing interests**

332 The authors have no conflicting financial interests.

333

334 **Author's contributions**

335 CC, AF, CM performed these experiments. All authors wrote, read and approved the final manuscript.

336

337 **Acknowledgements**

338 This work is part of the thesis by Coralie Coudray-Meunier, a PhD student who received financial support from

339 ANSES.

340

341 **References**

342 1. Robertson BH, Jansen RW, Khanna B, Totsuka A, Nainan OV, Siegl G, Widell A, Margolis HS, Isomura S, Ito K:

343 **Genetic relatedness of hepatitis A virus strains recovered from different geographical regions.** *J Gen Virol*

344 1992, **73**: 1365-1377.

345 2. Lu L, Ching KZ, de Paula VS, Nakano T, Siegl G, Weitz M, Robertson BH: **Characterization of the complete**

346 **genomic sequence of genotype II hepatitis A virus (CF53/Berne isolate).** *J Gen Virol* 2004, **85**: 2943-2952.

347 3. Costa-Mattioli M, Cristina J, Romero H, Perez-Bercoff R, Casane D, Colina R, Garcia L, Vega I, Glikman G,

348 Romanowsky V, Castello A, Nicand E, Bassin M, Billaudel S, Ferre V: **Molecular evolution of hepatitis A virus:**

349 **a new classification based on the complete VP1 protein.** *J Virol* 2002, **76**: 9515–9525.

350 4. Koopmans M, Duizer E: **Foodborne viruses: an emerging problem.** *Int J Food Microbiol* 2004, **90**: 23-41.

351 5. Vaughan G, Goncalves Rossi LM, Forbi JC, de Paula VS, Purdy MA, Xia G, Khudyakov YE: **Hepatitis A virus: Host**

352 **interactions, molecular epidemiology and evolution.** *Infect Genet Evol* 2014, **21C**: 227-243.

353 6. Franco E, Meleleo C, Serino L, Sorbara D, Zaratti L. Hepatitis A: **Epidemiology and prevention in developing**

354 **countries.** *World J Hepatol* 2012, **4**: 68-73.

355 7. World Health Organization. **Hepatitis A vaccines.** *Wkly Epidemiol Rec* 2000, **75**: 38-44.

356 8. Mohd Hanafiah K, Jacobsen KH, Wiersma ST: **Challenges to mapping the health risk of hepatitis A virus**

357 **infection.** *Int J Health Geogr* 2011, **10**: 57.

358 9. Anonymous: **Hepatitis A outbreak in Australia [Internet].** National Travel Health Network and Centre; 2009

359 November 13 [cited 2010 March 25]. Available

- 360 from:http://www.nathnac.org/pro/clinical_updates/hepatitisaoutbreakaustralia_131109healthprofessionals.
- 361 htm.
- 362 10. Beuchat LR: **Vectors and conditions for preharvest contamination of fruits and vegetables capable of**
- 363 **causing enteric diseases.** *Brit Food J* 2006, **108**: 38-53.
- 364 11. Gallot, C, Grout L, Roque-Afonso A-M, Couturier E, Carrillo-Santistevé P, Pouey J, Letort M-J, Hoppe S,
- 365 Capdepon P, Saint-Martin S, De Valk H, Vaillant V: **Hepatitis A associated with semidried tomatoes, France,**
- 366 **2010.** *Emerg Infect Dis* 2011, **17**: 566-567.
- 367 12. Hernández F, Monge R, Jiménez C, Taylor L: **Rotavirus and hepatitis A virus in market lettuce (*Latuca sativa*)**
- 368 **in Costa Rica.** *Int J Food Microbiol* 1997, **37**: 221-223.
- 369 13. Lacey S, Tracy L, Hammond R, Revill P, Donnan E, Lalor K, Bowden S: **Hepatitis A virus outbreak: molecular**
- 370 **epidemiology indicates a common source.** The 5th TEPHINET Southeast Asia and Western Pacific Bi-Regional
- 371 Scientific Conference; November 2-6, Seoul, Korea. 2009.
- 372 14. Petrignani M, Verhoef L, van Hunen R, Swaan C, van Steenbergén J, Boxman I, Ober HJ, Vennema H,
- 373 Koopmans M: **A possible foodborne outbreak of hepatitis A in the Netherlands, January–February 2010.**
- 374 *Euro Surveill* 2010, **15 (11)**, pii:19512.
- 375 15. Petrignani M, Harms M, Verhoef L, van Hunen R, Swaan C, van Steenbergén J, Boxman I, Peran i Sala R, Ober
- 376 H, Vennema H, Koopmans M, van Pelt W: **Update: a food-borne outbreak of hepatitis A in the Netherlands**
- 377 **related to semi-dried tomatoes in oil, January–February 2010.** *Euro Surveill* 2010, **15 (20)**, pii:19572.
- 378 16. Rosenblum LS, Mirkin IR, Allen DT, Safford S, Hadler SC: **A multifocal outbreak of hepatitis A traced to**
- 379 **commercially distributed lettuce.** *Am J Public Health* 1990, **80**: 1075-1079.
- 380 17. Koopmans M, von Bonsdorff CH, Vinjé J, de Medici D, Monroe S: **Foodborne viruses.** *FEMS Microbiol Rev*
- 381 2002; **26**: 187-205.
- 382 18. Sánchez G, Bosch A, Pintó RM: **Hepatitis A virus detection in food: current and future prospects.** *Lett Appl*
- 383 *Microbiol* 2007, **45**: 1-5.
- 384 19. Costafreda MI, Bosch A, Pinto RM: **Development, evaluation and standardization of a real time TaqMan**
- 385 **reverse transcription-PCR assay for quantification of hepatitis A virus in clinical and shellfish samples.** *Appl*
- 386 *Environ Microbiol* 2006, **72**: 3846-3855.
- 387 20. ISO/TS 15216-1. **Microbiology of food and animal feed -- Horizontal method for determination of hepatitis A**
- 388 **virus and norovirus in food using real-time RT-PCR -- Part 1: Method for quantification.** International
- 389 Organization for Standardization, Geneva, Switzerland. 2013.

- 390 21. ISO/TS 15216-2. **Microbiology of food and animal feed -- Horizontal method for determination of hepatitis A**
391 **virus and norovirus in food using real-time RT-PCR -- Part 2: Method for qualitative detection.** International
392 Organization for Standardization, Geneva, Switzerland. 2013.
- 393 22. Lees D, CEN WG6 TAG4: **International standardization of a method for detection of human pathogenic**
394 **viruses in molluscan shellfish.** *Food Environ Virol* 2010, **2**: 146-155.
- 395 23. Nainan OV, Xia G, Vaughan G, Margolis HS: **Diagnosis of hepatitis a virus infection: a molecular approach.**
396 *Clin Microbiol* 2006, **19**: 63-79.
- 397 24. Tjon G, Xiridou M, Coutinho R, Bruisten S: **Different transmission patterns of hepatitis A virus for two main**
398 **risk groups as evidenced by molecular cluster analysis.** *J Med Virol* 2007, **79**: 488-494.
- 399 25. Woodward J: **Bi-Allelic SNP Genotyping Using the TaqMan(®) Assay.** *Methods Mol Biol.* 2014, **1145**: 67-74.
- 400 26. Schwarz NG, Revillion M, Roque-Afonso AM, Dussaix E, Giraud M, Liberpre C, Couturier E, Delarocque
401 Astagneau E: **A food-borne outbreak of hepatitis A virus (HAV) infection in a secondary school in Upper**
402 **Normandy, France, in November 2006.** *Euro Surveill* 2008, **13 (22)**. pii: 18885.
- 403 27. Stapleton JT, Lemon SM: **Neutralization escape mutants define a dominant immunogenic neutralization site**
404 **on hepatitis A virus.** *J Virol* 1987, **61**: 491-498.
- 405 28. Costa-Mattioli M: **Genetic variability of hepatitis A virus.** *J Gen Virol* 2003, **84**: 3191-3201.
- 406 29. Tjon GM, Wijkmans CJ, Coutinho RA, Koek AG, van den Hoek JA, Leenders AC, Schneeberger PM, Bruisten SM:
407 **Molecular epidemiology of hepatitis A in Noord-Brabant, The Netherlands.** *J Clin Virol* 2005, **32**: 128-136.
- 408 30. Desbois D, Couturier E, Mackiewicz V, Graube A, Letort MJ, Dussaix E, Roque-Afonso A.M: **Epidemiology and**
409 **genetic characterization of hepatitis A virus genotype IIA.** *J Clin Microbiol* 2010, **48**: 3306-3315.
- 410 31. Vaughan G, Xia G, Forbi JC, Purdy MA, Rossi LM, Spradling PR, Khudyakov YE: **Genetic relatedness among**
411 **hepatitis A virus strains associated with food-borne outbreaks.** *PLoS One* 2013; **8**: e74546.
- 412 32. Sánchez G, Populaire S, Butot S, Putallaz T, Joosten H: **Detection and differentiation of human hepatitis A**
413 **strains by commercial quantitative real-time RT-PCR tests.** *J Virol Methods* 2006, **132**: 160-165.
- 414 33. Hussain Z, Das BC, Husain SA, Asim M, Chattopadhyay S, Malik A, Poovorawan Y, Theamboonlers A, Kar P:
415 **Hepatitis A viral genotypes and clinical relevance: Clinical and molecular characterization of hepatitis A**
416 **virus isolates from northern India.** *Hepatol Res* 2005, **32**: 16-24.
- 417 34. Song HU, Hwang SG, Kwon CI, Lee JE, Ko KH, Hong SP, Park PW, Rim KS: **Molecular epidemiology of hepatitis**
418 **A virus in the South-East area of Gyeonggi-do in Korea.** *Yonsei Me J* 2009; **50**: 512-516.
- 419 35. Aguirre S, Malirat V, Scodeller E, Mattion N: **First full-length genomic sequence of a hepatitis A virus isolated**
420 **in Argentina shows recombination between subgenotypes IA and IB.** *Virus Res* 2011, **155**: 316-324.

- 421 36. Liu W, Zhai J, Liu J, Xie Y: **Identification of recombination between subgenotypes IA and IB of hepatitis A**
422 **virus.** *Virus Genes* 2010, **40**: 222-224.
- 423 37. Villar LM, Morais LM, Aloise R, Melo MM, Calado IA, Lampe E, Gaspar AM: **Co-circulation of genotypes IA and**
424 **IB of hepatitis A virus in Northeast Brazil.** *Braz J Med Biol Res* 2006, **39**: 873-881.
- 425 38. Belalov I.S, Isaeva OV, Lukashev AN: **Recombination in hepatitis A virus: evidence for reproductive isolation**
426 **of genotypes.** *J Gen Virol* 2011, **92**: 860-872.
- 427 39. Cristina J, Costa-Mattioli M: **Genetic variability and molecular evolution of hepatitis A virus.** *Virus Res* 2007,
428 **127**: 151-157.
- 429 40. Lemon SM, Murphy PC, Shields PA, Ping LH, Feinstone SM, Cromeans T, Jansen RW: **Antigenic and genetic**
430 **variation in cytopathic hepatitis A virus variants arising during persistent infection: evidence for genetic**
431 **recombination.** *J Virol* 1991, **65**: 2056-2065.
- 432 41. Costa-Mattioli M, Ferré V, Casane D, Perez-Bercoff R, Coste-Burel M, Imbert-Marcille BM, Andre EC,
433 Bressollette-Bodin C, Billaudel S, Cristina J: **Evidence of recombination in natural populations of hepatitis A**
434 **virus.** *Virology* 2003, **20**:51-59.
- 435 42. Cromeans T, Sobsey MD, Fields HA: **Development of a plaque assay for a cytopathic, rapidly replicating**
436 **isolate of hepatitis A virus.** *J Med Virol* 1987, **22**: 45-56.
- 437 43. Dubois E, Hennechart C, Deboosère N, Merle G, Legeay O, Burger C, Le Calvé M, Lombard B, Ferré V, Traoré O:
438 **Intra-laboratory validation of a concentration method adapted for the enumeration of infectious F-specific**
439 **RNA coliphage, enterovirus, and hepatitis A virus from inoculated leaves of salad vegetables.** *Int J Food*
440 *Microbiol* 2006, **108**: 164-171.
- 441 44. Edgar RC: **MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput.** *Nucleic Acids Res*
442 2004, **32**: 1792-1797.
- 443 45. Waterhouse AM, Procter JB, Martin DMA, Clamp M, Barton GJ: **Jalview version 2: A Multiple Sequence**
444 **Alignment and Analysis Workbench.** *Bioinformatics* 2009, **25**: 1189-1191.
- 445 46. Tichopad A, Dilger M, Schwarz G, Plaffl MW: **Standardized determination of real-time PCR efficiency from a**
446 **single reaction set-up.** *Nucleic Acids Res* 2003, **31(20)**, e122 (Erratum in: *Nucleic Acids Res* 31(22) 6688).

447

448

449

450

451 **Legends:**

452 **Figure 1: HAV genome regions targeted for genotyping.** The different genomic regions used to identify each
453 HAV genotype are represented below the HAV genome scheme.

454

455 **Table 1: GenBank accession numbers for HAV isolates.** Nucleic acid sequences were used to design primers
456 and probes sets.

457 **Table 2: Sequences of primers and probes in the direction 5'-3'.** The specific genotype SNP is in bold. Probes
458 are FAM-BHQ except HAV 5'UTR which is FAM-MGB. *: Costafreda et al., 2006 [19].

459

460 **Table 3: Characteristics of RT-qPCR standard curves.** Parameters of RT-qPCR amplification curves obtained for
461 HAV detection by the RT-qPCR reference method and HAV subgenotyping by RT-qPCR assays. The limit of
462 detection (LOD) has been defined as the lowest amount of HAV detected in the three experiments and is
463 shown in bold. nd: not detected. / : not analyzed.

464

465 **Table 4: Specificity of subgenotyping RT-qPCR assays.** Six subtyping RT-qPCR assays were tested with 5×10^4
466 genome copies / assay for all subtypes of HAV in duplicate in three different experiments. Results are
467 expressed as means cycle threshold (Ct) values \pm standard deviations (SD). The number of positive Ct values is
468 given in parentheses.

469

470 **Table 5: Stool samples analysis.** Each sample was tested with the reference RT-qPCR assay targeting the 5'UTR
471 of HAV and the 6 genotype-specific RT-qPCR assays. The subtyping results were compared with those obtained
472 with sequencing by the NRC. Concentrations are given in genome copies per gram of stool. NC= Not
473 communicated. The difference of quantification between 5'UTR and subtype RT-qPCR assays is calculated by
474 the formula: $(\log_{10} (\text{copies genomes determined by reference RT-qPCR} / \text{copies genomes determined by}$
475 $\text{subgenotyping RT-qPCR assays}))$. The difference of quantification between IA and IIA subtypes by RT-qPCR
476 assays is calculated by the formula: $(\log_{10} (\text{copies genomes determined by IA RT-qPCR} / \text{copies genomes}$
477 $\text{determined by IIA RT-qPCR assays}))$.

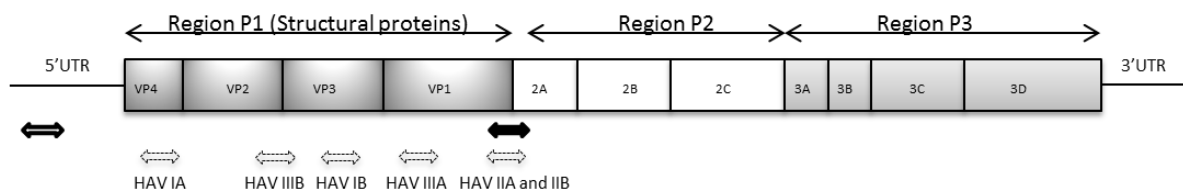
478

479 **Table 6: Serum samples analysis.** Each sample was tested with the reference RT-qPCR assay targeting the
 480 5'UTR of HAV and the 6 genotype-specific assays. The subtyping results were compared with those obtained
 481 with sequencing by the NRC. Concentrations are given in genome copies per μl of serum. NC= Not
 482 communicated. The difference of quantification between 5'UTR and subtype RT-qPCR assays is calculated by
 483 the formula: $(\log_{10}(\text{copies genomes determined by reference RT-qPCR} / \text{copies genomes determined by}$
 484 $\text{subgenotyping RT-qPCR assays}))$. The difference of quantification between IA and IB subtypes by RT-qPCR
 485 assays is calculated by the formula: $(\log_{10}(\text{copies genomes determined by IA RT-qPCR} / \text{copies genomes}$
 486 $\text{determined by IB RT-qPCR assays}))$.

487

488

489



- ➡ Junction VP1-2A : Reference sequencing
- ↔ RT-qPCR amplicon : for all genotype of HAV
- ↔ RT-qPCR amplicon : HAV sub-genotype specific

490

491

492

493 **Figure 1**

494

Genotype	Reference strain	GenBank accession number
HAV IA	AB020564.1	EU526088; EU526089; EU131373; AB020567; X75216; EF406357; AB623053; X83302; X75214; AB020569; AB618531; AB020565; K02990; AB618529; AF485328; EF207320; HM769724; AB020564; EU251188; X75215 ; AB020568; HQ437707; AF512536; AB020566; AF357222
HAV IB	M14707	HQ246217; NC_001489; M14707; HV192265; FB746524; M59810; EF406361; EF406359; EF405360; DQ646426; EF406363; EF406362; AF268396; M59809; M16632; M59808; EF406358; AF314208; M20273
HAV IIA	AY644676.1	AY574059; AY644676; GU390574; GU390572; GU390577; GU390576
HAV IIB	AY644670.1	AY644670; Z77248; Z77247; Z77245; Z77244; Z77243; Z77246
HAV IIIA	AB279732.1	AB279732; FJ360735; EU011791 ; FJ360730 ; FJ360733 ; DQ991030 ; AB279734 ; DQ991029 ; FJ360732; FJ360734; AB279733; FJ360731
HAV IIIB	AB279735.1	AB279735; AB258387; AB425339; AB300205;

495

496 **Table 1**

497

498

Genotype	Reference strain		Sequence	Position
HAV IA	AB020564.1	Forward primer	GCA TTT AGG TTT TTC CTC ATT	702-722
		Reverse primer	TCA ACK GAC TGA ATC ATT	837-820
		Probe	TCC AAA CAA GGA ATT TTC CAG AC	743-765
HAV IB	M14707	Forward primer	AAG CTT ATT GTG TAY TGT TAT	2070-2090
		Reverse primer	CAG AAT CAT CTC CAA CYT	2223-2208
		Probe	TTC TCC TTC TAA CGT TGC TTC CCA	2103-2125
HAV IIA	AY644676.1	Forward primer	ACY ATG ATG AGC AGA ATT G	2978-2996
		Reverse primer	GCA TAT TTT AAT CTC TGC TT	3129-3110
		Probe	AGA CCT GGA ATC GTC AGT GGA TGA	3004-3027
HAV IIB	AY644670.1	Forward primer	GGA GAT TTG AAA GTC ATA TTG	3047-3067
		Reverse primer	TTC CTG GGC ATA CTT TAG	3135-3118
		Probe	AGT CTT AAT TCT TTG TAT GGT TTTC	3078-3094
HAV IIIA	AB279732.1	Forward primer	TCC CTT GGA TTT GAC AAT	2605-2622
		Reverse primer	RGT ATT RAA CCT AAC AGC	2763-2747
		Probe	AAT TAT AAC TGG GGC TAC TGA TGT T	2623-2647
HAV IIIB	AB279735.1	Forward primer	AAT CCG ATG CTT CTC AAG	1560-1577
		Reverse primer	GCC TTC CTG AAT GGT ATT	1841-1824
		Probe	AAA ATT ACA CAC TTY ACA ACY TGG A	1589-1613
HAV 5'UTR	M14707	Forward primer *	TCACCGCCGTTTGCCTAG	68-85
		Reverse primer *	GGAGAGCCCTGGAAGAAAG	241-223
		Probe *	CCTGAACCTGCAGGAATTAA	169-150

499

500 **Table 2**

501

502

Genome copies / RT-qPCR assay	Mean Ct values +/- SD						
	HAV IA	HAV IB	HAV IIA	HAV IIB	HAV IIIA	HAV IIIB	HAV 5'UTR
5 x 10 ⁷	/	/	/	/	26,56±0,89	/	/
5 x 10 ⁶	/	/	/	/	29,49±0,88	/	/
5 x 10 ⁵	26.28±0.59	26.54±0.95	26.64±0.60	22.25±0.45	32.97±0.94	24.50±0.50	27.07±1.00
5 x 10 ⁴	30.01±0.58	29.60±0.115	30.26±0.52	25.53±0.35	36.90±1.69	27.65±0.48	30.76±0.74
5 x 10 ³	33.34±0.66	32.66±1.47	33.82±0.56	28.62±0.66	41.34±0.69	31.58±0.47	33.32±0.79
5 x 10 ²	36.28±0.69	36.16±1.48	36.59±0.79	32.00±0.67	nd	35.64±1.48	37.16±1.83
5 x 10 ¹	nd	nd	nd	35.79±1.09	/	nd	nd
5 x 10 ⁰	nd	nd	nd	nd	/	nd	nd
E	99.0%	109.0%	95.8%	100.8%	83.9%	86.5%	102.2%
R ²	0.974	0.898	0.973	0.982	0.952	0.966	0.916

503

504

505 **Table 3**

506

507

508

509

Sample	Set primers / probe					
	HAV IA	HAV IB	HAV IIA	HAV IIB	HAV IIIA	HAV IIIB
HAV IA	30.01±0.58 (6/6)	-	-	-	-	-
HAV IB	-	29.60±1.15 (6/6)	-	-	-	-
HAV IIA	-	-	30.57±0.87 (6/6)	-	-	-
HAV IIB	-	-	35.02±1.31 (4/6)	25.53±0.35 (6/6)	-	-
HAV IIIA	-	-	-	-	36.90±1.69 (6/6)	-
HAV IIIB	-	-	-	-	-	27.65±0.48 (6/6)

510

511 **Table 4**

512

513

Stool	Age/Sex	Transaminases	Travel	Genotype by sequencing	HAV genome copies / g of stool						Difference of quantification between 5'UTR and subtype RT-qPCR assays (log ₁₀)	Difference of quantification between IA and IIA subtype RT-qPCR assays (log ₁₀)	
					5'UTR	IA	IB	IIA	IIB	IIA			IIB
0780627147	21-30/M	NC	none	IA	2.30 x10 ⁷	1.93 x10 ⁸	-	-	-	-	-	IA : -0.92	-
1280210015	51-60/F	5680	Senegal	IB	1.50 x10 ¹⁰	-	7.19 x10 ¹⁰	-	-	-	-	IB : -0.68	-
1280514230	51-60/F	7191	Benin	IB	6.85 x10 ¹⁰	-	6.37 x10 ¹⁰	-	-	-	-	IB : +0.03	-
1181216151	51-60/F	3623	none	IA	7.75 x10 ¹¹	5.75 x10 ¹¹	-	3.85 x10 ⁶	-	-	-	IA : +0.13 ; IIA : +5.30	-5.17
078014121	51-60/F	NC	Morocco	IB	1.12 x10 ⁷	-	3.73 x10 ⁵	-	-	-	-	IB : +1.48	-

Table 5

Serum	Age/Sex	Transaminases	Travel	Genotype by sequencing	HAV genome copies/ μ l of serum						Difference of quantification between 5'UTR and subtype assays (\log_{10})	Difference of quantification between IA and IB subtype assays (\log_{10})	
					5'UTR	IA	IB	IIA	IIB	IIIA			IIIB
1310074855	61-70/F	3935	Ethiopia	IB	1.50 x10 ⁸	-	2.87 x10 ⁸	-	-	-	-	IB : -0.28	-
1310016965	11-20/M	400	NC	IB	3.13 x10 ⁵	-	4.18 x10 ³	-	-	-	-	IB : +1.87	-
1311012387	1-10/F	NC	NC	IA	6.37 x10 ⁴	9.26 x10 ⁴	-	-	-	-	-	IA : -0.16	-
1311018436	1-10/M	NC	NC	IA	2.86 x10 ⁴	3.60 x10 ⁴	-	-	-	-	-	IA : -0.10	-
1311072234	31-40/F	2018	NC	IA	7.36 x10 ⁴	7.31 x10 ⁴	8.58 x10 ³	-	-	-	-	IA : 0 ; IB : +0.93	-0.93
1310064958	61-70/M	2314	Guadeloupe	IA	4.73 x10 ⁵	5.50 x10 ⁵	-	-	-	-	-	IA : -0.07	-
1311009716	51-60/M	2339	NC	IB	1.70 x10 ⁶	-	2.30 x10 ⁶	-	-	-	-	IB : -0.13	-
1311071503	1-10/M	358	NC	IA	2.72 x10 ⁵	2.85 x10 ⁶	3.22 x10 ⁴	-	-	-	-	IA : -1.02 ; IB : +0.93	-1.95
1310024892	1-10/M	NC	Morocco	IA	6.14 x10 ⁶	6.47 x10 ⁶	-	-	-	-	-	IA : -0.02	-
1310066012	1-10/F	1113	Morocco	IA	2.04 x10 ³	2.48 x10 ³	-	-	-	-	-	IA : -0.09	-
1309036458	11-20/M	3393	Cameroun	IIA	3.42 x10 ⁵	-	-	4.66 x10 ⁶	-	-	-	IIA : -1.13	-
1309064503	1-10/F	2470	Algeria	IA	3.27 x10 ³	3.99 x10 ³	-	-	-	-	-	IA : -0.09	-
1309044888	11-20/M	1352	Guinea	IB	4.10 x10 ⁵	-	7.00 x10 ⁵	-	-	-	-	IB : -0.23	-
1310077770	31-40/M	NC	Ethiopia	IB	1.48 x10 ⁶	-	4.35 x10 ⁶	-	-	-	-	IB : -0.47	-
1310044717	51-60/F	6500	NC	IB	7.16 x10 ⁵	-	1.32 x10 ⁶	-	-	-	-	IB : -0.26	-
1311011402	1-10/M	993	Ethiopia	IB	7.89 x10 ⁵	-	1.38 x10 ⁶	-	-	-	-	IB : -0.24	-
1311018712	41-50/M	NC	Ethiopia	IB	4.63 x10 ³	-	1.22 x10 ⁴	-	-	-	-	IB : -0.42	-
1310005428	21-30/M	3400	Morocco	IA	5.87 x10 ³	1.52 x10 ⁴	1.37 x10 ²	-	-	-	-	IA : -0.41 ; IB : +1.63	-2.05
1311011353	41-50/F	1736	Ethiopia	IB	4.43 x10 ⁴	-	9.28 x10 ⁴	-	-	-	-	IB : -0.32	-
1310023611	21-30/F	1388	Tunisia	IA	3.84 x10 ⁴	2.09 x10 ⁴	4.57 x10 ³	-	-	-	-	IA : +0.26 ; IB : +0.92	-0.66
1380219001	51-60/M	4000	Madagascar	IIIA	4.73 x10 ⁵	-	-	-	-	3.10 x10 ⁴	-	IIIA : +1.18	-
1311018504	61-70/F	1334	NC	IB	6.96 x10 ⁴	-	2.09 x10 ⁵	-	-	-	-	IB : -0.48	-
1309047363	11-20/F	2000	NC	IB	9.76 x10 ⁴	-	1.30 x10 ⁵	-	-	-	-	IB : -0.12	-
1310011213	1-10/M	1831	Algeria	IA	7.89 x10 ⁴	6.68 x10 ⁴	4.77 x10 ³	-	-	-	-	IA : +0.07 ; IB : +1.22	-1.15
1309064723	11-20/F	1494	Morocco	IA	3.22 x10 ⁴	2.76 x10 ⁴	-	-	-	-	-	IA : +0.07	-
1309039311	1-10/M	NC	Guinea	IB	1.25 x10 ⁵	-	5.35 x10 ⁵	-	-	-	-	IB : -0.63	-
1310053557	21-30/M	269	NC	IA	9.38 x10 ¹	6.33 x10 ²	-	-	-	-	-	IA : -0.83	-
1310078280	1-10/F	857	Tunisia	IA	6.06 x10 ⁴	3.41 x10 ⁴	-	-	-	-	-	IA : +0.25	-
1380311211	61-70/M	1269	Madagascar	IIIA	1.48 x10 ⁴	-	-	-	-	4.25 x10 ⁴	-	IIIA : -0.46	-
1311062298	11-20/F	940	Morocco	IB	2.95 x10 ²	2.64 x10 ²	-	-	-	-	-	IA : +0.05	-

Table 6

1-3 Discrimination des particules virales infectieuses du virus de l'hépatite A et du rotavirus par l'utilisation de monoazides et des détergents combinés à la RT-qPCR

Discrimination of infectious hepatitis A virus and rotavirus by combining dyes and surfactants with RT-qPCR (article publié en 2013 dans BMC Microbiology)

La RT-qPCR permet la détection des génomes viraux, qu'ils soient issus de particules virales infectieuses ou non infectieuses. Afin de pouvoir corrélérer un diagnostic positif par RT-qPCR à un risque infectieux, il est nécessaire de développer des prétraitements à réaliser préalablement à la RT-qPCR et différentes approches sont possibles, notamment la réalisation de traitements enzymatiques ou chimiques à base de monoazides. Des traitements enzymatiques (Protéinase K et RNase) ont déjà été utilisés pour la différenciation de particules virales infectieuses et non infectieuses. Le propidium monoazide (PMA) et l'éthidium monoazide (EMA) sont des fluorochromes qui ont la capacité de s'insérer dans l'ADN et de s'y lier de façon covalente après photoactivation (grâce à un groupement azide photoinductible). L'ADN ainsi lié ne peut plus être amplifié par PCR. Les monoazides ne pénètrent pas dans les membranes cellulaires intactes et empêchent donc spécifiquement l'amplification des génomes issus d'organismes non viables. L'utilisation de ces molécules photoinductibles combinée à la qPCR, qui ont déjà été utilisées chez les bactéries notamment, pourrait être adaptée aux virus entériques afin de proposer un diagnostic viral basé sur la monoazide-RT-qPCR corrélé à l'infectiosité de la particule virale.

Cette approche a été développée et évaluée sur trois virus entériques cultivables (VHA ; souche HM175/18f clone B (ATCC, VR-1402) et rotavirus (RV) ; souches simienne SA11 et humaine Wa) soumis à des traitements d'inactivation thermique. Le VHA et le RV ont été choisis pour leur cultivabilité et pour leurs différences structurales (capsides et génomes, respectivement ARN simple brin positif et ARN double brin segmenté).

Les molécules de monoazide étant connues pour se lier aux molécules d'ADN double brin, leurs capacités à se lier également à des ARN viraux (VHA et Rotavirus) ont été évaluées. Pour améliorer la pénétration du monoazide à l'intérieur de la capside, les pré-traitements à

base de monoazides (EMA ou PMA) ont été optimisés pour chaque virus inactivé thermiquement, en évaluant l'action supplémentaire d'un détergent (Triton X100, Tween 20 et IGEPAL CA-620). Enfin des cinétiques d'inactivation thermiques ont été réalisées en utilisant trois méthodes de détection (titrage infectieux par culture cellulaire, titrage moléculaire par RT-qPCR et titrage moléculaire par RT-qPCR précédé du prétraitement optimisé). De plus, trois modèles moléculaires de RT-qPCR ont été testés pour chaque virus.

Notre étude a permis de démontrer que les deux monoazides (PMA /EMA) sont capables de se lier à l'ARN viral double brin du génome de rotavirus mais également à l'ARN viral simple brin du génome de VHA, certainement grâce à la présence de structures secondaires. La technique de PMA/EMA RT-qPCR a été mise au point sur les particules virales inactivées thermiquement (10 minutes à 80°C), ce qui a permis de définir la concentration optimale de monoazides à utiliser et l'intérêt de l'ajout de détergents pour chaque virus (EMA + Igepal-CA630- RT-qPCR pour VHA, EMA-RT-qPCR pour Wa et PMA-RT-qPCR pour SA11).

Des cinétiques d'inactivation thermiques à 37°C, 68°C, 72°C et 80°C des trois souches virales ont été réalisées, en mesurant en parallèle la réduction des titres viraux infectieux en culture cellulaire, et les titres génomiques obtenus par simple RT-qPCR et par « pré-traitement + RT-qPCR ». Les titres génomiques du VHA et des deux souches de rotavirus déterminés par RT-qPCR (sans pré-traitement) ne sont pas corrélés aux titres infectieux même lorsque les températures d'inactivation sont élevées alors qu'une meilleure corrélation entre titrage infectieux et titrage génomique par « pré-traitement + RT-qPCR » est observée, avec une corrélation maximale observée lors de l'inactivation à 80°C.

Afin d'évaluer l'impact de la région amplifiée par RT-qPCR sur la détection des génomes suite au prétraitement, trois modèles moléculaires (A, B, C) ont été testés pour réaliser les cinétiques d'inactivations thermiques. L'utilisation des modèles moléculaires de RT-qPCR A et B pour amplifier le génome du VHA, et B et C pour amplifier les génomes des rotavirus après le pré-traitement ont permis l'obtention de cinétiques d'inactivation thermique proches de celles obtenus par un titrage cellulaire.

La température d'inactivation de la souche virale est importante pour l'efficacité du traitement, car elle influe sur les dommages causés à la capsid virale et au génome, et donc à l'accessibilité du génome pour le monoazide. L'altération plus importante de la capsid virale lors de l'inactivation à 80 °C (comparativement à 68°C et 72°C) permet une pénétration plus efficace de l'EMA / PMA, ce qui peut expliquer les différences d'efficacité du prétraitement + RT-qPCR selon les températures d'inactivation. De même, l'utilisation d'un détergent permet d'altérer les capsides endommagées et d'augmenter la pénétration du PMA/EMA. Les modèles moléculaires de RT-qPCR les plus performants amplifient les séquences les plus longues indiquant que la taille de l'amplicon peut jouer un rôle dans l'efficacité du pré-traitement. Les deux modèles (A, B) ciblant le VHA sont situés dans la même région génomique (5'NTR), tandis que les deux modèles (B, C) ciblant le rotavirus sont localisés dans les régions NSP3 et NSP4. La localisation de la région amplifiée semble jouer un rôle dans l'efficacité du pré-traitement puisque la région 5'NTR de VHA comprend des structures secondaires, permettant la fixation du PMA et de l'EMA. L'efficacité du « pré-traitement-RT-qPCR » pour la détection des génomes du VHA ou des rotavirus issus de particules infectieuses est donc influencée par la nature du génome et par la taille et/ ou la région du génome amplifié.

En conclusion, nous avons développé une méthode de détection du génome du VHA et des rotavirus par RT-qPCR en réalisant au préalable un traitement basé sur l'utilisation des monoazide +/- détergent, qui permet d'obtenir une meilleure corrélation entre les titres infectieux et les titres génomiques lors d'une inactivation thermique.

A l'avenir, ce type de « pré-traitement RT-qPCR » pourrait être adapté à d'autres virus d'intérêt en hygiène alimentaire, non cultivables, tels que les norovirus et le virus de l'hépatite E, et être également testé vis-à-vis d'autres types de traitements d'inactivations virales (ex : inactivation chimique).

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Discrimination of infectious hepatitis A virus and rotavirus by combining dyes and surfactants with RT-qPCR

Coralie Coudray-Meunier¹, Audrey Fraisse¹, Sandra Martin-Latil¹, Laurent Guillier² and Sylvie Perelle^{1*}

Abstract

Background: Human enteric viruses are major agents of foodborne diseases. Because of the absence of a reliable cell culture method for most of the enteric viruses involved in outbreaks, real-time reverse transcriptase PCR is now widely used for the detection of RNA viruses in food samples. However this approach detects viral nucleic acids of both infectious and non infectious viruses, which limits the impact of conclusions with regard to public health concern. The aim of the study was to develop a method to discriminate between infectious and non-infectious particles of hepatitis A virus (HAV) and two strains of rotavirus (RV) following thermal inactivation by using intercalating dyes combined with RT-qPCR.

Results: Once the binding of propidium monoazide (PMA) or ethidium monoazide (EMA) was shown to be effective on the viral ssRNA of HAV and dsRNA of two strains of RV (SA11 and Wa), their use in conjunction with three surfactants (IGEPAL CA-630, Tween 20, Triton X-100) prior to RT-qPCR assays was evaluated to quantify the infectious particles remaining following heat treatment. The most promising conditions were EMA (20 μ M) and IGEPAL CA-630 (0.5%) for HAV, EMA (20 μ M) for RV (WA) and PMA (50 μ M) for RV (SA11). The effectiveness of the pre-treatment RT-qPCR developed for each virus was evaluated with three RT-qPCR assays (A, B, C) during thermal inactivation kinetics (at 37°C, 68°C, 72°C, 80°C) through comparison with data obtained by RT-qPCR and by infectious titration in cell culture. At 37°C, the quantity of virus (RV, HAV) remained constant regardless of the method used. The genomic titers following heat treatment at 68°C to 80°C became similar to the infectious titers only when a pre-treatment RT-qPCR was used. Moreover, the most effective decrease was obtained by RT-qPCR assay A or B for HAV and RT-qPCR assay B or C for RV.

Conclusions: We concluded that effectiveness of the pre-treatment RT-qPCR is influenced by the viral target and by the choice of the RT-qPCR assay. Currently, it would be appropriate to further develop this approach under specific conditions of inactivation for the identification of infectious viruses in food and environmental samples.

Keywords: Propidium monoazide, Ethidium monoazide, Surfactant, RT-qPCR, Hepatitis A virus, Rotavirus, Thermal inactivation, Infectivity

Background

Food-borne enteric viruses, particularly human noroviruses (NoV), rotaviruses (RV) and hepatitis A virus (HAV), constitute a serious public health concern, since they are responsible for the vast majority of cases of non-bacterial gastroenteritis and infectious hepatitis, which may occasionally be fatal [1,2]. These viruses are able to replicate in

the human gastro-intestinal tract and are dispersed by shedding in high concentrations into the stools. The stability of these viruses with regard to several physical conditions such as pH and temperature, and their resistance to different treatment systems, contribute significantly to their persistence in the environment [3,4]. Transmission of these viruses occurs by the faecal-oral route, primarily through direct person-to-person contact, but they are also efficiently transmitted by ingestion of contaminated drinking water or contaminated foods such as raw shellfish, fresh fruits and vegetables [5].

* Correspondence: sylvie.perelle@anses.fr

¹ANSES, Food Safety Laboratory, Food and Water Virology Unit, 23 Avenue du Général de Gaulle, 94706 Maisons-Alfort cedex, France

Full list of author information is available at the end of the article

To ensure the safety of these products, the development of sensitive, reliable techniques for the detection of enteric viruses in food and water samples is helpful. The cell culture system is the gold standard to examine the infectivity of the isolated viruses. Currently, detection of the main enteric viruses on the basis of their infectivity is complicated by the absence of a reliable cell culture method and the low contamination levels of food samples. Thus, molecular methods have been developed for the rapid detection of viral contamination of foods [6,7]. In 2004, the European Committee for Standardisation (CEN) asked a technical advisory group (TAG4) to develop standard methods (qualitative / quantitative) for the detection of norovirus and HAV in foodstuffs. Standard methods have recently been elaborated for a range of risk foods including bottled water, soft fruits and vegetables. The CEN/ISO/TS 15216 standard was published in the first half of 2013 and within a year these proposed protocols will be validated and then published as ISO or CEN standard methods [8]. All these methods are based on a final detection of the viral genome using real-time reverse transcriptase PCR (RT-qPCR), used for its sensitivity, specificity, speed and ability to deliver quantitative data. However, this approach detects the viral nucleic acids of both infectious and non-infectious viruses.

Therefore, it is important to develop and evaluate simple and efficient tools which make it possible to overcome the limitations of the traditional cell culture and PCR assays [9]. An approach based on an enzymatic treatment with RNase combined with a proteinase K treatment was found to be successful in some cases in distinguishing between infectious and non-infectious viruses [10-12]. For bacteria, a relatively recent approach is the treatment of samples with the DNA-intercalating dyes ethidium monoazide (EMA) or propidium monoazide (PMA) [13-17]. EMA and PMA are closely related DNA intercalating dyes with a photo-inducible azide group that covalently cross-link to DNA through visible-light photoactivation. PMA has the advantage of being more selective than EMA for dead cells as it is more membrane-impermeant [18]. Recently, promising PMA / EMA treatments have also been tested for distinguishing between infectious and non-infectious RNA viruses [19,20]. A study concluded that PMA-RT-PCR assays that include pretreatment of enteroviruses and noroviruses with PMA prior to RT-PCR enable rapid differentiation between infectious and non-infectious enteric viruses when the virus particles are inactivated by heating at 72°C or 37°C or by using hypochlorite. However, unlike poliovirus, PMA treatment did not affect detection of heat-inactivated Norwalk virus by quantitative RT-PCR [21]. Another study found that EMA did not distinguish between infectious and non-infectious avian influenza virus particles [22]. Sánchez et al. [23] showed that PMA treatment previous to RT-qPCR detection is a promising alternative for assessing HAV infectivity.

The usefulness of EMA or PMA for distinguishing between infectious and non-infectious RV and HAV was investigated. Both viruses were chosen for their cultivability and their differences in genomic organization. RV, the leading cause of severe dehydrating diarrhea in infants and young children worldwide, are non-enveloped viruses that possess a genome with 11 segments of double-stranded RNA contained in a triple-layered protein capsid and belong to the *Reoviridae*. Hepatitis A virus (HAV) infection is the leading worldwide cause of acute viral hepatitis. HAV is a positive single-stranded non-enveloped RNA virus classified in the *Hepatovirus* genus of the *Picornaviridae* family.

The purpose of this study was to develop a method based on pre-treatment-RT-qPCR assays in order to discriminate between infectious and non-infectious viruses (HAV, RV) following thermal inactivation. To this end, the binding of EMA and PMA to RV and HAV RNA was investigated. Then, a pre-treatment based on "PMA or EMA +/- surfactant RT-qPCR" was optimized for each virus. Finally, this method was applied to establish viral thermal inactivation kinetics through three RT-qPCR assays.

Results

Standard curves of RT-qPCR assays on viral RNA

Linear regression analyses were performed by plotting the cycle threshold (Ct) values against the logarithm of the PFU of HAV or TCID₅₀ (50% tissue culture infectious dose) of RV (SA11 and Wa) with RT-qPCR assays A, B and C corresponding to the RNA target. The mean parameters of the standard curves were as follows: standard curves respectively obtained with HAV assays A, B and C showed efficiencies of 100.00%, 95.93%, and 104.83% and regression coefficients of 0.999, 0.997, 0.996; standard curves respectively obtained with RV assays A, B and C showed efficiencies of 90.93%, 94.03%, and 94.23% and regression coefficients of 0.993, 0.986, 0.976 with Wa; standard curves respectively obtained with RV assays A, B and C showed efficiencies of 78.83%, 76.53%, and 85.50% and regression coefficients of 0.989, 0.984, 0.989 with SA11.

Evaluation of dyes-RT-qPCR assays on viral RNA

The first experiments studied the efficiency of PMA and EMA treatments to bind the viral RNA in order to avoid its detection (RV, HAV) using RT-qPCR assays A and the potential inhibitory effects of the dyes on RT-qPCR amplification (Table 1). Viral RNA was treated with dye concentrations ranging from 10 to 200 µM without photoactivation and then subjected to RT-qPCR to determine if residual dyes can be inhibitors for RT-qPCR (Table 1A). In the lowest PMA concentration (10 µM), an inhibitory effect on RT-qPCR detection was only found for RV RNA (Wa and SA11) (respectively a decrease of - 0.87 log₁₀ and - 1.47 log₁₀ of detected RNA).

Table 1 Binding of dyes to purified viral RNA

[Dye] μM	HAV		RV (Wa)		RV (SA11)	
	PMA	EMA	PMA	EMA	PMA	EMA
A						
10	-0.09 ± 0.11	-0.12 ± 0.09	-0.87 ± 0.30	-0.52 ± 0.19	-1.47 ± 1.27	-0.41 ± 0.27
20	-1.59 ± 0.74	-0.21 ± 0.27	-1.87	-1.18 ± 0.46	-2.51 ± 0.69	-0.31 ± 0.31
50	< LOD	-0.99 ± 0.51	< LOD	< LOD	< LOD	-0.47 ± 0.15
100	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	-0.44 ± 0.47
200	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	-0.30 ± 0.41
B						
0	-0.33 ± 0.10	-0.33 ± 0.10	-0.49 ± 0.51	-0.49 ± 0.51	-0.07 ± 0.26	-0.07 ± 0.26
10	-0.55 ± 0.13	-0.41 ± 0.26	-0.39 ± 0.11	-0.16 ± 0.06	-0.51 ± 0.16	-0.32 ± 0.32
20	-0.25 ± 0.27	0.37 ± 0.05	-0.27 ± 0.22	-0.37 ± 0.12	-0.68 ± 0.49	-0.28 ± 0.23
50	0.32 ± 0.26	0.43 ± 0.51	-0.34 ± 0.09	-0.23 ± 0.20	-1.60	-0.32 ± 0.23
100	-0.54 ± 0.01	0.03 ± 0.14	-0.38 ± 0.18	0.35 ± 0.24	< LOD	0.52 ± 0.23
200	-0.36 ± 0.13	0.35 ± 0.24	-0.30 ± 0.20	-0.47 ± 0.35	< LOD	-0.34 ± 0.16
C						
0	-0.33 ± 0.10	-0.33 ± 0.10	-0.49 ± 0.51	-0.49 ± 0.51	-0.07 ± 0.26	-0.07 ± 0.26
10	-2.65 ± 0.51	-0.96 ± 0.27	-1.27 ± 0.12	-0.59 ± 0.24	-1.41 ± 0.51	-0.79 ± 0.50
20	-2.27 ± 0.46	-1.08 ± 0.48	-1.33 ± 0.13	-0.07 ± 0.50	-1.48 ± 0.55	-0.64 ± 0.66
50	-3.16 ± 0.77	-1.16 ± 0.21	-1.75 ± 0.11	-0.62 ± 0.38	-2.96 ± 1.38	-1.22 ± 0.67
100	-2.47 ± 0.37	-1.56 ± 0.33	-2.20 ± 0.50	-1.01 ± 0.11	-3.58 ± 0.65	-2.06 ± 1.63
200	-2.91 ± 0.63	-1.53 ± 0.17	-2.52 ± 1.13	-0.99 ± 0.41	-3.02 ± 1.10	-0.63 ± 0.55

Quantification by RT-qPCR assays A of 10⁸ copies of the genome of viral RNA after monoazide treatment without photoactivation (A), after monoazide treatment without photoactivation followed by QIA-quick purification (B), after monoazide treatment with photoactivation followed by QIA-quick purification (C). Mean values ± SD (n=3).

With 20 μM of PMA, an inhibitory effect on RT-qPCR was also found for HAV RNA (- 1.59 log₁₀). PMA concentrations ranging from 50 μM to 200 μM were able to totally inhibit the RT-qPCR amplification of viral RNA. Inhibitory effects of EMA were found from 20 μM on RV (Wa) (- 1.18 log₁₀), and from 50 μM on HAV (- 0.99 log₁₀). Higher concentrations of EMA totally inhibited RT-qPCR assays on HAV and RV (Wa) viral RNA. Inversely, no inhibitory effect of any of the EMA concentrations tested was observed with RV (SA11) RNA. The efficacy of the purification of excess dye in treated RNA samples using the QIAquick PCR purification kit was tested to avoid inhibitory effects on RT-qPCR amplification (Table 1B). Purification by QIA-quick showed effective recovery with a decrease in viral titer ≤ - 0.49 log₁₀ with RNA samples not treated with monoazide. The purification step was found to be effective in removing residual dye, except for RV (SA11) RNA samples which were treated with PMA ranging from 50 to 200 μM.

Lastly, optimal PMA / EMA concentrations were determined on viral RNA samples after dye treatment including photoactivation and purification steps. The effects of dye (concentrations of 10 to 200 μM) were determined by measuring the decrease in RNA quantification by RT-

qPCR (Table 1C). PMA at 50 μM enabled the highest reduction of the RT-qPCR signal for HAV RNA (- 3.16 log₁₀) and PMA at 100 and 200 μM respectively enabled the highest reductions of the RT-qPCR signal for RV (SA11) (- 3.58 log₁₀) and RV (Wa) (- 2.52 log₁₀). EMA was still found to be less efficient than PMA treatment for all the viral RNA tested. These data showed that PMA and EMA are able to bind to viral RNA upon photoactivation making the RNA unavailable for amplification by RT-qPCR, although excess dye concentrations can inhibit RT-qPCR assays. The effectiveness of PMA and EMA treatments depends on the type of dye, the concentration of the dye and the viral RNA type, although PMA was found to be the most effective dye for the three viral RNA tested.

Optimization of pretreatment combining dyes and surfactants before RT-qPCR assays for the selective detection of infectious viruses

Determination of optimal PMA / EMA concentrations

Table 2 shows the results of experiments conducted with viruses (HAV and RV (Wa, SA11)) to optimize a specific procedure based on dye treatment for selective detection of the viral RNA from infectious viruses using RT-qPCR assays A.

Table 2 Influence of dye concentration on viruses

Titration method	Virus	Infectious / inactivated	PMA (µM)					EMA (µM)				
			5	20	50	75	100	5	20	50	75	100
RT-qPCR	HAV	Infectious	0.03 ± 0.08	0.02 ± 0.08	-0.03 ± 0.02	-0.08 ± 0.01	-0.02 ± 0.05	-0.10 ± 0.17	-0.04 ± 0.02	-0.07 ± 0.07	-0.05 ± 0.05	-0.09 ± 0.03
		Inactivated	-0.88 ± 0.12	-1.01 ± 0.08	-1.06 ± 0.11	-1.13 ± 0.09	-1.14 ± 0.09	-1.24 ± 0.13	-1.75 ± 0.91	-1.31 ± 0.28	-1.25 ± 0.24	-1.17 ± 0.23
	RV (SA11)	Infectious	-0.28 ± 0.38	-0.32 ± 0.44	-0.30 ± 0.33	-0.68 ± 0.41	-0.51 ± 0.28	-0.70 ± 0.12	-0.70 ± 0.30	-0.71 ± 0.08	-0.75 ± 0.09	-0.72 ± 0.09
		Inactivated	-1.16 ± 0.68	-1.45 ± 0.78	-1.60 ± 0.57	-1.70 ± 0.40	-1.71 ± 0.50	-1.12 ± 0.31	-1.13 ± 0.19	-1.05 ± 0.33	-1.06 ± 0.24	-1.07 ± 0.07
	RV (Wa)	Infectious	0.05 ± 0.09	-0.38 ± 0.34	-0.63 ± 0.02	-0.62 ± 0.14	-0.52 ± 0.15	-0.19 ± 0.05	-0.50 ± 0.20	-0.96 ± 0.31	-1.12 ± 0.16	-1.15 ± 0.13
		Inactivated	-0.24 ± 0.65	-0.62 ± 0.27	-1.00 ± 0.15	-1.44 ± 0.18	-1.45 ± 0.29	-0.52 ± 0.76	-1.51 ± 0.26	-1.81 ± 0.06	-1.72 ± 0.19	-1.48 ± 0.18

Quantification by RT-qPCR assays A after monoazide treatment of 10⁵TCID₅₀ of RV (SA11), 10³ TCID₅₀ of RV (Wa) and 6 × 10⁴ PFU of HAV, infectious or inactivated at 80°C for 10 minutes. Mean values ± SD (n=3).

As the first step in exploring the potential of PMA and EMA to detect infectious viruses, HAV, RV (SA11) and RV (Wa) viruses were either inactivated thermally or not, and were subjected to dye concentrations ranged from 5 to 100 μM , photoactivation, RNA extraction and quantification by RT-qPCR (Table 2). The presence of PMA or EMA had no effect on detection of the RNA extracted from infectious HAV regardless of the concentration tested. Similarly, quantification of RNA extracted from PMA-treated infectious RV was not strongly affected by decreases ranging from $-0.05 \log_{10}$ to $-0.63 \log_{10}$ for Wa and from $-0.28 \log_{10}$ to $-0.68 \log_{10}$ for SA11, depending on the PMA concentrations tested. However, quantification of RNA extracted from infectious RV was more strongly affected by EMA treatment, with a decrease between $-0.19 \log_{10}$ and $-1.15 \log_{10}$ for Wa and between $-0.70 \log_{10}$ and $-0.75 \log_{10}$ for SA11, depending on the EMA concentrations tested.

When thermally inactivated viruses were assayed with PMA RT-qPCR, maximum decreases were found for HAV ($-1.06 \log_{10}$ to $-1.14 \log_{10}$) and for RV (SA11) ($-1.60 \log_{10}$ to $-1.71 \log_{10}$) with PMA concentrations ranging from 50 μM to 100 μM , and for RV (Wa) ($-1.44 \log_{10}$ and $-1.45 \log_{10}$) with PMA concentrations of 75 μM and 100 μM . When inactivated viruses were assayed with EMA RT-qPCR, maximum decreases were found for HAV ($-1.75 \log_{10}$) with EMA at 20 μM , for RV (SA11) ($-1.13 \log_{10}$) with EMA at 20 μM , and for RV (Wa) ($-1.81 \log_{10}$) with EMA at 50 μM .

The data obtained with all the negative controls were as expected. Treatment by PMA / EMA without photoactivation or with a single exposure of the viruses to light before RNA extraction did not significantly affect the RT-qPCR detection of extracted RNA (data not shown).

The most effective dye concentration for each virus was experimentally chosen by taking into account the effect of the dye concentrations on the inactivated and infectious viruses. In cases where similar data were observed with different dye concentrations, the lowest dye concentration was preferred. Thus, 20 μM of EMA for all viruses, 50 μM of PMA for HAV and RV (SA11) and 75 μM of PMA for RV (Wa) were selected as optimal concentrations.

Evaluation of pre-treatments combining dye and surfactant

As a second step, Triton X-100, Tween 20 and IGEPAL CA-630, three widely used nonionic surfactants, were tested for their efficacy in improving the effects of PMA / EMA treatment on viral particles (Table 3).

Beforehand, we attempted to evaluate surfactant toxicity towards the infectivity of HAV and rotavirus strains, which would preclude their use as a discriminatory treatment. One set of HAV viral samples receiving surfactants was compared to untreated HAV viral samples

by titration with cell culture. None of the surfactant treatments significantly reduced the initial HAV titer ($\leq 0.20 \log_{10}$), which argues in favor of the use of a dye-surfactant pre-treatment. It was not possible to measure the toxicity of surfactants to RV strains (Wa and SA11) because all surfactant doses affected the MA104 cells in culture (data not shown).

The previously selected optimal dye concentration for each virus (20 μM of EMA for all viruses, 50 μM of PMA for HAV and RV (SA11) and 75 μM of PMA for RV (Wa)) were tested in association with three concentrations of three surfactants.

When inactivated HAV was assayed, Tween 20 only very slightly increased the efficacy of PMA (50 μM) ($< -0.7 \log_{10}$) and did not increase the efficacy of EMA (20 μM) pretreatments. The pretreatments of inactivated HAV associating PMA (50 μM) with IGEPAL CA-630 or Triton $\times 100$ improved the processing regardless of the concentration of surfactant tested. Indeed, the logarithmic reductions of RNA detected by RT-qPCR were included between $-2.34 \log_{10}$ and $-2.49 \log_{10}$ which was higher than the reduction of $1.06 \log_{10}$ obtained with PMA treatment at 50 μM . Similarly, the processing of inactivated HAV associating EMA (20 μM) with IGEPAL CA-630 or Triton $\times 100$, regardless of the concentration of surfactant tested, enhanced the efficacy of the processing. Indeed, the logarithmic reductions of RNA detected by RT-qPCR were included between $-2.23 \log_{10}$ and $-2.68 \log_{10}$ which was higher than the reduction of $1.75 \log_{10}$ obtained with EMA treatment at 20 μM . Finally, the treatment of HAV by the most promising IGEPAL CA-630 (0.5%) without monoazide or photoactivation before RNA extraction did not affect RT-qPCR detection of extracted RNA, which argues in favor of the use of a dye-surfactant pre-treatment (data not shown).

When inactivated RV (SA11) was assayed, the efficacy of the processing with PMA (50 μM) was always slightly higher without surfactant. When inactivated RV (SA-11) was assayed with EMA and surfactants, the highest improvement was found with Tween 20 (0.5%) leading to an increase of reduction of RNA detected by RT-qPCR of $-0.76 \log_{10}$ compared with treatment with EMA at 20 μM . However, the pre-treatment based on EMA also seemed to affect RNA detection from infectious RV (SA11) ($-0.72 \log_{10}$) more than the pre-treatment based on PMA ($-0.30 \log_{10}$). When inactivated RV (Wa) was assayed, none of the tested surfactants increased the efficacy of the dye pretreatments.

By taking into account all these data, we selected pre-treatments with EMA (20 μM) and IGEPAL CA-630 (0.5%) for HAV, with EMA (20 μM) for RV (Wa) and PMA (50 μM) for RV (SA11) for their high efficiencies. Since different incubation times (30 min, 2 h, overnight)

Table 3 Influence of combined dyes and surfactants on viruses

Titration method	Virus	Infectious / inactivated	Dye	Triton x100			Tween 20			IGEPAI CA-630		
				0.1%	0.5%	1%	0.1%	0.5%	1%	0.1%	0.5%	1%
RT-qPCR	HAV	Infectious	EMA (20 µM)	0.03 ± 0.07	-0.06 ± 0.06	-0.05 ± 0.05	-0.02 ± 0.09	-0.07 ± 0.09	-0.02 ± 0.06	0.02 ± 0.13	-0.02 ± 0.05	-0.04 ± 0.09
		Inactivated		-2.42 ± 0.04	-2.52 ± 0.10	-2.48 ± 0.01	-1.70 ± 0.05	-1.88 ± 0.29	-1.89 ± 0.08	-2.23 ± 0.41	-2.68 ± 0.01	-2.42 ± 0.07
		Infectious	PMA (50 µM)	-0.07 ± 0.02	-0.07 ± 0.02	0.00 ± 0.02	-0.05 ± 0.06	-0.12 ± 0.07	-0.09 ± 0.09	-0.06 ± 0.08	-0.04 ± 0.05	-0.07 ± 0.10
		Inactivated		-2.34 ± 0.27	-2.49 ± 0.25	-2.51 ± 0.23	-1.74 ± 0.07	-1.70 ± 0.09	-1.70 ± 0.11	-2.42 ± 0.27	-2.49 ± 0.34	-2.34 ± 0.19
	RV (SA11)	Infectious	EMA (20 µM)	-0.80 ± 0.10	-0.77 ± 0.08	0.47 ± 0.11	0.75 ± 0.14	-0.72 ± 0.07	-0.68 ± 0.09	-0.79 ± 0.07	-0.47 ± 0.09	-0.71 ± 0.09
		Inactivated		-1.66 ± 0.09	1.43 ± 0.15	-1.14 ± 0.28	-1.18 ± 0.17	-1.89 ± 0.77	-1.28 ± 0.20	-1.30 ± 0.13	-1.28 ± 0.30	-0.81 ± 0.27
		Infectious	PMA (50 µM)	-0.74 ± 0.15	-0.77 ± 0.16	-0.91 ± 0.20	0.80 ± 0.11	-0.76 ± 0.20	-0.80 ± 0.20	-0.72 ± 0.14	0.71 ± 0.23	-0.81 ± 0.18
		Inactivated		-1.34 ± 0.18	-1.29 ± 0.13	-1.33 ± 0.22	-1.30 ± 0.15	-1.39 ± 0.16	-1.31 ± 0.49	-1.31 ± 0.27	-1.35 ± 0.25	-1.14 ± 0.39
	RV (Wa)	Infectious	EMA (20 µM)	-0.39 ± 0.07	-0.24 ± 0.13	-0.15 ± 0.10	-0.41 ± 0.06	-0.13 ± 0.13	-0.37 ± 0.17	-0.28 ± 0.22	-0.21 ± 0.02	0.36 ± 0.13
		Inactivated		-1.21 ± 0.14	-0.68 ± 0.12	-0.40 ± 0.16	-1.01 ± 0.19	-0.88 ± 0.15	-0.58 ± 0.16	-0.82 ± 0.43	-0.71 ± 0.08	-0.14 ± 0.13
		Infectious	PMA (75 µM)	-0.57 ± 0.14	-0.61 ± 0.18	-0.61 ± 0.13	-0.58 ± 0.15	-0.58 ± 0.11	-0.64 ± 0.14	-0.60 ± 0.16	-0.58 ± 0.15	-0.70 ± 0.16
		Inactivated		-1.23 ± 0.08	-1.11 ± 0.04	-1.20 ± 0.18	-1.21 ± 0.08	-1.15 ± 0.09	-1.15 ± 0.17	-1.21 ± 0.08	-1.15 ± 0.18	-1.23 ± 0.08
Cell culture	HAV	Infectious	None	0.09 ± 0.22	-0.03 ± 0.17	0.02 ± 0.21	0.11 ± 0.11	0.16 ± 0.06	0.04 ± 0.25	0.06 ± 0.17	-0.01 ± 0.01	0.14 ± 0.09

Quantification by RT-qPCR assays A after monoazide treatment combined with surfactants (Triton x100, Tween-20, IGEPAI CA-630) of 10⁵ TCID₅₀ of RV (SA11), 10³ TCID₅₀ of RV (Wa) and 6x 10⁴ PFU of HAV, infectious or inactivated at 80°C for 10 minutes, and titration by cell culture of 6x 10⁴ PFU of infectious HAV treated with surfactants. Mean values ± SD (n=3).

did not change the selected pre-treatment efficiencies (data not shown), an incubation time of 2 h was selected for the following studies.

Kinetic thermal viral inactivation curves and impact of RT-qPCR assays

The heat sensitivity of HAV and RV (Wa, SA11) at four temperatures (37°C, 68°C, 72°C, 80°C) was analyzed by kinetic evaluation of the loss of infectivity in cell culture compared with the loss of genomic titer in RT-qPCR assays with or without pre-treatment. Stable secondary structures may facilitate the covalent binding of PMA / EMA to viral RNA rendering the RNA undetectable by RT-qPCR. Moreover, amplicon length may influence the effectiveness of these assays. Three RT-qPCR assays were assayed for each viral target to explore the impact of the amplified genomic region on the success of the pre-treatment-RT-qPCR assays in detecting the infectious viruses. The log₁₀ reduction detection limits of the cell culture technique were -4 log₁₀ PFU of HAV, -5.5 log₁₀ TCID₅₀ of RV (Wa) and -3.5 log₁₀ TCID₅₀ of RV (SA11). For describing all the inactivation curves, the log-linear + tail model was found to be the most appropriate. Figures 1 and 2 show the values of the parameters of Equation (2) that characterized the fate of the HAV and RV strain levels respectively according to the four different temperatures, and to the three methods of quantification of the virus titer, i.e. RT-qPCR and pre-treatment RT-qPCR depending on the three different RT-qPCR assays used and the infectious titer.

For HAV, the values of $S_{i,0}$ were not different from zero, which means that the EMA IGEPAL CA-630 treatment did not affect virus quantification with regard to the RT-qPCR method. At 37°C, the level of HAV remained constant regardless of the method used. For other temperatures, k_{max} , which is the inactivation rate, increased with temperature. Using a Bigelow-type model, relating D -value to temperature, this increase corresponds to z -values ranging from 17°C to 22°C for EMA-IGEPAL CA-630 -RT-qPCR and infectious titration methods and of 44°C for the RT-qPCR method, regardless of the RT-qPCR assay. Confidence intervals of $S_{i,res}$ indicate that the fraction of virus that can survive thermal treatment differs depending on the titration method used and the temperature. With EMA-IGEPAL CA-630 - RT-qPCR and RT-qPCR assay C, the $S_{2,res}$ value is approximately -1.6 log₁₀, which means that 1 virus out of 40 is quantifiable after 20 min of treatment regardless of the temperature. With EMA-IGEPAL CA-630 - RT-qPCR and RT-qPCR assay A or B, between 1 virus out 200 and 1 virus out of 6000 is still quantifiable after treatment at 68°C and 80°C (with $S_{2,res}$ ranged between -2.3 log₁₀ and -3.8 log₁₀). For RT-qPCR, $S_{1,res}$ are much higher than $S_{2,res}$, but the difference between RT-qPCR assays A and B and RT-qPCR assay C was also

observed for RT-qPCR. For the infectious titration method, $S_{3,res}$ is around -3.5 log₁₀, close to the values obtained with EMA-IGEPAL CA-630 - RT-qPCR associated with RT-qPCR assays A and B.

For RV strains, the values of $S_{2,0}$ were lower than zero, which means that the EMA / PMA treatment affected virus quantification with regard to the RT-qPCR method. Indeed, the reduction of the concentration of infectious virus due to the monoazide pre-treatment was about of -0.5 log₁₀ by using RT-qPCR assay A and is ranged from -1.2 log₁₀ to -2.5 log₁₀ by using RT-qPCR assays B and C. These reduction levels were the same for both RV strains. At 37°C, the level of RV strains remained constant regardless of the method used. At 68°C, 72°C, and 80°C, the genomic titer of the RV strains was found to be constant by using the RT-qPCR method regardless of the RT-qPCR assay tested. The $S_{i,res}$ confidence intervals indicate that the fraction of virus that can survive thermal treatment differs depending on the titration method used.

For the Wa RV strain, with EMA-RT-qPCR and RT-qPCR assay A, the $S_{2,res}$ value was approximately -1.3 log₁₀ which means 1 virus out of 20 was quantifiable after 20 min of treatment regardless of the temperature. After EMA-RT-qPCR and RT-qPCR assays B or C, between 1 virus out of 10⁴ and 1 virus out of 10⁵, was still quantifiable after treatment at 68°C, 72°C or 80°C (i.e. $S_{2,res}$ ranged between -4 log₁₀ and -5 log₁₀). The $S_{3,res}$ values obtained with the infectious titration method were similar to the $S_{2,res}$ values of RT-qPCR assays B and C.

For the SA11 RV strain, with PMA-RT-qPCR and RT-qPCR assay A, $S_{2,res}$ value is approximately -1.2 log₁₀. With RT-qPCR assays B and C, $S_{2,res}$ ranged from -2.4 log₁₀ and -3.9 log₁₀. The value of $S_{2,res}$ with these RT-qPCR assays decreased significantly when the temperature of treatment increases. $S_{3,res}$ values cannot be estimated as inactivation after 1 minute of treatment for 68°C, 72°C or 80°C was higher than the LOQ.

For SA11, the k_{max} value increased with the temperature. Using a Bigelow-type model, this increase corresponds to z -values ranging from 15°C to 19°C according to the RT-qPCR assays for the PMA-RT-qPCR method and of 28°C for the infectious titration method. For the Wa strain and EMA-RT-qPCR, the large confidence interval observed for k_{max} did not make it possible to detect a temperature effect. Very fast inactivation of Wa strain, (after 1 minute of treatment, infectious titers were below the limit of detection (LOD)) only allows to argue that k_{max} values were higher than 8.

In conclusion, assays conducted to examine the efficiency of pre-treatment RT-qPCR in minimizing detection signals from thermally-inactivated viruses were dependent on virus species, on the temperature of inactivation and on the RT-qPCR assays.

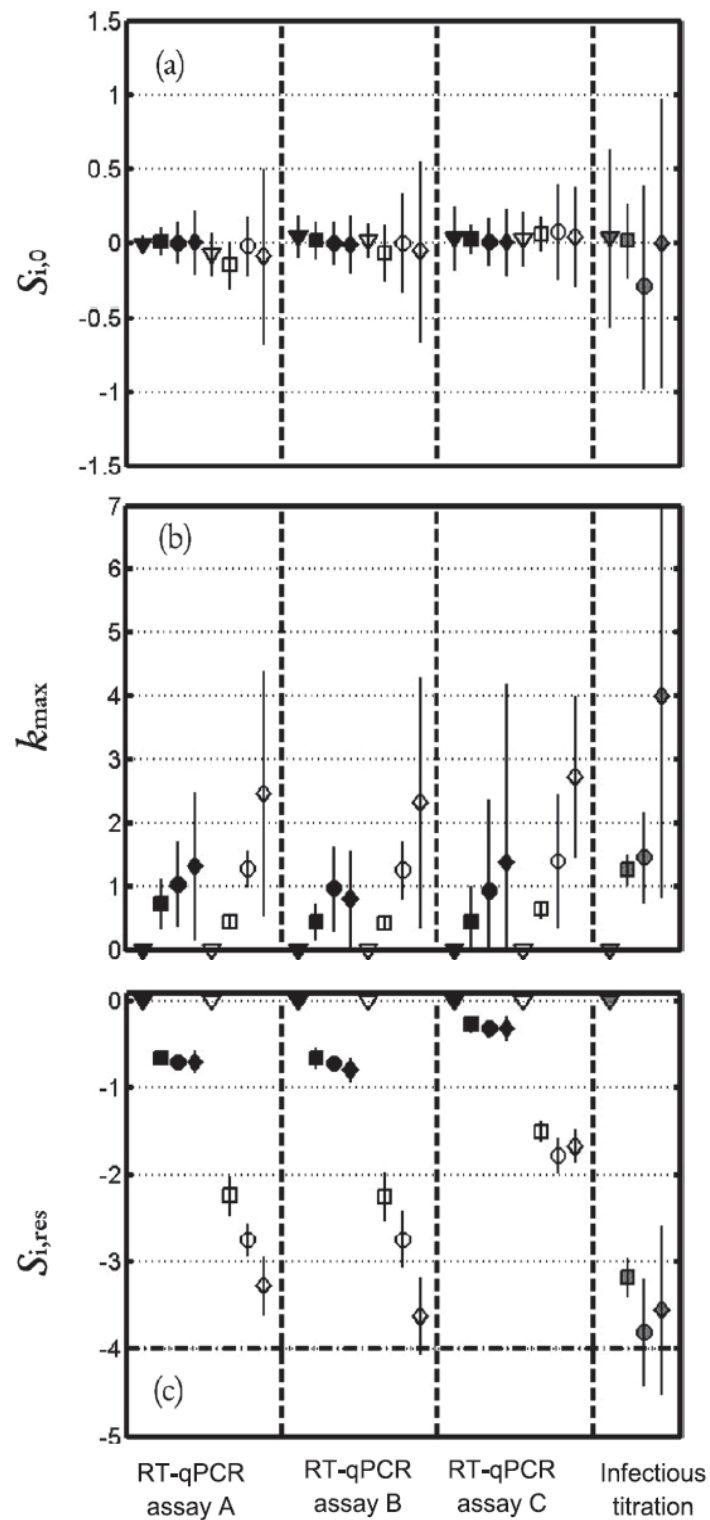


Figure 1 Thermal inactivation kinetics of HAV. Thermal Inactivation kinetics of HAV (a,b,c), expressed with the log-linear + tail model: $\log_{10}(S_i(t)) = \log_{10}(S_{i,0} - S_{i,res}) \cdot \exp(-k_{max} \cdot t) + S_{i,res}$ (Equation 2). Plots of the estimated parameters for Equation 2 and the corresponding 95% asymptotic confidence intervals for HAV. (a) $S_{i,0}$; (b) k_{max} ; (c) $S_{i,res}$. The results obtained at 37°C, 68°C, 72°C and 80°C are indicated by ∇ , \blacksquare , \bullet and \blacklozenge respectively. Symbol shaded in gray indicates data obtained with cell culture method, symbol in black indicates RT-qPCR and open symbol represents RT-qPCR with pre-treatment. (- -) Limit of quantification.

Discussion and conclusion

Foodborne viruses have emerged as a major cause of outbreaks worldwide. Among the factors that affect virus survival, temperature has a great influence on virus stability in food as in any other matrix. Therefore, food industries widely apply temperature as a virus-inactivating factor. Natural or added constituents of food and the virus species may influence the rate of virus inactivation by temperature but higher temperatures provided more pronounced virus decay [24]. The primary model that was found to effectively describe thermal virus inactivation in our study, (i.e. the log-linear + tail primary inactivation model), was similar to the one chosen to describe thermal inactivation of HAV in raspberries [25]. The infectivity of enteric viruses requires the functional integrity of two major components, the capsid and the genome [26]. While quantitative RT-PCR is a specific and sensitive tool for determining the quantities of viral genomes in the environment and food samples, it does not discriminate between infectious viruses and non-infectious viruses that do not pose a threat to health. Moreover, the virus genome was shown to be more resistant than the infectious virus. So, methods which provide information about the infectivity are particularly useful for the detection of enteric viruses and would be an advantage in a public health perspective [27].

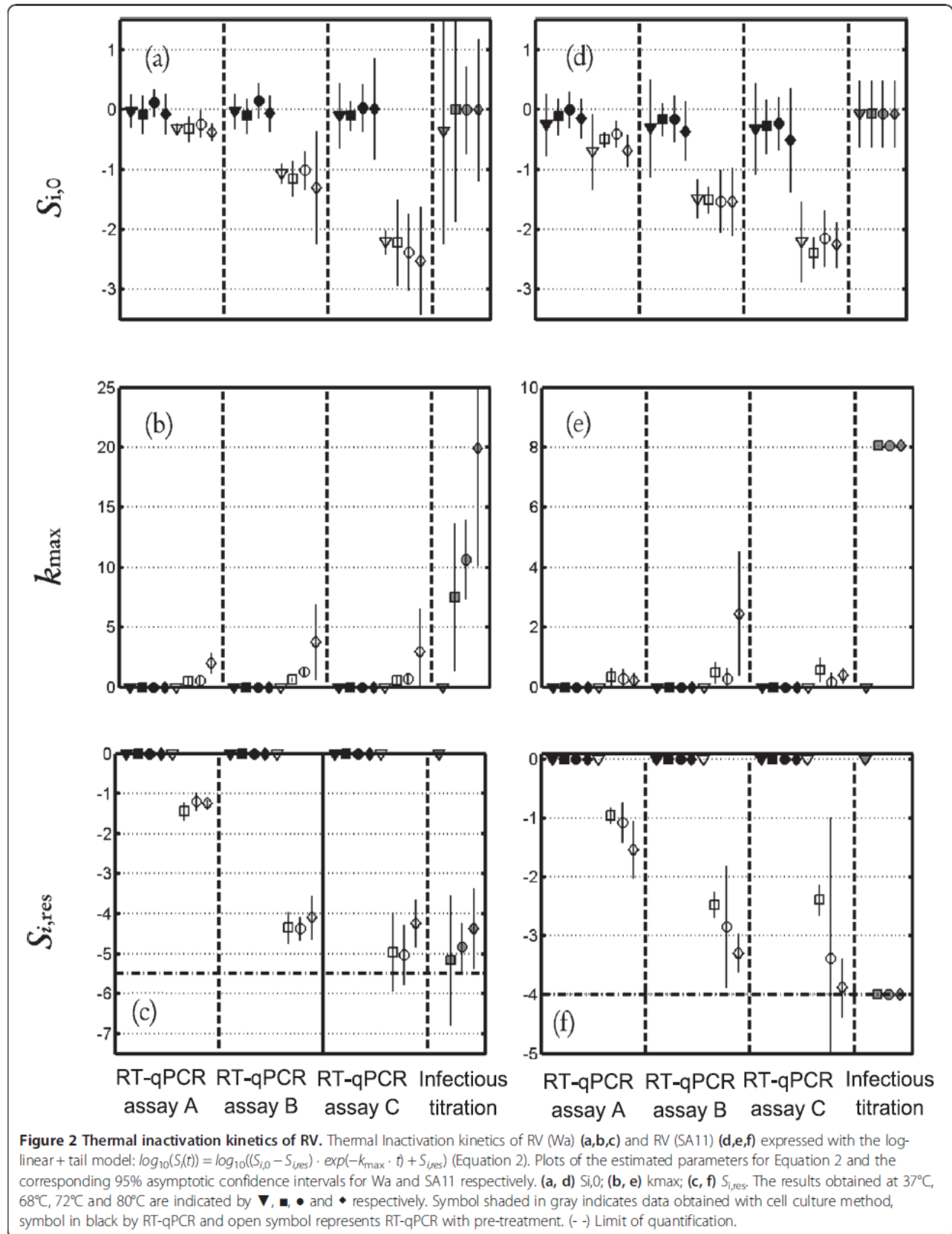
Recently, ethidium monoazide (EMA) and propidium monoazide (PMA), which are intercalating dyes, have been used combined with PCR or real-time PCR for the selective detection of viable microorganisms. In this study, monoazides were tested in association with surfactants in order to develop a technique for determining the residual infectivity of thermally inactivated enteric viruses. These assays are based on the penetration of monoazide, potentially facilitated by the action of surfactants, through damaged or compromised capsids and its covalent binding to viral RNA, which makes the genome unavailable for amplification by RT-qPCR.

In this study, it was hypothesized that the PMA / EMA would be able to enter non-infectious RV / HAV viruses and easily bind to the dsRNA of RV and to the highly structured 5'-non coding region (5'-NCR) of HAV ssRNA targeted by the RT-qPCR assays [28]. The pretreatment RT-qPCR assays with the shortest amplification fragments for RV (87-bp) and HAV (77-bp) did not produce data similar to those obtained by measuring the decrease in the number of infectious particles following heat treatment. By using both longer amplification fragments (313-bp; 352-bp) targeting two different regions of RV dsRNA, data obtained with pretreatment RT-qPCR were very similar suggesting that the targeted region had not influenced the success of the pretreatment RT-qPCR for dsRNA. Similarly, both longer amplification regions for HAV ssRNA (174-bp; 353-bp) provided

data suggesting that the stable secondary structures may facilitate covalent binding of monoazide to HAV ssRNA. Thus, the stable secondary structures may facilitate covalent binding of monoazide to viral RNA, rendering the RNA undetectable by RT-qPCR. Besides the targeted genome region, this study also showed the influence of the RT-qPCR assays in terms of length of amplicons for three viruses. Other studies have shown the influence of amplification length on the degree of PCR suppression by monoazide treatment in dead cells [29-31].

The HAV capsid is composed of the structural proteins VP1, VP2, VP3, and possibly VP4, encoded in the P1 region of the genome [32]. Cell culture-derived rotavirus preparations contain a mixture of double-layered particles (DLPs) and triple-layered particles (TLPs). The innermost layer of the rotavirus particle is made up of the core protein VP2, the middle layer is composed entirely of VP6, and the outermost layer of RV is composed of two proteins, VP4 and VP7 [33]. VP4 forms spikes that extend outwards from the surface of the virus and which have been linked to a variety of functions, including initial attachment of the virus to the cell membrane and penetration into the cell by the virion [34]. Indeed, the capsids structures may explain the differences of efficacy of thermal inactivation and of the penetration of monoazide. The presence of monoazide did not affect the measurement of HAV, but it slightly affected the measurement of both rotavirus strains. This effect appeared to be variable (between 0.5 log₁₀ and 2.5 log₁₀) depending on the RT-qPCR assays and therefore not always an impediment to the use of monoazide pretreatment for RV. Nevertheless, this monoazide effect seems to be dependent on the virus type and should be evaluated to develop this approach with other viruses.

There is still very little development of monoazide RT-qPCR methods for determining the infectivity of enteric viruses. Among the few studies reported in the literature, Sánchez et al. [23] found that PMA treatment at 50 µM was significantly more effective than RNase treatment for differentiating infectious and thermally-inactivated HAV (99°C for 5 min), with HAV titers reduced by more than 2.4 log₁₀. The EMA - IGEPAL CA-630 - RT-qPCR assay developed in this study was significantly more effective for differentiating infectious and thermally-inactivated HAV with HAV titers reduced by more than 3 log₁₀ and 3.8 log₁₀ respectively with the RT-qPCR assays A and B after 5 min at 80°C. Z values observed in the present study when infectious titration or pretreatment-RT-qPCR methods were used are consistent with those observed in the meta-analysis of inactivation of enteric viruses in food and water carried out by Bertrand et al. [24]. Nevertheless, when high inactivation temperatures were applied, clearer discriminations between infectious and non-infectious viruses were consistently observed with



pre-treatment-RT-qPCR assays. Thus, the procedures reported in the present study provide limits that are comparable to those determined by others [19,20,22]. As the pre-enzymatic treatment-PCR approach, monoazide RT-qPCR depend mainly on capsid integrity as the criterion for infectivity, and this could be one of the drawbacks of this technique since virus inactivation may take place by other means than particle disruption [9].

Optimization of EMA or PMA concentration and the choice of the RT-qPCR assay, as well as the addition of a complementary treatment to enhance the penetration of monoazide into the slightly-damaged capsid may lead to more effective monoazide treatment. This study showed that surfactants may be useful to improve monoazide-RT-qPCR assays for HAV but not for RV.

In conclusion, the lack of information about infectious risk makes it necessary to evaluate new means of preventing a positive RT-qPCR signal in the absence of infectious virus. The pre-treatment of enteric viruses with monoazide alone or in conjunction with other capsid-disrupting aids prior to RT-qPCR may be optimized to obtain rapid differentiation between infectious and non-infectious viruses. This approach can potentially be used with all non-culturable and difficult to culture viruses but must be estimated with regard to the specific conditions of inactivation. Currently, it seems relevant to develop this approach for the identification of infectious viruses in food and environmental samples. However the potential multiple sources of inactivation, such as UVs, storing conditions, temperature, etc., could lead to changes in capsid protein conformation without compromising capsid integrity [9]. This is why it may be necessary to adapt and evaluate the dye treatment according to the inactivation type. Moreover, the efficacy of pre-treatment RT-qPCR assays could be affected by the types of samples (various food and environmental samples) and should be characterized in order to be developed further. Therefore, this new approach could be very useful for evaluating the susceptibility of non-culturable enteric viruses (e.g. norovirus, HAV, HEV) to specific inactivation / disinfection techniques or food processing strategies and could be an alternative to studies using culturable surrogate viruses that differ in structure, function and compartment.

Methods

Viruses and cells

HAV strain HM175/18f, clone B (VR-1402) was obtained from the American Type Culture Collection (ATCC). This clone replicates rapidly and has cytopathic effects in cell culture [35]. HAV stock was produced by propagation in foetal rhesus monkey kidney (FRhK-4) cells (ATCC, CRL-1688) [36] and titrated by plaque assay [37]. Results were expressed in plaque-forming units/mL (PFU/mL) and HAV stock contained 10^7 PFU/mL.

Rotavirus strains SA11 (simian rotavirus A) and Wa (human rotavirus) were obtained from the Pasteur Institute (Paris, France) and were propagated in MA-104 rhesus monkey epithelial cell line (ATCC CRL-2378). MA-104 cells were grown in Minimum Essential Medium - Glutamax™ (MEM), 1% non-essential amino acids, 10% foetal bovine serum and 0.5% penicillin-streptomycin (Life Technologies, France). Cells were incubated at 37°C in an atmosphere containing 5% CO₂ and grown to sub-confluence. Rotavirus viral stock solutions consisted of an infected cell culture supernatant. Infected cells were frozen and thawed once and then clarified using low-speed centrifugation (6000 × g) at 4°C to remove residual debris. The supernatant of SA11 contained 10^7 TCID₅₀ / mL. The supernatant containing Wa was then ultracentrifugated at 151,000 × g for 1 h at 4°C to obtain a higher viral titer. The pellet was resuspended in PBS to obtain a Wa stock containing 10^5 TCID₅₀ / mL. Both virus stocks were divided into aliquots and stored at -80°C. For the infectivity assay, sub-confluent MA-104 cells seeded in 96-well plates were washed twice with MEM. Samples were trypsin-activated for 30 min at 37°C, and then added to MA-104 cells. Plates were incubated 3 days at 37°C. Infectious titers of RV were expressed as TCID₅₀/mL, according to the Kärber method.

RNA purification of Rotaviruses and HAV

HAV and RV RNA stocks were produced from infected cell culture supernatants. They were centrifugated at 4,000 g for 30 minutes at 4°C and then the supernatants were ultracentrifugated at 25,000 g for 25 min at 4°C. Finally, supernatants were ultracentrifugated at 151,000 g for 50 min at 4°C and the pellets were suspended in aliquots of 0.7 mL of 1× PBS and incubated overnight at 4°C before virus titration. The viral stocks were then vortexed for about 10 s before RNA extraction. Volumes of 350 µL were supplemented with NucliSens® easyMAG™ lysis buffer (BioMérieux) up to 3 mL and subjected to the NucliSens® easyMAG™ platform for RNA extraction by the “off-board Specific A protocol” according to the manufacturer’s instructions. Lastly, nucleic acids were eluted in 70 µL of elution buffer and pooled to obtain a homogenized RNA stock. To avoid contamination of cellular DNA from the HAV and RV RNA stocks, the samples were treated with the Turbo DNase free-kit (Life Technologies) according to the manufacturer’s instructions. The purified RNA stocks were quantified by measuring absorbance at 260 / 280 nm with a Nanodrop ND-100 (Thermoscientific, France) and the free software available on the “<http://endmemo.com/bio/dnacopynum.php>” website. All viral RNA stocks (from HAV, SA11 and Wa) containing 10^9 copies / µL were aliquoted and stored at - 80°C.

Propidium monoazide (PMA), ethidium monoazide (EMA)
PMA (phenanthridium, 3-amino-8-azido-5-[3-(diethylmethylammonio)propyl]-6-phenyl dichloride) was purchased from VWR (Fontenay sous Bois, France) at 20 mM and diluted in ultra pure RNase-free water to obtain the solutions used in this study. EMA (phenanthridium, 3-amino-8-azido-5-ethyl-6-phenyl bromide) (Life Technologies) was dissolved in absolute ethanol to create the stock concentration of 5 mg / mL and then dissolved in ultra pure RNase-free water to obtain the solutions used in this study. The EMA and PMA solutions were stored at -20°C in the dark. All the experiments with dyes were performed in light-transparent 1.5 mL microcentrifuge tubes (VWR).

Binding of dyes to purified viral RNA

The effect of several EMA and PMA treatment processes on 10^8 copies genome of viral RNA (RV, HAV) in 100 μL of phosphate-buffered saline (PBS) 1 \times , pH 7.0, were evaluated by testing several final dye concentrations (10, 20, 50, 100, 200 μM), with incubation of 2 h at 4°C in the dark and sample exposure to light for 15 min using the LED-Active[®] Blue system (IB - Applied Science, Barcelona, Spain). To determine whether PMA / EMA interfere with the ability of RT-qPCR to detect viruses, controls consisting of viral RNA that was treated with PMA / EMA without photoactivation were included with each dye concentration used. To attempt to remove the inhibitory effects of residual EMA / PMA on RT-qPCR, viral RNA treated with each dye concentration without photoactivation was purified using the QIAquick PCR purification kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) according to the manufacturer's instructions. Finally, to determine the efficiency of each concentration of PMA / EMA tested, treated viral RNA samples were subjected to photoactivation before the purification step using the QIAquick PCR purification kit. The negative control was a non-treated 1 \times PBS sample. The positive control was a non-treated viral RNA sample in 1 \times PBS. A non-treated viral RNA control sample was subjected to the photoactivation step to check the effect of the lamp. Finally, all these samples were subjected to RNA detection by RT-qPCR assays A. The experiments were performed three times for all viral RNA.

Determination of the optimal dye concentration for viruses

The best dye (PMA / EMA) and its optimised concentration were determined for each viral target by testing five dye concentrations (5 μM , 20 μM , 50 μM , 75 μM , 100 μM). Briefly, in 100 μL of 1 \times PBS samples of 10^5 TCID₅₀ of RV (SA11), 10^3 TCID₅₀ of RV (Wa) and 6×10^4 PFU of HAV were conserved at 4°C or inactivated at 80°C for 10 minutes. Next, samples were incubated with different dye concentrations for 2 h at 4°C in the dark

and then exposed to light for 15 min using the LED-Active[®] Blue system. The negative control was an untreated 1 \times PBS sample. The positive controls were the non-dye-treated viral samples kept at 4°C or inactivated at 80°C for 10 minutes, used to calculate the reduction rates of the viral load. To check the effect of the lamp, the non-dye-treated viral samples kept at 4°C or inactivated at 80°C for 10 minutes and subjected to the photoactivation step were used as the controls. To check the effect of the dyes, the viral samples at 4°C or inactivated at 80°C for 10 minutes treated with 50 μM of dye without the photoactivation step were used as the controls.

Finally, all these samples were subjected to RNA extraction and detection by RT-qPCR assays A. The experiments were performed three times for each virus.

Evaluation of the combined effect of dyes and surfactants

Tween 20 and IGEPAL CA-630 were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France) and Triton X-100 from Fisher Bioblock Scientific (Illkirch, France). These surfactants were dissolved in ultra pure RNase-free water to obtain solutions at 1% and 10%. In 100 μL of 1 \times PBS, samples of 10^5 TCID₅₀ of RV (SA11), 10^3 TCID₅₀ of RV (Wa) and 6×10^4 PFU of HAV were stored at 4°C or inactivated at 80°C for 10 minutes. The HAV and RV (Wa, SA11) samples were further treated with EMA 20 μM to which different final concentrations (0.1%, 0.5% and 1%) of the surfactants were added. The HAV and RV (SA11) samples were treated with PMA 50 μM to which different concentrations (0.1%, 0.5% and 1%) of the surfactants were added. The RV (Wa) samples were treated with PMA 75 μM to which different concentrations (0.1%, 0.5% and 1%) of the surfactants were added. Next, the samples were incubated for 2 h at 4°C in the dark and then exposed to light for 15 min using the LED-Active[®] Blue system.

The negative control was a non-inactivated and untreated 1 \times PBS sample. For the experiments at 4°C , the positive control was a non-inactivated and untreated virus sample incubated for 2 h at 4°C . For the experiments at 80°C , the positive control was an inactivated (10 min at 80°C) and untreated virus sample incubated for 2 h at 4°C . All non-inactivated samples and positive controls were subjected to infectious titration to check the effect of the surfactants on the infectious viruses. Finally, all these samples were subjected to RNA extraction and detection by RT-qPCR assays A. The experiments were performed three times for each virus. Concentrations of the surfactant (Tween 20, Triton \times 100 and IGEPAL CA-630) added to the treated samples were applied to MA-104 cells in order to check their cytotoxicity (negative control). The experiments were performed three times for each virus.

Evaluation of the incubation time with dyes and surfactants

The influence of the incubation time with dyes and surfactant were determined for HAV treated with EMA 20 μM + IGEPAL CA-630 0.5%, SA11 treated with PMA 50 μM and Wa treated with EMA 20 μM . Briefly, samples of 10^5 TCID₅₀ of RV (SA11), 10^3 TCID₅₀ of RV (Wa) and 6×10^4 PFU of HAV were stored in 100 μL of $1 \times$ PBS at 4°C or inactivated at 80°C for 10 minutes and were further incubated with the corresponding selected dyes and surfactants for 30 min, 2 h and overnight in the dark and then exposed to light for 15 min using the LED-Active® Blue system.

The negative control was a non-inactivated and untreated $1 \times$ PBS sample incubated for 2 h at 4°C. For the experiments at 4°C, the positive control was a non-inactivated and untreated virus sample incubated for 2 h at 4°C. For the experiments at 80°C, the positive control was an inactivated (10 min at 80°C) and untreated virus sample incubated for 2 h at 4°C. Additional controls were performed to check the effect of the IGEPAL CA-630 0.5% alone on HAV regardless of the thermal inactivation and photoactivation. Finally, all these samples were subjected to RNA extraction and detection by RT-qPCR assays A. The experiments were performed three times for each virus.

Thermal inactivation of viruses

Three series of HAV and RV strain (Wa, SA11) samples were inactivated thermally in $1 \times$ PBS by using a water bath set at 37°C and dry baths at 68°C, 72°C and 80°C. Aliquots of 50 μL of each virus were incubated for each temperature for 0, 1, 5, 10 and 20 min. Then, 150 μL of $1 \times$ PBS at 4°C were added to the samples and placed on ice. The negative control was a non-inactivated and untreated $1 \times$ PBS sample. The positive control was a non-inactivated and untreated virus sample stored at 4°C. Three 100 μL series of aliquots corresponding to 10^5 TCID₅₀ of RV (SA11), 10^3 TCID₅₀ of RV (Wa) and 6×10^4 PFU of HAV were performed. The first series was kept to monitor loss of infectivity by performing virus titration on cells. The second series was subjected to direct RNA extraction. Finally, the third series was treated with selected dyes and surfactant. Typically, a final dye concentration of 20 μM of EMA and IGEPAL CA-630 0.5% were added to HAV aliquots, a final dye concentration of 20 μM EMA was added to RV (Wa) aliquots, and a final dye concentration of 50 μM of PMA was added to RV (SA11) aliquots. Then, all samples were incubated for 2 h at 4°C in the dark and then exposed to light for 15 min using the LED-Active® Blue system. After photoactivation, the virus samples were also subjected to nucleic acid extraction. Finally, RNA extracts obtained

from the second and third series were quantified by testing the three RT-qPCR assays designed for each viral target. The experiments were performed three times for each virus.

Viral RNA extraction

Nucleic acid extraction was performed in untreated virus samples and samples treated with dyes and surfactants. A hundred μL of the virus sample were supplemented with NucliSens® easyMAG™ lysis buffer (BioMérieux) up to 3 mL and subjected to the NucliSens® easyMAG™ platform for total nucleic acid extraction by the “off-board Specific A protocol” according to the manufacturer’s instructions. Lastly, nucleic acids were eluted in 70 μL of elution buffer and stored at -80°C.

Primers and probes

Three RT-qPCR assays targeting the non-coding region at the 5' end (5'-NCR) of HAV which have been described by Costafreda et al. [38], and adapted from Costafreda et al. [38] and Di Pasquale et al. [39,40] were used. The sequences of the primer pairs and the TaqMan probes used were as follows:

The HAV RT-qPCR assay A generates amplification products of 174 bp [38] and was recommended in the CEN/ISO/TS 15216 (qualitative / quantitative methods) for detection of HAV in foodstuffs. The sense primer (HAV68) was 5'-TCACCGCCGTTTGCCTAG-3', the antisense primer (HAV241) was 5'-GGAGAGCCCTGGAAGAAAG-3' and the TaqMan probe (HAV150 -) was 5'-FAM-CCTGAACCTGCAGGAATTAA-MGB-3'.

HAV RT-qPCR assay B generates amplification products of 353 bp. It exhibits the same sense primer and probe as HAV RT-qPCR model A associated with another antisense primer named HAV-399R: 5'-GCCTAAGAGTTTCACCGTAG -3' designed with Beacon Designer software.

Finally, the HAV RT-qPCR assay C adapted from Di Pasquale et al. [39,40] generates amplification products of 77 bp. The sense primer (HAVf ISS (459–478)) was 5'-GCGGCGGATATTGGTGAGTT-3', the antisense primer (HAVr ISS (535–515)) was 5'-CAATGCATCCACTGGA TGAGA-3' and the TaqMan probe (HAVp ISS (484–511)) was 5' ROX- Δ GACAAAAACCATTCAACGCC GGAGGACT-BHQ2-3'. When comparing to the model published by Di Pasquale et al. [39,40], “ Δ ” corresponds to a deletion of 4 nucleotides and the nucleotides in bold corresponds to insertions.

Three RT-qPCR assays targeting the rotaviruses were used. The RT-qPCR assay which has been described by Pang et al. [41] in the NSP3 region was used with a sense primer slightly modified with degenerated bases for matching with both human and simian strains.

Thus, RV RT-qPCR assay A generates amplification products of 87 bp. The sense primer (Rota NVP3-F) (positions:

963–982) was 5'-RYCATCTAYRCATRACCCTC-3', the antisense primer (Rota NVP3-R) (positions 1034–1049) was 5'-GGTCACATAACGCCCC-3' and the TaqMan probe (positions 984–1016) was 5'-FAM-ATGAGCACAATAGTTAAAAGCTAACACTGTCAA-BHQ1-3'.

RV RT-qPCR assay B generates amplification products of 313 bp. It exhibits the same antisense primer and probe as RV RT-qPCR assay A associated with another sense primer named Rota NSP3-736 F : 5'-GARTGGTATYTAAGATCWATGGAAT-3' designed with Beacon Designer software.

RV RT-qPCR assay C designed in the NSP4 region with Beacon Designer software generates amplification products of 352 bp. The sense primer (rotaNSP4_166-188 F) was: 5'-ATTGCRYTGAAAACRTCAAAATG-3', the antisense primer (rotaNSP4_517-493R) was: 5'-GCA GTCACCTTCTYTTGGTTCATAAG-3' and the TaqMan probe (rotaNSP4_486-462P) was 5'-ROX-YCCACTTTCCCAYTCTTCTAGCGTT-BHQ2-3'. Primers and probes were purchased from Eurofins (Les Ulis, France) and Applied Biosystems (Courtaboeuf, France).

Real-time RT-qPCR conditions

One-step RT-qPCR amplifications were performed in duplicate on a CFX96™ real-time PCR detection system from Bio-Rad (Marnes-la-Coquette, France). Reactions were performed in a 25 µL reaction mixture containing 1× of thermoscript reaction mix, and 0.5 µL of ThermoScript Plus / Platinum Taq enzyme mix, which are components of the Platinum® Quantitative RT-PCR ThermoScript™ One-Step System (Fisher Bioblock Scientific, Illkirch, France), as well as 2 U RNase inhibitor (Applied Biosystems), 5 µg of BSA (Ambion), 500 nM of forward primer, 900 nM of reverse primer, 250 nM of probe and 5 µL of RNA extract. The one-step RT-qPCR program was as follows: 60 min reverse transcription of RNA at 55°C, followed by a 15 min denaturation step at 95°C, and finally 45 cycles of 15 s at 95°C, 1 min at 60°C and 1 min at 65°C. The fluorescence was recorded at the end of the elongation steps (1 minute at 65°C) by the apparatus for each amplification cycle. Ct was defined as the PCR cycle at which the fluorescence intensity exceeded the threshold value. All samples were characterised by a corresponding Ct value. Negative samples gave no Ct value. A standard curve for each system was generated using 10-fold dilution of purified RNA. The slopes (*S*) of the regression lines were used to calculate the amplification efficiency (*E*) of the real-time qRT-PCR reactions, according to the formula: $E = 10^{(-1/S)} - 1$ [42].

Data analysis

The viral titers were obtained with cell culture assay and RT-qPCR according to the pre-treatment. Virus inactivation was determined by calculating the $\log_{10} (N_t/N_0)$,

where N_0 is the titre of the virus recovered on the positive control and N_t is the titre of the virus recovered on the tested sample.

Thermal inactivation kinetics were expressed as the virus survival ratio

$$S_i(t) = \frac{N_i(t)}{N_0} \quad (1)$$

where $N_i(t)$ is the virus concentration measured with method *i* at time *t* and N_0 is the virus concentration obtained by the RT-qPCR method.

GInaFiT, a freeware Add-in for Microsoft® Excel developed by Geeraerd et al. [43] was used to model inactivation kinetics. GInaFiT makes it possible to choose from different types of microbial survival models (nine) according to different statistical criteria (i.e., sum of squared errors, mean sum of squared errors and its root, R^2 , and adjusted R^2). According to these criteria, the “log-linear + tail” inactivation model was found to be the most appropriate for describing inactivation curves regardless of the virus and the temperature of inactivation.

The log-linear + tail model can be expressed as followed:

$$\log_{10}(S_i(t)) = \log_{10}((S_{i,0} - S_{i,res}) \cdot \exp(-k_{max} \cdot t) + S_{i,res}) \quad (2)$$

where k_{max} (min^{-1}), $S_{i,res}$ and $S_{i,0}$ are the model parameters.

k_{max} is the first order inactivation constant, i.e. it characterizes the slope of the linear decrease of concentration expressed as a logarithm. k_{max} is directly linked to the *D* value, the decimal reduction time, $k_{max} = \ln(10)/D$. $S_{i,res}$ characterizes the fraction of the population remaining constant in time, or, otherwise stated, not undergoing any significant subsequent inactivation regardless of the duration of the inactivation treatment. $S_{i,0}$ is the initial survival ratio.

This ratio was expected to be equal to zero if the RT-qPCR method (*i* = 1) was used to quantify virus titer. $S_{i,0}$ can also help to quantify the difference between RT-qPCR and pretreatment-RTqPCR (*i* = 2) or the cultural titration method (*i* = 3).

GInaFiT also returns the standard error values of the estimated parameter. These standard errors were used to construct asymptotic parameter confidence intervals. When no inactivation was observed, k_{max} and $S_{i,res}$ were presented as zero with no confidence intervals, and the considered experiments were simply represented with $S_{i,0}$. When no quantification was possible after 1 minute of treatment, corresponding to very fast inactivation, the limit of quantification (LOQ) value was used to set a value for k_{max} and $S_{i,res}$. k_{max} was set at its minimum possible value, $\ln(10) \cdot \text{LOQ}$ and $S_{i,res}$ were set to their maximum

possible value, i.e. LOQ. No confidence intervals were given for either parameter.

Abbreviations

ATCC: American type culture collection; CEN: European committee for standardisation; dsRNA: Double-strand RNA; EMA: Ethidium monoazide; HAV: Hepatitis A virus; LOD: Limit of detection; LOQ: Limit of quantification; MEM: Minimum essential medium; NCR: Non-coding region; NoV: Norovirus; PBS: Phosphate-buffered saline; PCR: Polymerase chain reaction; PFU: Plaque-forming units; PMA: Propidium monoazide; RT-qPCR: Quantitative reverse transcriptase PCR; RV: Rotavirus; ssRNA: Single-strand RNA; TCID₅₀: 50% tissue culture infectious dose.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

CC and AF performed these experiments. LG performed statistical study. All authors wrote, read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

This work is part of the thesis by Coralie Coudray-Meunier, a PhD student who received financial support from ANSES.

Author details

¹ANSES, Food Safety Laboratory, Food and Water Virology Unit, 23 Avenue du Général de Gaulle, 94706 Maisons-Alfort cedex, France. ²ANSES, Food Safety Laboratory, Modelling of Bacterial Behaviour Unit, 23 Avenue du Général de Gaulle, 94706 Maisons-Alfort cedex, France.

Received: 19 June 2013 Accepted: 19 September 2013

Published: 1 October 2013

References

1. Koopmans M, Duizer E: Foodborne viruses: an emerging problem. *Int J Food Microbiol* 2004, **90**:23–41.
2. Rodríguez-Lázaro D, Cook N, Ruggeri FM, Sellwood J, Nasser A, Nascimento MS, D'Agostino M, Santos R, Saiz JC, Rzeżutka A, Bosch A, Gironés R, Carducci A, Muscillo M, Kovač K, Diez-Valcarce M, Vantarakis A, Von Bonsdorff CH, De Roda Husman AM, Hernández M, Van der Poel WH: Virus hazards from food, water and other contaminated environments. *FEMS Microbiol Rev* 2012, **36**:786–814.
3. Gulati BR, Allwood PB, Hedberg CW, Goyal SM: Efficacy of commonly used disinfectants for the inactivation of calicivirus on strawberry, lettuce, and a food-contact surface. *J Food Prot* 2001, **64**:1430–1434.
4. Hirneisen KA, Black EP, Cascarino JL, Fino VR, Hoover DG, Knierl KE: Viral inactivation in foods: a review of traditional and novel food-processing technologies. *CRFSFS* 2010, **9**:3–20.
5. Koopmans M, Von Bonsdorff CH, Vinjé J, De Medici D, Monroe S: Foodborne viruses. *FEMS Microbiol Rev* 2002, **6**:187–205.
6. Sánchez G, Bosch A, Pintó RM: Hepatitis A virus detection in food: current and future prospects. *Lett Appl Microbiol* 2007, **45**:1–5.
7. Stals A, Baert L, Van Coillie E, Uyttendaele M: Extraction of food-borne viruses from food samples: a review. *Int J Food Microbiol* 2012, **153**:1–9.
8. Lees D, CEN WG6 TAG4: International standardization of a method for detection of human pathogenic viruses in molluscan shellfish. *Food Environ Virol* 2010, **2**:146–155.
9. Hamza IA, Jurzik L, Überla K, Wilhelm M: Methods to detect infectious human enteric viruses in environmental water samples. *Int J Hyg Environ Health* 2011, **214**:424–436.
10. Lamhoujeb S, Fliss I, Ngazoa SE, Jean J: Evaluation of the persistence of infectious human noroviruses on food surfaces by using real-time nucleic acid sequence-based amplification. *Appl Environ Microbiol* 2008, **74**:3349–3355.
11. Nuanualsuwan S, Cliver DO: Pretreatment to avoid positive RT-PCR results with inactivated viruses. *J Virol Methods* 2002, **104**:217–225.
12. Topping JR, Schnerr H, Haines J, Scott M, Carter MJ, Willcocks MM, Bellamy K, Brown DW, Gray JJ, Gallimore CI, Knight AI: Temperature inactivation of Feline calicivirus vaccine strain FCV F-9 in comparison with human noroviruses using an RNA exposure assay and reverse transcribed

- quantitative real-time polymerase chain reaction-A novel method for predicting virus infectivity. *J Virol Methods* 2009, **156**:89–95.
13. Fittipaldi M, Nocker A, Codony F: Progress in understanding preferential detection of live cells using viability dyes in combination with DNA amplification. *J Microbiol Methods* 2012, **91**:276–289.
14. Fujimoto J, Tanigawa K, Kudo Y, Makino H, Watanabe K: Identification and quantification of viable *Bifidobacterium breve* strain Yakult in human faeces by using strain-specific primers and propidium monoazide. *J Appl Microbiol* 2011, **110**:209–217.
15. Josefsen MH, Löfström C, Hansen TB, Christensen LS, Olsen JE, Hoofar J: Rapid quantification of viable *Campylobacter* bacteria on chicken carcasses, using real-time PCR and propidium monoazide treatment, as a tool for quantitative risk assessment. *Appl Environ Microbiol* 2010, **76**:5097–5104.
16. Nocker A, Camper AK: Novel approaches toward preferential detection of viable cells using nucleic acid amplification techniques. *FEMS Microbiol Lett* 2009, **291**:137–142.
17. Yáñez MA, Nocker A, Soria-Soria E, Múrtula R, Martínez L, Catalán V: Quantification of viable *Legionella pneumophila* cells using propidium monoazide combined with quantitative PCR. *J Microbiol Methods* 2011, **85**:124–130.
18. Nocker A, Cheung CY, Camper AK: Comparison of propidium monoazide with ethidium monoazide for differentiation of live vs. dead bacteria by selective removal of DNA from dead cells. *J Microbiol Methods* 2006, **67**:310–320.
19. Kim K, Katayama H, Kitajima M, Tohya Y, Ohgaki S: Development of a real-time RT-PCR assay combined with ethidium monoazide treatment for RNA viruses and its application to detect viral RNA after heat exposure. *Water Sci Technol* 2011, **63**:502–507.
20. Kim SY, Ko G: Using propidium monoazide to distinguish between viable and nonviable bacteria, MS2 and murine norovirus. *Lett Appl Microbiol* 2012, **55**:182–188.
21. Parshionikar S, Laseke I, Fout GS: Use of propidium monoazide in reverse transcriptase PCR to distinguish between infectious and noninfectious enteric viruses in water samples. *Appl Environ Microbiol* 2010, **76**:4318–4326.
22. Graiver DA, Saunders SE, Topliff CL, Kelling CL, Bartelt-Hunt SL: Ethidium monoazide does not inhibit RT-PCR amplification of nonviable avian influenza RNA. *J Virol Methods* 2010, **164**:51–54.
23. Sánchez G, Elizaquível P, Aznar R: Discrimination of infectious hepatitis A viruses by propidium monoazide real-time RT-PCR. *Food Environ Virol* 2012, **4**:21–25.
24. Bertrand I, Schijven JF, Sánchez G, Wyn-Jones P, Ottoson J, Morin T, Muscillo M, Verani M, Nasser A, De Roda HAM, Myrmel M, Sellwood J, Cook N, Gantzer C: The impact of temperature on the inactivation of enteric viruses in food and water: a review. *J Appl Microbiol* 2012, **112**:1059–1074.
25. Deboosere N, Pinon A, Delobel A, Temmam S, Morin T, Merle G, Blaise-Boisseau S, Perelle S, Vialette M: A predictive microbiology approach for thermal inactivation of Hepatitis A Virus in acidified berries. *Food Microbiol* 2010, **27**:962–967.
26. Cliver DO: Capsid and infectivity in virus detection. *Food Environ Virol* 2009, **1**:123–128.
27. Stals A, Van Coillie E, Uyttendaele M: Viral genes everywhere: public health implications of PCR-based testing of foods. *Curr Opin Virol* 2013, **3**:69–73.
28. Kusov YY, Gauss-Müller V: In vitro RNA binding of the hepatitis A virus proteinase 3C (HAV 3Cpro) to secondary structure elements within the 5' terminus of the HAV genome. *RNA* 1997, **3**:291–302.
29. Contreras PJ, Urrutia H, Sossa K, Nocker A: Effect of PCR amplicon length on suppressing signals from membrane-compromised cells by propidium monoazide treatment. *J Microbiol Methods* 2011, **87**:89–95.
30. Soejima T, Schlitt-Dittrich F, Yoshida S: Polymerase chain reaction amplification length-dependent ethidium monoazide suppression power for heat-killed cells of Enterobacteriaceae. *Anal Biochem* 2011, **418**:37–43.
31. Luo JF, Lin WT, Guo Y: Method to detect only viable cells in microbial ecology. *Appl Microbiol Biotechnol* 2010, **86**:377–384.
32. Hollinger FB, Emerson SU: Hepatitis A virus. In *Fields Virology*. Edited by Knipe DM. Philadelphia, PA: Lippincott Williams and Wilkins; 2007:911–947.
33. Mathis PK, Ciarlet M, Campbell KM, Wang S, Owen KE, Ranheim TS: Separation of rotavirus double-layered particles and triple-layered particles by capillary zone electrophoresis. *J Virol Methods* 2010, **169**:13–21.
34. Estes MK: Rotaviruses and their replication. In *Fields Virology*. 3rd edition. Edited by Fields BN, Knipe DN, Howley PM, Chanock RM, Melnick JL,

- Monath TP, Roizman B, Straus SE. Philadelphia, Pa: Lippincott-Raven; 1996:1625–1655.
35. Lemon SM, Murphy PC, Shields PA, Ping LH, Feinstone SM, Cromeans T, Jansen RW: **Antigenic and genetic variation in cytopathic hepatitis A virus variants arising during persistent infection: evidence for genetic recombination.** *J Virol* 1991, **65**:2056–2065.
 36. Cromeans T, Sobsey MD, Fields HA: **Development of a plaque assay for a cytopathic, rapidly replicating isolate of hepatitis A virus.** *J Med Virol* 1987, **22**:45–56.
 37. Dubois E, Hennechart C, Deboosere N, Merle G, Legeay O, Burger C, Le Calvé M, Lombard B, Ferré V, Traoré O: **Intra-laboratory validation of a concentration method adapted for the enumeration of infectious F-specific RNA coliphage, enterovirus, and hepatitis A virus from inoculated leaves of salad vegetables.** *Int J Food Microbiol* 2006, **108**:164–171.
 38. Costafreda MI, Bosch A, Pinto RM: **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* 2006, **72**:3846–3855.
 39. Di Pasquale S, Paniconi M, De Medici D, Suffredini E, Croci L: **Duplex real time PCR for the detection of hepatitis A virus in shellfish using feline calicivirus as a process control.** *J Virol Methods* 2010, **163**:96–100.
 40. Di Pasquale S, Paniconi M, Auricchio B, Orefice L, Schultz AC, De Medici D: **Comparison of different concentration methods for the detection of hepatitis A virus and calicivirus from bottled natural mineral waters.** *J Virol Methods* 2010, **165**:57–63.
 41. Pang XL, Lee B, Boroumand N, Leblanc B, Preiksaitis JK, Yu Ip CC: **Increased detection of rotavirus using a real time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) assay in stool specimens from children with diarrhea.** *J Med Virol* 2004, **72**:496–501.
 42. Tichopad A, Dilger M, Schwarz G, Plaffl MW: **Standardized determination of real-time PCR efficiency from a single reaction set-up.** *Nucleic Acids Res* 2003, **31**(20):e122. Erratum in: *Nucleic Acids Res* 2003, **31**(22), 6688.
 43. Geeraerd AH, Valdramidis VP, Van Impe JF: **GlnaFIT, a freeware tool to assess non-log-linear microbial survivor curves.** *Int J Food Microbiol* 2005, **102**:95–105. Erratum in: 2006. *Int J Food Microbiol* 110: 297.

doi:10.1186/1471-2180-13-216

Cite this article as: Coudray-Meunier *et al.*: Discrimination of infectious hepatitis A virus and rotavirus by combining dyes and surfactants with RT-qPCR. *BMC Microbiology* 2013 **13**:216.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



2- VIRUS ENTERIQUES : Développement du diagnostic viral sur un format « PCR on chip »

2-1 Etude comparative de la Digital RT-PCR et de la RT-qPCR pour la quantification du virus de l'hépatite A et des Norovirus à partir d'échantillons d'eau et de laitue

A comparative study of digital RT-PCR and RT-qPCR for quantification of Hepatitis A virus and Norovirus in lettuce and water samples (article en cours de reviewing dans International Journal of Food Microbiology)

La (RT)-PCR quantitative en temps réel est aujourd'hui largement utilisée pour la quantification des génomes viraux. Elle nécessite l'utilisation de gammes de standards externes (d'ADN ou ARN viraux produits *in vitro* et quantifiés par spectrométrie) pour la quantification des cibles virales recherchées. Cette approche nécessite la construction des standards et leur calibration, ce qui rend délicate la standardisation de la quantification entre différents laboratoires.

La technique de digital PCR, récemment décrite, permet d'éviter l'utilisation de gammes de standards et de quantifier les génomes viraux de manière absolue, et pourrait ainsi permettre la standardisation de la quantification des génomes viraux entre les différents laboratoires. Les échantillons à analyser sont partitionnés en micro-chambres, dans lesquelles des réactions de qPCR individuelles ont lieu, de telle sorte que chacune des chambres reçoive une ou zéro copie de génome à amplifier. Le nombre de chambres où une amplification a eu lieu est comptabilisé, et permet de calculer le nombre de copie de génomes initialement présent dans l'échantillon grâce à l'utilisation de la loi statistique de Poisson.

L'objectif de cette étude est d'évaluer l'apport de la quantification absolue des génomes par digital PCR (appareil Biomark de Fluidigm) au diagnostic viral en hygiène alimentaire. La digital RT-PCR (RT-dPCR) a été comparée à la RT-qPCR pour la quantification des génomes de

NoV GI, NoV GII et VHA dans des échantillons de laitues et d'eau embouteillée artificiellement contaminés. Deux contrôles de process (mengovirus et norovirus murin) ont été testés pour vérifier la procédure d'extraction. Un contrôle externe d'amplification a permis d'évaluer et de comparer l'inhibition des réactions de RT-qPCR et RT-dPCR.

Afin d'évaluer la sensibilité de la digital PCR, des gammes de standards externes (ADN ou ARN viraux produits *in vitro* et quantifiés par spectrométrie) ont été testées en RT-qPCR et en RT-dPCR et les limites de détection (LOD) intrinsèques des virus entériques et des virus contrôles de process obtenues avec les deux méthodes de quantification (relative et absolue) ont été comparées.

La RT-qPCR et la RT-dPCR ont été comparées pour quantifier les génomes du VHA et des NoV GI et NoV GII, extraits d'échantillons d'eau embouteillée et de laitue artificiellement contaminés, en présence du MNV-1 et du mengovirus. L'extraction des virus a été réalisée en suivant la spécification technique publiée en 2013 (ISO/TS 15216-1 ; 15216-2). La détection et la quantification des virus extraits des matrices ont ensuite été réalisées soit en RT-PCR quantitative en temps réel (quantification relative, *via* l'utilisation de gammes de standards externes quantifiés par DO), soit en RT-PCR digital (quantification absolue). Pour chacune des deux méthodes de quantification et pour chacune des deux matrices, les efficacités d'amplification du contrôle d'inhibition (quantification des effets inhibiteurs des réactions de RT-PCR) ont été comparées ainsi que les rendements d'extraction des cinq cibles virales qui ont été soumis à une analyse statistique (analyse de variance multiple, suivie d'un test de comparaison multiple).

Enfin, les deux virus utilisés comme contrôles de process (MNV-1 et mengovirus) ont été comparés afin de pouvoir proposer le meilleur virus candidat pour les deux matrices testées en fonction des virus entériques recherchés, en se basant sur l'analyse statistique (analyse de variance multiple, suivie d'un test de comparaison multiple) effectuée sur les rendements d'extraction obtenus pour VHA, NoV GI, NoV GII, MNV-1 et mengovirus.

Les réactions de RT-qPCR et de RT-dPCR sont similaires en termes de sensibilité pour la détection de l'ARN de VHA, NoV GI et mengovirus, avec une limite de détection de l'ordre de 500 copies-génomes. En revanche, la limite de détection obtenue pour la détection des ARN

de NoV GII et MNV-1, ainsi que pour la détection des ADN de VHA, NoV GI et NoV GII, est améliorée d'1 \log_{10} en RT-qPCR par rapport à la RT-dPCR.

Le nombre de copies de génomes déterminé par la quantification absolue en digital RT-PCR est de 0,4 à 1 \log_{10} pour l'ADN et de 1,2 à 1,72 \log_{10} pour l'ARN plus faible que celui déterminé par la quantification des acides nucléiques *via* la mesure de la densité optique (DO) au Nanodrop (spectrométrie).

Les rendements d'extraction obtenus pour les cinq virus par RT-qPCR et RT-dPCR sont tous supérieurs à 19,20% dans la matrice eau, qui est peu inhibitrice.

Dans la laitue, les rendements d'extraction obtenus par les deux méthodes de détection sont compris entre 0,30% et 22,19% et sont améliorés par la dilution des ARN viraux préalablement à leur détection (compris entre 3,96% et 44,02%) ce qui montre la présence d'inhibiteurs issus de la matrice. L'analyse statistique montre que les rendements d'extraction obtenus avec la RT-qPCR et RT-dPCR sont au moins équivalents, voire significativement meilleurs avec la RT-dPCR pour la détection des ARN de NoV GI et de mengovirus extraits de l'eau et de NoV GII et du VHA extraits de laitues.

Les efficacités d'amplification des contrôles externes d'inhibition à partir des extraits viraux issus de l'eau sont comprises entre 30,25% et 103,56%, tous virus confondus, que les extraits aient été préalablement dilués ou non, et quelle que soit la méthode de détection. En revanche, les efficacités d'amplification des contrôles externes d'inhibition à partir des extraits viraux issus des laitues sont comprises entre 0,12% et 10,82% lorsque les ARN purs sont testés avec les deux techniques de PCR. Lorsque les ARN viraux sont dilués au 1/10^e les efficacités d'amplification des contrôles externes d'inhibition sont comprises entre 4,45% et 71,20% avec la RT-qPCR et 35,80% et 119,13% avec la RT-dPCR. La levée partielle des inhibitions des réactions d'amplification est observée pour les deux techniques de détection lorsque les extraits d'ARN viraux sont préalablement dilués. Cependant, la RT-dPCR est apparue moins sensible aux inhibiteurs de réactions d'amplification en particulier pour la détection du VHA, du NoV GI et du mengovirus dans la laitue.

Sur la base de la comparaison des rendements d'extraction obtenus pour les virus pathogènes et les virus utilisés comme contrôle de process, le MNV-1 est proposé comme contrôle de process pour la recherche du VHA, du NoV GI et du NoV GII dans l'eau et la laitue par RT-dPCR et par RT-qPCR. Le mengovirus peut être utilisé comme contrôle de process

pour la recherche du VHA et du NoV GII dans l'eau par RT-qPCR, pour la recherche du VHA, du NoV GI et du NoV GII dans l'eau par RT-dPCR, et pour la recherche du NoV GI et du NoV GII dans la laitue par RT-dPCR.

En conclusion, la digital RT-PCR permet d'obtenir les mêmes limites de détection que la RT-qPCR classique, et limite l'inhibition des réactions de RT-PCR due à « l'effet matrice ». La digital PCR permet de valider tous les essais selon les préconisations actuelles de la spécification technique (efficacité d'amplification des contrôles externes d'inhibition supérieurs à 25%), au contraire de la RT-qPCR classique utilisée en routine. La digital RT-PCR permet une quantification des génomes viraux en s'affranchissant du besoin de gammes de standards, tout en utilisant les mêmes conditions de PCR (kit, mix, cyclage, amorces/sondes) que la RT-qPCR, et limite le coût des analyses en virologie alimentaire. Elle pourrait donc être une bonne alternative pour la quantification des virus entériques issus de matrices alimentaires, environnementales ou cliniques.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25

**A comparative study of digital RT-PCR and RT-qPCR for quantification of
Hepatitis A virus and Norovirus in lettuce and water samples**

(Version révisée- soumise le 5 novembre 2014)

**Coralie Coudray-Meunier¹, Audrey Fraisse¹, Sandra Martin-Latil¹, Laurent
Guillier², Sabine Delannoy³, Patrick Fach³, Sylvie Perelle*¹**

**¹ Université Paris-Est, ANSES, Food Safety Laboratory, Enteric Viruses Unit, 23
Avenue du Général de Gaulle, 94706 Maisons-Alfort cedex, France.**

**² Université Paris-Est, ANSES, Food Safety Laboratory, Modelling of Bacterial
Behaviour Unit, 23 Avenue du Général de Gaulle, 94706 Maisons-Alfort cedex,
France.**

**³ Université Paris-Est, ANSES, Food Safety Laboratory, Identypath, 23 Avenue
du Général de Gaulle, 94706 Maisons-Alfort cedex, France.**

* Corresponding author: Tel: +33 (0)1 49 77 27 99. Fax: +33 (0)1 43 68 97 62.

E-mail address: sylvie.perelle@anses.fr

26 Abstract

27 Sensitive and quantitative detection of foodborne enteric viruses is classically achieved by quantitative RT-PCR
28 (RT-qPCR). Recently, digital PCR (dPCR) was described as a novel approach to genome quantification without
29 need for a standard curve. The performance of microfluidic digital RT-PCR (RT-dPCR) was compared to RT-qPCR
30 for detecting the main viruses responsible for foodborne outbreaks (human Noroviruses (NoV) and Hepatitis A
31 virus (HAV)) in spiked lettuce and bottled water. Two process controls (Mengovirus and Murine norovirus)
32 were used and external amplification controls (EAC) were added to examine inhibition of RT-qPCR and RT-
33 dPCR.

34 For detecting viral RNA and cDNA, digital PCR was found comparable in terms of sensitivity to conventional
35 quantitative PCR, but the numbers of genomic copies determined by dPCR were always from 0.4 to 1.7 log₁₀
36 lower than the expected numbers of copies calculated by using the standard qPCR curve. Viral recoveries
37 calculated by RT-dPCR were found to be significantly higher than by RT-qPCR for NoV GI, HAV and Mengovirus
38 in water, and for NoV GII and HAV in lettuce samples. The RT-dPCR assay proved to be more tolerant to
39 inhibitory substances present in lettuce samples. This absolute quantitation approach may be useful to
40 standardize quantification of enteric viruses in bottled water and lettuce samples and may be extended to
41 quantifying other human pathogens in food microbiology.

42

43 *Keywords: HAV, NoV, RT-dPCR, RT-qPCR, lettuce, water*

44

45 1- Introduction

46 Foodborne enteric viruses, particularly human Noroviruses (NoV) and Hepatitis A virus (HAV), represent a
47 serious public health concern since they are responsible for the vast majority of non-bacterial gastro-enteritis
48 or infectious hepatitis, which are occasionally fatal (Koo et al., 2010; Vaughan et al., 2014). Hepatitis A virus
49 (HAV) is classified in the Picornaviridae family and Noroviruses (NoV) belong to the Caliciviridae family. HAV
50 and NoV are small non-enveloped viruses and have a positive-sense, single-stranded RNA genome. They are
51 mainly transmitted via the faecal-oral route either by person-to-person contact or by ingestion of
52 contaminated water and food, particularly shellfish, soft fruits and vegetables (Kotwal and Cannon, 2014;
53 Matthews et al., 2012; Nainan et al., 2006). To ensure the safety of these products, the development of
54 sensitive, reliable and quantitative methods for detecting enteric viruses in food and water samples is needed.

55 Detection of these enteric viruses on the basis of their infectivity is complicated by the absence of a reliable cell
56 culture method and the low levels of contamination of food samples (Atmar and Estes, 2001; Sánchez et al.,
57 2007). To date, real-time RT-PCR has been one of the most promising detection methods due to its sensitivity,
58 specificity and speed. The RT-qPCR assay has become the gold standard for viral load quantification but it is
59 based on a standard curve which requires careful calibration and consistent source material. Therefore, due to
60 differences in standard curve construction and potential analysis subjectivity, this approach based on relative
61 quantitation has limitations and may lead to inter-laboratory variations (Bustin et al., 2004).

62 Digital PCR (dPCR) is an endpoint, sensitive and accurate absolute quantification approach that enables the
63 determination of target copy numbers without the need for a standard curve. These improvements are
64 achieved by partitioning the sample on micro-fluidic chips or micro-droplets into individual reactions so that
65 each reaction contains one or no copies of the nucleic acid target. The signal in dPCR is measured after
66 completing amplification, and the absolute number of target nucleic acid molecules in the sample is calculated
67 directly from the ratio of positive to total partitions using binomial Poisson statistics (Dube et al., 2008;
68 Pinheiro et al., 2012). Moreover, this approach may reduce the difficulty of quantifying viruses in the presence
69 of inhibitors linked to matrix-type components analysed in food or environmental virology (Rački et al., 2014).

70 Recently, the ISO/TS 15216-1 and 15216-2 standards using real time RT-PCR for both quantitative
71 determination and qualitative detection of NoV and HAV in foodstuffs were published (ISO/TS 15216-1., 2013;
72 ISO/TS 15216-2., 2013; Lees and CEN WG6 TAG4, 2010). In this study, a microfluidic digital RT-PCR chip with a
73 48 sample capacity was explored to determine the potential of this new concept of quantification for food
74 virology. The reference method using RT-qPCR was compared to RT-dPCR for quantification of NoV (GI, GII) and
75 HAV in spiked bottled water and lettuce. Two control process viruses (Mengovirus and Murine Norovirus) were
76 tested for monitoring the recovery of the viral extraction methods. The performance of the absolute
77 quantification assay was evaluated in terms of sensitivity and susceptibility to inhibition for detecting and
78 quantifying viral genomes in lettuce and bottled water.

79

80 **2- Materials and Methods**

81 **2.1 Human viral pathogens**

82 Noroviruses and Hepatitis A virus were selected as they are foodborne enteric viruses associated with
83 outbreaks and are targeted by the ISO /TS 15216- 1 and 15216-2. NoV GI and NoV GII were obtained from stool

84 samples (E2818 and E6620 respectively) of infected humans provided by the French National Reference Centre
85 for Enteric Viruses in Dijon, France. The faecal samples were suspended in 1X Phosphate Buffered Saline (PBS),
86 pH 7, to obtain a final 10% suspension (w/v), vortexed and centrifuged at 3000 g for 30 min at 4°C. Aliquots of
87 supernatant (100µL) were kept frozen at -80°C for later use. The titres of the clarified faecal suspensions were
88 established in NoV GI and NoV GII genomic copies with an RT-qPCR standard curve obtained with the ten-fold
89 diluted in vitro RNA transcripts (see section 2.3). Based on this approach, the clarified suspension stocks of NoV
90 GI and NoV GII had titres of approximately 1.4E+08 genome copies / mL and 6.5E+06 genome copies / mL
91 respectively.

92

93 HAV strain HM175/18f, clone B (VR-1402), was obtained from the American Type Culture Collection (ATCC).
94 This clone replicates rapidly and has cytopathic effects in cell culture (Lemon et al., 1991). HAV stock was
95 produced by propagation in foetal rhesus monkey kidney (FRhK-4) cells (ATCC, CRL-1688) (Cromeans et al.,
96 1987). The titre of viral production was established in HAV RNA genomic copies with an RT-qPCR standard
97 curve obtained with the ten-fold diluted in vitro RNA transcripts. Based on this approach, HAV stocks had titres
98 of approximately 9.3E+08 genome copies / mL.

99

100 2. 2. Process control viruses

101 To control losses of target virus which can occur at several stages during food sample analysis, samples are
102 spiked prior to processing with a defined amount of a process control virus. Mengovirus and Murine Norovirus
103 were both used as process control viruses.

104 The murine norovirus (MNV-1), a member of the Caliciviridae family, is morphologically and genetically similar
105 to human noroviruses, and shows considerable promise as a human norovirus surrogate (Wobus et al., 2006). It
106 has also recently been successfully tested as a process control virus for detecting NoV and HAV in some food
107 samples (Hennechart-Collette et al., 2014; Martin-Latil et al., 2012a; Stals et al., 2011a; Stals et al., 2011b) and
108 the hepatitis E virus (HEV) in water and pig liver products (Martin-Latil et al., 2012b, 2014).

109 Dr. H. Virgin from Washington University in the USA provided ANSES's Fougères Laboratory in France with
110 MNV-1 (CW1 strain) which was then propagated in a mouse leukaemic monocyte macrophage (RAW 264.7,
111 ATCC TIB-71) cell line (Cannon et al., 2006). MNV-1 stock was produced as previously described (Wobus et al.,
112 2004). The extracted RNA was confirmed with RT-qPCR and quantified by measuring absorbance at 260 / 280

113 nm with a NanoDrop ND-1000. Based on this approach, the production stock of MNV-1 had titres of
114 approximately $1.3E+12$ genome copies / mL.

115

116 Mengovirus (MC0 strain), a member of the Picornaviridae family sharing structural characteristics with HAV,
117 has been used as a process control virus for the detection of HAV and noroviruses in shellfish (Costafreda et al.,
118 2006; Le Guyader et al., 2009; Uhrbrand et al., 2010) as well as during the development of the Technical
119 Specification ISO/TS 15216. Mengovirus (strain MC0) was obtained from clarified supernatant provided by Dr.
120 Albert Bosch from the “Enteric Virus Group” of the University of Barcelona. Mengovirus stock was produced by
121 propagation in Hela cells (ATCC, CCL-2™) (Costafreda et al., 2006). The extracted RNA was confirmed with RT-
122 qPCR and quantified by measuring absorbance at 260 / 280 nm with a NanoDrop ND-1000. Based on this
123 approach, the production stock of Mengovirus had titres of approximately $6.6E+11$ genome copies / mL.

124

125 **2.3. DNA and RNA standards**

126 HAV, NoV GI and NoV GII cDNA corresponding respectively to the 39-518, 5257-5413 and 4981-5135 positions
127 of genomic sequence (M59808.1), (M87661) and (X86557) were cloned in pGEM-T Easy vector (Promega,
128 Charbonnières-les-Bains, France) and propagated in *E. coli* One Shot® TOP10F' (Life technologies). High quality
129 DNA plasmids containing HAV or NoV regions were purified using the Qiagen Plasmid Midi kit (Qiagen,
130 Courtaboeuf, France) according to the manufacturer’s protocol. Then, NoV GI plasmid was digested with NcoI
131 (Life technologies), HAV DNA and NoV GII DNA plasmids were digested with SpeI (Life technologies), and
132 transcripts were obtained by using the MEGAscript® kit (Life technologies) according to the manufacturer’s
133 protocol. Synthesized RNA were treated with Turbo™ DNase (Life technologies) according to the
134 manufacturer’s protocol in order to remove the DNA template following transcription, and purified by using
135 the MEGAclean™ kit (Life technologies). The synthesized DNA and RNA were confirmed with (RT)-qPCR and
136 quantified by measuring absorbance at 260 / 280 nm with a NanoDrop ND-1000 (Thermoscientific,
137 Courtaboeuf, France). Aliquots of 10 µL were kept frozen at -20°C for later use as standards and as external
138 amplification controls to monitor for RT-PCR inhibition in samples. This approach has been described in the
139 ISO/TS 15216- 1 and 15216-2 where an external control (EC) RNA (a RNA species carrying the target sequence
140 of interest) is added to an aliquot of RNA sample and tested using both RT-PCR methods. Comparison of the
141 results of this with the results of EC RNA in the absence of sample RNA enables determination of the level of

142 RT-PCR inhibition in each sample under test. In addition, in this method, the EC RNA control acts as a RT-PCR
143 positive control.

144 MNV-1 and Mengovirus RNA were extracted with the NucliSens® easyMAG™ platform (Biomérieux, Marcy
145 l'Etoile, France) and used as standards and EC RNA.

146

147 **2. 4. Inoculation of water and lettuce samples**

148 The principal chemical characteristics of the purchased bottled mineral water used to perform the study were:

149 Ca²⁺, 11.5 mg/L; Mg²⁺, 8 mg/L; Na²⁺, 11.6 mg/L; K⁺, 6.2 mg/L; Cl⁻, 13.5 mg/L; NO₃⁻, 6.3 mg/l; So₄²⁻, 8.1 mg/L;

150 SiO₂, 31.7mg/L, HCO₃⁻, 71.0 mg/L; F⁻, 0.2 mg/L. Laboratory measurements indicated a pH of 7. Bottled mineral

151 water samples (0.5 L) were spiked with 100 µL of dilutions in PBS of HAV, NoV GI or NoV GII stocks, to obtain

152 inoculation levels per sample of 1.0E+05, 1.0E+04 and 1.0E+03 genome copies for NoV GI; 1.6E+04, 1.6E+03

153 and 1.6E+02 genome copies for NoV GII; and 9.3E+03, 9.3E+2 and 9.3E+1 genome copies for HAV. They were

154 also spiked with 10 µL of dilutions in PBS of MNV-1 or Mengovirus stocks used as process controls to obtain

155 inoculation levels per sample of 1.3E+08 genome copies for MNV-1 or 6.6E+06 genome copies for Mengovirus.

156 For each virus (NoV GI, NoV GII or HAV), the experiment set was comprised of 3 bottles of water spiked with

157 each of the three inoculation levels with MNV-1 and 3 bottles of water spiked with each of the three

158 inoculation levels with Mengovirus.

159 The spiked bottle samples were homogenized using ten hand inversions. Uninoculated water samples were

160 used as a negative control. Each experiment set, from spiking to RNA extraction, was performed three times,

161 and RNA extracts (neat and diluted ten-fold) were analyzed in duplicate with the RT-qPCR and RT-dPCR assays.

162

163 Lettuce was purchased from a local market. Two batches of three lettuce samples (25 g) were spiked in a 400

164 mL polypropylene bag containing a filter compartment (Seward, Norfolk, United Kingdom) with HAV, NoV GI or

165 NoV GII to obtain inoculation levels per sample of 1.0E+06, 1.0E+05 and 1.0E+04 genome copies for NoV GI,

166 1.6E+05, 1.6E+04 and 1.6E+03 genome copies for NoV GII, and 9.3E+05, 9.3E+04 and 9.3E+03 genome copies

167 for HAV. Each 100 µL inoculum was distributed to about 20 spots on the surface of each 25 g sample of lettuce

168 and left to dry overnight at 4°C to increase the numbers of adhering viral particles. One batch of lettuce

169 samples was co-inoculated with 1.3E+08 genome copies of MNV-1 and one batch of lettuce samples was co-

170 inoculated with 6,6E+06 genome copies of Mengovirus per 25 g sample as process controls just before addition

171 of elution buffer. This was the earliest opportunity prior to virus extraction to control for extraction efficiency.
172 Uninoculated lettuce samples were used as a negative control. All experiment steps from spiking to RNA
173 extraction were performed three times, and RNA extracts (neat and diluted ten-fold) were analyzed in
174 duplicate with the RT-qPCR and RT-dPCR assays.

175

176 **2. 5. Sample processing for recovery of viruses and viral RNA extraction**

177 The protocol used for recovery of viruses from 0.5 L of inoculated bottled water and viral RNA extraction was
178 the same as previously described (Martin-Latil et al., 2012b; Perelle et al., 2009; Schultz et al., 2011). To detect
179 enteric viruses on spiked lettuce, the elution-concentration method described for vegetables in the ISO/TS
180 15216-1, 15216-2 (2013) was used. Then, samples were subjected to the NucliSens® easyMAG™ platform
181 (Biomérieux) for total nucleic acid extraction by the “off board Specific A” protocol according to manufacturer’s
182 instructions. Nucleic acids were eluted in 40 µL (for RT-dPCR) or 100 µL (for RT-qPCR) of elution buffer and
183 stored at -80°C.

184

185 HAV, NoV GI, NoV GII, Mengovirus and MNV-1 recovery rate percentages in spiked samples were calculated
186 using the inoculum and the following formula:

187 $\text{Quantity of virus recovered after spiking experiments} / \text{Quantity of inoculum} \times 100.$

188 HAV, NoV GI, NoV GII, Mengovirus and MNV-1 external amplification controls were calculated using the
189 following formula:

190 $\text{Quantity of external control RNA recovered in sample} / \text{Quantity of external control RNA recovered in ultrapure}$
191 $\text{water} \times 100.$

192

193 **2. 6. Primers and probes**

194 The primers and probes used to detect NoV GI, NoV GII, HAV and Mengovirus are those described in ISO/TS
195 15216-1, 15216-2 (2013). The primers and the probe used to detect MNV-1 were described previously (Martin-
196 Latil et al., 2012a). All the primers and probes were purchased from Life Technologies or Eurofins MWG Operon
197 (Les Ulis, France).

198

199

2. 7. RT-qPCR conditions on Bio-Rad's CFX96

One-step RT-qPCR amplifications were performed on a CFX96™ real time PCR detection system from Bio-Rad (Marnes-la-Coquette, France). Reactions were performed in a 25 µL reaction mixture containing 1X of RNA UltraSense™ master mix and 1.25 µL of RNA Ultrasense™ enzyme mix, which are components of the RNA UltraSense™ One-Step Quantitative RT-PCR System (Life Technologies), 2 U RNase inhibitor (Life Technologies), 5 µg of bovine serum albumin (Life Technologies), 500 nM of forward primer, 900 nM of reverse primer and 250 nM of probe, and 5 µL of RNA extract. A positive control containing RNA extracted from virus suspensions, a negative control containing all the reagents except the RNA template, and an external amplification control containing 5µL of sample RNA extract and 1µL of 1.0E+06 genome copies / µL external control RNA (synthesized RNA (HAV, NoV GI and NoV GII) or RNA extracts (MNV-1 and Mengovirus)) were included with each set of reaction mixtures. Pure and 10-fold diluted RNA extracts obtained from each sample were tested in duplicate.

The one-step RT-qPCR program involved 60 min reverse transcription of RNA at 55°C, followed by a 15 min denaturation step at 95°C, and lastly 45 cycles of 15 s at 95°C, 1 min at 60°C and 1 min at 65°C. A standard curve for each target (HAV, NoV GI, NoV GII, Mengovirus and MNV-1) was generated with synthesized DNA (HAV, NoV GI and NoV GII) or RNA extracts (MNV-1 and Mengovirus) resulting from serial dilution in ultrapure water. The slopes (S) of the regression lines were used to calculate the amplification efficiency (E) of the RT-qPCR reactions, according to the formula $E = 10^{-1/S} - 1$ to determine the performance of RT-qPCR assays.

218

2. 8. RT-dPCR conditions on Fluidigm's BioMark System

Digital PCR works by partitioning a single sample into hundreds of individual PCR reactions. RT-dPCR amplifications were performed on a Fluidigm's BioMark System by using qdPCR 37k IFC digital array microfluidic chips (Les Ulis, France). Utilizing nanoscale valves and channels, the Biomark Integrated Fluidic Circuit (IFC) controller partitions each of the 48 samples premixed with PCR reagents into a panel of 770 PCR reaction chambers (ie 36,960 individual qPCR reactions on a digital array). By counting the number of positive reactions, the number of target molecules in each sample can be accurately estimated according to Poisson distribution.

227

228 Reactions were performed in a 10 μ L reaction mixture containing 1X of RNA UltraSense™ master mix, 1X of
229 ROX reference dye and 0.44 μ L of RNA Ultrasense™ enzyme mix, which are components of the RNA
230 UltraSense™ One-Step Quantitative RT-PCR System (Life Technologies), 1X of 20X GE Sample Loading Reagent
231 (Biomark), 2 U RNase inhibitor (Life Technologies), 500 nM of forward primer, 900 nM of reverse primer and
232 250 nM of probe, and 5.8 μ L of RNA extract. A positive control containing RNA extracted from virus
233 suspensions, a negative control containing all the reagents except the RNA template, and an external
234 amplification control containing 5.8 μ L of sample RNA extract and 1 μ L of 1.0E+06 genome copies / μ L external
235 control RNA (synthesized RNA (HAV, NoV GI and NoV GII) or RNA extracts (MNV-1 and Mengovirus)) were
236 included with each set of reaction mixtures. Pure and 10-fold diluted RNA extracts obtained from each sample
237 were tested in duplicate. 6 μ L out of ten reaction mix was charged onto the chip with the IFC controller MX but
238 0.65 μ L were effectively partitioned into the 770 chambers of one panel, including 0.38 μ L of RNA extract). The
239 one-step RT-dPCR program involved 60 min reverse transcription of RNA at 55°C, followed by a 15 min
240 denaturation step at 95°C, and lastly 45 cycles of 15 s at 95°C, 1 min at 60°C and 1 min at 65°C. Fluorescence
241 was recorded by the apparatus at the end of the elongation steps (1 minute at 65°C) for each amplification
242 cycle.

243 The Digital PCR Analysis software, part of the Biomark System (Fluidigm), was used to count the number of
244 positive chambers out of the total number of chambers per panel. The Poisson distribution was used to
245 estimate the average number of template copies per chamber in a panel (Bhat et., 2009; Dube et al., 2008). All
246 samples were characterised by a corresponding absolute quantity. No positive chambers were observed in
247 negative samples.

248

249 **2.9. Statistical analysis**

250 The first objective of the statistical analysis was to test for potential differences in the recovery rates of the two
251 process control viruses (Mengovirus versus MNV-1) along with the effect of several other factors: (i) nature of
252 the inoculated virus (HAV, NoV GI and NoV GII), (ii) dilution of the sample (non-diluted / ten-fold diluted), and
253 (iii) inter-assay variability. The second objective was to check for differences in the recovery rates of the two
254 RT-PCR methods (RT-qPCR versus RT-dPCR) for all viruses (inoculated human enteric and process control
255 viruses) along with the effect of the following factors: (i) dilution of the sample (non-diluted/ ten-fold diluted),
256 and (ii) inter-assay variability.

257

258 For these two objectives, multiway analysis of variance was used in order to determine if the means in a set of
259 data differ when grouped by multiple factors and if they do differ, which factors or combinations of factors are
260 associated with the difference. This was done with the ANOVAN subroutine from the statistics toolbox of
261 MATLAB software (version 2012b; The Math Works Inc., Natick, MA, USA). The means of the two replicates of
262 each experiment were analysed by N-way ANOVA. Then for each factor of interest (e.g. effect of RT-PCR
263 method) we applied a multiple comparison procedure to obtain information about which pairs of means are
264 significantly different, and which are not. The multiple comparison procedure was applied by using Matlab's
265 MULTCOMPARE subroutine.

266

267 For the process control viruses, we tested for differences between their recovery rates along with the effect of
268 the type of inoculated virus (HAV, NoV GI and NoV GII), the dilution of the sample (non-diluted/ ten-fold
269 diluted), and inter-assay variability on the recovery rate of both process controls.

270

271

272 **Results**

273 **3. 1. Sensitive and accurate quantification by RT-dPCR**

274 Digital RT-PCR's potential for sensitive and accurate quantification was assessed on dilution series of RNA and
275 cDNA of HAV, NoV GI, NoV GII, and RNA dilutions of Mengovirus and MNV-1 (Table 1). The sensitivity of the RT-
276 dPCR assays is comparable to that of RT-qPCR with ca. 500 genome copies / reaction mixture of RNA of HAV,
277 NoV GI, Mengovirus. The sensitivity of NoV GII and MNV-1 RNA and of HAV, NoV GI, NoV GII cDNA was
278 approximately improved by 1 log₁₀ with RT-qPCR compared to RT-dPCR. The numbers of genome copies as
279 determined by the direct measurement of the concentrations of targets by RT-dPCR were always from 0.4
280 log₁₀ to 1 log₁₀ with DNA and from 1.2 to 1.7 log₁₀ with RNA lower than the expected numbers of copies
281 calculated via the standard curve by RT-qPCR.

282

283 **3. 2. Detection of HAV and NoV in lettuce and bottled water samples by RT-qPCR vs RT-dPCR**

284 RT-qPCR and RT-dPCR were tested for the recovery of HAV and NoV present in spiked lettuce and bottled water
285 samples, according to the presence of MNV-1 or Mengovirus used as a control process (Table 2A and 2B).

286 3.2.1 Bottled water

287 In the spiked bottled water samples, NoV GI, NoV GII and HAV were commonly detected by RT-qPCR and RT-
288 dPCR when testing pure RNA extracts regardless viral inoculum levels. Independently of the process control,
289 viral target and spiking level used, the observed recovery rates were over 19.20 % by RT-qPCR and over 41.73 %
290 by RT-dPCR. When MNV-1 was used, the lowest dose of HAV was detected in three assays out of three by RT-
291 dPCR but only in one assay out of three by RT-qPCR. Inversely, the lowest dose of NoV GII was always detected
292 in three assays out of three by RT-qPCR but only in one assay out of three and two assays out of three by RT-
293 dPCR (under the quantification limit) when MNV-1 and Mengovirus were used, respectively.

294 All the samples inoculated with the lowest quantities of HAV and NoV GII tested negative with 10-fold diluted
295 RNA extracts. Most of the samples inoculated with the lowest quantities of NoV GI were found positive with
296 10-fold diluted RNA extracts except for one assay out of three using MNV-1 and RT-qPCR and one assay out of
297 three using Mengovirus and RT-dPCR. Independently of the process control, the viral target and the virus
298 inoculation level used, the recovery rates obtained by testing 10-fold diluted positive RNA extracts were over
299 13.52 % by RT-qPCR and over 36.67 % by RT-dPCR (Table 2 A).

300

301 3.2.2 Lettuce

302 In spiked lettuce samples, NoV GI, NoV GII and HAV were commonly detected when testing pure RNA extracts
303 except the lowest dose of NoV GII which was not detected by RT-dPCR, regardless of the process control used.
304 Independently of the process control, the viral target and the virus inoculation level used, the recovery rates
305 were over 0.43 % by RT-qPCR and 0.02 % by RT-dPCR.

306 All the samples inoculated with NoV GI were found positive whatever the detection method. When MNV-1 was
307 used, two assays out of three were positive by RT-qPCR and by RT-dPCR with the lowest doses of HAV. The
308 intermediate dose of NoV GII was positive in three assays out of three by RT-qPCR but in two assays out of
309 three by RT-dPCR. The lowest dose of NoV GII was only detected by RT-qPCR in two assays out of three. When
310 Mengovirus was used, the lowest dose of HAV was always detected but the intermediate dose of HAV was
311 detected in two assays out of three by RT-dPCR vs three assays out of three by RT-qPCR. The lowest dose of
312 NoV GII was only detected by RT-qPCR in two assays out of three.

313

314 Independently of the process control, the viral target and the virus inoculation level used, the recovery rates
315 obtained by testing 10-fold diluted RNA extracts were over 3.17 % by RT-qPCR and 9.32 % by RT-dPCR. The
316 samples inoculated with the lowest quantities of HAV were found positive with 10-fold diluted RNA extracts
317 except for one assay out of three when using Mengovirus and RT-qPCR. All the samples inoculated with NoV GI
318 were found positive with 10-fold diluted RNA extracts whatever the detection method. All the samples
319 inoculated with the lowest quantities of NoV GII were found negative with 10-fold diluted RNA extracts. The
320 samples inoculated with the intermediate quantities of NoV GII were found positive with 10-fold diluted RNA
321 extracts except for one assay out of three when using Mengovirus regardless of the detection method used
322 (RT-dPCR or RT-qPCR).

323

324 After ten-fold dilution of RNA extracts some samples were found positive whereas they tested negative when
325 pure RNA was tested (with the lowest dose of HAV plus MNV-1 detected by RT-qPCR and RT-dPCR and with the
326 intermediate dose of NoV GII plus MNV-1 detected by RT-dPCR). Conversely, some 10-fold diluted RNA extracts
327 were found negative although pure RNA extracts were positive (with the lowest dose of HAV plus Mengovirus
328 detected by RT-qPCR, with the intermediate dose of NoV GII plus Mengovirus whatever the used detection
329 method (RT-dPCR or RT-qPCR) and with the lowest dose of NoV GII detected by RT-qPCR regardless process
330 controls used). These data confirmed the necessity of testing pure and diluted RNA extracts (Table 2 B).

331

332 **3. 3. Quality controls and interpretation of results**

333 **3.3. 1- Process Controls**

334 To verify that sample processing had worked correctly (sample treatment and nucleic acid isolation), a process
335 control (MNV-1 or Mengovirus) was added prior to treating the bottled water and lettuce (Table 3).

336 The MNV-1 recovery rates obtained by testing pure RNA extracts from bottled water and lettuce were
337 respectively higher than 51.20 % and 0.89% by RT-qPCR and higher than 12.20 % and 0.32 % by RT-dPCR.

338 Regardless of the detection methods used (RT-qPCR or RT-dPCR), the recovery rates for MNV-1 ranged from
339 51.46 % to 67.60 % in bottled water samples and ranged from 6.59 % to 18.02 % in lettuce samples when
340 testing 10-fold diluted RNA extracts.

341 The Mengovirus recovery rates obtained by testing pure RNA extracts from bottled water and lettuce were
342 respectively higher than 48.75 % and 3.58% by RT-qPCR and higher than 76.10 % and 0.36 % by RT-dPCR.

343 Regardless of the detection methods used (RT-qPCR or RT-dPCR), the recovery rates for Mengovirus ranged
344 from 57.83 % to 68.81 % in bottled water samples and ranged from 22.07 % to 44.02 % in lettuce samples
345 when testing 10-fold diluted RNA extracts.

346

347 In lettuce with the RT-dPCR method, multiway analysis of variance revealed significantly higher recovery rates
348 of both process controls for 10-fold diluted samples ($p < 0.001$). In bottled water with the RT-dPCR method,
349 multi-way analysis of variance revealed significantly higher MNV-1 recovery rates for 10-fold diluted samples
350 ($p < 0.001$) and Mengovirus recovery rates for undiluted samples ($p = 0.03$).

351 With the RT-dPCR method, the type of inoculated virus (regardless of HAV, NoV GI or NoV GII) had no effect on
352 recovery rates of both process controls ($p = 0.54$). Moreover Mengovirus was found to have higher recovery
353 rates ($p < 0.001$) than MNV-1 in both lettuce and bottled water samples.

354 With RT-qPCR detection, the same conclusions with regard to the effect of these different factors on the
355 recovery rates of both process controls in lettuce were obtained, i.e. Mengovirus with higher recovery rates,
356 influence of dilution ($p < 0.001$) and no effect of the nature of the inoculated virus. Recovery rates in bottled
357 water with the RT-qPCR method were the same for both process control viruses and their recovery rates were
358 not affected by dilution or by the type of inoculated virus.

359

360 **3.3. 2- External amplification control (EAC)**

361 The implementation of an external amplification control (EAC) corresponding to each viral target was used to
362 examine RT-qPCR and RT-dPCR inhibition (Table 4).

363 EAC recovery rates in pure and 10-fold diluted RNA extracted from bottled water samples were over 30.25 %
364 with RT-qPCR and over 73.44 % with RT-dPCR.

365 EAC recovery rates in RNA extracted from lettuce samples were always higher when testing 10-fold diluted RNA
366 regardless of the viral target using RT-qPCR and RT-dPCR. Nevertheless, they were higher with RT-dPCR, except
367 for NoV GII and MNV-1 with pure RNA and MNV-1 with 10-fold diluted RNA.

368 By taking into account the EAC yield ($> 25\%$) indicated in the ISO / TS standards (ISO/TS 15216-1., 2013; ISO/TS
369 15216-2., 2013) data obtained with bottled water are systematically valid whatever the detection method.
370 Conversely, only lettuce analyzed by testing 10-fold diluted RNA should be considered as systematically valid by
371 RT-dPCR and sometimes valid by RT-qPCR (NoV GII and MNV-1).

372 3. 4. Statistical analysis of viral recovery rates obtained by RT-dPCR and RT-qPCR

373 Multiway analysis of variance helps to determine if the two RT-PCR quantification methods performed equally
374 in bottled water and lettuce samples for the five different viruses tested, i.e. the two process control viruses
375 and the three inoculated viruses. The effect of quantification was estimated along with other factors (dilution,
376 reproducibility, spiking level for pathogenic viruses, type of process control, and type of human pathogenic
377 virus). Figure 1 illustrates the difference between the two methods. RT-dPCR and RT-qPCR were found to be
378 equivalent for NoV GII and MNV-1 in water and NoV GI, Mengovirus and MNV-1 in lettuce. Higher recovery
379 rates were obtained with RT-dPCR for HAV, NoV GI and Mengovirus in water and for NoV GII and HAV in
380 lettuce.

381

382

383 4- Discussion

384 Enteric viruses are the leading cause of foodborne outbreaks. Norovirus are major human agents of diarrhoea
385 worldwide. HAV may be a relatively rare contaminant in food samples in non-endemic areas, but the disease is
386 severe and the consequences of an outbreak can be dramatic. Human health risk associated with the
387 consumption of contaminated food and the low levels of the virus generally found in food samples have led to
388 the development of Technical Specifications for the detection of Norovirus and HAV in foodstuffs using RT-
389 qPCR (ISO/TS 15216-1., 2013; ISO/TS 15216-2., 2013; Lees and CEN WG6 TAG4, 2010). The matrix extraction
390 procedure is a crucial point and the methods include the use of process controls to determine the level of
391 acceptability of recovery efficiency of the whole process and the use of an external amplification control (EAC)
392 to examine RT-qPCR inhibition. Recently, important applications of digital PCR have been described for the
393 fields clinical virology and oncology for the detection of rare mutants. Digital PCR is a promising novel
394 technology for viral load quantification and recently it has also been used for rotavirus quantification in
395 different types of surface water (Rački et al., 2014). This genomic quantification approach does not require
396 calibrated standards (DNA, RNA) leading to a potential simplification of quantitative molecular diagnosis in
397 food virology. In this study we explored an absolute quantification approach based on microfluidic digital RT-
398 PCR to quantify the presence of viral genomes in lettuce and water.

399 The data obtained showed that RT-dPCR was generally comparable in terms of sensitivity to traditional RT-
400 qPCR methods for both human enteric viruses (NoV GI, NoV GII, HAV) and control process viruses (MNV-1,

401 Mengovirus). The TaqMan-based chemistry used in conventional RT-PCR assays was used in identical PCR
402 conditions when applied to microfluidic RT-dPCR, which was important for more effectively comparing the two
403 methods. The numbers of genomic copies determined by RT-dPCR did not match perfectly with those
404 determined by RT-qPCR. When using RT-dPCR, the genome copies estimates were always slightly lower than
405 the expected with RT-qPCR. One potential cause of discrepancy between relative and absolute quantification
406 could be errors introduced by spectrophotometric determination of the nucleic acid concentration leading to
407 an overestimation of the copy genome number of the standards (Henrich et al., 2012; Sanders et al., 2013).
408 Moreover, digital RT-PCR may provide more accurate measurements than RT-qPCR as it is not dependent on
409 amplification efficiency. Given this fact, it was not surprising to observe some differences between the two
410 approaches when comparing their potential for quantifying HAV and noroviruses in spiked bottled water and
411 lettuce samples. Two main steps are required for the detection of viruses in food: viral extraction procedure
412 and viral RNA detection by real-time RT-PCR. In both steps, the inclusion of quality controls (a process control
413 and an EAC control) is mandatory to correctly interpret assay results.

414 In this study, two process controls (Mengovirus and MNV-1) were used to monitor the viral extraction
415 procedure without affecting viral human pathogen recovery. Based on the ISO/TS 15216 standard, samples are
416 considered valid for analysis when recovery of the process control was higher than 1%, which is rare without
417 RNA dilution in lettuce samples. Ideally, a satisfactory process control should be extracted in a similar way and
418 with comparable efficiency as the viral target. Indeed, to ensure viral diagnostic validation, it would be more
419 convenient to select a process control showing a recovery less than or equal to that of the human viral
420 pathogens. Data suggested that in water, Mengovirus or MNV-1 seemed appropriate for the diagnostic
421 validation of all three viruses (HAV, NoV GI and NoV GII) regardless of the RT-PCR method used, except for
422 Mengovirus for the detection of NoV GI using RT-qPCR, as its recovery was only slightly above those of NoV GI.
423 In lettuce, MNV-1 seemed to be the most relevant process control for the diagnostic validation by RT-qPCR and
424 RT-dPCR because it is convenient for the three pathogenic viruses. Alternatively, Mengovirus could also be
425 used in lettuce for detecting NoV GI and NoV GII by RT-dPCR.

426 Even if it is easier to use the same process control virus for assessing the detection of whole viruses, the choice
427 of this control is crucial for diagnostic validation and studies showing comparison data obtained with the most
428 common process controls are useful to consolidate their use according to the type of samples.

429 Differences in viral recoveries are usually observed and may be the result of the type of food matrix, drying
430 conditions, viral strain, sample size or debris such as soil particles. The highest viral recoveries were obtained
431 from bottled water. Recovery efficiencies from lettuce samples reported in the present study are comparable
432 to those determined by other studies (Brassard et al. 2011; Coudray et al., 2013; Kim et al., 2009; Summa et al.,
433 2012). Viral recoveries calculated by RT-dPCR were found significantly higher than by RT-qPCR for Nov GI, HAV
434 and Mengovirus in water, and for Nov GII and HAV in lettuce samples. Also, RT-dPCR was found to be more
435 robust in the presence of PCR inhibitors than RT-qPCR, which led us to validate all the analyses performed in
436 lettuce samples. Indeed, digital PCR may usually offer an advantage over qPCR when dealing with inhibition-
437 prone samples because individual micro-reactions mitigate the impact of inhibitors as previously described by
438 Dingle et al. (2013), Morisset et al. (2013) and Rački et al. (2014). Moreover, the price per sample for the viral
439 quantification was estimated twice cheaper by using the RT-dPCR than the RT-qPCR.

440

441 In conclusion, this study showed a novel application of microfluidic RT-dPCR and demonstrates the strong
442 potential for rapid, sensitive and accurate quantification of viral loads in bottled water and lettuce samples.
443 Further comparisons of microfluidic RT-dPCR with the current reference procedures are needed to more
444 effectively evaluate the possibility of using this absolute quantification approach to routinely monitor enteric
445 viruses in various food samples.

446

447 **Acknowledgements**

448 The authors would like to thank Pierre Maris for providing the MNV-1 stock, Albert Bosch for providing the
449 Mengovirus stock, and Pierre Pothier for providing the norovirus samples, as well as the members of the
450 working group of the European Committee for Standardization (CEN/TC275/WG6/TAG4 "Detection of viruses in
451 food") for their helpful advice. We also thank Jordan Moore for his technical assistance on the Biomark
452 (Fluidigm). This work is part of the thesis by Coralie Coudray-Meunier, a PhD student who received financial
453 support from ANSES.

454

455

456

457

458 **References**

- 459 Atmar, RL., Estes, MK., 2001. Diagnosis of noncultivable gastroenteritis viruses, the human caliciviruses. *Clinical*
460 *Microbiology Reviews* 14, 15-37.
- 461 Bhat, S., Herrmann, J., Armishaw, P., Corbisier, P., Emslie, K.R., 2009. Single molecule detection in nanofluidic digital array
462 enables accurate measurement of DNA copy number. *Analytical and bioanalytical chemistry* 394, 457-467.
- 463 Bustin, SA., Nolan, T., 2004. Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. *Journal of*
464 *Biomolecular Techniques* 15, 155–166.
- 465 Brassard, J., Guévremont, É., Gagné, M. J., Lamoureux, L., 2011. Simultaneous recovery of bacteria and viruses from
466 contaminated water and spinach by a filtration method. *International Journal of Food Microbiology* 144, 565-568.
- 467 Cannon, J.L., Papafragkou, E., Park, G.W., Osborne, J., Jaykus, L.A., Vinjé, J., 2006. Surrogates for the study of norovirus
468 stability and inactivation in the environment: a comparison of murine norovirus and feline calicivirus. *Journal of*
469 *Food Protection* 69, 2761-2765.
- 470 Costafreda, M.I., Bosch, A., Pinto, R.M., 2006. Development, evaluation and standardization of a real time TaqMan reverse
471 transcription-PCR assay for quantification of hepatitis A virus in clinical and shellfish samples. *Applied and*
472 *Environmental Microbiology* 72, 3846-3855.
- 473 Coudray, C., Merle, G., Martin-Latil, S., Guillier, L., Perelle, S., 2013. Comparison of two extraction methods for the
474 detection of hepatitis A virus in lettuces using the murine norovirus as a process control. *Journal of Virological*
475 *Methods* 193, 96-102.
- 476 Cromeans, T., Sobsey, M. D., Fields, H. A., 1987. Development of a plaque assay for a cytopathic, rapidly replicating isolate
477 of hepatitis A virus. *Journal of Medical Virology* 22, 45-56.
- 478 Dingle, TC., Sedlak, RH., Cook, L., Jerome, KR., 2013. Tolerance of droplet-digital PCR vs real-time quantitative PCR to
479 inhibitory substances. *Clinical Chemistry* 59, 1670-1672.
- 480 Dube, S., Qin, J., Ramakrishnan, R., 2008. Mathematical analysis of copy number variation in a DNA sample using digital PCR
481 on a nanofluidic device. *PLoS One* 3(8):e2876.
- 482 Hennechart-Collette, C., Martin-Latil, S., Guillier, L., Perelle, S., 2014. Multiplex real-time RT-qPCR for the detection of
483 Norovirus in bottled and tap water using murine norovirus as a process control. *Journal of Applied Microbiology*.
484 116, 179-190.
- 485 Henrich, TJ., Gallien, S., Li, JZ., Pereyra, F., Kuritzkes, DR., 2012. Low-level detection and quantitation of cellular HIV-1 DNA
486 and 2-LTR circles using droplet digital PCR. *Journal of Virological Methods* 186, 68-72.
- 487 ISO/TS 15216-1, 2013. Microbiology of food and animal feed -- Horizontal method for determination of hepatitis A virus and
488 norovirus in food using real-time RT-PCR -- Part 1: Method for quantification. International Organization for
489 Standardization, Geneva, Switzerland.

- 490 ISO/TS 15216-2, 2013. Microbiology of food and animal feed -- Horizontal method for determination of hepatitis A virus and
491 norovirus in food using real-time RT-PCR -- Part 2: Method for qualitative detection. International Organization for
492 Standardization, Geneva, Switzerland.
- 493 Kim, H. Y., Park, H. J., Ko, G., 2009. Hollow-fiber ultrafiltration for the concentration and simultaneous recovery of multiple
494 pathogens in contaminated foods. *Journal of Food Protection* 72, 2547-2552
- 495 Koo, HL., Ajami, N., Atmar, RL., DuPont, HL 2010. Noroviruses: The leading cause of gastroenteritis worldwide. *Discovery*
496 *medicine* 10, 61-70.
- 497 Kotwal, G., Cannon, JL., 2014. Environmental persistence and transfer of enteric viruses. *Current opinion in virology* 4C, 37-
498 43.
- 499 Le Guyader, F. S., Parnaudeau, S., Schaeffer, J., Bosch, A., Loisy, F., Pommepuy, M., Atmar, R. L., 2009. Detection and
500 quantification of norovirus in shellfish. *Applied and Environmental Microbiology* 75, 618-624.
- 501 Lemon, S. M., Murphy, P. C., Shields, P. A., Ping, L. H., Feinstone, S. M., Cromeans, T., Jansen, R. W., 1991. Antigenic and
502 genetic variation in cytopathic hepatitis A virus variants arising during persistent infection: evidence for genetic
503 recombination. *Journal of Virology* 65, 2056-2065.
- 504 Lees, D., CEN WG6 TAG4., 2010. International standardization of a method for detection of human pathogenic viruses in
505 molluscan shellfish. *Food Environmental Virology* 2, 146-155.
- 506 Martin-Latil, S., Hennechart Collette, C., Guillier, L., Perelle, S., 2012a. Comparison of two extraction methods for the
507 detection of hepatitis A virus in semi-dried tomatoes and murine norovirus as a process control by duplex RT-qPCR.
508 *Food Microbiology* 31, 246-253.
- 509 Martin-Latil, S., Hennechart Collette, C., Guillier, L., Perelle, S., 2012b. Duplex RT-qPCR for the detection of hepatitis E virus
510 in water, using a process control. *International Journal of Food Microbiology* 157, 167-73.
- 511 Martin-Latil, S., Hennechart-Collette, C., Guillier, L., Perelle, S., 2014. Method for HEV detection in raw pig liver products
512 and its implementation for naturally contaminated food. *International Journal of Food Microbiology* 176, 1-8.
- 513 Matthews, JE., Dickey, BW., Miller, RD., Felzer, JR., Dawson, BP., Lee, AS., Rocks, JJ., Kiel, J., Montes, JS., Moe, CL.,
514 Eisenberg, JN., Leon, JS., 2012. The epidemiology of published norovirus outbreaks: a review of risk factors
515 associated with attack rate and genogroup. *Epidemiology and infection* 140, 1161-1172.
- 516 Morisset, D., Štebih, D., Milavec, M., Gruden, K., Žel, J., 2013. Quantitative analysis of food and feed samples with droplet
517 digital PCR. *PLoS One* 8, e62583.
- 518 Nainan, O.V., Xia, G., Vaughan, G., Margolis, H.S., 2006. Diagnosis of hepatitis a virus infection: a molecular approach.
519 *Clinical microbiology reviews* 19, 63-79.

- 520 Perelle, S., Cavellini, L., Burger, C., Blaise-Boisseau, S., Hennechart-Collette, C., Merle, G., Fach, P., 2009. Use of a robotic
 521 RNA purification protocol based on the NucliSens® easyMAG™ for real-time RT-PCR detection of hepatitis A virus in
 522 bottled water. *Journal of Virological Methods* 157, 80-83.
- 523 Pinheiro, LB., Coleman, VA., Hindson, CM., Herrmann, J., Hindson, BJ., Bhat, S., Emslie, KR., 2012. Evaluation of a droplet
 524 digital polymerase chain reaction format for DNA copy number quantification. *Analytical Chemistry* 84, 1003-1011.
- 525 Rački, N., Morisset, D., Gutierrez-Aguirre, I., Ravnikar, M., 2014. One-step RT-droplet digital PCR: a breakthrough in the
 526 quantification of waterborne RNA viruses. *Analytical and bioanalytical chemistry* 406, 661-667.
- 527 Sánchez, G., Bosch, A., Pintó, R. M., 2007. Hepatitis A virus detection in food: current and future prospects. *Letters in*
 528 *Applied Microbiology* 45, 1-5.
- 529 Sanders R, Mason DJ, Foy CA, Huggett JF., 2013. Evaluation of digital PCR for absolute RNA quantification. *PLoS One* 8,
 530 e75296.
- 531 Schultz, A. C., Perelle, S., Di Pasquale, S., Kovac, K., De Medici, D., Fach, P., Sommer, H. M., Hoorfar, J., 2011. Collaborative
 532 validation of a rapid method for efficient virus concentration in bottled water. *International Journal of Food*
 533 *Microbiology* 145, S158-S166.
- 534 Stals, A., Baert, L., De Keuckelaere, A., Van Coillie, E. and Uyttendaele, M., 2011a. Evaluation of a norovirus detection
 535 methodology for ready-to-eat foods. *International Journal of Food Microbiology* 145, 420-425.
- 536 Stals, A., Baert, L., Van Coillie, E. and Uyttendaele, M., 2011b. Evaluation of a norovirus detection methodology for soft red
 537 fruits. *Food Microbiology* 28, 52-58.
- 538 Summa, M., von Bonsdorff, C. H., Maunula, L., 2012. Evaluation of four virus recovery methods for detecting noroviruses on
 539 fresh lettuce, sliced ham, and frozen raspberries. *Journal of Virological Methods* 183, 154-160.
- 540 Uhrbrand, K., Myrmel, M., Maunula, L., Vainio, K., Trebbien, R., Nørrung, B., Schultz, AC., 2010. Evaluation of a rapid
 541 method for recovery of norovirus and hepatitis A virus from oysters and blue mussels. *Journal of Virological*
 542 *Methods* 169, 70-78.
- 543 Vaughan, G., Goncalves Rossi, L.M., Forbi, J.C., de Paula, V.S., Purdy, M.A., Xia, G., Khudyakov, Y.E., 2014. Hepatitis A virus:
 544 Host interactions, molecular epidemiology and evolution. *Infection, genetics and evolution* 21C, 227-243.
- 545 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.,
 546 Virgin, H. W., 2004. Replication of Norovirus in cell culture reveals a tropism for dendritic cells and macrophages.
 547 *PLoS Biology* 2, e432.
- 548 Wobus, C. E., Thackray, L. B., Virgin, H.W., 2006. Murine norovirus: a model system to study norovirus biology and
 549 pathogenesis. *Journal of Virology* 80, 5104-5112.
- 550
- 551

552 **Legends:**

553 **Table 1:** Sensitivity of the DNA or RNA of Hepatitis A virus (HAV), Norovirus genogroups I and II (NoV GI and
554 NoV GII), Murine Norovirus (MNV-1) or Mengovirus by RT-qPCR and RT-dPCR. Results are expressed as genome
555 copies, calculated by OD or by RT-dPCR. The number of genomic copies measured by RT-dPCR within 0.38 μ L of
556 RNA/ DNA effectively loaded in the digital plate was multiplied by 15.26 to obtain the genomic copy number
557 within 5.8 μ L of nucleic acid extract mixed with the master mix. Thus, for each sample, the number of genomic
558 copy determined by OD and analysed by RT-qPCR were compared with the number of genomic copy
559 determined by RT-dPCR. All experiments were performed three times in duplicate and the mean of the two
560 replicates was used for each reproducibility experiment.

561

562 **Table 2:** Mean percentage recovery calculated for three inoculum levels (expressed as genome copies) of HAV,
563 NoV GI or NoV GII in presence of MNV-1 or Mengovirus in bottled water (2A) and in lettuce (2B) with RT-qPCR
564 and RT-dPCR. The mean of the two replicates was used for each reproducibility experiment. Results are
565 expressed as means \pm SEM (standard error of the mean). For each inoculation level, three experiments were
566 performed and undiluted and 10-fold diluted RNA extracts were tested twice for each sample type. One out of
567 two positive determinations in one experiment set was considered as a positive assay. ND: not detected. <LOD:
568 detected but not quantified

569

570 **Table 3:** Mean percentage recovery calculated for MNV-1 or Mengovirus for the three inoculum levels
571 (expressed as genome copies) of HAV, NoV GI or NoV GII in bottled water or in lettuce with RT-qPCR and RT-
572 dPCR. The mean of the two replicates was used for each reproducibility experiment. Results are expressed as
573 means \pm SEM (standard error of the mean). For each inoculation level, three experiments were performed and
574 undiluted and 10-fold diluted RNA extracts were tested twice for each sample type. One out of two positive
575 determinations in one experiment set was considered as a positive assay.

576

577 **Table 4:** Mean percentage recovery calculated for the external amplification control (EAC) for HAV, NoV GI,
578 NoV GII, MNV-1 and Mengovirus with RT-qPCR and RT-dPCR. The mean of the two replicates was used for each
579 reproducibility experiment. Results are expressed as means \pm SEM (standard error of the mean). For each viral
580 target, three experiments were performed and pure and 10-fold diluted RNA extracts were tested twice for

581 each sample type. One out of two positive determinations in one experiment set was considered as a positive
582 assay.

583

584 **Figure 1:** Population marginal means with standard error of extraction yields using RT-qPCR and RT-dPCR for
585 HAV, NoV GI, NoV GII, MNV-1 and Mengovirus, in bottled water or in lettuce. Two means are significantly
586 different if their intervals are disjoint and are not significantly different if their intervals overlap.

587

588

589

590

591

592

593

594

595

596

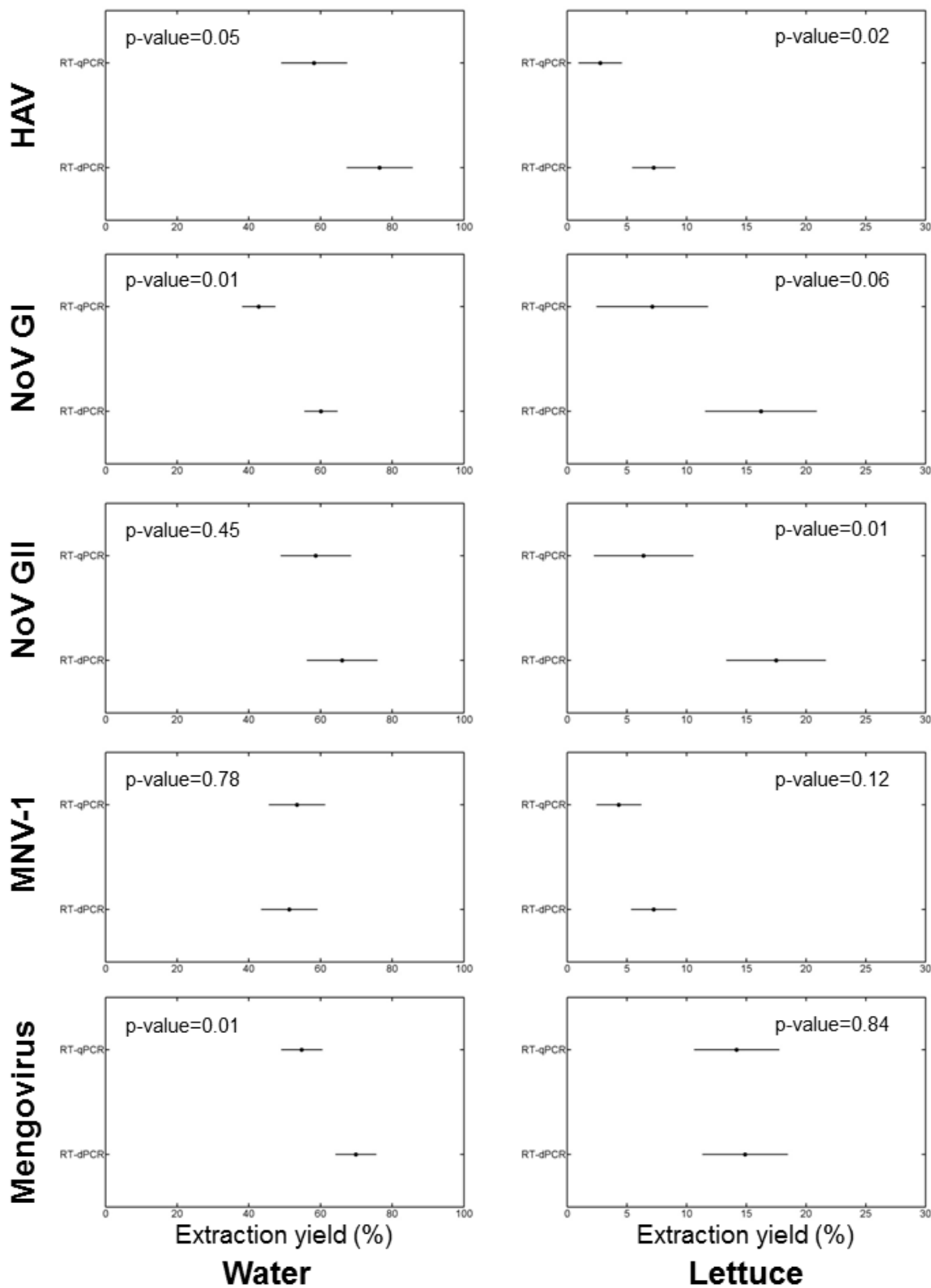
597

598

599

600

601



602
603
604
605

Figure 1

Copy number of DNA/ RNA extracts by OD and added to master mix in RT- qPCR or RT-dPCR	HAV				NoV GI				NoV GII				MNV-1		Mengovirus	
	DNA		RNA		DNA		RNA		DNA		RT-qPCR		DNA		RNA	
	RT- qPCR	RT-dPCR	RT-qPCR	RT-dPCR	RT-qPCR	RT-dPCR	RT-qPCR	RT-dPCR	RT-qPCR	RT-dPCR	RT-qPCR	RT-dPCR	RT-qPCR	RT-dPCR	RT-qPCR	RT-dPCR
5E+05	3/3	2.61E+04 (3/3)	3/3	1.40E+04 (3/3)	3/3	5E+05	3/3	2.61E+04 (3/3)	3/3	1.40E+04 (3/3)	3/3	5E+05	3/3	2.61E+04 (3/3)	3/3	1.40E+04 (3/3)
5E+04	3/3	1.25E+04 (3/3)	3/3	1.20E+03 (3/3)	3/3	5E+04	3/3	1.25E+04 (3/3)	3/3	1.20E+03 (3/3)	3/3	5E+04	3/3	1.25E+04 (3/3)	3/3	1.20E+03 (3/3)
5E+03	3/3	6.67E+02 (3/3)	3/3	2.04E+02 (3/3)	3/3	5E+03	3/3	6.67E+02 (3/3)	3/3	2.04E+02 (3/3)	3/3	5E+03	3/3	6.67E+02 (3/3)	3/3	2.04E+02 (3/3)
5E+02	3/3	4.58E+01 (3/3)	3/3	3.05E+01 (2/3)	3/3	5E+02	3/3	4.58E+01 (3/3)	3/3	3.05E+01 (2/3)	3/3	5E+02	3/3	4.58E+01 (3/3)	3/3	3.05E+01 (2/3)
5E+01	3/3	0/3	0/3	0/3	3/3	5E+01	3/3	0/3	0/3	0/3	3/3	5E+01	3/3	0/3	0/3	0/3
5E+00	1/3	0/3	0/3	0/3	3/3	5E+00	1/3	0/3	0/3	0/3	3/3	5E+00	1/3	0/3	0/3	0/3
5E-01	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	5E-01	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	5E-01	0/3	0/3	0/3	0/3

Table 1 :

		Bottled water							
		Pure RNA				10-fold diluted RNA			
Process control		MNV-1		Mengovirus		MNV-1		Mengovirus	
Inoculated virus		RT-qPCR	RT-dPCR	RT-qPCR	RT-dPCR	RT-qPCR	RT-dPCR	RT-qPCR	RT-dPCR
HAV	9.3E+03	49.85% ± 27.34 (3/3)	72.96% ± 25.22 (3/3)	47.06% ± 17.22 (3/3)	57.06% ± 21.48 (3/3)	67.96% ± 35.80 (3/3)	103.23% ± 27.72 (3/3)	53.14% ± 22.16 (3/3)	74.72% ± 18.09 (3/3)
	9.3E+02	65.66% ± 31.80 (3/3)	55.04% ± 14.73 (3/3)	44.99% ± 19.50 (3/3)	62.18% ± 11.04 (3/3)	90.89% ± 16.31 (3/3)	99.65% ± 30.36 (3/3)	50.90% ± 34.73 (2/3)	87.93% ± 34.16 (3/3)
	9.3E+01	43.95% (1/3)	88.53% ± 29.38 (3/3)	115.38% ± 51.77 (3/3)	60.62% ± 26.84 (3/3)	ND (0/3)	ND (0/3)	ND (0/3)	ND (0/3)
NoV GI	1.0E+05	52.98% ± 9.00 (3/3)	73.43% ± 11.04 (3/3)	30.71% ± 6.83 (3/3)	51.58% ± 7.39 (3/3)	56.18% ± 7.32 (3/3)	84.31% ± 10.11 (3/3)	29.32% ± 8.21 (3/3)	58.00% ± 8.54 (3/3)
	1.0E+04	50.65% ± 7.04 (3/3)	59.01% ± 12.19 (3/3)	27.39% ± 8.38 (3/3)	42.32% ± 10.54 (3/3)	61.15% ± 19.16 (3/3)	75.60% ± 13.68 (3/3)	31.98% ± 12.30 (3/3)	36.67% ± 5.55 (3/3)
	1.0E+03	51.02% ± 25.67 (3/3)	44.63% ± 10.77 (3/3)	19.20% ± 5.48 (3/3)	41.73% ± 18.07 (3/3)	67.09% ± 72.86 (2/3)	97.01% ± 8.38 (3/3)	13.52% ± 5.94 (3/3)	86.39% ± 5.42 (2/3)
NoV GII	1.6E+04	50.48% ± 13.65 (3/3)	49.24% ± 14.58 (3/3)	26.39% ± 5.77 (3/3)	60.65% ± 6.97 (3/3)	56.83% ± 18.29 (3/3)	57.10% ± 22.37 (3/3)	47.55% ± 19.40 (3/3)	82.92% ± 14.09 (3/3)
	1.6E+03	61.41% ± 32.38 (3/3)	42.35% ± 18.77 (3/3)	21.64% ± 14.67 (3/3)	57.49% ± 15.76 (3/3)	127.08% ± 38.21 (3/3)	139.24% (1/3) ; <LOD (2/3)	72.35% ± 20.63 (3/3)	71.18% ± 2.34 (3/3)
	1.6E+02	101.90% ± 28.38 (3/3)	<LOD (1/3)	108.36% ± 24.13 (3/3)	73.53% (1/3); <LOD (2/3)	ND (0/3)	ND (0/3)	ND (0/3)	ND (0/3)

Table 2A

		Lettuce							
		Pure RNA				10-fold diluted RNA			
Process control		MNV-1		Mengo Virus		MNV-1		Mengovirus	
Inoculated virus		RT-qPCR	RT-dPCR	RT-qPCR	RT-dPCR	RT-qPCR	RT-dPCR	RT-qPCR	RT-dPCR
HAV	9.3E+05	0.69% ± 0.33 (3/3)	0.53% ± 0.23 (3/3)	0.45% ± 0.14 (3/3)	0.02% ± 0.01 (3/3)	4.20% ± 1.88 (3/3)	9.32% ± 4.53 (3/3)	3.33% ± 1.13 (3/3)	11.77% ± 1.54 (3/3)
	9.3E+04	0.48% ± 0.10 (3/3)	1.41% ± 0.59 (3/3)	1.94% ± 1.22 (3/3)	1.38% ± 1.17 (2/3)	3.96% ± 1.02 (3/3)	16.79% ± 6.44 (3/3)	7.55% ± 3.52 (3/3)	17.76% ± 10.22 (3/3)
	9.3E+03	0.67% ± 0.09 (2/3)	2.40% ± 1.17 (2/3)	3.42% ± 3.19 (3/3)	3.17% ± 0.46 (3/3)	17.15% ± 11.06 (3/3)	15.01% ± 2.94 (3/3)	9.75% ± 5.85 (2/3)	19.58% ± 9.47 (3/3)
NoV GI	1.0E+06	3.28% ± 1.74 (3/3)	22.19% ± 23.39 (3/3)	0.43% ± 0.29 (3/3)	1.69% ± 1.13 (3/3)	17.33% ± 3.54 (3/3)	25.73% ± 11.84 (3/3)	4.72% ± 2.47 (3/3)	23.98% ± 2.90 (3/3)
	1.0E+05	5.10% ± 3.69 (3/3)	0.57% ± 0.38 (3/3)	0.56% ± 0.40 (3/3)	1.84% ± 1.00 (3/3)	21.45% ± 10.83 (3/3)	22.12% ± 7.57 (3/3)	4.14% ± 0.31 (3/3)	23.35% ± 8.01 (3/3)
	1.0E+04	1.37% ± 0.38 (3/3)	1.67% ± 1.09 (3/3)	1.03% ± 0.52 (3/3)	2.98% ± 2.00 (3/3)	13.02% ± 5.46 (3/3)	25.96% ± 13.04 (3/3)	3.17% ± 1.58 (3/3)	28.76% ± 6.75 (3/3)
NoV GII	1.6E+05	1.46% ± 0.40 (3/3)	1.79% ± 0.92 (3/3)	2.48% ± 0.98 (3/3)	6.41% ± 4.19 (3/3)	10.17% ± 1.67 (3/3)	25.52% ± 9.19 (3/3)	8.70% ± 3.82 (3/3)	17.74% ± 4.24 (3/3)
	1.6E+04	2.99% ± 1.66 (3/3)	3.39% ± 1.63 (2/3)	2.11% ± 1.49 (3/3)	15.96% ± 10.01 (3/3)	13.57% ± 5.40 (3/3)	36.22% ± 29.06 (3/3)	7.75% ± 5.06 (2/3)	38.85% ± 9.49 (2/3)
	1.6E+03	9.88% ± 1.64 (2/3)	ND (0/3)	9.17% ± 2.27 (2/3)	ND (0/3)	ND (0/3)	ND (0/3)	ND (0/3)	ND (0/3)

Table 2B

Process control	HAV, NoV GI, NoV GII inoculum	Bottled water				Lettuce			
		Pure RNA		10-fold diluted RNA		Pure RNA		10-fold diluted RNA	
		RT-qPCR	RT-dPCR	RT-qPCR	RT-dPCR	RT-qPCR	RT-dPCR	RT-qPCR	RT-dPCR
MNV-1	High inoculum	51.50% ± 8.30 (9/9)	14.04% ± 0.76 (9/9)	53.48% ± 9.29 (9/9)	64.75% ± 6.69 (9/9)	0.91% ± 0.31 (9/9)	0.32% ± 0.12 (9/9)	7.05% ± 1.16 (9/9)	18.02% ± 6.01 (9/9)
	Middle inoculum	51.20% ± 10.32 (9/9)	12.42% (1/9) ; <LOD (8/9)	58.66% ± 12.74 (9/9)	67.60% ± 7.32 (9/9)	1.25% ± 0.48 (9/9)	0.54% ± 0.30 (9/9)	8.08% ± 2.43 (9/9)	10.03% ± 3.09 (9/9)
	Low inoculum	58.71% ± 5.52 (9/9)	12.20% (2/9) ; <LOD (7/9)	57.31% ± 5.44 (9/9)	51.46% ± 7.73 (9/9)	0.89% ± 0.27 (9/9)	0.66% ± 0.26 (9/9)	6.59% ± 1.47 (9/9)	13.47% ± 3.87 (9/9)
Mengovirus	High inoculum	48.75% ± 8.77 (9/9)	78.94% ± 8.75 (9/9)	58.00% ± 11.60 (9/9)	64.00% ± 10.76 (9/9)	3.69% ± 0.79 (9/9)	0.98% ± 0.43 (9/9)	24.71% ± 3.36 (9/9)	32.39% ± 11.50 (9/9)
	Middle inoculum	52.42% ± 9.48 (9/9)	76.10% ± 8.88 (9/9)	57.83% ± 8.80 (9/9)	59.41% ± 5.88 (9/9)	3.58% ± 0.73 (9/9)	0.36% ± 0.11 (9/9)	23.00% ± 4.60 (9/9)	22.07% ± 6.46 (9/9)
	Low inoculum	50.93% ± 4.90 (9/9)	80.92% ± 8.94 (9/9)	68.19% ± 13.72 (9/9)	68.81% ± 12.32 (9/9)	4.96% ± 1.01 (9/9)	1.62% ± 1.22 (9/9)	36.99% ± 6.88 (9/9)	44.02% ± 8.80 (9/9)

Table 3

Samples	EAC	Pure RNA		10-fold diluted RNA	
		RT-qPCR	RT-dPCR	RT-qPCR	RT-dPCR
Bottled water	HAV	75.48% ± 16.19	95.29% ± 14.37	86.99% ± 4.15	75.78% ± 12.33
	NoV GI	52.75% ± 5.21	87.34% ± 19.43	62.05% ± 11.48	88.10% ± 13.65
	NoV GII	94.29% ± 20.33	81.96% ± 16.50	116.88% ± 9.64	88.82% ± 10.25
	MNV-1	30.25% ± 11.50	100.07% ± 8.15	82.75% ± 12.45	99.49% ± 39.85
	Mengovirus	51.94% ± 26.67	103.56% ± 24.14	91.33% ± 29.24	73.44% ± 13.86
Lettuce	HAV	0.13% ± 0.01	4.87% ± 3.68	4.84% ± 1.26	80.47% ± 25.35
	NoV GI	0.12% ± 0.05	1.49% ± 1.24	4.45% ± 2.10	61.42% ± 24.30
	NoV GII	10.82% ± 10.61	4.48% ± 1.85	71.20% ± 3.91	75.17% ± 22.57
	MNV-1	7.72% ± 3.62	2.54% ± 2.33	46.05% ± 16.26	35.80% ± 32.13
	Mengovirus	1.81% ± 1.51	1.84% ± 0.99	23.42% ± 1.96	119.13% ± 19.13

Table 4

2-2 Une nouvelle approche de détection des virus entériques grâce à un système de PCR nanofluidique en temps réel à haut débit

2-2-1 Introduction

Les virus entériques humains constituent un sérieux problème de santé publique et sont responsables d'une variété de pathologies aiguës, notamment les gastroentérites aiguës. Les virus entériques sont principalement transmis par voie féco-orale par contact direct de personne à personne ou par l'ingestion d'eau ou d'aliments contaminés, en particulier les coquillages, les fruits et les végétaux (Matthews et al., 2012 ; Nainan et al., 2006 ; Kotwal and Cannon, 2014). Les virus entériques sont excrétés en grande quantité dans les fécès (10^9 à 10^{10} virions/g de selles) et ont une dose infectieuse de l'ordre de 10 à 100 virions. Les virus entériques sont spécifiques d'un hôte et ne sont pas capables de se répliquer dans l'environnement mais ils peuvent survivre pendant une longue période sur les aliments, les surfaces entrant en contact avec des aliments et dans l'eau (souterraine, de surface et potable). Ces caractéristiques permettent aux virus entériques de jouer un rôle significatif dans les épidémies liées à la consommation d'eau ou d'aliments contaminés. Bien que les norovirus soient reconnus comme une cause majeure de TIAC, les virus hépatiques (virus des hépatites A et E) ainsi que les rotavirus sont aussi responsables d'épidémies (Koopmans and Duizer, 2004). D'autres virus de moindre importance épidémiologique sont également capables de transmission *via* l'eau et/ou les aliments, incluant les bocavirus humains, les cosavirus, le parvovirus B19, les picobirnavirus, les sapovirus, le TBEV (Tick-Borne Encephalitis Virus), les aichi virus, les coronavirus humains (229E, HKU1, OC43, NL63), les adénovirus entériques (40, 41), les astrovirus, les enterovirus (dont les coxsackievirus et les echovirus) (Koopmans and Duizer, 2004 ; Vasickova et al., 2005 ; Wilhelmi et al., 2003).

Disposer d'outils pour la détection rapide de ces pathogènes viraux est important pour l'analyse des échantillons cliniques, environnementaux et alimentaires. La détection de ces virus entériques sur la base de leur infectivité est compliquée par l'absence de méthode de culture cellulaire permissive pour la majorité des virus entériques et les faibles quantités de virus contaminants les échantillons environnementaux et alimentaires (Atmar and Estes, 2001; Sánchez et al., 2007). A ce jour, la RT-PCR en temps réel est une des méthodes de

détection de choix en raison de sa sensibilité, sa spécificité et sa rapidité. Récemment, la publication des spécifications techniques ISO/TS 15216-1 et 15216-2 a encadré la détection qualitative et quantitative des norovirus (NoV GI et NoV GII) et du virus de l'hépatite A (VHA) dans les produits alimentaires (Lees, et al., 2010; ISO/TS 15216-1, 15216-2, 2013).

Le but de cette étude est de développer une méthode de RT-PCR en temps réel pour détecter 20 virus entériques et deux virus utilisés habituellement comme contrôles de process (mengovirus et norovirus murin) pour contrôler les rendements de récupération des virus pathogènes à partir des matrices alimentaires. Les limites de détection et de quantification des génomes viraux ont été comparées en utilisant la RT-qPCR en temps réel conventionnelle et la nouvelle approche de digital RT-PCR (système Biomark de Fluidigm). Finalement, tous les génomes viraux ont été détectés en RT-qPCR nanofluidique (détection qualitative, système Biomark de Fluidigm) afin d'évaluer les avantages de cette nouvelle technique pour la détection des virus entériques en termes de spécificité et de sensibilité.

2-2-2 Matériel et méthodes

2-2-2-1 Virus et cellules

La souche de **VHA HM175/18f**, clone B (VR-1402) a été obtenue de l'ATCC (American Type Culture Collection). Ce clone se réplique rapidement et a un effet cytopathique en culture cellulaire (Lemon et al., 1991). Le stock de VHA a été produit à partir de la lignée cellulaire FRhK-4 (foetal rhesus monkey kidney, ATCC, CRL-1688) (Cromeans et al., 1987) et titré par la méthode des plages de lyse (Dubois et al., 2006). Le titre a été établi en copie-génome d'ARN de VHA en RT-qPCR grâce à l'utilisation de courbes de standard d'ARN transcrits *in vitro* en dilutions sériées (voir section 2-2-2-3 Standards ARN et ADN). Basé sur cette approche, le stock de VHA a un titre de $9,33.10^8$ copies-génome/ml.

La souche de **MNV-1** (CW strain) a été fournie au laboratoire de l'ANSES de Fougères (France) par le Dr H. Virgin de l'Université de Washington (USA). Elle se réplique dans la lignée cellulaire RAW (mouse leukaemic monocyte macrophage, RAW 264.7, ATCC TIB-71) (Cannon et al., 2006). Les cellules RAW 264.7 sont cultivées à 37°C dans une atmosphère contenant 5% de CO₂ en milieu Glutamax™ modifié (Dulbecco's modified Eagle's medium

Glutamax™ (DMEM)), 1% d'acides aminés non essentiels, 10% de sérum bovin fœtal HyClone et 0,5% de Pénicilline-streptomycine (Life technologies). Le stock de MNV-1 a été produit comme précédemment décrit (Wobus et al. 2004). Les ARN génomiques extraits ont été vérifiés par RT-qPCR et quantifiés en mesurant l'absorbance à 260/280nm à l'aide d'un Nanodrop ND-1000 (Thermoscientific, Courtaboeuf, France) et le logiciel gratuit en ligne disponible sur le site "<http://endmemo.com/bio/dnacopynum.php>". Basé sur cette approche, le stock de MNV-1 a un titre de $1,36.10^{12}$ copies-génome/ml.

La souche de **mengovirus** (MC₀) a été obtenue à partir d'un surnageant de culture cellulaire clarifié fourni par le Dr Albert Bosch de l'équipe « Virus Entériques » de l'Université de Barcelone (Espagne). Le stock de mengovirus a été produit à partir de la lignée cellulaire HeLa (ATCC, CCL-2™) (Costafreda et al., 2006). Les cellules HeLa sont cultivées à 37°C dans une atmosphère contenant 5% de CO₂ en milieu Glutamax™ essentiel minimum (Minimum Essential Media Glutamax™ (MEM)), 1% d'acides aminés non essentiels, 10% de sérum bovin fœtal et 0,5% de Pénicilline-streptomycine (Life technologies). Les ARN génomiques extraits ont été vérifiés par RT-qPCR et quantifiés en mesurant l'absorbance à 260/280nm à l'aide d'un NanoDrop ND-1000 et le logiciel gratuit en ligne disponible sur le site "<http://endmemo.com/bio/dnacopynum.php>". Basé sur cette approche, le stock de MNV-1 a un titre de $6,68.10^{11}$ copies-génome/ml.

La souche humaine de **rotavirus Wa** a été obtenue de l'institut Pasteur (Paris, France) et se réplique dans la lignée MA-104 (rhesus monkey epithelial cell line, ATCC CRL-2378). Les cellules MA-104 sont cultivées à sous-confluence à 37°C dans une atmosphère contenant 5% de CO₂ en milieu Glutamax™ essentiel minimum (MEM), 1% d'acides aminés non essentiels, 10% de sérum bovin fœtal et 0,5% de Pénicilline-streptomycine (Life technologies). Les cellules infectées ont été congelées et décongelées une fois et ensuite clarifiées par centrifugation à basse vitesse (6000xg) à 4°C pour enlever les débris résiduels. Le surnageant contenant Wa a ensuite été ultracentrifugé à 151 000 x g pendant 1h à 4°C pour obtenir un titre viral concentré. Le culot a été resuspendu dans du PBS (Phosphate Buffered Saline) pour obtenir un stock de Wa contenant 10^5 TCID₅₀/ml. Le stock viral a été aliquoté et conservé à 80°C. Les ARN génomiques extraits ont été vérifiés par RT-qPCR et quantifiés en mesurant l'absorbance à 260/280nm à l'aide d'un NanoDrop ND-1000 et le logiciel gratuit en

ligne disponible sur le site "<http://endmemo.com/bio/dnacopynum.php>". Basé sur cette approche, le stock de rotavirus Wa a un titre de $8,1 \cdot 10^{11}$ copies-génom/ml.

Les quatre souches virales suivantes sont issues de surnageants de culture, deux souches **d'entérovirus**: une souche humaine de coxsackievirus B6, la Souche Schmitt (ATCC® VR-1037AS/MK™), ainsi qu'une souche humaine d'échovirus 19, la Souche Burke, une souche **d'adénovirus** 40 (provenant d'ATCC VR-931), ainsi qu'une souche **d'astrovirus** de génogroupe I.

2-2-2-2 Virus et selles

Les échantillons de selles humaines suivants ont été fournis par le Centre National de Référence (CNR) des Virus Entériques (Dijon, France) : **adénovirus 41** (selles n°E5669), **astrovirus GI** (E4883), **norovirus GI** (E5486 ; E5569 ; E8050), **norovirus GII** (E6929 ; E6618 ; E7859 ; E7022 ; E6992), **rotavirus** (RV G12P8 = E7622 ; RV G1P8 = E8097), **aichi virus** (E6841) et **norovirus GII.13 + norovirus GIV**.

Les échantillons de selles humaines suivants ont été fournis par le Centre national de Référence des Virus de l'Hépatite A et E (Villejuif, France) : **VHA GIA** (selles n°780627147 ; 1181216151), **VHA GIB** (1280210015 ; 1280514230), **VHE G3c** (1280511146), **VHE G3f** (1280418084 ; 1280530128) et **VHE G4** (1280615097 ; 1280522166).

Les échantillons de selles ont été resuspendus dans du PBS 1X à pH 7 pour obtenir une suspension finale à 10% (poids/volume), vortexés puis centrifugés 30 min à 3000 x g à 4°C. Le surnageant a ensuite été aliquoté et conservé à -80°C.

Les ARN/ADN génomiques extraits des adénovirus, des astrovirus et des rotavirus ont été vérifiés par RT-qPCR et quantifiés en mesurant l'absorbance à 260/280nm à l'aide d'un NanoDrop ND-1000 et le logiciel gratuit en ligne disponible sur le site "<http://endmemo.com/bio/dnacopynum.php>".

Les ARN génomiques extraits des norovirus GI, GII et GIV, des sapovirus, des aichi virus, des VHA et des VHE ont été vérifiés et quantifiés par RT-qPCR grâce à l'utilisation de courbes de standard d'ARN transcrits *in vitro* (voir section 2-2-2-3 Standards ARN et ADN).

2-2-2-3 Standards ARN et ADN

Les séquences insérées à partir des souches de référence dans les plasmides recombinants sont indiquées dans le Tableau 13.

Virus	Séquence de référence	Position de la séquence génomique clonée	Plasmide utilisé
Virus de l'hépatite A	M59808.1	39-518	pGEM-T Easy vector
Virus de l'hépatite E	AB097812	5301-5371	pGEM-T Easy vector
Norovirus GI	M87661	5257-5413	pGEM-T Easy vector
Norovirus GII	X86557	4981-5135	pGEM-T Easy vector
Norovirus GIV	JQ613567	4961-5140	pBluescriptIISK
Sapovirus	NC_006269	5051-5200	pBluescriptIISK
Aichi virus	AB040749	241-350	pBluescriptIISK
Picobirnavirus	AB186898	701-860 (segment 2)	pBluescriptIISK
TBEV	U27495	11031-11141	pBluescriptIISK
Parvovirus B19	AB550331	2221-2420	pBluescriptIISK
Cosavirus	NC_012800	701-860	pBluescriptIISK
Bocavirus gt2	NC_012042	2511-2700	pBluescriptIISK
229E	AF304460	25351-25530	pBluescriptIISK
HKU1	HM034837.1	28751-28940	pBluescriptIISK
NL63	JX504050	26191-26380	pBluescriptIISK
OC43	JN129835.1	28791-28940	pBluescriptIISK

Tableau 13 : Construction des plasmides : position de l'insert à partir de la souche de référence et types de plasmides utilisés (pGEM-T Easy vector (Promega, Charbonnières-les-Bains, France), pBluescriptIISK+vector (Genecust, Dudelange, Luxembourg))

Les ADNc de **VHE**, **VHA**, **NoV GI** et **NoV GII** ont été clonés chacun dans un vecteur plasmidique pGEM-T, et répliqués dans *E. coli* One Shot® TOP10F' (Life technologies, Saint Aubin, France). Les plasmides contenant les inserts ont été purifiés grâce au kit Qiagen Plasmid midi kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) en suivant les instructions du fournisseur. Ensuite, le plasmide contenant l'insert de NoV GI a été digéré par l'enzyme de restriction *NCOI* (Life technologies) et les plasmides contenant les inserts de NoV GII, VHA et VHE ont été digérés par l'enzyme de restriction *SpeI* (Life technologies). La transcription des inserts a été réalisée par l'utilisation du kit MEGAscript® kit (Life technologies) en suivant les instructions du fournisseur. Les ARN transcrits nouvellement synthétisés ont été traités à la

Turbo™ DNase (Life technologies) afin d'éliminer tout l'ADN résiduel puis purifiés par le kit MEGAclean™ kit (Life technologies). Les ARN transcrits ont été vérifiés par RT-qPCR et quantifiés en mesurant l'absorbance à 260/280nm à l'aide d'un NanoDrop ND-1000 et le logiciel gratuit en ligne disponible sur le site "<http://endmemo.com/bio/dnacopynum.php>". Les aliquots ont été congelés à -20°C pour leur utilisation future en tant que standards de RT-qPCR.

Les ADNc de **sapovirus, picobirnavirus, TBEV, norovirus GIV, aichi virus, cosavirus, 229E, HKU1, OC43 et NL63** ont été clonés chacun dans un vecteur plasmidique pBluescriptII SK. Tous les plasmides recombinants ont été purifiés par GeneCust et utilisés pour produire des ARN transcrits. Les plasmides (0,5µg) contenant les inserts de sapovirus, TBEV, norovirus GIV, 229E, cosavirus et NL63 ont été digérés par l'enzyme de restriction *EcoRV* (Life technologies), et les plasmides contenant les inserts de picobirnavirus, aichi virus, HKU1 et OC43 ont été digérés par l'enzyme de restriction *SpeI*. Les plasmides digérés ont été transcrits à l'aide du kit MEGAscript® kit) en suivant les instructions du fournisseur. Les ARN transcrits nouvellement synthétisés ont été traités deux fois à la Turbo™ DNase en suivant le protocole du fournisseur afin d'éliminer tout l'ADN résiduel suivant l'étape de transcription, puis purifiés par le kit MEGAclean™ kit (Life technologies). Les ARN transcrits ont été vérifiés par RT-qPCR et quantifiés en mesurant l'absorbance à 260/280nm à l'aide d'un NanoDrop ND-1000 et le logiciel gratuit en ligne disponible sur le site "<http://endmemo.com/bio/dnacopynum.php>". Les aliquots ont été congelés à -20°C pour leur utilisation future en tant que standards de RT-qPCR.

Les ADNc de **bocavirus et parvovirus** ont été clonés chacun dans un vecteur plasmidique pBluescriptII SK. Les deux plasmides recombinants ont été purifiés par GeneCust puis digérés par l'enzyme de restriction *SpeI* pour leur linéarisation. Les ADN synthétisés ont été vérifiés par RT-qPCR et quantifiés en mesurant l'absorbance à 260/280nm à l'aide d'un NanoDrop ND-1000 et le logiciel gratuit en ligne disponible sur le site "<http://endmemo.com/bio/dnacopynum.php>". Les aliquots ont été congelés à -20°C pour leur utilisation future en tant que standards de RT-qPCR.

2-2-2-4 Extraction des acides nucléiques

Les génomes des adénovirus (40 et 41), astrovirus, rotavirus, coxsackievirus B6, echovirus 19, MNV-1, mengovirus, VHA (HM175/18f, VHA GIA et VHA GIB), VHE (VHE G3c, VHE G3G et VHE G4), NoV (GI, GII, GII+GIV), sapovirus et aichi virus ont été extraits grâce à l'appareil NucliSens® easyMAG™ (Biomérieux Marcy l'Etoile, France) en utilisant le protocole « off board Specific A » permettant l'extraction totale des acides nucléiques. Les acides nucléiques ont été élués dans 100µl de tampon d'éluion et conservés à -80°C. Les ADN et ARN extraits ont été vérifiés par RT-qPCR. Les ARN et ADN d'adénovirus 41 et astrovirus provenant de selles, et de rotavirus Wa, MNV-1, mengovirus, coxsackievirus provenant des surnageants de culture cellulaire ont été utilisés comme standards, les autres comme échantillons à tester.

Les ADN et ARN extraits d'adénovirus 41 et astrovirus provenant de selles, et de rotavirus Wa, MNV-1, mengovirus et coxsackievirus B6 ont été quantifiés en mesurant l'absorbance à 260/280nm à l'aide d'un NanoDrop ND-1000 et le logiciel gratuit en ligne disponible sur le site "<http://endmemo.com/bio/dnacopynum.php>". Les ARN extraits de VHA (HM175/18f, VHA GIA et VHA GIB), VHE (VHE G3c, VHE G3G et VHE G4), NoV (GI, GII, GII+GIV), sapovirus, echovirus 19, aichi virus, adénovirus 40 et astrovirus (extrait de surnageant) ont été quantifiés par RT-qPCR grâce à l'utilisation des courbes de standards (ARN transcrits in vitro, ADN plasmidiques, ARN génomiques extraits).

2-2-2-5 Amorces et sondes

Les amorces et sondes utilisées pour détecter tous les virus sont présentées dans le Tableau 14. Les amorces et sondes utilisées pour détecter NoV GI, NoV GII, VHA et mengovirus sont ceux décrits dans les spécifications techniques (ISO/ TS 15216-1 / 15216-2 (2013)). Toutes les amorces et sondes ont été achetées chez Life Technologies ou Eurofins MWG Operon (Les Ulis, France).

*Tableau 14 (page suivante) : Modèles moléculaires utilisés pour cette étude
* : Dans l'ordre : région génomique ciblée ; séquence de référence ; taille de l'amplicon*

Virus	Specificity	Sequence (5' - 3')	Location Size	Target *	Reference (+/- adapted for this study)
Hepatitis A virus	All genotypes	F 5'-TCA-CCG-CCG-TTT-GCC-TAG-3' R 5'-GGA-GAG-CCC-TGG-AAG-AAA-G-3' P FAM-5'-CCT-GAA-CCT-GCA-GGA-ATT-AA-3'-MGB	68-85 241-223 169-150	5'UTR M14707 174bp	Costafreda et al., 2006
Hepatitis E virus	All genotypes	F HEV-5260-F CGGTGGTTTCTGGGGTGAC R HEV-5330-R AGGGGTTGGTTGGATGAATATAG P HEV-5280-P GGGTGTATTCTCAGCCCTTCGC	5260-5278 5330-5308 5280-5301	ORF2/ORF3 M73218 71bp	Martin-Latil et al., 2012b
Rotavirus	Serotype A	F ACC ATC TWC ACR TRA CCC TC R GGT CAC ATA ACG CCC C P FAM-ACA ATA GTT AAA AGC TAA CAC TGT CAA	963-982 1049-1034 990-1016	NSP3 (segment 7) X81436 87pb	Pang et al., 2011, adapted Pang et al., 2004 Pang et al., 2004, adapted
Norovirus	Noro 1	F QNIF4 5'-CGC-TGG-ATG-CGN-TTC-CAT-3' R NL1LCR 5'-CCT-TAG-ACG-CCA-TCA-TCA-TTT-AC-3' P NVGG1P FAM-5'-TGG-ACA-GGA-GAY-CGC-RAT-CT-3'- BHQ	5291-5308 5376-5334 5321-5340	5' end of ORF2 X86557 86bp	da Silva et al., 2007 Svraka et al., 2007 Svraka et al., 2007
Norovirus	Noro 2	F QNIF2 5'-ATG-TTC-AGR-TGG-ATG-AGR-TTC-TCW-GA-3' R COG2R 5'-TCG-ACG-CCA-TCT-TCA-TTC-ACA-3' P FAM-5'-AGC-ACG-TGG-GAG-GGC-GAT-CG-3'- BHQ	5012-5037 5080-5100 5042-5061	5' end of ORF2 X86557 89bp	Loisy et al., 2005 Kageyama et al., 2003 Loisy et al., 2005
Norovirus	Noro 4	F GGA TGC GRT TCT CAG ACT R TCT TCA TTC ACA AAR TCG GGA G P Fam- TGG GAG GGG GAT CGC GAT CT -BHQ	4986-5003 5055-5034 5012-5031	ORF1-ORF2 JQ613567 70bp	This study This study Trujillo et al., 2006, adapted
Sapovirus	GG 1, 2, 4, 5	F GACCAAGGCTCTCGCYACCTAC R CCCTCCATYTCAAACAACATAWTTTG P CCCACTGGGTARGTACTGTAC	5074-5094 5177-5154 5135-5114	Polymerase / capsid junction NC_006269 104bp	Chan et al., 2006 Chan et al., 2006 This study
Aichi virus	/	F CCAGCCTGACGTATCACAGG R CACAATTGCCACGTGAGCAGCTT P FAM-CTGTGTGAAGYCC-MGBNFQ	268-287 329-307 288-300	5' UTR AB040749 62bp	Drexler et al., 2011
Astrovirus	/	F TCT YAT AGA CCG YAT TAT TGG R TCA AAT TCT ACA TCA CCA A P FAM-CCC CAD CCA TCA TCA TCT TCA TCA-BHQ1	2209-2229 2322-2301 2295-2272	ORF 1a NC 001943 114bp	Van Maarseveen et al., 2010
Adenovirus	40 et 41 (serotype F)	F CTC GAC ATG ACT TTT GAG GT R GTA GAC GGC CTC GAT GAC P AGG ATG AGC CCA CAC TTC TYA TGB	20256-20275 20375-20358 20290-20302	Hexon protein NC_001454 120bp	Van Maarseveen et al., 2010, adapted
Coronavirus humans	229E (α-coronaV)	229E-F CAT ACT ATC AAC CCA TTC AAC AAG 229E-R CAC GGC AAC TGT CAT GTA TT 229E-P ATG AAC CTG AAC ACC TGA AGC CAA TCT ATG	25374-25397 25510-25491 25480-25451	glycoprotein AF304460 137bp	Gaunt et al., 2010 Gaunt et al., 2010 Zlateva et al., 2011
	HKU1 (β-coronaV)	HKU1-F TCC TAC TAY TCA AGA AGC TAT CC HKU1-R AAT GAA CGA TTA TTG GGT CCA C HKU1-P TYC GCC TGG TAC GAT TTT GCC TCA	28775-28797 28921-28900 28808-28831	phosphoprotein HM034837.1 147bp	Gaunt et al., 2010 Gaunt et al., 2010 Zlateva et al., 2011
	NL63 (α-coronaV)	NL63-F GTT CTG ATA AGG CAC CAT ATA GG NL63-R TTT AGG AGG CAA ATC AAC ACG NL63-P CGC ATA CGC CAA CGC TCT TCA ACA	26215-26237 26357-26337 26326-26303	phosphoprotein JX504050 143bp	Gaunt et al., 2010 Gaunt et al., 2010 Zlateva et al., 2011
	OC43 (β-coronaV)	OC43-F CAT ACY CTG ACG GTC ACA ATA ATA OC43-R ACC TTA GCA ACA GTC ATA TAA GC OC43-P TGC CAA AGA ATA GCC ART ACC TAG T	28812-28835 28921-28899 28889-28865	glycoprotein JN129835.1 110bp	Gaunt et al., 2010 Gaunt et al., 2010 Zlateva et al., 2011, adapted
Picobirnavirus	/	F GTCTATCAACCAATATCTT R CCTATCAACAGCTTCCAT P CACGCTGGCACYAAYCCYAATCTT	742-761 819-802 794-771	RNA dependent-RNA polymerase AB186898 78bp	This study
Tick-born-encephalitis virus	European, (Siberian ?) and Far-Eastern genotypes	F F-TBE 1 GGG CGG TTC TTG TTC TCC R R-TBE 1 ACW CAT CAC CTC CTT GTC AGA CT P TBE-PROBE-WT TGA GCC ACC ATC ACC CAG ACA CA	11054-11071 11121-11099 11073-11095	3'NCR U27495 68bp	Schwaiger and Cassinotti, 2003 , adapted
Parvovirus	B19	F CCC CGG GAC CAG TTC AGG R CCC CTY ACA CCR TCC CAC AC P ATC ATY TGT CGG AAG CYC AGT TTC CTC CG	2241-2258 2393-2374 2262-2290	NS AB550331 153bp	Kaida et al., 2012
Enterovirus	/	F NMF1 GCCCCTGAATGCGGC R Ev1R GAT TGT CAC CAT AAG CAG C P EvP FAM-CGG AAC CGA CTA CTT TGG GTG TCC GT- BHQ	334-348 481-464 416-441	Polyprotein AJ295199 148pb	Mohamed et al., 2004 Monpoeho et al., 2000, adapted Monpoeho et al., 2000
Cosavirus	/	F TTGTAGYATGCTGTRTGTGTGTG R CCAYTGTGTGGGTCCTTTTCG P FAM- CYCACAGGCCRRRAAGCCCTGTC-DDQ1	735-758 827-808 783-807	5'-UTR NC_012800 93bp	Stocker et al., 2012, adapted
Bocavirus	hBoV2	F CTAGACCAAGCGACGAAGAC R CTCTAGCAAGYCTAGTAGAATGCC P AACCCACACCATCCAGGACATCTG-BHQ	2531-2550 2675-2652 2646-2622	Gene NP-1 NC_012042 145bp	Xu et al., 2011
MNV	MNV-1	F 5'-CCGCCATGGTCTGGAGAATG-3' R 5'-GCACAACGGCACTACCAATCTTG-3' P FAM 5'-CGTGTGCTGCTGGTCTTGTCAA-3' BHQ1	3193-3213 3330-3308 3227-3250	Polyprotein DQ285629 138bp	Martin-Latil et al., 2012a
Mengovirus	MC ₀	F Mengo 110 (FW): GCG GGT CCT GCC GAA AGT R Mengo 209 (REV): GAA GTA ACA TAT AGA CAG ACG CAC AC P Mengo 147 (PROBE): ATC ACA TTA CTG GCC GAA GC MGB	/	5'NTR 100bp	Pintó et al., 2009

2-2-2-6 Conditions de RT-qPCR sur le CFX96 (Biorad)

Les réactions d'amplification par RT-qPCR en une seule étape ont été réalisées sur un système de détection CFX96™ real time PCR de BioRad (Marnes-la-Coquette, France). Les réactions sont réalisées dans un volume final de 15µl, contenant 1X de tampon « RNA UltraSense™ master mix » et 0,63µl d'enzyme (RNA Ultrasense™ enzyme mix), qui sont des composants du kit « RNA UltraSense™ One-Step Quantitative RT-PCR System » (Life technologies), 2 U de « RNase inhibitor » (Life technologies), 5 µg d'albumine sérique bovine (BSA, Life Technologies), 500 nM d'amorces sens, 900 nM d'amorces anti-sens et 250 nM de sondes, et 5 µL d'acides nucléiques (ARN/ADN extraits, ARN transcrits, ADN plasmidiques). Un contrôle négatif contenant tous les réactifs excepté l'échantillon d'acides nucléiques est inclus pour chaque mix réactionnel réalisé.

Le programme de la RT-qPCR en une seule étape consiste en 60 minutes de transcription inverse de l'ARN à 55°C, suivi d'une étape de dénaturation de 15 minutes à 95°C, enfin de 45 cycles de dénaturation de 15 secondes à 95°C, d'hybridation de 1 minute à 60°C et d'élongation de 1 minute à 65°C. La fluorescence est mesurée à la fin de l'étape d'élongation lors de chaque cycle. Tous les échantillons sont caractérisés par une valeur de Ct, sauf les échantillons négatifs. Une courbe standard pour chacune des cibles recherchées est générée par des dilutions en série en eau ultra-pure d'ARN transcrits (VHA, VHE, NoV GI, NoV GII, NoV GIV, sapovirus, cosavirus, aichi virus, coronavirus humains (HKU1, 229E, NL63, OC43), picobirnavirus et TBEV), d'ARN extraits (rotavirus, astrovirus, entérovirus, MNV et mengovirus), d'ADN plasmidiques (parvovirus et bocavirus) ou d'ADN extrait (adénovirus). Les pentes des courbes de régression (S) ont été utilisées pour calculer l'efficacité d'amplification (E) des réactions de RT-qPCR, selon la formule $E = 10^{-1/S} - 1$ afin de déterminer les performances des réactions de RT-qPCR.

2-2-2-7 Conditions de Digital RT-PCR avec le Biomark™ HD System (Fluidigm)

Les réactions d'amplification par RT-dPCR en une seule étape ont été réalisées sur le système de détection BioMark de Fluidigm, en utilisant des plaques microfluidiques « qdPCR 37k IFC digital array ». L'appareil Biomark Integrated Fluidic Circuit (IFC) permet la répartition des 48 mix réactionnels (comprenant les réactifs de PCR et les échantillons) en

chacun 770 chambres individuelles de PCR, situées sur une puce au centre de la plaque (soit 36960 réactions/plaque).

Les réactions sont réalisées dans un volume final de 10 μ l, contenant 1X de tampon « RNA UltraSense™ master mix », 1X de ROX (fluorescence de référence) et 0,44 μ l d'enzyme (RNA Ultrasense™ enzyme mix), qui sont des composants du kit « RNA UltraSense™ One-Step Quantitative RT-PCR System » (Life technologies), 1X du réactif de chargement (20X GE Sample Loading Reagent (Fluidigm)), 2 U de « RNase inhibitor » (Life technologies), 500 nM d'amorces sens, 900 nM d'amorces anti-sens et 250 nM de sondes, et 5,8 μ L d'acides nucléiques (ARN/ADN extraits, ARN transcrits, ADN plasmidiques). Un contrôle négatif contenant tous les réactifs excepté l'échantillon d'acides nucléiques est inclus pour chaque mix réactionnel réalisé.

Six μ l de chacun des mix réactionnels sont chargés sur la puce centrale grâce à l'IFC controller MX, mais 0,65 μ l sont réellement répartis dans les 770 chambres, incluant 0,38 μ l d'acides nucléiques.

Le programme de la RT-qPCR en une seule étape consiste en 60 minutes de transcription inverse de l'ARN à 55°C, suivi d'une étape de dénaturation de 15 minutes à 95°C, et enfin de 45 cycles de dénaturation de 15 secondes à 95°C, d'hybridation de 1 minute à 60°C et d'élongation de 1 minute à 65°C. La fluorescence est mesurée à la fin de l'étape d'élongation lors de chaque cycle.

Le logiciel d'analyse « Digital PCR Analysis software (Fluidigm) » est utilisé pour le comptage du nombre de chambres positives sur le nombre total de micro-chambres, pour chacun des 48 échantillons testés. La loi de Poisson est utilisée par le logiciel pour estimer le nombre réel de copies génomes de virus présents dans chaque échantillon (Dube et al., 2008 ; Bhat et al., 2009). Tous les échantillons sont caractérisés par une quantité absolue des génomes présents, excepté les échantillons négatifs.

2-2-2-8 Conditions de RT-qPCR Array avec le Biomark™ HD System (Fluidigm)

Les plaques microfluidiques « 48.48 Dynamic Arrays IFC » sont chargées par l'appareil Biomark Integrated Fluidic Circuit (IFC). La réaction de qPCR est réalisée sur l'appareil Biomark et les résultats sont analysés par le logiciel d'analyse « Fluidigm® Real-Time PCR Analysis » (Fluidigm).

La réaction de RT-qPCR est réalisée en trois étapes : l'étape de transcription inverse (RT), une étape de préamplification et l'étape d'amplification par PCR.

Les réactions de RT sont réalisées dans un volume final de 25µl contenant 1X de tampon « First-Strand Buffer », 10mM de DTT et 1µl d'enzyme (SuperScript® III RT enzyme), qui sont des composants du kit « SuperScript® III Reverse Transcriptase » (Life technologies), 2 U de « RNase inhibitor » (Life technologies), 2mM d'amorces « Random hexamer » (Life technologies), 200µM de dNTP (Life technologies), et 10µl d'acides nucléiques. Un contrôle négatif contenant tous les réactifs excepté l'échantillon d'acides nucléiques est inclus pour chaque mix réactionnel réalisé. Le programme de RT consiste en 5min à 25°C, suivi de 60 minutes à 55°C et finalement 15 minutes à 70°C. Les ADNc produits sont conservés à -80°C pour leur usage ultérieur.

Les réactions de préamplification sont réalisées dans un volume final de 10µl contenant 1X de mix réactionnel (SuperMix, composant de Perfecta Preamp Supermix (Quanta)), 0,2µl du pool d'amorces (contenant toutes les amorces F et R des différents virus ciblés, à une concentration de 100nM pour les amorces F et 180nM pour les amorces R) et 5µl d'ADNc. Un contrôle négatif contenant tous les réactifs excepté l'échantillon d'acides nucléiques est inclus. Le programme de préamplification consiste en 10 minutes à 95°C, suivi de 14 cycles de 15 secondes à 95°C et 4 minutes à 60°C. Les ADN amplifiés sont immédiatement dilués au quart et conservés à -80°C pour leur usage ultérieur.

Pour la réaction de qPCR Array, les 48 mix réactionnels sont réalisés dans un volume final de 6µl chacun. Ils contiennent 1X de tampon « RNA UltraSense™ master mix », 1X de ROX (fluorescence de référence) et 0,27µl d'enzyme (RNA Ultrasense™ enzyme mix), qui sont des composants du kit « RNA UltraSense™ One-Step Quantitative RT-PCR System » (Life technologies), 1X du réactif de chargement (20X GE Sample Loading Reagent (Fluidigm)), et 2,7µl d'ADN préamplifiés. Les 48 mix sont déposés sur la partie droite de la plaque "48.48 Dynamic Array IFC". Un contrôle négatif contenant tous les réactifs excepté l'échantillon d'ADN est inclus pour chaque mix réactionnel réalisé. D'un autre côté, les 48 mix de 5µl contenant 500nM d'amorces F, 900nM d'amorces R et 250nM de sondes sont déposés sur la partie gauche de la plaque.

Le volume final chargé dans chacune des 2304 microchambres réactionnelles (situées sur la puce au centre de la plaque) est de 9nl.

Le programme de la qPCR consiste en une étape de dénaturation de 15 minutes à 95°C, puis 45 cycles de dénaturation de 15 secondes à 95°C, d'hybridation de 1 minute à 60°C et d'élongation de 1 minute à 65°C. La fluorescence est mesurée à la fin de l'étape d'élongation lors de chaque cycle. Tous les échantillons sont caractérisés par une valeur de Ct, sauf les échantillons négatifs.

2-2-3 Résultats

2-2-3-1 Détection quantitative par RT-qPCR conventionnelle et RT-dPCR

La quantification génomique par digital RT-PCR a été testée en réalisant des gammes de dilution sériées des 22 génomes viraux et comparée à la RT-qPCR (Tableau 15). La sensibilité de la RT-qPCR conventionnelle est meilleure que celle de la RT-dPCR pour quatre virus (d'un facteur 1,5 pour 229E ; d'un facteur 3 pour parvovirus, OC43 et astrovirus). La sensibilité de la RT-dPCR est meilleure que celle de la RT-qPCR conventionnelle pour dix-huit virus (d'un facteur 1,7 pour TBEV, rotavirus Wa et mengovirus ; d'un facteur 3,3 pour bocavirus, sapovirus, VHE, HKU1, VHA et MNV ; d'un facteur 6,7 pour NL63 ; d'un facteur 17 pour aichi virus, NoV GI, NoV GII et adénovirus 41 ; d'un facteur 33 pour picobirnavirus et entérovirus ; d'un facteur 167 pour cosavirus ; d'un facteur 333 pour NoV GIV).

Le nombre de copies-génome calculé par l'utilisation de courbe standard en RT-qPCR et celui obtenu par quantification absolue par RT-dPCR sont similaires uniquement lorsque l'ADN plasmidique est testé.

Lorsque les ARN transcrits sont testés, le nombre de copies-génome calculé par mesure directe en RT-dPCR est de 0,89 à 2,14 \log_{10} plus faible que celui attendu *via* les courbes standards en RT-qPCR. De même, en testant les ARN génomiques provenant des surnageants de culture cellulaire ou de selles, le nombre de copies-génome calculé par mesure directe en RT-dPCR est respectivement de 1,56 à 2,05 \log_{10} et de 1,47 à 3,40 \log_{10} plus faible que celui attendu *via* les courbes standards en RT-qPCR.

Virus	Echantillon		RT-qPCR (CFX96)					RT-dPCR (BIOMARK)		RT-PCR Array (BIOMARK)
	Genome	Type de l'échantillon	Pente	E	R ²	Gamme de détection (valeurs de Ct)	LOD ^a	LOD ^a	Différence entre les deux types de quantification ^b	LOD ^a
Bocavirus	ADN sb	ADN plasmidique	-3,2 ± 0,2	106%	0,966	16,9-37,36	1	0.3	0.17	10
Parvovirus B19	ADN sb		-3,05 ± 0,14	113%	0,980	15,22-36,35	0,5	1.5	-0.31	10
Sapovirus	ARN sb+	ARN transcrit à partir d'un plasmide	-3,55 ± 0,29	91%	0,963	20,21-36,01	50	15	0.89	1,00E+03
Picobirnavirus	ARN db		-3,14 ± 0,53	108%	0,878	20,93-37,86	500	15	0.99	1,00E+05
Virus de l'hépatite E	ARN sb+		-3,49 ± 0,23	93%	0,972	19,91-38,15	50	15	1.25	1,00E+03
TBEV	ARN sb+		-3,1 ± 0,21	110%	0,970	21,66-37,54	50	30	1.03	1,00E+05
Aichi virus	ARN sb+		-3,34 ± 0,46	99%	0,933	27,18-36,53	5,00E+03	300	1.32	1,00E+06
229E	ARN sb+		-3,05 ± 0,37	113%	0,934	25,97-36,89	100	150	1.64	1,00E+04
HKU1	ARN sb+		-3,41 ± 0,22	97%	0,982	25,84-36,34	100	30	1.57	1,00E+05
Cosavirus	ARN sb+		-3,16 ± 0,27	107%	0,978	24,26-31,41	5,00E+03	30	1.35	1,00E+05
Norovirus GGI	ARN sb+		-3,37 ± 0,28	98%	0,973	26,97-38,43	500	30	1.44	1,00E+04
Norovirus GGIV	ARN sb+		-3,53 ± 0,35	92%	0,952	22,7-37,92	1,00E+04	30	1.51	1,00E+04
Norovirus GGII	ARN sb+		-3,44 ± 0,32	95%	0,954	23,01-38,53	500	30	1.64	1,00E+04
OC43	ARN sb+		-3,39 ± 0,31	97%	0,952	22,84-37,7	50	150	1.67	1,00E+05
NL63	ARN sb+		-3,31 ± 0,83	100%	0,851	28,59-36,63	1,00E+03	150	1.97	1,00E+05
Virus de l'hépatite A	ARN sb+		-3,27 ± 0,46	102%	0,916	26,03-39,80	500	150	2.14	1,00E+04
Adenovirus 41	ADN db		Selles	-3 ± 0,16	115%	0,986	23,43-35,08	500	30	1.47
Astrovirus	ARN sb+	-3,65 ± 0,54		88%	0,943	32,88-42,23	1,00E+03	3000	3.40	1,00E+06
Rotavirus Wa	ARN db	Production cellulaire	-3,51 ± 0,79	93%	0,812	22,05-36,45	500	300	1.56	1,00E+05
MNV-1	ARN sb+		-3,01 ± 0,32	115%	0,947	28,33-38,14	500	150	1.95	1,00E+05
Enterovirus	ARN sb+		-3,36 ± 0,59	98%	0,894	25,28-36,79	5,00E+03	150	1.97	1,00E+04
Mengovirus	ARN sb+		-3,21 ± 0,2	105%	0,983	26,77-38	500	300	2.05	1,00E+05

Tableau 15 : Limites de détection (LOD) obtenues pour les 22 virus testés en RT-qPCR (CFX96), en RT-dPCR (Biomark) et en RT-PCR Array (Biomark) (n=3) et différences de quantification entre la spectrométrie (Nanodrop) et la quantification absolue par RT-dPCR (n=3). ^a : les LOD sont données en nombre de copies-génome /réaction, après une quantification au spectromètre ; ^b : le décalage de la quantification entre la DO par Nanodrop et la RT-dPCR est donné en log₁₀, et est obtenu grâce au calcul =moyenne pour la gamme de [LOG₁₀(DO)-LOG₁₀(Digital)]

2-2-3-2 Détection qualitative par RT-qPCR Array

Le potentiel de la RT-qPCR Array pour la détection sensible et spécifique des 22 génomes viraux a été testé grâce à l'utilisation de gammes de dilution afin de déterminer la limite de détection (Tableau 15).

Chacun des 22 échantillons de virus a été testé trois fois en duplicate en regard des 22 modèles moléculaires. Aucune amplification non spécifique n'a été observée.

La sensibilité de la RT-qPCR Array est moindre que celles de la RT-qPCR conventionnelle et de la RT-dPCR. Les limites de détection obtenues pour les 22 virus détectés sont comprises entre 10 et 10^6 copies-génome par réaction. La meilleure limite de détection est obtenue pour bocavirus et parvovirus, dont les génomes testés étaient sous forme d'ADN plasmidique, avec 10 copies-génome détectées par réaction. Le décalage entre les limites de détection obtenues selon ces trois types de qPCR est compris entre 0,82 et 3,82 \log_{10} selon le virus ciblé.

2-2-3-3 Détection qualitative par RT-qPCR Array, puis quantification par RT-dPCR d'échantillons

27 échantillons (4 surnageants de culture et 23 échantillons cliniques) ont été testés sur la RT-qPCR Array. La quantification des génomes viraux détectés a ensuite été sélectivement réalisée par RT-dPCR et RT-qPCR. Les résultats sont montrés dans le Tableau 16.

Les génomes viraux présents dans les échantillons cliniques et identifiés par les CNR ont tous été détectés par la RT-qPCR Array. Deux échantillons cliniques ont présenté une détection positive pour au moins deux virus (selles identifiées VHA IB par le CNR : présence de VHA et d'aichi virus ; selles identifiées aichi virus par le CNR : présence de aichi virus, adénovirus et astrovirus). La selle « NoV GII.13 + NoV GIV » fournie par le CNR comme co-infection a bien été trouvée positive pour NoV GII et NoV GIV.

La quantification des génomes viraux dans les échantillons (simple, double ou triple co-infections) a été réalisée avec succès pour tous les génomes ciblés en RT-qPCR.

La quantification des génomes viraux par RT-dPCR a été réalisée pour tous les échantillons. Des différences de quantification sont à nouveau observées entre nombre de copies-génome calculé par mesure directe en RT-dPCR et nombre de copies-génome calculé par spectrométrie et attendu *via* les courbes standards en RT-qPCR.

Pour les génomes viraux provenant des surnageants de culture cellulaire ainsi que ceux provenant des selles cliniques, le nombre de copies-génome calculé par mesure directe en

RT-dPCR est respectivement de 0 à 1,5 log₁₀ et de 0 à 3,74 log₁₀ plus faible que celui attendu *via* les courbes standards en RT-qPCR.

Virus	N° éch /désignation	Nature	Origine	Détection PCR Array 48x48 (essais positifs/essais réalisés)	Détection RT-dPCR*	Détection RT-qPCR*
VHA	HM175/18f	surnageant de culture	ATCC	3/3	1,51E+09	4,50E+10
EV	EchoV	surnageant de culture	Echovirus 19 souche Burke	2/2	1,61E+09	1,75E+10
Adénovirus	Adénovirus 40	surnageant de culture	ATCC VR-931	2/2	7,11E+08	1,42E+10
Astrovirus	Astrovirus GI	surnageant de culture	N/A	2/2	1,76E+10	2,43E+10
VHA IA	780627147	selle	CNR VHA/VHE	3/3	1,29E+06	2,30E+06
VHA IA	1181216151	selle	CNR VHA/VHE	3/3	2,45E+09	7,75E+10
VHA IB	1280210015	selle	CNR VHA/VHE	3/3	7,52E+07	1,50E+09
VHA IB	1280514230	selle	CNR VHA/VHE	3/3 (VHA)	2,88E+08	6,85E+09
				2/2 (Aichi virus)	9,17E+07	2,77E+09
VHE 3c	1280511146	selle	CNR VHA/VHE	2/2	7,36E+07	1,41E+09
VHE 3f	1280418084	selle	CNR VHA/VHE	2/2	1,43E+08	1,95E+09
VHE 3f	1280530128	selle	CNR VHA/VHE	2/2	1,32E+07	5,21E+08
VHE 4	1280615097	selle	CNR VHA/VHE	2/2	4,44E+07	2,40E+08
VHE 4	1280522166	selle	CNR VHA/VHE	2/2	2,60E+07	5,34E+09
RV G12P8	E7622	selle	CNR Virus entériques	2/2	4,84E+09	7,28E+11
RV G1P8	E8097	selle	CNR Virus entériques	2/2	7,83E+08	4,31E+12
Aichi virus	E6841	selle	CNR Virus entériques	1/2 (Aichi virus)	7,83E+05	6,00E+07
				2/2 (Adénovirus)	4,69E+09	5,85E+10
				2/2 (Astrovirus)	4,42E+08	1,65E+11
NoV GI.4	E5486	selle	CNR Virus entériques	3/3	1,98E+07	7,79E+07
NoV GI.1	E5569	selle	CNR Virus entériques	3/3	9,58E+06	9,91E+07
NoV GI.3	E8050	selle	CNR Virus entériques	3/3	3,96E+07	7,40E+08
NoV GII.4	E6929	selle	CNR Virus entériques	3/3	5,53E+07	7,00E+08
NoV GII.7	E6618	selle	CNR Virus entériques	3/3	8,29E+05	8,03E+06
NoV GII.6	E7859	selle	CNR Virus entériques	3/3	6,94E+07	5,24E+08
NoV GII.3	E7022	selle	CNR Virus entériques	3/3	1,95E+07	2,91E+08
NoV GII.1	E6992	selle	CNR Virus entériques	3/3	1,75E+06	1,52E+07
NoV GII.13 + NoV GIV	-	selle	CNR Virus entériques	3/3 (NoV GII.13)	2,95E+06	1,16E+06
				2/2 (NoV GIV)	3,04E+05	1,84E+07

Tableau 16: Détection des échantillons par l'utilisation de la RT-qPCR Array, puis quantification par RT-dPCR et RT-qPCR.

VHA = Virus de l'hépatite A ; EV = enterovirus ; VHE = virus de l'hépatite E ; RV = rotavirus ; NoV = norovirus. * copies génome/g de selle ou copies génome/mL de surnageant de culture

2-2-4 Discussion

Les virus entériques sont capables de persister pendant une longue période dans l'environnement et peuvent être transmis à faible dose infectieuse par contact interhumain, ou *via* l'eau ou les aliments, et posent un sérieux problème de santé publique (Koopmans and Duizer, 2004). Ils sont responsables de gastroentérites, mais également d'hépatites et d'autres maladies, incluant des infections respiratoires, des conjonctivites, des méningites virales, des encéphalites, des myocardites et des paralysies, pouvant avoir un fort taux de mortalité, spécialement chez les patients immunodéprimés (Griffin et al., 2003). Les virus entériques les plus étudiés sont les norovirus et les virus d'hépatites, mais de nouveaux outils sont nécessaires pour la détection et la surveillance de l'ensemble des virus pathogènes dans l'environnement, les aliments et les investigations lors d'épidémies.

La PCR digital en microfluidique (dPCR) est une approche en point final, sensible et permettant une quantification absolue du nombre de copies génome sans nécessiter l'utilisation de courbe de standards. La RT-dPCR a été comparée à la RT-qPCR conventionnelle pour la quantification de 20 virus entériques et de deux virus utilisés comme contrôles de process. Pour la détection des ARN et ADNc viraux, la sensibilité de la dPCR a été trouvée souvent meilleure à celle de la qPCR. En revanche, le nombre de copies-génome déterminé par la dPCR est souvent différent de celui calculé par spectrométrie.

Il semble que les deux quantifications obtenues par les deux méthodes pour les cibles à ADN soient assez semblables, tandis que des différences de quantification sont observées lorsque les cibles sont des ARN, ces différences varient de 0 à 3,74 \log_{10} , que ce soit pour les ARN de référence ou les échantillons cliniques testés.

Une cause potentielle de cette divergence entre quantification relative et absolue pourrait être les erreurs introduites par la détermination de la concentration en acides nucléiques par la spectrométrie, conduisant à une surestimation du nombre de copies-génomés (Henrich et al., 2012; Sanders et al., 2013). Cela peut expliquer pourquoi certains échantillons provenant de surnageants de culture cellulaire ou de selles, qui contiennent potentiellement d'autres génomes (ARN cellulaires dans le cas de génome viral issu de surnageant de culture cellulaire ; ARN provenant d'autres virus, bactéries ou cellules humaines lorsqu'il s'agit d'échantillons cliniques (selles)) et des ARN provenant de génomes

dégradés et donc non amplifiables par PCR, sont particulièrement affectés par cette différence de quantification.

Une autre cause potentielle pourrait être due à l'étape de RT qui n'est pas efficace à 100%, tous les ARN ne sont donc pas rétrotranscrits en ADNc et ainsi non quantifiés par (RT)-dPCR ce qui peut alors impliquer une sous-estimation de la concentration en ARN viral par RT-dPCR.

La digital PCR peut fournir une mesure plus précise que la qPCR car elle n'est pas dépendante de l'efficacité d'amplification. De plus, l'avantage de cette nouvelle technologie est sa meilleure tolérance aux substances inhibitrices et peut ainsi réduire la difficulté de quantifier les virus en présence d'inhibiteurs liés au types de matrices analysées en virologie environnementale et alimentaire (Rački et al., 2014; Morisset et al., 2013).

Les innovations récentes dans la miniaturisation des PCR ont permis de réaliser des **qPCR à haut débit**, permettant la réduction du volume réactionnel d'une PCR au niveau du nanolitre, réduisant ainsi les volumes de réactifs et d'échantillons nécessaires ainsi que le coût des réactifs, permettant l'usage de sondes d'hydrolyse ainsi que d'agents intercalants (Devonshire et al., 2013). La comparaison de cette technologie à la qPCR classique a montré que les résultats obtenus sont concordants et reproductibles (Spurgeon et al., 2008) et que la sensibilité est similaire voire meilleure (Jang et al., 2011 ; Ishii et al., 2013). Pour l'analyse d'ARN, la transcription inverse doit être réalisée extemporanément, et une étape de préamplification peut être nécessaire en raison des faibles volumes réactionnels afin d'améliorer la sensibilité du test (Jang et al., 2011 ; Ishii et al., 2013).

Ainsi, le développement d'une « **Viropuce** », basée sur la technologie de PCR Array, permet l'analyse simultanée par qPCR de 48 échantillons en regard de 22 virus ciblés. Etant donné les très petits volumes dans lesquelles se déroulent les réactions de RT-PCR Array (9nl), il a été nécessaire de réaliser une étape de préamplification, ce qui a conduit à réaliser l'étape de RT extemporanément.

Vingt virus entériques ont été ciblés, ainsi que deux virus utilisés comme contrôles de process (MNV et mengovirus). Les limites de détection sont moins bonnes (de 0,82 à 3,82 \log_{10}) que celles obtenues en RT-qPCR conventionnelle et en RT-dPCR. Il est possible que le fait que l'étape de RT-PCR ne se déroule pas en une seule étape, au contraire de la RT-qPCR conventionnelle et de la RT-dPCR, soit responsable de cette moins bonne sensibilité.

Les échantillons cliniques qui ont été analysés par la RT-qPCR Array ont tous été identifiés en accord avec les données des CNR. En revanche, deux selles contenaient plus qu'un seul génome viral, ce qui complète les analyses effectuées par les CNR. Cette technique est donc utile afin de réaliser un screening rapide des échantillons à tester.

En conclusion, la digital PCR pourrait être utilisée pour standardiser la quantification des virus entériques voire d'autres pathogènes humains en microbiologie des aliments. À terme, la RT-qPCR Array associée à la digital PCR pourrait être appliquée pour le criblage des échantillons contaminés puis la quantification des virus pathogènes. Ce type d'approche renforce le potentiel analytique pour l'investigation des épidémies et pourrait permettre de développer la surveillance des virus entériques.

III- DISCUSSION - PERSPECTIVES

Les virus entériques humains sont responsables de pathologies diverses (dont les gastroentérites et les hépatites aiguës) et constituent un problème de santé publique important. Leur transmission est féco-orale et ils sont principalement transmis de personne à personne ou *via* la consommation d'un aliment contaminé, notamment les produits crus, tels que les végétaux, les fruits et les coquillages, qui représentent une part importante de notre alimentation. La contamination des aliments peut survenir à toutes les étapes du processus de production, et la capacité des virus entériques à persister dans l'environnement ainsi que leur pouvoir infectieux à faible dose font que ces virus représentent un réel risque pour la santé des consommateurs (Lees, 2010 ; D'Agostino et al., 2011 ; Bosch et al., 2011).

Les virus contaminant les aliments sont majoritairement les virus de l'hépatite A et les norovirus de génogroupes I et II (Koopmans and Duizer, 2004) mais d'autres virus tels que le virus de l'hépatite E (qui est un virus émergent, zoonotique et retrouvé dans les aliments à base de porc), les adénovirus 40 et 41, les rotavirus, les sapovirus, les astrovirus, les coronavirus, les aichi virus, les entérovirus, le TBEV, les picobirnavirus, les norovirus de génogroupe IV, les parvovirus, les bocavirus et les cosavirus ont également été retrouvés (Koopmans and Duizer, 2004 ; Vasickova et al., 2005 ; Wilhelmi et al., 2003). La consommation de ces aliments contaminés par plusieurs personnes peut alors être à l'origine de TIAC.

Devant ce risque viral, il est nécessaire de disposer de techniques rapides et fiables afin de pouvoir détecter les virus entériques à partir des matrices alimentaires. Comme ces virus sont difficilement cultivables, les méthodes utilisées pour le diagnostic en routine sont basées sur la qPCR (Koopmans and Duizer, 2004 ; Lees, 2010).

Une spécification technique pour la détection des virus entériques (VHA, norovirus GI et GII) dans cinq matrices alimentaires ciblées (végétaux, fruits rouges, eau, coquillages et surfaces) a été publiée en 2013 par le groupe de travail européen de standardisation créé en 2004, le CEN/WG6/TAG4, afin d'harmoniser les procédures (Lees, 2010 ; ISO/TS 15216-1, 2013 ; ISO/TS 15216-2, 2013). La détection des virus dans les aliments repose sur trois étapes : une

étape d'élution - concentration, une étape d'extraction et une étape de détection des génomes viraux par RT-qPCR.

Les faibles concentrations virales retrouvées sur les aliments, ainsi que la présence d'inhibiteurs de réaction PCR rendent délicate la détection des virus entériques, et une variabilité des rendements d'extraction des virus avec des efficacités d'extraction relativement faibles est souvent décrite (Butot et al., 2014 ; Gensberger and Kostic, 2013 ; Lees, 2010). L'étape d'extraction des virus à partir des matrices alimentaires est donc une étape cruciale, qu'il faut optimiser en fonction de la matrice, et dont il faut contrôler l'efficacité à l'aide d'un virus utilisé comme contrôle de process (Diez-Valcarce et al., 2011).

L'évaluation des performances de protocoles d'extraction nouvellement développés peut être réalisée par comparaison avec les méthodes décrites dans la spécification technique (Butot et al., 2014). Ainsi, la comparaison de l'étape de concentration du VHA contaminant des laitues par la technique de **filtration** vs la précipitation par le PEG recommandée dans la spécification technique a été réalisée. Dans cette étude, les sensibilités des deux méthodes étaient similaires et les limites de détection en accord avec la littérature (Brassard et al., 2011 ; Kim et al., 2009 ; Hida et al., 2013 ; Sánchez et al., 2012b). Il est cependant souvent difficile de comparer les limites de détection obtenues par les différentes méthodes car elles ne sont pas toutes données dans la même unité et les corrélations entre PFU, TCID₅₀, RT-PCR et copies-génome ne sont pas toujours disponibles (Butot et al., 2014). Les différences de rendements d'extraction observées dans la littérature (Stals et al., 2012) dépendent en grande partie du type de matrice alimentaire testée, d'où l'importance de l'optimisation du processus d'extraction pour maximiser la récupération des virus tout en limitant l'extraction des molécules inhibitrices de réactions PCR. La dilution des ARN viraux extraits peut limiter l'effet des inhibitions des réactions de RT-qPCR, mais comme l'ont montré ces travaux, il est important de réaliser la détection des ARN extraits avec et sans dilution, pour limiter l'impact de l'inhibition d'amplification mais aussi limiter la perte de sensibilité (Butot et al., 2014 ; ISO/TS 15216-1, 2013 ; ISO/TS 15216-2, 2013).

Malgré la présence des inhibiteurs, la technique de (RT)-qPCR reste la technique la plus sensible pour la détection des virus entériques dans les échantillons alimentaires. Pour mieux caractériser les souches virales et réaliser des analyses phylogénétiques, le

génotypage par séquençage est utilisé. Il permet de relier les patients d'une épidémie aux aliments responsables, et de tracer l'origine géographique d'une souche donnée afin de trouver l'origine de la transmission (Vaughan et al., 2013b).

Le virus de l'hépatite A regroupe six génotypes (I à VI). Les génotypes I, II et III, chacun subdivisés en sous-types A et B, infectent les humains, et les plus fréquemment retrouvés sont les sous-types IA majoritairement ainsi que IB et IIIA dans une plus faible mesure (Costa-Mattioli et al., 2002 ; Lu et al., 2004 ; Nainan et al., 2006). Les souches sont génotypées en routine par séquençage du génome au niveau de la jonction VP1-2A ou d'une partie de VP1 (Schwarz et al., 2008 ; Nainan et al., 2006). Dans les pays industrialisés, un produit alimentaire contaminé par le VHA et distribué à grande échelle est susceptible d'entraîner des épidémies de grande ampleur avec un fort potentiel d'adultes susceptibles de développer la maladie du à la faible endémie et la faible couverture vaccinale (Mohd Hanafiah et al., 2011). En France, les génotypes IA, IB et IIIA sont majoritairement retrouvés, bien que des souches de sous-génotypes IIA circulent également (Roque-Afonso et al., 2010). Mais compte tenu des faibles niveaux de contamination des aliments par les virus, il est souvent difficile de pouvoir génotyper par séquençage le virus qui a été détecté par RT-qPCR en cas de TIAC.

La mise à disposition d'outils sensibles tels que la qPCR pour génotyper les souches est un réel avantage. Ce travail a permis le développement de six modèles moléculaires de RT-qPCR pour identifier les six sous-types humains du VHA (IA, IB, IIA, IIB, IIIA, IIIB).

Ces six modèles de RT-qPCR, utilisés sur des échantillons cliniques ont mis en évidence la possible présence de co-infection et d'une souche recombinante. Pour approfondir l'étude de ces échantillons cliniques, la souche recombinante potentielle devra être séquencée afin de confirmer l'hypothèse et de localiser le site de recombinaison sur son génome. Les échantillons où une co-infection a été suspectée pourront être séquencés par NGS afin de valider l'hypothèse ou pour vérifier qu'il ne s'agit pas d'un variant, auquel cas l'amplification pourrait résulter d'une réaction croisée (non spécifique du sous-type). Ces modèles moléculaires de RT-qPCR peuvent être utilisés en virologie alimentaire afin de relier les patients à l'aliment contaminé qui est la source de leur infection. Récemment, dans le cadre de nos missions d'analyses en cas de TIAC, nous avons identifié la présence du VHA dans des tartelettes aux fruits rouges consommées par les patients, ainsi que dans le lot de fruits

rouges qui avait servi à leur préparation. Les génomes des souches n'ont pas pu être génotypés par séquençage qui est la méthode de référence (Gold standard). L'utilisation des modèles de RT-qPCR spécifiques des génotypes du VHA a permis de mettre en évidence que les souches détectées dans les deux échantillons alimentaires étaient de génotype IA comme celui identifié chez les patients. Cette TIAC est reliée à celle qui sévit en Europe depuis janvier 2013 (11 pays touchés), et dont l'origine est attribuée à la consommation de fruits congelés (European Centre for Disease Prevention and Control and the European Food Safety Authority, 2014).

Ainsi, bien que le génotypage conventionnel par séquençage reste la méthode de référence, le génotypage par RT-qPCR peut être proposé comme un test additionnel lorsque le séquençage est infructueux, ce qui est courant en virologie alimentaire.

En virologie clinique, le génotypage par RT-qPCR peut permettre d'identifier des co-infections et possiblement des souches recombinantes dont les descriptions dans la littérature sont assez récentes (Costa-Mattioli et al., 2003a ; Cristina and Costa-Mattioli, 2007 ; Belalov et al., 2011).

Une approche de génotypage par RT-qPCR a déjà été réalisée pour les rotavirus (Kottaridi et al., 2012) mais il serait intéressant de développer ce type d'approches pour d'autres virus entériques comme le virus de l'hépatite E (VHE) qui est émergent, mais surtout pour norovirus qui est l'agent étiologique majeur des TIAC d'origine virale.

Etant donné que 36,5% à 75% des TIAC ne sont jamais reliés ni à un pathogène ni à un aliment d'une part (Delmas et al., 2010 ; Vaillant et al., 2012 ; www.invs.sante.fr/Dossiers-thematiques/Maladies-infectieuses/Risques-infectieux-d-origine-alimentaire/Toxi-infections-alimentaires-collectives/Donnees-epidemiologiques), et que d'autre part les TIAC entraînant des symptômes peu graves, rapidement résolutifs ou touchant un petit nombre de malades (comme les TIAC à norovirus et les TIAC familiales) ont une probabilité plus faible d'être déclarées (Vaillant et al., 2012), des progrès sont encore à prévoir pour l'amélioration de l'estimation de l'impact réel des virus entériques en termes de santé publique. La technique de (RT)-qPCR ne permet pas une recherche exhaustive des virus entériques car la quantité disponible d'extrait de génomes viraux à partir des matrices est limitée, et le choix du virus à rechercher est réalisé sur des bases épidémiologiques ou des données cliniques.

Les innovations récentes dans la miniaturisation des PCR ont permis le développement de plateformes permettant de réaliser des réactions de **qPCR à haut débit**, dont le volume réactionnel est de l'ordre du nanolitre, ce qui permet de limiter les coûts en réactifs, ainsi que le volume de l'échantillon testé (Devonshire et al., 2013). De plus, le potentiel de la **digital PCR** pour quantifier de manière absolue les génomes (sans nécessiter l'utilisation de gammes de standards) et limiter l'effet des inhibiteurs de PCR a été décrit (Sedlak et al., 2013 ; Dingle et al., 2013 ; Morisset et al., 2013 ; Rački et al., 2014).

La digital PCR et la qPCR à haut débit ont été évaluées dans le domaine du diagnostic viral pour la quantification des génomes viraux et la détection simultanée de 20 virus entériques. La quantification des molécules d'ADN par digital PCR (basée sur le comptage des puits positifs et négatifs en fin de PCR) est précise, reproductible et peut tolérer des variations d'efficacité d'amplification sans que cela affecte l'estimation du nombre de copie génome (Hindson et al., 2011 ; Sanders et al., 2013). La quantification de l'ADN par dPCR est décrite comme une quantification absolue et il semble que cette approche permette des estimations plus précises du nombre de copies de génomes (Devonshire et al., 2013). Plusieurs études ont comparé la qPCR et la dPCR en virologie, et les résultats semblent montrer une même sensibilité voire une amélioration du seuil de détection avec la dPCR (Heinrich et al., 2012 ; White et al., 2012 ; Hindson et al., 2013 ; Morisset et al., 2013 ; Sedlak et al., 2013 ; Zhao et al., 2013). La digital PCR a également été appliquée à la quantification d'ARN issus d'échantillons cliniques en réalisant une RT-dPCR (Devonshire et al., 2013 ; Sanders et al., 2013).

La RT-dPCR a été également évaluée par rapport à la RT-qPCR classique pour la quantification du VHA et des NoV sur deux matrices alimentaires (l'eau et la laitue). Les réactions de RT-dPCR n'ont pas nécessité d'optimisation particulière et ont été réalisées selon les conditions réactionnelles préconisées pour la RT-qPCR dans la spécification technique. Les LOD des virus testés et extraits des matrices sont similaires en dPCR et en qPCR. L'utilisation de la dPCR améliore particulièrement les rendements d'extraction viraux obtenus à partir de la laitue qui est une matrice inhibitrice confirmant l'intérêt de la digital PCR pour limiter l'impact des inhibiteurs de réactions PCR (Dingle et al., 2013 ; Morisset et al., 2013 ; Rački et al., 2014). En effet, alors que l'amplification génomique par qPCR dépend de la concentration des inhibiteurs dans le mix réactionnel en entier, la quantification par dPCR est basée sur le partitionnement d'un échantillon (comprenant potentiellement des

inhibiteurs) en micro-compartiments ce qui tend (à limiter l'impact des inhibiteurs d'amplification PCR (Dingle et al., 2013 ; Henrich et al., 2012).

La digital RT-PCR a été trouvée moins sensible aux inhibiteurs que la qPCR classique pour les deux matrices testées (eau et laitue). Des essais complémentaires permettront d'évaluer la digital RT-PCR pour la détection des virus sur les fruits rouges, qui est une matrice inhibitrice très souvent impliquée dans les toxi-infections alimentaires. Des résultats préliminaires obtenus (non présentés) tendent vers une levée importante des inhibitions de réaction d'amplification lorsque la détection est réalisée par la digital PCR comparativement à la qPCR classique.

La validation du diagnostic viral repose sur l'utilisation de **contrôles** appropriés, notamment un contrôle de process et un contrôle d'amplification PCR.

Le contrôle de process permet de vérifier l'intégralité du processus, c'est-à-dire l'extraction du virus de la matrice ainsi que l'étape de qPCR (Lees, 2010 ; Stals et al., 2012 ; Diez-Valcarce et al., 2011). La spécification technique relative au diagnostic viral en hygiène alimentaire propose de valider l'analyse si un rendement d'au moins 1% d'extraction est obtenu pour le contrôle de process (en analysant soit l'ARN extrait pur ou préalablement dilué) (ISO/TS 15216-1, 2013 ; ISO/TS 15216-2, 2013). Le contrôle d'amplification permet de vérifier le niveau d'inhibition de la réaction d'amplification due à l'effet matrice (D'Agostino et al., 2011). La spécification technique recommande l'utilisation du contrôle externe d'amplification (EAC) et propose que le seuil d'acceptabilité des résultats soit une efficacité d'amplification d'au moins 25%, que les extraits d'ARN aient été préalablement dilués ou non. Néanmoins, la dilution préalable des extraits d'ARN ne suffit pas toujours à lever suffisamment les inhibitions des réactions PCR lors de l'analyse de certaines matrices alimentaires comme les laitues par la technique de RT-qPCR. La digital PCR présente donc un réel avantage pour la validation des diagnostics viraux étant donné sa meilleure résistance à l'inhibition de réaction PCR comparativement à la qPCR classique.

Une « **Viropuce de détection de virus entériques** » ciblant vingt virus entériques et deux virus utilisés comme contrôle de process (MNV et mengovirus) a été développée en utilisant la PCR haut débit. Les virus entériques choisis sont les norovirus de génogroupes I, II et IV et

le virus de l'hépatite A, qui sont les principaux agents de TIAC, les rotavirus, les astrovirus, les adénovirus entériques, les sapovirus, les entérovirus et les aichi virus, qui sont ponctuellement impliqués dans des TIAC, le virus de l'hépatite E et le TBEV, qui sont des virus émergents, zoonotiques et pouvant avoir un fort impact sur la santé, les coronavirus humains, les cosavirus, les bocavirus de génotype 2, les parvovirus et les picobirnavirus, qui sont des agents potentiellement transmis par voie alimentaire et hydrique et dont la surveillance est à renforcer (Koopmans and Duizer, 2004 ; Vasickova et al., 2005 ; Wilhelmi et al., 2003 ; FAO/WHO, 2008 ; EFSA (BIOHAZ), 2011).

Pour valider les modèles moléculaires de RT-qPCR ciblant les 22 virus, les limites de détection obtenues en digital PCR ont été comparées à celles obtenues par qPCR classique. La sensibilité de la RT-dPCR est souvent meilleure que celle de la RT-qPCR. Les nombres de copies-génome déterminés par digital PCR et par spectrométrie sont similaires lorsqu'il s'agit d'un échantillon d'ADN, comme précédemment décrit par Sanders et al., (2013).

En revanche, ces deux méthodes de quantification ne sont pas en accord lorsqu'il s'agit de quantifier l'ARN avec des quantités mesurées toujours plus faibles par digital PCR (de l'ordre de 1 à 3 \log_{10}). Plusieurs explications sont envisagées. Ces différences de quantification des ARN peuvent être dues à un biais de mesure en spectrométrie : la quantification par les UV surestime la quantification de l'ARN (Henrich et al., 2012 ; Sanders et al., 2013). De manière intéressante, le décalage de quantification n'est pas toujours le même. Ces différences semblent varier notamment en fonction de la nature de l'ARN quantifié (ARN transcrit, ARN extrait). La sensibilité de la technique pour un même amplicon peut être affectée par le type de génome testé (par exemple un ADN génomique *versus* un ADN plasmidique), avec une variabilité des mesures de quantification accrue par la nature complexe de l'échantillon (Whale et al., 2013). Cela permet d'expliquer que les plus grandes différences observées entre les deux modes de quantification sont obtenues avec les ARN génomiques extraits de surnageants de culture cellulaire et d'échantillons cliniques.

Ces différences peuvent être également dues à la réaction de RT-PCR elle-même puisque les molécules d'ARN ne seraient pas toutes détectées en RT-PCR (Sanders et al., 2013). Plusieurs raisons sont avancées et testées par les auteurs. L'étape de RT n'est pas efficace à 100%, au contraire de l'étape de PCR, et peut être inhibée par certains composants de l'extrait viral total. De plus, les étapes de RT et de PCR sont sources de variabilité liée au kit utilisé et à la

nature de l'ARN testé. Enfin, ces variations de quantification sont fonction de la séquence amplifiée (Sanders et al., 2013).

La « Viropuce » permet de réaliser un criblage mais pas de quantifier les génomes viraux. Dans la littérature, la sensibilité des réactions de « qPCR Array » a été décrite comme similaire voire meilleure que celle obtenue avec la qPCR conventionnelle (Jang et al., 2011 ; Ishii et al., 2013). Dans cette étude sur les virus entériques, qui sont majoritairement des virus à ARN, les résultats ont montré que la sensibilité de la qPCR Array était moins bonne que celle de la qPCR conventionnelle malgré l'ajout d'une étape de préamplification. Le fait que les réactions de RT-qPCR Array soient réalisées sous de très faibles volumes (nanolitre) et que l'étape de RT soit réalisée extemporanément pourrait expliquer cette différence de sensibilité.

Même si les LOD des agents pathogènes sont moins bonnes (de l'ordre de 1 à 3,8 \log_{10}) qu'en qPCR classique et qu'en dPCR, une « qPCR Array » permet néanmoins d'augmenter le panel de pathogènes et d'échantillons testés.

La « Viropuce » développée pourrait être utilisée dans le cadre de plans de surveillance des virus entériques dans les aliments à risque (coquillages, végétaux, fruits...) ou dans l'environnement (eaux usées, de rivière, d'irrigation). Très peu de données sont disponibles quant à la concentration des virus entériques dans l'environnement ; la concentration moyenne des adénovirus entériques retrouvés dans les eaux environnementales est de $3,2 \cdot 10^2$ copies génome /100ml d'eau, celle des sapovirus est de 10^4 copies par litre, le génome d'astrovirus est détecté dans les eaux usées avec une concentration moyenne de $4,1 \cdot 10^6$ génome d'astrovirus / 100 ml, les cosavirus sont détectés dans des eaux de rivières et des eaux usées à des concentrations allant jusqu'à $2,80 \cdot 10^6$ copies/L (Le Cann et al., 2004 ; Haramoto et al., 2008 ; La Rosa et al., 2012 ; Haramoto and Otagiri, 2014), ces quantités virales semblent compatibles avec l'utilisation de la « Viropuce » en termes de LOD. Les très fortes concentrations de virus entériques retrouvées dans les selles des patients humains (supérieurs à 10^5 particules virales infectieuses / g de selles) rendent également l'utilisation de la Viropuce pertinente en virologie clinique.

La « Viropuce » permet donc d'élargir l'éventail de virus recherchés dans un même échantillon et peut facilement être modifiable pour permettre la détection d'autres virus en fonction de l'émergence de nouveaux pathogènes.

L'utilisation des méthodes de détection moléculaires (RT-qPCR classique, RT-dPCR, RT-qPCR Array) pour la détection des virus ne permet pas d'évaluer le **risque infectieux** qui est important en santé publique. Le développement de méthodologies pour contribuer à une meilleure évaluation du risque infectieux est donc nécessaire.

Différentes approches méthodologiques ont été testées sur les virus, comme l'ICC-PCR, l'application de pré-traitements (avant la RT-PCR), la vérification de l'intégrité du génome, la capacité à se lier au récepteur cellulaire ou la mesure des dommages oxydatifs de la capsid. En particulier, l'utilisation de traitements simples, tels que l'action de la protéinase K associée à la RNase, à réaliser avant l'étape de détection par PCR, a déjà été testée pour différencier les virus entériques infectieux et non infectieux (Nuanalsuwan and Cliver, 2002 ; Schielke et al., 2011). Les pré-traitements utilisant l'EMA ou le PMA ont été utilisés avec le poliovirus et le virus de l'hépatite A avec des résultats encourageants, mais sans efficacité avec le virus de l'influenza aviaire (Parshionikar et al., 2010 ; Graiver et al., 2010 ; Sánchez et al., 2012a).

La réalisation de pré-traitements avant la RT-qPCR permet de conserver tous les avantages de cette technique rapide et sensible. L'étude réalisée sur une souche du VHA et deux souches de rotavirus a permis le développement d'un pré-traitement, à réaliser avant l'extraction des génomes viraux et la RT-qPCR, sur la base de l'utilisation de monoazides (PMA et EMA, molécules s'intercalant dans les doubles hélices de l'ADN et empêchant son amplification par PCR). Cependant, le traitement a dû être adapté pour chacune des souches testées selon plusieurs paramètres: choix et concentration du monoazide, intérêt de l'ajout d'un détergent, importance de la taille et de la localisation de l'amplicon. Ces différences de prétraitement sont nécessaires car les virus ont des capsides différentes et des génomes différents (structures secondaires, ARN simple ou double brin).

La pénétration du monoazide à l'intérieur d'un virion est possible si la capsid est endommagée par un traitement d'inactivation. L'ajout d'un détergent peut aider le monoazide à accéder à l'ARN viral, mais n'a été efficace que pour la souche du VHA, ce qui peut être expliqué par les différences structurales des capsides de rotavirus et du VHA. La liaison du PMA et de l'EMA au génome viral est effective en présence de double brin, comme c'est le cas pour le génome de rotavirus. La liaison de l'EMA au génome d'ARN simple brin du VHA est probablement favorisée par la présence des structures secondaires

dans la région 5'NTR (Kusov and Gauss-Müller, 1997) ce qui explique l'importance du choix de la localisation de l'amplicon. De même, il a été démontré que l'augmentation de la taille de l'amplicon joue également un rôle positif dans l'efficacité de l'action des monoazides, comme avaient pu le démontrer d'autres études (Contreras et al., 2011 ; Soejima et al., 2011).

L'inactivation thermique du VHA et des rotavirus a été testée à plusieurs températures (37°C, 68°C, 72°C et 80°C). Les dommages causés à la capsidie lors de l'inactivation sont fonction de la température, ce qui influe sur l'efficacité de pénétration du monoazide à l'intérieur de la capsidie (Cliver, 2009), et qui explique que le pré-traitement est d'autant plus efficace que la température d'inactivation est élevée. Ainsi, une bonne corrélation entre le titre infectieux mesuré par culture cellulaire et le titre moléculaire mesuré par « prétraitement-RT-qPCR », est obtenue alors que le titre moléculaire par RT-qPCR classique ne permet pas de voir la diminution du titre infectieux.

Dans cette étude réalisée sur le VHA et les souches de rotavirus, les virus ont été inactivés par la température. Ce type de « prétraitement-RT-qPCR » pourrait être adapté pour l'évaluation de l'efficacité virucide de différents types de process d'inactivation (UV, chlore, température..) utilisés dans l'industrie alimentaire (Wigginton et al., 2012). Cette approche reste cependant encore difficile à mettre en œuvre sur des échantillons alimentaires naturellement contaminés étant donné qu'ils ont pu subir plusieurs types d'inactivation (dans leur environnement ou l'industrie agroalimentaire).

En conclusion, ces travaux ont contribué à améliorer la détection, la quantification, le typage et la prise en compte du risque infectieux dans le diagnostic viral. Les nouvelles technologies de « PCR haut débit » qui ont été développées pourraient être utiles pour standardiser la quantification des virus entériques dans les aliments, réaliser des études de prévalence et enfin pourraient être étendue à la quantification des génomes d'autres pathogènes d'intérêt diagnostique en microbiologie alimentaire.

ANNEXE 1 : Mention « Thèse effectuée dans un environnement Qualité »

La mission principale de l'Anses est d'assurer la sécurité sanitaire humaine dans les domaines de l'environnement, du travail et de l'alimentation et d'assurer la protection de la santé et du bien-être des animaux et la protection de la santé des végétaux. Parmi les différents laboratoires, le laboratoire de sécurité des aliments est responsable de la caractérisation des dangers microbiologiques (bactéries et virus) et chimiques. Il a une mission de référence (LNR et LRUE) mais également une mission de recherche, en général réalisée au service de la référence et de l'expertise.

La politique Qualité du laboratoire est de s'engager en Qualité pour l'ensemble des activités réalisées au laboratoire, avec d'une part une démarche qualité pour les analyses (accréditation Cofrac selon le référentiel NF EN ISO 17025, cf. Portée disponible sur le www.cofrac.fr) et la réalisation d'essais interlaboratoires d'aptitude (EILA) ; et d'autre part la mise en place d'une démarche qualité en recherche. Le laboratoire s'est engagé à placer l'ensemble des travaux doctoraux sous qualité recherche grâce à l'aide de l'équipe *Qualité* assistée de la Mission *Soutien et valorisation de la recherche*.

Un système de management de la qualité en recherche a été mis en place et comprend une partie « Traçabilité analytique », basée sur le référentiel NF EN ISO 17025, et une partie « Traçabilité du raisonnement et Pilotage du projet ».

La partie « Traçabilité analytique » prend en compte les points suivants :

- **Compétence des personnels**
- **Gestion et métrologie des équipements, Gestion des consommables**
- **Traçabilité analytique** (traçabilité des expérimentations, Fiabilité des résultats : mise en place de contrôles internes et externes, Validation des méthodes développées : procédure existante pour l'accréditation ISO 17025 pour la gestion de la portée flexible (cf. portée disponible sur www.cofrac.fr)
- **Gestion de la documentation qualité recherche** (gestion des procédures et autres documents liés à un projet de recherche)

- **Dynamique d'amélioration** (processus de gestion des non-conformités, améliorations et outils associés identiques au Manuel Qualité Analyses, mise en place d'un processus d'audit spécifique aux doctorants, bilan du système de management de la qualité en recherche lors de la revue de direction annuelle du laboratoire)

La partie « Traçabilité du raisonnement et Pilotage du projet » prend en compte les points suivants :

- **Définition du projet** (objectifs, constitution de l'équipe et collaborations, étude de faisabilité et bibliographie)
- **Elaboration du plan expérimental** (Description et planification des actions, Elaboration du protocole d'expérimentation)
- **Mise en œuvre du plan expérimental** (Traçabilité intellectuelle (idées, hypothèses), suivi de l'évolution de la recherche, Traçabilité analytique)
- **Conclusion** (Analyse des résultats, Incertitudes, Conclusion pour chaque hypothèse)
- **Bilan intermédiaire – Bilan de fin de projet** (Analyse des écarts par rapport aux objectifs, Non-conformité analytique, Non confirmation d'hypothèse, Controverse, Relations avec le client de la recherche, Compte-rendu, Rapport final)
- **Diffusion des connaissances acquises** (publications, brevets, communications, congrès)

En ce qui concerne les doctorants, un suivi qualité, effectué par le service *Qualité* assisté de la *Mission Soutien et valorisation de la recherche*, est mis en place tout au long de la thèse, avec des entretiens et audits internes.

Au bout de 6 mois de thèse, l'équipe *Qualité* rencontre le doctorant (ainsi que le directeur de thèse, le chef d'unité). Cet entretien a pour objectif principal de vérifier l'appropriation de la démarche qualité et de la gestion de projet par le doctorant, ainsi que la progression de la mise sous assurance qualité de ses travaux. A cette occasion, le doctorant présente à l'attention de l'équipe *Qualité*, son sujet et les principales hypothèses de travail à partir desquelles il expérimente.

Au bout de 18 à 24 mois de thèse, un premier audit interne est réalisé, portant principalement sur la traçabilité des expérimentations mises en œuvre ainsi que de la traçabilité du raisonnement scientifique.

Au bout de 30 mois de thèse, un audit de vérification de la mise en œuvre des actions correctives signalées lors de l'audit précédent est effectué.

A l'issue de cet audit, un rapport (portant sur les points suivants : initiation du doctorant à l'Assurance Qualité, présentation du projet par le doctorant (objectifs/hypothèses), organisation de la documentation qualité, pilotage du projet, expérimentations et traçabilité, conclusion) est rédigé par l'équipe *Qualité* montrant l'implication du doctorant dans la démarche qualité ; ce rapport a vocation, avec l'accord de l'école doctorale, à être inséré dans le mémoire de thèse.

En effet, depuis 2008, l'Anses œuvre pour la mise en place de la mention qualité (« thèse effectuée dans un environnement Qualité ») dans le mémoire de thèse, avec depuis 2011 la mise en place d'un rapport qualité dans le mémoire de thèse avec l'accord de l'école doctorale ABIES (N 0435).

RAPPORT QUALITE POUR LE MEMOIRE DE THESE DE C. COUDRAY

« PROJET VIROPUCES »

Depuis 1990, le laboratoire de sécurité des aliments de l'Anses a mis en place une démarche qualité. Il est doté d'une mission *Qualité* rattachée à la direction du laboratoire. Le laboratoire est accrédité par le COFRAC selon le référentiel NF EN ISO 17025 (portée disponible sur www.cofrac.fr) pour un ensemble de programmes « Essais » correspondant à ses activités d'analyse de contaminants microbiologiques et physico-chimiques dans les aliments. Depuis 2001, le laboratoire a entrepris une démarche de qualité en recherche et a suivi en cela les recommandations de la commission AFNOR sur l'assurance qualité en recherche. Un système de management de la qualité en recherche a été mis en place au sein du laboratoire qui s'applique aux travaux de thèse. Un manuel pour la qualité en recherche auquel les unités accueillant des doctorants doivent se référer est en vigueur. Des audits internes sont réalisés régulièrement dans les unités et des doctorants par la mission *Qualité* qui reçoit pour cela l'appui de la mission *Soutien et Valorisation de la recherche*.

C'est dans ce contexte que le présent rapport qualité pour les travaux de thèse faisant l'objet de ce mémoire a été rédigé. Les audits et le rapport ci-dessous ne concernent que les travaux effectués à l'Anses, au laboratoire de sécurité des aliments de Maisons-Alfort.

Rédacteurs et auditeurs	Service de management de la qualité : H. Lelièvre (responsable), C. Cecconi et M. Poumeyrol (adjointes) devenu Mission Qualité au 1 ^{er} janvier 2014 : C. Cecconi (chef de la mission), A. Chausse (adjoint) Mission Soutien et valorisation de la recherche : S. Dragacci (chef de la mission, Directrice de recherche)
Audits Qualité	Février 2012 - Janvier 2013 - Janvier 2014
Unité d'accueil	Unité VAE-Virologie des aliments et dans l'eau, chef d'Unité S. Perelle - ANSES-Laboratoire de sécurité des aliments
Date début de thèse	Mai 2011
Acronyme Thèse	ViroPuces
Sujet de Thèse	Apport des biopuces au diagnostic des virus entériques transmissibles par la voie alimentaire
Direction de thèse	P. Fach (Anses, laboratoire Sécurité des aliments)
Chef de travaux à l'Anses	S. Perelle (Anses, Unité Virologie des aliments et dans l'eau)
Ecole doctorale	ABIES-Agriculture, Alimentation, Biologie, Environnement et Santé (ED n° 0435, AgroParisTech)
Comité de pilotage	Fach P. (Anses-Laboratoire Sécurité Aliments), Morin T. (Anses-Laboratoire de Ploufragan-Plouzané), Roque AM. (CNR Hépatites A et E, Hôpital P. Brousse, Villejuif), Belliot G. (CNR Virus entériques, CHU Dijon)
Correspondant qualité de l'Unité	A. Fraise

Extrait de la charte des thèses de l'Anses : « *Thèse et système de management de la qualité* : Les travaux de thèse doivent s'intégrer dans le système de management de la qualité en recherche en place au sein de l'entité. Le management de la qualité en recherche permet de garantir la bonne conduite de la recherche et ainsi de donner confiance dans les résultats de la recherche.

A ce titre, le doctorant accepte d'effectuer ses expériences et manipulations conformément aux méthodes contenues dans le manuel de la qualité du laboratoire dont il a pris connaissance. Le doctorant accepte qu'un

audit qualité ait lieu au cours de son travail ainsi qu'il y ait éventuellement un audit qualité à la fin de son travail, préliminaire à la rédaction du bilan qualité de la thèse par le responsable qualité de l'entité et qui devra accompagner son mémoire de thèse. D'autre part, le doctorant accepte qu'une fois par an ait lieu un bilan qualité de son travail dont les conclusions pourront comporter des suggestions d'amélioration. L'entité d'accueil du doctorant s'engage à prendre en charge et assurer la formation qualité de l'étudiant et à mettre à sa disposition toute la documentation qualité dont il a besoin. »

Initiation à l'assurance qualité

La doctorante a été formée de façon satisfaisante au système d'assurance qualité par la correspondante qualité de l'unité. Elle s'est rapidement approprié la démarche qualité et a utilisé le manuel de la qualité en recherche du laboratoire et la documentation afférente.

Présentation par la doctorante de son projet de recherche (objectifs, hypothèses de travail)

Le sujet de thèse a été présenté par la doctorante lors du premier audit. Les hypothèses de travail ont été clairement identifiées en prélude à l'organisation des travaux de thèse. Les parties expérimentales ont été construites et tracées de façon pertinente.

Gestion du projet de thèse

La doctorante s'est particulièrement investie dans la mise sous assurance qualité de ses travaux de thèse. La définition des objectifs, l'édification des hypothèses, les travaux et protocoles expérimentaux, l'enregistrement et le traitement des résultats acquis, leur analyse et interprétation et enfin la discussion-conclusion, voire l'émission de nouvelles hypothèses de travail, sont parfaitement détaillés et tracés. La valorisation des résultats est d'emblée inscrite dans le déroulement des travaux (rédaction des résultats validés sous format de publication).

La valorisation du projet de recherche est avérée par X publications publiées dont X en tant que premier auteur, plusieurs communications à congrès ou colloques dont X orales.

Traçabilité de la démarche et des expérimentations



La traçabilité de la démarche de recherche ainsi que celle des expérimentations mises en œuvre a été examinée en cours d'audit et s'est révélée exemplaire. La documentation qualité est convenablement utilisée : documents de définition et d'acceptation du projet, composition de l'équipe de recherche et du comité de pilotage et la description détaillée des tâches effectuées. Des rapports d'avancement et des rapports de réunion (notamment du comité de pilotage) complètent la documentation qualité de la thèse. Concernant la valorisation notamment sous forme de publications, des dossiers ont été constitués permettant de conserver la traçabilité des résultats publiés, les courriers échangés avec les éditeurs et les réponses apportées aux reviewers.

L'archivage de l'ensemble du dossier de recherche est effectué sur le réseau informatique de l'établissement (répertoire de l'unité d'accueil).

EN CONCLUSION, LA MISSION QUALITE DU LABORATOIRE DE SECURITE DES ALIMENTS ATTESTE QUE LES TRAVAUX DE THESE MENES PAR C. COUDRAY SE SONT DEROULES EN APPLIQUANT LES ELEMENTS DU SYSTEME QUALITE DU LABORATOIRE, CE QUI PERMET D'AVOIR CONFIANCE DANS LA CONDUITE DU PROJET DE THESE. C. COUDRAY S'EST

BEAUCOUP IMPLIQUEE DANS UNE REDACTION METICULEUSE DE SA DEMARCHE QUALITE DEPUIS L'HYPOTHESE DE TRAVAIL
JUSQU'A LA PUBLICATION DES RESULTATS, ET LA TRAÇABILITE DES EXPERIMENTATIONS A ETE EFFECTUEE DE FAÇON
PERTINENTE ET MINUTIEUSE.

Fait à Maisons-Alfort, le 14/03/14

 <p>S. Perelle Chef de travaux et Chef de l'Unité Virus Entériques Anses-Laboratoire de sécurité des aliments</p>	 <p>C. Cecconi Chef de la mission Qualité Anses-Laboratoire de sécurité des aliments</p>
--	--

ANNEXE 2 : La Digital PCR - fiche technique

La Digital PCR peut être réalisée avec différents appareils. Nous avons choisi l'appareil Fluidigm (commercialisé par Biomark) qui se trouve sur la plateforme IdentityPath, à l'Anses de Maisons-Alfort.



Figure 2a : De gauche à droite : **IFC Controller MX**, qui permet le chargement de la plaque ; **thermocycleur Fluidigm (Biomark)**, qui permet de réaliser l'étape d'amplification ; **ordinateur**, qui pilote le thermocycleur et permet le chargement et l'analyse des données.

Le principe général de la Digital PCR est le suivant :

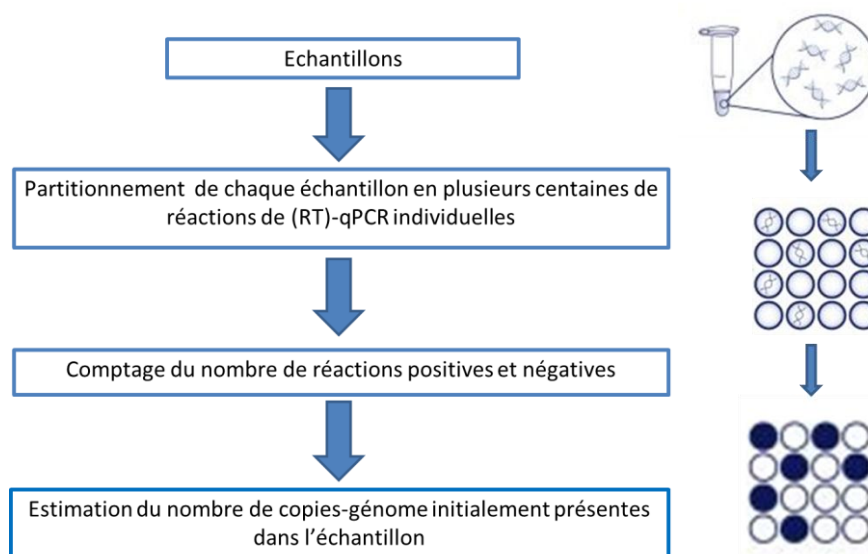


Figure 2b : Principe général de la Digital PCR

Les 48 échantillons à analyser sont chargés sur cette plaque. Le volume total (mix + génome viral) réellement analysé est de $0,65\mu\text{L}$ par échantillon, qui est partitionné en 770 chambres individuelles (sur la puce centrale) *via* des canaux microfluidiques.

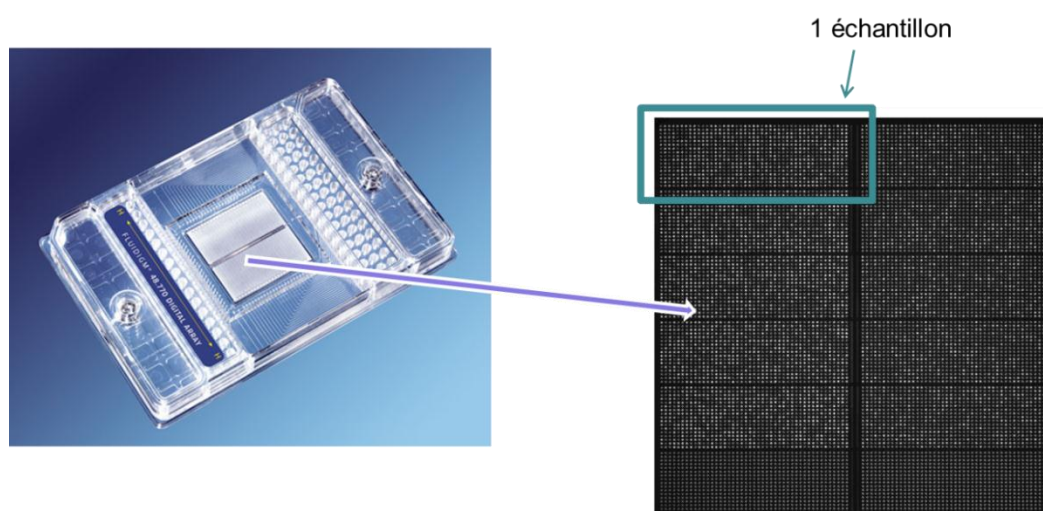


Figure 2c : A gauche : Plaque 48.770 ; A droite : Visualisation d'une partie de la puce centrale après chargement du mix (contenant du Rox)

Après l'étape d'amplification (RT-qPCR en une seule étape et suivant le même thermocyclage que celui optimisé pour une RT-qPCR classique), les données sont analysées.

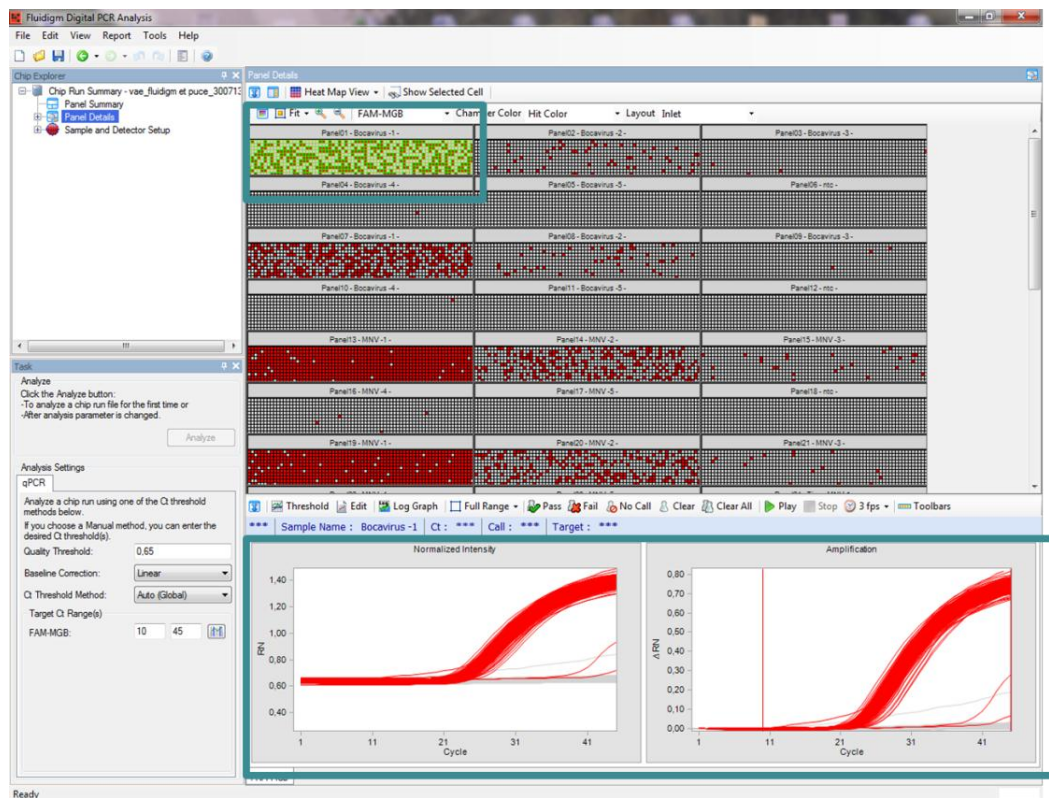


Figure 2d : Vue du logiciel d'analyse des résultats. En haut, les points rouges correspondent à des micro-chambres ou une courbe d'amplification est détectée et en gris là où il n'y en a pas. Le cadre bleu correspond aux 770 micro-chambres correspondant à 1 échantillon, dont les courbes d'amplification détectées sont visibles dans la partie basse de l'image.

Après la vérification des courbes d'amplification, le nombre de puits positifs et de puits négatifs dans les 770 chambres pour chaque échantillon déposé est déterminé par le logiciel. Celui-ci calcule automatiquement en se basant sur la loi de Poisson le nombre de copies-génomés (**quantité absolue**) initialement présent dans chacun des échantillons déposés.

ANNEXE 3 : La qPCR Array - fiche technique

La qPCR Array est réalisée sur l'appareil Fluidigm (commercialisé par Biomark) qui se trouve sur la plateforme IdentityPath, à l'Anses de Maisons-Alfort.



Figure 3a : De gauche à droite : **IFC Controller MX**, qui permet le chargement de la plaque ; **thermocycleur Fluidigm (Biomark)**, qui permet de réaliser l'étape d'amplification ; **ordinateur**, qui pilote le thermocycleur et permet le chargement et l'analyse des données.

L'appareil Fluidigm permet d'analyser des puces microfluidiques, soit la puce « BioMark 48.48 DynamicArray », permettant d'analyser 48 échantillons en regard de 48 sets d'amorces/sondes, avec un volume réactionnel de 10nl, soit la puce « BioMark 96.96 DynamicArray », permettant d'analyser 96 échantillons en regard de 96 sets d'amorces/sondes, avec un volume réactionnel de 6,75nl. La réaction de qPCR se déroule dans des microchambres réactionnelles, chargées *via* des canaux microfluidiques (Figure 3b).

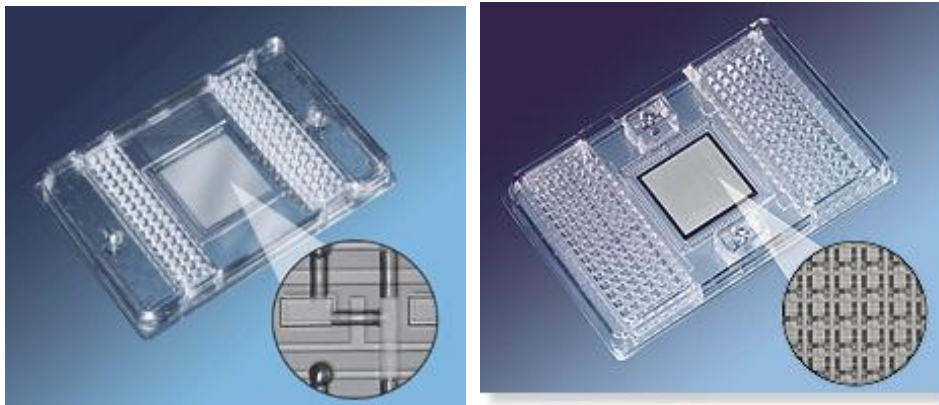


Figure 3b : BioMark 48.48 et 96.96 Dynamic Array

La distribution des échantillons et des mix réactionnels est réalisée à travers les circuits fluidiques intégrés (IFC) sur la puce centrale grâce à un appareil, l'IFC Controller, de telle sorte que chaque échantillon soit distribué avec chacun des mix réactionnels. Une fois le thermocyclage terminé, le logiciel de l'appareil donne les résultats sous forme de tableaux de Ct et sous forme de carte (figure 3c).

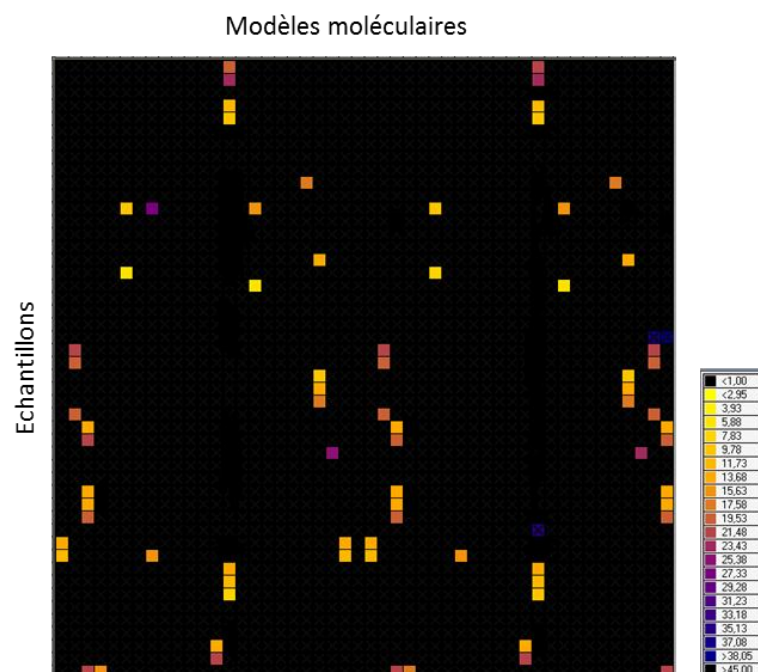


Figure 3c : Résultats obtenus: carte de la plaque 48.48 avec les couleurs qui sont fonction du Ct d'amplification obtenu

ANNEXE 4 : Valorisation des travaux

- Publications :

Coralie Coudray, Ghislaine Merle, Sandra Martin-Latil, Laurent Guillier, Sylvie Perelle.

Comparison of two extraction methods for the detection of hepatitis A virus in lettuces using the murine norovirus as a process control. *Journal of Virological Methods* 2013, 193:96-102. [publié](#)

- Coralie Coudray-Meunier, Audrey Fraisse, Sandra Martin-Latil, Laurent Guillier, Sylvie Perelle. **Discrimination of infectious hepatitis A virus and rotavirus by combining dyes and surfactants with RT-qPCR.** *BMC Microbiology* 2013, 13:216. [publié](#)

- Coralie Coudray-Meunier, Audrey Fraisse, Sandra Martin-Latil, Sylvie Perelle. **Hepatitis A virus genotyping based on RT-qPCR.** *BMC Microbiology* 2014, 14:296. [publié](#)

- Coralie Coudray-Meunier, Audrey Fraisse, Sandra Martin-Latil, Laurent Guillier, Sylvie Perelle. **Comparison of digital RT-PCR and quantitative RT-PCR for the detection of hepatitis A virus and norovirus in food samples and water.** *International Journal of Food Microbiology*. [en cours de révision](#)

- Coralie Coudray-Meunier, Audrey Fraisse, Sandra Martin-Latil, Sabine Delannoy, Patrick Fach, Sylvie Perelle. **A novel high-throughput method for molecular detection of human pathogenic viruses using a nanofluidic real-time PCR system.** [en cours d'écriture](#)

- Communications affichées :

- Journées ANSES, janvier 2013 :

« **Détection des particules virales infectieuses du virus de l'hépatite A (VHA) par RT-qPCR** »

- Journées ABIES (Ecole doctorale), mars 2013 :

« **Detection of infectious viral particles of the hepatitis A virus (HAV) by using a pre-treatment in combination with quantitative real time RT-PCR (RT-qPCR)** »

- European Congress of Virology, 11-14 sept 2013, à Lyon :

« **Detection of infectious viral particles of the hepatitis A virus (HAV) by using a pre-treatment in combination with quantitative real time RT-PCR (RT-qPCR)** »

- Journées ANSES, novembre 2013 :

« **Apport de la « RT-PCR Digital » pour la quantification des virus entériques : Application pour la quantification du virus de l'hépatite A et des Norovirus (génogroupes I et II) sur la laitue** »

- International Conference on Food and Environmental Virology, 2-5 septembre 2014, Corfu, Grèce :

« **Application of digital RT-PCR on food virology: detection of Hepatitis A Virus and Norovirus in lettuce samples** »

« **Hepatitis A virus subgenotyping based on RT-qPCR assays** »

- Communications orales :

- Journée de la plateforme nationale IdentityPath, 31 janvier 2014 :

« **Comparaison de 2 méthodes de quantification (RT-qPCR et RT-Digital-PCR) des génomes viraux dans les matrices alimentaires** »

- Journées Francophones de Virologie, 6 mars 2014 :

« **Comparaison de 2 méthodes de quantification (RT-qPCR et RT-Digital-PCR) des génomes viraux dans les matrices alimentaires** »

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abravanel, F., Chapuy-Regaud, S., Lhomme, S., Miedougé, M., Peron, J.-M., Alric, L., Rostaing, L., Kamar, N., Izopet, J., 2013. Performance of anti-HEV assays for diagnosing acute hepatitis E in immunocompromised patients. *Journal of Clinical Virology* 58, 624–628.
- AFSSA, 2007. Bilan des connaissances relatives aux virus transmissibles à l'homme par voie orale, disponible sur <https://www.anses.fr/fr/documents/MIC-Ra-VirusOral.pdf>
- Alcala, A., Vizzi, E., Rodriguez-Diaz, J., Zambrano, J.L., Betancourt, W., Liprandi, F., 2010. Molecular Detection and Characterization of Aichi Viruses in Sewage-Polluted Waters of Venezuela. *Applied and Environmental Microbiology* 76, 4113–4115.
- Allander, T., Tammi, M.T., Eriksson, M., Bjerkner, A., Tiveljung-Lindell, A., Andersson, B., 2005. Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 12891–12896.
- Ambert-Balay, K., Lorrot, M., Bon, F., Giraudon, H., Kaplon, J., Wolfer, M., Lebon, P., Gendrel, D., Pothier, P., 2008. Prevalence and Genetic Diversity of Aichi Virus Strains in Stool Samples from Community and Hospitalized Patients. *Journal of Clinical Microbiology* 46, 1252–1258.
- Anonymous, 2009 November 13. Hepatitis A Outbreak in Australia [Internet]. National Travel Health Network and Centre [cited 2010 March 25]. Disponible sur http://www.nathnac.org/pro/clinical_updates/hepatitisaoutbreakaustralia_131109healthprofessionals.htm.
- Arankalle VA, Chobe LP, Jha J, Chadha MS, Banerjee K, Favorov MO, et al. Aetiology of acute sporadic non-A, non-B viral hepatitis in India. *J Med Virol* 1993;40:121–5.
- Arcangeletti, M.C., De Conto, F., Pinardi, F., Medici, M.C., Valcavi, P., Ferraglia, F., Motta, F., Covan, S., Calderaro, A., Chezzi, C., Dettori, G., 2005. Electron microscopy as a reliable tool for rapid and conventional detection of enteric viral agents: a five-year experience report. *Acta Biomed* 76, 165–170.
- Arcangeletti, M.C., Dussaix, E., Ferraglia, F., Roque-Afonso, A.M., Graube, A., Chezzi, C., 2011. Multicentric evaluation of new commercial enzyme immunoassays for the detection of immunoglobulin M and total antibodies against hepatitis A virus. *Clinical and Vaccine Immunology* 18, 1391–1394.
- Arthur, J.L., Higgins, G.D., Davidson, G.P., Givney, R.C., Ratcliff, R.M., 2009. A Novel Bocavirus Associated with Acute Gastroenteritis in Australian Children. *PLoS Pathogens* 5, e1000391.
- Atmar, R.L., Neill, F.H., Romalde, J.L., Le Guyader, F., Woodley, C.M., Metcalf, T.G., Estes, M.K., 1995. Detection of Norwalk virus and hepatitis A virus in shellfish tissues with the PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 61, 3014–3018.
- Atmar, R.L., Estes, M.K., 2001. Diagnosis of Noncultivable Gastroenteritis Viruses, the Human Caliciviruses. *Clinical Microbiology Reviews* 14, 15–37.
- Aye TT, Uchida T, Ma XZ, Iida F, Shikata T, Zhuang H, et al. Complete nucleotide sequence of a hepatitis E virus isolated from the Xinjiang epidemic (1986–1988) of China. *Nucleic Acids Res* 1992;20:3512.
- Ayodeji, M., Kulka, M., Jackson, S.A., Patel, I., Mammel, M., Cebula, T.A., Goswami, B.B., 2009. A microarray based approach for the identification of common foodborne viruses. *The open virology journal* 3, 7.

- Baert, L., Uyttendaele, M., Debevere, J., 2007. Evaluation of two viral extraction methods for the detection of human noroviruses in shellfish with conventional and real-time reverse transcriptase PCR. *Letters in Applied Microbiology* 44, 106–111.
- Bailly JL., Mirand A., Henquell C., Archimbaud C., Chambon M., Charbonné F., Traoré O., Peigue-Lafeuille H., 2008. Génotypage et épidémiologie moléculaire des enterovirus non poliomyélitiques. *Virologie*, 12 (1), 53-65.
- Balogh, Z., Ferenczi, E., Szeles, K., Stefanoff, P., Gut, W., Szomor, K.N., Takacs, M., Berencsi, G., 2010. Tick-borne encephalitis outbreak in Hungary due to consumption of raw goat milk. *Journal of Virological Methods* 163, 481–485.
- Bank-Wolf, B.R., König, M., Thiel, H.J., 2010. Zoonotic aspects of infections with noroviruses and sapoviruses. *Veterinary Microbiology* 140, 204–212.
- Bányai, K., Jakab, F., Reuter, G., Bene, J., Uj, M., Meleg, B., Szücs, G., 2003. Sequence heterogeneity among human picobirnaviruses detected in a gastroenteritis outbreak. *Archives of Virology* 148, 2281–2291.
- Battaglioli, G., Nazarian, E.J., Lamson, D., Musser, K.A., St George, K., 2012. Evaluation of the RIDAQuick norovirus immunochromatographic test kit. *Journal of Clinical Virology* 53, 262–264.
- Belalov, I.S., Isaeva, O.V., Lukashev, A.N., 2011. Recombination in hepatitis A virus: evidence for reproductive isolation of genotypes. *Journal of General Virology* 92, 860–872.
- Berto, A., Van der Poel, W.H.M., Hakze-van der Honing, R., Martelli, F., La Ragione, R.M., Inglese, N., Collins, J., Grierson, S., Johne, R., Reetz, J., Dastjerdi, A., Banks, M., 2013a. Replication of hepatitis E virus in three-dimensional cell culture. *Journal of Virological Methods* 187, 327–332.
- Berto, A., Grierson, S., Hakze-van der Honing, R., Martelli, F., Johne, R., Reetz, J., Ulrich, R.G., Pavio, N., Van der Poel, W.H.M., Banks, M., 2013b. Hepatitis E virus in pork liver sausage, France. *Emerging Infectious Diseases journal* 19, 264–266.
- Bhat, S., Herrmann, J., Armishaw, P., Corbisier, P., Emslie, K.R., 2009. Single molecule detection in nanofluidic digital array enables accurate measurement of DNA copy number. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 394, 457–467.
- Bican, P., J. Cohen, A. Charpilienne, and R. Scherrer. 1982. Purification and characterization of bovine rotavirus cores. *J. Virol.* 43:1113-1117.
- Bidawid, S., Farber, J.M., Sattar, S.A., 2000. Rapid concentration and detection of hepatitis A virus from lettuce and strawberries. *Journal of Virological Methods* 88, 175–185.
- Biel, S.S., Gelderblom, H.R., 1999. Diagnostic electron microscopy is still a timely and rewarding method. *Journal of Clinical Virology* 13, 105–119.
- Bihari, C., Rastogi, A., Saxena, P., Rangegowda, D., Chowdhury, A., Gupta, N., Sarin, S.K., 2013. Parvovirus B19 Associated Hepatitis. *Hepatitis Research and Treatment* 2013, 1–9.
- Blaise-Boisseau, S., Hennechart-Collette, C., Guillier, L., Perelle, S., 2010. Duplex real-time qRT-PCR for the detection of hepatitis A virus in water and raspberries using the MS2 bacteriophage as a process control. *Journal of Virological Methods* 166, 48–53.
- Blank, C.A., Anderson, D.A., Beard, M., Lemon, S.M., 2000. Infection of polarized cultures of human intestinal epithelial cells with hepatitis A virus: vectorial release of progeny virions through apical cellular membranes. *Journal of Virology* 74, 6476–6484.
- Blanton, L.H., Adams, S.M., Beard, R.S., Wei, G., Bulens, S.N., Widdowson, M.A., Glass, R.I., Monroe,

- S.S., 2006. Molecular and epidemiologic trends of caliciviruses associated with outbreaks of acute gastroenteritis in the United States, 2000–2004. *Journal of Infectious Diseases* 193, 413–421.
- Blinkova, O., Rosario, K., Li, L., Kapoor, A., Slikas, B., Bernardin, F., Breitbart, M., Delwart, E., 2009. Frequent Detection of Highly Diverse Variants of Cardiovirus, Cosavirus, Bocavirus, and Circovirus in Sewage Samples Collected in the United States. *Journal of Clinical Microbiology* 47, 3507–3513.
- Bon, F., Kaplon, J., Metzger, M.-H., Pothier, P., 2007. Evaluation of seven immunochromatographic assays for the rapid detection of human rotaviruses in fecal specimens. *Pathologie Biologie* 55, 149–153.
- Boom, R., Sol, C.J., Salimans, M.M., Jansen, C.L., Wertheim-van Dillen, P.M., van der Noordaa, J., 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal of Clinical Microbiology* 28, 495–503.
- Boonham, N., Kreuze, J., Winter, S., van der Vlugt, R., Bergervoet, J., Tomlinson, J., Mumford, R., 2013. *Methods in virus diagnostics: From ELISA to Next Generation Sequencing*. Virus Research.
- Bosch, A., Sánchez, G., Le Guyader, F., Vanaclocha, H., Haugarreau, L., Pintó, R.M., 2001. Human enteric viruses in Coquina clams associated with a large hepatitis A outbreak. *Water Science and Technology* 43, 61–65.
- Bosch, A., Sánchez, G., Abbaszadegan, M., Carducci, A., Guix, S., Guyader, F.S., Netshikweta, R., Pintó, R.M., Poel, W.H.M., Rutjes, S., Sano, D., Taylor, M.B., Zyl, W.B., Rodríguez-Lázaro, D., Kovač, K., Sellwood, J., 2011. *Analytical Methods for Virus Detection in Water and Food*. Food Analytical Methods 4, 4–12.
- Bose, P.D., Das, B.C., Hazam, R.K., Kumar, A., Medhi, S., Kar, P., 2014. Evidence of extrahepatic replication of Hepatitis E virus in human placenta. *Journal of General Virology*.
- Brassard, J., Guévremont, É., Gagné, M.-J., Lamoureux, L., 2011. Simultaneous recovery of bacteria and viruses from contaminated water and spinach by a filtration method. *International Journal of Food Microbiology* 144, 565–568.
- Brassard, J., Gagne, M.-J., Genereux, M., Cote, C., 2012. Detection of Human Food-Borne and Zoonotic Viruses on Irrigated, Field-Grown Strawberries. *Applied and Environmental Microbiology* 78, 3763–3766.
- Brinkman, N.E., Fout, G.S., 2009. Development and evaluation of a generic tag array to detect and genotype noroviruses in water. *Journal of Virological Methods* 156, 8–18.
- Brown, M., Wilson-Friesen, H.L., Doane, F., 1992. A block in release of progeny virus and a high particle-to-infectious unit ratio contribute to poor growth of enteric adenovirus types 40 and 41 in cell culture. *Journal of Virology* 66, 3198–3205.
- Butot, S., Putallaz, T., Sánchez, G., 2007. Procedure for Rapid Concentration and Detection of Enteric Viruses from Berries and Vegetables. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 186–192.
- Butot, S., Putallaz, T., Sánchez, G., 2008. Effects of sanitation, freezing and frozen storage on enteric viruses in berries and herbs. *International Journal of Food Microbiology* 126, 30–35.
- Butot, S., Putallaz, T., Amoroso, R., Sánchez, G., 2009. Inactivation of enteric viruses in minimally processed berries and herbs. *Applied and Environmental Microbiology* 75, 4155–4161.
- Butot, S., Zuber, S., Baert, L., 2014. Sample preparation prior to molecular amplification: Complexities and opportunities. *Current Opinion in Virology* 4, 66–70.

- 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. *Journal of Food Protection*® 69, 2761–2765.
- Capobianchi, M.R., Giombini, E., Rozera, G., 2012. Next-generation sequencing technology in clinical virology. *Clinical Microbiology and Infection* 19, 15–22.
- Carpentier, A., Chaussade, H., Rigaud, E., Rodriguez, J., Berthault, C., Boue, F., Tognon, M., Touze, A., Garcia-Bonnet, N., Choutet, P., Coursaget, P., 2012. High Hepatitis E Virus Seroprevalence in Forestry Workers and in Wild Boars in France. *Journal of Clinical Microbiology* 50, 2888–2893.
- Carpi, G., Bertolotti, L., Rosati, S., Rizzoli, A., 2009. Prevalence and genetic variability of tick-borne encephalitis virus in host-seeking *Ixodes ricinus* in northern Italy. *Journal of General Virology* 90, 2877–2883.
- Casas, N., Suñén, E., 2002. Detection of enteroviruses, hepatitis A virus and rotaviruses in sewage by means of an immunomagnetic capture reverse transcription-PCR assay. *Microbiological research* 157, 169–176.
- Cascio, A., Bosco, M., Vizzi, E., Giammanco, A., Ferraro, D., Arista, S., 1996. Identification of picobirnavirus from faeces of Italian children suffering from acute diarrhea. *European Journal of Epidemiology* 12, 545–547.
- Castriciano, S., Luinstra, K., Petrich, A., Smieja, M., Lee, C., Jang, D., Portillo, E., Chernesky, M., 2007. Comparison of the RIDASCREEN norovirus enzyme immunoassay to IDEIA NLV GI/GII by testing stools also assayed by RT-PCR and electron microscopy. *Journal of Virological Methods* 141, 216–219.
- Chalupa, P., Vasickova, P., Pavlik, I., Holub, M., 2014. Endemic hepatitis E in the Czech Republic. *Clinical Infectious Diseases* 58, 509–516.
- Chan, M.C.W., Sung, J.J.Y., Lam, R.K.Y., Chan, P.K.S., Lai, R.W.M., Leung, W.K., 2006. Sapovirus detection by quantitative real-time RT-PCR in clinical stool specimens. *Journal of Virological Methods* 134, 146–153.
- Chan, C.V., Chan, C.D., Ma, C., Chan, H., 2011. Norovirus as cause of benign convulsion associated with gastro-enteritis. *Journal of Paediatrics and Child Health* 47, 373–377.
- Chen, S.Y., Tsai, C.N., Lai, M.W., Chen, C.-Y., Lin, K.-L., Lin, T.Y., Chiu, C.H., 2009. Norovirus Infection as a Cause of Diarrhea-Associated Benign Infantile Seizures. *Clinical Infectious Diseases* 48, 849–855.
- Chen, H., Mammel, M., Kulka, M., Patel, I., Jackson, S., Goswami, B.B., 2011. Detection and identification of common food-borne viruses with a tiling microarray. *The open virology journal* 5, 52.
- Chen, S.Y., Chiu, C.H., 2012. Worldwide molecular epidemiology of norovirus infection. *Paediatrics and International Child Health* 32, 128–131.
- Cheong, S., Lee, C., Choi, W.C., Lee, C.H., Kim, S.J., 2009. Concentration method for the detection of enteric viruses from large volumes of foods. *Journal of Food Protection*® 72, 2001–2005.
- Chonmaitree, T., Ford, C., Sanders, C., Lucia, H.L., 1988. Comparison of cell cultures for rapid isolation of enteroviruses. *Journal of Clinical Microbiology* 26, 2576–2580.
- Cisak, E., Wojcik-Fatla, A., Zajac, V., Sroka, J., Buczek, A., Dutkiewicz, J., 2010. Prevalence of Tick-borne encephalitis virus (TBEV) in samples of raw milk taken randomly from cows, goats and sheep in eastern Poland. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* 17, 283–286.

- Clemente-Casares, P., Pina, S., Buti, M., Jardi, R., Martin, M., Bofill-Mas, S., Girones, R., 2003. Hepatitis E Virus Epidemiology in Industrialized Countries. *Emerging Infectious Diseases journal* 9, 449–454.
- Cliver, D.O., 2009. Capsid and Infectivity in Virus Detection. *Food and Environmental Virology* 1, 123–128.
- Comelli, H., Rimstad, E., Larsen, S., Myrmel, M., 2008. Detection of norovirus genotype I.3b and II.4 in bioaccumulated blue mussels using different virus recovery methods. *International Journal of Food Microbiology* 127, 53–59.
- Contreras, P.J., Urrutia, H., Sossa, K., Nocker, A., 2011. Effect of PCR amplicon length on suppressing signals from membrane-compromised cells by propidium monoazide treatment. *Journal of Microbiological Methods* 87, 89–95.
- 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. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 3846–3855.
- 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. *Journal of Virology* 76, 9516–9525.
- Costa-Mattioli, M., Ferré, V., Casane, D., Perez-Bercoff, R., Coste-Burel, M., Imbert-Marcille, B.-M., Andre, E.C.M., Bressollette-Bodin, C., Billaudel, S., Cristina, J., 2003a. Evidence of recombination in natural populations of hepatitis A virus. *Virology* 311, 51–59.
- Costa-Mattioli, M., Di Napoli, A., Ferré, V., Billaudel, S., Perez-Bercof, R., Cristina, J., 2003b. Genetic variability of hepatitis A virus. *Journal of General Virology* 84, 3191–3201.
- Couturier E. L'hépatite E : synthèse de l'épidémiologie humaine. BEH Hors-série / 14 septembre 2010. Disponible sur <http://www.invs.sante.fr/beh/2010/hs/>
- Cristina, J., Costa-Mattioli, M., 2007. Genetic variability and molecular evolution of Hepatitis A virus. *Virus Research* 127, 151–157.
- Cromeans, T., Sobsey, M.D., Fields, H.A., 1987. Development of a plaque assay for a cytopathic, rapidly replicating isolate of hepatitis A virus. *Journal of Medical Virology* 22, 45–56.
- Crossan, C., Baker, P.J., Craft, J., Takeuchi, Y., Dalton, H.R., Scobie, L., 2012. Hepatitis E Virus Genotype 3 in Shellfish, United Kingdom. *Emerging Infectious Diseases* 18, 2085–2087.
- Cunha, C.B., Opal, S.M., 2014. Middle East respiratory syndrome (MERS), A new zoonotic viral pneumonia. *Virulence* 5:6, 650–654.
- D'Agostino, M., Cook, N., Rodriguez-Lazaro, D., Rutjes, S., 2011. Nucleic Acid Amplification-Based Methods for Detection of Enteric Viruses: Definition of Controls and Interpretation of Results. *Food and Environmental Virology* 3, 55–60.
- Da Silva, A.K., Le Saux, J.-C., Parnaudeau, S., Pommepuy, M., Elimelech, M., Le Guyader, F.S., 2007. Evaluation of Removal of Noroviruses during Wastewater Treatment, Using Real-Time Reverse Transcription-PCR: Different Behaviors of Genogroups I and II. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 7891–7897.
- Dancho, B.A., Chen, H., Kingsley, D.H., 2012. Discrimination between infectious and non-infectious human norovirus using porcine gastric mucin. *International Journal of Food Microbiology* 155, 222–226.
- Dare, R.K., Fry, A.M., Chittaganpitch, M., Sawanpanyalert, P., Olsen, S.J., Erdman, D.D., 2007. Human

- Coronavirus Infections in Rural Thailand: A Comprehensive Study Using Real-Time Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction Assays. *The Journal of Infectious Diseases* 196, 1321–1328.
- De Rougemont A., Kaplon J., Pothier P., 5ème séminaire des CNR, 28 mai 2008 Evolution des génotypes de rotavirus dans la population pédiatrique française. Présentation ppt.
- De Rougemont, A., Kaplon, J., Billaud, G., Lina, B., Pinchinat, S., Derrough, T., Caulin, E., Pothier, P., Floret, D., 2009. Sensitivity and specificity of the VIKIA Rota-Adeno immuno-chromatographic test (bioMérieux) and the ELISA IDEIA Rotavirus kit (Dako) compared to genotyping. *Pathologie Biologie* 57, 86–89.
- Delmas G, Jourdan da Silva N, Pihier N, Weill FX, Vaillant V, de Valk H. Les toxi-infections alimentaires collectives en France entre 2006 et 2008. *BEH* 31-32 / 27 juillet 2010. Disponible sur opac.invs.sante.fr/doc_num.php?explnum_id=265
- Dentinger, C.M., Bower, W.A., Nainan, O.V., Cotter, S.M., Myers, G., Dubusky, L.M., Fowler, S., Salehi, E.D., Bell, B.P., 2001. An outbreak of hepatitis A associated with green onions. *The Journal of Infectious Diseases* 183, 1273–1276.
- Desai, R., Hembree, C.D., Handel, A., Matthews, J.E., Dickey, B.W., McDonald, S., Hall, A.J., Parashar, U.D., Leon, J.S., Lopman, B., 2012. Severe outcomes are associated with genogroup 2 genotype 4 norovirus outbreaks: a systematic literature review *Clinical Infectious Diseases* 55, 189–193.
- Devonshire, A.S., Sanders, R., Wilkes, T.M., Taylor, M.S., Foy, C.A., Huggett, J.F., 2013. Application of next generation qPCR and sequencing platforms to mRNA biomarker analysis. *Methods* 59, 89–100.
- Di Bartolo, I., Diez-Valcarce, M., Vasickova, P., Kralik, P., Hernandez, M., Angeloni, G., Ostanello, F., Bouwknecht, M., Rodríguez-Lázaro, D., Pavlik, I., Ruggeri, F.M., 2012. Hepatitis E Virus in Pork Production Chain in Czech Republic, Italy, and Spain, 2010. *Emerging Infectious Diseases* 18(8), 1282–1289.
- Di Pasquale, S., Paniconi, M., Auricchio, B., Orefice, L., Schultz, A.C., De Medici, D., 2010. Comparison of different concentration methods for the detection of hepatitis A virus and calicivirus from bottled natural mineral waters. *Journal of Virological Methods* 165, 57–63.
- Dierssen, U., Rehren, F., Henke-Gendo, C., Harste, G., Heim, A., 2008. Rapid routine detection of enterovirus RNA in cerebrospinal fluid by a one-step real-time RT-PCR assay. *Journal of Clinical Virology* 42, 58–64.
- Diez-Valcarce, M., Cook, N., Hernández, M., Rodríguez-Lázaro, D., 2011. Analytical Application of a Sample Process Control in Detection of Foodborne Viruses. *Food Analytical Methods* 4, 614–618.
- Dingle, T.C., Sedlak, R.H., Cook, L., Jerome, K.R., 2013. Tolerance of Droplet-Digital PCR vs Real-Time Quantitative PCR to Inhibitory Substances. *Clinical Chemistry* 59, 1670–1672.
- Dreier, J., Stormer, M., Kleesiek, K., 2005. Use of Bacteriophage MS2 as an Internal Control in Viral Reverse Transcription-PCR Assays. *Journal of Clinical Microbiology* 43, 4551–4557.
- Drexler, J., Baumgarte S., de Souza Luna L.K., Eschbach-Bludau M., Lukashev A.N., Drosten C., 2011. Aichi Virus Shedding in High Concentrations in Patients with Acute Diarrhea. *Emerging Infectious Diseases* 17(8), 1544–1548.
- Drosten C, Gunther S, Preiser W, van der Werf S, Brodt HR, Becker S, et al. Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med* 2003 ; 348(20):1967–76.

- Dube, S., Qin, J., Ramakrishnan, R., 2008. Mathematical Analysis of Copy Number Variation in a DNA Sample Using Digital PCR on a Nanofluidic Device. *PLoS ONE* 3, e2876.
- Dubois, E., Agier, C., Traoré, O., Hennechart, C., Merle, G., Crucière, C., Laveran, H., 2002. Modified concentration method for the detection of enteric viruses on fruits and vegetables by reverse transcriptase-polymerase chain reaction or cell culture. *Journal of Food Protection*® 65, 1962–1969.
- Dubois, E., Hennechart, C., Deboosère, N., Merle, G., Legeay, O., Burger, C., Le Calvé, M., Lombard, B., Ferré, V., Traoré, O., 2006. Intra-laboratory validation of a concentration method adapted for the enumeration of infectious F-specific RNA coliphage, enterovirus, and hepatitis A virus from inoculated leaves of salad vegetables. *International Journal of Food Microbiology* 108, 164–171.
- 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. *International Journal of Food Microbiology* 117, 141–149.
- Duizer, E., Schwab, K.J., Neill, F.H., Atmar, R.L., Koopmans, M.P.G., Estes, M.K., 2004. Laboratory efforts to cultivate noroviruses. *Journal of General Virology* 85, 79–87.
- EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ); Scientific Opinion on An update on the present knowledge on the occurrence and control of foodborne viruses. *EFSA Journal* 2011; 9(7):2190. [96 pp.] doi:10.2903/j.efsa.2011.2190. Available online: www.efsa.europa.eu/efsajournal
- El-Senousy, W.M., Costafreda, M.I., Pintó, R.M., Bosch, A., 2013. Method validation for norovirus detection in naturally contaminated irrigation water and fresh produce. *International Journal of Food Microbiology* 167, 74–79.
- Endo, R., Ishiguro, N., Kikuta, H., Teramoto, S., Shirkoohi, R., Ma, X., Ebihara, T., Ishiko, H., Ariga, T., 2007. Seroepidemiology of Human Bocavirus in Hokkaido Prefecture, Japan. *Journal of Clinical Microbiology* 45, 3218–3223.
- Enouf, V., Dos Reis, G., Guthmann, J.P., Guerin, P.J., Caron, M., Marechal, V., Nicand, E., 2006. Validation of single real-time TaqMan® PCR assay for the detection and quantitation of four major genotypes of hepatitis E virus in clinical specimens. *Journal of Medical Virology* 78, 1076–1082.
- European Centre for Disease Prevention and Control and the European Food Safety Authority, 2014; Outbreak of hepatitis A in EU/EEA countries - Second update. EFSA supporting publication 2014 : EN - 581.14pp.
- European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control, 2012. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2010 ; *EFSA Journal* 2012; 10(3):2597. [442pp.] doi:10.2903/j.efsa.2012.2597. Available online: www.efsa.europa.eu/efsajournal
- Estes, M.K., Cohen, J., 1989. Rotavirus gene structure and function. *Microbiological Reviews* 53, 410–449.
- Fakruddin, M., Mannan, K.S.B., Chowdhury, A., Mazumdar, R.M., Hossain, M.N., Islam, S., Chowdhury, M.A., 2013. Nucleic acid amplification: Alternative methods of polymerase chain reaction. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences* 5, 245–252.
- FAO/WHO [Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization]. 2008. Microbiological hazards in fresh leafy vegetables and herbs: Meeting Report. Microbiological Risk Assessment Series No. 14. Rome. 151pp

- Farkas, T., Zhong, W.M., Jing, Y., Huang, P.W., Espinosa, S.M., Martinez, N., Morrow, A.L., Ruiz-Palacios, G.M., Pickering, L.K., Jiang, X., 2004. Genetic diversity among sapoviruses. *Archives of Virology* 149.
- Finkbeiner, S.R., Zeng, X.-L., Utama, B., Atmar, R.L., Shroyer, N.F., Estes, M.K., 2012. Stem cell-derived human intestinal organoids as an infection model for rotaviruses. *MBio* 3, e00159–00112.
- Fino, V.R., Kniel, K.E., 2008. Comparative recovery of foodborne viruses from fresh produce. *Foodborne pathogens and disease* 5, 819–825.
- Fittipaldi, M., Rodriguez, N.J.P., Codony, F., Adrados, B., Peñuela, G.A., Morató, J., 2010. Discrimination of infectious bacteriophage T4 virus by propidium monoazide real-time PCR. *Journal of Virological Methods* 168, 228–232.
- FitzSimons, D., Hendrickx, G., Vorsters, A., Van Damme, P., 2010. Hepatitis A and E: Update on prevention and epidemiology. *Vaccine* 28, 583–588.
- Flewett, T. H., A. S. Bryden, H. Davies, G. N. Woode, J. C. Bridger, and J. M. Derrick. 1974. Relation between viruses from acute gastroenteritis of children and newborn calves. *Lancet* ii:61-63.
- 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. *International Journal of Food Microbiology* 151, 98–104.
- Franco, E., 2012. Hepatitis A: Epidemiology and prevention in developing countries. *World Journal of Hepatology* 4, 68.
- Fregolente, M.C.D., de Castro-Dias, E., Martins, S.S., Spilki, F.R., Allegretti, S.M., Gatti, M.S.V., 2009. Molecular characterization of picobirnaviruses from new hosts. *Virus Research*. 143, 134–136.
- Fregolente, M.C.D., Gatti, M.S.V., 2009. Nomenclature proposal for picobirnavirus. *Archives of Virology* 154, 1953–1954.
- Fuentes, C., Guix, S., Pérez-Rodríguez, F.J., Fuster, N., Carol, M., Pintó, R.M., Bosch, A., 2014. Standardized multiplex one-step qRT-PCR for hepatitis A virus, norovirus GI and GII quantification in bivalve mollusks and water. *Food Microbiology* 40, 55–63.
- Fuhrman, J.A., Liang, X., Noble, R.T., 2005. Rapid detection of enteroviruses in small volumes of natural waters by real-time quantitative reverse transcriptase PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 4523–4530.
- Gallay, A., De Valk, H., Cournot, M., Ladeuil, B., Hemery, C., Castor, C., Bon, F., Mégraud, F., Le Cann, P., Desenclos, J.C., the Outbreak Investigation Team, 2006. A large multi-pathogen waterborne community outbreak linked to faecal contamination of a groundwater system, France, 2000. *Clinical Microbiology and Infection* 12, 561–570.
- Gallimore, C.I., Appleton, H., Lewis, D., Green, J., Brown, D.W., 1995. Detection and characterisation of bisegmented double-stranded RNA viruses (picobirnaviruses) in human faecal specimens. *Journal of Medical Virology* 45, 135–140.
- Gallimore, C.I., Pipkin, C., Shrimpton, H., Green, A.D., Pickford, Y., McCARTNEY, C., Sutherland, G., Brown, D.W.G., Gray, J.J., 2005. Detection of multiple enteric virus strains within a foodborne outbreak of gastroenteritis: an indication of the source of contamination. *Epidemiology and Infection* 133, 41–47.
- Gallot, C., Grout, L., Roque-Afonso, A.M., Couturier, E., Carrillo-Santistevé, P., Pouey, J., Letort, M.J., Hoppe, S., Capdepon, P., Saint-Martin, S., De Valk, H., Vaillant, V., 2011. Hepatitis A associated with semidried tomatoes, France, 2010. *Emerging Infectious Diseases journal* 17,

- 566–567.
- Gaumann, R., Muhlemann, K., Strasser, M., Beuret, C.M., 2010. High-Throughput Procedure for Tick Surveys of Tick-Borne Encephalitis Virus and Its Application in a National Surveillance Study in Switzerland. *Applied and Environmental Microbiology* 76, 4241–4249.
- Gaunt, E.R., Hardie, A., Claas, E.C.J., Simmonds, P., Templeton, K.E., 2010. Epidemiology and Clinical Presentations of the Four Human Coronaviruses 229E, HKU1, NL63, and OC43 Detected over 3 Years Using a Novel Multiplex Real-Time PCR Method. *Journal of Clinical Microbiology* 48, 2940–2947.
- Gautam, R., Lyde, F., Esona, M.D., Quaye, O., Bowen, M.D., 2013. Comparison of Premier™ Rotaclone®, ProSpecT™, and RIDASCREEN® rotavirus enzyme immunoassay kits for detection of rotavirus antigen in stool specimens. *Journal of Clinical Virology* 58, 292–294.
- Gensberger, E.T., Kostić, T., 2013. Novel tools for environmental virology. *Current Opinion in Virology* 3, 61–68.
- Gibson, K.E., 2014. Viral pathogens in water: occurrence, public health impact, and available control strategies. *Current Opinion in Virology* 4, 50–57.
- Gillesberg Lassen, S., Soborg, B., Midgley, S.E., Steens, A., Vold, L., Stene-Johansen, K., Rimhanen-Finne, R., Kontio, M., Löfdahl, M., Sundqvist, L., Edelstein, M., Jensen, T., Vestergaard, H.T., Fischer, T.K., Mølbak, K., Ethelberg, S., 2013. Ongoing multi-strain food-borne hepatitis A outbreak with frozen berries as suspected vehicle: four Nordic countries affected, October 2012 to April 2013. *Eurosurveillance* 18, 20467.
- Girard, M., Morales-Rayas, R., Jean, J., 2013. Comparison of RNA Extraction Methods for the Detection of a Norovirus Surrogate in Ready-to-Eat Foods. *Foodborne Pathogens and Disease* 10, 47–54.
- Gofti-Laroche, L., Gratacap-Cavallier, B., Demanse, D., Genoulaz, O., Seigneurin, J.-M., Zmirou, D., 2003. Are waterborne astrovirus implicated in acute digestive morbidity (E. MI. RA study)? *Journal of Clinical Virology* 27, 74–82.
- Goldsmith, C.S., Miller, S.E., 2009. Modern Uses of Electron Microscopy for Detection of Viruses. *Clinical Microbiology Reviews* 22, 552–563.
- Graff JW, Ewen J, Ettayebi K, Hardy ME. Zinc-binding domain of rotavirus NSP1 is required for proteasome-dependent degradation of IRF3 and autoregulatory NSP1 stability. *J Gen Virol.* 2007; 88:613–620.
- Graiver, D.A., Saunders, S.E., Topliff, C.L., Kelling, C.L., Bartelt-Hunt, S.L., 2010. Ethidium monoazide does not inhibit RT-PCR amplification of nonviable avian influenza RNA. *Journal of Virological Methods* 164, 51–54.
- Green, K. Y., R. M. Chanock, A. Z. Kapikian. 2001. Human caliciviruses, p. 841-873. *In* D. M. Knipe and P. M. Howley (ed.), *Fields virology*, Fourth Edition, vol. 1. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Pa.
- Gregory, J.B., Litaker, R.W., Noble, R.T., 2006. Rapid One-Step Quantitative Reverse Transcriptase PCR Assay with Competitive Internal Positive Control for Detection of Enteroviruses in Environmental Samples. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 3960–3967.
- Griffin, D.W., Donaldson, K.A., Paul, J.H., Rose, J.B., 2003. Pathogenic Human Viruses in Coastal Waters. *Clinical Microbiology Reviews* 16, 129–143.
- Gritsun, T.S., Lashkevich, V.A., Gould, E.A., 2003. Tick-borne encephalitis. *Antiviral research* 57, 129–146.

- Grodzki, M., Schaeffer, J., Piquet, J.C., Le Saux, J.C., Chev , J., Ollivier, J., Le Pendu, J., Le Guyader, F.S., 2014. Bioaccumulation efficiency tissue distribution, and environmental occurrence Of hepatitis E virus in bivalve shellfish from France. *Applied and Environmental Microbiology* 80, 4269–4276.
- Guillois-B cel, Y., Couturier, E., Le Saux, J.C., Roque-Afonso, A.M., Le Guyader, F.S., Le Goas, A., Pern s, J., Le Behec, S., Briand, A., Robert, C., Dussaix, E., Pommepuy, M., Vaillant, V., 2009. An oyster-associated hepatitis A outbreak in France in 2007. *Eurosurveillance* 14,19144.
- Guix S., Bosch A., Pinto R.M., 2007 : Chapter 22, *Astrovirus Replication: An Overview*, p571-596
- Gutierrez-Aguirre, I., Steyer, A., Boben, J., Gruden, K., Poljsak-Prijatelj, M., Ravnkar, M., 2008. Sensitive Detection of Multiple Rotavirus Genotypes with a Single Reverse Transcription-Real-Time Quantitative PCR Assay. *Journal of Clinical Microbiology* 46, 2547–2554.
- Hall, A.J., Eisenbart, V.G., Eting e, A.L., Gould, L.H., Lopman, B.A., Parashar, U.D., 2012. Epidemiology of foodborne norovirus outbreaks, United States, 2001-2008. *Emerging Infectious Diseases journal* 18, 1566–1573.
- Hamza, I.A., Jurzik, L., Wilhelm, M., Uberla, K., 2009. Detection and quantification of human bocavirus in river water. *Journal of General Virology* 90, 2634–2637.
- Hamza, I.A., Jurzik, L.,  berla, K., Wilhelm, M., 2011a. Evaluation of pepper mild mottle virus, human picobirnavirus and Torque teno virus as indicators of fecal contamination in river water. *Water Research* 45, 1358–1368.
- Hamza, I.A., Jurzik, L.,  berla, K., Wilhelm, M., 2011b. Methods to detect infectious human enteric viruses in environmental water samples. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 214, 424–436.
- Haramoto, E., Katayama, H., Phanuwat, C., Ohgaki, S., 2008. Quantitative detection of sapoviruses in wastewater and river water in Japan. *Letters in Applied Microbiology* 46, 408–413.
- Haramoto, E., Otagiri, M., 2014. Occurrence of Human Cosavirus in Wastewater and River Water in Japan. *Food and Environmental Virology* 6, 62-66.
- Harrington PR, Lindesmith L, Yount B, et al. Binding of Norwalk virus-like particles to ABH histo-blood group antigens is blocked by antisera from infected human volunteers or experimentally vaccinated mice. *J Virol* 2002 ; 76 : 12335-43.
- Hata, A., Katayama, H., Kitajima, M., Visvanathan, C., Nol, C., Furumai, H., 2011. Validation of Internal Controls for Extraction and Amplification of Nucleic Acids from Enteric Viruses in Water Samples. *Applied and Environmental Microbiology* 77, 4336–4343.
- Hennechart-Collette, C., Martin-Latil, S., Guillier, L., Perelle, S., 2014. Multiplex real-time RT-qPCR for the detection of Norovirus in bottled and tap water using murine norovirus as a process control. *Journal of Applied Microbiology* 116, 179–190.
- Hennechart-Collette C, Martin-Latil S, Guillier L, Perelle S. Determination of which virus to use as a process control when testing for the presence of hepatitis A virus and norovirus in food and water. *Manuscrit en préparation*
- Henrich, T.J., Gallien, S., Li, J.Z., Pereyra, F., Kuritzkes, D.R., 2012. Low-level detection and quantitation of cellular HIV-1 DNA and 2-LTR circles using droplet digital PCR. *Journal of Virological Methods* 186, 68–72.
- Hernández, F., Monge, R., Jiménez, C., Taylor, L., 1997. Rotavirus and hepatitis A virus in market lettuce (*Latuca sativa*) in Costa Rica. *International Journal of Food Microbiology* 37, 221–223.
- Hida K., Kulka M., Papafragkou E., 2013. Development of a rapid total nucleic acid extraction method

- for the isolation of hepatitis A virus from fresh produce. . International Journal of Food Microbiology 161, 143-150.
- Hindson, B.J., Ness, K.D., Masquelier, D.A., Belgrader, P., Heredia, N.J., Makarewicz, A.J., Bright, I.J., Lucero, M.Y., Hiddessen, A.L., Legler, T.C., Kitano, T.K., Hodel, M.R., Petersen, J.F., Wyatt, P.W., Steenblock, E.R., Shah, P.H., Bousse, L.J., Troup, C.B., Mellen, J.C., Wittmann, D.K., Erndt, N.G., Cauley, T.H., Koehler, R.T., So, A.P., Dube, S., Rose, K.A., Montesclaros, L., Wang, S., Stumbo, D.P., Hodges, S.P., Romine, S., Milanovich, F.P., White, H.E., Regan, J.F., Karlin-Neumann, G.A., Hindson, C.M., Saxonov, S., Colston, B.W., 2011. High-Throughput Droplet Digital PCR System for Absolute Quantitation of DNA Copy Number. Analytical Chemistry 83, 8604–8610.
- Hindson, C.M., Chevillet, J.R., Briggs, H.A., Gallichotte, E.N., Ruf, I.K., Hindson, B.J., Vessella, R.L., Tewari, M., 2013. Absolute quantification by droplet digital PCR versus analog real-time PCR. Nature Methods 10, 1003–1005.
- Holtz, L.R., Finkbeiner, S.R., Kirkwood, C.D., Wang, D., 2008. Identification of a novel picornavirus related to cosaviruses in a child with acute diarrhea. Virology Journal 5, 159.
- Holzmann, H., Aberle, S.W., Stiasny, K., Werner, P., Mischak, A., Zainer, B., Netzer, M., Koppi, S., Bechter, E., Heinz, F.X., 2009. Tick-borne encephalitis from eating goat cheese in a mountain region of Austria. Emerging infectious diseases 15(10), 1671–1673.
- Hooper, R.R., Juels, C.W., Routenberg, J.A., Harrison, W.O., Kilpatrick, M.E., Kendra, S.J., Dienstag, J.L., 1977. An outbreak of type A viral hepatitis at the Naval Training Center, San Diego: epidemiologic evaluation. American Journal of Epidemiology 105, 148–155.
- Hoorfar, J., Malorny, B., Abdulmawjood, A., Cook, N., Wagner, M., Fach, P., 2004. Practical considerations in design of internal amplification controls for diagnostic PCR assays. Journal of Clinical Microbiology 42, 1863–1868.
- Hoshino, Y., Kapikian, A.Z., 2000. Rotavirus serotypes: classification and importance in epidemiology, immunity, and vaccine development. J Health Popul Nutr 18, 5–14.
- Hu, L., Crawford, S.E., Hyser, J.M., Estes, M.K., Prasad, B.V.V., 2012. Rotavirus non-structural proteins: Structure and Function. Current Opinion in Virology 2, 380–388.
- Huang, R., Li, X., Huang, Y., Chen, H., 2014. Strategies to enhance high pressure inactivation of murine norovirus in strawberry puree and on strawberries. International Journal of Food Microbiology 185, 1–6.
- Hudopisk, N., Korva, M., Janet, E., Simetinger, M., Grgič-Vitek, M., Gubenšek, J., Natek, V., Kraigher, A., Strle, F., Avšič-Županc, T., 2013. Tick-borne encephalitis associated with consumption of raw goat milk, Slovenia, 2012. Emerging Infectious Diseases journal 19, 806–808.
- Hutson AM, Airaud F, LePendou J, Estes MK, Atmar RL. Norwalk virus infection associates with secretor status genotyped from sera. J Med Virol. 2005 Sep;77(1): 116-20.
- Hyeon, J.-Y., Chon, J.-W., Park, C., Lee, J.-B., Choi, I.-S., Kim, M.-S., Seo, K.-H., 2011. Rapid Detection Method for Hepatitis A Virus from Lettuce by a Combination of Filtration and Integrated Cell Culture–Real-Time Reverse Transcription PCR. Journal of Food Protection 74, 1756–1761.
- ICTV, disponible sur <http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>
- Iritani, N., Kaida, A., Abe, N., Kubo, H., Sekiguchi, J.-I., Yamamoto, S.P., Goto, K., Tanaka, T., Noda, M., 2014. Detection and genetic characterization of human enteric viruses in oyster-associated gastroenteritis outbreaks between 2001 and 2012 in Osaka City, Japan. Journal of Medical Virology doi: 10.1002/jmv.23883
- Ishida, S., Yoshizumi, S., Ikeda, T., Miyoshi, M., Goto, A., Matsubayashi, K., Ikeda, H., 2012. Detection

- and molecular characterization of hepatitis E virus in clinical, environmental and putative animal sources. *Archives of Virology* 157, 2363–2368.
- Ishii, S., Segawa, T., Okabe, S., 2013. Simultaneous quantification of multiple food- and waterborne pathogens by use of microfluidic quantitative PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 79, 2891–2898.
- ISO/TS 15216-1. Microbiology of food and animal feed -- Horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus in food using real-time RT-PCR -- Part 1: Method for quantification. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland. 2013.
- ISO/TS 15216-2. Microbiology of food and animal feed -- Horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus in food using real-time RT-PCR -- Part 2: Method for qualitative detection. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland. 2013.
- Ito, S., Takeshita, S., Nezu, A., Aihara, Y., Usuku, S., Noguchi, Y., Yokota, S., 2006. Norovirus-associated encephalopathy. *The Pediatric Infectious Disease Journal* 25, 651–652.
- Iturriza-Gómara, M., Dallman, T., Bányai, K., Böttiger, B., Buesa, J., Diedrich, S., Fiore, L., Johansen, K., Korsun, N., Kroneman, A., Lappalainen, M., László, B., Maunula, L., Matthinjssens, J., Midgley, S., Mladenova, Z., Poljsak-Prijatelj, M., Pothier, P., Ruggeri, F.M., Sanchez-Fauquier, A., Schreier, E., Steyer, A., Sidaraviciute, I., Tran, A.N., Usonis, V., Van Ranst, M., de Rougemont, A., Gray, J., 2009. Rotavirus surveillance in europe, 2005-2008: web-enabled reporting and real-time analysis of genotyping and epidemiological data. *The Journal of Infectious Diseases* 200 Suppl 1, S215–221.
- Jääskeläinen, A.J., Maunula, L., 2006. Applicability of microarray technique for the detection of noro- and astroviruses. *Journal of Virological Methods* 136, 210–216.
- Jacobsen, K.H., Wiersma, S.T., 2010. Hepatitis A virus seroprevalence by age and world region, 1990 and 2005. *Vaccine* 28, 6653–6657.
- Jang, J.S., Simon, V.A., Feddersen, R.M., Rakhshan, F., Schultz, D.A., Zschunke, M.A., Lingle, W.L., Kolbert, C.P., Jen, J., 2011. Quantitative miRNA expression analysis using fluidigm microfluidics dynamic arrays. *BMC Genomics* 12, 144.
- Jayaram, H., Estes, M.K., Prasad, B.V.V., 2004. Emerging themes in rotavirus cell entry, genome organization, transcription and replication. *Virus Research* 101, 67–81.
- Jebblaoui, A., Haim-Boukobza, S., Marchadier, E., Mokhtari, C., Roque-Afonso, A.-M., 2013. Genotype 4 Hepatitis E Virus in France: An Autochthonous Infection With a More Severe Presentation. *Clinical Infectious Diseases* 57, e122–e126.
- Jevšnik, M., Uršič, T., Zigon, N., Lusa, L., Krivec, U., Petrovec, M., 2012. Coronavirus infections in hospitalized pediatric patients with acute respiratory tract disease. *BMC Infectious Diseases* 12, 365.
- Jevšnik, M., Steyer, A., Zrim, T., Pokorn, M., Mrvič, T., Grosek, Š., Strle, F., Lusa, L., Petrovec, M., 2013. Detection of human coronaviruses in simultaneously collected stool samples and nasopharyngeal swabs from hospitalized children with acute gastroenteritis. *Virology journal* 10, 46.
- Jiang, B., Monroe, S.S., Koonin, E.V., Stine, S.E., Glass, R.I., 1993. RNA sequence of astrovirus: distinctive genomic organization and a putative retrovirus-like ribosomal frameshifting signal that directs the viral replicase synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90, 10539–10543.
- Joshi, M.S., Walimbe, A.M., Chitambar, S.D., 2008. Evaluation of genomic regions of hepatitis A virus

- for phylogenetic analysis: Suitability of the 2C region for genotyping. *Journal of Virological Methods* 153, 36–42.
- 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. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 3359–3363.
- Jothikumar, N., Cromeans, T.L., Robertson, B.H., Meng, X.J., Hill, V.R., 2006. A broadly reactive one-step real-time RT-PCR assay for rapid and sensitive detection of hepatitis E virus. *Journal of Virological Methods* 131, 65–71.
- Jothikumar, N., Sobsey, M.D., Cromeans, T.L., 2010. Development of an RNA extraction protocol for detection of waterborne viruses by reverse transcriptase quantitative PCR (RT-qPCR). *Journal of Virological Methods* 169, 8–12.
- Kageyama, T., Kojima, S., Shinohara, M., Uchida, K., Fukushi, S., Hoshino, F.B., Takeda, N., Katayama, K., 2003. Broadly Reactive and Highly Sensitive Assay for Norwalk-Like Viruses Based on Real-Time Quantitative Reverse Transcription-PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 41, 1548–1557.
- Kaida, A., Kubo, H., Sekiguchi, J.-I., Ohyama, M., Goto, K., Hase, A., Iritani, N., 2012. Detection of five rash-associated viruses using multiplex real-time PCR during 2006–2011. *Japanese journal of infectious diseases* 65, 430–432.
- Kamar, N., Bendall, R., Legrand-Abravanel, F., Xia, N.-S., Ijaz, S., Izopet, J., Dalton, H.R., 2012. Hepatitis E. *Lancet* 379, 2477–2488.
- Kamar, N., Dalton, H.R., Abravanel, F., Izopet, J., 2014. Hepatitis E Virus Infection. *Clinical Microbiology Reviews* 27, 116–138.
- Kapoor, A., Victoria, J., Simmonds, P., Slikas, E., Chieochansin, T., Naeem, A., Shaukat, S., Sharif, S., Alam, M.M., Angez, M., 2008. A highly prevalent and genetically diversified Picornaviridae genus in South Asian children. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105, 20482–20487.
- Kapoor, A., Slikas, E., Simmonds, P., Chieochansin, T., Naeem, A., Shaukat, S., Alam, M.M., Sharif, S., Angez, M., Zaidi, S., Delwart, E., 2009. A Newly Identified Bocavirus Species in Human Stool. *The Journal of Infectious Diseases* 199, 196–200.
- Kapoor, A., Simmonds, P., Slikas, E., Li, L., Bodhidatta, L., Sethabutr, O., Triki, H., Bahri, O., Oderinde, B.S., Baba, M.M., Bukbuk, D.N., Besser, J., Bartkus, J., Delwart, E., 2010. Human Bocaviruses Are Highly Diverse, Dispersed, Recombination Prone, and Prevalent in Enteric Infections. *The Journal of Infectious Diseases* 201, 1633–1643.
- Kapusinszky, B., Minor, P., Delwart, E., 2012. Nearly Constant Shedding of Diverse Enteric Viruses by Two Healthy Infants. *Journal of Clinical Microbiology* 50, 3427–3434.
- Katayama, H., Haramoto, E., Oguma, K., Yamashita, H., Tajima, A., Nakajima, H., Ohgaki, S., 2008. One-year monthly quantitative survey of noroviruses, enteroviruses, and adenoviruses in wastewater collected from six plants in Japan. *Water Research* 42, 1441–1448.
- Khamrin, P., Nguyen, T.A., Phan, T.G., Satou, K., Masuoka, Y., Okitsu, S., Maneekarn, N., Nishio, O., Ushijima, H., 2008. Evaluation of immunochromatography and commercial enzyme-linked immunosorbent assay for rapid detection of norovirus antigen in stool samples. *Journal of Virological Methods* 147, 360–363.
- Khuroo MS, Saleem M, Teli MR, Sofi MA. Failure to detect chronic liver disease after epidemic non-A, non-B hepatitis. *Lancet* 1980;2:97–8.
- Kim, H.-Y., Kwak, I.-S., Hwang, I.-G., Ko, G., 2008. Optimization of methods for detecting norovirus on

- various fruit. *Journal of Virological Methods* 153, 104–110.
- Kim, H.-Y., Park, H.-J., Ko, G., 2009. Hollow-fiber ultrafiltration for the concentration and simultaneous recovery of multiple pathogens in contaminated foods. *Journal of Food Protection*® 72, 2547–2552.
- Kim, M., Lim, M.Y., Ko, G., 2010. Enhancement of enteric adenovirus cultivation by viral transactivator proteins. *Applied and Environmental Microbiology* 76, 2509–2516.
- Kim, K., Katayama, H., Kitajima, M., Tohya, Y., Ohgaki, S., 2011. Development of a real-time RT-PCR assay combined with ethidium monoazide treatment for RNA viruses and its application to detect viral RNA after heat exposure. *Water Science & Technology* 63, 502.
- Kim, J.-M., Kim, S.Y., Park, Y.B., Kim, H.J., Min, B.S., Cho, J.-C., Yang, J.M., Cho, Y.-H., Ko, G., 2012. Simultaneous detection of major enteric viruses using a combimatrix microarray. *Journal of Microbiology* 50, 970–977.
- Kim, S.Y., Ko, G., 2012. Using propidium monoazide to distinguish between viable and nonviable bacteria, MS2 and murine norovirus: Using propidium monoazide to assess viability. *Letters in Applied Microbiology* 55, 182–188.
- Kirby, A., Gurgel, R.Q., Dove, W., Vieira, S.C.F., Cunliffe, N.A., Cuevas, L.E., 2010. An evaluation of the RIDASCREEN and IDEIA enzyme immunoassays and the RIDAQUICK immunochromatographic test for the detection of norovirus in faecal specimens. *Journal of Clinical Virology* 49, 254–257.
- Kitajima, M., Oka, T., Haramoto, E., Katayama, H., Takeda, N., Katayama, K., Ohgaki, S., 2010. Detection and Genetic Analysis of Human Sapoviruses in River Water in Japan. *Applied and Environmental Microbiology* 76, 2461–2467.
- Kitajima, M., Haramoto, E., Phanuwan, C., Katayama, H., 2011. Prevalence and Genetic Diversity of Aichi Viruses in Wastewater and River Water in Japan. *Applied and Environmental Microbiology* 77, 2184–2187.
- Kitajima, M., Hata, A., Yamashita, T., Haramoto, E., Minagawa, H., Katayama, H., 2013. Development of a Reverse Transcription-Quantitative PCR System for Detection and Genotyping of Aichi Viruses in Clinical and Environmental Samples. *Applied and Environmental Microbiology* 79, 3952–3958.
- Klaus, C., Hoffmann, B., Beer, M., Müller, W., Stark, B., Bader, W., Stiasny, K., Heinz, F.X., Süß, J., 2010a. Seroprevalence of tick-borne encephalitis (TBE) in naturally exposed monkeys (*Macaca sylvanus*) and sheep and prevalence of TBE virus in ticks in a TBE endemic area in Germany. *Ticks and Tick-borne Diseases* 1, 141–144.
- Klaus, C., Hoffmann, B., Hering, U., Mielke, B., Sachse, K., Beer, M., Süß, J., 2010b. Tick-borne encephalitis (TBE) virus prevalence and virus genome characterization in field-collected ticks (*Ixodes ricinus*) from risk, non-risk and former risk areas of TBE, and in ticks removed from humans in Germany. *Clinical Microbiology and Infection* 16, 238–244.
- Klement, C., Kissova, R., Lengyelova, V., Stipalova, D., Sobotova, Z., Galama, J.M.D., Bopegamage, S., 2013. Human enterovirus surveillance in the Slovak Republic from 2001 to 2011. *Epidemiology and Infection* 141, 2658–2662.
- Kobayashi, S., Fujiwara, N., Yasui, Y., Yamashita, T., Hiramatsu, R., Minagawa, H., 2012. A foodborne outbreak of sapovirus linked to catered box lunches in Japan. *Archives of Virology* 157, 1995–1997.
- Kohli, E., Bon, F., Balay, K., Pothier, P., 2005. Les calicivirus humains, une cause majeure de gastro-entérite aiguë. *Virologie* 9, 93–106.

- Kooh P., Hepatitis E virus in delicatessen meat products derived from raw pig liver. Opinion of the French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety (Anses). 8th meeting of the MRA Network- 23-24 April 2013
- Koopmans, M., Duizer, E., 2004. Foodborne viruses: an emerging problem. *International Journal of Food Microbiology* 90, 23–41.
- Koopmans, M., 2009. Noroviruses in healthcare settings: a challenging problem. *Journal of Hospital Infection* 73, 331–337.
- Koroglu, M., Yakupogullari, Y., Otlu, B., Ozturk, S., Ozden, M., Ozer, A., Sener, K., Durmaz, R., 2011. A waterborne outbreak of epidemic diarrhea due to group A rotavirus in Malatya, Turkey. *New Microbiologica* 34, 17–24.
- Kota, M., Bino, S., Delogu, R., Simaku, A., Neza, B., Ruggeri, F.M., Fiore, L., 2014. Epidemiology of rotavirus diarrhoea in Albania. *Archives of Virology* doi: 10.1007/s00705-014-2093-4.
- Kottaridi, C., Spathis, A.T., Ntova, C.K., Papaevangelou, V., Karakitsos, P., 2012. Evaluation of a multiplex real time reverse transcription PCR assay for the detection and quantitation of the most common human rotavirus genotypes. *Journal of Virological Methods* 180, 49–53.
- Kotwal, G., Cannon, J.L., 2014. Environmental persistence and transfer of enteric viruses. *Current Opinion in Virology* 4, 37–43.
- Krishna, N.K., 2005. Identification of structural domains involved in astrovirus capsid biology. *Viral Immunology* 18, 17–26.
- Kroneman, A., Vega, E., Vennema, H., Vinjé, J., White, P.A., Hansman, G., Green, K., Martella, V., Katayama, K., Koopmans, M., 2013. Proposal for a unified norovirus nomenclature and genotyping. *Archives of Virology* 158, 2059–2068.
- Kupča, A.M., Essbauer, S., Zoeller, G., de Mendonça, P.G., Brey, R., Rinder, M., Pfister, K., Spiegel, M., Doerrbecker, B., Pfeffer, M., Dobler, G., 2010. Isolation and molecular characterization of a tick-borne encephalitis virus strain from a new tick-borne encephalitis focus with severe cases in Bavaria, Germany. *Ticks and Tick-borne Diseases* 1, 44–51.
- Kusov, Y.Y., Gauss-Müller, V., 1997. In vitro RNA binding of the hepatitis A virus proteinase 3C (HAV 3Cpro) to secondary structure elements within the 5' terminus of the HAV genome. *RNA* 3, 291–302.
- Kuypers, J., Martin, E.T., Heugel, J., Wright, N., Morrow, R., Englund, J.A., 2007. Clinical disease in children associated with newly described coronavirus subtypes. *Pediatrics* 119, e70–76.
- La Rosa, G., Pourshaban, M., Iaconelli, M., Muscillo, M., 2010a. Quantitative real-time PCR of enteric viruses in influent and effluent samples from wastewater treatment plants in Italy. *Annali dell'Istituto superiore di sanità* 46, 266–273.
- La Rosa, G., Pourshaban, M., Iaconelli, M., Spuri Vennarucci, V., Muscillo, M., 2010b. Molecular Detection of Hepatitis E Virus in Sewage Samples. *Applied and Environmental Microbiology* 76, 5870–5873.
- La Rosa, G., Muscillo, M., Vennarucci, V.S., Garbuglia, A.R., La Scala, P., Capobianchi, M.R., 2011. Hepatitis E virus in Italy: molecular analysis of travel-related and autochthonous cases. *Journal of General Virology* 92, 1617–1626.
- La Rosa, G., Fratini, M., della Libera, S., Iaconelli, M., Muscillo, M., 2012. Emerging and potentially emerging viruses in water environments. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanità* 48, 397–406.
- Landry, M.L., 1990. Nucleic acid hybridization in viral diagnosis. *Clinical biochemistry* 23, 267–277.
- Le Cann, P., Ranarijaona, S., Monpoeho, S., Le Guyader, F., Ferré, V., 2004. Quantification of human

- astroviruses in sewage using real-time RT-PCR. *Research in Microbiology* 155, 11–15.
- Le Guyader, F.S., Le Saux, J.-C., Ambert-Balay, K., Krol, J., Serais, O., Parnaudeau, S., Giraudon, H., Delmas, G., Pommepuy, M., Pothier, P., Atmar, R.L., 2008. Aichi Virus, Norovirus, Astrovirus, Enterovirus, and Rotavirus Involved in Clinical Cases from a French Oyster-Related Gastroenteritis Outbreak. *Journal of Clinical Microbiology* 46, 4011–4017.
- Le Guyader, S.F., Le Saux, J.-C., Delmas, G., Krol, J., Ambert-Balay, K., 2009. Virus Aichi, norovirus, astrovirus, entérovirus et rotavirus impliqués dans des cas de gastroentérites suite à la consommation d’huîtres. *Virologie* 13, 327–329.
- Leclerc, H., Schwartzbrod, L., Dei-Cas, E., 2002. Microbial agents associated with waterborne diseases. *Critical Reviews in Microbiology* 28, 371–409.
- Lee, C.S., Lee, C., Marion, J., Wang, Q., Saif, L., Lee, J., 2014. Occurrence of human enteric viruses at freshwater beaches during swimming season and its link to water inflow. *Science of The Total Environment* 472, 757–766.
- Lees D, CEN WG6 TAG4, 2010. International standardization of a method for detection of human pathogenic viruses in molluscan shellfish. *Food and Environmental Virology* 2, 146-155.
- Lemon, S.M., Murphy, P.C., Shields, P.A., Ping, L.H., Feinstone, S.M., Cromeans, T., Jansen, R.W., 1991. Antigenic and genetic variation in cytopathic hepatitis A virus variants arising during persistent infection: evidence for genetic recombination. *Journal of Virology* 65, 2056–2065.
- Lévêque, N., Renois, F., Andréoletti, L., 2012. The microarray technology: facts and controversies: Microarray technology in clinical virology. *Clinical Microbiology and Infection* 19, 10–14.
- 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. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 4951–4955.
- Li, D., Baert, L., Van Coillie, E., Uyttendaele, M., 2011. Critical studies on binding-based RT-PCR detection of infectious Noroviruses. *Journal of Virological Methods* 177, 153–159.
- Lindesmith L, Moe C, Marionneau S, Ruvoen N, Jiang X, Lindblad L, Stewart P, LePendou J, Baric R. Human susceptibility and resistance to Norwalk virus infection. *Nat Med.* 2003 May;9(5):548-53. Epub 2003 Apr 14.
- Liu, M., P. A. Offit, and M. K. Estes. 1988. Identification of the simian rotavirus SAI genome segment 3 product. *Virology* 163:26-32.
- Liu, W., Zhai, J., Liu, J., Xie, Y., 2009. Identification of recombination between subgenotypes IA and IB of hepatitis A virus. *Virus Genes* 40, 222–224.
- Logan, C., O’Leary, J.J., O’Sullivan, N., 2006. Real-Time Reverse Transcription-PCR for Detection of Rotavirus and Adenovirus as Causative Agents of Acute Viral Gastroenteritis in Children. *Journal of Clinical Microbiology* 44, 3189–3195.
- Logan, C., O’Leary, J.J., O’Sullivan, N., 2007. Real-time reverse transcription PCR detection of norovirus, sapovirus and astrovirus as causative agents of acute viral gastroenteritis. *Journal of Virological Methods* 146, 36–44.
- Loisy, F., Atmar, R.L., Guillon, P., Le Cann, P., Pommepuy, M., Le Guyader, F.S., 2005. Real-time RT-PCR for norovirus screening in shellfish. *Journal of Virological Methods* 123, 1–7.
- Love, D., Casteel, M., Meschke, J., Sobsey, M., 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. *International Journal of Food Microbiology* 126, 221–226.
- Lu, L., Ching, K.Z., de Paula, V.S., Nakano, T., Siegl, G., Weitz, M., Robertson, B.H., 2004. Characterization of the complete genomic sequence of genotype II hepatitis A virus

- (CF53/Berne isolate). *Journal of General Virology* 85, 2943–2952.
- Lu, L., Li, C., Hagedorn, C.H., 2006a. Phylogenetic analysis of global hepatitis E virus sequences: genetic diversity, subtypes and zoonosis. *Reviews in Medical Virology* 16, 5–36.
- Lu, X., Chittaganpitch, M., Olsen, S.J., Mackay, I.M., Sloots, T.P., Fry, A.M., Erdman, D.D., 2006b. Real-Time PCR Assays for Detection of Bocavirus in Human Specimens. *Journal of Clinical Microbiology* 44, 3231–3235.
- Mansfield, K.L., Johnson, N., Phipps, L.P., Stephenson, J.R., Fooks, A.R., Solomon, T., 2009. Tick-borne encephalitis virus - a review of an emerging zoonosis. *Journal of General Virology* 90, 1781–1794.
- Mansuy, J.M., Abravanel, F., Miedouge, M., Mengelle, C., Merviel, C., Dubois, M., Kamar, N., Rostaing, L., Alric, L., Moreau, J., Peron, J.M., Izopet, J., 2009. Acute hepatitis E in south-west France over a 5-year period. *Journal of Clinical Virology* 44, 74–77.
- Martella, V., Bányai, K., Matthijnssens, J., Buonavoglia, C., Ciarlet, M., 2010. Zoonotic aspects of rotaviruses. *Veterinary Microbiology* 140, 246–255.
- Martin-Latil, S., Hennechart-Collette, C., Guillier, L., Perelle, S., 2012a. Comparison of two extraction methods for the detection of hepatitis A virus in semi-dried tomatoes and murine norovirus as a process control by duplex RT-qPCR. *Food Microbiology* 31, 246–253.
- Martin-Latil, S., Hennechart-Collette, C., Guillier, L., Perelle, S., 2012b. Duplex RT-qPCR for the detection of hepatitis E virus in water, using a process control. *International Journal of Food Microbiology* 157, 167–173.
- Martin-Latil, S., Hennechart-Collette, C., Guillier, L., Perelle, S., 2014. Method for HEV detection in raw pig liver products and its implementation for naturally contaminated food. *International Journal of Food Microbiology* 176, 1–8.
- Masclaux, F.G., Hotz, P., Friedli, D., Savova-Bianchi, D., Oppliger, A., 2013. High occurrence of hepatitis E virus in samples from wastewater treatment plants in Switzerland and comparison with other enteric viruses. *Water Research* 47, 5101–5109.
- Mathis, P.K., Ciarlet, M., Campbell, K.M., Wang, S., Owen, K.E., Ranheim, T.S., 2010. Separation of rotavirus double-layered particles and triple-layered particles by capillary zone electrophoresis. *Journal of Virological Methods* 169, 13–21.
- Mathijs, E., Stals, A., Baert, L., Botteldoorn, N., Denayer, S., Mauroy, A., Scipioni, A., Daube, G., Dierick, K., Herman, L., Coillie, E., Uyttendaele, M., Thiry, E., 2012. A Review of Known and Hypothetical Transmission Routes for Noroviruses. *Food and Environmental Virology* 4, 131–152.
- Matthews, J.E., Dickey, B.W., Miller, R.D., Felzer, J.R., Dawson, B.P., Lee, A.S., Rocks, J.J., Kiel, J., Montes, J.S., Moe, C.L., Eisenberg, J.N.S., Leon, J.S., 2012. The epidemiology of published norovirus outbreaks: a review of risk factors associated with attack rate and genogroup. *Epidemiology and Infection* 140, 1161–1172.
- Mattion NM, Mitchell DB, Both GW, Estes MK. Expression of rotavirus proteins encoded by alternative open reading frames of genome segment 11. *Virology*. 1991; 181:295–304.
- Mattison, K., Brassard, J., Gagné, M.-J., Ward, P., Houde, A., Lessard, L., Simard, C., Shukla, A., Pagotto, F., Jones, T.H., Trottier, Y.-L., 2009. The feline calicivirus as a sample process control for the detection of food and waterborne RNA viruses. *International Journal of Food Microbiology* 132, 73–77.
- Mattison, K., Corneau, N., Berg, I., Bosch, A., Duizer, E., Gutiérrez-Aguirre, I., L'Homme, Y., Lucero, Y., Luo, Z., Martyres, A., Myrmel, M., O'Ryan, M., Pagotto, F., Sano, D., Svraka, S., Urzua, U.,

- Bidawid, S., 2011. Development and validation of a microarray for the confirmation and typing of norovirus RT-PCR products. *Journal of Virological Methods* 173, 233–250.
- Maunula, L., Kaupke, A., Vasickova, P., Söderberg, K., Kozyra, I., Lazic, S., van der Poel, W.H.M., Bouwknegt, M., Rutjes, S., Willems, K.A., Moloney, R., D'Agostino, M., de Roda Husman, A.M., von Bonsdorff, C.-H., Rzeżutka, A., Pavlik, I., Petrovic, T., Cook, N., 2013. Tracing enteric viruses in the European berry fruit supply chain. *International Journal of Food Microbiology* 167, 177–185.
- Medici, M.C., Abelli, L.A., Dodi, I., Dettori, G., Chezzi, C., 2010. Norovirus RNA in the blood of a child with gastroenteritis and convulsions--A case report. *Journal of Clinical Virology* 48, 147–149.
- Mellou, K., Katsioulis, A., Potamiti-Komi, M., Pournaras, S., Kyritsi, M., Katsiaflaka, A., Kallimani, A., Kokkinos, P., Petinaki, E., Sideroglou, T., Georgakopoulou, T., Vantarakis, A., Hadjichristodoulou, C., 2014. A large waterborne gastroenteritis outbreak in central Greece, March 2012: challenges for the investigation and management. *Epidemiology & Infection* 142, 40–50.
- Mena, K.D., Gerba, C.P., 2009. Waterborne adenovirus. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 198, 133–167.
- Midgley, S., Böttiger, B., Jensen, T.G., Friis-Møller, A., Person, L.K., Nielsen, L., Barzinci, S., Fischer, T.K., 2014. Human group A rotavirus infections in children in Denmark; detection of reassortant G9 strains and zoonotic P[14] strains. *Infection, Genetics and Evolution* 27C, 114–120.
- Mohamed, N., Elfaitouri, A., Fohlman, J., Friman, G., Blomberg, J., 2004. A sensitive and quantitative single-tube real-time reverse transcriptase-PCR for detection of enteroviral RNA. *Journal of Clinical Virology* 30, 150–156.
- Mohd Hanafiah, K., Jacobsen, K.H., Wiersma, S.T., 2011. Challenges to mapping the health risk of hepatitis A virus infection. *International Journal of Health Geographics* 10, 57.
- Monpoeho, S., Dehée, A., Mignotte, B., Schwartzbrod, L., Marechal, V., Nicolas, J.C., Billaudel, S., Ferré, V., 2000. Quantification of enterovirus RNA in sludge samples using single tube real-time RT-PCR. *BioTechniques* 29, 88–93.
- Morin, T., Picoche, B., 2008. Virus entériques : connaissances actuelles et moyens de maîtrise dans l'industrie agro-alimentaire. Enteric viruses: current knowledge and control methods in the agri-food industry. *Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France*. 2008, 161 (2), 111-118
- Morisset, D., Štebih, D., Milavec, M., Gruden, K., Žel, J., 2013. Quantitative Analysis of Food and Feed Samples with Droplet Digital PCR. *PLoS ONE* 8, e62583.
- Naik, S.R., Aggarwal, R., Salunke, P.N., Mehrotra, N.N., 1992. A large waterborne viral hepatitis E epidemic in Kanpur, India. *Bulletin of the World Health Organization* 70, 597–604.
- Nainan, O.V., Xia, G., Vaughan, G., Margolis, H.S., 2006. Diagnosis of hepatitis a virus infection: a molecular approach. *Clinical Microbiology Reviews* 19, 63–79.
- Nielsen, A.C.Y., Böttiger, B., Midgley, S.E., Nielsen, L.P., 2013. A novel enterovirus and parechovirus multiplex one-step real-time PCR-validation and clinical experience. *Journal of Virological Methods* 193, 359–363.
- Nordgren, J., Bucardo, F., Svensson, L., Lindgren, P.E., 2010. Novel Light-Upon-Extension Real-Time PCR Assay for Simultaneous Detection, Quantification, and Genogrouping of Group A Rotavirus. *Journal of Clinical Microbiology* 48, 1859–1865.
- Nuanalsuwan, S., Cliver, D.O., 2002. Pretreatment to avoid positive RT-PCR results with inactivated viruses. *Journal of virological methods* 104, 217–225.

- Nuanualsuwan, S., Cliver, D.O., 2003. Capsid Functions of Inactivated Human Picornaviruses and Feline Calicivirus. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 350–357.
- Oka, T., Mori, K., Iritani, N., Harada, S., Ueki, Y., Iizuka, S., Mise, K., Murakami, K., Wakita, T., Katayama, K., 2012. Human sapovirus classification based on complete capsid nucleotide sequences. *Archives of Virology* 157, 349–352.
- Okamoto, H., 2007. Genetic variability and evolution of hepatitis E virus. *Virus Research* 127, 216–228.
- Okamoto, H., 2011a. Efficient cell culture systems for hepatitis E virus strains in feces and circulating blood. *Reviews in Medical Virology* 21, 18–31.
- Okamoto, H., 2011b. Hepatitis E virus cell culture models. *Virus Research* 161, 65–77.
- Opinion of the French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety concerning the "Request to assess the risks related to contamination of delicatessen meats products derived from raw pork liver with hepatitis E virus (HEV)", 17 February 2013. ANSES Opinion Request No. 2012-SA-0012.
- Pan, L., Zhang, Q., Li, X., Tian, P., 2012. Detection of human norovirus in cherry tomatoes, blueberries and vegetable salad by using a receptor-binding capture and magnetic sequestration (RBCMS) method. *Food Microbiology* 30, 420–426.
- Pang, X.L., Lee, B., Boroumand, N., Leblanc, B., Preiksaitis, J.K., Yu Ip, C.C., 2004. Increased detection of rotavirus using a real time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) assay in stool specimens from children with diarrhea. *Journal of Medical Virology* 72, 496–501.
- Pang, X., Cao, M., Zhang, M., Lee, B., 2011. Increased sensitivity for various rotavirus genotypes in stool specimens by amending three mismatched nucleotides in the forward primer of a real-time RT-PCR assay. *Journal of Virological Methods* 172, 85–87.
- Pang, X.L., Preiksaitis, J.K., Lee, B.E., 2014. Enhanced enteric virus detection in sporadic gastroenteritis using a multi-target real-time PCR panel: A one-year study. *Journal of Medical Virology* 86, 1594–1601.
- Parashar, U.D., Hummelman, E.G., Bresee, J.S., Miller, M.A., Glass, R.I., 2003. Global Illness and Deaths Caused by Rotavirus Disease in Children. *Emerging Infectious Diseases journal* 9, 565–572.
- Parshionkar, S., Laseke, I., Fout, G.S., 2010. Use of Propidium Monoazide in Reverse Transcriptase PCR To Distinguish between Infectious and Noninfectious Enteric Viruses in Water Samples. *Applied and Environmental Microbiology* 76, 4318–4326.
- Patel, M.M., Hall, A.J., Vinjé, J., Parashar, U.D., 2009. Noroviruses: A comprehensive review. *Journal of Clinical Virology* 44, 1–8.
- Pelosi, E., Clarke, I., 2008. Hepatitis E: a complex and global disease. *Emerging Health Threats Journal* 1: e8.
- Pereira, H.G., Flewett, T.H., Candeias, J.A.N., Barth, O.M., 1988. A Virus with a Bisegmented Double-stranded RNA Genome in Rat. *Oryzomys nigripes* 2749–2754.
- Perelle, S., Cavellini, L., Burger, C., Blaise-Boisseau, S., Hennechart-Collette, C., Merle, G., Fach, P., 2009. Use of a robotic RNA purification protocol based on the NucliSens® easyMAG™ for real-time RT-PCR detection of hepatitis A virus in bottled water. *Journal of Virological Methods* 157, 80–83.
- Petrignani, M., Verhoef, L., Vennema, H., van Hunen, R., Baas, D., van Steenberghe, J.E., Koopmans, M.P.G., 2014. Underdiagnosis of Foodborne Hepatitis A, the Netherlands, 2008-20101.

- Emerging Infectious Diseases journal 20, 596–602.
- Pina, S., Puig, M., Lucena, F., Jofre, J., Girones, R., 1998. Viral pollution in the environment and in shellfish: human adenovirus detection by PCR as an index of human viruses. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 3376–3382.
- Pintó, R.M., Costafreda, M.I., Bosch, A., 2009. Risk assessment in shellfish-borne outbreaks of hepatitis A. *Applied and Environmental Microbiology* 75, 7350–7355.
- Piqueur, M.A., Verstrepen, W.A., Bruynseels, P., Mertens, A.H., 2009. Improvement of a real-time RT-PCR assay for the detection of enterovirus RNA. *Virology Journal* 6, 95.
- Polston, P.M., Rodríguez, R.A., Seo, K., Kim, M., Ko, G., Sobsey, M.D., 2014. Field evaluation of an improved cell line for the detection of human adenoviruses in environmental samples. *Journal of Virological Methods* 205C, 68–74.
- Prata, C., Ribeiro, A., Cunha, Â., Gomes, N.C.M., Almeida, A., 2012. Ultracentrifugation as a direct method to concentrate viruses in environmental waters: virus-like particle enumeration as a new approach to determine the efficiency of recovery. *Journal of Environmental Monitoring* 14, 64.
- Rački, N., Morisset, D., Gutierrez-Aguirre, I., Ravnikar, M., 2014. One-step RT-droplet digital PCR: a breakthrough in the quantification of waterborne RNA viruses. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 406(3),661-7.
- Ramalingam, S., Smith, D., Wellington, L., Vanek, J., Simmonds, P., MacGilchrist, A., Bathgate, A., Simpson, K., Johannessen, I., 2013. Autochthonous hepatitis E in Scotland. *Journal of Clinical Virology* 58, 619–623.
- Rapport annuel d'activité 2012 du CNR VHA/VHE, disponible sur <http://www.cnrvha-vhe.org/wp-content/uploads/2012/03/2012-Rapport-VHA-VHE.pdf>
- RASFF (notifications), disponible sur <https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/portal/?event=SearchForm&cleanSearch=1>
- Reuter, G., Boros, Á., Pankovics, P., 2011. Kobuviruses - a comprehensive review. *Reviews in Medical Virology* 21, 32–41.
- Reyes, G.R., Yarbough, P.O., Tam, A.W., Purdy, M.A., Huang, C.-C., Jung-suh, P.K., Bradley, D.W., Fry, K.E., 1991. Hepatitis E virus (HEV): the novel agent responsible for enterically transmitted non-A, non-B hepatitis. *Gastroenterologia Japonica* 26, 142–147.
- Reyes GR, Huang CC, Tam AW, Purdy MA. Molecular organization and replication of hepatitis E virus (HEV). *Arch Virol Suppl* 1993;7:15–25.
- Rigotto, C., Kolesnikovas, C.K., Moresco, V., Simões, C.M.O., Barardi, C.R.M., 2009. Evaluation of HA negatively charged membranes in the recovery of human adenoviruses and hepatitis A virus in different water matrices. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 104, 970–974.
- Robertson, B.H., Jansen, R.W., Khanna, B., Totsuka, A., Nainan, O.V., Siegl, G., Widell, A., Margolis, H.S., Isomura, S., Ito, K., 1992. Genetic relatedness of hepatitis A virus strains recovered from different geographical regions. *Journal of General Virology* 73 (Pt 6), 1365–1377.
- Rodríguez, R.A., Pepper, I.L., Gerba, C.P., 2009. Application of PCR-Based Methods To Assess the Infectivity of Enteric Viruses in Environmental Samples. *Applied and Environmental Microbiology* 75, 297–307.
- Rodríguez-Lazaro, D., Cook, N., Hernandez, M., 2013. Real-time PCR in Food Science: PCR Diagnostics. *Current Issues in Molecular Biology* 15, 39–44.

- Roelandt S., Heyman P., Tavernier P., Roels S., 2010. Tick-borne encephalitis in Europe: Review of an emerging zoonosis. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift* 79 :23-31.
- Rogée, S., Talbot, N., Caperna, T., Bouquet, J., Barnaud, E., Pavio, N., 2013. New models of hepatitis E virus replication in human and porcine hepatocyte cell lines. *Journal of General Virology* 94, 549–558.
- Rönnqvist, M., Mikkilä, A., Tuominen, P., Salo, S., Maunula, L., 2013. Ultraviolet Light Inactivation of Murine Norovirus and Human Norovirus GII: PCR May Overestimate the Persistence of Noroviruses Even When Combined with Pre-PCR Treatments. *Food and environmental virology* 1–10.
- Roque-Afonso, A.M., Desbois, D., Dussaix, E. 2010. Hepatitis A virus: Serology and molecular diagnostics. *Future Virology*, 5 : 233–242.
- Rosen, B.I., Fang, Z.-Y., Glass, R.I., Monroe, S.S., 2000. Cloning of Human Picobirnavirus Genomic Segments and Development of an RT-PCR Detection Assay. *Virology* 277, 316–329.
- Rosenblum, L.S., Mirkin, I.R., Allen, D.T., Safford, S., Hadler, S.C., 1990. A multifocal outbreak of hepatitis A traced to commercially distributed lettuce. *Am. J. Public Health* 80, 1075–1079.
- Rota PA, Oberste MS, Monroe SS, Nix WA, Campagnoli R, Icenogle JP, et al. Characterization of a novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *Science* 2003; 300(5624):1394–9.
- Rovida, F., Campanini, G., Piralla, A., Adzasehoun, K.M.G., Sarasini, A., Baldanti, F., 2013a. Molecular detection of gastrointestinal viral infections in hospitalized patients. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 77, 231–235.
- Rovida, F., Campanini, G., Sarasini, A., Adzasehoun, K.M.G., Piralla, A., Baldanti, F., 2013b. Comparison of immunologic and molecular assays for the diagnosis of gastrointestinal viral infections. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 75, 110–111.
- Rutjes, S.A., Italiaander, R., van den Berg, H.H.J.L., Lodder, W.J., de Roda Husman, A.M., 2005. Isolation and Detection of Enterovirus RNA from Large-Volume Water Samples by Using the NucliSens miniMAG System and Real-Time Nucleic Acid Sequence-Based Amplification. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 3734–3740.
- Ruvoën-Clouet N, Belliot G, Le Pendu J. Noroviruses and histo-blood groups: the impact of common host genetic polymorphisms on virus transmission and evolution. *Rev Med Virol.* 2013 Nov;23(6):355-66.
- Rzezutka, A., D’agostino, M., Cook, N., 2006. An ultracentrifugation-based approach to the detection of hepatitis A virus in soft fruits. *International Journal of Food Microbiology*.
- Sánchez, G., Bosch, A., Pintó, R.M., 2007. Hepatitis A virus detection in food: current and future prospects. *Letters in Applied Microbiology* 45, 1–5.
- Sánchez, G., Elizaquível, P., Aznar, R., 2012a. Discrimination of infectious hepatitis A viruses by propidium monoazide real-time RT-PCR. *Food and Environmental Virology* 4, 21–25.
- Sánchez, G., Elizaquível, P., Aznar, R., 2012b. A single method for recovery and concentration of enteric viruses and bacteria from fresh-cut vegetables. *International Journal of Food Microbiology* 152, 9–13.
- Sanders, R., Mason, D.J., Foy, C.A., Huggett, J.F., 2013. Evaluation of Digital PCR for Absolute RNA Quantification. *PLoS one* 8, e75296.
- Sano, D., Pintó, R.M., Omura, T., Bosch, A., 2010. Detection of Oxidative Damages on Viral Capsid Protein for Evaluating Structural Integrity and Infectivity of Human Norovirus. *Environmental*

- Science & Technology 44, 808–812.
- Santé Canada, 2004 : Recommandations pour la qualité de l'eau potable au Canada : Documentation à l'appui — Les virus entériques. Bureau de la qualité de l'eau et de la santé, Direction générale de la santé environnementale et de la sécurité des consommateurs, Santé Canada, Ottawa (Ontario).
- 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. *Emerging Infectious Diseases* 17, 7–15.
- Scherer, K., Johne, R., Schrader, C., Ellerbroek, L., Schulenburg, J., Klein, G., 2010. Comparison of two extraction methods for viruses in food and application in a norovirus gastroenteritis outbreak. *Journal of Virological Methods* 169, 22–27.
- Schielke, A., Filter, M., Appel, B., Johne, R., 2011. Thermal stability of hepatitis E virus assessed by a molecular biological approach. *Virology Journal* 8, 487.
- Schrader, C., Schielke, A., Ellerbroek, L., Johne, R., 2012. PCR inhibitors - occurrence, properties and removal. *Journal of Applied Microbiology* 113, 1014–1026.
- Schultz, A.C., Vega, E., Dalsgaard, A., Christensen, L.S., Nørrung, B., Hoorfar, J., Vinjé, J., 2011. Development and evaluation of novel one-step TaqMan realtime RT-PCR assays for the detection and direct genotyping of genogroup I and II noroviruses. *Journal of Clinical Virology* 50, 230–234.
- Schwaiger, M., Cassinotti, P., 2003. Development of a quantitative real-time RT-PCR assay with internal control for the laboratory detection of tick borne encephalitis virus (TBEV) RNA. *Journal of Clinical Virology* 27, 136–145.
- Schwarz, N.G., Revillion, M., Roque-Afonso, A.M., Dussaix, E., Giraud, M., Liberpre, C., Couturier, E., Astagneau, E.D., 2008. A food-borne outbreaks of hepatitis A virus (HAV) infection in a secondary school in Upper Normandy, France, in November 2006. *Eurosurveillance* 13, 18885.
- Sedlak, R.H., Jerome, K.R., 2013. Viral diagnostics in the era of digital polymerase chain reaction. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 75, 1–4.
- Selvaraju, S.B., Nix, W.A., Oberste, M.S., Selvarangan, R., 2012. Optimization of a Combined Human Parechovirus-Enterovirus Real-Time Reverse Transcription-PCR Assay and Evaluation of a New Parechovirus 3-Specific Assay for Cerebrospinal Fluid Specimen Testing. *Journal of Clinical Microbiology* 51, 452–458.
- Seymour, I.J., Appleton, H., 2001. Foodborne viruses and fresh produce. *Journal of Applied Microbiology* 91, 759–773.
- Shaw, R. D., K. J. Fong, G. A. Losonsky, M. M. Levine, Y. Maldonado, R. Yolken, J. Flores, A. Z. Kapikian, P. T. Vo, and H. B. Greenberg. 1987. Epitope-specific immune responses to rotavirus vaccination. *Gastroenterology* 93:941-950.
- Shirato, H, S Ogawa, H Ito, T Sato, A Kameyama, H Narimatsu, Z Xiaofan, T Miyamura, T Wakita, K Ishii and N Takeda. Noroviruses distinguish between type 1 and type 2 histo-blood group antigens for binding. *J Virol*, 2008 ; 82(21): 10756-67.
- Sinclair, R.G., Jones, E.L., Gerba, C.P., 2009. Viruses in recreational water-borne disease outbreaks: a review. *Journal of Applied Microbiology* 107, 1769–1780.
- Smith, E.M., Estes, M.K., Graham, D.Y., Gerba, C.P., 1979. A plaque assay for the simian rotavirus SA11. *Journal of General Virology* 43, 513–519.

- Smith, A., Reacher, M., Smerdon, W., Adak, G.K., Nichols, G., Chalmers, R.M., 2006. Outbreaks of waterborne infectious intestinal disease in England and Wales, 1992–2003. *Epidemiology and Infection* 134, 1141.
- Smith, D.B., Purdy, M.A., Simmonds, P., 2013. Genetic Variability and the Classification of Hepatitis E Virus. *Journal of Virology* 87, 4161–4169.
- Soejima, T., Schlitt-Dittrich, F., Yoshida, S., 2011. Polymerase chain reaction amplification length-dependent ethidium monoazide suppression power for heat-killed cells of Enterobacteriaceae. *Analytical Biochemistry* 418, 37–43.
- Spurgeon, S.L., Jones, R.C., Ramakrishnan, R., 2008. High throughput gene expression measurement with real time PCR in a microfluidic dynamic array. *PLoS ONE* 3, e1662.
- Stals, A., Baert, L., Van Coillie, E., Uyttendaele, M., 2011. Evaluation of a norovirus detection methodology for soft red fruits. *Food Microbiology* 28, 52–58.
- Stals, A., Baert, L., Van Coillie, E., Uyttendaele, M., 2012. Extraction of food-borne viruses from food samples: A review. *International Journal of Food Microbiology* 153, 1–9.
- Steyer, A., Torkar, K.G., Gutiérrez-Aguirre, I., Poljšak-Prijatelj, M., 2011. High prevalence of enteric viruses in untreated individual drinking water sources and surface water in Slovenia. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 214, 392–398.
- Stöcker, A., de Carvalho Dominguez Souza, B.F., Ribeiro, T.C.M., Netto, E.M., Araujo, L.O., Corrêa, J.I., Almeida, P.S., Peixoto de Mattos, A., Ribeiro, H. da C., Pedral-Sampaio, D.B., Drosten, C., Drexler, J.F., 2012. Cosavirus Infection in Persons with and without Gastroenteritis, Brazil. *Emerging Infectious Diseases* 18, 656–659.
- Straub, T.M., Bentrup, Z., Höner, K., Orosz-Coghlan, P., Dohnalkova, A., Mayer, B.K., Bartholomew, R.A., Valdez, C.O., Bruckner-Lea, C.J., Gerba, C.P., 2007. In vitro cell culture infectivity assay for human noroviruses. *Emerging infectious diseases* 13(3), 396–403.
- Straub, T.M., Bartholomew, R.A., Valdez, C.O., Valentine, N.B., Dohnalkova, A., Ozanich, R.M., Bruckner-Lea, C.J., Call, D.R., 2011. Human norovirus infection of caco-2 cells grown as a three-dimensional tissue structure. *Journal of Water and Health* 9, 225–240.
- Straub, T.M., Hutchison, J.R., Bartholomew, R.A., Valdez, C.O., Valentine, N.B., Dohnalkova, A., Ozanich, R.M., Bruckner-Lea, C.J., 2013. Defining cell culture conditions to improve human norovirus infectivity assays. *Water Science and Technology* 67, 863–868.
- Summa, M., von Bonsdorff, C.-H., Maunula, L., 2012. Evaluation of four virus recovery methods for detecting noroviruses on fresh lettuce, sliced ham, and frozen raspberries. *Journal of Virological Methods* 183, 154–160.
- Süss, J., 2011. Tick-borne encephalitis 2010: Epidemiology, risk areas, and virus strains in Europe and Asia—An overview. *Ticks and Tick-borne Diseases* 2, 2–15.
- Svensson, L., H. Sheshberadaran, S. Vene, E. Norrby, M. Grandein, and G. Wadell. 1987. Serum antibody responses to individual viral polypeptides in human rotavirus infections. *J. Gen. Virol.* 68:643-651.
- 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. *Journal of Clinical Microbiology* 45, 1389–1394.
- Swinkels, H.M., Kuo, M., Embree, G., Fraser Health Environmental Health Investigation Team, Andonov, A., Henry, B., Buxton, J.A., 2014. Hepatitis A outbreak in British Columbia, Canada: the roles of established surveillance, consumer loyalty cards and collaboration, February to May 2012. *Eurosurveillance* 19, 20792.

- Takahashi, H., Tanaka, T., Jirintai, S., Nagashima, S., Takahashi, M., Nishizawa, T., Mizuo, H., Yazaki, Y., Okamoto, H., 2012. A549 and PLC/PRF/5 cells can support the efficient propagation of swine and wild boar hepatitis E virus (HEV) strains: demonstration of HEV infectivity of porcine liver sold as food. *Archives of Virology* 157, 235–246.
- Takanashi, S., Saif, L.J., Hughes, J.H., Meulia, T., Jung, K., Scheuer, K.A., Wang, Q., 2014. Failure of propagation of human norovirus in intestinal epithelial cells with microvilli grown in three-dimensional cultures. *Archives of Virology* 159, 257–266.
- Tam AW, Smith MM, Guerra ME, Huang CC, Bradley DW, Fry KE, et al. Hepatitis E virus (HEV): molecular cloning and sequencing of the full-length viral genome. *Virology* 1991;185:120–31.
- Tan, M., Jiang, X., 2005. Norovirus and its histo-blood group antigen receptors: an answer to a historical puzzle. *Trends in Microbiology* 13, 285–293.
- Tan M, Jiang X. 2010. Norovirus gastroenteritis, carbohydrate receptors, and animal models. *PLoS Pathog* 6:e1000983.
- Tapparel, C., Siegrist, F., Petty, T.J., Kaiser, L., 2013. Picornavirus and enterovirus diversity with associated human diseases. *Infection, Genetics and Evolution* 14, 282–293.
- Taube, S., Kolawole, A.O., Höhne, M., Wilkinson, J.E., Handley, S.A., Perry, J.W., Thackray, L.B., Akkina, R., Wobus, C.E., 2013. A mouse model for human norovirus. *mBio* 4(4):e00450-13.
- Thorven, M, A Grahn, KO Hedlund, H Johansson, C Wahlfrid, G Larson and L Svensson. A homozygous nonsense mutation (428G-->A) in the human secretor (FUT2) gene provides resistance to asymptomatic norovirus (GGII) infections. *J Virol*, 2005 ; 79(24):15351-5.
- Tian, P., Engelbrektson, A., Mandrell, R., 2008. Two-Log Increase in Sensitivity for Detection of Norovirus in Complex Samples by Concentration with Porcine Gastric Mucin Conjugated to Magnetic Beads. *Applied and Environmental Microbiology* 74, 4271–4276.
- Tian, P., Yang, D., Pan, L., Mandrell, R., 2011. Application of a Receptor-Binding Capture Quantitative Reverse Transcription-PCR Assay To Concentrate Human Norovirus from Sewage and To Study the Distribution and Stability of the Virus. *Applied and Environmental Microbiology* 78, 429–436.
- Tjon, G., Xiridou, M., Coutinho, R., Bruisten, S., 2007. Different transmission patterns of hepatitis A virus for two main risk groups as evidenced by molecular cluster analysis. *Journal of Medical Virology* 79, 488–494.
- Trujillo, A.A., McCaustland, K.A., Zheng, D.-P., Hadley, L.A., Vaughn, G., Adams, S.M., Ando, T., Glass, R.I., Monroe, S.S., 2006. Use of TaqMan Real-Time Reverse Transcription-PCR for Rapid Detection, Quantification, and Typing of Norovirus. *Journal of Clinical Microbiology* 44, 1405–1412.
- Tse, C., Capeau, J., 2003. Quantification des acides nucléiques par PCR quantitative en temps réel, in: *Annales de Biologie Clinique*. pp. 279–293.
- Uhnoo, I., Wadell, G., Svensson, L., Johansson, M.E., 1984. Importance of enteric adenoviruses 40 and 41 in acute gastroenteritis in infants and young children. *Journal of Clinical Microbiology* 20, 365–372.
- Uhrbrand, K., Myrmel, M., Maunula, L., Vainio, K., Trebbien, R., Nørrung, B., Schultz, A.C., 2010. Evaluation of a rapid method for recovery of norovirus and hepatitis A virus from oysters and blue mussels. *Journal of Virological Methods* 169, 70–78.
- UniProtKB, disponible sur <http://www.uniprot.org/help/uniprotkb>
- Usuku, S., Kumazaki, M., Kitamura, K., Tochikubo, O., Noguchi, Y., 2008. An outbreak of food-borne

- gastroenteritis due to sapovirus among junior high school students. *Japanese Journal of Infectious Diseases* 61, 438–441.
- Vabret, A., Dina, J., Brison, E., Brouard, J., Freymuth, F., 2009. Coronavirus humains (HCoV). *Pathologie Biologie* 57, 149–160.
- Vaillant, V., De Valk H., Saura C., 2012. Les systèmes de surveillance des maladies d'origine alimentaire: sources, méthodes, apports, limites. *BEH Hors-série / 9 mai 2012*. Disponible sur www.invs.sante.fr/content/download/36107/.../beh_hors-serie_2012.pdf
- Valenzuela, S., Pizarro, J., Sandino, A.M., Vasquez, M., Fernandez, J., Hernandez, O., Patton, J., Spencer, E., 1991. Photoaffinity labeling of rotavirus VP1 with 8-azido-ATP: identification of the viral RNA polymerase. *J. Virol.* 65, 3964–3967.
- Van der Hoek L, Pyrc K, Jebbink MF, Vermeulen-Oost W, Berkhout RJ, Wolthers KC, et al. Identification of a new human coronavirus. *Nat Med* 2004;10(4):368–73.
- Van der Poel, W.H., 2014. Food and environmental routes of Hepatitis E virus transmission. *Current Opinion in Virology* 4, 91–96.
- Van Leeuwen, M., Williams, M.M.W., Koraka, P., Simon, J.H., Smits, S.L., Osterhaus, A.D.M.E., 2010. Human Picobirnaviruses Identified by Molecular Screening of Diarrhea Samples. *Journal of Clinical Microbiology* 48, 1787–1794.
- Van Marseveen, N.M., Wessels, E., de Brouwer, C.S., Vossen, A.C.T.M., Claas, E.C.J., 2010. Diagnosis of viral gastroenteritis by simultaneous detection of Adenovirus group F, Astrovirus, Rotavirus group A, Norovirus genogroups I and II, and Sapovirus in two internally controlled multiplex real-time PCR assays. *Journal of Clinical Virology* 49, 205–210.
- Vasickova, P., Dvorska, L., Lorencova, A., Pavlik, I., 2005. Viruses as a cause of foodborne diseases: a review of the literature. *Veterinární medicína* 50, 89–104.
- Vaughan, G., Goncalves Rossi, L.V., Forbi, J.C., de Paula, V.S., Purdy, M.A., Xia, G., Khudyakov, Y.E., 2013a. Hepatitis A virus: Host interactions, molecular epidemiology and evolution. *Infection, Genetics and Evolution*.
- Vaughan, G., Xia, G., Forbi, J.C., Purdy, M.A., Rossi, L.M.G., Spradling, P.R., Khudyakov, Y.E., 2013b. Genetic Relatedness among Hepatitis A Virus Strains Associated with Food-Borne Outbreaks. *PLoS ONE* 8, e74546.
- Vega, E., Barclay, L., Gregoricus, N., Shirley, S.H., Lee, D., Vinjé, J., 2014. Genotypic and epidemiologic trends of norovirus outbreaks in the United States, 2009 to 2013. *Journal of Clinical Microbiology* 52, 147–155.
- Vicente, D., Cilla, G., Montes, M., Pérez-Yarza, E.G., Pérez-Trallero, E., 2007. Human bocavirus, a respiratory and enteric virus. *Emerging Infectious Diseases journal* 13, 636–637.
- Victoria, M., Guimarães, F., Fumian, T., Ferreira, F., Vieira, C., Leite, J.P., Miagostovich, M., 2009. Evaluation of an adsorption–elution method for detection of astrovirus and norovirus in environmental waters. *Journal of Virological Methods* 156, 73–76.
- Vinjé, J., 2014. Advances in Laboratory Methods for Detection and Typing of Norovirus. *Journal of Clinical Microbiology*. doi:10.1128/JCM.01535-14
- ViralZone www.expasy.org/viralzone, Swiss Institute of Bioinformatics
- Wakuda, M., Pongsuwanna, Y., Taniguchi, K., 2005. Complete nucleotide sequences of two RNA segments of human picobirnavirus. *Journal of Virological Methods* 126, 165–169.
- Wales, S.Q., Ngo, D., Hida, K., Kulka, M., 2012. Temperature and density dependent induction of a cytopathic effect following infection with non-cytopathic HAV strains. *Virology* 430, 30–42.

- Whale, A.S., Cowen, S., Foy, C.A., Huggett, J.F., 2013. Methods for Applying Accurate Digital PCR Analysis on Low Copy DNA Samples. *PLoS ONE* 8, e58177.
- Wheeler, C., Vogt, T.M., Armstrong, G.L., Vaughan, G., Weltman, A., Nainan, O.V., Dato, V., Xia, G., Waller, K., Amon, J., Lee, T.M., Highbaugh-Battle, A., Hembree, C., Evenson, S., Ruta, M.A., Williams, I.T., Fiore, A.E., Bell, B.P., 2005. An outbreak of hepatitis A associated with green onions. *The New England Journal of Medicine* 353, 890–897.
- White, R.A., Quake, S.R., Curr, K., 2012. Digital PCR provides absolute quantitation of viral load for an occult RNA virus. *Journal of Virological Methods* 179, 45–50.
- 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. *Environmental Science & Technology* 46, 12069–12078.
- Wilhelmi, I., Roman, E., Sanchez-Fauquier, A., 2003. Viruses causing gastroenteritis. *Clinical microbiology and infection* 9, 247–262.
- 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, H.W., 2004. Replication of Norovirus in cell culture reveals a tropism for dendritic cells and macrophages. *PLoS Biol.* 2, e432.
- Wong DC, Purcell RH, Sreenivasan MA, Prasad SR, Pavri KM. Epidemic and endemic hepatitis in India: evidence for a non-A, non-B hepatitis virus aetiology. *Lancet* 1980;2:876–9.
- Woo PC, Lau SK, Chu CM, Chan KH, Tsoi HW, Huang Y, et al. Characterization and complete genome sequence of a novel coronavirus, coronavirus HKU1, from patients with pneumonia. *J Virol* 2005;79(2): 884–95.
- World Health Organization, 2000. Hepatitis A vaccines. *The Weekly Epidemiological Record*, 75: 38-44.
- Xu, Z. -q., Cheng, W. -x., Li, B. -w., Li, J., Lan, B., Duan, Z.J., 2011. Development of a Real-Time PCR Assay for Detecting and Quantifying Human Bocavirus 2. *Journal of Clinical Microbiology* 49, 1537–1541.
- Yamashita, T., Sugiyama, M., Tsuzuki, H., Sakae, K., Suzuki, Y., Miyazaki, Y., 2000. Application of a Reverse Transcription-PCR for Identification and Differentiation of Aichi Virus, a New Member of the Picornavirus Family Associated with Gastroenteritis in Humans. *Journal of Clinical Microbiology* 38, 2955–2961.
- Yang, W., Gu, A.Z., Zeng, S., Li, D., He, M., Shi, H., 2011. Development of a combined immunomagnetic separation and quantitative reverse transcription-PCR assay for sensitive detection of infectious rotavirus in water samples. *Journal of Microbiological Methods* 84, 447–453.
- Yugo, D., Meng, X.-J., 2013. Hepatitis E Virus: Foodborne, Waterborne and Zoonotic Transmission. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 10, 4507–4533.
- Zeng, S.Q., Halkosalo, A., Salminen, M., Szakal, E.D., Puustinen, L., Vesikari, T., 2008. One-step quantitative RT-PCR for the detection of rotavirus in acute gastroenteritis. *Journal of Virological Methods* 153, 238–240.
- Zhai, L., Dai, X., Meng, J., 2006. Hepatitis E virus genotyping based on full-length genome and partial genomic regions. *Virus Research* 120, 57–69.
- Zhang, Y., Hung, T., Song, J., He, J., 2013. Electron microscopy: essentials for viral structure, morphogenesis and rapid diagnosis. *Science China Life Sciences* 56, 421–430.
- Zhao, H., Wilkins, K., Damon, I.K., Li, Y., 2013. Specific qPCR assays for the detection of orf virus,

- pseudocowpox virus and bovine papular stomatitis virus. *Journal of Virological Methods* 194, 229–234.
- 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.
- Zlateva, K.T., Crusio, K.M., Leontovich, A.M., Lauber, C., Claas, E., Kravchenko, A.A., Spaan, W.J.M., Gorbalenya, A.E., 2011. Design and validation of consensus-degenerate hybrid oligonucleotide primers for broad and sensitive detection of corona- and toroviruses. *Journal of Virological Methods* 177, 174–183.
- www.appliedbiosystems.com/absite/us/en/home/applications-technologies/real-time-pcr/real-time-pcr-instruments/openarray-real-time-pcr-system/digital-pcr-using-openarray.html
- www.cdc.gov/hepatitis/HEV/HEVfaq.htm
- www.cdc.gov/hepatitis/outbreaks/2013/A1b-03-31/index
- www.cdc.gov/norovirus/php/illness-outbreaks.html
- www.cnrvha-vhe.org/
- www.cofrac.fr
- www.invs.sante.fr/Dossiers-thematiques/Maladies-infectieuses/Hepatites-virales/Hepatite-A/Donnees-epidemiologiques
- www.invs.sante.fr/Dossiers-thematiques/Maladies-infectieuses/Hepatites-virales/Hepatite-A/Points-d-actualite
- www.invs.sante.fr/Dossiers-thematiques/Maladies-infectieuses/Risques-infectieux-d-origine-alimentaire/Toxi-infections-alimentaires-collectives/Donnees-epidemiologiques
- www.who.int/immunization/topics/rotavirus/en/
- www.who.int/ith/diseases/rotavirus/en/
- www.who.int/mediacentre/factsheets/fs114/fr/
- www.who.int/mediacentre/factsheets/fs328/fr/

RESUME

Les principaux virus entériques à l'origine de toxi-infections alimentaires collectives sont les norovirus de génogroupes I et II (NoV GI, NoV GII) et le virus de l'hépatite A (VHA) responsables respectivement de gastro-entérites et d'hépatites. Ces virus sont transmissibles par la voie féco-orale directe ou via l'ingestion d'eaux ou d'aliments consommés crus ou peu cuits (coquillages, fruits et légumes). Le niveau de contamination virale des aliments souvent faible nécessite d'utiliser des méthodes de détection très sensibles. La plupart des virus entériques étant non cultivable, ces méthodes reposent sur la détection / quantification des génomes viraux par RT-qPCR ce qui ne permet pas de déterminer l'infectiosité des virus et limite l'appréciation du risque viral en santé publique. Les travaux de thèse visaient à proposer des méthodes moléculaires pour la détection, la quantification et le typage des virus entériques, à évaluer l'apport de nouvelles technologies moléculaires (comme la Digital RT-PCR (RT-dPCR) et la RT-PCR à haut débit) dans le cadre du diagnostic viral dans les aliments et enfin à développer des traitements précédant les réactions de RT-qPCR pour détecter des génomes issus de particules virales infectieuses.

Une nouvelle technique d'extraction du VHA à partir de la laitue a été développée et évaluée équivalente à la technique de référence décrite dans les spécifications techniques publiées en 2013 (ISO/TS 15216-1 et 15216-2). Pour favoriser les études phylogénétiques dans le domaine alimentaire, 6 modèles moléculaires de RT-qPCR spécifiques des 6 sous-types humains du VHA (IA, IB, IIA, IIB, IIIA, IIIB) ont été développés et évalués pour le génotypage d'échantillons cliniques contaminés par le VHA. Ils peuvent être utiles pour tracer les sous-types du VHA dans des échantillons faiblement contaminés comme des matrices alimentaires, mais aussi permettre l'identification de co-infection de l'homme ou de souches de VHA recombinantes.

La RT-dPCR en nanofluidique a été comparée à la RT-qPCR pour la quantification des génomes de NoV GI, NoV GII et VHA en présence de 2 contrôles de process (mengovirus et norovirus murin) dans des échantillons de laitues et d'eau embouteillée artificiellement contaminés. Un contrôle externe d'amplification a permis d'évaluer et de comparer l'inhibition des réactions de RT-qPCR et RT-dPCR. Les rendements d'extraction viraux se sont révélés significativement plus élevés après RT-dPCR qu'après RT-qPCR pour les NoV GI et mengovirus dans l'eau et pour les NoV GII et VHA dans les échantillons de laitue. De plus, les essais de RT-dPCR se sont avérés être plus tolérants à la présence de substances inhibitrices issues de laitues.

La technologie qPCR en nanofluidique a également été utilisée afin de proposer une « puce » capable de détecter 20 virus entériques. Des limites de détection similaires ont été obtenues avec la qPCR et la dPCR. La qPCR nanofluidique a été trouvée moins sensible d'environ 1 à 3 log₁₀ (du fait des faibles volumes (~nanolitre) d'échantillons analysés).

Des prétraitements à base de monoazides +/- détergent à réaliser avant la RT-qPCR pour la détection de virus infectieux (VHA, rotavirus) ont été développés et évalués en réalisant des cinétiques d'inactivations thermiques. En conclusion, l'efficacité de pré-traitements avant la RT-qPCR pour la détection de génomes issus de particules virales infectieuses est prometteuse mais dépendante du niveau d'inactivation virale, du virus et du modèle moléculaire de RT-qPCR.

En conclusion, ces travaux ont contribué à améliorer la détection, la quantification, le typage et la prise en compte du risque infectieux dans le diagnostic viral. Les nouvelles technologies de « PCR haut débit » qui ont été développées pourraient être utiles pour standardiser la quantification des virus entériques dans les aliments, réaliser des études de prévalence et enfin être étendues à la quantification des génomes d'autres pathogènes en microbiologie alimentaire.

ABSTRACT

The main enteric viruses that cause foodborne outbreaks are noroviruses genogroupe I and II (NoV GI and NoV GII) and hepatitis A virus (HAV), respectively responsible for gastroenteritis and hepatitis. They are mainly transmitted via the faecal-oral route either by person-to-person contact or by ingestion of contaminated water, raw and undercooked food, particularly shellfish, soft fruits and vegetables. Viral contamination level is often low and requires sensitive methods of detection. As most enteric viruses are not cultivable, these methods are based on viral genome detection and quantification by real time RT-PCR. Such an approach provides no information regarding virus infectivity and therefore limits viral risk assessment in public health. These thesis works aim to propose molecular methods for enteric viruses detection, quantification and typing, also to evaluate new molecular technologies contribution (as Digital PCR and PCR high throughput) for food viral diagnosis and finally to develop treatments combined with RT-qPCR to only detect genomes from infectious viral particles.

A new HAV extraction from lettuce method was developed and assessed as similar to the reference method which is described in the technical specifications published in 2013 (ISO/TS 15216-1; ISO/TS 15216-2). In order to facilitate phylogenetic analysis in food microbiology, six subtype-specific RT-qPCR assays for human HAV (HAV IA, IB, IIA, IIB, IIIA, IIIB) were developed and evaluated by testing HAV contaminated clinical samples genotyping. These assays may be particularly useful for accurately tracing HAV in low-level contaminated samples such as food matrices and moreover, to allow co-infection identification in human samples and/or HAV recombinant strains.

Nanofluidic digital RT-PCR (RT-dPCR) was compared to RT-qPCR for NoV GI, NoV GII, and HAV genomes quantification, in presence of two process controls (mengovirus and murine norovirus) in artificially contaminated bottled water and lettuce samples. External amplification control allowed evaluating and comparing RT-qPCR and RT-dPCR assays inhibitions. Viral recoveries calculated by RT-dPCR were found to be significantly higher than by RT-qPCR for NoV GI and Mengovirus in water, and for NoV GII and HAV in lettuce samples. The RT-dPCR assay proved to be more tolerant to inhibitory substances present in lettuce samples.

Nanofluidic PCR Array (PCR Array) has also been used in order to propose an array able to simultaneously detect 20 enteric viruses. Similar detection limits were obtained with qPCR and dPCR but PCR Array was found less sensitive of 1 to 3 log₁₀ (due to the weak volumes (nanolitre) of analyzed samples).

Pretreatments based on the use of monoazides +/- surfactant and to do before RT-qPCR were developed for discriminating between infectious and non-infectious particles of HAV and rotavirus. They have been evaluated with thermal inactivation kinetic curves. In conclusion, the effectiveness of the pretreatments combined with RT-qPCR for infectious viral particles genomes detection is promising but it is influenced by the viral inactivation level, by the viral target and by the choice of the RT-qPCR assay.

To summarize, this work has contributed to improve detection, quantification, typing and consideration of infectious risk in viral diagnosis. Our newly developed high throughput PCR assays could be used to standardize foodborne enteric viruses quantification, to realize studies of prevalence and lastly could also be spread to the genomes quantification of others pathogenic of diagnostic interest in food microbiology.