

**Nouveau test de diagnostic qui permet de dire si un virus est infectieux ou non :
Oui, mais pas pour tous les virus!**

Carl A. Gagnon, Chantale Provost

No de projet : IA116548

Durée : 06/2016 – 08/2018

FAITS SAILLANTS

Les tests de diagnostic moléculaires couramment utilisés pour détecter la présence d'un pathogène dans un échantillon clinique et environnemental, comme la PCR en temps réel (qPCR), ne peuvent pas établir si un virus est infectieux. Ils peuvent seulement nous indiquer la présence ou l'absence du génome viral dans un échantillon donné.

Ce projet a pour objectif de développer un nouvel outil de diagnostic qui serait capable de différencier les virus infectieux des non-infectieux. Des virus porcins qui provoquent des pertes économiques importantes seront ciblés, soit: le virus de la diarrhée épidémique porcine (vDEP), le virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcine (vSRRP) et le circovirus porcine (PCV). La nouvelle méthode de diagnostic proposée utilise trois molécules, soit l'éthidium monoazide (EMA), le propidium monoazide (PMA) et le PMAxx. Ces molécules sont connues pour différencier les bactéries vivantes des bactéries mortes, lorsque jumelées avec les techniques standards de qPCR ou de RT-qPCR (rétro-transcription combinée à la qPCR). L'EMA, le PMA et le PMAxx sont des molécules qui ne peuvent pas traverser les membranes des cellules vivantes. Elles ne peuvent donc pas entrer en contact avec le matériel génétique (ADN et ARN) des cellules vivantes qui possèdent des membranes intactes. Ces molécules sont aussi reconnues pour lier l'ADN et l'ARN libre, c'est-à-dire sans protection membranaire comme dans les cellules mortes ou endommagées. La liaison de ces molécules au génome (ADN et ARN) va ultimement inhiber la réaction qPCR ou RT-qPCR, donnant ainsi un résultat PCR négatif. Donc, lorsqu'un échantillon contient des bactéries (cellules) vivantes avec une membrane intacte, le qPCR et le RT-qPCR seront positifs à la présence de la bactérie et lorsque la bactérie (cellule) est morte avec une membrane endommagée, ces mêmes tests donneront un résultat négatif.

L'hypothèse de ce projet est que les trois molécules pourraient aussi avoir le même effet sur les virus et ainsi permettre la différenciation des virus infectieux (particules virales intactes et donc empêchant l'EMA, le PMA et PMAxx de lier le génome virale) des non-infectieux (particules virales endommagées incluant la perte de la membrane virale). Les résultats du projet montrent que le test permet de différencier les virus infectieux des non-infectieux, mais seulement pour certains types de virus. Les virus peuvent se diviser en deux grands types, soit les virus enveloppés et les virus non-enveloppés. Les virus enveloppés possèdent une membrane similaire à celle des bactéries en plus d'une capsid, tandis que les virus non-enveloppés possèdent seulement une capsid. La nouvelle méthode de diagnostic a été incapable de différencier les particules infectieuses des non-infectieuses pour les virus enveloppés, tel que le vDEP et le vSRRP.

Nos résultats démontrent que les molécules EMA et PMA, lorsqu'incubées avec les virus enveloppés, peuvent eux-mêmes diminuer l'infectivité de ces derniers et donc rend très difficile la distinction entre les particules virales infectieuses des non-infectieuses. À l'opposé, ces molécules semblent efficaces pour les virus non-enveloppés tel que le PCV. Il reste toutefois une étape de validation *in vitro* de la méthode de diagnostic à réaliser pour le PCV, qui est d'inactiver (rendre non-infectieux) le virus et de l'introduire dans des échantillons cliniques négatifs pour confirmer l'efficacité des molécules avec ce genre d'échantillon clinique.

OBJECTIF(S) ET MÉTHODOLOGIE

Afin de tester l'hypothèse de ce projet, qui est que les molécules EMA, PMA et PMAxx sont capables de distinguer les virus infectieux des non-infectieux, le projet a été divisé en 4 objectifs: 1) Vérifier si ces molécules ont un effet sur les vDEP, les PCV et les vSRRP infectieux. 2) Inactiver les virus afin de démontrer l'efficacité de ces molécules vis-à-vis ce type de virus. 3) Tester les molécules sur de vrais échantillons cliniques positifs. 4) Confirmer l'efficacité des molécules dans un modèle d'infection *in vivo*, c'est-à-dire à partir de porcelets vivants (c.à-d. infectés et non-infectés avec le vDEP). Afin de répondre à ces objectifs, nous avons utilisé les molécules EMA, PMA et PMAxx, jumelées avec les techniques standards de qPCR ou de RT-qPCR pour la détection des virus ciblés (c.-à-d. vDEP, vSRRP et PCV). Les tests de diagnostic de qPCR et de RT-qPCR qui ont été utilisés pour détecter la présence du PCV, du vDEP et du vSRRP, sont ceux validés par le Service de diagnostic de la FMV de l'UdM.

RÉSULTATS SIGNIFICATIFS POUR L'INDUSTRIE

1) Vérifier si les molécules EMA/PMA/PMAxx ont un effet sur les vDEP, les PCV et les vSRRP infectieux.

Afin de s'assurer que les molécules EMA/PMA/PMAxx n'ont pas d'effet adverse sur les virions de vDEP, vSRRP et PCV, une série croissante de différentes concentrations des molécules (effets doses-réponses) ont été incubés avec chacun des virus et les titres viraux ont été déterminés (infectivité en culture cellulaire; TCID₅₀/mL) et comparés avec les résultats de qPCR ou RT-qPCR. Les résultats montrent que les trois molécules diminuent l'infectivité du vDEP et qu'il y a une augmentation proportionnelle des valeurs Cq obtenus par RT-qPCR. Il est important de noter que les résultats des qPCR ou des RT-qPCR sont inversement proportionnels à la quantité de génome viral détectée, c'est-à-dire plus la valeur Cq est grande, moins il y a de génome viral présent dans l'échantillon testé.

Donc, ces résultats suggèrent que les trois molécules modulent l'infectivité du vDEP, et conséquemment qu'elles sont peu utiles pour faire la distinction entre les particules infectieuses des non-infectieuses car les molécules peuvent entrer en contact avec le matériel génétique des vDEP infectieux et ainsi inhiber la réaction RT-qPCR. Les vDEP infectieux devraient, selon notre hypothèse, être protégés par leur enveloppe et cela devrait empêcher les molécules de se lier au génome viral (avec un résultat de RT-qPCR faible, donc positif).

Malheureusement, nous observons le contraire nous indiquant que les molécules peuvent avoir accès au génome viral des particules virales intactes, donc infectieuses. Des tests préliminaires ont également été faits avec le vSRRP et des résultats similaires à ceux du vDEP ont été obtenus. Suite à ces résultats, il n'était pas judicieux de poursuivre la validation de la nouvelle méthode de diagnostic *in vivo* pour ces virus. Les résultats obtenus avec le virus PCV ont été beaucoup plus positifs pour une utilisation réelle future de la technologie. Les courbes doses-réponses démontrent que les molécules EMA/PMA/PMAxx n'affectent pas l'infectivité du PCV.

2) Inactiver les virus afin de démontrer l'efficacité des molécules.

Par la suite, nous avons testé l'efficacité des molécules EMA/PMA/PMAxx sur des échantillons de PCV type 2b (PCV2b) non-inactivés (infectieux) ou inactivés avec du Triton 5%, de l'eau de javel 0,6% ou autoclavés (non-infectieux). Le traitement avec du Triton 5% pendant 30 minutes n'est pas suffisant pour inactiver le PCV2b. L'eau de javel 0,6% inactive complètement le PCV2b, mais semble aussi détruire presque complètement son génome; toutes les valeurs Cq obtenues avec le virus inactivé avec l'eau de javel 0,6% sont presque tous négatifs ou seulement très faiblement positifs. Le PCV2b a aussi été inactivé par un cycle liquide d'autoclave de 15 minutes à 121.1°C. Cette inactivation nous a permis de confirmer que les traitements avec toutes les molécules (EMA/PMA/PMAxx) inhibent significativement les réactions de RT-qPCR du PCV2b inactivé avec un cycle d'autoclave. Ces résultats suggèrent que la nouvelle méthode de diagnostic pourrait être

utilisée comme outil moléculaire pour distinguer les particules virales infectieuses des particules virales non-infectieuses du PCV2b. Toutefois, ces résultats doivent être confirmés et validés à partir d'échantillons cliniques négatifs auxquels différents PCV2b (infectieux ou inactivés) auront été ajoutés afin d'imiter les conditions réelles d'utilisation de la nouvelle méthode de diagnostic.

3) Tester les molécules sur de vrais échantillons cliniques positifs.

Huit échantillons cliniques positifs pour PCV2b (tissus pulmonaires et sérums) ont été traités avec les trois molécules afin de vérifier notre hypothèse. Les résultats obtenus par qPCR montrent que la majorité des échantillons ne présentent qu'une faible augmentation en Cq lorsque traités avec les trois molécules car leur matériel génétique demeure, probablement, protégé par la capside. Ces résultats suggèrent que dans ces échantillons, il y a toujours des particules virales infectieuses de PCV2b qui ne sont pas affectées par les trois molécules. Il est connu que le PCV2b est très résistant dans l'environnement et qu'il peut donc demeurer infectieux dans des échantillons cliniques durant de longues périodes. Nous proposons, donc, d'effectuer de nouveaux tests avec du PCV2b autoclavé ou non et par la suite, ajouter ces virus à des échantillons cliniques négatifs afin de valider l'efficacité des molécules à différencier les particules virales infectieuses des non-infectieuses du PCV2b.

4) Confirmer l'efficacité des molécules dans un modèle d'infection *in vivo*, c'est-à-dire chez des porcelets vivants.

Pour répondre à cet objectif, nous avons tout d'abord voulu vérifier si notre modèle d'infection expérimentale au vDEP était fonctionnel. Ainsi, quatre porcelets ont été infectés avec du vDEP afin de vérifier et confirmer que le lot de vDEP que nous avons produit *in vitro* (c.-à-d. en laboratoire à partir de cultures cellulaires infectées) pouvait induire la maladie chez les porcelets inoculés. Trois des 4 porcelets ont développé des signes cliniques de diarrhée modérée à 3 jours post-infection (PI). Les prélèvements de fèces des quatre porcelets inoculés ont été trouvés positifs pour le vDEP par qRT-PCR à partir de 2 jours PI. Les intestins et les nœuds lymphatiques prélevés lors de la nécropsie à 4 jours PI ont aussi donné des résultats positifs pour le vDEP chez les quatre porcelets. Ces résultats démontrent que notre modèle d'infection expérimentale du vDEP est valide, que les virus du vDEP, produit *in vitro* en laboratoire, infectent les porcelets et sont capables de produire les signes cliniques attendus chez les animaux infectés.

APPLICATIONS POSSIBLES POUR L'INDUSTRIE ET/OU SUIVI À DONNER

Bien que la méthode de diagnostic développée ne soit pas efficace pour les virus enveloppés tels que le vDEP et le vSRRP, qui sont deux virus très importants pour l'industrie porcine, il semble être prometteur pour les virus non-enveloppés tel que le PCV. Il reste toutefois une étape à la validation du test. Des échantillons cliniques négatifs doivent êtreensemencés avec du PCV inactivé afin de confirmer l'efficacité des molécules. La méthode de diagnostic pourra par la suite être utilisée par l'industrie, si celle-ci a un besoin de différencier les virus infectieux des non-infectieux pour des virus non-enveloppés tel que le PCV.

POINT DE CONTACT POUR INFORMATION

Nom du responsable du projet : Carl A. Gagnon
Téléphone : 450-773-8521 ext 8681
Courriel : carl.a.gagnon@umontreal.ca

REMERCIEMENTS AUX PARTENAIRES FINANCIERS

Ces travaux ont été réalisés grâce à une aide financière du Programme de soutien à l'innovation en agroalimentaire, un programme issu de l'accord du cadre Cultivons l'avenir conclu entre le ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation et Agriculture et Agroalimentaire Canada.