



**HAL**  
open science

# Intérêt du génotypage des phages ARN F-spécifiques pour estimer la pollution fécale et virale des eaux

Leslie Ogorzaly

► **To cite this version:**

Leslie Ogorzaly. Intérêt du génotypage des phages ARN F-spécifiques pour estimer la pollution fécale et virale des eaux. Microbiologie et Parasitologie. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 2009. Français. NNT : 2009NAN10025 . tel-01748485

**HAL Id: tel-01748485**

**<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01748485>**

Submitted on 29 Mar 2018

**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.



## AVERTISSEMENT

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

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

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

Contact : [ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

ECOLE DOCTORALE "BIOLOGIE SANTE ENVIRONNEMENT"

# THESE

Présentée et soutenue publiquement

le 29 avril 2009

pour l'obtention du titre de

## DOCTEUR DE L'UNIVERSITE HENRI POINCARÉ

Mention Environnement et Santé

par

**Leslie OGORZALY**

née le 24 février 1980

Titulaire du Diplôme d'Etudes Approfondies

Mention Chimie et Microbiologie de l'Eau

Sujet :

*Intérêt du génotypage des phages ARN F-spécifiques pour  
estimer la pollution fécale et virale des eaux*

### MEMBRES DU JURY

**Président :** Pr Virginie FERRE-AUBINEAU (Laboratoire de virologie, CHU Nantes)

**Rapporteurs :** Pr Anicet BLANCH (Faculté de Biologie, Université de Barcelone, Espagne)  
Pr Pierre POTHIER (Centre national de référence des virus entériques, CHU Dijon)

**Examineurs :** Pr Armand MAUL (LMAM, UMR 7122 Université de Metz-CNRS)  
Pr Christophe GANTZER (LCPME, UMR 7564, Nancy Université-CNRS)

**Membre invité :** Mme Annick MOREAU (Pôle eau, Groupe Danone)



## Remerciements

Il ne m'a pas fallu attendre le moment de rédiger ces quelques lignes pour remercier l'ensemble des personnes qui m'ont conseillée, entourée, encouragée et soutenue tout au long de cette « périlleuse » épreuve ; mais je vais tout de même tenter de satisfaire au mieux au traditionnel exercice des remerciements, même si, pour certaines personnes, un simple « merci » me semble un peu dérisoire...

Je souhaite tout d'abord exprimer mes plus sincères remerciements au Professeur Christophe GANTZER, directeur scientifique de cette thèse et membre du jury. Christophe, merci de m'avoir accordé ta confiance depuis mon arrivée au laboratoire ; merci également pour ton encadrement exceptionnel, tes précieux conseils, ton soutien quasi quotidien et ta disponibilité sans faille pendant toutes ces années. Tu m'as en quelque sorte ouvert la voie de la recherche et de la virologie, qui n'étaient pas vraiment mes ambitions premières... J'espère que tu garderas un bon souvenir de ta première thésarde !

J'adresse mes remerciements au Professeur Armand MAUL, co-directeur de cette thèse et membre du jury, pour avoir accepté de prendre le wagon en cours de route. Notre collaboration et nos échanges scientifiques ont permis d'étoffer ce travail. Vos compétences et votre patience m'ont donné l'occasion d'approfondir mes connaissances rudimentaires en statistiques ; domaine parfois un peu « abstrait » à mes yeux, mais indispensable à une démarche scientifique rigoureuse.

Je suis très sensible à l'honneur que m'ont fait les Professeurs Anicet BLANCH et Pierre POTHIER en acceptant d'être rapporteurs de ce travail. Ces quelques lignes me permettent de vous remercier très sincèrement pour votre implication et vos rapports enthousiastes sur ce travail de thèse. Je remercie également vivement les autres membres du jury, le Professeur Virginie FERRE-AUBINEAU et Madame Annick MOREAU, d'avoir accepté cette charge supplémentaire de travail et d'avoir porté un vif intérêt ainsi qu'un regard critique à ce travail. Qu'ils soient tous assurés de ma profonde reconnaissance.

Je remercie vivement et sincèrement le Docteur Myriam PARIS, pour son soutien et sa disponibilité au cours de nos deux années de collaboration. Merci Myriam pour ton aide et ton efficacité lors de nos trop nombreuses péripéties avec les transports... A travers toi et Annick MOREAU, je remercie chaleureusement l'ensemble du groupe Danone pour le support financier m'ayant permis de réaliser une partie de ce travail.

Je souhaite également témoigner ma reconnaissance à l'ensemble des personnes avec lesquelles j'ai eu l'occasion de collaborer tout au long de ces années au laboratoire. Parmi elles,

Jean-Christophe SCHROTTER et Claire MACHINAL (Veolia Environnement) qui m'ont soutenu et encouragé lors de mes débuts dans le monde de la recherche, Sylvain SKRABER (Institut Gabriel Lippmann) avec qui j'ai eu le plaisir de collaborer sur le projet Virus et Biofilms et Isabelle BERTRAND (LCPME) qui a su m'apporter ses compétences scientifiques et me prodiguer de précieux conseils sur différents projets.

Je m'adresse ici à toutes les personnes du laboratoire et plus particulièrement à celles appartenant à l'équipe « Microbiologie Environnementale » pour leur dire combien j'ai été sensible à leur accueil, leur soutien et surtout leur bonne humeur. Merci pour cette chaleureuse et conviviale ambiance de travail ; j'ai eu un grand plaisir à passer ces quatre années avec vous tous.

Plus précisément, merci à Madame Anine Schwartzbrod pour son accueil, ses judicieux conseils et ses anecdotes qui agrémentaient toujours les pauses café.

Merci aux anciens thésards en virologie, Jérémie et Julien, de m'avoir intégré à votre joyeux duo (devenu trio) dès mon arrivée au laboratoire, et de m'avoir fait partager votre expérience scientifique. Merci à Sébastien, que je qualifierais amicalement « le bavard du laboratoire », pour son grain de folie et nos longues conversations, même quand le temps nous manquait ! Je te souhaite bon courage pour l'achèvement de ta thèse, l'échéance arrive à grands pas. Merci à Isabelle pour ses encouragements et les moments de détente sportive passez ensemble.

Merci à Laurent et David pour leur aide technique et logistique. Un clin d'œil tout particulier à Sandrine L. que j'ai très souvent mise à contribution pour la mise en forme de ce travail. Merci pour tes compétences informatiques, ta disponibilité et ton enthousiasme à chaque passage dans ton bureau.

Merci aux stagiaires, Adeline, Carole et Marine, d'avoir contribué à la réalisation de ce travail, parfois pendant vos vacances. J'espère vous avoir transmis le « virus » de la recherche. Également une petite pensée pour les nouvelles graines de chercheurs du laboratoire Sandra et Christelle. Merci pour votre soutien moral et « culinaire » lors de mes longues soirées de rédaction au laboratoire... Un petit aperçu de ce qui vous attend, vous êtes prévenues !!!

Un grand merci à mes amis Gaëlle, Julien, Romy, Laëticia, Jérémie, Séb, Marc, Nico... et aux maîtres-nageurs Xa, Claude, Béné, Steph et leurs conjoints pour les soirées et les weekends de détente et de défoulement.

Bien évidemment, je remercie infiniment toute ma famille, en particulier mes parents, Vanessa, Ghislain, Annaëlle, Julien, mamie Jacqueline ainsi que ma belle famille, notamment Françoise et Sébastien, pour leur patience lors de mes trop longues périodes d'absence, mais surtout pour leur encouragement et leur soutien indéfectible.

Enfin, il est une personne qui, bien que n'apparaissant jamais dans ce manuscrit, a pourtant longuement et patiemment contribué à la réalisation de ce travail. Pour cette raison et bien d'autres encore, Greg, merci pour tout ce que tu m'apportes...







## Liste des abréviations

|                       |  |
|-----------------------|--|
| <b>ACP</b>            | Analyse en Composantes Principales                   |
| <b>Ad</b>             | Adénovirus   |
| <b>ADN</b>            | Acide désoxyribonucléique                            |
| <b>AFLP</b>           | Amplified Fragment Length Polymorphism               |
| <b>ARA</b>            | Antibiotic Resistance Analysis                       |
| <b>ARN</b>            | Acide ribonucléique                                  |
| <b>BLAST</b>          | Basic Local Alignment Search Tool                    |
| <b>Ct</b>             | Cycle threshold (cycle seuil)                        |
| <b>db</b>             | double brin  |
| <b>DGGE</b>           | Denaturing Gradient Gel Electrophoresis              |
| <b>dNTP</b>           | Désoxyribonucléotide triphosphate                    |
| <b>ECP</b>            | Effet cytopathogène                                  |
| <b>FAM</b>            | 6-carboxyfluorescéine                                |
| <b>FNU</b>            | Formazin Nephelometric Unit                          |
| <b>GG</b>             | Génogroupe   |
| <b>HAV</b>            | Hepatitis A virus                                    |
| <b>IAC</b>            | Internal Amplification Control                       |
| <b>ICC-PCR</b>        | Integrated Cell Culture – Polymerase Chain Reaction  |
| <b>IFF</b>            | Infectious Focus Forming                             |
| <b>ISO</b>            | International Standardization Organisation           |
| <b>kb</b>             | kilo base  |
| <b>kpb</b>            | kilo paire de base                                   |
| <b>MAR</b>            | Multiple Antibiotic Resistance                       |
| <b>MGB</b>            | Minor Groove Binding                                 |
| <b>NCBI</b>           | National Center for Biotechnology Information        |
| <b>NFQ</b>            | Non Fluorescent Quencher                             |
| <b>NPP</b>            | Nombre le Plus Probable                              |
| <b>NPPUC</b>          | Nombre le Plus Probable d'Unités Cytopathogènes      |
| <b>PBS</b>            | Phosphate Buffer Saline                              |
| <b>pb</b>             | paire de base  |
| <b>PCR</b>            | Polymerase Chain Reaction                            |
| <b>qPCR</b>           | quantitative PCR                                     |
| <b>PFGE</b>           | Pulsed Field Gel Electrophoresis                     |
| <b>RAPD</b>           | Randomly Amplified Polymorphic DNA                   |
| <b>RFLP</b>           | Restriction Fragment Length Polymorphism             |
| <b>RT</b>             | Reverse-Transcription                                |
| <b>sb</b>             | simple brin  |
| <b>TAMRA</b>          | 6-carboxytétraméthylrhodamine                        |
| <b>Taq</b>            | Thermophilus aquaticus                               |
| <b>Tm</b>             | Temperature melting                                  |
| <b>T<sub>90</sub></b> | Temps nécessaire pour inactiver 90% d'une population |
| <b>UDP</b>            | Unité de Détection de PCR                            |
| <b>UFP</b>            | Unité Formant Plaque                                 |
| <b>USEPA</b>          | United States Environmental Protection Agency        |



# *Sommaire*



**INTRODUCTION – OBJECTIF DE L’ETUDE.....1**

**PARTIE I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....2**

|            |  |    |
|------------|--|----|
| 1.         | LES BACTERIOPHAGES ARN F-SPECIFIQUES .....   | 7  |
| 1.1.       | La structure des phages ARN F-spécifiques.....   | 7  |
| 1.1.1.     | Le génome viral .....  | 7  |
| 1.1.1.1.   | Phylogénie de la famille des <i>Leviviridae</i> .....  | 9  |
| 1.1.1.2.   | La classification des espèces connues .....  | 11 |
| 1.1.2.     | La capsid virale .....   | 12 |
| 1.2.       | Les méthodes de détection et de typage des phages ARN F-spécifiques.....                               | 13 |
| 1.2.1.     | La détection et l'énumération par la méthode des plages de lyse.....                                   | 13 |
| 1.2.2.     | Les méthodes de typage des bactériophages ARN F-spécifiques.....                                       | 14 |
| 1.2.2.1.   | Les méthodes immunologiques.....   | 14 |
| 1.2.2.1.1. | Le sérotypage .....  | 14 |
| 1.2.2.1.2. | Le test d'agglutination indirecte.....   | 15 |
| 1.2.2.2.   | Les méthodes génétiques .....  | 15 |
| 1.2.2.2.1. | Les techniques d'hybridation moléculaire.....  | 15 |
| 1.2.2.2.2. | L'amplification par RT-PCR .....   | 16 |
| 1.2.2.2.3. | La détection et la quantification par RT-PCR en temps réel.....  | 16 |
| 1.2.2.3.   | Comparaison des techniques de typage.....  | 17 |
| 2.         | LES BACTERIOPHAGES ARN F-SPECIFIQUES COMME INDICATEURS DE POLLUTION FECALE ET VIRALE DES EAUX .....    | 19 |
| 2.1.       | La pollution fécale et virale des eaux .....   | 20 |
| 2.1.1.     | Les virus pathogènes à transmission hydrique.....  | 20 |
| 2.1.2.     | La persistance des virus entériques dans les eaux .....  | 29 |
| 2.2.       | Les indicateurs de pollution de nature virale.....   | 31 |
| 2.2.1.     | Les virus pathogènes .....   | 31 |
| 2.2.2.     | Les bactériophages.....  | 32 |
| 2.2.2.1.   | Les phages ARN F-spécifiques comme indicateurs de pollution fécale .....                               | 34 |
| 2.2.2.2.   | Les phages ARN F-spécifiques comme indicateurs viraux de pollution virale .....                        | 38 |
| 3.         | LES BACTERIOPHAGES ARN F-SPECIFIQUES COMME OUTIL POUR DETERMINER L'ORIGINE DE LA POLLUTION FECALE .... | 40 |
| 3.1.       | Les méthodes « bibliothèque-dépendantes ».....   | 41 |
| 3.1.1.     | Les analyses phénotypiques .....   | 42 |
| 3.1.2.     | Les analyses génétiques .....  | 44 |
| 3.1.3.     | Les limites des méthodes « bibliothèque-dépendante » .....   | 46 |
| 3.2.       | Les méthodes « bibliothèque-indépendantes ».....   | 48 |
| 3.2.1.     | Les méthodes bactériennes.....   | 48 |
| 3.2.2.     | Les méthodes virales .....   | 49 |

**PARTIE II : MATERIELS ET METHODES ..... 57**

|        |   |    |
|--------|---|----|
| 1.     | VIRUS .....   | 59 |
| 2.     | METHODES DE CONCENTRATION DES VIRUS A PARTIR DES EAUX.....                | 59 |
| 2.1.   | Adsorption-éluion sur laine de verre .....                                | 59 |
| 2.2.   | Adsorption-éluion sur membrane électropositive.....                       | 60 |
| 3.     | METHODES DE DETECTION ET DE QUANTIFICATION DU GENOME VIRAL.....           | 61 |
| 3.1.   | Extraction des acides nucléiques .....                                    | 61 |
| 3.1.1. | Extraction avec des colonnes à membrane de silice .....                   | 61 |
| 3.1.2. | Extraction avec des particules de silice magnétiques .....                | 62 |
| 3.2.   | Détection par double amplification : nested ou semi nested (RT)-PCR ..... | 63 |
| 3.2.1. | Recherche des adénovirus humains .....                                    | 63 |
| 3.2.2. | Recherche des norovirus génogroupe I et génogroupe II .....               | 64 |
| 3.2.3. | Révélation des produits de PCR.....                                       | 66 |
| 3.3.   | Détection par (RT)-PCR en temps réel.....                                 | 67 |
| 4.     | CULTURE DES ADENOVIRUS INFECTIEUX.....                                    | 69 |
| 4.1.   | Quantification des virus infectieux.....                                  | 70 |
| 4.2.   | Détection des virus infectieux par ICC-PCR .....                          | 70 |

|        |   |    |
|--------|---|----|
| 5.     | TRAITEMENT STATISTIQUE DES DONNEES.....   | 71 |
| 5.1.   | Analyse en composantes principales .....  | 71 |
| 5.2.   | Etude des cinétiques d'inactivation des particules virales et de la dégradation du génome viral ..... | 71 |
| 5.2.1. | Test de linéarité du modèle.....  | 71 |
| 5.2.2. | Comparaison des pentes .....  | 72 |
| 5.2.3. | Prédiction de $y$ pour une valeur de $x$ .....  | 73 |

**PARTIE III : RESULTATS ..... 75**

**CHAPITRE 1 : ASPECTS METHODOLOGIQUES DE LA DETECTION DES VIRUS DANS LES EAUX..... 77**

|        |   |     |
|--------|---|-----|
| 1.     | METHODE DE DETECTION ET DE GENOTYPAGE DES BACTERIOPHAGES ARN F-SPECIFIQUES .....      | 81  |
| 2.     | MISE EN EVIDENCE DES ADENOVIRUS ET DES NOROVIRUS PAR AMPLIFICATION GENIQUE .....      | 93  |
| 2.1.   | Détection des norovirus et des adénovirus par double amplification : nested-PCR ..... | 93  |
| 2.2.   | Quantification des adénovirus humains par PCR en temps réel .....                     | 95  |
| 3.     | METHODE DE CONCENTRATION DES VIRUS A PARTIR DES EAUX.....                             | 98  |
| 3.1.   | Concentration à partir d'eau de surface .....   | 98  |
| 3.2.   | Concentration à partir d'eaux souterraines .....                                      | 98  |
| 3.2.1. | Protocole expérimental.....   | 100 |
| 3.2.2. | Choix de la membrane électropositive.....   | 100 |

**CHAPITRE 2 : GENOTYPAGE DES PHAGES ARN F-SPECIFIQUES DANS LES EAUX USEES URBAINES..... 105**

|    |  |     |
|----|--|-----|
| 1. | DISTRIBUTION DES GENOGROUPES DE PHAGES ARN F-SPECIFIQUES DANS LES EAUX USEES ET LES BIOFILMS ..... | 107 |
| 2. | PERSISTANCE DES PHAGES ARN F-SPECIFIQUES DANS LES EAUX USEES ET LES BIOFILMS.....                  | 110 |

**CHAPITRE 3 : ETUDE DE LA POLLUTION FECALE ET VIRALE D'UNE EAU DE RIVIERE ..... 133**

**CHAPITRE 4 : ETUDE DE LA POLLUTION FECALE ET VIRALE DES EAUX SOUTERRAINES ..... 151**

|      |   |     |
|------|---|-----|
| 1.   | PERSISTANCE DES PARTICULES VIRALES DANS L'EAU SOUTERRAINE ..... | 153 |
| 1.1. | Démarche expérimentale.....                                     | 153 |
| 1.2. | Résultats de l'étude de persistance .....                       | 154 |
| 2.   | RECHERCHE DE GENOME VIRAL DANS LES EAUX SOUTERRAINES .....      | 160 |
| 2.1. | Démarche expérimentale.....                                     | 160 |
| 2.2. | Résultats de l'analyse virologique des eaux souterraines .....  | 161 |

**DISCUSSION GENERALE - CONCLUSION..... 167**

**REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES ..... 179**

**ANNEXES ..... 205**

*Introduction – Objectif de l'étude*





Parmi les virus transmissibles à l'homme par voie orale, les virus responsables de gastroentérite aiguë et d'hépatite aiguë sont un des fléaux les plus redoutés à l'échelle planétaire (AFSSA, 2007). Il s'agit de virus à multiplication entérique pour lesquels le risque de transmission à l'homme via l'eau (eau de boisson, eau de baignade...) a été démontré. Depuis plus d'un siècle, ce sont les indicateurs bactériens de pollution fécale qui sont utilisés pour gérer le risque d'infection virale lié au milieu hydrique (*Escherichia coli*, entérocoques). Actuellement ces outils montrent malheureusement des limites, notamment en raison d'une survie et d'un comportement des bactéries dans l'environnement totalement différents de ceux des virus. C'est ainsi que des indicateurs de pollution fécale de nature virale ont été proposés (coliphage somatiques, bactériophages ARN F-spécifiques et phage de *Bacteroides fragilis*). A titre d'exemple, une étude épidémiologique récente a révélé que les indicateurs bactériens conventionnels, recommandés par l'organisation mondiale de la santé, ne permettraient pas de prédire les risques de maladies gastro-intestinales au niveau d'une zone de baignade (Colford *et al.*, 2007). Dans cette étude, seuls les bactériophages ARN F-spécifiques ont eu une valeur prédictive des risques gastro-intestinaux.

Les bactériophages ARN F-spécifiques sont des virus qui infectent spécifiquement les bactéries Gram négatif possédant des pili sexuels (*E. coli* ...). Ces virus, non enveloppés, sont constitués d'une capsid de nature uniquement protéique et d'un simple brin d'ARN servant de support à l'information génétique. Avec une taille comprise entre 20 et 30 nm, ils font partie des plus petits virus connus. D'un point de vue écologique, ces phages, hôtes habituels ou occasionnels du tube digestif de l'homme et des animaux, sont retrouvés en grande quantité dans les eaux usées brutes, à des concentrations de l'ordre de  $10^4$  à  $10^6$  UFP/100mL (Chung *et al.*, 1998; Contreras-Coll *et al.*, 2002; Lucena *et al.*, 2003; Blanch *et al.*, 2004; Lodder et de Roda Husman, 2005; Mandilara *et al.*, 2006; Gourmelon *et al.*, 2007). Ainsi, ils ont naturellement été proposés comme indicateurs de pollution fécale du milieu hydrique, au même titre que les indicateurs bactériens tels que *Escherichia coli* ou les entérocoques (Havelaar et Pot-Hogbeboom, 1988; IAWPRC, 1991; Armon et Kott, 1996). De plus, en raison de leur structure similaire à celles des principaux virus entériques pathogènes (norovirus, virus de l'hépatite A ...), ils ont également été proposés comme indicateurs de pollution virale. En effet, par opposition aux bactéries indicatrices de pollution fécale, ces phages auraient un comportement dans l'environnement plus représentatif de celui des virus pathogènes (Havelaar *et al.*, 1993; Grabow, 2001).

Dans les années 1980, Furuse et ses collaborateurs décrivent l'existence de 4 sérotypes au sein des phages ARN F-spécifiques. Ces observations, réalisées à partir de l'analyse d'échantillons de selles (humaines et animale) ou d'eaux usées, ont également mis en évidence une répartition particulière des sérotypes en fonction de l'origine des échantillons. Ainsi, ils observent que les sérotypes II et III sont majoritairement associés à des échantillons d'origine humaine, contrairement aux sérotypes I et IV principalement associés à des échantillons animaux (Furuse *et al.*, 1981; Osawa *et al.*, 1981; Havelaar *et al.*, 1990). A partir des années 1990, grâce à l'avènement des techniques moléculaires, ces phages ont pu être caractérisés d'un point de vue génomique, aboutissant également à une distinction en quatre génogroupes. Ceci a donné lieu au développement de méthodes de génotypage basées sur des techniques d'hybridation moléculaire. Il s'agit en fait de réaliser une culture des phages puis de révéler les différents génogroupes à l'aide de sondes oligonucléotidiques spécifiques (Hsu *et al.*, 1995; Beekwilder *et al.*, 1996a; Schaper et Jofre, 2000). L'amplification du génome par RT-PCR avant l'étape d'hybridation est également possible (Vinjé *et al.*, 2004). Ces méthodes, et plus particulièrement l'étape d'hybridation, ont le désavantage d'être difficiles et contraignantes à mettre en œuvre (Wolf *et al.*, 2008). Malgré ces difficultés méthodologiques,

cette technique a permis d'établir que le génotypage des phages ARN F-spécifiques pouvait être un outil efficace pour déterminer l'origine d'une pollution fécale. En effet, parmi les 26 paramètres chimiques et microbiologiques évalués au cours d'un projet européen (EVK1-2000-22080), le génotypage de phages ARN F-spécifiques a été classé parmi les quatre meilleurs outils permettant de discriminer l'origine de la pollution fécale (Blanch *et al.*, 2004; Blanch *et al.*, 2006). Cependant, dans cette étude, tout comme de nombreuses autres s'intéressant à l'écologie des différents génogroupes, les eaux usées ont préférentiellement été ciblées (Schaper *et al.*, 2002b; Cole *et al.*, 2003; Long *et al.*, 2005; Stewart-Pullaro *et al.*, 2006; Sundram *et al.*, 2006; Gourmelon *et al.*, 2007). Certaines de ces études décrivent également quelques données concernant les eaux de surface, mais globalement, il reste un vide important concernant la présence de ces génogroupes dans les eaux naturelles. Plus récemment, une étude a été entièrement consacrée au génotypage des phages ARN F-spécifiques dans les eaux d'estuaires (Love *et al.*, 2007).

Au niveau des eaux naturelles, la problématique peut être différente de celle rencontrée dans les eaux usées. En effet, dans ce type de milieu, d'autres paramètres peuvent entrer en ligne de compte lors de l'étude de la distribution des quatre génogroupes. Ces paramètres sont, par exemple, la dilution des microorganismes fécaux, la persistance des microorganismes dans l'environnement ou encore la possibilité d'être confronté à des milieux plus complexes pouvant être soumis à différentes sources de pollution fécale. Concernant la persistance des phages ARN F-spécifiques infectieux, des travaux ont démontré une meilleure survie des phages appartenant aux génogroupes I et II par rapport à ceux des autres génogroupes, dans différents types d'eaux (Brion *et al.*, 2002; Schaper *et al.*, 2002a; Long et Sobsey, 2004; Muniesa *et al.*, 2009). En conséquence, il est très probable que la distribution des quatre génogroupes dans les eaux de surface soit influencée par ces différences de persistance du caractère infectieux, induisant un biais important dans l'interprétation des résultats. Or, les méthodes d'amplification génique, qui détectent directement le génome sans même passer par une étape de culture, offre la possibilité de mettre en évidence du génome viral alors même que les particules virales ne présentent plus de caractère infectieux. De nombreuses études montrent que le génome viral est plus persistant que la particule infectieuse associée et ceci quel que soit le milieu étudié (Arnal *et al.*, 1998; Gassilloud *et al.*, 2003; Skraber *et al.*, 2004; Bae et Schwab, 2008; Espinosa *et al.*, 2008). Ainsi, la recherche directe du génome viral, sans étape de culture, pourrait permettre de suivre plus longtemps les différents génogroupes dans l'environnement.

Dans ce contexte, l'objectif du travail est de définir l'intérêt du génotypage des phages ARN F-spécifiques pour estimer la pollution fécale et virale des eaux superficielles et des eaux souterraines. Il est donc indispensable de situer l'information apportée par le génotypage par rapport à celle fournie par la recherche d'indicateurs bactériens (*E. coli*, entérocoques) et par la détection des virus pathogènes pour l'homme (norovirus, adénovirus). Ceci implique des recherches et des développements sur au moins trois niveaux. Le premier niveau est purement méthodologique. Il consiste à développer une nouvelle méthode de génotypage des phages ARN F-spécifiques basée sur la détection directe et spécifique du génome de chaque génogroupe (RT-PCR en temps réel). Par ailleurs, des méthodes pour estimer la pollution fécale et virale devront, le cas échéant, être définies et adaptées à notre objectif. Le deuxième aspect vise à confirmer l'écologie des phages ARN F-spécifiques dans les eaux usées urbaines qui constituent le premier maillon du cycle de contamination fécale et virale du milieu hydrique. Les résultats obtenus avec la nouvelle méthode de génotypage pourront ainsi être comparés aux nombreuses données déjà disponibles concernant le génotypage des phages dans les eaux usées. Le troisième aspect consiste à évaluer la

présence et la distribution des différents génogroupes dans deux cas précis et totalement différents du point de vue de la pollution fécale et virale : une eau de rivière sous influence anthropique et des eaux souterraines, a priori, mieux protégées de ce type de pollution.

Ce rapport de thèse s'articule autour de quatre grandes parties. Tout d'abord, la première partie est dédiée à une étude bibliographique consacrée aux bactériophages ARN F-spécifiques et à leurs différentes utilisations dans le cadre d'études destinées à évaluer et à caractériser la pollution fécale et virale des eaux. La seconde partie est consacrée à une brève description des matériels et méthodes ne figurant pas dans les articles scientifiques joints à ce manuscrit. La troisième partie, dédiée aux résultats, est présentée sous forme de publications, parues (2) ou soumise (1). Avant chaque publication, un résumé en français synthétise l'essentiel de la problématique, de la démarche scientifique, des résultats et de leurs interprétations. Le premier chapitre de cette partie présente, tout d'abord, l'ensemble des aspects méthodologiques qu'il a fallu développer ou adapter de manière à atteindre les objectifs fixés, et notamment la nouvelle méthode de génotypage des bactériophages ARN F-spécifiques. Ensuite, les trois chapitres suivants traitent des différents résultats obtenus pour les trois types de milieux étudiés et sont donc respectivement consacrées aux eaux usées, à l'eau de rivière et aux eaux souterraines. Enfin, dans la dernière partie, l'ensemble des résultats est discuté de manière à dégager et à préciser les apports scientifiques obtenus à partir des résultats de génotypage par RT-PCR en temps réel, dans le cadre d'études dédiées aux pollutions fécales du milieu hydrique.



# *Partie I : Etude Bibliographique*



## 1. LES BACTERIOPHAGES ARN F-SPECIFIQUES

Les bactériophages ARN F-spécifiques appartiennent à la famille des *Leviviridae*. Ils ne possèdent pas d'enveloppe et sont constitués uniquement d'une capsid de nature protéique à l'intérieur de laquelle se trouve un acide nucléique (ARN) qui est le support de l'information génétique. Ces virus de 20-30 nm de diamètre font partie des virus les plus petits connus à l'heure actuelle.

Ils infectent les bactéries possédant des pili sexuels ou F-pili (Figure 1) comme les entérobactéries, telles que *Escherichia coli*, mais également les espèces du genre *Caulobacter*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter* et probablement beaucoup d'autres bactéries Gram négatif exprimant le pili approprié à leur surface.

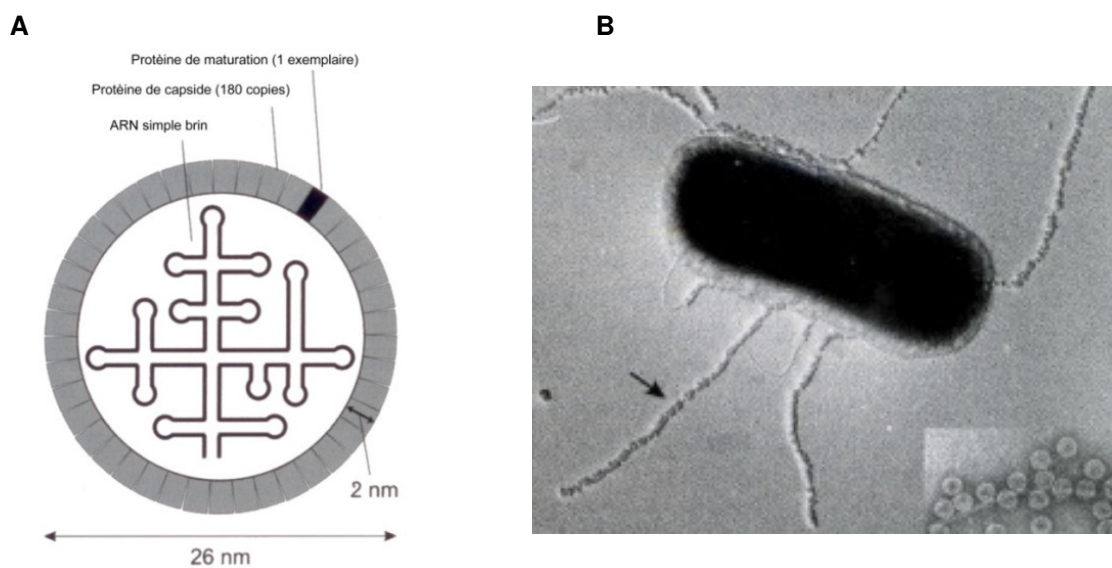


Figure 1. Morphologie des bactériophages ARN F-spécifiques. (A) : Représentation schématique de la structure virale. (B) : Bactérie *Escherichia coli* avec des bactériophages MS2 attachés à ses F-pili (adaptée du 8e rapport du comité international de taxonomie des virus, Fauquet *et al.*, 2005).

### 1.1. La structure des phages ARN F-spécifiques

#### 1.1.1. Le génome viral

Les virus se répliquent à partir de leur seul acide nucléique une fois que celui-ci se retrouve dans le cytoplasme bactérien. Leur génome sert à la fois de support de l'information génétique mais aussi de support pour sa propre réplication.

La famille des *Leviviridae* contient deux genres : les *Levivirus* et les *Allolevivirus*. Par exemple, les phages MS2 et GA appartiennent au genre *Levivirus* alors que les phages Q $\beta$  et SP font partie du genre *Allolevivirus*. Le génome des bactériophages ARN F-spécifiques est constitué d'un ARN simple brin non segmenté de polarité positive présentant quatre séquences codantes (Figure 2). Trois gènes sont communs à la famille des *Leviviridae* alors que le quatrième est dépendant du genre auquel appartient le phage. Les gènes communs sont ceux codant :

- la protéine de maturation (ou protéine A), nécessaire à la reconnaissance du récepteur situé au niveau du pili sexuel de la bactérie hôte ;

- la protéine de capsid, unité constitutive de base de la capsid ;
- la réplicase, nécessaire à la réplication du génome viral au sein de la cellule hôte. Il s'agit d'une ARN polymérase ARN dépendante.

Le dernier gène est, soit une protéine de lyse impliquée dans la lyse bactérienne pour le genre *Levivirus*, soit une protéine « readthrough » pour le genre *Allolevivirus*. Dans ce dernier cas, la lyse de la cellule bactérienne est assurée par la protéine de maturation, et la protéine « readthrough » jouerait un rôle dans le phénomène d'infectivité (Klovins *et al.*, 2002). Les deux genres se différencient également par la taille du génome viral, celui des *Allolevivirus* étant plus grand que celui des *Levivirus*. Ceci est principalement dû à une taille plus importante des intercistrons et à un gène codant pour la protéine de maturation plus long (Klovins *et al.*, 2002).

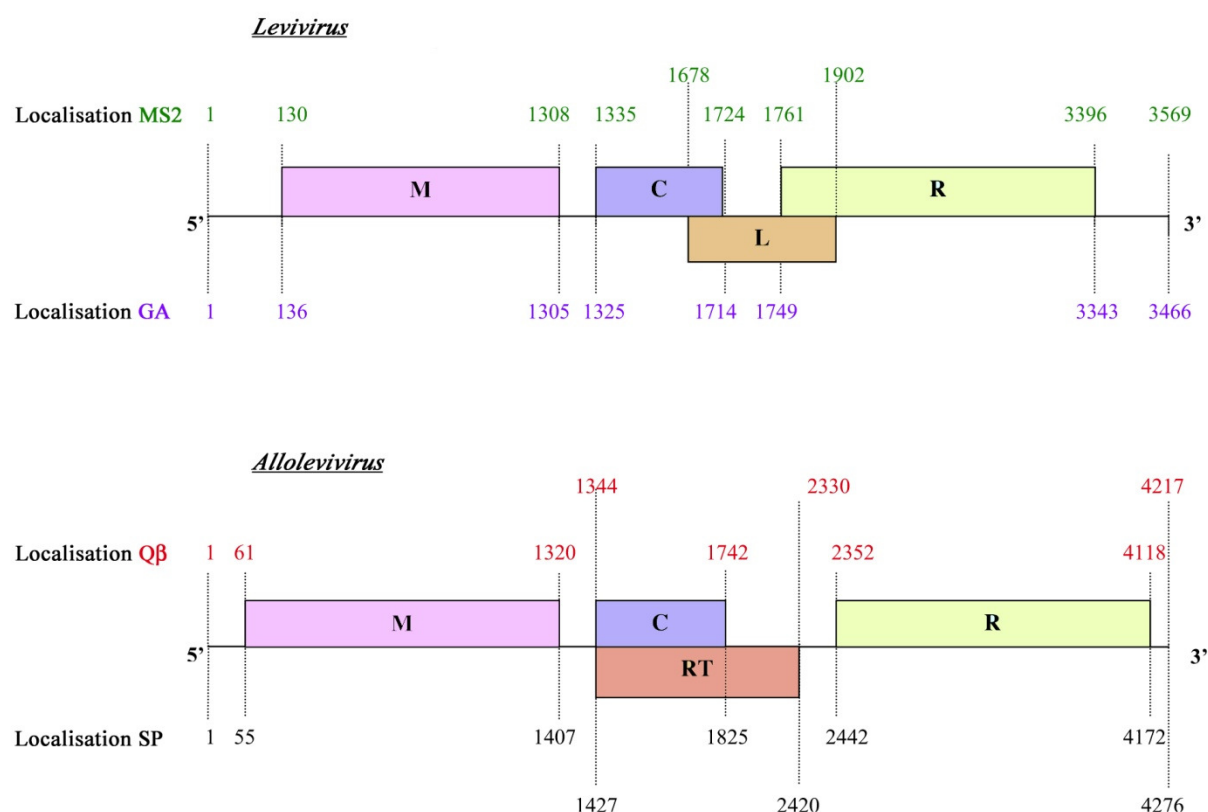


Figure 2. Organisation génétique de l'ARN des bactériophages MS2, GA, Q $\beta$  et SP (Inokuchi *et al.*, 1986; Inokuchi *et al.*, 1988; Priano *et al.*, 1995; Bollback et Huelsenbeck, 2001).

M : gène de la protéine de maturation, C : gène de la protéine de capsid, R : gène de la réplicase, L : gène de la protéine de lyse, RT : gène de la protéine « readthrough ».

Les gènes communs sont représentés au-dessus du génome et le gène différent au-dessous. Les localisations des gènes des phages MS2 et Q $\beta$  sont situées dans les parties supérieures des schémas et celle des phages GA et SP dans les parties inférieures. Les séquences sont issues de la base de données Genbank avec les numéros d'accès suivants : MS2 (NC\_001417) ; GA (NC\_001426) ; Q $\beta$  (AY099114) ; SP (X07489).

De nombreuses structures secondaires du génome ont été décrites pour ces phages, notamment pour les phages MS2 et Q $\beta$  (Min Jou *et al.*, 1972; Ball, 1973; Fiers *et al.*, 1976; Jacobson, 1976; Edlind et Bassel, 1977; Hasegawa *et al.*, 1979; Iserentant et Fiers, 1979; Adhin *et al.*, 1990; Skripkin *et al.*, 1990; Guisez *et al.*, 1993; Beekwilder *et al.*, 1995; Groeneveld *et al.*, 1995; Beekwilder *et al.*, 1996b; Jacobson *et al.*, 1998).



Ces structures secondaires semblent jouer des rôles importants, par exemple dans la régulation de la traduction du génome viral.

### 1.1.1.1. Phylogénie de la famille des *Leviviridae*

L'analyse phylogénétique de Bollback et Huelsenbeck (2001) a permis de décrire l'évolution du génome des *Leviviridae* en terme de structure, d'organisation et de taille à partir d'un ancêtre commun hypothétique dont seraient issus l'ensemble des phages ARN F-spécifiques connus aujourd'hui (groupe monophylétique). Cet ancêtre commun semble avoir été très semblable aux *Levivirus* et au phage PP7 dans l'architecture du génome, avec une petite taille de génome, l'absence du gène « readthrough » et la présence d'un gène de lyse. La première évolution du génome se manifeste par l'événement A (Figure 3) au niveau de la spécificité du plasmide F, c'est-à-dire au niveau du récepteur présent sur la bactérie hôte. Ce changement a abouti à la séparation des individus selon leur spécificité d'hôte ; d'un côté le phage PP7 spécifique de *Pseudomonas* et de l'autre les *Levivirus* et les *Allolevivirus* spécifiques des entérobactéries. Plus tard, trois événements consécutifs, nommés B, C et D (Figure 3) seraient à l'origine de la séparation en deux genres : *Levivirus* et *Allolevivirus*. Ces trois événements sont : (B) une augmentation de la taille du génome par recombinaison ou par un événement de duplication, (C) une perte de la région codante pour la protéine de lyse, transférant la fonction de lyse au niveau de la protéine de maturation et enfin (D) l'apparition d'une nouvelle protéine « readthrough » impliquée dans l'infection de la cellule hôte.

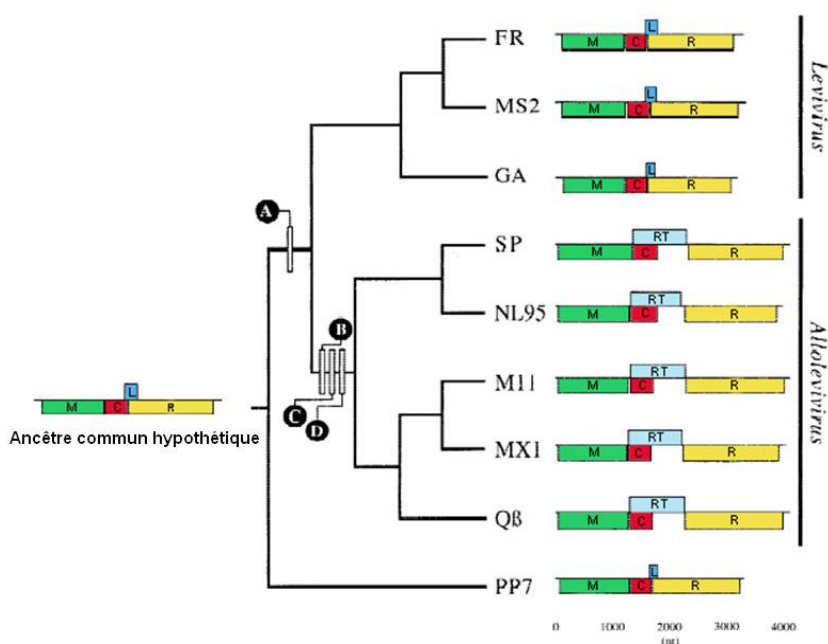


Figure 3. Arbre phylogénétique des *Leviviridae* établi à partir de l'analyse de la séquence complète du gène de la protéine de capsid et évolution du génome viral (adapté de Bollback et Huelsenbeck, 2001).

M : gène de la protéine de maturation, C : gène de la protéine de capsid, R : gène de la réplicase, L : gène de la protéine de lyse, RT : gène de la protéine « readthrough », A, B, C et D : événements mutationnels.

Une autre étude phylogénétique (Klovins *et al.*, 2002) a été entreprise avec un membre supplémentaire de la famille des *Leviviridae* responsable d'infection chez les acinéto bactéries, le phage

AP250. Ce phage partagerait des caractéristiques à la fois avec le phage MS2 et avec le phage Q $\beta$ . Suite à cette observation, un nouvel arbre phylogénétique (Figure 4) a été proposé avec un ancêtre commun possédant uniquement les trois gènes communs à l'ensemble de la famille. Pour cet ancêtre hypothétique, la fonction de lyse serait portée par la protéine de maturation (protéine A), comme cela est toujours le cas chez le phage Q $\beta$ .

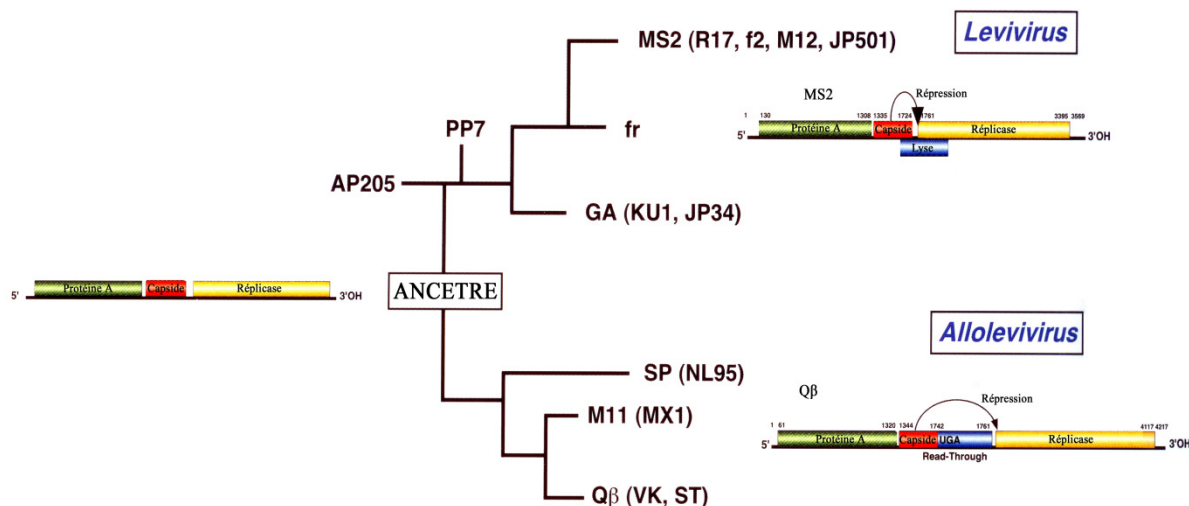


Figure 4. Arbre phylogénétique proposé pour la famille des *Leviviridae*. Les relations entre les individus ont été établies à partir des caractéristiques des séquences génomiques et des structures secondaires de l'ARN (adapté de Klovins *et al.* (2002), Fauquet *et al.* (2005)).

Au-delà de la distinction en deux genres, les phages appartenant à la famille des *Leviviridae* ont aussi été répartis en quatre groupes (nommés I, II, III et IV). Cette répartition a initialement été établie suite à l'application de tests sérologiques (Furuse *et al.*, 1978) ou à l'analyse de l'activité de la réplicase (Miyake *et al.*, 1971). Les résultats des analyses phylogénétiques (Bollback et Huelsenbeck, 2001) ont bien confirmé ce schéma de classification du point de vue de l'analyse des séquences génétiques. Le génogroupe I, représenté par le phage MS2, et le génogroupe II, représenté par le phage GA, appartiennent au genre *Levivirus*. La différence majeure entre les membres de ces deux génogroupes est une délétion d'environ 60 nucléotides au niveau de la région 3' non-traduite (3'UTR) des phages du génogroupe II. Il y a également une délétion d'environ 35 nucléotides au niveau du gène de la réplicase. Les génogroupes III et IV, représentées respectivement par les phages Q $\beta$  et SP, appartiennent au genre *Allolevivirus*. La principale différence entre les deux génogroupes se situe au niveau du gène de la protéine de maturation avec une délétion d'environ 90 nucléotides chez les phages du génogroupe III. A titre de comparaison, les pourcentages d'identité du génome des quatre phages modèles sont présentés dans le Tableau 1.

Tableau 1. Calculs d'identité (exprimés en %) des génomes des quatre bactériophages modèles MS2, GA, Q $\beta$  et SP.

| Identité (%)               | GA (génogroupe II) | Q $\beta$ (génogroupe III) | SP (génogroupe IV) |
|----------------------------|--------------------|----------------------------|--------------------|
| MS2 (génogroupe I)         | 57                 | 47,1                       | 47,3               |
| GA (génogroupe II)         | -                  | 46,6                       | 46,9               |
| Q $\beta$ (génogroupe III) | -                  | -                          | 58,9               |

Plus récemment, dans une étude (Vinjé *et al.*, 2004) visant à rechercher les quatre génogroupes dans des eaux usées, un potentiel nouveau génogroupe dans le genre *Levivirus* a été décrit (génogroupe JS). Les deux souches observées présentaient environ 40% de différence au niveau de leurs séquences génomiques par rapport à celles des génogroupes I et II. Cette observation a été confirmée par d'autres auteurs (Love *et al.*, 2007). En effet, d'autres souches JS, provenant d'échantillons d'eau et de coquillages de différents estuaires, ont été observées. Ces souches montrent environ 60% de similarité avec le phage MS2. Pour les auteurs de ces deux études, le fait que des souches de cet éventuel nouveau génogroupe aient pu être isolées dans des échantillons provenant de régions géographiquement différentes confirme que ces phages pourraient former une lignée stable au sein du genre *Levivirus* (Figure 5).

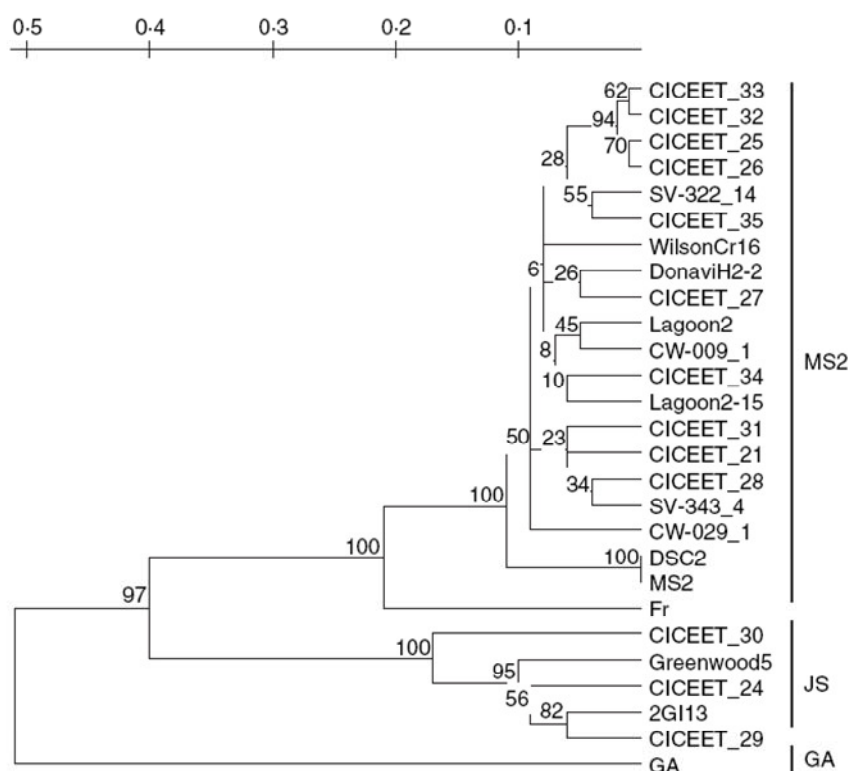


Figure 5. Arbre phylogénétique établi à partir d'une séquence de 189 nucléotides du gène de la réplicase des *Levivirus* et obtenu à l'aide du modèle de Jukes and Cantor, auquel sont associées des valeurs de bootstrap (Love *et al.*, 2007). Celui-ci met en évidence l'éventuel nouveau génogroupe nommé JS.

#### 1.1.1.2. La classification des espèces connues

Actuellement, environ une soixantaine de phages ARN F-spécifiques responsables d'infection chez les entérobactéries ont été décrits, dont certains n'ont été isolés que très récemment (Nishihara *et al.*, 2006). Il existe 16 phages appartenant au genre *Levivirus*, 10 appartenant au genre *Allolevivirus* et plus d'une trentaine sont en attente de classification (Tableau 2).

Tableau 2. Classification des *Leviviridae* (adaptée du 8<sup>e</sup> rapport du comité international de taxonomie des virus, Fauquet *et al.* (2005) et de la section de taxonomie du "National Center for Biotechnology Information").

| Genre  | Génogroupe       | Espèce type                                     | Souches                        | Numéro GenBank |
|--|------------------|---|--------------------------------|----------------|
| <i>Levivirus</i>   | • Génogroupe I   | <i>Enterobacteria phage MS2</i>                 | Enterobacteria phage f2        | M24832         |
|  |                  |   | Enterobacteria phage fr        | X15031*        |
|  |                  |   | Enterobacteria phage JP501     | AF227251       |
|  |                  |   | Enterobacteria phage M12       | AF195778       |
|  |                  |   | Enterobacteria phage R17       | M24829         |
|  |                  |   | Enterobacteria phage ZR        | AB218931       |
|  |                  |   | Enterobacteria phage MS2       | NC001417*      |
|  | • Génogroupe II  | <i>Enterobacteria phage BZ13</i>                | Enterobacteria phage GA        | X03869*        |
|  |                  |   | Enterobacteria phage JP34      | J04343         |
|  |                  |   | Enterobacteria phage KU1       | AF227250*      |
|  |                  |   | Enterobacteria phage TH1       | AB218930       |
|  |                  |   | Enterobacteria phage BO1       | AB218932       |
|  |                  |   | Enterobacteria phage BZ13      | J02446         |
|  |                  |   | Enterobacteria phage JP500     | AB218928       |
|  |                  |   | Enterobacteria phage SD        | AB218929       |
| Espèces provisoires  |                  | Acinetobacter phage AP205                       | NC002700                       |                |
|  |                  | Pseudomonas phage PP7                           | NC01628                        |                |
| <i>Allolevivirus</i>   | • Génogroupe III | <i>Enterobacteria phage Q<math>\beta</math></i> | Enterobacteria phage M11       | AF052431*      |
|  |                  |   | Enterobacteria phage MX1       | AF059242*      |
|  |                  |   | Enterobacteria phage ST        | J02502         |
|  |                  |   | Enterobacteria phage VK        | J02522         |
|  |                  |   | Enterobacteria phage Q $\beta$ | AY099114*      |
|  | • Génogroupe IV  | <i>Enterobacteria phage F1</i>                  | Enterobacteria phage NL95      | AF059243*      |
|  |                  |   | Enterobacteria phage SP        | X07489*        |
|  |                  |   | Enterobacteria phage TW28      | J02521         |
|  |                  |   | Enterobacteria phage TW19      | J02520         |
|  |                  |   | Enterobacteria phage F1        | EF068134*      |
| 33 phages non classés infectant <i>Caulobacter</i> , <i>Enterobacteria</i> et <i>Pseudomonas</i> |                  |   |                                |                |

\* génome entièrement séquencé.

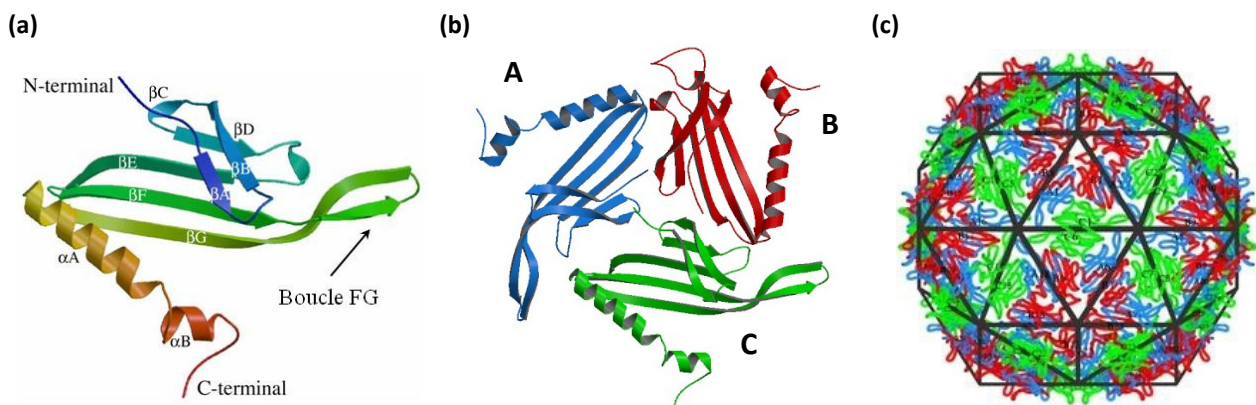
### 1.1.2. La capside virale

La capside est une coque qui entoure et protège l'acide nucléique viral. Pour les virus nus, elle intervient également dans l'attachement du virus à la cellule hôte. Elle est constituée par l'assemblage d'unités structurales protéiques qui se répètent et qui peuvent se regrouper en unités morphologiques. La structure de la capside définit la forme du virus, ce qui permet de distinguer deux groupes principaux de virus: les virus à symétrie cubique et les virus à symétrie hélicoïdale.

Les bactériophages ARN F-spécifiques, tout comme les virus entériques pathogènes pour l'homme, sont à symétrie cubique et ont une forme quasi-sphérique, dite icosaédrique. Leur capside est composée de 180 copies de la protéine de capside (14 kDa) arrangées de manière à former un icosaèdre.

Pour le phage MS2, la chaîne principale de la protéine de capside se replie en sept feuillets  $\beta$  et en deux hélices  $\alpha$  (Figure 6a). Au niveau de la capside, cette protéine se trouve sous trois conformations différentes nommées A, B et C (Figure 6b). La structure de cette capside protéique a été résolue grâce à la cristallographie aux rayons X (Valegård *et al.*, 1990; Golmohammadi *et al.*, 1993; Valegård *et al.*, 1994; Golmohammadi *et al.*, 1996; Tars *et al.*, 1997). De manière générale, ces études ont montré que la capside

était formée par des dimères de la protéine de capsid : 60 quasi-symétriques nommés A-B et 30 symétriques nommés C-C (Figure 6c).



**Figure 6. (a) Structure tertiaire de la protéine de capsid du bactériophage MS2 comprenant 7 feuillets  $\beta$  ( $\beta$ A à  $\beta$ G) et 2 hélices  $\alpha$  ( $\alpha$ A et  $\alpha$ B). (b) Représentation des trois conformations de la protéine de capsid A, B et C et de leur agencement pour former la capsid icosaédrique des *Leviviridae* (c) (source: [http://viperdb.scripps.edu/info\\_page.php?VDB=2ms2](http://viperdb.scripps.edu/info_page.php?VDB=2ms2)).**

De manière plus générale, la protéine de capsid des *Levivirus* (MS2 et GA) est composée de 130 acides aminés alors que celle des *Allolevivirus* (Q $\beta$  et SP) en contient 132 (Genbank NP\_040648, BAA00918, AAM33126, NP\_695027). Grâce à la réalisation d'alignement de séquences, les pourcentages d'identité entre les différentes protéines de capsid ont été établis. Il est de 87% entre les phages MS2 et le phage fr qui appartiennent au même génogroupe, de 62% entre MS2 et GA qui appartiennent au même genre mais à des génogroupes différents, et seulement de 20% entre MS2 et Q $\beta$  qui n'appartiennent pas au même genre (Tars *et al.*, 1997).

Chaque particule virale possède également, au niveau de la capsid, un exemplaire de la protéine de maturation (35-61 kDa) qui est nécessaire à la maturation du virus et à son attachement au niveau du pili sexuel de la bactérie hôte. La position précise de cette protéine de maturation n'est pas encore clairement définie. Chez les *Allolevivirus*, plusieurs copies de la protéine « readthrough » sont également présentes au niveau de la capsid virale (Fauquet *et al.*, 2005).

## 1.2. Les méthodes de détection et de typage des phages ARN F-spécifiques

### 1.2.1. La détection et l'énumération par la méthode des plages de lyse

Typiquement, les bactériophages sont détectés par les effets qu'ils produisent sur les bactéries hôtes après les avoir infectées. Ce sont des méthodes simples qui permettent soit de quantifier les bactériophages, soit de déterminer de manière qualitative leur présence ou absence dans un volume d'échantillon donné.

Le nombre de bactériophages est généralement déterminé par la méthode quantitative des plages de lyse. Le principe de cette méthode repose sur le mélange d'un milieu nutritif gélosé fondu, à une température juste supérieure à la température de solidification de l'agar, avec la bactérie hôte en phase

exponentielle de croissance et un volume approprié d'échantillon à analyser. Le tout est ensuite ensemencé sur un milieu nutritif solide. Après incubation durant une nuit à 37°C, les plages de lyse sont comptées et la concentration est exprimée en unités formant plages (UFP) par unité de volume analysé. Cette méthode fait l'objet d'une norme européenne ISO 17005-1 (1998) et d'une norme américaine (USEPA 1602, 2001).

La présence de phages dans un volume d'échantillon donné peut également être déterminée par un test qualitatif d'enrichissement en deux étapes (USEPA 1601, 2001). Lors de la première étape, la bactérie hôte en phase exponentielle de croissance ainsi que des nutriments sont ajoutés à l'échantillon à tester. Après une nuit d'incubation, dans des conditions permettant l'infection de la bactérie et la réplication des phages présents, le mélange est déposé par spots sur un tapis bactérien. L'apparition de plage de lyse indique la présence de phages dans l'échantillon initial. L'estimation de la concentration en phages peut éventuellement être réalisée à partir d'une série de dilutions de l'échantillon à tester. Dans ce cas, la concentration est exprimée en nombre le plus probable (NPP) par unité de volume (Maul, 1991).

Un des facteurs sélectifs dans l'utilisation de ces méthodes de détection reste le choix de la bactérie hôte (Jofre, 2007). Dans les méthodes standardisées, trois souches sont préconisées : *Escherichia coli* K12 Hfr (ATCC-23631 ou NCTC 12487) qui est naturellement porteuse de l'information génétique nécessaire à la synthèse des F-pili, *Escherichia coli* HS(pFamp)R ou plus simplement *E. coli* Famp (ATCC-700891) et *Salmonella thyphimurium* WG49 (NCTC 12484). Ces deux dernières souches ont été génétiquement modifiées de manière à porter le plasmide F qui contient l'information génétique nécessaire à la formation des F-pili (Havelaar et Hogeboom, 1984; Debartolomeis et Cabelli, 1991). Ces souches bactériennes sont spécifiques des bactériophages F-spécifiques et sont en théorie résistantes aux phages somatiques qui infectent les bactéries au niveau de la paroi cellulaire. Cela justifie leur utilisation lors de dénombrements à partir d'échantillons environnementaux. Dans une étude comparative, Mooijman *et al.* (2002) suggèrent que la souche *S. thyphimurium* WG49 détecterait plus de phages F-spécifiques que la souche *E. coli* Famp.

## **1.2.2. Les méthodes de typage des bactériophages ARN F-spécifiques**

Initialement, le typage a été entrepris à l'aide de méthodes immunologiques aboutissant à la répartition des bactériophages ARN F-spécifiques en quatre sérotypes (Furuse *et al.*, 1981). Après l'avènement des méthodes moléculaires, ces phages ont également été caractérisés d'un point de vue génomique, aboutissant à une distinction en quatre génogroupes correspondant approximativement aux quatre sérotypes (Hsu *et al.*, 1995; Beekwilder *et al.*, 1996a).

### **1.2.2.1. Les méthodes immunologiques**

#### **1.2.2.1.1. Le sérotypage**

Historiquement, la technique de sérotypage a été la première décrite pour permettre de classer les bactériophages ARN F-spécifiques en quatre groupes selon leurs propriétés sérologiques (Watanabe *et al.*, 1967; Furuse *et al.*, 1978; Furuse *et al.*, 1981; Osawa *et al.*, 1981; Furuse *et al.*, 1983). D'un point de vue méthodologique, cela consiste à mettre en contact un phage donné avec une bactérie hôte sur un milieu

gélifié contenant du sérum (anti-MS2 par exemple) préparé à partir d'un animal. L'absence de plage de lyse au niveau du tapis bactérien est interprétée comme une neutralisation de l'infectiosité du bactériophage par le sérum. La détermination du sérotype ne peut cependant se faire qu'après avoir testé un phage donné vis-à-vis des différents sérums.

#### **1.2.2.1.2. Le test d'agglutination indirecte**

Récemment, une nouvelle méthode de typage des bactériophages ARN F-spécifiques a été développée en utilisant le principe d'agglutination de billes de latex (Love et Sobsey, 2007). Pour cela, des anticorps, isolés à partir de sérum de lapin ayant subi une injection de phages, sont fixés à des billes de latex. Ces billes sont ensuite mises en présence d'une suspension de phages. Comme les billes présentent une taille assez importante, la réaction immunologique spécifique entre les anticorps d'un groupe et les phages du même groupe est visible à l'œil nu.

Les principaux avantages de cette technique sont sa rapidité, sa spécificité et son faible coût. Le principe de l'agglutination est d'ailleurs largement utilisé pour des diagnostics virologiques des adénovirus (Grandien *et al.*, 1987) et des rotavirus (Hughes *et al.*, 1984) dans les selles. Le seul inconvénient de cette approche est son manque de sensibilité. Or, à la différence des échantillons cliniques, les échantillons environnementaux ont généralement des niveaux d'antigènes bas. C'est pourquoi une étape préalable de culture des phages, à partir de l'échantillon environnemental à tester, est indispensable avant de réaliser le test d'agglutination (Love et Sobsey, 2007).

#### **1.2.2.2. Les méthodes génétiques**

##### **1.2.2.2.1. Les techniques d'hybridation moléculaire**

Les techniques d'hybridation sont basées sur l'immobilisation des acides nucléiques cibles sur une membrane de nylon suivie par leur détection par hybridation avec une sonde oligonucléotidique marquée. Cette approche est relativement peu sensible et nécessite donc une étape de culture préalable. Dans le cas particulier des bactériophages ARN F-spécifiques, c'est la technique des plages de lyse qui est employée (Hsu *et al.*, 1995; Beekwilder *et al.*, 1996a). Les phages se trouvant au niveau des plages de lyse sont alors transférés sur une membrane de nylon, dénaturés par traitement chimique et les ARN sont fixés à la membrane par irradiation aux ultraviolets. Les membranes sont ensuite placées dans une solution d'hybridation contenant une sonde marquée spécifique d'un genre ou d'un génogroupe. Différents marquages peuvent être réalisés, impliquant des modes de révélation différents. Les techniques de marquage utilisées peuvent faire appel à des isotopes radioactifs (Beekwilder *et al.*, 1996a) ou à des anticorps sur lesquels est fixée une enzyme. L'ajout d'un substrat de l'enzyme permet ensuite la révélation de la réaction. Dans le cas de l'utilisation de l'activité phosphatase, les substrats sont soit des molécules colorées (Hsu *et al.*, 1995) soit des molécules chimio-luminescentes (Schaper et Jofre, 2000). Dans ce dernier cas, les photons produits par la réaction enzymatique sont détectés sur film auto-radiographique.

### 1.2.2.2. L'amplification par RT-PCR

La technique de Polymerase Chain Reaction (PCR) permet d'amplifier de façon spécifique une séquence d'ADN en plusieurs millions de copies à l'aide d'une enzyme thermostable et de deux amorces sens et antisens. Lorsqu'il s'agit de virus à ARN, comme c'est le cas pour les bactériophages ARN F-spécifiques, une étape préliminaire de rétro-transcription (RT) est nécessaire afin de synthétiser un brin d'ADN complémentaire (ADNc) à partir de l'ARN viral. Ce brin d'ADNc servant ensuite de matrice pour la réaction de PCR. L'ADN amplifié peut être détecté soit par hybridation moléculaire avec une sonde complémentaire de la séquence amplifiée, soit par électrophorèse sur gel d'agarose en présence d'un agent intercalant (bromure d'éthidium par exemple), suivie par une révélation aux ultraviolets (254 nm).

Les premières études portant sur le génotypage des bactériophages ARN F-spécifiques par des techniques de PCR n'ont été publiées que très récemment (Vinjé *et al.*, 2004; Dryden *et al.*, 2006). La méthode décrite par Vinjé *et al.* (2004) consiste en une première étape de RT-PCR avec des amorces spécifiques de chaque genre (*Levivirus* et *Allolevivirus*), suivie d'une étape d'hybridation inverse. Lors d'une hybridation inverse (reverse line blot hybridization), les produits d'amplification, contenus en phase liquide, s'hybrident avec des sondes oligonucléotidiques spécifiques liées de manière covalente à un support solide de type membrane de nylon. Six sondes ont été décrites, ciblant spécifiquement les phages MS2, GA, Q $\beta$ , M11 SP et FI. La visualisation des produits hybridés se fait ensuite par chimioluminescence. Un des principaux avantages de ce principe de détection est que la membrane peut être réutilisée sans perte de sensibilité (Vinjé et Koopmans, 2000). Pour étudier la répartition des génogroupes dans l'environnement, Dryden *et al.* (2006) ont développé trois systèmes de RT-PCR, reconnaissant chacun spécifiquement les phages MS2, GA et SP. Après amplification, les produits de PCR sont analysés par électrophorèse. Toutefois, dans ces deux exemples de méthodes, uniquement les phages modèles de chaque génogroupe sont recherchés et non l'ensemble des phages appartenant à un génogroupe donné.

### 1.2.2.3. La détection et la quantification par RT-PCR en temps réel

La PCR en temps réel est une technique où l'étape de révélation des produits amplifiés se fait directement au cours de l'amplification. Le principe de cette technique est fondé sur la mesure de la fluorescence émise au cours de la PCR qui est proportionnelle au nombre de copies d'ADN synthétisées. Suivant la technologie utilisée, la fluorescence peut être le résultat d'interactions non spécifiques entre l'ADN amplifié et un agent intercalant (SYBER Green), soit générée grâce à une sonde spécifique complémentaire de l'ADN cible. Il s'agit de sondes marquées chimiquement par des fluorochromes: sondes TaqMan et TaqMan MGB, sondes d'hybridation, sondes molecular beacon, sondes scorpions (Mackay *et al.*, 2002).

Les premiers travaux relatifs à l'utilisation de la RT-PCR en temps réel pour réaliser le génotypage des bactériophages ARN F-spécifiques ont été publiés en 2006 (Ogorzaly et Gantzer, 2006). Cette méthode, qui sera plus largement décrite dans la partie résultats, utilise des sondes TaqMan MGB. Ces sondes comportent deux éléments spécifiques constitués par un groupement MGB (Minor Groove Binder) et un quencher non fluorescent (NFQ) à l'extrémité 3'. Les MGB sont des molécules relativement allongées, en forme de croissant, qui se lient au sillon mineur de l'ADN par des interactions de types Van Der Waals, hydrophobes et électrostatiques (Kutyavin *et al.*, 2000). La présence du groupement MGB permet



d'augmenter le  $T_m$  des sondes et la stabilité de la liaison entre la sonde et l'ADN cible. Plus la sonde est de petite taille et plus la contribution du groupement MGB à la stabilité de cette liaison est importante. Le groupement MGB permet donc de dessiner des sondes plus courtes et ainsi plus sensibles aux variations de séquences d'un seul nucléotide. C'est pourquoi, elles sont notamment utilisées pour la discrimination allélique.

Depuis, deux autres techniques de génotypage utilisant des systèmes de RT-PCR en temps réel ont également été décrits. Tout deux utilisent une RT-PCR multiplex en temps réel avec soit des sondes TaqMan classiques (Wolf *et al.*, 2008) ou des sondes molecular beacons (Kirs et Smith, 2007). Tout comme les sondes TaqMan MGB, les sondes molecular beacons sont marquées par deux fluorochromes dont un quencher non fluorescent (NFQ). Ces sondes sont conçues pour former à l'état basal une structure tige-boucle ou épingle à cheveux, la zone complémentaire du génome cible formant la boucle, et la zone d'appariement en tige permettant le rapprochement des deux fluorochromes. A l'état initial, aucune fluorescence n'est émise. Lors de l'hybridation des sondes sur les produits amplifiés, l'éloignement du quencher permet l'émission du signal de fluorescence. La lecture de la fluorescence se fait au moment de l'hybridation. Les sondes restent intactes en fin de réaction, contrairement aux sondes TaqMan qui sont hydrolysées au cours de l'amplification par l'activité 5'-3' exonucléasique de la Taq polymérase. Ces sondes, tout comme les sondes TaqMan, présentent une grande spécificité permettant de détecter une variation de l'ordre d'un nucléotide (Mackay *et al.*, 2002).

Au delà du gain de temps, la PCR en temps réel a surtout l'avantage de permettre la quantification des acides nucléiques présents dans un échantillon donné.

### 1.2.2.3. La comparaison des techniques de typage

Des études comparatives ont été menées afin d'évaluer la sensibilité des techniques de typage vis-à-vis d'un panel de souches environnementales de phages ARN F-spécifiques. Les techniques de sérotypage, d'agglutination, d'hybridation et de RT-PCR suivi d'une hybridation inverse sont capables de classer respectivement 99,5% (Hsu *et al.*, 1995), 96,4% (Love et Sobsey, 2007), 96,6% (Hsu *et al.*, 1995) et 97,8% (Vinjé *et al.*, 2004; Love *et al.*, 2007) des isolats. Ceci permet donc de conclure à une performance et à une capacité de typage similaire de ces différentes méthodes. Cependant, lors de comparaisons des méthodes immunologique et génétique sur un même panel d'échantillons, des contradictions peuvent apparaître. Par exemple, sur des échantillons environnementaux, Love et Sobsey (2007) rapportent 12,5% de contradictions entre les méthodes de sérotypage et de génotypage, avec notamment certains isolats présentant un profil sérologique intermédiaire entre deux sérotypes. Ainsi, les phages JP34 et MX1 ont été initialement décrits comme étant respectivement des intermédiaires entre les sérotypes I et II et les sérotypes III et IV, mais l'analyse de leur séquence d'ARN les positionne clairement comme faisant respectivement partie des génogroupes II (Adhin *et al.*, 1989) et III (Beekwilder *et al.*, 1995). Ces observations contradictoires, et plus particulièrement le cas du phage JP34, ont en partie été expliquées par un changement de trois acides aminés au niveau de la protéine de capsid induisant une identification de sérotype I malgré une similarité de séquence d'ARN de 95% avec le génogroupe II (Harigai *et al.*, 1986; Adhin *et al.*, 1989). De plus, les sérums utilisés dans les méthodes immunologiques sont toujours obtenus à partir d'un phage donné (anti-MS2, anti-GA...) et ne semblent pas, par conséquent, être systématiquement spécifiques d'un groupe de phages ou encore représentatifs des souches environnementales (Love et Sobsey, 2007). Ainsi, les

méthodes génétiques ont souvent été considérées comme plus appropriées (Hsu *et al.*, 1995; Beekwilder *et al.*, 1996a) et ont donc été largement employées pour étudier la répartition des quatre génogroupes dans les selles et les eaux usées. Les résultats de ces études seront détaillés dans la 3<sup>ème</sup> section de cette étude bibliographique, consacrée à l'utilisation des bactériophages ARN F-spécifiques pour discriminer l'origine de la pollution fécale.

## 2. LES BACTERIOPHAGES ARN F-SPECIFIQUES COMME INDICATEURS DE POLLUTION FECALE ET VIRALE DES EAUX

La qualité de l'eau et par conséquent la santé humaine, peuvent être affectées par la présence de microorganismes pathogènes. Ces microorganismes, initialement excrétés en grande quantité dans les selles des personnes infectées, se retrouvent au niveau des eaux usées puis au niveau des eaux de surface, selon l'efficacité du traitement d'épuration. Les microorganismes à excrétion fécale susceptibles d'être observés dans l'environnement sont présentés dans le Tableau 3. Ils sont généralement transmis par le mode féco-oral.

**Tableau 3. Principaux microorganismes pathogènes pour l'homme à transmission hydrique (d'après Ashbolt, 2004).**

| Bactéries                                      | Virus entériques                            | Protozoaires                             |
|--|---|--|
| - <i>Salmonella spp.</i>                       | - Enterovirus (Poliovirus, Coxsackie virus) | - <i>Acanthamoeba spp.</i>               |
| - <i>Shigella spp.</i>                         | - Rotavirus                                 | - <i>Balantidium coli</i>                |
| - <i>Vibrio cholera</i>                        | - Human adenovirus F                        | - <i>Cryptosporidium parvum, hominis</i> |
| - <i>Escherichia coli</i> (souches pathogènes) | - Norovirus                                 | - <i>Entamoeba histolytica</i>           |
| - <i>Yersinia enterocolitica</i>               | - Sapovirus                                 | - <i>Giardia lamblia</i>                 |
| - <i>Campylobacter jejuni</i>                  | - Human hepatitis virus A                   | - <i>Naegleria fowleri</i>               |
| - <i>Legionella pneumophila</i>                | - Human hepatitis virus E                   |  |
| - <i>Leptospira spp.</i>                       |   |  |
| - Mycobactéries variées                        |   |  |

Généralement, l'estimation de la qualité de l'eau est basée sur la recherche d'indicateurs de pollution fécale. Idéalement, l'indicateur choisi devrait répondre à plusieurs exigences : être uniformément présent dans les selles, être incapable de se multiplier en dehors de son hôte, être au moins aussi résistant que les pathogènes vis-à-vis des conditions environnementales, être fortement corrélé à la présence de microorganismes pathogènes et être facilement détectable en laboratoire (Armon et Kott, 1996).

Historiquement, ce sont des bactéries fécales qui ont été sélectionnées comme outils pour prédire la présence de pathogènes aussi bien d'origine bactérienne, virale que parasitaire. Ils sont encore aujourd'hui considérés comme les indicateurs de référence d'un point de vue législatif dans de nombreux pays. Les principaux indicateurs bactériens conventionnellement utilisés sont *Escherichia coli*, les coliformes totaux, fécaux et thermotolérants, les entérocoques (streptocoques fécaux) et *Clostridium perfringens*. De nombreuses études épidémiologiques ont montré que la mauvaise qualité bactériologique de l'eau entraîne généralement des troubles digestifs chez les consommateurs ou les baigneurs (Zmirou *et al.*, 1990; Pruss, 1998; van Asperen *et al.*, 1998; Zmirou *et al.*, 2003).

Cependant, la communauté scientifique a émis des doutes quant à la capacité de ces indicateurs à déterminer la qualité de l'eau et à prédire les maladies virales à transmission hydrique. En effet, l'absence de bactéries indicatrices dans un milieu donné ne signifie pas pour autant l'absence de virus pathogènes. Deux observations majeures sont à l'origine des interrogations concernant la pertinence de ces indicateurs bactériens. Premièrement, dans les eaux, il y a souvent un manque de corrélation entre la présence des indicateurs bactériens et celles des virus pathogènes (Gerba *et al.*, 1979; Wyer *et al.*, 1995; Jiang *et al.*, 2001; Borchardt *et al.*, 2004; Horman *et al.*, 2004; Harwood *et al.*, 2005). Deuxièmement, les virus sont plus

résistants aux stress environnementaux et aux processus de désinfection que les indicateurs bactériens conventionnels (Payment *et al.*, 1985a; Payment *et al.*, 1985b; Wait et Sobsey, 2001; Fujioka et Yoneyama, 2002). Ainsi, beaucoup de scientifiques ont préconisé la nécessité de trouver d'autres indicateurs pour évaluer la présence des virus pathogènes dans les eaux.

## **2.1. La pollution fécale et virale des eaux**

### **2.1.1. Les virus pathogènes à transmission hydrique**

Les virus pathogènes susceptibles d'être retrouvés dans les différents milieux hydriques sont principalement les virus dits « entériques ». Ce terme englobe l'ensemble des virus capables d'infecter et de se multiplier au niveau des cellules de l'appareil gastro-intestinal de l'homme (Tableau 4 et Figure 7). Ils sont excrétés en grande quantité dans les selles des personnes infectées (jusqu'à  $10^{11}$  particules virales par gramme de selle) et contaminent ainsi l'environnement via les eaux usées. Incapables de se multiplier en l'absence de cellules-hôtes (parasitisme obligatoire), ils peuvent persister dans l'environnement et rester infectieux plusieurs jours voire plusieurs semaines, selon les conditions. Ces virus peuvent résister aux traitements d'épuration des eaux usées et ainsi contaminer les eaux de surface (rivières, mers...). A ce niveau, ils sont susceptibles de représenter une menace pour les baigneurs au travers des eaux récréatives, mais surtout, au niveau des zones conchylicoles, ces virus peuvent contaminer les fruits de mer consommés crus la plupart du temps. Ces virus entériques peuvent également résister aux traitements destinés à la production d'eau potable à partir des eaux de surface, et ainsi constituer une menace pour les consommateurs d'eau de distribution. Des contaminations de l'eau potable, post-traitements, peuvent également survenir lors d'une mauvaise séparation des eaux traitées et des eaux non traitées (Carter, 2005).

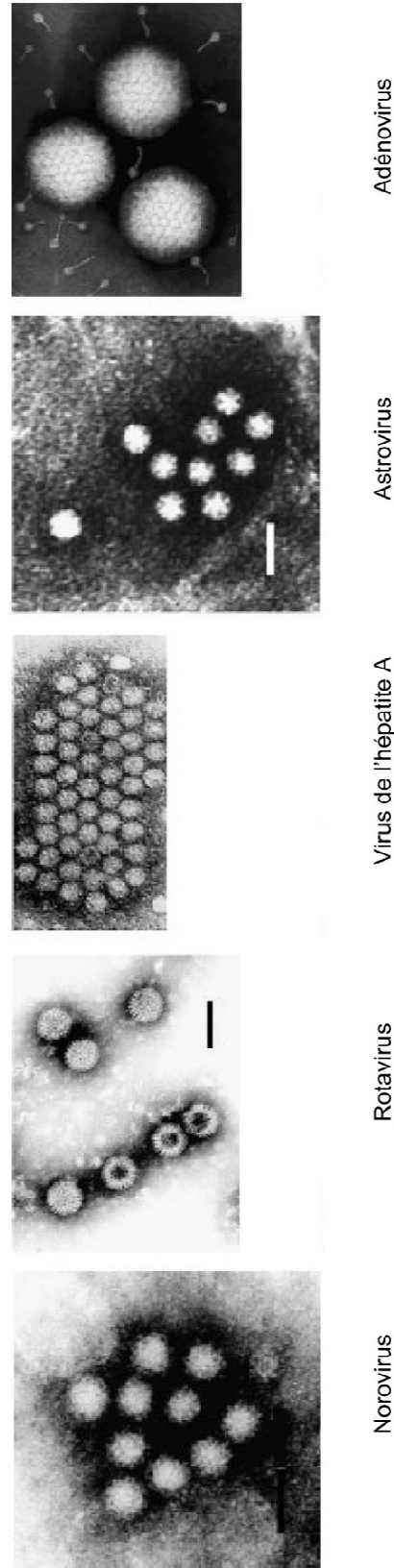
Toutefois, malgré une excrétion fécale importante et la mise en évidence de ces virus dans les eaux, cela n'implique pas nécessairement que ces virus soient principalement ou majoritairement transmis *via* le milieu hydrique. Quoi qu'il en soit, l'exposition à des eaux susceptibles de contenir des virus infectieux présente un risque certain d'infection. Même si dans la plupart des cas, ce risque peut être considéré comme négligeable, dans d'autres circonstances il peut également s'avérer très important. A titre d'exemple, (Payment *et al.*, 1997) estiment qu'au Canada, environ 14 à 40% des maladies gastro-intestinales peuvent être attribuées à la consommation d'eau du robinet.

Une infection par ces virus entériques peut soit engendrer des troubles plus ou moins sévères, soit rester asymptomatique (Wyn-Jones et Sellwood, 2001). Trois groupes de virus peuvent être distingués selon le type de pathologie qu'ils provoquent : les virus de gastroentérites, les virus hépatiques et des virus capables de se multiplier au niveau des cellules intestinales mais qui migrent ensuite pour infecter d'autres cellules cibles telles que le système nerveux central (Tableau 4).

**Tableau 4. Caractéristiques des principaux virus entériques humains responsables de pathologies liées à l'eau (Koopmans and Duizer, 2004; Carter, 2005; Fauquet et al., 2005).**  
 sb : simple brin, db : double brin, kb : kilo bases, kpb : kilo paires de bases

| Maladie               | Nom commun des virus  | Famille       | Genre             | Morphologie des virus | Taille (nm) | Nature de génome | Taille du génome (kb ou kpb) | Configuration du génome |
|-----------------------|-----------------------|---------------|-------------------|-----------------------|-------------|------------------|------------------------------|-------------------------|
| <b>Gastroentérite</b> | Norovirus             | Caliciviridae | Norovirus         | icosaédrique          | 27 – 30     | ARN sb           | 7-8                          | 1 segment               |
|                       | Sapovirus             | Caliciviridae | Sapovirus         | icosaédrique          | 27 – 30     | ARN sb           | 7-8                          | 1 segment               |
|                       | Adénovirus            | Adenoviridae  | Mastadenovirus    | icosaédrique          | 80 – 110    | ADN db           | 26-45                        | linéaire                |
|                       | Rotavirus             | Reoviridae    | Rotavirus         | icosaédrique          | 75          | ARN db           | 19-32                        | 11 segments             |
|                       | Astrovirus            | Astroviridae  | Mastrovirus       | icosaédrique          | 28          | ARN sb           | 6-7                          | 1 segment               |
| <b>Hépatite</b>       | Virus de l'hépatite A | Picomaviridae | Hepatovirus       | icosaédrique          | 25 – 28     | ARN sb           | 7-9                          | 1 segment               |
|                       | Virus de l'hépatite E | Hepeviridae   | Hepevirus         | icosaédrique          | 30          | ARN sb           | 7                            | 1 segment               |
| <b>Autres*</b>        | Entérovirus           | Picomaviridae | Human enterovirus | icosaédrique          | 27          | ARN sb           | 7-9                          | 1 segment               |

\* les entérovirus sont responsables d'une grande variété de symptômes, notamment des symptômes neuroaux



**Figure 7. Microscopie électronique des principaux virus entériques qui sont couramment ou occasionnellement associés à une transmission hydrique (Koopmans and Duizer, 2004)**

## Les adénovirus

Les adénovirus sont des virus non enveloppés d'environ 80 à 110 nm de diamètre avec une capsidie icosaédrique. Cette capsidie est constituée de 3 protéines majoritaires nommées hexon, penton et fibre, plus d'autres protéines minoritaires VI, VIII, IX et IIIa (Stewart *et al.*, 1993). Le génome viral est un ADN double brin linéaire de taille comprise entre 26 et 45 kilo paires de base (Davison *et al.*, 2003) auquel est liée de manière covalente une protéine terminale (TP) aux deux extrémités 5' (Figure 8) Ce génome code pour plus de 30 protéines structurales et non structurales.

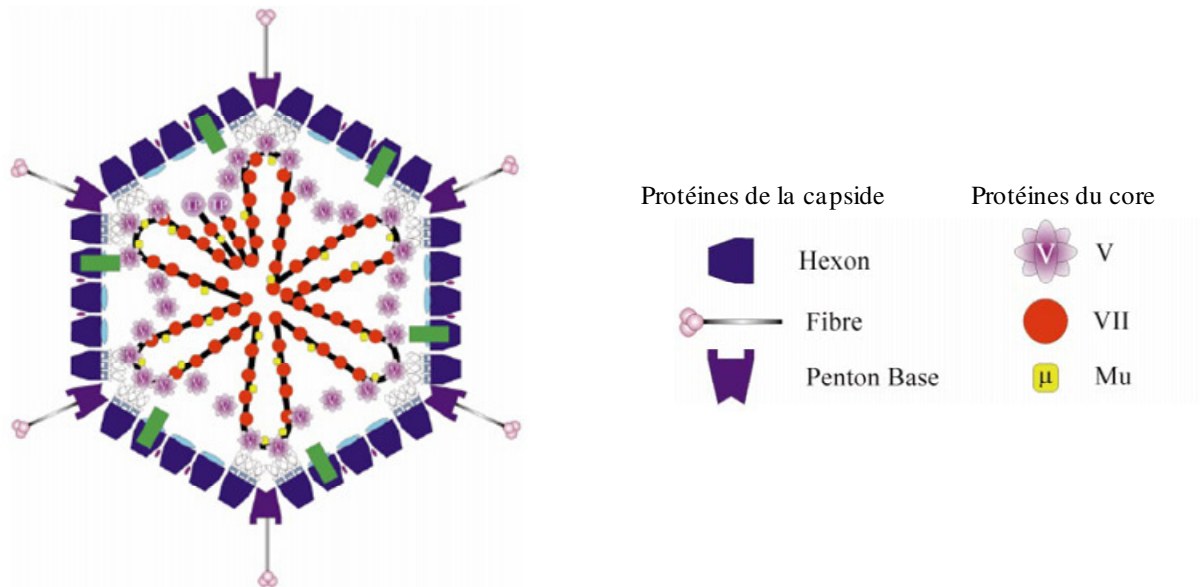


Figure 8. Représentation schématique de la structure des adénovirus (Russell, 2000).

Les adénovirus, membres de la famille des *Adenoviridae*, ont été isolés chez une grande variété d'hôtes, incluant des représentants de chaque grande classe de vertébrés (des poissons aux mammifères). Cette famille est divisée en quatre genres *Siadenovirus*, *Aviadenovirus*, *Atadenovirus* et *Mastadenovirus*. D'après une analyse phylogénétique (Davison *et al.*, 2003), il semblerait qu'il puisse exister un cinquième groupe au sein de cette famille, dans lequel pourraient être regroupées les souches virales infectant les poissons (*Ichtadenovirus*). Les adénovirus humains appartiennent tous au genre *Mastadenovirus*, mais on trouve également au sein de ce genre des souches virales responsables de pathologies chez d'autres mammifères (bovins, équins, ovins, porcins...). A l'heure actuelle, 51 sérotypes ont été décrits chez l'homme. Ils sont répartis en six sous-groupes (ou espèces) nommés de A à F. Ces virus peuvent induire une grande variété de pathologies comme des gastroentérites, des maladies respiratoire, des conjonctivites... Le Tableau 5 résume la classification des 51 sérotypes humains ainsi que les cellules hôtes associées. Quelle que soit leur cellule hôte, la plupart des sérotypes sont capables de se multiplier au niveau du système digestif et sont par conséquent excrétés dans les selles. Seuls les adénovirus 40 et 41, couramment désignés sous le terme d'adénovirus entériques, sont responsables de gastroentérites, notamment chez les enfants. Fleet *et al.* (2000) rapporte qu'en Australie le sérotype 41 serait majoritairement responsables de cas de diarrhées (40 à 80%) par rapport au sérotype 40 (moins de 20%).

Tableau 5. Classification des différents sérotypes d'adénovirus humains et de leurs cellules hôtes (Jiang, 2006).

| Sous-groupes (espèces) | Sérotypes   | Site de l'infection             |
|------------------------|---|---------------------------------|
| A                      | 12, 18, 31  | Tractus gastro-intestinal       |
| B                      | 3, 7, 16, 21, 50, 11, 14, 34, 35  | Poumons, système urinaire       |
| C                      | 1, 2, 5, 6  | Système respiratoire            |
| D                      | 8, 9, 10, 13, 15, 17, 19, 22, 23, 24, 26, 27, 30, 32, 33, 36, 37,<br>38, 39, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 51 | Tractus gastro-intestinal, yeux |
| E                      | 4   | Système respiratoire            |
| F                      | 40, 41  | Tractus gastro-intestinal       |

La première épidémie d'origine hydrique impliquant des adénovirus a été reportée au cours de l'été 1977 en Géorgie (D'Angelo *et al.*, 1979), où 72 cas de fièvre et conjonctivite ont pu être associés à un adénovirus sérotype 4. Ce même sérotype viral a d'ailleurs aussi été isolé dans l'eau de la piscine responsable de l'épidémie. Les sérotypes 3 et 7 ont également été incriminés lors d'épidémies similaires (Martone *et al.*, 1980; Turner *et al.*, 1987). L'épidémie d'origine hydrique la plus récente a été rapportée en Grèce lors de l'été 1995 (Papapetropoulou et Vantarakis, 1998), durant laquelle au moins 80 athlètes participant à un concours de natation ont montré des symptômes de conjonctivite, maux de tête et fièvre. Des adénovirus ont pu être détectés par nested-PCR dans l'eau de la piscine, mais le sérotype n'a pas été identifié.

Un cas d'épidémie de symptômes entériques liés aux adénovirus a été décrit dans une municipalité finlandaise en avril 1994 (Kukkula *et al.*, 1997) où environ 20 à 50% de la population présentaient des symptômes de gastroentérites. Des adénovirus, des rotavirus et des norovirus ont été identifiés, mais les analyses virales ont montré que le principal agent responsable était un norovirus. Généralement, le rôle des adénovirus entériques dans les épidémies de gastroentérites est peu établi car les infections sont le plus souvent asymptomatiques chez l'adulte (Jiang, 2006). De la même manière, chez les enfants atteints de gastroentérites, la fréquence des adénovirus 40 et 41 varie de 2 à 12% (Cevenini *et al.*, 1987; Bon *et al.*, 1999; Fleet *et al.*, 2000).

Les adénovirus ont reçu une attention particulière ces dernières années en raison de leur grande fréquence, souvent en concentration assez importante, dans les eaux de surface. Les données synthétisées dans le Tableau 6 donnent un aperçu de la répartition et de la représentativité de ces virus dans les eaux de surface.

Tableau 6. Présence et concentration des adénovirus humains dans les eaux de surface (d'après (Gerba, 2007)).

| Adénovirus, Sérotypes | Type d'eau     | Concentration / Fréquence (méthode)                                   | Localisation   | Références                        |
|-----------------------|----------------|---|----------------|-----------------------------------|
| Ad2, Ad3, Ad5, Ad6    | Rivière        | 0-25 UFP/L  | Japon          | Tani <i>et al.</i> , 1995         |
| Ad40, Ad41            | Eau de surface | 49-88% (Hybridation)  | Afrique du sud | Genthe <i>et al.</i> , 1995       |
| Ad <sub>NS</sub>      | Rivière        | 74% (PCR)   | Espagne        | Pina <i>et al.</i> , 1998         |
| Ad <sub>NS</sub>      | Rivière        | 100% (PCR)  | Espagne        | Girones <i>et al.</i> , 1995      |
| Ad 40                 | Eau de surface | 48%, 0-2.10 <sup>1</sup> NPP  | Etats-Unis     | Chapron <i>et al.</i> , 2000      |
| Ad                    | Eau de Surface | 880-7500 génome/L   | Californie     | Jiang <i>et al.</i> , 2001        |
| Ad                    | Rivière        | 50% (PCR)   | Californie     | Jiang et Chu, 2004                |
| Ad                    | Eau de surface | 66,7% (ICC-PCR)   | Corée du sud   | Lee <i>et al.</i> , 2005          |
| Ad                    | Eau de surface | 12,7% (ICC-PCR)   | Corée du sud   | van Heerden <i>et al.</i> , 2003  |
| Ad2, Ad40, Ad41       | Eau de surface | 22,2% (PCR)   | Afrique du sud | van Heerden <i>et al.</i> , 2005a |
| Ad                    | Rivière        | 20% (PCR)   | Allemagne      | Pusch <i>et al.</i> , 2005        |
| Ad                    | Lac            | 7.10 <sup>0</sup> - 4.10 <sup>3</sup> virus/L (qPCR)<br>60% (ICC-PCR) | Etats-Unis     | Xagorarakis <i>et al.</i> , 2007  |
| Ad40, Ad41            |                | 5.10 <sup>1</sup> -5.10 <sup>2</sup> virus/L (qPCR)                   |                |                                   |
| Ad et Ad40, Ad41      | Rivière        | 2.10 <sup>0</sup> -7.10 <sup>3</sup> génome/L                         | Japon          | Haramoto <i>et al.</i> , 2007     |

Ad<sub>NS</sub> : sérotype non spécifié, Ad : adénovirus humains, UFP : unités formant plages, NPP : nombre le plus probable, ICC-PCR : culture cellulaire suivie d'une PCR, qPCR : PCR quantitative

### Les astrovirus

Les astrovirus ont été isolés chez l'homme, mais également chez un grand nombre d'espèces animales. Les astrovirus humains, membres du genre *Mamastrovirus* (astrovirus humains et animales) au sein de la famille des *Astroviridae*, sont des virus non enveloppés d'environ 28 nm de diamètre à ARN simple brin. En microscopie électronique, ils présentent un motif en étoile au centre de leur capsid. Ils ont été identifiés pour la première fois en tant que pathogènes humains par Madeley et Cosgrove (1975) pendant une épidémie de gastroentérite dans une maternité anglaise. Ces virus sont aujourd'hui reconnus comme un agent étiologique important de gastroentérites virales (Foley *et al.*, 2000). Huit sérotypes d'astrovirus humains ont été identifiés. Les infections se retrouvent principalement chez les enfants en bas âge (Walter et Mitchell, 2000, 2003), mais les astrovirus sont également retrouvés dans des populations adultes (Oishi *et al.*, 1994; Belliot *et al.*, 1997), plus particulièrement chez les personnes âgées (Lewis *et al.*, 1989) et immunodéprimés (Grohmann *et al.*, 1993).

Ces virus ont déjà été détectés dans l'eau (Marx *et al.*, 1997; Chapron *et al.*, 2000) mais il n'existe que très peu d'études documentant leur transmission via l'eau, même si celle-ci est souvent évoquée. Toutefois, Pinto *et al.* (1996) ont mis en évidence la présence d'astrovirus dans une eau prélevée au niveau d'une zone où des épidémies de gastroentérites sont couramment rapportées. Plus récemment, une étude (Gofti-Laroche *et al.*, 2003) a évalué l'impact potentiel des astrovirus au niveau de l'eau de distribution. Pour cela les auteurs ont étudié la relation entre l'incidence des gastroentérites et la prévalence du génome des astrovirus humains dans un système d'eau potable en France. Les résultats montrent que 12% des échantillons d'eau analysés sont positifs en génome d'astrovirus et que la présence de ces virus augmente significativement le risque de gastroentérites. Pour les auteurs, les astrovirus seraient donc responsables d'une partie des maladies digestives liées à l'eau. En 2004, à Helsinki en Scandinavie, ces virus ont d'ailleurs été incriminés lors d'une épidémie survenue chez des utilisateurs d'une piscine extérieure (Maunula *et al.*, 2004).



### Les calicivirus (Norovirus et Sapovirus)

La famille des *Caliciviridae* est composée de quatre genres : *Norovirus*, *Sapovirus*, *Lagovirus* et *Vesivirus*. Les virus appartenant aux deux derniers genres cités infectent uniquement les espèces animales. Les genres *Norovirus* et *Sapovirus* contiennent des virus responsables d'infection chez l'homme et chez les animaux, mais aucune transmission inter-espèces n'a, pour le moment, été mise en évidence (Atmar et Estes, 2006). Aucun de ces virus n'est actuellement cultivable sur les systèmes cellulaires classiques de laboratoire (Duizer *et al.*, 2004). Cependant, deux découvertes récentes devraient permettre de mieux comprendre la réplication de ces virus. D'une part, un norovirus murin cultivable sur les systèmes cellulaires classiques a été identifié par Wobus *et al.* (2004; 2006) et, d'autre part Straub *et al.* (2007) ont décrit un nouveau modèle de culture tridimensionnel à partir de cellules épithéliales intestinales humaines, sur lequel les norovirus humains seraient capables de se multiplier.

Comme les autres *Caliciviridae*, les norovirus sont des virus non enveloppés à structure icosaédrique. Ils possèdent un génome à ARN simple brin de polarité positive d'environ 7600 nucléotides (Jiang *et al.*, 1993). Dans une récente étude concernant l'analyse de la séquence en acides aminés de la protéine de capsid de souches virales distinctes, Zheng *et al.* (2006) ont proposé de diviser le genre *Norovirus* en cinq génogroupes (GGI à GGIV). Les différents génogroupes sont eux-mêmes divisés en groupes génétiques ou génotypes représentés chacun par un virus type. Uniquement les génogroupes I, II et IV contiennent des souches virales pathogènes pour l'homme.

Les norovirus humains sont la principale cause de gastroentérites non bactérienne à travers le monde et également dans les pays développés (Carter, 2005). Toutes les classes d'âge de la population sont sensibles à ce type d'infection. De plus, la faible dose infectieuse et la résistance dans l'environnement de ces virus, leur confèrent un potentiel épidémique important. Ainsi, de nombreuses épidémies à norovirus d'origine hydrique ont été rapportées (Blanton *et al.*, 2006). La transmission du virus, suite à la consommation d'eau contaminée, est bien documentée et les épidémies décrites ont pu être associées à des systèmes d'eau indépendants ou communautaires, des puits privés ou encore des eaux souterraines (Taylor *et al.*, 1981; Kaplan *et al.*, 1982; Wilson *et al.*, 1982; Lawson *et al.*, 1991; Payment *et al.*, 1994; Beller *et al.*, 1997; Kukkula *et al.*, 1997; Kukkula *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2005; Maunula *et al.*, 2005). Par ailleurs, les eaux récréatives ont aussi été associées à des épidémies de gastroentérites avec des norovirus identifiés comme agent pathogène (Baron *et al.*, 1982; Gray *et al.*, 1997; Hoebe *et al.*, 2004).

Concernant le genre *Sapovirus*, les différentes analyses phylogénétiques portant soit sur la séquence nucléotidique de l'ARN polymérase (Farkas *et al.*, 2004), soit sur celle de la protéine de capsid (Hansman *et al.*, 2007a) ont abouti à une division en cinq génogroupes (GGI à GGIV) de ce genre. Tout comme les norovirus, les différents génogroupes sont eux aussi divisés en génotypes. Les génogroupes GGI, GGII, GGIV et GGIV comportent des souches virales infectant l'homme, contrairement au GGIII qui infecte des espèces porcines (Hansman *et al.*, 2007a). En général, les sapovirus sont associés à des cas sporadiques de gastroentérites chez les enfants et restent des agents mineurs de ce type de symptômes par rapport aux norovirus. Ceci explique en partie le nombre limité d'études les concernant spécifiquement. A titre d'exemple, dans une large étude épidémiologique consacrée aux calicivirus, réalisée aux Etats-Unis sur une période de quatre ans, les sapovirus représentent seulement 2% des virus isolés contrairement aux norovirus GGI et GGII qui représentent respectivement 19% et 79% (Blanton *et al.*, 2006). Même si ces virus

ont récemment été mis en évidence dans les milieux aquatiques et plus particulièrement dans des eaux de rivière japonaises (Hansman *et al.*, 2007b; Haramoto *et al.*, 2008), la transmission par l'eau reste peu connue et peu décrite. Cependant, au vu des ressemblances avec les norovirus, il semble, a priori, possible d'envisager ce mode de transmission.

### Les entérovirus

Sous le genre *Enterovirus*, appartenant à la famille des *Picornaviridae*, sont regroupés les poliovirus, les coxsackievirus, les echovirus et de nombreux autres entérovirus. Plus de 80 sérotypes différents ont déjà été identifiés et répertoriés par le comité international de taxonomie des virus (Fauquet *et al.*, 2005). Les entérovirus sont des virus à ARN simple brin avec une capsidie protéique d'environ 20 à 30 nm de diamètre. Environ 70% des entérovirus, sans compter les poliovirus, sont responsables de pathologies humaines et environ 30% sont associés à des infections chez diverses espèces animales comme les bovins et les porcins. Le plus souvent, les infections à entérovirus chez l'homme sont asymptomatiques (Grist *et al.*, 1978). Des symptômes se manifestent chez environ 1% des personnes infectées et ils peuvent être associés à une très grande diversité clinique : une atteinte du système nerveux central (poliomyélite), des infections du système respiratoire ou encore des maladies cardiaques comme la myocardite, ou la péricardite (Grist *et al.*, 1978; Wood *et al.*, 1978). Contrairement aux autres groupes viraux, de nombreuses données sont disponibles sur la présence des entérovirus dans l'environnement car leur identification est possible sur les systèmes cellulaires de laboratoire aussi bien avec des lignées cellulaires humaines qu'animales (Tableau 7 et Tableau 8). Paradoxalement, les épidémies avérées d'origine hydrique sont très rares et donc très peu documentées.

### Les rotavirus

Les rotavirus sont reconnus comme étant le principal agent étiologique des gastroentérites virales chez les enfants (Schwab, 2007), mais il semble que, de plus en plus, il soit également assez fréquemment rencontrés chez l'adulte (Griffin *et al.*, 2002; Carraro *et al.*, 2008). Les rotavirus constituent un genre au sein de la famille des *Reoviridae*. Ils possèdent un génome constitué de 11 segments d'ARN double brin qui code six protéines structurales (VP1 à VP6) et six autres non-structurales (NSP1 à NSP6). La capsidie virale, d'environ 75 nm de diamètre est constituée de trois couches superposées. Les rotavirus sont classés en sept groupes distincts, nommés A à G, capables d'infecter une grande variété d'espèces animales. Parmi eux, seulement les groupes A, B et C sont responsables de pathologie chez l'homme, avec une forte fréquence du groupe A à travers le monde. De nombreuses études décrivent des épidémies à rotavirus d'origine hydrique touchant aussi bien les enfants que les adultes (Hopkins *et al.*, 1984; Hung *et al.*, 1984; Hrdy, 1987; Gerba *et al.*, 1996; Kukkula *et al.*, 1997; Villena *et al.*, 2003; Divizia *et al.*, 2004).

### Les virus des hépatites A et E

Le virus de l'hépatite A (HAV) appartient au genre *Hepatovirus* au sein de la famille des *Picornaviridae*. Il s'agit d'un virus nu à capsidie icosaédrique d'environ 30 nm de diamètre qui contient une molécule d'ARN simple d'environ 7500 bases (Fauquet *et al.*, 2005). Les analyses moléculaires réalisées

sur les différentes souches isolées de par le monde, ont permis de mettre en évidence l'existence de 6 génotypes (I à IV), eux-mêmes subdivisés en 2 génogroupes (A et B). Seuls les génotypes I, II et III sont responsables d'infections chez l'homme, avec une prédominance des génotypes I et III. Les infections liées au virus de l'hépatite A n'ont pas les mêmes conséquences selon la classe d'âge considérée. Ainsi, plus de 90% des enfants de moins de 5 ans infectés par le HAV développent une forme asymptomatique alors que 50 à 75% des adultes infectés développent une forme ictérique (Pinto et Saiz, 2007). La transmission par voie féco-orale est de loin la plus habituelle et elle est le plus souvent directe de personne à personne. Toutefois, 84 000 cas d'hépatite A sont recensés annuellement aux Etats-Unis dont 5% seraient directement liés à l'eau ou à l'alimentation (Koopmans *et al.*, 2002). A propos des épidémies liées à l'eau, Bloch *et al.* (1990) rapportent que 16 personnes séro-susceptibles sur 18 (89%) utilisant l'eau d'un même puits au nord de la Géorgie ont présentés des symptômes d'hépatite A. Toutefois, peu d'épidémies liées à une consommation directe d'eau ont été décrites. Généralement, les épidémies avérées sont plutôt la conséquence de la consommation d'aliments souillés par de l'eau contaminée (Reid et Robinson, 1987; Rosenblum *et al.*, 1990; Sanchez *et al.*, 2002).

Précédemment classé dans la famille des *Caliciviridae*, le virus de l'hépatite E est aujourd'hui le seul représentant du genre *Hepevirus* dans la famille des *Hepeviridae*. La particule virale de structure icosaédrique mesure entre 27 et 34 nm de diamètre et ne possède pas d'enveloppe. Le génome de ce virus est un ARN simple brin de polarité positive et d'une taille d'environ 7 300 kb. Les différentes souches isolées ont pu être classées en quatre génotypes. Le génotype 1 correspond à la souche endémique des pays en voie de développement de l'Asie et de l'Afrique, le génotype 2 a été observé au Mexique et en Asie, le génotype 3 est lui très largement distribué et a été isolé lors de cas sporadiques d'hépatite ainsi que chez les porcs. Enfin le génotype 4, retrouvé exclusivement dans les pays asiatiques, a été isolé aussi bien chez l'homme que chez les cochons domestiques (Panda *et al.*, 2007). La transmission du virus se fait essentiellement par la voie hydrique ce qui cause de fréquentes épidémies dans les pays en voie de développement (Emerson et Purcell, 2003). La première épidémie documentée a eu lieu en Inde dans les années 1955-1956. L'origine de l'épidémie, qui avait initialement été attribuée au virus de l'hépatite A, était la contamination d'une rivière, servant à la production d'eau de boisson, par des eaux usées (Pinto et Saiz, 2007). La zone endémique la plus touchée par le virus semble être la Chine avec déjà 11 épidémies recensées. La plus importante d'entre elles a eu lieu dans les années 1986-1988, avec plus de 119 000 cas. Jusqu'à maintenant, les cas sporadiques observés dans les régions non endémiques étaient souvent attribués à des voyages, mais une augmentation du nombre de cas a été observée dans ces pays (Smith, 2001). Un potentiel zoonotique de ce virus a été suggéré après la mise en évidence du virus chez les animaux sauvages et domestiques. Toutefois, la transmission inter-espèces n'est pas évidente, car peu de cas humains ont été rapportés dans des régions où le virus est endémique chez les animaux (Koopmans et Duizer, 2004).

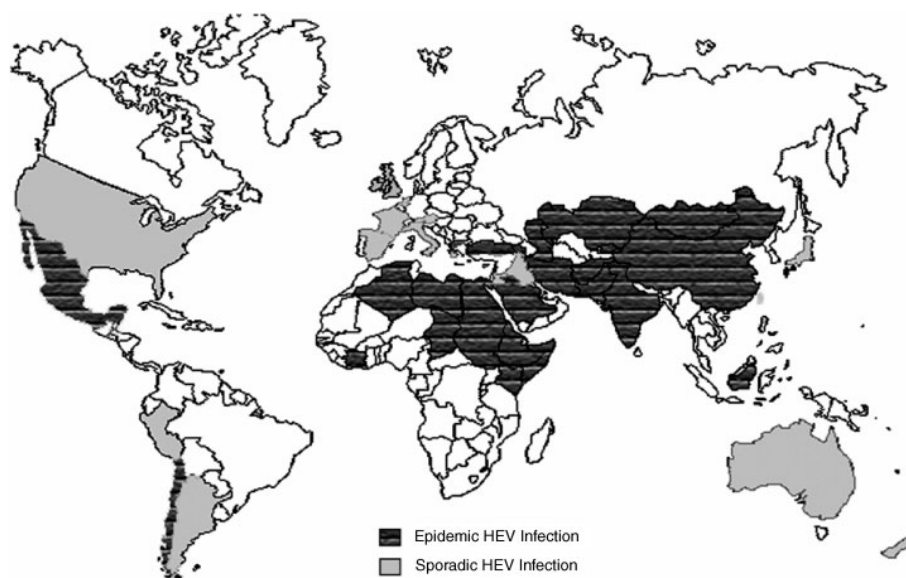


Figure 9. Distribution géographique du virus de l'hépatite E. Les régions en noir représentent les zones géographiques où le virus est endémique et les régions en gris représentent les zones où les cas d'hépatite E sont sporadiques (Panda *et al.*, 2007).

De manière à compléter les données sur les virus entériques décrits précédemment, le Tableau 7 et le Tableau 8 donnent un aperçu des concentrations en virus pathogènes observées dans les eaux de surface et les eaux souterraines à travers le monde.

Tableau 7. Aperçu de la présence et de la concentration des virus entériques dans les eaux superficielles (d'après Gerba, 2007).

| Localisation         | Concentration - Pourcentage de positif   | Remarques             | Références                     |
|----------------------|--|-----------------------|--------------------------------|
| Etats-Unis (Arizona) | Entérovirus: 0-0,75 UFP/L<br>Rotavirus: 0-0,25 IFF/L   | Eau récréative        | Rose <i>et al.</i> , 1987      |
| Etats-Unis           | Astrovirus: 27,57% (ICC-PCR)<br>Entérovirus: 27,5% (ICC-PCR)   | Eau de surface        | Chapron <i>et al.</i> , 2000   |
| Etats-Unis (Floride) | 0,002-0,014 NPP ou ECP/L   | Lacs                  | Betancourt et Rose, 2005       |
| Italie               | HAV (culture):   |                       | Diviza <i>et al.</i> , 1989    |
| Allemagne            | 0,5-56 NPPUC   | Rivières              | Walter <i>et al.</i> , 1989    |
| Canada               | 0,1-29 NPPUC/L   | Rivière St Lawrence   | Payment <i>et al.</i> , 2000   |
| Corée                | Entérovirus (ICC-PCR): 33,3%   | Rivière Han           | Lee <i>et al.</i> , 2005       |
| Pays-Bas             | Entérovirus: 0,3-2 UFP/L<br>Rotavirus (PCR): 57-5386   | Rivières Waal et Maal | Lodder et de Roda Husman, 2005 |
| Afrique du sud       | Rotavirus: 13%   | Barrage               | van Zyl <i>et al.</i> , 2006   |
| France               | Entérovirus (culture): 3%<br>Entérovirus (PCR): 88%<br>HAV (PCR): 1,5%<br>Norovirus GI (PCR): 1,5%<br>Norovirus GII (PCR): 0%<br>Astrovirus (PCR): 3%<br>Rotavirus (PCR): 0% | Diverses rivières     | Hot <i>et al.</i> , 2003       |
| Afrique du sud       | HAV (PCR): 35,3%<br>HAV (PCR): 37,3%   | Rivière<br>Barrage    | Taylor <i>et al.</i> , 2001    |
| Thaïlande            | HAV (PCR): 15%   | Canaux                | Kittigul <i>et al.</i> , 2000  |

UFP : unités formant plages, NPPUC : nombre le plus probable d'unités cytopathogènes, ICC-PCR : culture cellulaire suivie d'une PCR, IFF : foci fluorescent

Tableau 8. Exemple de la présence des virus entériques au niveau des eaux souterraines

| Localisation           | Concentration - Pourcentage de positif   | Remarques                           | Références                        |
|------------------------|--|-------------------------------------|-----------------------------------|
| Etats-Unis             | Entérovirus: 30,1% (PCR)<br>HAV: 8,6% (PCR)<br>Rotavirus : 8,6% (PCR)  | Divers puits aux Etats-Unis (n=139) | Abbaszadegan <i>et al.</i> , 1999 |
| Etats-Unis (Wisconsin) | HAV : 6% (PCR)<br>Rotavirus : 2% (PCR)<br>Entérovirus: 2% (PCR)<br>Norovirus: 2% (PCR)                             | Puits individuels                   | Borchardt <i>et al.</i> , 2003    |
| Etats-Unis             | Norovirus : 21% (PCR)<br>HAV : 14% (PCR)<br>Rotavirus : 0% (PCR)<br>Entérovirus: 38% (PCR)<br>Réovirus : 62% (PCR) | 21 puits (n=321)                    | Fout <i>et al.</i> , 2003         |
| Etats-Unis (Wisconsin) | Virus entériques : 50% dont des entérovirus, des rotavirus, des norovirus et du HAV                                | Puits municipaux (n=48)             | Borchardt <i>et al.</i> , 2004    |

### 2.1.2. La persistance des virus entériques dans les eaux

Les virus sont des parasites intracellulaires obligatoires et en tant que tel, ils sont incapables de se multiplier en dehors de leur hôte. Le nombre de particules virales infectieuses ne peut donc que diminuer ou au mieux rester stable, après qu'elles ont été émises dans l'environnement. Lorsque l'on parle de « survie » ou « d'inactivation » des virus, cela se rapporte toujours au caractère infectieux de ces derniers. Ainsi, le seul moyen permettant de déterminer et de mesurer cette survie est la détection par les méthodes de culture cellulaire, qui font office de référence pour déterminer le caractère infectieux d'une particule virale.

Différents facteurs environnementaux peuvent contrôler la survie des virus dans les eaux. Parmi l'ensemble des facteurs listés dans le Tableau 9, la température est considérée comme celui ayant le plus d'influence sur le survie des particules virales et ce, tout virus confondu (Yates *et al.*, 1985). En général, plus la température est basse et plus les virus persistent longtemps (O'Brien et Newman, 1977; Nasser *et al.*, 1993; Allwood *et al.*, 2003; Noble *et al.*, 2004; Fong *et al.*, 2005). La température peut, soit être directement à l'origine d'une dénaturation des acides nucléiques et des protéines qui constituent le virus, soit générée des réactions chimiques ou enzymatiques qui dégraderont la capsid virale. A titre d'exemple, dans de l'eau souterraine, le taux d'inactivation du poliovirus 1 passe de 0,02 log<sub>10</sub>/jour pour une température de 4°C à 0,4 log<sub>10</sub>/jour à 26°C (John et Rose, 2005). D'autres études ont comparé la survie des virus entériques pathogènes dans les eaux usées et les eaux naturelles. L'étude d'Enriquez *et al.* (1995) compare l'inactivation des adénovirus entériques à celle du poliovirus dans de l'eau de distribution, de l'eau usée et de l'eau mer à différentes température. Quelle que soit la condition, il montre que les adénovirus sont toujours plus persistants que le poliovirus 1. Dans de l'eau de distribution à 4°C, les T<sub>99</sub> estimés sont de 304 jours pour l'adénovirus 41 est de 41 jours le poliovirus 1.

Après la température, le rayonnement ultraviolet est aussi un des facteurs importants responsables de l'inactivation virale puisque plusieurs auteurs ont montré que cette inactivation était favorisée en présence de lumière. Ainsi, il n'est pas rare de voir des résultats démontrant que l'inactivation virale dans les eaux est plus importante en été qu'en hiver (Johnson *et al.*, 1997; Sinton *et al.*, 1999; Noble *et al.*, 2004). La composition chimique de l'eau influence également l'inactivation des virus. Des facteurs, tels que le pH ou la

présence de sels affectent la stabilité des virus. Ainsi, les virus survivent presque toujours mieux dans l'eau douce que dans l'eau de mer (Girones *et al.*, 1989; Bosch *et al.*, 1997; Sinton *et al.*, 2002). Selon les conditions du milieu considéré, tous ces facteurs peuvent agir séparément ou conjointement, et il est donc difficile d'isoler chaque facteur lors d'expériences *in situ*.

**Tableau 9. Facteurs influençant la persistance et la survie des virus entériques dans les eaux**

| <b>Facteur</b>                    | <b>Influence et commentaire</b>   |
|-----------------------------------|---|
| <b>La température</b>             | Probablement le facteur le plus important, plus longue survie à base température                            |
| <b>La lumière</b>                 | Les rayons ultraviolets de la lumière du soleil peuvent causer des dommages au niveau des acides nucléiques |
| <b>Le pH</b>                      | La plupart des virus sont stables aux pH naturels des eaux (pH compris entre 5-9)                           |
| <b>Les sels</b>                   | La présence de certains cations peut protéger les virus de l'inactivation à la chaleur                      |
| <b>La matière organique</b>       | La présence d'eaux usées favorise la survie des particules virales  |
| <b>Les matières en suspension</b> | L'association avec des solides prolonge la survie des particules virales                                    |
| <b>Les facteurs biologiques</b>   | Prédation de la microflore aquatique  |

Afin de mieux comprendre les phénomènes d'inactivation des particules virales, il est possible d'étudier indépendamment les constituants de celles-ci, à savoir les protéines de la capsidie ou le génome viral. Avec les techniques de biologie moléculaire, et plus particulièrement les méthodes de PCR en temps réel, il est devenu plus aisé de quantifier la diminution des virus par la dégradation de leur génome. Cela se révèle également très intéressant pour obtenir des données sur les virus non cultivables tels que les norovirus humains (Ngazoa *et al.*, 2008). La plupart des études comparatives s'intéressant à la fois aux phénomènes d'inactivation virale et de dégradation du génome viral s'accordent toutes à dire que le génome persiste mieux que la particule virale qui lui est associé. Ceci a été démontré pour le virus de l'hépatite A dans de l'eau de mer artificielle (Arnal *et al.*, 1998), le poliovirus 1 dans de l'eau de rivière ou de l'eau minérale (Gassilloud *et al.*, 2003; Skraber *et al.*, 2004), les astrovirus et les rotavirus dans de l'eau souterraine (Espinosa *et al.*, 2008), et également pour les calicivirus et le phage MS2 dans l'eau de surface et l'eau souterraine (Bae et Schwab, 2008). Cette observation a parfois été nuancée en fonction des conditions expérimentales. Par exemple, Bae et Schwab (2008) constatent que la différence de persistance entre le génome et la particule infectieuse s'observe moins à une température de 4°C qu'à 25°C. De la même manière, Espinosa *et al.* (2008) montre une différence de persistance dans l'eau souterraine mais pas dans de l'eau de rivière.

Même si le génome viral ne permet pas de connaître le caractère infectieux des virus détectés, sa mise en évidence peut apporter des informations intéressantes sur la pollution fécale. Tout d'abord, en raison d'une persistance prolongée par rapport aux particules infectieuses, le génome viral semble pouvoir offrir la possibilité de suivre la pollution fécale sur une période de temps plus importante. De plus, comme il sera détaillé dans la partie suivante, la présence de génome viral pourrait également être utilisée comme indicateur de la présence de virus pathogènes.

## 2.2. Les indicateurs de pollution de nature virale

Puisque les bactéries ne semblent pas adéquates pour prédire le comportement des virus, les scientifiques se sont tournés vers les virus pour tenter d'estimer la qualité virale de l'eau. Les virus pathogènes (Fong, 2005) et les bactériophages de bactéries entériques ont tout deux été proposés comme potentiels indicateurs viraux de la pollution fécale.

### 2.2.1. Les virus pathogènes

A partir des années 1980, en réponse aux reproches adressés à l'encontre des indicateurs bactériens, certains auteurs ont suggéré d'utiliser directement les virus entériques pathogènes pour l'homme comme indicateur de contamination virale (Sellwood *et al.*, 1981). Les premiers virus proposés pour remplir cette fonction ont été les entérovirus, principalement parce qu'ils ont été très largement étudiés et qu'ils sont reconnus comme étant les virus entériques les plus facilement cultivables et quantifiables par les méthodes de culture cellulaire. Ces virus ont d'ailleurs été inclus dans une directive européenne visant à estimer la qualité des eaux de baignade (76/160/CEE, 1976). Néanmoins, des difficultés méthodologiques ont conduit à éliminer ce paramètre de la nouvelle directive (2000/60/CE, 2000). En effet, une recherche de virus infectieux nécessite l'utilisation d'une technique de concentration parfois contraignante et pas toujours adaptée en termes de volume à analyser.

Après l'avènement des techniques de biologie moléculaire, et la mise en évidence d'une meilleure persistance de celui-ci, le génome des virus pathogènes a également été proposé comme indicateur de pollution virale. Il est toutefois important de garder à l'esprit que les résultats obtenus avec cette méthode de détection restent extrêmement différents de ceux obtenus par culture cellulaire. A titre d'exemple, dans une étude évaluant l'utilisation du génome entéroviral en tant qu'indicateur dans des eaux de surface, il est rapporté que 88% des échantillons montrent la présence de génome d'entérovirus, alors que seulement 3% des mêmes échantillons était positifs par culture cellulaire (Hot *et al.*, 2003). Grâce aux comparaisons effectuées avec d'autres virus pathogènes, les auteurs concluent que la présence de génome entéroviral pourrait être un bon indicateur de la présence de virus pathogènes.

Concernant le choix des virus à cibler, des études conduites en Europe et dans d'autres parties du monde ont suggéré d'inclure les adénovirus comme index de pollution fécale en raison d'une présence et d'une persistance dans les environnements aquatiques plus importante que celles des entérovirus (Irving et Smith, 1981; Krikelis *et al.*, 1985; Pina *et al.*, 1998; Jiang *et al.*, 2001; Thurston-Enriquez *et al.*, 2003). De plus, d'un point de vue pratique, la recherche des adénovirus par biologie moléculaire apparaît plus simple que celle des autres virus entériques car elle ne nécessite pas de rétro-transcription (Jofre, 2007). Ils sont également plus stables et plus résistants dans les milieux aquatiques. Enriquez *et al.* (1995) ont montré que les adénovirus persistaient trois à cinq fois plus longtemps que le poliovirus dans de l'eau de mer. Muniain-Mujika *et al.* (2003) ont recherché la présence de pathogènes viraux dans les coquillages au niveau de trois sites espagnols, présentant des niveaux de contamination différents. Respectivement, 47%, 19% et 24% de leurs échantillons (n=54) étaient positifs pour la présence d'adénovirus humains, d'entérovirus humains et de virus de l'hépatite A. De plus, les adénovirus humains ont été détectés dans tous les échantillons positifs pour la présence d'entérovirus et de virus de l'hépatite A. Dans une autre étude, Pina *et al.* (1998) rapportent

que la présence d'adénovirus humains dans des échantillons d'eaux usées est fortement corrélée à la présence des virus de l'hépatite A et à la présence de bactériophages spécifiques de l'homme, tel que les phages de *Bacteroides fragilis* HSP40.

La recherche des virus pathogènes, que ce soit par culture cellulaire ou par biologie moléculaire, en tant qu'indicateurs de pollution virale présente l'avantage de disposer d'indicateurs incapables de se multiplier dans l'environnement. De plus, cela apporterait directement une information sur la présence des virus pathogènes (Fong et Lipp, 2005). Toutefois, plusieurs inconvénients peuvent également être soulignés. Premièrement, les virus pathogènes sont généralement présents en faible quantité dans les eaux, ce qui implique une contraignante étape de concentration avant leur détection (Jofre, 2007). Deuxièmement, plusieurs études ont montré qu'il n'existait pas de corrélation entre la densité des différents virus au niveau des échantillons d'eaux usées (Irving et Smith, 1981), d'eaux de surface (Chapron *et al.*, 2000) et d'eau de mer (Jiang *et al.*, 2001). En effet, la plupart des maladies virales à transmission hydrique présente un caractère saisonnier et cette saisonnalité peut également varier en fonction des climats et des zones géographiques. Par conséquent, la présence de virus pathogènes dans les rejets humains dépend de la situation épidémiologique au sein de la population. Cette saisonnalité a également été observée au niveau des eaux (Tani *et al.*, 1995; Westrell *et al.*, 2006; Jiang *et al.*, 2007). Une différence de résistance vis-à-vis des stress environnementaux et des traitements de désinfection a également été rapportée entre les différents types de virus pathogènes (Callahan *et al.*, 1995; Gerba *et al.*, 2002). Ainsi, pour être un outil pertinent, la recherche de virus pathogènes ou du génome viral devrait cibler, simultanément ou non, les principaux virus entériques pathogènes (Cho *et al.*, 2000; Lee et Kim, 2002).

### 2.2.2. Les bactériophages

Les bactériophages ont été préconisés, pour la première fois, comme indicateurs potentiels de la présence de microorganismes entériques au cours des années 1950 (Guelin et Gozda Wa-Le Bris, 1952). Par la suite, l'intérêt des phages infectant les bactéries entériques a été très largement étudié. Aujourd'hui, il est admis que les phages ne sont pas parfaits comme indicateurs viraux puisque les études de corrélation entre la présence des phages et celle des virus pathogènes dans différents types d'eau sont loin d'être unanimes (Jofre, 2007). Cependant, les données disponibles suggèrent que la présence de certains phages dans les eaux pourrait indiquer la présence probable de virus. Les phages qui présentent un intérêt dans l'évaluation de la qualité des eaux sont les coliphages somatiques (Kott *et al.*, 1974; IAWPRC, 1991), les phages de *Bacteroides fragilis* (Jofre *et al.*, 1986; Tartera et Jofre, 1987; IAWPRC, 1991) et les phages ARN F-spécifiques (IAWPRC, 1991; Havelaar, 1993). Ces phages appartiennent à 6 familles différentes dont les caractéristiques structurales sont résumées dans le Tableau 10.

Parmi ces trois groupes, les coliphages somatiques sont les phages les plus abondants au niveau des eaux usées avec une concentration de l'ordre de  $10^6$  à  $10^7$  UFP/100mL (Contreras-Coll *et al.*, 2002; Lucena *et al.*, 2003; Lodder et de Roda Husman, 2005). Ils constituent un ensemble très hétérogène de virus, aux caractéristiques structurales diverses (Tableau 10), capables d'infecter certaines souches d'*E. coli* par adsorption au niveau de la paroi bactérienne. Une critique souvent formulée à leur rencontre est leur possible

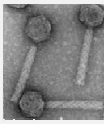
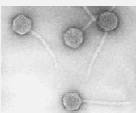

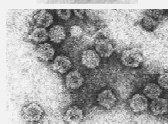
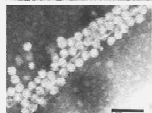
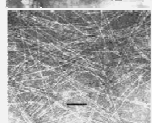


capacité à se multiplier dans l'environnement. Cependant, des études récentes suggèrent que ces phages ne représentent qu'une faible proportion du nombre détecté dans les eaux, notamment lorsque la détection est réalisée avec la bactérie hôte recommandée par les méthodes standardisées (Muniesa *et al.*, 2003; Muniesa et Jofre, 2004). Par ailleurs, leur seconde faiblesse serait leur plus faible résistance aux traitements de désinfection par rapport aux autres groupes de bactériophages.

Contrairement aux coliphages somatiques, les phages responsables d'infection chez *Bacteroides fragilis*, sont décrits comme étant les moins nombreux dans les eaux usées, avec une concentration de l'ordre de  $10^4$  à  $10^5$  UFP/100mL (Puig *et al.*, 1999; Contreras-Coll *et al.*, 2002; Lucena *et al.*, 2003). Toutefois, ils semblent être plus résistants que les autres groupes de phages (Duran *et al.*, 2002) et ne se répliquent pas en dehors du tube digestif des mammifères. La principale critique à leur rencontre, au delà du fait qu'ils soient faiblement représentés dans les eaux, porte sur leur méthode de détection nécessitant des conditions anaérobies et des hôtes différents selon les zones géographiques.

Les phages ARN F-spécifiques constituent un groupe de virus très homogène dont l'utilisation a souvent été décrite comme étant plus propice à l'estimation de la qualité des eaux que celle des autres phages. Ainsi, nous nous sommes plus particulièrement intéressés à ces virus et aux raisons de leur intérêt.

**Tableau 10. Caractéristiques structurales des familles de bactériophages regroupant des phages intéressants pour évaluer la qualité des eaux (d'après Jofre, 2007). <sup>a</sup> coliphages somatiques, <sup>b</sup> phages de *Bacteroides fragilis*, <sup>c</sup> bactériophages ARN F-spécifiques.**

| Famille                            | Caractéristique structurale   | Phage modèle (hôte)   | Microscopie électronique  |
|------------------------------------|---|---|---|
| <i>Myoviridae</i> <sup>a</sup>     | ADN db<br>Longue queue rétractile<br>Capside d'environ 100 nm<br>Capside icosaédrique ou allongée | T2, T4 ( <i>E. coli</i> )   |  |
| <i>Siphoviridae</i> <sup>a,b</sup> | ADN db<br>Longue queue non rétractile<br>Capside d'environ 60 nm<br>Capside icosaédrique          | $\lambda$ ( <i>E. coli</i> )<br>B40-8 ( <i>Bacteroides fragilis</i> )                       |  |
| <i>Podoviridae</i> <sup>a</sup>    | ADN db<br>Courte queue<br>Capside d'environ 65 nm<br>Capside icosaédrique                         | T7, P22 ( <i>E. coli</i> )  |  |
| <i>Microviridae</i> <sup>a</sup>   | ADN sb<br>Absence de queue<br>Capside d'environ 25 - 30 nm<br>Capside icosaédrique                | $\phi$ X174 ( <i>E. coli</i> )  |  |
| <i>Leviviridae</i> <sup>c</sup>    | ARN sb<br>Absence de queue<br>Capside d'environ 25 nm<br>Capside icosaédrique                     | f2, MS2, GA, Q $\beta$ , FI<br>(bactérie porteuse du plasmide codant pour les pili sexuels) |  |
| <i>Inoviridae</i>                  | ADN db<br>Capside d'environ 800 x 6 nm<br>Tiges longues et flexibles                              | fd, M13<br>(bactérie porteuse du plasmide codant pour les pili sexuels)                     |  |

### 2.2.2.1. Les phages ARN F-spécifiques comme indicateurs de pollution fécale

En tant que microorganismes fécaux, les phages ARN F-spécifiques, tout comme les autres groupes de phages, doivent pouvoir être isolés à partir d'échantillons fécaux. A partir d'échantillons humains, une incidence maximale de seulement 30% a été rapportée (Grabow *et al.*, 1995; Schaper *et al.*, 2002b). De la même manière, les résultats au niveau d'échantillons animaux sont assez disparates, mais la fréquence d'échantillons positifs observés reste plus importante que pour les échantillons humains (Grabow *et al.*, 1995; Calci *et al.*, 1998; Schaper *et al.*, 2002b). En règle générale, les concentrations de phages ARN F-spécifiques mesurées dans les selles animales, de l'ordre de  $10^4$  UFP/g de selles, sont toujours plus importantes que celles mesurées à partir de selles humaines (Jofre, 2007).

De manière parfois contradictoire, ces phages sont relativement abondants dans les eaux usées. Le Tableau 12 montre, qu'au niveau des eaux usées brutes, leur concentration est de l'ordre de  $10^5$  à  $10^6$  UFP/100mL. Cette concentration est généralement considérée comme intermédiaire entre celles des coliphages somatiques et des phages infectant *Bacteroides fragilis*. Dans les eaux traitées (traitement secondaires), la concentration est de l'ordre de  $10^3$  à  $10^4$  UFP/100mL. Cette ambiguïté entre les résultats obtenus à partir des échantillons fécaux et ceux des eaux usées n'a pas été éclaircie. Pourtant, il est peu probable que ces phages soient capables de se multiplier en dehors du système digestif de l'homme ou des animaux. Woody et Cliver (1995) constatent en effet que les pili sexuels indispensables à l'infection des bactériophages F-spécifiques ne sont synthétisés qu'au-dessus d'une température de 25°C avec un optimal au-dessus de 30°C. Lorsque la température passe de 30 à 25°C, le nombre de bactéries infectées est diminué d'un facteur 10. Ce nombre est encore diminué lorsque les bactéries sont en phase stationnaire par rapport à la phase exponentielle. De ce fait, il apparaît raisonnable de penser que les conditions rencontrées dans le milieu naturel sont incompatibles avec la multiplication des phages ARN F-spécifiques.

Dans les eaux de surface, les concentrations rapportées dans la littérature couvrent une gamme assez étendue pouvant aller de l'absence des phages à une concentration de  $10^5$  UFP/100mL. A titre de comparaison avec les eaux usées, la valeur moyenne est de l'ordre de  $10^2$  à  $10^3$  UFP/100mL (Tableau 13). Toutefois, il est important de préciser que les études prises comme exemples ne sont pas toujours directement comparables car dans certaines d'entre elles les phages ont été énumérés après une étape de concentration. Au niveau des eaux souterraines, moins de données sont disponibles dans la littérature. Les exemples présentés dans le Tableau 13 rapportent que moins de 30% des échantillons analysés montrent la présence de phages ARN F-spécifique avec des concentrations pouvant occasionnellement atteindre  $10^2$  UFP/100mL, selon l'origine de l'eau.

Afin de déterminer la pertinence de ces phages en tant qu'indicateurs de pollution fécale, deux axes de recherche ont été développés. Tout d'abord, la forte prévalence de phages ARN F-spécifiques a parfois été comparée à celle des indicateurs bactériens conventionnels. Ainsi, il a été rapporté que la concentration de ces phages était positivement corrélée à celle d'*E. coli* dans les eaux de rivière (Sundram *et al.*, 2002; Horman *et al.*, 2004) et à celles d'*E. coli*, des coliformes totaux et des entérocoques dans les eaux usées (Mandilara *et al.*, 2006). Ensuite, sur le plan de la survie, les phages sont soumis aux mêmes facteurs inactivants que les virus pathogènes. Le Tableau 11 expose quelques exemples de  $T_{90}$  témoignant de la persistance des phages ARN F-spécifiques dans les eaux naturelles.

Tableau 11. Exemples de  $T_{90}$  obtenus pour les phages ARN F-spécifiques infectieux dans différents types d'eau.

| Phage                    | Type d'eau                    | Condition | $T_{90}$ (jours) | Référence                         |
|--------------------------|-------------------------------|-----------|------------------|-----------------------------------|
| Phages ARN F-spécifiques | Rivière ( <i>in situ</i> )    | Eté       | 2,6              | Duran <i>et al.</i> , 2002        |
|                          |                               | Hiver     | 13,5             |                                   |
| Phages ARN F-spécifiques | Eau de mer ( <i>in situ</i> ) | Eté       | 0,6              | Moce-Llivina <i>et al.</i> , 2005 |
| Phage MS2                | Eau du robinet déchlorée      | 4°C       | 25,7             | Allwood <i>et al.</i> , 2003      |
|                          |                               | 25°C      | 18,7             |                                   |
|                          |                               | 37°C      | 2,7              |                                   |
| Phage MS2                | Eaux souterraines             | 4°C       | ~ 37             | Yates <i>et al.</i> , 1985        |
|                          |                               | 12°C      | ~ 12             |                                   |
|                          |                               | 23°C      | ~ 3              |                                   |
| Phage MS2                | Eau de surface                | 4°C       | ~ 20             | Bae et Schwab, 2008               |
|                          |                               | 25°C      | ~ 8              |                                   |
|                          | Eau souterraine               | 4°C       | > 20             |                                   |
|                          |                               | 25°C      | ~ 11             |                                   |

Les comparaisons effectuées avec les indicateurs bactériens s'accordent toutes à dire que les phages présentent une meilleure survie dans les environnements aquatiques. Ainsi, il a été décrit que les phages ARN F-spécifiques et le phage MS2 persistent mieux qu'*E. coli* dans les eaux usées, les eaux souterraines (Nasser et Oman, 1999) et l'eau de distribution déchlorée (Allwood *et al.*, 2003). Dans une autre étude, réalisée *in situ* dans une eau de rivière, un effet saisonnier a été mis en évidence quant à la survie des phages ARN F-spécifiques. En hiver, ces phages montrent une meilleure résistance que les coliformes fécaux et les entérocoques, mais cela s'inverse en été (Duran *et al.*, 2002). Les auteurs ont supposé que cette différence pouvait être la conséquence de l'augmentation de la durée d'ensoleillement, des changements de température ou de pH de l'eau. Sinton *et al.* (2002) montrent également l'effet inactivant de la lumière du soleil sur les phages ARN F-spécifiques et les indicateurs bactériens. Ils démontrent que les phages sont moins sensibles à ce paramètre que les entérocoques, les coliformes fécaux et *E. coli*.

Ainsi, au vu de leur concentration dans les eaux, parfois corrélées à celles des indicateurs bactériens, et de leur meilleure persistance dans l'environnement, les phages ARN F-spécifiques ont souvent été proposés comme indicateurs de pollution fécale en complément des indicateurs conventionnels.

Tableau 12. Concentration des bactériophages ARN F-spécifiques dans les eaux usées brutes et traitées.

| Type d'eau          | Souche réceptrice           | Type d'échantillon    | n   | Pourcentage de positifs | Concentration (UFP/100mL)                                  | Références                          |                             |
|---------------------|-----------------------------|-----------------------|-----|-------------------------|--|-------------------------------------|-----------------------------|
| Eaux usées brutes   | <i>S. typhimurium</i> WG 49 |                       | 8   |                         | $4,2 \cdot 10^5$ à $3,1 \cdot 10^5$ , m = $9,7 \cdot 10^5$ | Cornax <i>et al.</i> , 1991         |                             |
|                     | <i>E. coli</i> HS (Famp)    |                       | 27  | 100%                    | $1 \cdot 10^3$ à $7,6 \cdot 10^5$ , m = $7,2 \cdot 10^4$   | Araujo <i>et al.</i> , 1997         |                             |
|                     | <i>S. typhimurium</i> WG 49 |                       | 21  |                         | $4,7 \cdot 10^5$ à $7,8 \cdot 10^5$ , m = $2 \cdot 10^6$   | Chung <i>et al.</i> , 1998          |                             |
|                     | <i>E. coli</i> HS (Famp)    |                       | 21  |                         | $1,9 \cdot 10^5$ à $4,8 \cdot 10^5$ , m = $1 \cdot 10^6$   |                                     |                             |
|                     | <i>E. coli</i> HS (Famp)    |                       | 16  |                         | m = $8,1 \cdot 10^4$                                       | Lasobras <i>et al.</i> , 1999       |                             |
|                     | <i>E. coli</i> K12 Hfr      |                       | 12  |                         | m = $2,1 \cdot 10^5$                                       |                                     |                             |
|                     | <i>S. typhimurium</i> WG 49 |                       | 32  | 94 à 100%               | $1 \cdot 10^5$ à $1 \cdot 10^6$ , m = $5 \cdot 10^7$       | Baggi <i>et al.</i> , 2001          |                             |
|                     | <i>S. typhimurium</i> WG 49 |                       | 32  | 75 à 79%                | $1 \cdot 10^5$ à $1 \cdot 10^7$ , m = $1,7 \cdot 10^6$     |                                     |                             |
|                     | <i>S. typhimurium</i> WG 49 |                       | 9   |                         | m = $4,3 \cdot 10^5$                                       | Skraber <i>et al.</i> , 2002        |                             |
|                     |                             | Urbaine               |     |                         | $1,6 \cdot 10^5$ à $1,3 \cdot 10^5$ , m = $6,3 \cdot 10^5$ | Schaper <i>et al.</i> , 2002b       |                             |
|                     |                             | Hôpital               |     |                         | m = $8,2 \cdot 10^4$                                       |                                     |                             |
|                     |                             | Abattoirs             |     |                         | $2,6 \cdot 10^5$ à $3,8 \cdot 10^5$ , m = $2,3 \cdot 10^6$ |                                     |                             |
|                     |                             |                       |     |                         | m = $6,3 \cdot 10^5$                                       | Contreras-Coll <i>et al.</i> , 2002 |                             |
|                     |                             |                       |     | 104                     | 100%   | m = $3,9 \cdot 10^4$                | Lucena <i>et al.</i> , 2003 |
|                     |                             |                       |     | 28                      | 100%   | m = $3,9 \cdot 10^4$                |                             |
|                     |                             | Fosse septique        |     |                         | 100%   | m = $1,7 \cdot 10^5$                | Blanch <i>et al.</i> , 2004 |
|                     |                             | Urbaine + Hôpital     |     | 87                      | 100%   | m = $2,1 \cdot 10^5$                |                             |
|                     | Abattoirs                   |                       | 81  | 30%                     | m = $2,1 \cdot 10^5$                                       |                                     |                             |
|                     |                             |                       |     |                         | $6,7 \cdot 10^4$ à $8,4 \cdot 10^5$ , m = $3,2 \cdot 10^5$ | Lodder et de Roda Husman, 2005      |                             |
|                     |                             |                       | 60  |                         | $10^3$ à $10^5$ , m = $7,9 \cdot 10^3$                     | Mandliara <i>et al.</i> , 2006      |                             |
|                     |                             |                       | 110 | 99%                     | <50 à $8,3 \cdot 10^6$ , m = $2 \cdot 10^5$                | Blanch <i>et al.</i> , 2006         |                             |
|                     | Rejets humains              |                       |     | 80%                     | <50 à $2,5 \cdot 10^8$ , m = $5,7 \cdot 10^4$              |                                     |                             |
|                     | Rejets animaux              |                       | 110 | 100%                    | $2,5 \cdot 10^5$ à $5,9 \cdot 10^5$ , m = $1,6 \cdot 10^6$ | Gourmelon <i>et al.</i> , 2007      |                             |
|                     |                             |                       | 5   |                         | <100 à $2,5 \cdot 10^5$ , m = $1,3 \cdot 10^4$             |                                     |                             |
| Eaux usées traitées | <i>S. typhimurium</i> WG 49 |                       | 21  |                         | <100 à $1,9 \cdot 10^5$ , m = $7,7 \cdot 10^3$             | Chung <i>et al.</i> , 1998          |                             |
|                     | <i>E. coli</i> HS (Famp)    |                       | 21  |                         | <10 à $1 \cdot 10^7$ , m = $5 \cdot 10^6$                  |                                     |                             |
|                     | <i>E. coli</i> K12 Hfr      |                       | 32  | 33 à 100%               | <10 à $2 \cdot 10^6$ , m = $1,7 \cdot 10^5$                | Baggi <i>et al.</i> , 2001          |                             |
|                     | <i>S. typhimurium</i> WG 49 |                       | 32  | 0 à 100%                | m = $5,6 \cdot 10^6$                                       |                                     |                             |
|                     | <i>S. typhimurium</i> WG 49 |                       | 9   |                         | $2,7 \cdot 10^5$ à $1,3 \cdot 10^7$ , m = $7,8 \cdot 10^5$ | Skraber <i>et al.</i> , 2002        |                             |
|                     | <i>S. typhimurium</i> WG 49 |                       |     | 100%                    | $5,3 \cdot 10^2$ à $1,2 \cdot 10^4$ , m = $4,8 \cdot 10^3$ | Schaper <i>et al.</i> , 2002b       |                             |
|                     | <i>S. typhimurium</i> WG 49 |                       |     | 100%                    | $10^2$ à $10^5$ , m = $3,3 \cdot 10^3$                     | Lodder et de Roda Husman, 2005      |                             |
|                     | <i>S. typhimurium</i> WG 49 | Traitement primaire   | 60  |                         | $10^2$ à $10^3$ , m = $3,2 \cdot 10^2$                     | Mandliara <i>et al.</i> , 2006      |                             |
|                     |                             | Traitement secondaire | 20  |                         |  |                                     |                             |

m : moyenne

Tableau 13. Concentration des bactériophages ARN F-spécifiques dans les eaux naturelles.

| Type d'eau      | Souche réceptrice | Type d'échantillon            | n                           | Pourcentage de positifs      | Concentration (UFP/100mL)                                       | Références  |                                |
|-----------------|-------------------|-------------------------------|-----------------------------|------------------------------|---|---|--------------------------------|
| Eaux de surface | Rivière           | <i>E. coli</i> HS (Famp)      | 97                          | 100%                         | <10 à 3,6.10 <sup>5</sup> , m = 5,9.10 <sup>2</sup>             | Araujo <i>et al.</i> , 1997   |                                |
|                 |                   | <i>E. coli</i> K12 Hfr        | 35                          | 21 à 22%                     | <10 à 1.10 <sup>5</sup> , m = 5,2.10 <sup>4</sup>               | Baggi <i>et al.</i> , 2001  |                                |
|                 |                   | <i>S. typhimurium</i> WG 49   | 35                          | 22 à 35%                     | <10 à 1,3.10 <sup>3</sup> , m=6.10 <sup>2</sup>                 |   |                                |
|                 |                   | <i>S. typhimurium</i> WG 49   | 96                          |                              | m = 2,1.10 <sup>2</sup>   | Skraber <i>et al.</i> , 2002  |                                |
|                 |                   | <i>S. typhimurium</i> WG 49   | 43                          | 71 à 100%                    | 1.10 <sup>1</sup> à 6,5.10 <sup>2</sup> , m = 4.10 <sup>2</sup> | Duran <i>et al.</i> , 2002  |                                |
|                 |                   | <i>S. typhimurium</i> WG 49   | 392                         |                              | <10 à 3,2.10 <sup>5</sup> , m = 5.10 <sup>2</sup>               | Lucena <i>et al.</i> , 2003   |                                |
|                 |                   | <i>S. typhimurium</i> WG 49   |                             | Site 1                       | 100%  | m = 7.10 <sup>2</sup>   | Lodder et de Roda Husman, 2005 |
|                 |                   |                               |                             | Site 2                       | 100%  | m = 1.10 <sup>2</sup>   |                                |
|                 |                   |                               |                             | Site 1 (10 m <sup>2</sup> )  |   | 9,8.10 <sup>4</sup> à 8,3.10 <sup>5</sup> , m = 3,3.10 <sup>5</sup> | Cornax <i>et al.</i> , 1991    |
|                 |                   |                               |                             | Site 1 (100 m <sup>2</sup> ) |   | 1.10 <sup>2</sup> à 3,3.10 <sup>4</sup> , m = 1,8.10 <sup>3</sup>   |                                |
| Mer             |                   | Site 1 (500 m <sup>2</sup> )  | 9                           |                              | 48,9 à 2,2.10 <sup>4</sup> , m = 5,2.10 <sup>2</sup>            |   |                                |
|                 |                   | Site 1 (1000 m <sup>2</sup> ) | 9                           |                              | <10 à 1,2.10 <sup>3</sup> , m = 2,2.10 <sup>2</sup>             |   |                                |
|                 |                   | Site 2                        | 10                          |                              | <10 à 50, m = <10   |   |                                |
|                 |                   |                               | 427                         |                              | <10 à 20  | Ibarluzea <i>et al.</i> , 2007                                      |                                |
|                 |                   | <i>S. typhimurium</i> WG 49   |                             |                              | <10   | Contreras-Coll <i>et al.</i> , 2002                                 |                                |
|                 |                   | <i>S. typhimurium</i> WG 49   |                             |                              | <10 à 7,1.10 <sup>5</sup>                                       | Gourmelon <i>et al.</i> , 2007                                      |                                |
|                 | Rivière + Mer     | Estuaires                     | <i>E. coli</i> HS (Famp)    | 92                           | 14,1%   | <10 à 400, m = 1,49   | Araujo <i>et al.</i> , 1997    |
|                 |                   |                               | <i>S. typhimurium</i> WG 49 | 197                          | 28,8%   | <1 : 10,5%<br>1 à 10 : 7,8%<br>10 à 100 : 7,8%<br>>100 : 2,7%       | Lucena <i>et al.</i> , 2006    |
|                 |                   |                               | <i>E. coli</i> HS (Famp)    | 57                           | < 1 %   |   | Locas <i>et al.</i> , 2007     |
|                 |                   |                               | 160                         | < 1 %                        |   | Locas <i>et al.</i> , 2008  |                                |

\* distance du point de pollution, m : moyenne

### 2.2.2.2. Les phages ARN F-spécifiques comme indicateurs viraux de pollution virale

D'un point de vue morphologique, les phages ARN F-spécifiques possèdent une structure similaire à celle des principaux virus entériques pathogènes, à savoir une capsidie icosaédrique de 20 à 30 nm et un ARN simple brin. Ceci n'est pas le cas des deux autres groupes de phages proposés comme indicateurs (Tableau 10). Ainsi, ils semblent être plus adéquats pour décrire le comportement des virus pathogènes dans l'environnement.

De nombreuses études démontrent que, dans des conditions environnementales, la survie des phages ARN F-spécifiques ressemble à celle des virus entériques. Par exemple, Yates *et al.* (1985) montrent que la survie du phage MS2 est similaire à celle du poliovirus 1 et de l'échovirus 1 dans des eaux souterraines à différentes températures. Nasser et Oman (1999) comparent la survie des phages ARN F-spécifiques à celles du poliovirus 1 et du virus de l'hépatite A dans l'eau souterraine et l'eau usée à différentes températures. Les auteurs concluent que les phages sont bien adaptés pour prédire l'inactivation des virus pathogènes dans les eaux naturelles. Allwood *et al.* (2003) arrivent à la même conclusion après avoir comparé la survie du phage MS2 à celles du calicivirus félin f9 dans de l'eau du robinet déchlorée à différentes températures. D'après eux, les phages ARN F-spécifiques pourraient être de bons indicateurs du comportement des norovirus dans l'environnement. D'autres auteurs trouvent des résultats divergents. Par exemple, Moce-Llivina *et al.* (2005) montrent que, dans de l'eau de mer, les phages ARN F-spécifiques survivent moins bien que les entérovirus (echovirus 6 et coxsackievirus B5). Toutefois, d'autres études rapportent une sensibilité plus importante de ces phages dans l'eau de mer par rapport à l'eau douce (Sinton *et al.*, 2002).

Havelaar *et al.* (1993) sont parmi les premiers à avoir mis en évidence que les phages ARN F-spécifiques pouvaient potentiellement être de bons indicateurs de la présence de virus pathogènes. Ils démontrent que la concentration de ces phages est très fortement corrélée à la concentration en entérovirus infectieux dans toutes les eaux de surface étudiées (rivières et lacs). Toutefois, cela n'est pas vrai dans les eaux usées, qu'elles soient brutes ou épurées. Depuis, d'autres corrélations ont été mises en évidence avec les adénovirus, les rotavirus et les entérovirus dans des eaux côtières (Jiang *et al.*, 2001; Ballester *et al.*, 2005), et également avec les entérovirus dans les eaux de zones conchylicoles (Chung *et al.*, 1998). Toutefois, dans d'autres études, cette relation n'est pas observée et les auteurs s'accordent à dire que la présence des phages ARN F-spécifiques ne peut prétendre jouer le rôle d'indicateur de la présence éventuelle de virus entériques (Moriñigo *et al.*, 1992; Vilagines *et al.*, 1997; Griffin *et al.*, 1999; Borchardt *et al.*, 2004; Horman *et al.*, 2004; Harwood *et al.*, 2005). Grabow (2001) explique ce manque de corrélations entre les phages et les virus entériques par plusieurs raisons. La première réside dans le fait que les phages sont continuellement excrétés, aussi bien par les hommes que les animaux, contrairement aux virus entériques pathogènes qui sont généralement excrétés pendant de courtes périodes par les personnes infectées. De plus, la présence de certains virus pathogènes dans l'environnement est soumise aux variations épidémiologiques (Westrell *et al.*, 2006; Katayama *et al.*, 2008), ce qui n'est pas le cas des phages. Par contre, il semble tout de même que les phages puissent être soumis à des variations saisonnières, avec des concentrations généralement plus importantes en hiver qu'en été (Jiang *et al.*, 2007).

Dans le même ordre d'idées, deux études épidémiologiques ont montré qu'il existait une relation entre le nombre de bactériophages ARN F-spécifiques présents dans l'eau de surface et le risque de gastro-entérites par la baignade (Lee *et al.*, 1997; Colford *et al.*, 2007). Toutefois, Colford et ses collaborateurs

nuancent leurs résultats car un faible nombre de personnes avaient été exposées à l'eau lors de la présence des phages. D'autres études, au contraire, n'établissent pas ce lien (Medema *et al.*, 1997; van Asperen *et al.*, 1998).

\*\*\*\*\*

*En résumé, même si les phages ARN F-spécifiques ont été présentés comme étant potentiellement plus intéressants que les autres groupes de phages pour estimer la pollution fécale et prédire la présence de virus entériques pathogènes, les recherches menées jusqu'alors n'ont pas permis de le certifier. Néanmoins, l'utilisation de ces phages présente un atout supplémentaire qui pourrait permettre de caractériser la nature de la pollution fécale.*

### 3. LES BACTERIOPHAGES ARN F-SPECIFIQUES COMME OUTIL POUR DETERMINER L'ORIGINE DE LA POLLUTION FECALE

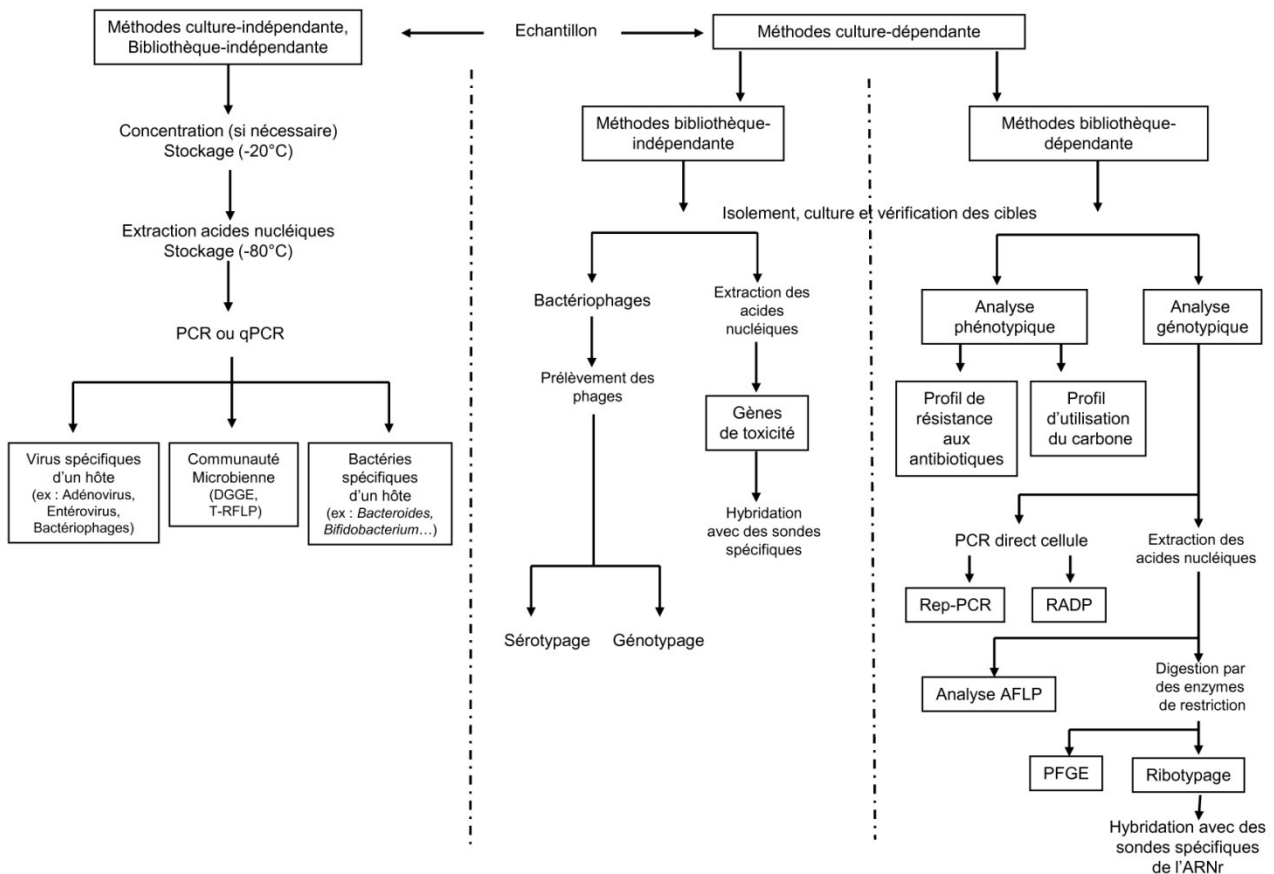
La menace pour la santé humaine liée à la présence de contaminants fécaux d'origine humaine dans les eaux est bien connue. Cependant, les animaux domestiques ou d'élevage sont également susceptibles de transmettre de nombreux pathogènes. Le risque lié à ce type de contaminants est habituellement supposé moins important que celui lié aux rejets humains, notamment parce que les virus, principale cause de maladies liées à une exposition à une eau contaminée, sont très spécifiques de leurs hôtes. Les principaux pathogènes zoonotiques sont *Salmonella*, *E. coli* O157:H7, *Campylobacter jejuni*, *Giardia* spp., *Cryptosporidium* spp. et le virus de l'hépatite E (Craun *et al.*, 2004). Ils sont responsables de troubles gastro-intestinaux et sont généralement transmis via le mode féco-oral. Peu d'études ont évalué le risque pour la santé humaine associé à ces pathogènes à transmission hydrique. De la même manière, le risque lié aux animaux sauvages est également très peu connu.

Il est reconnu que les indicateurs bactériens ne permettent pas de déterminer la source de contamination. En effet, une très grande variété d'animaux contient également dans leurs selles des bactéries utilisées comme indicateurs de pollution (Souza *et al.*, 1999; Gordon et Cowling, 2003). Néanmoins, il a été tenté d'identifier les sources de contaminants fécaux à l'aide des indicateurs bactériens, selon l'hypothèse que les rejets humains et animaux contiendraient des quantités et un ratio différents d'*E. coli* et d'entérocoques. Toutefois, cette approche a été jugée inappropriée, notamment en raison de niveaux de survie différents des microorganismes (Pourcher *et al.*, 1991). De plus, il est difficile d'imaginer comment identifier la source majoritaire de contamination en cas de pollution d'origine mixte.

Ainsi, un axe de recherche, consacré au développement et à l'optimisation de méthodes permettant d'identifier l'origine d'une pollution fécale, s'est rapidement développé de manière à répondre aux besoins croissants dans ce domaine. En effet, la présence de microorganismes fécaux dans les eaux représente aussi bien un enjeu pour la santé humaine, qu'un enjeu économique, notamment pour l'exploitation des zones de conchyliculture et de baignade.

De nombreuses méthodes ont déjà été proposées alors que d'autres sont encore à l'étude. La démarche générale est fondée sur l'établissement du degré de similitude entre les microorganismes recueillis dans les écosystèmes aquatiques et les microorganismes provenant de sources connues de pollution fécale (selles humaines ou animales). L'ensemble des méthodes disponibles doit être vu comme une « boîte à outils » dans laquelle certaines méthodes s'avèrent davantage pertinentes que d'autres, selon les circonstances de l'étude (Figure 10). Les techniques couramment employées peuvent être séparées en deux grandes familles : les méthodes chimiques (Seiler *et al.*, 1999) et les méthodes microbiologiques (Scott *et al.*, 2002). Dans cette synthèse bibliographique, uniquement les méthodes microbiologiques seront développées. Elles peuvent être classées en deux catégories, à savoir des méthodes exigeant la création d'une base ou bibliothèque de données et celles ne nécessitant pas de base de données. La classification de ces techniques est aussi parfois établie selon la nécessité ou non d'une étape préalable de culture des microorganismes d'intérêt (par exemple *E. coli*, les entérocoques ou encore des virus). En règle générale, toutes les méthodes nécessitant une base de données sont également culture-dépendantes.





**Figure 10. Représentation schématique de la « boîte à outils » rassemblant les différentes méthodes disponibles pour déterminer l'origine de la pollution fécale observée dans les eaux (adapté de USEPA, 2005; Santo Domingo et al., 2007).**

### 3.1. Les méthodes « bibliothèque-dépendantes »

Les premières méthodes développées pour déterminer l'origine humaine ou animale d'une pollution étaient, pour la plupart, basées sur la construction et l'utilisation d'une bibliothèque d'isolats de microorganismes indicateurs. Dans ce contexte, la « bibliothèque » est un ensemble d'isolats bactériens obtenus à partir d'échantillons fécaux connus (USEPA, 2005). L'identification de l'origine d'un échantillon inconnu est ensuite réalisée par une comparaison statistique entre les modèles de la bibliothèque et les isolats de l'un des échantillons à analyser (Field, 2004).

A ce jour, les microorganismes fécaux indicateurs les plus couramment utilisés sont ceux déjà utilisés pour estimer la pollution fécale des eaux comme *Escherichia coli*, les entérocoques et les streptocoques fécaux. Leur recherche est réalisée au moyen de méthodes fondées, soit sur la détermination de profils phénotypiques, soit sur la détermination d'empreintes génétiques. Les analyses génotypiques sont basées sur l'étude de l'organisation du génome, tandis que les analyses phénotypiques mesurent les produits d'expression du génome.

### 3.1.1. Les analyses phénotypiques

Les méthodes fondées sur l'étude des phénotypes utilisent des comparaisons cellulaires ou physiologiques entre isolats d'origine connue et inconnue. Les deux principales caractéristiques étudiées pour déterminer l'origine d'une pollution sont la résistance aux antibiotiques (Parveen *et al.*, 1997; Hagedorn *et al.*, 1999; Wiggins *et al.*, 1999; Harwood *et al.*, 2000; Carroll *et al.*, 2005; Edge et Hill, 2005) et le profil d'utilisation des sources de carbone (Hagedorn *et al.*, 2003; Harwood *et al.*, 2003; Wallis et Taylor, 2003; Ahmed *et al.*, 2007)

#### Profil de résistance aux antibiotiques

Il y a environ vingt ans, l'idée d'utiliser la résistance aux antibiotiques pour faciliter l'identification de l'origine fécale des microorganismes indicateurs germait pour les entérocoques (Kibbey *et al.*, 1978), les coliformes fécaux (Bell *et al.*, 1983) et *Escherichia coli* (Krumperman, 1983). Le mécanisme de discrimination proposé repose sur l'hypothèse que l'exposition de divers hôtes (bétail, homme ou animaux sauvages) à certains antibiotiques varie (traitements médicaux ou vétérinaires), et que la pression de sélection de ces antibiotiques sur les populations microbiennes de l'appareil gastro-intestinal aurait comme conséquence des différences mesurables au niveau des bactéries isolées dans les rejets de ces hôtes (Harwood *et al.*, 2003). Les isolats bactériens sont cultivés en présence d'un large panel d'antibiotiques à des concentrations variées. Le degré de croissance de chaque isolat est ensuite évalué et utilisé pour établir un profil de résistance. Cette démarche est largement employée car elle est rapide, peu coûteuse et repose sur des techniques simples de laboratoire. Il existe plusieurs approches différentes pour étudier la résistance aux antibiotiques (par exemple MAR : « multiple antibiotic resistance » ou ARA : « antibiotic resistance analysis »). Les méthodes MAR sont basées sur l'utilisation de nombreux antibiotiques à une seule concentration (Kaspar *et al.*, 1990), contrairement aux méthodes ARA où différentes concentrations de chaque antibiotique sont utilisées pour construire le profil de résistance (Wiggins, 1996).

Les méthodes ARA ont été largement utilisées dans les études environnementales (Parveen *et al.*, 1997; Hagedorn *et al.*, 1999; Harwood *et al.*, 2003; Graves *et al.*, 2007). Par exemple, une grande bibliothèque d'entérocoques a été établie pour l'homme, le bétail et les animaux sauvages. Cette bibliothèque a permis d'identifier le bétail comme source principale de contamination au niveau d'un bassin versant en Virginie (Hagedorn *et al.*, 1999). De la même manière, Graves *et al.* (2002) ont développé une bibliothèque contenant 1174 isolats différents d'entérocoques appartenant à 7 groupes d'hôtes. Parmi les 2012 isolats environnementaux testés, 50% ont été identifiés comme provenant du bétail, 40% provenant des animaux sauvages et 10% de l'homme. Geary et Davies (2003) ont appliqué cette même méthode lors d'une étude visant à déterminer l'origine de la pollution fécale dans une zone conchylicole australienne. Les 166 isolats testés n'ont pas permis d'identifier la source dominante de pollution.

Bien que cet outil ait fait l'objet d'une grande attention pour identifier les sources de pollution fécale, il est aujourd'hui controversé pour plusieurs raisons. Field et Samadpour (2007) soulignent que l'hypothèse de départ peut être remise en question. En effet, si les différents antibiotiques utilisés pour les hommes et les animaux d'élevage appartiennent aux mêmes classes d'antibiotiques ils induiront les mêmes mécanismes de résistance chez les bactéries entériques. De la même manière, si la faune sauvage se trouve à proximité

de zones d'élevage, ces animaux seront potentiellement exposés aux mêmes antibiotiques, notamment par le biais de la consommation de la nourriture destinée au bétail (Meays *et al.*, 2004). D'ailleurs certains auteurs (Souza *et al.*, 1999) ont constaté que les isolats bactériens d'animaux sauvages mexicains étaient aussi résistants aux antibiotiques que des isolats bactériens provenant de la population humaine. Pour de nombreux auteurs (Seurinck *et al.*, 2005b; USEPA, 2005; Field et Samadpour, 2007) le fait que les gènes de résistance soient portés par des éléments labiles, comme les plasmides ou les transposons, constitue un problème majeur. En effet, suite à de fortes pressions de sélection (exposition à certains antibiotiques, produits chimiques ou changement de conditions environnementales), ces éléments mobiles peuvent être transférés d'une souche bactérienne à une autre et ainsi modifier les profils de résistance. Ainsi, la résistance aux antibiotiques est souvent considérée comme géographiquement (Ebdon et Taylor, 2006) ou temporellement (Wiggins *et al.*, 2003) instable, nécessitant la construction de bibliothèques de références de grande taille et/ou représentative à chaque zone d'étude. A cela s'ajoute la difficulté de travailler avec des méthodes non standardisées, induisant une très grande diversité dans le choix des antibiotiques et de leurs concentrations, rendant difficile la comparaison des différentes études et de leurs résultats.

#### Profil d'utilisation du carbone

La seconde catégorie de méthodes, qualifiée de profil d'utilisation du carbone, est fondée sur des différences observées parmi les bactéries dans leur manière d'utiliser un large éventail de sources de carbone pour leur production d'énergie et leur croissance. Deux systèmes commerciaux, sous forme de plaque 96 puits, sont disponibles : Biolog et PhenePlate (Bactus). Ils permettent de vérifier simultanément la réaction métabolique des bactéries au regard d'une grande diversité de sources de carbone et de déterminer s'il y a utilisation d'un substrat (glucose, lactose, arabinose, glycérol...) ou non grâce à l'apparition de coloration. À la suite de l'inoculation d'une bactérie inconnue sur une plaque 96 puits, contenant chacun un substrat différent, un profil métabolique peut être obtenu. Par exemple, avec le système Biolog, l'utilisation des substrats par la bactérie se traduit par l'apparition dans les puits d'une couleur pourpre. Cette coloration pourpre est produite par la réduction de l'indicateur, le tétrazolium, en un composé coloré le formazan. En l'absence de l'utilisation du substrat, le puits demeure incolore. Cette méthode, largement utilisée en microbiologie clinique, a été proposée par Hagedorn *et al.* (2003) comme outil pour déterminer l'origine des pollutions fécales parce qu'elle est rapide, simple et ne nécessite pas de connaissances techniques particulières.

Hagedorn *et al.* (2003) ont mis en place une bibliothèque de profil d'utilisation du carbone référençant 365 isolats d'entérocoques d'origine humaine (105) et non humaine (260). Après prélèvement et analyses de 90 isolats inconnus par le système Biolog, les auteurs ont montré que la bibliothèque permettait l'identification des sources de pollution suspectées. Une étude utilisant le système Pheneplate (Ahmed *et al.*, 2005b) a permis de créer une grande base de données contenant 4057 entérocoques et 3728 *E. coli*. Cette bibliothèque a été utilisée avec succès et a ainsi permis d'identifier plus de 65 % des bactéries fécales présentes dans une crique australienne. Cependant, ces méthodes ne sont pas encore très utilisées et des évaluations supplémentaires sont nécessaires pour conclure sur leur potentiel dans les études de pollution (Ahmed *et al.*, 2005a).

### 3.1.2. Les analyses génétiques

Grâce aux outils de la biologie moléculaire, l'étude des isolats bactériens s'est considérablement développée et diversifiée. Les méthodes de typage génomique ont été développées dans un premier temps pour l'identification des espèces ou des sous-espèces bactériennes dans un contexte épidémiologique ou taxonomique. Récemment, il y a eu un intérêt considérable pour l'application de ces méthodes à la recherche de l'origine de la pollution fécale (Myoda *et al.*, 2003). L'utilisation de ces méthodes est basée sur l'existence de lignées bactériennes spécifiques d'un hôte au sein des espèces bactériennes. L'hypothèse initiale est donc qu'il existerait un lien entre les caractéristiques génétiques de ces lignées bactériennes et leur spécificité d'hôte (Yan et Sadowsky, 2007). L'approche technique utilisée consiste à déterminer les empreintes génétiques des lignées bactériennes après une étape d'isolement par culture. Les différentes techniques moléculaires permettant l'analyse de la structure et de l'organisation du génome entier, de gènes particuliers, ou encore d'une séquence particulière d'ADN, sont basées sur la digestion enzymatique, l'amplification de l'ADN ou sur une combinaison des deux. Quelle que soit la technique employée, les fragments d'ADN obtenus peuvent ensuite être séparés sur gel d'électrophorèse, ce qui produit un spectre de bandes pouvant être visualisées et caractérisées comme une « empreinte » génétique unique.

Les méthodes génotypiques appliquées à la recherche de l'origine de la pollution fécale sont le ribotypage (Parveen *et al.*, 1999; Carson *et al.*, 2001; Carson *et al.*, 2003; Myoda *et al.*, 2003; Samadpour *et al.*, 2005), l'amplification de séquences répétitives ou rep-PCR (Dombek *et al.*, 2000; Carson *et al.*, 2003; McLellan *et al.*, 2003; Johnson *et al.*, 2004), le polymorphisme de longueur de fragment amplifié ou AFLP (Guan *et al.*, 2002; Leung *et al.*, 2004), l'électrophorèse en champ pulsé ou PFGE (Myoda *et al.*, 2003), l'amplification aléatoire ou RADP (Venieri *et al.*, 2004) ou encore l'électrophorèse en gel dénaturant ou DGGE (Sigler et Pasutti, 2006). Plusieurs de ces méthodes peuvent être difficiles à mettre en œuvre et sont relativement coûteuses, mais leur principal avantage est un grand pouvoir discriminatoire (Yan et Sadowsky, 2007). Seules les trois méthodes les plus couramment employées dans le cadre d'études écologiques (PFGE, ribotypage et rep-PCR) sont décrites en détails.

#### Electrophorèse en champ pulse (PFGE)

L'électrophorèse en champ pulsé est le résultat de la combinaison d'une digestion par des enzymes de restriction à faible nombre de sites de coupure et d'une électrophorèse adaptée à la grande taille des produits de digestion. Le résultat est un profil de restriction de l'ensemble du génome bactérien étudié. La PFGE est considérée comme une méthode extrêmement discriminatoire et stable pour l'analyse d'un grand nombre d'espèces bactériennes telles que *E. coli*, les entérocoques, *Acinetobacter sp*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Mycobacterium avium* (Olive et Bean, 1999). Un des facteurs limitant de l'utilisation de la PFGE pour rechercher les origines de la pollution est le temps nécessaire pour accomplir une analyse (jusqu'à 3 jours). Cela rend difficile le travail avec un grand nombre d'échantillons (Olive et Bean, 1999). Certaines études écologiques ont tout de même été entreprises. Par exemple, Parveen *et al.* (2001) ont utilisé la méthode PFGE pour analyser 32 isolats d'*E. coli* provenant d'eaux d'estuaires soumis à une contamination fécale de sources variées. Les différentes sources de pollution n'ont pu être distinguées et aucune association entre les profils de PFGE et l'origine des isolats n'a été établie. Myoda *et al.* (2003) ont analysé avec la même technique des échantillons en aveugle, préalablement contaminés avec des rejets

fécaux d'origine connue (humain, eaux usées, chien, mouette, et vache). Le taux de classification correcte était de 81%, tandis que le taux de faux positifs était de 21%.

### Amplification des séquences répétitives

Le procédé connu sous le terme d'amplification de séquences répétitives (rep-PCR) permet l'amplification de nombreux fragments de tailles différentes à l'aide d'amorces consensuelles homologues des séquences répétitives non codantes du génome bactérien (Versalovic *et al.*, 1991). Les amorces utilisées avec la rep-PCR peuvent se fixer au niveau de plusieurs séquences répétitives réparties tout le long du génome. Les différents fragments amplifiés peuvent alors être séparés par électrophorèse selon leur taille. Une empreinte génétique rep-PCR est ainsi créée. Trois familles d'éléments répétitifs ont été identifiées : les séquences REP (repetitive extragenic palindromic), les séquences ERIC (enterobacterial repetitive intergenic consensus), et les séquences BOX (boîte). Ces éléments répétés sont considérés comme étant fortement conservés du point de vue de l'évolution (Versalovic *et al.*, 1991). Cette technique a été largement employée pour étudier l'origine des pollutions fécales car elle est rapide, simple et peu coûteuse. Les applications écologiques ont été principalement réalisées à l'aide des amorces spécifiques des séquences REP (Dombek *et al.*, 2000; McLellan *et al.*, 2003) et des séquences BOX (Dombek *et al.*, 2000; Carson *et al.*, 2003; Johnson *et al.*, 2004). Dombek *et al.* (2000) ont utilisé une rep-PCR ciblant la séquence BOX pour tenter de différencier la pollution fécale humaine de la pollution animale de six espèces différentes (vaches, porcs, moutons, poulets, oies et canards). Après l'analyse de 154 isolats d'*E. coli*, les auteurs ont rapporté que 100% des isolats de poulet et de vache, et que 83% des isolats humains, avaient été classés correctement. Au vu de ces résultats, ils ont confirmé que la rep-PCR était une méthode adaptée pour différencier et grouper les isolats d'*E. coli* des animaux et des humains. De la même manière, Carson *et al.* (2003) ont entrepris une étude de rep-PCR sur huit classes d'hôtes (homme, bétail, porc, cheval, chien, poulet, dinde, et oie) et ont constaté un taux de classification correcte de 88%. Ils ont conclu que la rep-PCR pouvait être considérée comme une méthode précise, reproductible, et efficace.

### Ribotypage

Le ribotypage est une méthode de détermination des empreintes génétiques qui étudie les gènes fortement conservés des ARN ribosomiaux. Le principe repose sur la combinaison de deux techniques. Dans un premier temps, le génome est digéré par une enzyme de restriction à nombreux sites de coupure (RFLP) telle que *HindIII* (Parveen *et al.*, 1999) ou une combinaison de deux enzymes telles que *EcoR1* et *PvuII*. Après séparation électrophorétique, la localisation de la séquence au niveau du gel s'effectue par hybridation avec une sonde spécifique marquée (Southern blot). La méthode est un procédé contraignant qui implique la culture et l'identification des bactéries, l'extraction d'ADN, la migration sur gel d'électrophorèse, l'hybridation moléculaire par Southern Blot et l'analyse des empreintes génétiques obtenues (Scott *et al.*, 2002). Malgré cela, le ribotypage a été un protocole très utilisé dans les études visant à déterminer l'origine de la pollution fécale (Parveen *et al.*, 1999; Carson *et al.*, 2001; Jenkins *et al.*, 2003; Scott *et al.*, 2003). Carson *et al.* (2001) ont analysé 287 isolats d'*E. coli* rassemblant des souches humaines, issues d'animaux d'élevage (bétail, porc, chevaux, volaille, et dindes), d'animaux de compagnie (chiens), et de la faune sauvage (oies) et ont correctement identifié, respectivement, 95% et 99% des isolats humains et

animaux. De même, parmi les 238 isolats d'*E.coli* examinés par Parveen *et al.* (1999), 97% et 67% d'isolats animaux et humains ont été correctement identifiés. Un inconvénient important de la technique de ribotypage est que sa capacité à distinguer les isolats de différentes origines fécales est dépendante du protocole utilisé et notamment du choix des enzymes de restriction (Field et Samadpour, 2007). Par exemple, deux protocoles sont couramment utilisés. Celui développé par Samadpour (Griffith *et al.*, 2003; Myoda *et al.*, 2003) utilisant deux enzymes de restriction (*EcoR1* et *PvuII*) et un second utilisant uniquement l'enzyme *HindIII* (Parveen *et al.*, 1999; Carson *et al.*, 2001; Moore *et al.*, 2005). Lors d'études comparatives, le premier protocole a permis une identification correcte d'échantillons en aveugle alors que le second a échoué (Myoda *et al.*, 2003; Stoeckel *et al.*, 2004; Moore *et al.*, 2005).

#### Etudes comparatives des méthodes « bibliothèque-dépendantes »

Différentes études comparatives consacrées aux méthodes « bibliothèque-dépendantes » (analyses phénotypiques et génotypiques) sont rapportées dans la littérature.

Dans une première étude, réalisée aux Etats-Unis (Harwood *et al.*, 2003; Myoda *et al.*, 2003), l'ensemble des participants disposait des mêmes échantillons d'eau artificiellement contaminés par des selles humaines, d'animaux de bétail, de chiens, d'oiseaux marins ou des eaux usées humaines. Les différents participants ont testé en aveugle la résistance aux antibiotiques, le profil d'utilisation du carbone, le ribotypage, la rep-PCR et la PFGE sur les streptocoques fécaux, les entérocoques et *E. coli*. Il ressort de cette étude que les méthodes génotypiques, et plus particulièrement le ribotypage et la PFGE, semblent donner de meilleurs résultats que les méthodes phénotypiques, mais avec un fort taux de faux résultats positifs observés.

Dans la seconde étude, consacrée à *E. coli*, les deux méthodes qui semblent être les plus intéressantes sont le ribotypage et la PFGE. Le ribotypage, réalisé avec les enzymes *EcoRI* et *Pvu II*, apparaît comme la méthode la plus exacte avec 100% de classification correcte des échantillons. Cependant, ce résultat peut être tempéré car seulement 6% des échantillons analysés ont pu être classés. La PFGE a, quant à elle, été qualifiée de méthode la plus reproductible (Stoeckel *et al.*, 2004).

La troisième étude a comparé les performances du ribotypage (enzyme *HindIII*) et de la résistance aux antibiotiques (ARA) sur des échantillons analysés en aveugle (Moore *et al.*, 2005). Seulement 28% (ARA) et 27% (ribotypage) des isolats d'*E. coli* ont pu être correctement associés à leur origine fécale. L'étude conclut qu'aucune des méthodes évaluées n'est disposée à être appliquée aux échantillons environnementaux.

Enfin, la quatrième étude (Samadpour *et al.*, 2005) compare également le ribotypage (enzyme *EcoRI* et *PvuII*) et la résistance aux antibiotiques à l'aide de 40 isolats d'*E. coli* appartenant à 7 hôtes différents. Les auteurs concluent que l'analyse phénotypique ne permet pas de distinguer les différents groupes d'hôtes contrairement à l'analyse génotypique.

### **3.1.3. Les limites des méthodes « bibliothèque-dépendantes »**

Au cours des dernières années, de nombreuses études ont mis en évidence les limites des méthodes « bibliothèque-dépendantes » et ont ainsi soulevé nombre de questions quant à leur application dans des

études environnementales. La taille et la représentativité de la bibliothèque de données sont les deux facteurs les plus importants à considérer lors du développement des méthodes « bibliothèque-dépendantes ». La question du nombre d'isolats bactériens devant figurer dans la bibliothèque, afin qu'elle soit représentative de la population bactérienne, n'a pas encore été clairement abordée (Ahmed, 2007). L'avis général est que la bibliothèque doit être à la fois assez grande et représentative de la diversité des souches trouvées au sein d'un groupe d'hôtes. Cependant, le coût et temps nécessaire à la construction des bibliothèques sont très souvent des facteurs limitatifs.

Les indicateurs bactériens principalement utilisés dans ces méthodes ont aussi été controversés en raison d'un manque de spécificité d'hôtes et d'une instabilité temporelle et géographique. Les souches bactériennes pouvant être retrouvées au sein de plusieurs groupes hôtes sont considérées comme cosmopolites (Whitlock *et al.*, 2002). De nombreux auteurs ont mis en évidence la présence de ces souches cosmopolites aussi bien pour *E. coli* (McLellan *et al.*, 2003) que pour les entérocoques (Ahmed *et al.*, 2005b). Ce manque de spécificité a souvent été attribué au manque de pouvoir discriminant des méthodes de typage utilisées. De manière générale, les méthodes phénotypiques sont souvent considérées comme plus discriminantes que les méthodes génotypiques, mais elles identifient tout de même des isolats cosmopolites (Ahmed, 2007). La stabilité temporelle et géographique des indicateurs bactériens est aussi un sujet de discussion puisque, idéalement, les méthodes mises en place pour déterminer l'origine de la pollution fécale devraient être applicables quelles que soient la saison et les zones géographiques (USEPA, 2005). A ce sujet, des résultats contradictoires ont été observés. Jenkins *et al.* (2003) suggèrent que les souches d'*E. coli* isolées au niveau d'un hôte donné ne sont pas stables au cours du temps, alors que Wiggins *et al.* (2003) et Ahmed *et al.* (2006) ont démontré une stabilité temporelle sur plus d'une année grâce à l'utilisation d'une large bibliothèque d'isolats bactériens. La variabilité géographique a également été mise en évidence pour les souches d'*E. coli* d'origine animale (Scott *et al.*, 2003) et les entérocoques (Ebdon et Taylor, 2006). Ce manque de stabilité a souvent été associé à la taille de la bibliothèque et au nombre d'isolats étudiés, considéré comme trop faible pour être représentatif des populations bactériennes.

Les résultats obtenus par les méthodes de typage sont très complexes et demandent un traitement statistique des données. La méthode la plus couramment utilisée est le taux moyen de classification correcte. Il s'agit d'une évaluation mathématique de la capacité d'une bibliothèque à classer correctement des isolats tirés de la bibliothèque. Cependant, ce mode de calcul est susceptible d'être influencé par la taille de la bibliothèque et ne constituerait donc pas un bon estimateur de la capacité d'une méthode à identifier les sources de pollution (Field, 2004). D'autres analyses multi-variées peuvent être employées mais les résultats d'une étude de Ritter *et al.* (2003) suggèrent un degré élevé de variabilité parmi les résultats obtenus avec les différentes méthodes statistiques testées.

Enfin, il semble également intéressant d'aborder la question de la culture des microorganismes avant leur détection. En effet, bien que les méthodes basées sur la culture présentent l'avantage d'être généralement peu coûteuses et d'augmenter la quantité de microorganismes ou de marqueurs d'intérêt, leur utilisation présente certains inconvénients. Tout d'abord, les recherches se limitent aux microorganismes fécaux facilement cultivables. Pourtant, il est connu que les bactéries cultivables ne représentent qu'une faible proportion de la population bactérienne totale des selles. De plus, il semblerait que la composition des communautés microbiennes soit influencée voire même modifiée par les cultures de laboratoire. Ce biais éventuel n'est que très rarement pris en compte dans les études environnementales liées à la pollution

fécale, mais peut pourtant avoir une influence importante, notamment dans le cas de l'utilisation de méthodes quantitatives (Field et Samadpour, 2007).

### 3.2. Les méthodes « bibliothèque-indépendantes »

Dans une revue récente, il apparaît incontestable pour Santo Domingo *et al.* (2007) que les recherches actuelles s'orientent préférentiellement vers l'utilisation de méthodes « bibliothèque-indépendantes » basées sur la recherche de spécificités d'hôtes par les méthodes de biologie moléculaire, et plus particulièrement les techniques de PCR. La culture des microorganismes n'est généralement pas nécessaire, mais elle peut l'être dans certains cas pour accroître le nombre d'individus porteurs du marqueur d'intérêt. Ces méthodes de détection présentent l'avantage d'être quantitatives, assez rapides et potentiellement très sensibles. De plus, elles offrent l'opportunité de pouvoir réaliser des détections multiples, simultanées ou non, à partir d'un même échantillon d'acides nucléiques et ainsi évaluer la population microbienne dans son ensemble (Field et Samadpour, 2007). Les différentes techniques développées dans le cadre d'une application environnementale ciblent aussi bien des bactéries que des virus et ont toutes en commun la mise en évidence de marqueurs spécifiques d'une catégorie d'hôtes.

#### 3.2.1. Les méthodes bactériennes

##### Gènes de bactéries anaérobies

La nécessité de maintenir des conditions anoxiques pour la culture et l'identification des bactéries anaérobies (genres *Bacteroides* et *Bifidobacterium*) a souvent limité leur utilisation comme indicateur de pollution fécale malgré une forte abondance dans les selles, parfois même plus importante que les bactéries coliformes ou les entérocoques (Sghir *et al.*, 2000). Le principal avantage de ces microorganismes réside dans le fait qu'ils sont incapables de se multiplier dans l'environnement en raison de leurs strictes conditions de croissance. Ainsi, ils ne survivent que sur de très courtes périodes de temps, faisant d'eux principalement des indicateurs de contamination récente. Cependant, le développement des outils de biologie moléculaire ont permis de surmonter l'obstacle lié à leur mode de croissance. De nombreuses PCR ont été développées pour identifier les bactéries appartenant au phylum *Bacteroidetes*. Celles-ci permettent, notamment, d'identifier les rejets de ruminants, de chiens, de chevaux, de cochons et de l'homme. Les deux principaux marqueurs utilisés sont les gènes codant pour l'ARN de la petite sous-unité ribosomale (Bernhard et Field, 2000) et pour les protéines de surface (Shanks *et al.*, 2006; Shanks *et al.*, 2007). Il a été montré que ces deux marqueurs persistaient assez longtemps pour être détectables dans les eaux. De plus, il semble que cette méthode présente une bonne stabilité géographique puisque elle a déjà été utilisée aux Etats-Unis et au Canada (Shanks *et al.*, 2006; Lamendella *et al.*, 2007; Walters *et al.*, 2007), en Europe (Seurinck *et al.*, 2005a; Reischer *et al.*, 2006; Reischer *et al.*, 2007), au Japon (Okabe *et al.*, 2007) et en Nouvelle Zélande (Gilpin *et al.*, 2003). Cependant, les marqueurs recherchés semblent présenter un manque de spécificité, notamment pour les animaux sauvages. De plus, un transfert horizontal de gènes entre les bactéries fécales n'est pas exclu, nécessitant de tester la spécificité. Des approches similaires ont été employées pour les bactéries du genre *Bifidobacterium* (Bonjoch *et al.*, 2004). Cependant, lors d'une étude comparative européenne, la détection moléculaire de *Bifidobacterium dentium* et *Bifidobacterium adolescentis* n'a pas été



concluante pour identifier l'origine des échantillons (Blanch *et al.*, 2006). Pourtant, dans cette même étude, le dénombrement des bifidobactéries fermentant le sorbitol, par une méthode classique de culture sur milieu sélectif s'est révélé être un bon indicateur de pollution humaine.

### Gènes de toxines bactériennes

Une autre approche consiste à rechercher les gènes de toxines de bactéries entériques responsables de troubles gastro-intestinaux. Ces souches sont associées au système digestif d'une grande diversité d'hôtes humains et animaux. Les cibles étudiées chez les *E. coli* pathogènes sont les gènes codant pour la toxine ST1b, spécifique de l'homme, la toxine ST1b spécifique des porcins (Khatib *et al.*, 2003) et la toxine LT11a spécifique des bovins (Khatib *et al.*, 2002). De la même manière, pour les entérocoques, une protéine de surface correspondante à un facteur de virulence chez *Enterococcus faecium*, est la cible d'une PCR spécifique des déchets humains. A titre d'exemple, ce marqueur a été identifié dans 97% des échantillons d'eaux usées humaines aux Etats-Unis, mais jamais dans des échantillons provenant d'animaux d'élevage ou d'oiseaux (Scott *et al.*, 2005). Pourtant, très récemment, il a été suggéré que la présence de ce gène dans l'environnement ne soit pas limitée à des contaminants fécaux d'origine humaine, ce qui pourrait affaiblir son utilisation comme outil de discrimination des sources fécales (Byappanahalli *et al.*, 2008). De plus, ces marqueurs, bien que spécifiques et géographiquement stables, sont parfois présents en trop faible quantité dans l'environnement pour être mis en évidence. Pour obtenir un signal à partir de 100mL d'eau, il est donc parfois nécessaire de procéder à une étape préliminaire de culture (Scott *et al.*, 2005), ou de réaliser la détection par nested-PCR. Il est également envisageable d'augmenter le volume de l'échantillon à analyser. Comme la plupart des méthodes ciblant les gènes bactériens, celle-ci est également sensible aux possibles transferts horizontaux de gènes entre bactéries. Ce phénomène a déjà été suspecté chez les entérocoques et chez *E. coli* (Field *et al.*, 2003) lors d'applications environnementales de ces méthodes de PCR.

### **3.2.2. Les méthodes virales**

#### Bactériophages

Les bactériophages ARN F-spécifiques sont considérés comme les phages les plus largement étudiés et les mieux caractérisés pour une utilisation dans des études de détermination de l'origine des pollutions fécales (Scott *et al.*, 2002). Toutefois, les phages de bactéries appartenant au genre *Bacteroides* ont également été largement étudiés comme outil de discrimination (Tartera *et al.*, 1989; Grabow *et al.*, 1995; Puig *et al.*, 1999). Ainsi, il a été montré que la souche *Bacteroides fragilis* HSP40, proposée comme traceur de la pollution humaine, permettait de détecter un grand nombre de phages dans les régions méditerranéennes et en Afrique du Sud, mais pas en Europe du nord ni aux Etats-Unis. De la même manière, la souche *Bacteroides fragilis* RYC2056 permet la détection de phages en quantité similaire, quelle que soit la région géographique, mais elle n'est pas apte à d'identifier les sources de pollution. Par comparaison aux deux précédentes, la souche isolée par Payan *et al.* (2005), nommée GA-17 et identifiée comme *Bacteroides thetaiotaomicron*, semble être un outil intéressant pour la recherche des phages. D'ailleurs, au cours d'une étude comparative réalisée en Europe, les phages responsables d'infection chez

*Bacteroides thetaiotaomicron* ont été qualifiés de bons indicateurs potentiels, tout comme certains génogroupes de bactériophages ARN F-spécifiques.

En effet, pour les phages ARN F-spécifiques, il a été observé que les selles humaines et animales contenaient spécifiquement certains séro ou géno-groupes (Osawa *et al.*, 1981; Havelaar *et al.*, 1986; Havelaar *et al.*, 1990). La majorité des données disponibles concernant la répartition des quatre groupes dans les selles a été synthétisée dans le Tableau 14, en fonction des espèces et de la méthode de typage utilisée.

**Tableau 14. Distribution des quatre séro ou géno-groupes dans des selles humaines et animales.**

| Espèces  | Méthode de typage | Nombre d'échantillons | Pourcentage d'échantillons positifs |              |              |              |                               | Références                    |
|--|-------------------|-----------------------|-------------------------------------|--------------|--------------|--------------|-------------------------------|-------------------------------|
|  |                   |                       | GG I                                | GG II        | GG III       | GG IV        | Autre*                        |                               |
| <b>Homme</b>                                       |                   |                       |                                     |              |              |              |                               |                               |
|  | Sérotypage        | n = 18                |                                     | 50%          | 38,9%        | 11,1%        | Osawa <i>et al.</i> , 1981    |                               |
|  |                   | n = 6                 |                                     |              |              | 100%         | Havelaar <i>et al.</i> , 1990 |                               |
|  | Hybridation       | n = 20                |                                     | 90%          | 10%          |              | Schaper <i>et al.</i> , 2002b |                               |
| <b>Ensemble des échantillons d'origine humaine</b> |                   |                       | <b>0%</b>                           | <b>61,4%</b> | <b>20,4%</b> | <b>18,2%</b> |                               |                               |
| <b>Animaux</b>                                     |                   |                       |                                     |              |              |              |                               |                               |
| • Vache  | Sérotypage        | n = 4                 | 100%                                |              |              |              | Osawa <i>et al.</i> , 1981    |                               |
|  |                   | n = 18                |                                     |              |              | 100%         | Havelaar <i>et al.</i> , 1986 |                               |
|  |                   | n = 5                 | 100%                                |              |              |              | Havelaar <i>et al.</i> , 1990 |                               |
|  | Hybridation       | n = 11                | 36,4%                               | 18,2%        |              | 36,4%        | 9,1%                          | Cole <i>et al.</i> , 2003     |
|  |                   | n = 3                 |                                     | 33,3%        |              | 33,3%        | 33,3%                         | Long <i>et al.</i> , 2005     |
|  |                   | n = 90                | 100%                                |              |              |              |                               | Schaper <i>et al.</i> , 2002b |
| • Porc   | Sérotypage        | n = 11                | 36,4%                               | 54,5%        |              | 9,1%         | Osawa <i>et al.</i> , 1981    |                               |
|  |                   | n = 25                | 56%                                 |              |              | 44%          | Havelaar <i>et al.</i> , 1986 |                               |
|  |                   | n = 78                | 43,6%                               | 1,3%         |              | 55,1%        | Havelaar <i>et al.</i> , 1990 |                               |
|  | Hybridation       | n = 29                |                                     | 58,6%        |              | 41,4%        |                               | Hsu <i>et al.</i> , 1995      |
|  |                   | n = 64                | 53%                                 | 28%          |              | 19%          |                               | Schaper <i>et al.</i> , 2002b |
|  |                   | n = 157               | 2,5%                                | 0,7%         |              | 96,8%        |                               |                               |
| • Moutons  | Sérotypage        | n = 20                | 50%                                 |              |              | 50%          | Havelaar <i>et al.</i> , 1986 |                               |
| • Cheval   | Sérotypage        | n = 1                 | 100%                                |              |              |              | Osawa <i>et al.</i> , 1981    |                               |
| • Volailles :<br>poulet,<br>oie,<br>canard         | Sérotypage        | n = 22                | 59,1%                               |              |              | 40,9%        | Havelaar <i>et al.</i> , 1986 |                               |
|  |                   | n = 89                | 62,9%                               |              |              | 37,1%        | Havelaar <i>et al.</i> , 1990 |                               |
|  |                   | n = 3                 | 100%                                |              |              |              | Cole <i>et al.</i> , 2003     |                               |
|  |                   | n = 5                 | 100%                                |              |              |              | Long <i>et al.</i> , 2005     |                               |
|  |                   | n = 9                 | 37%                                 |              |              | 63%          |                               |                               |
|  | Hybridation       | n = 62                | 48,4%                               |              |              | 51,6%        |                               | Hsu <i>et al.</i> , 1995      |
|  |                   | n = 1                 | 100%                                |              |              |              |                               |                               |
|  |                   | n = 46                | 80%                                 |              |              | 20%          |                               | Schaper <i>et al.</i> , 2002b |
|  |                   | n = 350               | 71,8%                               | 7%           | 0,8%         | 20,4%        |                               |                               |
| • Oiseaux<br>marins                                | Sérotypage        | n = 24                | 4,2%                                |              |              | 95,8%        | Cole <i>et al.</i> , 2003     |                               |
|  |                   | n = 50                | 54%                                 |              |              | 46%          | Long <i>et al.</i> , 2005     |                               |
| <b>Ensemble des échantillons d'origine animale</b> |                   |                       | <b>52,6%</b>                        | <b>5,7%</b>  | <b>0,2%</b>  | <b>41,3%</b> | <b>0,2%</b>                   |                               |

\*Autre : résultats ambigus ou non exploitables, GG : génogroupe

Dans le Tableau 14, les données bibliographiques concernant la répartition des séro ou géno-groupes ont été reportées en fonction de la méthode de typage. Toutefois, d'après les résultats rapportés

précédemment, il semble raisonnable d'analyser et d'interpréter les résultats dans leur ensemble car moins de 15% de discordance a été observée entre les deux méthodes de typage. Ainsi seul le terme « génogroupe » sera dorénavant employé. Ces données sont également regroupées sans aucune distinction géographique. En effet, dans une étude comparative, Schaper *et al.* (2002b) n'observent pas de différence de répartition des génogroupes selon la région de prélèvements des échantillons (Espagne ou Afrique du Sud). Cette observation a été confirmée lors d'essais inter-laboratoires réalisés au niveau européen (Blanch *et al.*, 2004). De plus, dans le contexte des études écologiques, il est préférable que les outils développés ne soient pas sujet à de telles variations.

Seules trois études rapportent des résultats de génotypage à partir d'échantillons de selles humaines. Sur les 44 échantillons regroupés, les génogroupes II (61,4%) et III (20,5%) sont majoritairement isolés dans ce type de selles. Le génogroupe IV est également mis en évidence dans 18,2% des échantillons. Cependant, il est important de préciser que cette observation résulte principalement de l'étude menée par Havelaar *et al.* (1990) où uniquement le génogroupe IV est mis en évidence.

Pour les selles animales, environ 1300 échantillons ont été regroupés à partir de 7 études différentes. Il en ressort que les génogroupes I et IV ont été isolés dans, respectivement, 52,6% et 41,3% des échantillons. A eux deux, ces génogroupes représentent environ 94% de la population de bactériophages ARN F-spécifiques mis en évidence. Le génogroupe II représente 6% des phages isolés. Toutefois, ce chiffre peut aisément être attribué aux études menées sur les rejets de porc, dans lesquels le génogroupe II représente plus de 11% de la population. La présence de ce génogroupe dans les rejets porcins, alors qu'il semble être majoritairement d'origine humaine, a souvent été expliqué par des ressemblances au niveau de la flore du système gastro-intestinal (Hsu *et al.*, 1995; Schaper *et al.*, 2002b; Cole *et al.*, 2003). Notons également, à titre d'information complémentaire, qu'il n'est pas possible de distinguer les différentes espèces animales car il n'existe pas d'association particulière entre un groupe d'animaux (bovins, porcins, oiseaux...) et un génogroupe donné.

Ainsi, au vu de ces résultats, il est aujourd'hui largement admis que les génogroupes II et III seraient principalement d'origine humaine, contrairement aux génogroupes I et IV qui seraient préférentiellement associés aux rejets animaux, sans toutefois présenter de séparation stricte entre les espèces. Ces conclusions ont été obtenues à l'aide des méthodes de sérotypage et d'hybridation. Jusqu'alors, aucune étude n'a été entreprise sur des échantillons fécaux à partir des nouvelles méthodes de biologie moléculaire.

Suite à ces observations, de nombreuses études portant sur la distribution des quatre génogroupes dans les eaux usées ont été menées. La synthèse, présentée dans le Tableau 15, illustre les résultats obtenus lors de dix études consacrées à la répartition des différents génogroupes dans des eaux usées d'origine connues. La prévalence des différents génogroupes dans ce type de milieu reste identique à celle observée dans des échantillons fécaux. En effet, les génogroupes II (38,7%) et III (46,0%) sont majoritairement isolés à partir d'eaux usées d'origine humaine, contrairement aux génogroupes I (59,8%) et IV (27,5%) principalement présents au niveau d'eaux contaminées par des rejets animaux. Toutefois, dans des eaux contaminées par des rejets humains, une part non négligeable de phage appartenant au génogroupe I (13,3%) est souvent mise en évidence.

Tableau 15. Distribution des quatre génogroupes dans les eaux usées brutes d'origine connue.

| Origine   | Méthode de typage | Nombre d'isolats | Pourcentage d'échantillons positifs |              |              |                                      |             | Références                           |
|---|-------------------|------------------|-------------------------------------|--------------|--------------|--------------------------------------|-------------|--------------------------------------|
|   |                   |                  | GG I                                | GG II        | GG III       | GG IV                                | Autre*      |                                      |
| Stations d'épuration                            | Sérotypage        | n = 56           | 1,9%                                | 7,7%         | 88,5%        | 1,9%                                 |             | Furuse <i>et al.</i> , 1978          |
|   |                   | n = 1832         | 12,1%                               | 26,6%        | 61,2%        | 0,1%                                 |             | Furuse <i>et al.</i> , 1981          |
|   |                   | n = 278          | 0,4%                                | 44,6%        | 55,0%        |                                      |             |                                      |
|   | Hybridation       | n = 27           | 3,7%                                | 51,9%        | 18,5%        |                                      | 25,9%       | Cole <i>et al.</i> , 2003            |
|   |                   | n = 69           | 23,2%                               | 10,1%        | 56,6%        |                                      | 10,1%       | Brion <i>et al.</i> , 2002           |
|   |                   | n = 70           | 51,4%                               | 45,7%        | 2,9%         |                                      |             | Schaper <i>et al.</i> , 2002b        |
|   |                   | n = 50           | 28,0%                               | 72,0%        |              |                                      |             |                                      |
|   |                   | n = 165          | 29,1%                               | 69,7%        | 1,2%         |                                      |             |                                      |
|   |                   | n = 559          | 33,1%                               | 42,9%        | 22%          | 2,0%                                 |             |                                      |
|   |                   | n = 390          | 31,0%                               | 42,1%        | 23,8%        | 3,1%                                 |             |                                      |
|   |                   | n = 1985         | 11,6%                               | 43,9%        | 41,9%        | 2,6%                                 |             |                                      |
|   |                   | n = 538          | 2,2%                                | 61,5%        | 34,6%        | 1,7%                                 |             |                                      |
|   |                   | n = 451          | 4,9%                                | 37,7%        | 52,5%        | 4,9%                                 |             |                                      |
|   |                   | n = 527          | 27,1%                               | 40,0%        | 30,2%        | 2,7%                                 |             |                                      |
|   |                   | n = 26           | 7,7%                                | 46,2%        | 23,1%        | 3,8%                                 | 19,2%       | Long <i>et al.</i> , 2005            |
| n = 133   | 10,5%             | 14,3%            | 72,9%                               |              | 2,3%         | Stewart-Pullaro <i>et al.</i> , 2006 |             |                                      |
| n = 10  |                   |                  | 70%                                 |              | 30%          | Hsu <i>et al.</i> , 1995             |             |                                      |
| n = 12  |                   |                  | 83,3%                               |              | 16,7%        |                                      |             |                                      |
| Hôpitaux  | Sérotypage        | n = 19           |                                     | 68,4%        | 31,6%        |                                      |             | Havelaar <i>et al.</i> , 1986        |
|   |                   | n = 26           | 19,2%                               | 42,3%        | 7,7%         | 30,8%                                |             | Havelaar <i>et al.</i> , 1990        |
|   | Hybridation       | n = 110          | 6,3%                                | 27,3%        | 66,4%        |                                      |             | Schaper <i>et al.</i> , 2002b        |
|   |                   | n = 374          | 5,9%                                | 42,0%        | 52,1%        |                                      |             |                                      |
| Mixte   |                   | n = 1244         | 7,9%                                | 30,6%        | 60,1%        |                                      |             |                                      |
|   |                   | n = 71           | 7%                                  | 40%          | 48%          | 5%                                   |             | Blanch <i>et al.</i> , 2004          |
| <b>Total des échantillons d'origine humaine</b> |                   |                  | <b>13,3%</b>                        | <b>38,5%</b> | <b>46,2%</b> | <b>1,7%</b>                          | <b>0,3%</b> |                                      |
| Abattoirs                                       |                   |                  |                                     |              |              |                                      |             |                                      |
| Bovins  | Sérotypage        | n = 17           | 23,5%                               |              |              | 76,5%                                |             | Havelaar <i>et al.</i> , 1990        |
|   |                   | n = 49           | 77,6%                               |              | 6,1%         | 16,3%                                |             |                                      |
| Volailles                                       |                   | n = 39           | 56,4%                               | 2,6%         | 5,1%         | 35,9%                                |             |                                      |
| Bovins  | Hybridation       | n = 95           | 100%                                |              |              |                                      |             | Schaper <i>et al.</i> , 2002b        |
|   |                   | n = 629          | 75,0%                               | 1,6%         | 18,4%        | 5,0%                                 |             |                                      |
| Volaille  |                   | n = 917          | 18,2%                               | 0,6%         | 9,2%         | 72,0%                                |             |                                      |
| Mixte   |                   | n = 52           | 98,1%                               | 1,9%         |              |                                      |             |                                      |
|   |                   | n = 802          | 86,5%                               | 6,9%         | 2,5%         | 4,1%                                 |             |                                      |
| n = 71  |                   |                  | 34%                                 | 12%          | 28%          | 26%                                  |             | Blanch <i>et al.</i> , 2004          |
| Elevages  |                   |                  |                                     |              |              |                                      |             |                                      |
| Porcins   | Sérotypage        | n = 57           | 52,6%                               | 5,3%         | 24,6%        | 17,5%                                |             | Cole <i>et al.</i> , 2003            |
|   |                   | n = 66           | 48,5%                               | 1,5%         | 27,3%        | 4,5%                                 | 18,2%       | Long <i>et al.</i> , 2005            |
| Bovins  | Hybridation       | n = 53           | 69,8%                               |              | 18,8%        | 5,7%                                 | 5,7%        | Stewart-Pullaro <i>et al.</i> , 2006 |
|   |                   | n = 43           | 100%                                |              |              |                                      |             | Long <i>et al.</i> , 2005            |
| <b>Total des échantillons d'origine animale</b> |                   |                  | <b>59,1%</b>                        | <b>2,9%</b>  | <b>9,9%</b>  | <b>27,5%</b>                         | <b>0,5%</b> |                                      |

\*Autre : résultats ambigus ou non exploitables, GG : génogroupe

A l'heure actuelle, seules les méthodes de typage nécessitant une étape de culture préalable ont fait l'objet d'études comparatives (Noble *et al.*, 2003; Blanch *et al.*, 2006). Dans une étude inter-laboratoire européenne, il a été montré que la distribution des génogroupes I, II et IV était significativement différente entre des échantillons d'eaux usées d'origine humaine et d'origine animale (Blanch *et al.*, 2004; Blanch *et al.*, 2006). Cependant, malgré une plus forte abondance dans les échantillons d'origine humaine, le pourcentage de génogroupe III, présent dans les deux types d'échantillons, n'était pas significativement

différent. Ainsi, la différence entre les deux sources de pollution possibles serait principalement mise en évidence par le génogroupe II. Après analyse des données (n=225), il apparaît que l'utilisation du génotypage des phages ARN F-spécifiques a permis d'identifier correctement respectivement, 85% et 98% des échantillons d'origine humaine et non humaine. La seconde étude consistait à analyser des échantillons d'eau de surface artificiellement contaminés soit par des eaux usées urbaines, soit par des selles issues d'individus (Noble *et al.*, 2003). L'ensemble des échantillons contenant de l'eau usée ont correctement été identifiés (4/4), ce qui n'est pas le cas des échantillons contenant des selles humaines (1/4). Ainsi les auteurs concluent que ce groupe de phages serait un meilleur traceur des rejets issus des populations humaines que des rejets individuels.

Deux inconvénients sont souvent mis en évidence quant à l'utilisation de cette méthode de typage pour identifier l'origine de la pollution fécale. Tout d'abord, certains auteurs considèrent cette méthode limitée car elle permet uniquement de distinguer une pollution humaine d'une pollution animale, sans distinction possible entre les espèces animales (Field et Samadpour, 2007). Ensuite, plusieurs études ont montré que le temps de survie des bactériophages ARN F-spécifiques pouvait être différent selon le génogroupe (Brion *et al.*, 2002; Schaper *et al.*, 2002a). Dans une étude réalisée sur de l'eau de surface artificiellement contaminée, Long et Sobsey (2004) ont décrit que les phages du génogroupe I montraient la meilleure survie, suivis par ceux du génogroupe II. Les phages appartenant aux génogroupes III et IV montraient une survie similaire, mais plus faible en comparaison avec les autres génogroupes. Pour les auteurs, ces résultats suggèrent que ces différences de survie influencent leur prévalence dans les eaux environnementales et induisent donc un biais dans l'attribution de l'origine de la pollution. Très récemment, ce phénomène a été évalué lors d'expérimentations *in situ* réalisées dans de l'eau de mer et de l'eau douce (Muniesa *et al.*, 2009). Les conclusions sont similaires aux études précédentes et confirment la meilleure persistance des génogroupes I et II par rapport aux deux autres. Dans une autre étude réalisée à partir d'eau de mer artificiellement contaminée, Kirs et Smith (2007) montrent que les phages du génogroupe IV présentent une inactivation plus rapide que les trois autres génogroupes. Aucune différence de survie n'est observée entre les phages appartenant aux génogroupes I, II et III. De plus, il est également démontré que lorsque l'on s'intéresse au génome viral, aucune différence de persistance de l'ARN n'est observée en fonction du génogroupe viral. Cette observation montre qu'il serait intéressant d'évaluer les nouvelles méthodes de typage utilisant les outils de biologie moléculaire, lesquelles sont actuellement en train de remplacer les méthodes de détection basées sur l'utilisation de la culture (Field et Samadpour, 2007).

### Virus pathogènes

Metcalf *et al.* (1995) sont parmi les premiers chercheurs à suggérer que la recherche de virus pathogènes spécifiques d'un groupe d'hôtes dans les échantillons environnementaux pourraient permettre de déterminer l'origine d'une pollution fécale et ainsi améliorer la surveillance de la qualité des eaux.

Les virus entériques sont présents en forte concentration au niveau des selles humaines et animales des individus présentant des symptômes cliniques, mais également en plus faible quantité au niveau des selles et parfois des urines des porteurs sains. Comme décrit plus en détails dans le chapitre précédent, au sein d'une même famille sont retrouvés aussi bien des virus capables d'infecter l'homme que des virus

responsables de pathologie chez les animaux. Cependant, dans la plupart des cas, un virus donné présente un spectre d'hôtes très étroit et n'est capable d'infecter spécifiquement qu'une seule catégorie d'hôtes. A titre d'exemple, l'ensemble des virus décrit au sein de la famille des *Adenoviridae* sont capables d'infecter de nombreuses espèces animales. Ainsi, dans cette famille, 51 sérotypes humains, 5 porcins, 10 bovins, 7 ovins, 2 canins, 2 équins plus d'autres souches spécifiques des oiseaux et des amphibiens sont actuellement décrits.

Les différentes études décrivant l'utilisation des virus pathogènes pour identifier l'origine des pollutions fécales se sont principalement intéressées aux adénovirus, aux entérovirus, aux polyomavirus (Ley *et al.*, 2002; Maluquer de Motes *et al.*, 2004; Fong *et al.*, 2005; Jimenez-Clavero *et al.*, 2005; Hundesa *et al.*, 2006) et aux teschovirus (Jimenez-Clavero *et al.*, 2003). Au sein des adénovirus, les PCR décrites sont spécifiques soit des humains, des bovins, des porcins ou des ovins. Les teschovirus semblent spécifiques des porcins alors que les polyomavirus et les entérovirus sont généralement utilisés pour identifier des contaminations humaines ou engendrées par des bovins. En règle générale, l'ensemble de ces études montrent une grande spécificité des systèmes de détection développés. Toutefois, Jimenez-Clavero *et al.* (2005) montrent que les PCR ciblant les entérovirus bovins permettent également d'observer des entérovirus chez les cerfs, les moutons, les chevaux et les chèvres. Grâce à l'analyse des séquences, une très grande hétérogénéité a pu être mise en évidence et les auteurs suggèrent l'existence de nombreux variants, laissant ainsi supposer que les systèmes de PCR utilisés permettraient plutôt d'identifier une contamination globale d'origine animale. Pour Hundesa *et al.* (2006), il serait préférable de travailler avec les adénovirus et les polyomavirus, notamment en raison de leur forte prévalence dans les eaux, et ce sans distinction géographique.

Jusqu'à alors, ces méthodes n'ont pas fait l'objet de beaucoup d'études à grande échelle (Field et Samadpour, 2007). Seule une étude menée par Noble *et al.* (2003) compare la pertinence des méthodes de détection et de typage des adénovirus, des entérovirus et des phages ARN F-spécifiques dans des échantillons environnementaux analysés en aveugle. Les résultats obtenus avec les virus pathogènes sont similaires à ceux décrits pour les phages ARN F-spécifiques. En effet, aussi bien la recherche des adénovirus que celle des entérovirus permet d'identifier correctement des eaux artificiellement contaminées par des eaux usées humaines, mais échouent plus fréquemment lors de l'analyse d'échantillons contaminés par des selles. Pour Field et Samadpour (2007), ces méthodes sont particulièrement intéressantes car la plupart d'entre elles permettent également de renseigner directement sur la présence de virus pathogènes pour l'homme.

\*\*\*\*\*

*En résumé, la plupart des méthodes décrites précédemment ont toutes permis d'identifier avec plus ou moins de succès l'origine de pollution fécale observée dans des eaux, mais cela s'est très souvent limité à des études ponctuelle, aussi bien géographiquement que temporellement. De plus, si l'on se base sur les critères et les différentes étapes définis par Field et Samadpour (2007) pour valider une méthode, il en ressort que la plupart des méthodes exposées ne sont encore qu'à un stade expérimental, puisque très peu de tests de comparaison de méthodes et de tests sur des échantillons analysés en aveugle ont été réalisés.*

Actuellement, seules deux études à grande échelle, basées sur la réalisation de ces tests, sont rapportées dans la littérature. Une a été entreprise aux Etats-Unis (Field et al., 2003; Griffith et al., 2003; Harwood et al., 2003; Myoda et al., 2003; Noble et al., 2003) et la seconde a été réalisée au niveau européen (Blanch et al., 2004; Blanch et al., 2006).

Incontestablement, il ressort de ces études qu'aucune des méthodes évaluées ne permet d'identifier parfaitement l'origine des contaminations fécales. Plus précisément, les méthodes « bibliothèque-dépendantes » identifient correctement la source majeure de pollution, mais présentent généralement un fort taux de faux positifs. Au sein de cette catégorie de méthodes, il semblerait que les analyses génétiques donnent de meilleurs résultats que les analyses phénotypiques. Globalement, sur l'ensemble des méthodes expérimentées, les techniques de PCR ciblant des marqueurs spécifiques d'un hôte ou d'une catégorie d'hôtes semblent se distinguer des autres techniques de la « boîte à outils ». En effet, d'après l'étude américaine, ce sont elles qui ont le mieux réussi à différencier les contaminations humaines des contaminations non humaines. Toutefois, les systèmes de PCR disponibles aujourd'hui ne permettent pas encore de distinguer les différentes sources de pollution animales (bétail, animaux domestiques ou animaux sauvages), en raison notamment du manque de séquences disponibles. Au sein des méthodes visant une spécificité d'hôte, les marqueurs virologiques apparaissent comme de bons indicateurs des rejets d'une population vue d'en son ensemble et non d'individus isolés. Cependant les problèmes liés à la qualité des eaux résultent principalement d'une contamination fécale globale. L'étude européenne a également permis de mettre en avant les marqueurs virologiques et plus particulièrement les bactériophages. En effet, parmi les meilleurs outils de discrimination mis en évidence on retrouve les phages infectant *Bacteroides thetaiotaomicron* et certains génogroupes des bactériophages ARN F-spécifiques.





## *Partie II : Matériels et Méthodes*



## 1. VIRUS

Au cours de notre étude, quatre bactériophages et deux virus entériques pathogènes ont été utilisés comme virus modèles. Pour les bactériophages, nous avons choisi un représentant de chacun des génogroupes des phages ARN F-spécifiques, à savoir le phage MS2 (GGI), le phage GA (GGII), le phage Q $\beta$  (GGIII) et le phage SP (GGIV), appartenant tous à la famille des *Leviviridae*. Le phage MS2 est une souche référencée (ATCC 15597-B1) alors que les phages GA, Q $\beta$  et SP nous ont été fournis par le professeur J. Jofre (Université de Barcelone) et Y. Inokuchi (Université de Tokyo). Concernant les virus pathogènes, un adénovirus et un norovirus sont utilisés comme virus modèles. L'adénovirus 2 (NCPV#213) est issu de la collection nationale anglaise de virus pathogènes (Health Protection Agency Culture Collection, Grande Bretagne). Le norovirus modèle utilisé, isolé à partir d'un échantillon de selle, appartient au génogroupe II, génotype 4 (Grimsby, V548) et nous a été fourni par l'unité de virologie environnementale de l'Health Protection Agency (Grande-Bretagne).

## 2. METHODES DE CONCENTRATION DES VIRUS A PARTIR DES EAUX

Le but de la concentration est d'obtenir sous un très faible volume, les virus présents dans les échantillons d'eau à analyser. Dans cette étude, deux méthodes de concentration ont été employées selon les conditions expérimentales. Toutes deux reposent sur le principe d'adsorption-élution des virus à un support filtrant contenu à l'intérieur d'une cartouche en acier inoxydable (Sartorius, réf. SM 16 249). Il s'agit d'adsorber les particules virales présentes dans l'eau sur un support chargé. L'adsorption se fait par l'intermédiaire des charges électrostatiques présentes à la fois à la surface des particules virales et à la surface du support. L'élution des virus, sous un faible volume, est réalisée à l'aide d'un tampon alcalin. La première méthode employée nécessite un support en laine de verre, alors que dans la seconde, une membrane électropositive est utilisée.

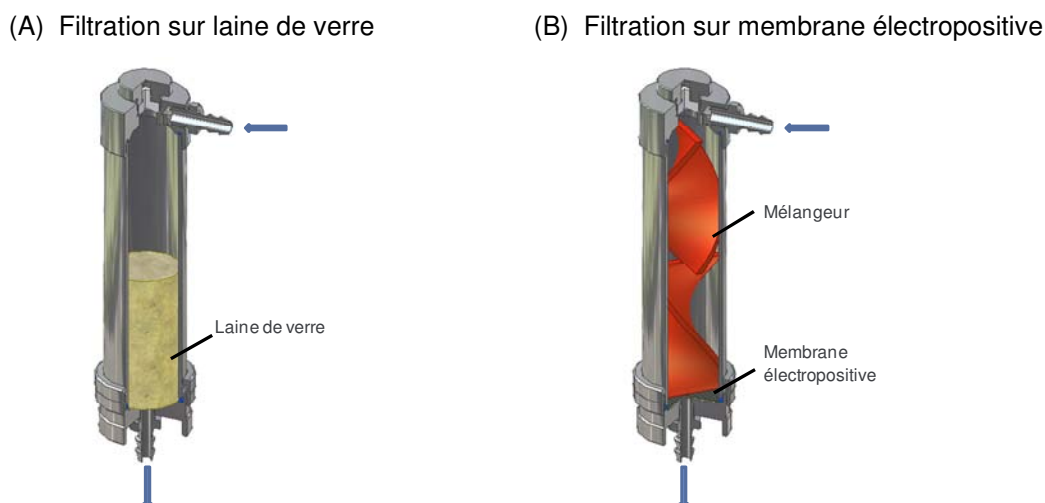
### 2.1. Adsorption-élution sur laine de verre

La technique d'adsorption-élution sur laine de verre fait l'objet d'une norme expérimentale (AFNOR-XPT90-451, 1996) décrivant les conditions de concentration des entérovirus à partir des eaux. Dans notre étude, plusieurs modifications ont été apportées par rapport au protocole original.

D'un point de vue pratique, 10g (au lieu de 50g) de laine de verre sodocalcique sont introduits et compactés dans la cartouche (Figure 11). Dans un second temps, la laine de verre est traitée séquentiellement par 50mL d'HCl 1M, 50mL d'eau déminéralisée, 50mL de NaOH 1M et 1 000mL d'eau déminéralisée. Ce traitement a pour effet d'éliminer la silice colloïdale susceptible d'être toxique pour les cultures cellulaires et de stériliser la laine de verre. Dans un troisième temps, contrairement à la norme, l'eau à analyser est préalablement acidifiée à un pH de 3,5 à l'aide d'une solution d'acide chlorhydrique 1M. L'eau est ensuite filtrée à travers la laine de verre. Après filtration de la totalité de l'échantillon, l'élution des particules adsorbées est pratiquée à l'aide de 200mL d'une solution éluante stérile à pH 9,5 (glycine 0,05M,

3% d'extrait de bœuf (Sigma, réf. B-4888)). Les 200mL d'éluat recueillis dans un flacon stérile sont immédiatement neutralisés à pH 7,2, constituant ainsi le concentrat primaire.

Ce concentrat primaire est acidifié jusqu'à un pH compris entre 3 et 3,5 à l'aide d'une solution d'acide chlorhydrique 1M, de manière à faire précipiter les protéines. Cette solution est alors soumise à une seconde concentration par centrifugation 45 minutes à 3 500g. Finalement, le culot obtenu est repris dans 10mL de tampon PBS (Gibco, réf. 18912-014). Ce volume final, nommé concentrat, est conservée à -20°C jusqu'à la réalisation des analyses virologiques.



**Figure 11.** Description des cartouches de filtration utilisées pour concentrer les virus selon le principe d'adsorption-élution sur laine de verre (A) ou sur membrane électropositive (B). Les flèches représentent les sens de circulation de l'eau au travers de la cartouche.

## 2.2. Adsorption-élution sur membrane électropositive

Lors d'une concentration sur membrane électropositive, cette dernière est placée à l'intérieur de la cartouche au dessus des deux grilles métalliques de la partie inférieure de la cartouche. Afin de briser le jet d'eau entrant dans la cartouche et ainsi éviter une détérioration de la membrane de filtration, un « mélangeur » en inox est également placé à l'intérieur de la cartouche (Figure 11).

A l'issue de la filtration, la membrane peut soit être soumise à une étape d'élution, soit directement être utilisée pour une étape d'extraction des acides nucléiques, sans élution préalable. Dans ce dernier cas, la membrane est prélevée et introduite dans 10mL de tampon de lyse (Biomérieux, réf. 280134). L'ensemble est agité pendant 10 minutes à 200 tours/min avant de retirer la membrane. La solution de lyse permet de réaliser directement la première étape du protocole d'extraction des acides nucléiques viraux sans élution préalable des particules virales (Beuret, 2003; Hill *et al.*, 2007; Perelle *et al.*, 2009). Lors d'une recherche des virus par biologie moléculaire, ce procédé présente l'avantage d'éviter l'utilisation d'une solution éluante riche en protéines susceptible d'induire des interférences lors des réactions enzymatiques (Shieh *et al.*, 1997; Reynolds *et al.*, 1998). Lorsque l'étape d'élution est nécessaire, les membranes sont placées dans 10mL d'une solution éluante, identique à celle utilisée après filtration sur laine de verre, permettant de remettre en suspension les particules virales adsorbées sur la membrane. L'ensemble est agité 10 minutes

à 200 tours/min avant de retirer la membrane de la solution. Après élution, le concentrat obtenu est immédiatement neutralisé par ajout d'acide chlorhydrique (1M).

### 3. METHODES DE DETECTION ET DE QUANTIFICATION DU GENOME VIRAL

#### 3.1. Extraction des acides nucléiques

Au cours de nos travaux, selon les conditions expérimentales, deux protocoles d'extraction des acides nucléiques différents ont été employés. Le premier protocole décrit permet d'extraire l'ARN ou l'ADN viral à partir de faibles volumes d'échantillons (< 1mL) ; alors que le second offre la possibilité de pouvoir extraire les acides nucléiques totaux à partir de volumes initiaux plus importants (jusqu'à 5mL). Ces deux protocoles sont réalisés à l'aide de kits commerciaux.

##### 3.1.1. Extraction avec des colonnes à membrane de silice

L'extraction de l'ARN ou l'ADN viral peut être réalisée à l'aide du kit commercial QIAamp viral RNA mini kit (Qiagen, réf. 52 904). Ce système d'extraction permet d'isoler les acides nucléiques viraux en dénaturant chimiquement la capsidie protéique des virus mais aussi d'éliminer certains inhibiteurs de la PCR ainsi que les RNases présentes dans le milieu. Le protocole d'extraction est le suivant :

##### Protocole :

- Placer 560µL de tampon de lyse (AVL) dans un tube eppendorf de 1,5mL
- Ajouter 140µL d'échantillon à analyser et vortexer 15 secondes
- Incuber 10 minutes à 15-25°C
- Ajouter 560µL d'éthanol 96-100% et vortexer 15 secondes
- Récupérer 630µL de la solution (sur les 1260µL) et les placer dans la colonne
- Centrifuger 1 minute à 6 000 g
- Placer la colonne dans un nouveau tube collecteur de 1,5mL
- Répéter l'opération avec les 630µL restants
- Placer la colonne dans un nouveau tube collecteur de 1,5mL
- Ajouter dans la colonne 500µL de tampon de lavage (AW1)
- Centrifuger 1 minute à 6 000 g
- Placer la colonne dans un nouveau tube de 1,5mL
- Ajouter 500µL de tampon de lavage (AW2)
- Centrifuger 3 minutes à 20 000 g
- Placer la colonne dans un tube eppendorf de 1,5mL
- Ajouter 60 ou 100µL de tampon d'élution (AVE)
- Incuber 1 minute à 15-25°C
- Centrifuger 1 minute à 6 000 g
- Utiliser l'extrait immédiatement ou congeler à - 80°C

Ainsi, les acides nucléiques (ARN ou ADN) contenus dans les 140µL d'échantillon de départ sont récupérés sous un volume de 60µL ou 100µL d'extrait.

### 3.1.2. Extraction avec des particules de silice magnétiques

Une étude comparative (Burgener *et al.*, 2003) de différents kits d'extraction commercialisés pour extraire les ARN viraux contenus dans un grand volume d'échantillon ( $\geq 1\text{mL}$ ) a montré que deux kits (Kit Nuclisens, Biomérieux et l'association Centricon-QIAamp, Qiagen) ,parmi les quatre testés, étaient adaptés à la détection de virus dans des concentrats d'eau environnementale. Rutjes *et al.* (2005) ont montré que le kit Nuclisens utilisant les billes de silice magnétiques permettait une meilleure détection des entérovirus à partir de concentrats d'eaux environnementales que le kit Nuclisens non magnétique. De plus, celui-ci a également été employé pour la mise en évidence du virus de l'hépatite A après concentration sur une membrane électropositive (Perelle *et al.*, 2009). Par conséquent, le kit Nuclisens Magnetic extraction (Biomérieux, réf. 200293) a été utilisé pour extraire les acides nucléiques viraux à partir d'un échantillon de volume important ou à partir des membranes électropositives.

Ce kit permet l'extraction de l'ensemble des acides nucléiques contenus dans un échantillon donné (ADN et ARN). Cette méthode d'extraction des acides nucléiques repose sur la chimie de Boom (Boom *et al.*, 1990) en utilisant des particules de silice magnétiques. L'extraction est réalisée selon les instructions données par le fournisseur. Brièvement, l'échantillon à analyser est mis en contact avec un tampon de lyse contenant 5 mol/L de thiocyanate de guanidium puis incubé 10 minutes à température ambiante de manière à dénaturer la capsid protéique des virus. Dans des conditions de force ionique élevée, les acides nucléiques se fixent sur les particules de silice. Celles-ci agissent comme une phase solide et les composants étrangers aux acides nucléiques sont retirés après plusieurs étapes de lavage. Enfin, les acides nucléiques sont élués de la phase solide (particules de silice) à faible force ionique, puis conservés à  $-80^{\circ}\text{C}$ . Le protocole de l'extraction est le suivant :

#### Protocole :

- Placer 10mL de tampon de lyse (NucliSens Lysis Buffer, Biomérieux, réf. 280134) dans un tube de 50mL
- Ajouter l'échantillon à analyser et mélanger (5mL d'eau de rivière, de concentrat ou membrane)
- Incuber 10 min à température ambiante
- Ajouter 50 $\mu\text{L}$  de suspension de particules de silice, vortexer
- Incuber 10 min à température ambiante
- Fixer les billes à l'aide d'un portoir magnétique et éliminer le liquide
- Laver deux fois les billes avec 400 $\mu\text{L}$  de tampon de lavage WB1
- Transférer les billes dans un nouveau tube
- Laver deux fois les billes avec 500 $\mu\text{L}$  de tampon de lavage WB2
- Ajouter aux billes 50 $\mu\text{L}$  de tampon d'éluion, mélanger à l'aide de la pipette
- Placer les tubes sous agitation (1400 rpm) à  $60^{\circ}\text{C}$  pendant 5 min
- Aimanter les billes et récupérer le surnageant dans un tube propre
- Ajouter, de nouveau, aux billes 50 $\mu\text{L}$  de tampon d'éluion,
- Placer les tubes sous agitation (1400 rpm) à  $60^{\circ}\text{C}$  pendant 5 min
- Récupérer le surnageant et le mélanger au précédent (100 $\mu\text{L}$  d'extrait final)
- Utiliser l'extrait immédiatement ou congeler à  $-80^{\circ}\text{C}$

Ainsi, les acides nucléiques contenus dans l'échantillon de départ (5mL d'eau, de concentrat ou membrane) sont récupérés dans 100 $\mu\text{L}$  d'extrait.

### 3.2. Détection par double amplification : nested ou semi nested (RT)-PCR

Les méthodes de double amplification utilisées sont issues d'articles scientifiques, auxquelles ont été ajoutés des contrôles internes d'amplification (IAC). Les IAC utilisés ont été synthétisés par la société Yorkshire Bioscience ([www.york-bio.com](http://www.york-bio.com), Grande-Bretagne) pour l'ensemble des laboratoires européens participant au contrat européen Virobathe (projet numéro 513648). Ici, sont décrits les protocoles finaux appliqués sur les échantillons environnementaux. Les résultats d'optimisation des méthodes liées à l'ajout des contrôles internes seront exposés dans la première partie des résultats consacrée au développement des outils méthodologiques.

#### 3.2.1. Recherche des adénovirus humains

La recherche des adénovirus humains s'effectue par nested-PCR selon la méthode développée par Allard *et al.* (2001). Le gène ciblé au cours de cette PCR est celui codant pour la protéine hexon des adénovirus humain. L'IAC utilisé lors de cette nested PCR est un plasmide (pGem vector) contenant les séquences des amorces des deux étapes de PCR, encadrées par des séquences de *Salmonella enterica*. Une fois construit, ce plasmide est linéarisé à l'aide de l'enzyme de restriction *Pst*I. Un seul site de coupure existe sur ce plasmide et il est situé en aval de l'insertion de l'IAC.

Le Tableau 16 présente les séquences nucléotidiques des amorces utilisées pour les deux PCR successives.

**Tableau 16. Séquences des amorces utilisées pour la nested-PCR adénovirus humains**

| Etape      | Dénomination | Fonction        | Séquence (5' - 3')*                    |
|------------|--------------|-----------------|--|
| PCR        | Hex1deg      | Amorce sens     | GCC SCA RTG GKC WTA CAT GCA CAT C      |
|            | Hex2deg      | Amorce antisens | CAG CAC SCC iCG RAT GTC AAA            |
| Nested-PCR | neHex3deg    | Amorce sens     | GCC CGY GCM ACi GAI ACS TAC TTC        |
|            | neHex4deg    | Amorce antisens | CCY ACR GCC AGi GTR WAI CGM RCY TTG TA |

\* R (A ou G), Y (C ou T), S (G ou C), W (A ou T), K (G ou T), M (A ou C), i (inosine)

Les concentrations initiales et finales, ainsi que le volume de chaque réactif entrant dans la composition des mélanges réactionnels des PCR, sont présentés dans le Tableau 17. Le volume réactionnel est de 50µL par tube pour les deux PCR.

Lors des deux PCR successives, l'amplification de l'ADN se fait en plusieurs étapes. Une étape initiale de 3 minutes à 95°C (activation de la Taq polymérase), suivie par 45 cycles composés chacun de 30 secondes à 95°C (dénaturation du double brin d'ADN), 30 secondes à 55°C (hybridation des amorces avec l'ADN cible) puis 1 minute à 72°C (élongation du brin complémentaire) et enfin une étape de 5 minutes à 72°C.

La taille de l'amplicon de la cible virale est de 301pb après la 1<sup>ère</sup> PCR et de 171pb après la 2<sup>ème</sup> PCR. La taille de l'amplicon du contrôle interne est de 384pb après la 1<sup>ère</sup> PCR et de 337pb après la 2<sup>ème</sup> PCR.

Tableau 17. Composition des milieux réactionnels de PCR et de nested PCR

| Réactifs                         | PCR                    |             | Nested-PCR            |             |                      |
|----------------------------------|------------------------|-------------|-----------------------|-------------|----------------------|
|                                  | Concentration initiale | Volume (µL) | Concentration finale  | Volume (µL) | Concentration finale |
| Tampon Platinum Taq <sup>a</sup> | 10X                    | 5           | 1X                    | 5           | 1X                   |
| dNTP <sup>b</sup>                | 12,5mM                 | 5           | 0,25mM A/C/G, 0,5mM U | 2           | 0,1mM A/C/G, 0,2mM U |
| MgCl <sub>2</sub> <sup>a</sup>   | 50mM                   | 1,5         | 1,5mM                 | 1,5         | 1,5mM                |
| Amorce sens                      | 50µM                   | 0,5         | 0,5µM                 | 0,5         | 0,5µM                |
| Amorce antisens                  | 50µM                   | 0,5         | 0,5µM                 | 0,5         | 0,5µM                |
| IAC                              | 1pg/mL                 | 5           | 50 fg                 | -           | -                    |
| Platinum Taq <sup>a</sup>        | 5U/µL                  | 0,2         | 1U                    | 0,2         | 1U                   |
| H <sub>2</sub> O                 |                        | 22,3        | -                     | 38,3        | -                    |
| Extrait à analyser               |                        | 10          | -                     | 2           | -                    |

<sup>a</sup>: Invitrogen, réf. 10966-034, <sup>b</sup>: Applied Biosystems, réf. N8080270

### 3.2.2. Recherche des norovirus génogroupe I et génogroupe II

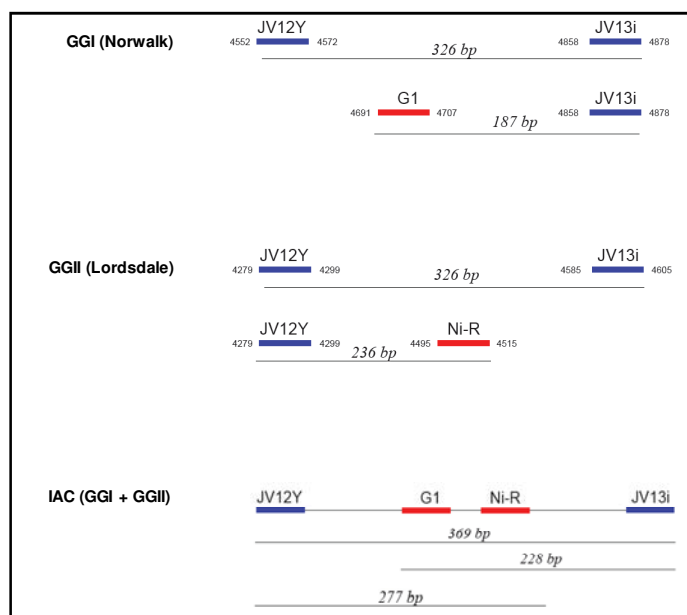
Cette recherche s'effectue par semi-nested RT-PCR. Il s'agit d'une combinaison des amorces développées par Green *et al.* (1998) et Vennema *et al.* (2002). Elle comprend une amplification du gène de l'ARN polymérase ARN-dépendant par RT-PCR one-step, à laquelle sont ajoutés un contrôle interne d'amplification et un inhibiteur de RNases. L'IAC utilisé lors de cette semi nested RT-PCR est un plasmide (pGem vector) contenant les séquences des amorces des deux étapes de PCR, encadrées par des séquences du gène de la  $\beta$ -globuline humaine. Une fois construit, ce plasmide a été fragmenté à l'aide de l'enzyme de restriction *Sall* puis transcrit en ARN. Le Tableau 18 présente les séquences nucléotidiques des amorces utilisées pour les deux PCR successives permettant la mise en évidence des norovirus. L'étape de RT-PCR est commune aux deux génogroupes. La distinction des génogroupes se fait alors lors de la semi-nested PCR (Figure 12).

Tableau 18. Séquences des amorces utilisées pour la semi-nested RT-PCR norovirus

| Cible         | Etape           | Dénomination | Fonction        | Séquence (5' - 3')*         |
|---------------|-----------------|--------------|-----------------|-----------------------------|
| Norovirus     | RT-PCR          | JY12Y        | Amorce sens     | ATA CCA CTA TGA TGC AGA YTA |
|               |                 | JV13i        | Amorce antisens | TCA TCA TCA CCA TAG AAi GAG |
| Génogroupe I  | Semi-nested PCR | G1           | Amorce sens     | TCN GAA ATG GAT GTT GG      |
| Génogroupe II |                 | Ni-R         | Amorce antisens | AGC CAG TGG GCG ATG GAA TTC |

\* N (A, T, C ou G), Y (C ou T), i (inosine)





**Figure 12.** Représentation schématique des combinaisons d'amorces utilisées lors des semi nested RT-PCR ciblant les norovirus GGI, GGII et le contrôle interne d'amplification (IAC). Deux norovirus (Norwalk et Lordsdale) ont été pris en exemple afin de définir les positions des différentes amorces.

Les concentrations initiales et finales, ainsi que le volume de chaque réactif entrant dans la composition des mélanges réactionnels de RT-PCR one-step et de semi-nested PCR, sont présentés dans les tableaux ci-dessous (Tableau 19 et Tableau 20). Les volumes réactionnels finaux sont de 50µL par tube pour les deux PCR.

**Tableau 19.** Composition de mélange réactionnel de RT-PCR one-step

| Réactifs                            | Concentration initiale | Volume (µL) | Concentration finale |
|-------------------------------------|------------------------|-------------|----------------------|
| Tampon kit OneStep <sup>a</sup>     | 5X                     | 10          | 1X                   |
| dNTPs kit OneStep <sup>a</sup>      | 10mM                   | 2           | 0,4mM A/T/C/G        |
| Amorce JV12Y                        | 100µM                  | 0,25        | 0,5µM                |
| Amorce JV13i                        | 100µM                  | 0,25        | 0,5µM                |
| IAC                                 | 10fg/mL                | 5           | 50ag                 |
| Enzyme Mix kit OneStep <sup>a</sup> |                        | 2           | 1X                   |
| RNase inhibitor <sup>b</sup>        | 40 U/µL                | 1,25        | 50U                  |
| H <sub>2</sub> O                    |                        | 19,25       | -                    |

<sup>a</sup> : Qiagen, réf. 210212, <sup>b</sup> : Promega, réf. N2115

Dans un premier temps, la rétro-transcription de l'ARN viral en ADNc s'effectue à 50°C pendant 30 minutes, suivi par une étape d'inactivation de la reverse transcriptase par chauffage pendant 15 minutes à 95°C. Dans un deuxième temps, l'amplification de l'ADNc par PCR se déroule sur 40 cycles composés chacun de 1 minute à 94°C, 1 minute à 37°C et 1 minute à 72°C. La réaction se termine par un chauffage pendant 10 minutes à 72°C.

Tableau 20. Composition de mélange réactionnel de semi-nested PCR pour la détection du génogroupe I

| Réactifs                         | Concentration initiale | Volume ( $\mu\text{L}$ ) | Concentration finale |
|----------------------------------|------------------------|--------------------------|----------------------|
| Tampon Platinum TAQ <sup>a</sup> | 10X                    | 5                        | 1X                   |
| dNTP (A/C/G/U) <sup>b</sup>      | 12,5mM                 | 4                        | 0,1mM A/C/G; 0,2mM U |
| MgCl <sub>2</sub> <sup>a</sup>   | 50mM                   | 2                        | 2mM                  |
| Amorce G1                        | 100 $\mu\text{M}$      | 0,2                      | 0,5 $\mu\text{M}$    |
| Amorce JV13i                     | 100 $\mu\text{M}$      | 0,2                      | 0,5 $\mu\text{M}$    |
| Platinum Taq <sup>a</sup>        | 5U/ $\mu\text{L}$      | 0,2                      | 1 U                  |
| H <sub>2</sub> O                 |                        | 37,4                     | -                    |

<sup>a</sup> : Invitrogen, réf. 10966-034, <sup>b</sup>: Applied Biosystems, réf. N8080270

Lors des semi-nested, l'amplification de l'ADN par PCR se déroule sur 35 cycles composés chacun de 1 minute à 95°C, 1 minute à 40°C et 1 minute à 72°C. La réaction se termine par une étape de chauffage pendant 10 minutes à 72°C.

La taille de l'amplicon est de 326pb après la RT-PCR, de 187pb après la semi-nested PCR du génogroupe I et de 236pb pour le génogroupe II. La taille de l'amplicon du contrôle interne est de 369pb après la RT-PCR, de 228pb après la semi-nested PCR du génogroupe I et de 277pb pour le génogroupe II.

### 3.2.3. Révélation des produits de PCR

La révélation des produits de PCR se fait par électrophorèse sur gel d'agarose 2% (Promega, réf. V3121) contenant 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$  de bromure d'éthidium (Biorad, réf. 161-0433). Les produits amplifiés (2 $\mu\text{L}$ ), ainsi qu'un marqueur de poids moléculaire (100pb DNA ladder Promega, réf. G21-01), sont mélangés à 10 $\mu\text{L}$  de tampon de charge, puis déposés dans les puits du gel. La migration s'effectue dans une solution de Tris-Borate-EDTA (Sigma, réf. T-3913) pendant environ 1 heure à 110 volts. Après migration, les différents fragments amplifiés sont visualisés aux ultra-violets (Gel Doc XR, Biorad). L'analyse du gel d'électrophorèse est réalisée avec le logiciel Quantity One® 4.6.2 (Biorad).

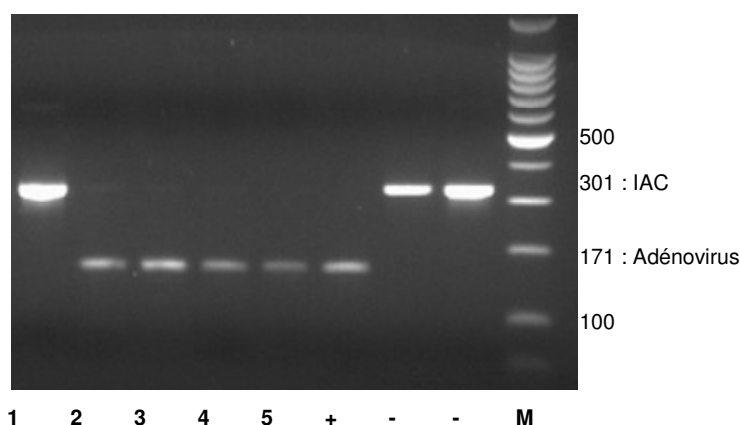


Figure 13. Exemple de photographie d'un gel d'électrophorèse obtenu après une nested PCR ciblant les adénovirus humains. L'échantillon 1 est considéré comme négatif, alors que les échantillons numérotés de 2 à 5 sont considérés comme positifs. + : contrôle positif, - : contrôle négatif, M : marqueur de poids moléculaire.

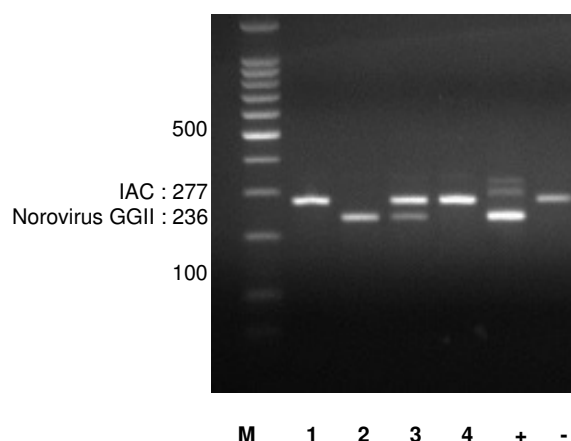


Figure 14. Exemple de photographie d'un gel d'électrophorèse obtenu après une semi nested RT-PCR ciblant les norovirus génogroupe II. Les échantillons 2 et 3 sont considérés comme positifs et les échantillons 1 et 4 sont considérés comme négatifs. + : contrôle positif, - : contrôle négatif, M : marqueur de poids moléculaire.

### 3.3. Détection par (RT)-PCR en temps réel

Les techniques de PCR en temps réel sont utilisées pour la recherche des adénovirus et celle des bactériophages ARN F-spécifiques. Seule la PCR destinée aux adénovirus est décrite dans cette partie. En effet, les RT-PCR en temps réel ciblant les génogroupes des phages ARN F-spécifique, ont été entièrement développées lors de ce projet de recherche. Par conséquent, elles seront exposées dans la partie résultats de ce manuscrit.

La PCR en temps réel permettant la recherche des adénovirus est basée sur la méthode mise au point par Hernroth *et al.* (2002) et cible le gène codant pour la protéine hexon des adénovirus, tout comme la nested-PCR. Le Tableau 21 présente les séquences nucléotidiques des amorces et de la sonde TaqMan utilisées pour la quantification des adénovirus humains par PCR en temps réel.

Tableau 21. Séquences des amorces et de la sonde utilisées pour la PCR en temps réel des adénovirus humains

| Dénomination | Fonction        | Séquence (5' - 3')*                   |
|--------------|-----------------|---------------------------------------|
| Ad F         | Amorce sens     | CWTACATGCACATCKCSGG                   |
| Ad R         | Amorce antisens | CRCGGGCRAAYTGACCAG                    |
| Ad P1        | Sonde TaqMan    | FAM-CCGGGCTCAGGTACTCCGAGGCGTCCT-TAMRA |

\* R (A ou G), Y (C ou T), S (G ou C), W (A ou T), K (G ou T)

Les concentrations initiales et finales, ainsi que le volume de chaque réactif entrant dans la composition du mélange réactionnel de PCR en temps réel, sont présentés dans le Tableau 22. Le volume réactionnel est de 25µL par puits. Le réactif TaqMan Universal Master Mix contient les différents éléments constitutifs du milieu réactionnel de PCR, hormis les amorces et la sonde. Les différents composants de ce

réactif sont l'AmpliTaq Gold DNA polymérase, l'AmpErase uracil-N-glycosylase (UNG), des dNTPs dont des dUTPs, une référence passive (ROX), permettant la normalisation du signal lors des variations de température et un tampon de PCR optimisé contenant notamment du  $MgCl_2$  (5mM).

L'amplification de l'ADN par PCR en temps réel est réalisée en plusieurs étapes. L'étape initiale de 2 minutes à 50°C est suivie d'une activation enzymatique de 10 minutes à 95°C et enfin de 50 cycles composés chacun de 15 secondes à 95°C et 1 minute à 60°C.

**Tableau 22. Composition du mélange réactionnel de PCR en temps réel des adénovirus humains**

| Réactifs                                 | Concentration initiale | Volume (µL) | Concentration finale |
|--|------------------------|-------------|----------------------|
| TaqMan Universel Master Mix <sup>a</sup> | 2X                     | 12,5        | 1X                   |
| Amorce sens                              | 22,5µM                 | 1           | 0,9µM                |
| Amorce antisens                          | 22,5µM                 | 1           | 0,9µM                |
| Sonde                                    | 11,25µM                | 0,5         | 0,225µM              |
| Extrait à analyse                        |                        | 10          |                      |

<sup>a</sup>: Applied Biosystems, réf. 4304437

Comme cela avait initialement été décrit par les auteurs de cette PCR en temps réel, la quantification stricte du nombre de copies de génome contenues dans un échantillon donné est permise par l'utilisation d'une courbe d'étalonnage. Celle-ci est réalisée à l'aide du plasmide pBR322-Ad41 transformé et porteur de la séquence complète du gène codant pour l'hexon de l'adénovirus 41 (Allard *et al.*, 1985). La taille du fragment ajouté est de 8986pb, et celui-ci a été inséré au niveau du site de restriction *BamHI*, comme illustré sur la carte génétique du plasmide (Figure 15). La bactérie *E. coli* JM 109 (Promega, réf. L2001), porteuse de ce plasmide transformé, nous a été fournie par le Professeur Girones (Université de Barcelone, Département de Microbiologie).

La purification du plasmide recombinant pBR322-Ad41 est réalisée à l'aide du kit QIAGEN plasmid Midi kit (Qiagen, réf. 12143) selon les recommandations du fabricant, à partir d'un volume de culture important, établi sur 100mL de milieu LB liquide (1% peptone de caséine, 0,5% extrait de levure, 0,5% NaCl, pH ajusté à 7,5 avec du NaOH) en présence d'ampicilline (100µg/mL). Ce volume de culture est conseillé lorsque l'on travaille avec un plasmide à faible nombre de copies. La méthode de purification est similaire à celle de la technique de lyse alcaline sauf qu'elle utilise en plus une colonne de résine échangeuse d'ions retenant sélectivement l'ADN plasmidique à faible force ionique. Ensuite, le passage sur la colonne de solutions de salinité croissante permet l'élution de l'ADN plasmidique. La quantité d'ADN plasmidique obtenue est déterminée par spectrophotométrie U.V à une longueur d'ondes de 260nm. Dans une dernière étape, le plasmide est purifié et linéarisé à l'aide de l'enzyme de restriction *HindIII* (Fermentas, #ER0051) selon les instructions du fournisseur. La suspension ainsi obtenue contient  $3,42.10^8$  copies de génome par microlitre. Celle-ci est conservée à -20°C.

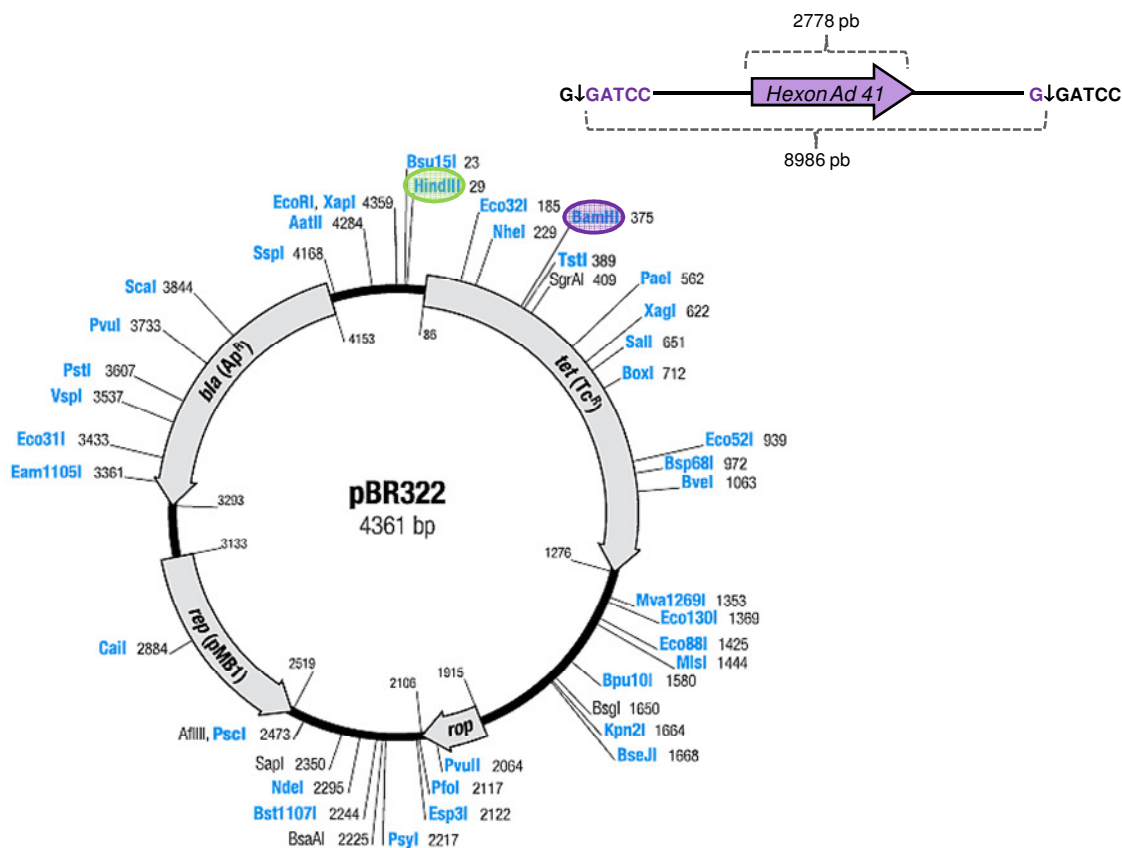


Figure 15. Carte génétique du plasmide pBR322-Ad41 porteur du gène d'intérêt pour réaliser la quantification des adénovirus par PCR en temps réel. *BamHI* : site d'insertion de la séquence contenant le gène d'intérêt (hexon Ad41), *HindIII* : site de restriction utilisé pour linéariser le plasmide.

#### 4. CULTURE DES ADÉNOVIRUS INFECTIEUX

Les cellules A549 (ECACC, réf. 86012804), lignée cellulaire établie à partir d'un carcinome de poumons humain, sont utilisées pour la culture et la recherche des adénovirus. Ces cellules sont permissives à de nombreux sérotypes d'adénovirus mais également aux entérovirus. Les milieux de culture des cellules sont constitués par du « Minimum Essentiel Medium » stérile (MEM) de Eagle (Sigma, réf. M-5650) contenant du rouge de phénol à titre d'indicateur de pH. Ce milieu est complété avec 1% de L-glutamine (Sigma, réf. G-7513). Les milieux sont également additionnés de sérum de veau fœtal décomplémenté à la chaleur (Invitrogen, réf. 10500-056) à raison de 10% pour un milieu de croissance et 2% pour du milieu de survie. Dans le cas d'analyse d'échantillons environnementaux, une solution d'antibiotiques-antifongiques (Sigma, réf. P-0781) est ajoutée aux milieux de culture à hauteur de 1% du volume final, ainsi qu'une solution d'hydrochlorure de guanidine (concentration finale de 100µg/mL) permettant d'inhiber la réplication des entérovirus.

#### 4.1. Quantification des virus infectieux

Les adénovirus infectieux sont quantifiés par la méthode quantique en milieu liquide du Nombre le Plus Probable (NPP) dans des microplaques de 96 puits. Pour ce faire, dans chaque puits sont introduits 200µL de suspension cellulaire à  $1.10^4$  cellules/mL (milieu de survie) et 50µL d'échantillon à analyser ou de sa dilution dans du milieu de survie. La quantification est réalisée à partir de plusieurs dilutions successives et 40 puits sont inoculés pour chaque point de la gamme de dilution. Après 11 jours d'incubation à 37°C sous atmosphère enrichie à 5% de CO<sub>2</sub>, le nombre de puits présentant un effet cytopathogène (ECP) est comptabilisé. Le calcul de la concentration virale, exprimée en Nombre le Plus Probable d'Unités Cytopathogènes par unité de volume (NPPUC/mL), est réalisé grâce à un programme informatique développé par Maul (1991)

#### 4.2. Détection des virus infectieux par ICC-PCR

La stratégie sélectionnée pour la détection des adénovirus infectieux, à partir des suspensions virales obtenues suite aux étapes de concentration des virus à partir des eaux, est basée sur la technique d'ICC-PCR (Integrated Cell Culture-PCR). Cette dernière consiste à combiner une étape de culture des virus par passage des échantillons à analyser sur des systèmes cellulaires et une étape ultérieure de détection par les techniques d'amplification génique. Cette méthode permet d'augmenter la sensibilité de détection des virus pathogènes par rapport à la seule technique de culture cellulaire. En effet, l'ICC-PCR permet de mettre en évidence des virus dont la réplication au sein des lignées cellulaires ne provoque pas d'ECP (Vivier *et al.*, 2004). Par ailleurs, cette technique permet un gain de temps important (Reynolds *et al.*, 2001) en raison de la grande sensibilité des méthodes de PCR, mais également une augmentation du volume de l'échantillon à analyser par rapport aux méthodes de PCR utilisées seules.

La méthode utilisée a été développée dans le cadre du projet européen Virobathe (Virobathe, 513648). A cet effet, des cellules A549 sont mises en culture dans des flasques de 25 cm<sup>2</sup>. Lorsque le tapis cellulaire est formé (cellules confluentes à 90-100%), le milieu de croissance est éliminé et 2mL d'échantillon à tester sont ajoutés aux cellules. Après une heure d'incubation à 37°C, l'inoculum est éliminé. Les cellules sont ensuite lavées avec du tampon PBS (Gibco, réf. 18912-014), afin d'éliminer toute trace de l'inoculum. Les flasques sont incubées, en présence de milieu de survie, pendant 5 jours à 37°C sous atmosphère enrichie en CO<sub>2</sub>. Le 5<sup>ème</sup> jour, les flasques sont congelées (-20°C) et décongelées 3 fois et le mélange cellules/milieu est centrifugé (175g, 5 min). L'ADN viral est alors extrait à partir de 140µL de surnageant de culture cellulaire à l'aide du kit Qiagen Viral RNA, puis analysé avec le protocole de nested-PCR destiné aux adénovirus.

## 5. TRAITEMENT STATISTIQUE DES DONNEES

La plupart des méthodes statistiques mises en œuvre au cours de cette étude, ont été effectuées à l'aide du logiciel XLstat (Addinsoft, France). Selon le contexte expérimental, notre choix s'est porté soit sur des méthodes de statistique descriptive (analyse en composantes principales et coefficient de corrélation de Pearson), soit sur des tests d'hypothèse. Pour ces derniers, on peut également distinguer les tests paramétriques (test de Student, test du rapport de vraisemblance) des tests non paramétriques (test de Mann-Whitney-Wilcoxon, Kruskal-Wallis, test de Friedman, test des signes et test exact de Fisher). Dans cette partie, la description des méthodes employées se limitera à l'analyse en composantes principales et à la modélisation des cinétiques d'inactivation.

### 5.1. Analyse en composantes principales

L'analyse en composantes principales (ACP) est un outil de synthèse de l'information, très utile lorsque l'on est en présence d'une masse importante de données quantitatives à traiter et à interpréter. L'ACP est une méthode factorielle, en ce sens qu'elle produit des facteurs, notés F, qui sont des combinaisons linéaires des variables originelles. Ces facteurs sont hiérarchisés et indépendants les uns des autres. Ceci permet d'obtenir une vision globale de la structure des données expérimentales en réduisant notamment l'ensemble des variables originelles à un nombre limité de facteurs. Par la suite, il est possible de représenter les variables d'origine dans un espace réduit formé, par exemple, par le plan des deux premiers facteurs ( $F_1$ ,  $F_2$ ), ce qui permet parfois d'interpréter les relations entre les différentes variables, les unes par rapport aux autres.

Parallèlement, le calcul de la matrice des corrélations (coefficients de corrélation de Pearson) permet d'objectiver et d'analyser les relations bilatérales existantes entre les différentes variables, prises deux à deux.

### 5.2. Etude des cinétiques d'inactivation des particules virales et de la dégradation du génome viral

#### 5.2.1. Test de linéarité du modèle

A partir des données expérimentales, le modèle choisi pour décrire la cinétique d'inactivation est de la forme :  $\log_{10} \left( \frac{Q_t}{Q_0} \right) = at + b$

- avec :
- $Q_0$ : quantité de virus ou de génome viral au début de l'expérience,
  - $Q_t$ : quantité de virus ou de génome viral à un temps t
  - t : temps

Une analyse de régression, selon la méthode des moindres carrés, a permis d'ajuster un modèle de ce type à chaque série expérimentale.

Pour savoir si les cinétiques d'inactivation peuvent être décrites par des droites, il est nécessaire de tester la linéarité de la régression. A cet effet, il n'est pas possible d'utiliser le  $r^2$  de la régression car ce dernier n'a pas de valeur statistique, eu égard au fait que les temps mentionnés en abscisses ont été fixés et qu'ils ne sont donc pas les réalisations d'une variable aléatoire. Il est, par contre, concevable de tester la linéarité du modèle, à partir de la comparaison statistique de la variance résiduelle et de la variance purement expérimentale. Cette dernière peut être estimée à partir des répétitions. Soient  $y_i^1$  et  $y_i^2$  les mesures associées au temps  $i$ , et  $n$  le nombre total de points expérimentaux, les deux variances mentionnées précédemment sont estimées de la manière suivante:

$$\text{Variance résiduelle: } \frac{n s_r^2}{n-2}$$

$$\text{Variance expérimentale: } s_{exp}^2 = \frac{\sum (y_i^1 - y_i^2)^2}{n}$$

Pour tester la validité du modèle linéaire, ces deux variances sont comparées à l'aide du test de Fisher. Sous l'hypothèse nulle ( $H_0$  : le modèle linéaire est valide), les variances résiduelle et expérimentale sont égales. Par contre, si le modèle ne s'applique pas, la variance résiduelle sera supérieure à la variance expérimentale. Pour ce faire, la probabilité critique de l'hypothèse nulle est calculée comme suit :

$$P = P(F_{(n-2, \frac{n}{2})} > f), \quad \text{avec } f = \frac{n s_r^2}{(n-2) s_{exp}^2}$$

### 5.2.2. Comparaison des pentes

Soient deux séries de statistiques doubles, auxquelles des droites de régression passant par l'origine ont été ajustées :

série 1:  $\{(x_{1i}, y_{1i}), i = 1, \dots\}$ ; droite ajustée d'équation  $\widehat{y}_1 = a_1 x$

série 2:  $\{(x_{2i}, y_{2i}), i = 1, \dots\}$ ; droite ajustée d'équation  $\widehat{y}_2 = a_2 x$

La comparaison des pentes d'inactivation (ou de dégradation) de deux droites de régression en fonction du temps est effectuée à l'aide du test de Student. L'hypothèse nulle consiste à dire que les deux pentes  $a_1$  et  $a_2$  ne sont pas significativement différentes. La statistique de test s'écrit :

$$t = \frac{|a_1 - a_2|}{s \sqrt{\frac{1}{\sum (x_{i1})^2} + \frac{1}{\sum (x_{i2})^2}}}$$



$$\text{avec } s = \sqrt{\frac{(n_1 - 1)s_{y_{1,r}}^2 + (n_2 - 1)s_{y_{2,r}}^2}{n_1 + n_2 - 2}}$$

où  $n_1$  et  $n_2$  représentent le nombre total de points expérimentaux correspondant respectivement à chacune des deux séries statistiques.

La probabilité critique associée à l'hypothèse nulle est obtenue par l'expression :

$$P = 2 P(T_{(n_1+n_2-2)} > t)$$

### 5.2.3. Prédiction de $y$ pour une valeur de $x$

A partir de la droite de régression, il est possible, dans une première étape, de calculer un intervalle de confiance de  $y$  pour un temps  $x$  fixé.

Dans le cadre des études d'inactivation des particules virales en fonction du temps, celle-ci est exprimée à l'aide de l'expression suivante :

$$\log_{10} \left( \frac{Q_t}{Q_0} \right) = at$$

Il est alors possible, dans une seconde étape, de calculer un intervalle de confiance du temps correspondant à un taux d'inactivation donné, comme par exemple 90% ( $T_{90}$ ). Dans ce cas précis, on cherche à estimer le temps nécessaire, capable de produire une inactivation telle que :

$$\left( \frac{Q_t}{Q_0} \right) = 0,10; \quad \text{i.e.} \quad \log_{10} \left( \frac{Q_0}{Q_t} \right) = \log_{10} (0,10) = -1$$

Notons au passage, que le  $T_{90}$  est égal à l'image réciproque de -1 par la fonction de régression ajustée, soit  $T_{90} = -\frac{1}{a}$ . Pour un temps  $x_0$  donné et un niveau de probabilité  $(1-\alpha)$  fixé à l'avance, un intervalle de confiance de  $y$  ( $IC_{y_0}^{1-\alpha}$ ) est obtenu à l'aide de la formule suivante :

$$IC_{y_0}^{1-\alpha} = \left[ ax_0 - t_{n-1} \left(1 - \frac{\alpha}{2}\right) \times s \sqrt{\frac{x_0^2}{\sum x_i^2}}; ax_0 + t_{n-1} \left(1 - \frac{\alpha}{2}\right) \times s \sqrt{\frac{x_0^2}{\sum x_i^2}} \right]$$

$$\text{avec } s = \sqrt{\frac{ns_r^2}{n-1}}$$

Enfin, si les bornes de  $IC_{y_0}^{1-\alpha}$  sont notées respectivement  $b_i$  et  $b_s$ , alors les bornes inférieure et supérieure d'un intervalle de confiance de  $T_{90}$ , au niveau de probabilité  $(1-\alpha)$ , sont égales aux images réciproques de  $b_s$  et  $b_i$  par la fonction de régression ajustée, soit respectivement,  $\frac{1}{a} b_s$  et  $\frac{1}{a} b_i$  (Figure 16).

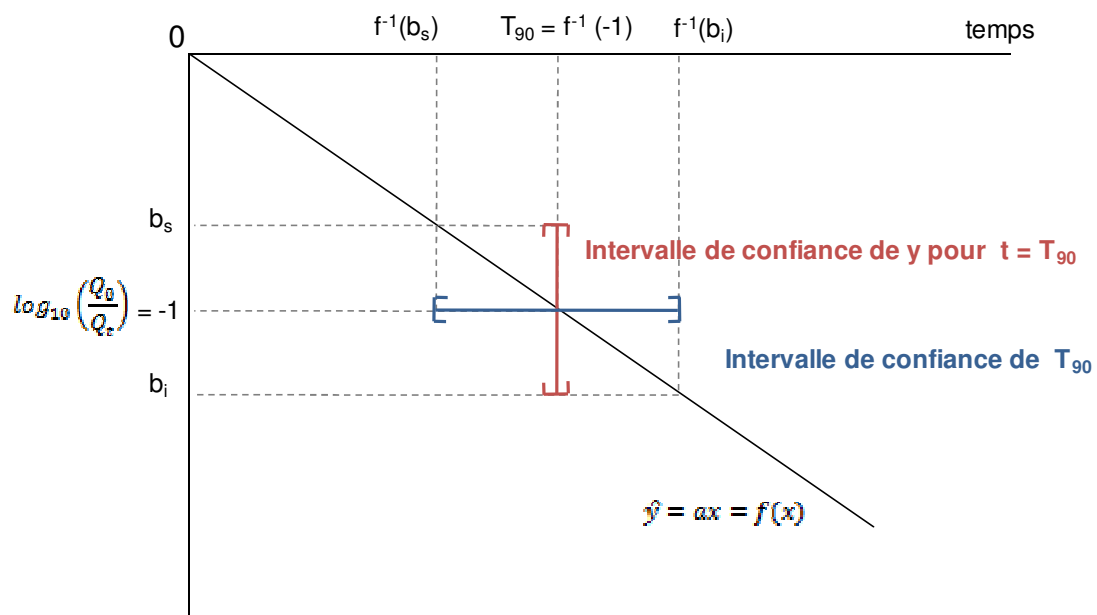


Figure 16. Représentation du principe permettant de calculer un intervalle de confiance d'une valeur de  $T_{90}$ .

## *Partie III : Résultats*



*Chapitre 1 :*

*Aspects méthodologiques de la détection des virus dans les  
eaux*





L'objectif de ce travail est de déterminer l'intérêt du génotypage des bactériophages ARN F-spécifiques pour estimer la pollution fécale et virale des eaux. Afin d'atteindre cet objectif, il est impératif de disposer d'une méthode de génotypage des phages ARN F-spécifiques mais également d'être capable d'évaluer la pollution fécale et virale de différents milieux hydriques. Pour réaliser notre étude dans des conditions techniques satisfaisantes, une réflexion préalable sur le plan méthodologique a donc été nécessaire. En effet, des microorganismes de différentes natures (bactéries et virus) doivent être mis en évidence dans des milieux variés (eaux usées, eaux de rivière et eaux souterraines) et ce, par le biais de méthodes de détection faisant aussi bien appel aux techniques de biologie moléculaire qu'aux méthodes de culture.

D'un point de vue pratique, plusieurs possibilités s'offrent à nous. Il est envisageable d'utiliser des méthodes standardisées, ainsi que des méthodes décrites dans la littérature. Par ailleurs, d'autres méthodes, essentielles pour répondre aux contraintes de notre étude, doivent être développées et/ou optimisées.

L'estimation de la pollution fécale s'effectue à l'aide des indicateurs de pollution fécale conventionnels, qui peuvent être soit de nature bactérienne (*E. coli*, entérocoques), soit de nature virale (coliphages somatiques, bactériophages ARN F-spécifiques). Leur méthode de détection dans les différents milieux hydriques fait l'objet de procédures normalisées (procédures ISO) basées sur des techniques de culture.

La pollution virale des eaux est évaluée en recherchant des norovirus, des adénovirus et parfois des entérovirus. Dans ce travail, seuls les adénovirus font l'objet d'une recherche par les méthodes de culture cellulaire (ICC-PCR) qui témoignent du caractère infectieux des virus. La recherche du génome viral est la seule méthode de détection commune à l'ensemble des virus. Celle-ci se décompose classiquement en deux phases successives, à savoir une étape d'extraction des acides nucléiques, qui peut aisément être réalisée à l'aide de kits commerciaux, suivie d'une étape de détection par amplification génique. Très souvent, en fonction de nos conditions expérimentales et de nos milieux d'étude, cette dernière étape nécessite des adaptations méthodologiques ayant pour but, soit de prendre en compte le risque de faux négatifs, soit de permettre la quantification stricte du nombre de copies de génome présent dans un échantillon donné. Ainsi, des protocoles déjà existants pour la détection des norovirus et des adénovirus ont été adaptés à nos besoins. Enfin, une nouvelle approche, basée sur la détection du génome par RT-PCR en temps réel, a été développée pour réaliser le génotypage des bactériophages ARN F-spécifiques.

Le Tableau 23 présente un bilan des méthodes de détection des microorganismes nécessaires à la réalisation de cette étude.

Tableau 23. Méthodes de détection des microorganismes nécessaires à la réalisation de cette étude.

| Méthodes d'analyse et microorganismes cibles   | Références  |
|--|---|
| <b>Détection des microorganismes par biologie moléculaire</b>  |   |
| <b>✓ Extraction des acides nucléiques</b>  |   |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>Acides nucléiques totaux</li> <li>ARN viral et ADN d'adénovirus</li> </ul>  | Nuclisens kit (Biomérieux, réf. 200293)<br>Qiagen Viral RNA mini kit (Qiagen, réf. 52906)   |
| <b>✓ Amplification génique</b>   |   |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>Adénovirus humains :               <ul style="list-style-type: none"> <li>PCR en temps réel</li> <li>nested-PCR</li> </ul> </li> <li>Norovirus               <ul style="list-style-type: none"> <li>semi-nested RT-PCR</li> </ul> </li> <li>Bactériophages ARN F-spécifiques               <ul style="list-style-type: none"> <li>RT-PCR en temps réel</li> </ul> </li> </ul> | adaptée de Hernroth <i>et al.</i> (2002)<br>adaptée de Allard <i>et al.</i> (2001)<br>adaptée de Green <i>et al.</i> (1998) et Vennema <i>et al.</i> (2002)<br>à développer |
| <b>Détection des microorganismes par culture</b>   |   |
| <b>✓ Virus</b>   |   |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>Bactériophages ARN F-spécifiques</li> <li>Coliphages somatiques</li> <li>Adénovirus humains               <ul style="list-style-type: none"> <li>ICC-PCR</li> </ul> </li> </ul>   | ISO10705-1, 1995<br>ISO10705-2, 1995<br>VIROBATHE, 2005-2007  |
| <b>✓ Bactéries</b>   |   |
| <ul style="list-style-type: none"> <li><i>Escherichia coli</i></li> <li>Entérocoques</li> </ul>  | ISO9308-3, 1998<br>ISO7899-1, 1998  |

De manière générale, la recherche des microorganismes dans les eaux environnementales peut se décomposer en deux grandes étapes. L'étape de détection est certes incontournable, mais, selon le milieu d'étude et les microorganismes ciblés, elle devient parfois impossible sans envisager une étape de concentration préalable. Dans notre étude, cette étape de concentration des microorganismes s'est parfois avérée nécessaire. Pour les indicateurs bactériens, une procédure normalisée a été employée (ISO9308-1, 2000), alors que pour les phages et les virus pathogènes, le choix des protocoles de concentration à utiliser a été adapté en fonction du milieu d'étude (Tableau 24).

Tableau 24. Conditions d'application de l'étape préalable de concentration en fonction du type d'eau et des microorganismes recherchés : pour chaque combinaison, le volume concentré est indiqué en gras. Lorsque l'étape de concentration n'est pas indispensable, le volume analysé est indiqué entre parenthèses.

| Type d'eau        | Indicateurs bactériens<br>(culture) | Coliphages somatiques<br>(culture) | Bactériophages ARN<br>F-spécifiques (RT-PCR) | Virus pathogènes<br>(RT-PCR) |
|-------------------|-------------------------------------|------------------------------------|--|------------------------------|
| Eaux usées        | -                                   | -                                  | (140µL)                                      | (140µL)                      |
| Eaux de rivière   | (3mL)                               | (10mL)                             | (5mL)  | <b>10L</b>                   |
| Eaux souterraines | <b>250mL</b>                        | <b>3-4L</b>                        | <b>50L</b>                                   | <b>50L</b>                   |



Ainsi, nous avons effectué un travail méthodologique sur les trois points essentiels suivants:

- le protocole de génotypage des bactériophages ARN F-spécifiques par RT-PCR en temps réel,
- les protocoles d'amplification génique disponibles pour les adénovirus et les norovirus, afin de pouvoir maîtriser le risque de faux négatifs et la quantification du nombre de copies de génome,
- le choix et l'optimisation des méthodes de concentration des virus pathogènes et des phages.

## 1. METHODE DE DETECTION ET DE GENOTYPAGE DES BACTERIOPHAGES ARN F-SPECIFIQUES

Lorsque cette étude a été entreprise, la détection des bactériophages ARN F-spécifiques et l'étude de la répartition de leurs génogroupes dans des échantillons environnementaux étaient principalement réalisées par des méthodes de culture couplées à des techniques de détection moléculaire comme l'hybridation (Hsu *et al.*, 1995; Beekwilder *et al.*, 1996a). Or, au fil des études réalisées, ces techniques de détection ont souvent été considérées comme longues et difficiles à mettre en œuvre, tout en étant parfois à l'origine de résultats ambigus. Pourtant, avec l'engouement actuel pour les méthodes permettant de déterminer l'origine de la pollution fécale et les recherches de l'indicateur de pollution idéal toujours infructueuses, il semble intéressant de disposer d'une nouvelle méthode de détection afin d'évaluer au mieux l'intérêt du génotypage des phages ARN F-spécifiques pour ces applications.

Ainsi, nous avons choisi de développer des RT-PCR en temps réel permettant de détecter spécifiquement les quatre génogroupes de phages ARN F-spécifiques à partir de prélèvements environnementaux. Globalement, la démarche expérimentale suivie s'articule autour de trois parties avec comme objectif principal de disposer d'une méthode sensible, spécifique et permettant de détecter l'ensemble des bactériophages appartenant à un génogroupe donné.

La première partie du travail a été réalisée à partir des séquences nucléotidiques mises à disposition dans la base de données Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Lors de la mise en place de cette étude, respectivement 4, 5, 3 et 3 séquences génomiques, partielles ou complètes, étaient disponibles au sein des génogroupes I, II, III et IV. La réalisation des alignements de séquences a permis de mettre en évidence des zones conservées du génome viral spécifiques à chaque génogroupe. Ce choix méthodologique a été établi de manière à augmenter la probabilité de détection de l'ensemble des phages appartenant à un génogroupe donné. Les systèmes de RT-PCR en temps réel ont ensuite été dessinés au niveau des zones d'intérêt identifiées, en respectant les critères de choix des amorces et des sondes TaqMan MGB définis par le logiciel Primer Express (Primer Express Oligo Design software v.1.5, Applied Biosystems). Par ailleurs, en raison des futures applications environnementales de cette nouvelle méthode de typage et afin d'éviter les faux résultats positifs dus à des amplifications non spécifiques, la spécificité des amorces et des sondes sélectionnées a été évaluée d'un point de vue théorique par le test BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

La seconde partie du travail, réalisée à partir de stocks de phages (MS2, GA, Q $\beta$  et SP), a été dédiée à l'optimisation et à l'évaluation des quatre systèmes de RT-PCR en temps réel selon les critères suivants : l'évaluation du domaine de linéarité, l'efficacité, la sensibilité et la spécificité. Les trois premiers critères ont été étudiés à partir de gammes de dilution logarithmiques des stocks viraux, aboutissant à la création d'une courbe standard. Les différentes RT-PCR montrent une linéarité sur au moins 5 unités logarithmiques, des efficacités comprises entre 87% et 95%, et des limites de détection comprises entre  $2 \cdot 10^{-4}$  et  $2 \cdot 10^{-1}$  UFP/réaction. D'un point de vue expérimental, la spécificité a été évaluée grâce à la mise en œuvre de tests croisés entre les quatre systèmes de RT-PCR, les stocks de phages et des mélanges de phages appartenant à divers génogroupes. Il a alors été démontré que les systèmes dessinés sont parfaitement spécifiques d'un génogroupe donné et qu'il n'existe pas d'interférences lors de l'analyse d'un milieu complexe comportant différentes espèces virales. Ainsi, l'ensemble de ces investigations ont abouti à un protocole d'amplification unique, adapté aux quatre systèmes de RT-PCR et permettant une quantification sensible et spécifique des différents génogroupes de bactériophages ARN F-spécifiques.

Enfin, dans une dernière partie, et avant d'envisager toute application environnementale, il apparaissait indispensable de tester cette nouvelle méthode de génotypage dans un milieu complexe, à la fois contaminé en bactériophages ARN F-spécifiques et susceptible de contenir des inhibiteurs de PCR, telles que les eaux usées brutes. A partir des sept échantillons analysés (Maisons-Laffitte, France), il apparaît que trois génogroupes sur quatre ont pu être détectés. Seul le génogroupe IV n'a jamais été mis en évidence. Toutefois, il est largement admis que ce génogroupe n'est que très rarement observé au niveau d'échantillons environnementaux. Ainsi, la mise en évidence de différents génogroupes au niveau des échantillons d'eaux usées brutes, à l'aide des RT-PCR en temps réel, montre la possible application de cette nouvelle méthode dans des échantillons environnementaux complexes. De plus, en regardant les résultats de génotypage plus en détails, il ressort que, dans cette eau usée, le génogroupe II est toujours largement majoritaire. Cette observation semble étayer l'hypothèse de l'origine humaine de ce génogroupe. Pourtant, à une date particulière, le génogroupe I apparaît majoritaire. Lors de ce phénomène ponctuel, une pluviométrie exceptionnellement importante a été documentée, et des parasites (*Cryptosporidium* et *Giardia*) ont également été décelés à des concentrations relativement élevées. La présence de pathogènes à caractère zoonotique couplée au pic de phages appartenant au génogroupe I, nous a confortés dans l'idée que le génotypage pouvait constituer un outil intéressant de discrimination de l'origine de la pollution fécale.

La mise en œuvre des expérimentations, les étapes d'optimisation de la méthode, ainsi que les résultats obtenus lors de cette première partie de nos travaux sont présentés sous forme d'un article scientifique paru dans *Journal of Virological Methods* (Ogorzaly et Gantzer, 2006).

La méthode de génotypage mise au point au cours de ce travail a également été utilisée dans le cadre d'une étude visant à estimer l'élimination de différents génogroupes par filtration membranaire dans le cadre des traitements de potabilisation. Ce travail a aussi fait l'objet d'une publication scientifique dans la revue *Journal of Membrane Science* (Langlet *et al.*, 2009), qui est présentée en annexe à titre informatif.

Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

Journal of Virological Methods 138 (2006) 131–139

[www.elsevier.com/locate/jviromet](http://www.elsevier.com/locate/jviromet)

## Development of real-time RT-PCR methods for specific detection of F-specific RNA bacteriophage genogroups: Application to urban raw wastewater

Leslie Ogorzaly, Christophe Gantzer\*

Laboratoire de Chimie Physique et Microbiologie pour l'Environnement (LCPME), Virologie, UMR 7564 CNRS/Université Henri Poincaré (UHP) – Nancy I, Faculté de Pharmacie, 5 rue Albert Lebrun, BP 80403, 54 001 Nancy Cedex, France

Received 9 May 2006; received in revised form 28 July 2006; accepted 7 August 2006

Available online 25 September 2006

### Abstract

F-specific RNA bacteriophages have been classified into four genogroups (GI, GII, GIII and GIV). It was suggested that two of these genogroups are more frequent in human excreta (GII and GIII) and the two other (GI and GIV) are specific for animal excreta. Real-time RT-PCR methods using TaqMan MGB probe were developed to detect the four genogroups. Primers and probes of each specific RT-PCR were designed to target all sequenced bacteriophages belonging to one genogroup, without cross-reactivity with other genogroups. These four methods showed detection limits ranging between 0.01 and 10 PFU/mL and PCR efficiencies ranging between 87 and 95%. The newly methods were tested in urban raw wastewater. Genogroups I and II were detected in all samples ( $n=7$ ); GIII in six samples and GIV was never detected. GI was predominant in one sample, in which the quantity of *Cryptosporidium* and *Giardia* was, respectively, three and eight times higher than the mean values. Because GI is mainly observed in animals, it was hypothesized that this increase was due to an animal input. The use of F-specific RNA phage genotyping to estimate the origin of faecal pollution requires appropriate validation. In this context, real-time RT-PCR will undoubtedly be useful.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** F-specific RNA bacteriophages; Real-time RT-PCR; Genotyping; Wastewater

### 1. Introduction

Bacteriophages have long been considered as attractive candidates for indicators of enteric viral behaviour and of faecal pollution in environmental waters. Three basic groups of bacteriophages have been proposed: somatic coliphages, male-specific (F-DNA or F-RNA) coliphages and phages infecting *Bacteroides fragilis* (Grabow, 2001; Havelaar et al., 1993; IAWPRC, 1991; Leclerc et al., 2000; Morinigo et al., 1992). Among them, F-specific RNA phages (F-RNA phages) are often proposed to identify the origin of faecal pollution.

F-specific RNA phages are viruses that primarily infect Gram-negative bacteria which possess a plasmid coding for an F or sex pilus. The viruses have an icosahedral capsid and their genome consists of positive-sense linear single-stranded RNA.

F-specific RNA phages belong to the *Leviviridae* family, which is divided into two genera: *Levivirus* and *Allolevivirus*; and unclassified groups (Bollback and Huelsenbeck, 2001). These phages are also classified into four groups on the basis of their serological cross-reactivity (Vinjé et al., 2004), replicase template activity (Miyake et al., 1971) and phylogenetic analysis (Bollback and Huelsenbeck, 2001). The genus *Levivirus* contains the genogroup I (MS2-like) and the genogroup II (GA-like), whereas *Allolevivirus* genus contains the genogroup III (Q $\beta$ -like) and the genogroup IV (SP-like). Genogroups II and III may be more frequent in human faeces and urban wastewater, while genogroups I and IV may be more frequent in animal faeces and waters contaminated by animal activities (Brion et al., 2002; Cole et al., 2003; Osawa et al., 1981; Schaper et al., 2002; Scott et al., 2002). Using this type of approach, different studies have shown that microbial water quality is generally more influenced by animal contamination than by human contamination (Griffin et al., 2000). However, there is no absolute association between F-specific RNA phage genogroups and ani-

\* Corresponding author. Tel.: +33 3 83 682 291; fax: +33 3 83 682 301.  
E-mail address: [christophe.gantzer@pharma.uhp-nancy.fr](mailto:christophe.gantzer@pharma.uhp-nancy.fr) (C. Gantzer).

mal or human sources. GII phages are routinely found in pig faeces, but never in any other animal faeces. This exception is explained by the fact that pigs have a gastrointestinal physiology and flora similar to humans, partly because of their close living conditions (Cole et al., 2003; Hsu et al., 1995; Schaper et al., 2002). Moreover, GIII phages are also found in chicken and pig wastewater (Sundram et al., 2006). On the other hand, F-specific RNA phages GI and GIV are specific for animal wastewater.

Immunological, genetic or hybridization methods can be used to characterise phages as being derived from human or animal sources (Hsu et al., 1995; Schaper and Jofre, 2000). The most widely used hybridization method involves plating the phage on a particular host, transferring the plaques to a nylon membrane, denaturing the phage to expose the nucleic acid, cross-linking the nucleic acid to the membrane and then detecting genogroup specific nucleic acid sequences with oligonucleotide probes. This technique has been shown to be successful in identifying the four groups of F-specific RNA phages (Hsu et al., 1995; Sundram et al., 2006), but it is fastidious and labour intensive. To date, different researchers have developed other more rapid techniques: Vinjé et al. (2004) associated RT-PCR and reverse blot hybridization (on amplified cDNA) and O'Connell et al. (2006) optimized real-time fluorogenic RT-PCR for detecting bacteriophage MS2.

The purpose of this work was to develop a new real-time RT-PCR method for the specific detection of each genogroup. This new method was then tested on urban raw wastewater to evaluate its usefulness and validity on environmental samples.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Origin, culture and enumeration of F-specific RNA bacteriophages

Four representative F-specific RNA bacteriophage strains, MS2, GA, Q $\beta$  and SP, belonging, respectively, to genogroup

I (GI), GII, GIII and GIV, were selected for specific genogroup real-time RT-PCR development. MS2 phages were obtained from culture collection (ATCC 15597-B1); GA and Q $\beta$  were provided by J. Jofre (University Barcelona) and SP by Y. Inokuchi (University Tokyo).

The phages were separately replicated according to standard procedure Anon. (1997) without the chloroform step, using *Escherichia coli* Hfr K12 (ATCC 23631) as the bacterial host. After replication, the phage suspension was centrifuged (3000  $\times g$  for 20 min) and the supernatant was decontaminated by filtration through sterile membrane filters (0.22  $\mu\text{m}$ , Millipore). Initial concentration viral stocks were about  $10^{10}$  PFU/mL. The different stocks of phages were then stored at 4 °C.

F-specific RNA phages were quantified by double agar layer plaque assay method (Anon., 1997), using *E. coli* Hfr K12 as host. Viral concentration was then expressed in plaque forming units by millilitre (PFU/mL).

### 2.2. Sequence alignments and primer and probe set design

For each genogroup, alignment was constructed using ClustalX (V. 1.8) software. It was based on complete or partial genomic sequences of F-RNA phages available on Genbank. The genomic sequences of F-specific RNA phages (Genbank accession number) used for genogroup I were MS2 (NC\_001417), fr (NC\_001333), M12 (AF195778) and JP501 (AH009279). GA (NC\_001426), JP34 (J04343), TH1 (J02519), BZ13 (J02446) and KU1 (NC\_002250) were used for genogroup II, Q $\beta$  (AY099114), MX1 (AF059242) and M11 (AF052431) for genogroup III and SP (X07489), TW28 (J02521) and NL95 (AF059243) for genogroup IV. To design the primers and TaqMan probes, the selected segments of genome were further analysed using the Primer Express<sup>®</sup> Oligo Design software (V. 1.5, Applied Biosystems). Primer pairs and associated probes were chosen at the same time.

Table 1  
Primer and probe sequences for TaqMan real-time RT-PCR for detection of four F-specific RNA phage genogroups

| Genogroup |         | Sequence (5'–3')            | Orientation | Nucleotides | Location               |
|-----------|---------|-----------------------------|-------------|-------------|------------------------|
| GI        | Forward | TCAGTGGTCCATACCTTAGATGC     | +           | 23-bp       | 1255–1277 <sup>a</sup> |
|           | Reverse | ACCCCGTTAGCGAAGTTGCT        | –           | 20-bp       | 1404–1423 <sup>a</sup> |
|           | Probe   | FAM–CTCGTCGACAATGG–MGBNFQ   | +           | 14-bp       | 1362–1375 <sup>a</sup> |
| GII       | Forward | TGCAAACCTAACTCGGAATGG       | +           | 21-bp       | 3273–3293 <sup>b</sup> |
|           | Reverse | AGGAGAGAACGCAGGCCTCTA       | –           | 21-bp       | 3325–3345 <sup>b</sup> |
|           | Probe   | FAM–TCCCTCTATTTCCTC–MGBNFQ  | +           | 15-bp       | 3304–3318 <sup>b</sup> |
| GIII      | Forward | CCGCGTGGGGTAAATCC           | +           | 17-bp       | 1412–1428 <sup>c</sup> |
|           | Reverse | TTCTTACGATTGCGAGAAGGCT      | –           | 22-bp       | 1506–1527 <sup>c</sup> |
|           | Probe   | FAM–AAGCGGGTGCAGTT–MGBNFQ   | +           | 14-bp       | 1455–1468 <sup>c</sup> |
| GIV       | Forward | GCTACTAGCCTTCGTCGCAAGA      | +           | 22-bp       | 4056–4077 <sup>d</sup> |
|           | Reverse | GAAGGCACTGTCTGAATCCA        | –           | 21-bp       | 4098–4118 <sup>d</sup> |
|           | Probe   | FAM–AGGTCGGTACAAAGTG–MGBNFQ | +           | 16-bp       | 4079–4094 <sup>d</sup> |

<sup>a</sup> Nucleotide positions based on Genbank accession number NC\_001417: MS2 phage.

<sup>b</sup> Nucleotide positions based on Genbank accession number NC\_001426: GA phage.

<sup>c</sup> Nucleotide positions based on Genbank accession number AF059242: MX1 phage.

<sup>d</sup> Nucleotide positions based on Genbank accession number X07489: SP phage.

### 2.2.1. Primer pairs

Three guidelines were used for primer selection:  $T_m$  between 58 and 60 °C, G-C content in the 20–80% range and no more than two G and/or C bases at the 3' end of the five nucleotides. For each genogroup, one or more primer pairs met these three criteria. Then, these different selected primers pairs were tested by SYBR Green real-time RT-PCR in order to evaluate their amplification efficiency and consequently optimize the primer choice for Taqman assays. The four final selected primer pairs were shown in Table 1.

### 2.2.2. TaqMan MGB probes

TaqMan MGB probes, characterised by a minor groove binder (MGB) at the 3' end, were chosen for several reasons. This MGB increases the melting temperature ( $T_m$ ), allows the use of probes shorter than 20 nucleotides and differentiates two sequences with only one mismatch (Watzinger et al., 2006). The reporter FAM was attached to the 5' end. One TaqMan MGB probe was selected for each specific genogroup RT-PCR system in agreement with these guidelines of choice:  $T_m$  included between 65 and 67 °C, no guanine residue at the 5' end of the probe and probe as short as possible without being shorter than 13 nucleotides. Only probes corresponding to the final selected primer combinations were tested by TaqMan PCR. The different selected probes and the four RT-PCR systems are shown in Table 1.

### 2.3. Urban raw wastewater samples

Raw urban wastewater was collected after decantation. This water mainly comes from human sources but is also influenced by activity relating to horses. Seven samples were collected over 3 weeks. They were submitted to classical physico-chemical and microbiological analysis. The main characteristics were (average values,  $n=7$ ): turbidity 87 NTU, COD 262 mg O<sub>2</sub>/L, suspended matter 0.1 g/L, *E. coli* 7.5 log MPN/100 mL (Idexx), enterococci 6.7 log MPN/100 mL (Idexx), F-RNA phages 580 PFU/mL (ISO 1075-1), 4182 *Cryptosporidium* oocysts/L and 4075 *Giardia* kysts/L (USEPA-821-R-01-025). These samples were also submitted to phage genotyping by real-time RT-PCR.

### 2.4. Viral RNA extraction

Viral RNA was extracted using QIAamp® Viral RNA Mini kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. Extraction was performed on 140 µL (viral suspension in phosphate buffer or wastewater) and the final volume was 60 µL. The extracts were immediately stored at –80 °C.

### 2.5. Reverse transcription (RT) procedure

For RT, 7.5 µL of extracted viral RNA was mixed with 1 µL of 10 mM dNTPs (Applied Biosystems), 1 µL of reverse primer at 20 µM (Applied Biosystems) and 3.5 µL of DNase–RNase free water (Sigma). This first RT step was carried out at 65 °C for 5 min and immediately incubated on ice at least 1 min. Reaction

mixture consisting of 4 µL of 5× First-Strand Buffer (Invitrogen), 1 µL of 0.1 M DTT (Invitrogen), 1 µL (40 U/µL) of RNase Inhibitor (Promega), and 1 µL (200 U/µL) of SuperScript Reverse Transcriptase III (Invitrogen) was added in reaction tube to give a total volume of 20 µL. This RT mixture was heated at 50 °C for 1 h, followed by 15 min at 70 °C to inactivate the reaction. The RT products (cDNA) were immediately cooled at 4 °C.

### 2.6. SYBR Green and TaqMan real-time procedure

In the PCR assay, 5 µL of cDNA was added to 25 µL of SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems) or TaqMan Universal Master Mix (Applied Biosystems), both containing AmpliTaq Gold DNA polymerase, 1.25 µL of each primer (forward and reverse) at 40 µM and 1 µL of probe at 15 µM only for TaqMan assay. All primers and probes were synthesised by Applied Biosystems. DNase–RNase free water was added to obtain a total volume of 50 µL. PCR was performed at 50 °C for 2 min, 10 min at 95 °C, followed by 50 cycles of 15 s at 95 °C and 60 s at 60 °C, on ABI Prism® 7700 Sequence Detection system using SDS V.1.6.3 software (Applied Biosystems).

### 2.7. Standard curves

Ten-fold dilutions of F-specific RNA phage stocks ( $10^{-2}$ – $10^5$  PFU/mL) were made with phosphate buffer (pH 7.2) in order to construct standard curves. The dilutions were analysed by double agar layer plaque assay method to define concentration in PFU/mL. Positive and negative controls were added in each assay. The Ct values of each dilution amplified in triplicate by TaqMan PCR were plotted as a function of the logarithm of the starting quantity of phages (PFU/mL). The slope ( $s$ ) of the standard curve was used for determining the PCR efficiency ( $E$ ) in conformity with  $E = 10^{(-1/s)} - 1$  (Kubista et al., 2006). Thus, a standard curve with a slope of –3.33 corresponded to a reaction with an efficiency value of 100%.

## 3. Results

### 3.1. Real-time RT-PCR

#### 3.1.1. Primer pairs chosen by SYBR Green real-time PCR

Each of four alignment sets underlined one area suitable for the design of primer and probe sets specific for each genogroup. No one gene was initially targeted, but the selected regions corresponded to the replicase gene for GII and GIV, the capsid gene for GIII and both maturase and capsid genes for GI.

After GI and GIV sequence alignments, only one primer pair for each genogroup was selected in agreement with the guidelines. Three and four primer pairs were acceptable for genogroups II and III, respectively. Each primer pair (nine in total) was applied to 10-fold serial dilution of the representative phage, using SYBR Green in order to choose the best primer pair for TaqMan real-time RT-PCR. The final choice was based on three criteria: the melting temperature ( $T_m$ ) of

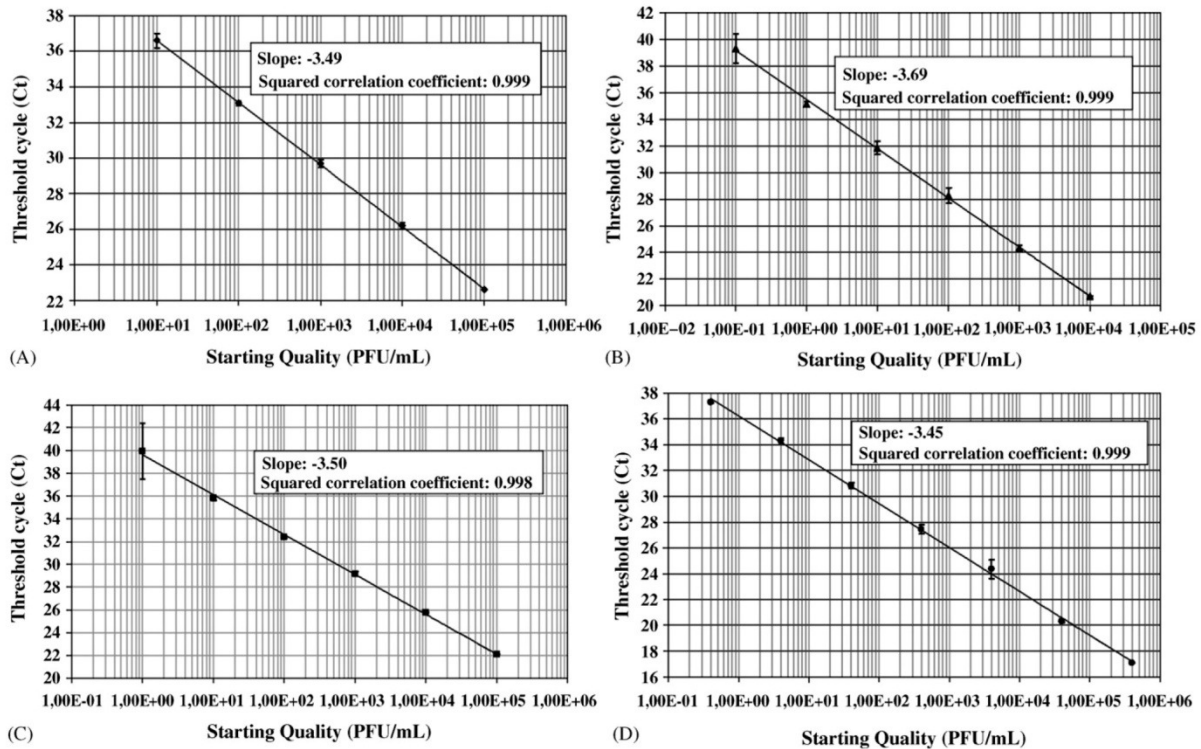


Fig. 1. Standard curves for F-specific RNA bacteriophage genogroups using TaqMan real-time RT-PCR. Means and standard deviation of Ct are shown (triplicate), (A) MS2 phage (GI), (B) GA phage (GII), (C) Q $\beta$  phage (GIII), (D) SP phage (GIV).

the amplified fragment (specific or non-specific amplification), the efficiency of PCR (slope close to  $-3.33$ ) and the squared correlation coefficient of linear regression (Table 2). Among the different selected primer combinations, one for genogroup II and one for genogroup III were chosen because they provided no non-specific amplification or dissociation curves with a single peak at expected melting temperature. Moreover, these primer pairs had a slope close to  $-3.33$ . The other primer pairs provided non-specific amplification and/or multiple peaks in the dissociation curves. In the final format, the GII primer pair selected amplified a 73-base pair (bp) amplicon with melt-

ing temperature ( $T_m$ ) of  $77.4^\circ\text{C}$  (GII-A in Table 2), and the primer pair of genogroup III amplified a 116-bp fragment with  $T_m$  of  $83^\circ\text{C}$  (GIII-D in Table 2). An example of amplification profiles and melting curves for phage GA obtained by SYBR Green RT-PCR is given in Fig. 2A and B. In the target region for genogroups I and IV, only one primer pair agreed with the guidelines of choice and both also showed satisfactory results with SYBR Green PCR. The length fragment specific for GI was 169-bp and the one for phage GIV was 63-bp. The sequences of final selected primers are shown in Table 1.

Table 2  
SYBR Green real-time RT-PCR results for each selected primer pairs

| Genogroup | Primers pairs name | Melting temperature ( $T_m$ ) | Slope <sup>a</sup> | Squared correlation coefficient |
|-----------|--------------------|-------------------------------|--------------------|---------------------------------|
| GI        | –                  | $83^\circ\text{C}$            | $-3.07$            | 0.99 (3 points)                 |
| GII       | A                  | $77.4^\circ\text{C}$          | $-3.47$            | 0.99 (5 points)                 |
|           | B                  | Non-specific amplification    | –                  | –                               |
|           | C                  | Non-specific amplification    | –                  | –                               |
| GIII      | A                  | $79.1^\circ\text{C}$          | $-2.35$            | 0.98 (3 points)                 |
|           | B                  | $79.2^\circ\text{C}$          | $-2.55$            | 0.97 (3 points)                 |
|           | C                  | Non-specific amplification    | –                  | –                               |
|           | D                  | $83^\circ\text{C}$            | $-3.18$            | 0.99 (5 points)                 |
| GIV       | –                  | $80.6^\circ\text{C}$          | $-2.82$            | 0.99 (5 points)                 |

<sup>a</sup> A standard curve with a slope of  $-3.33$  corresponded to a reaction with an efficiency value of 100%.

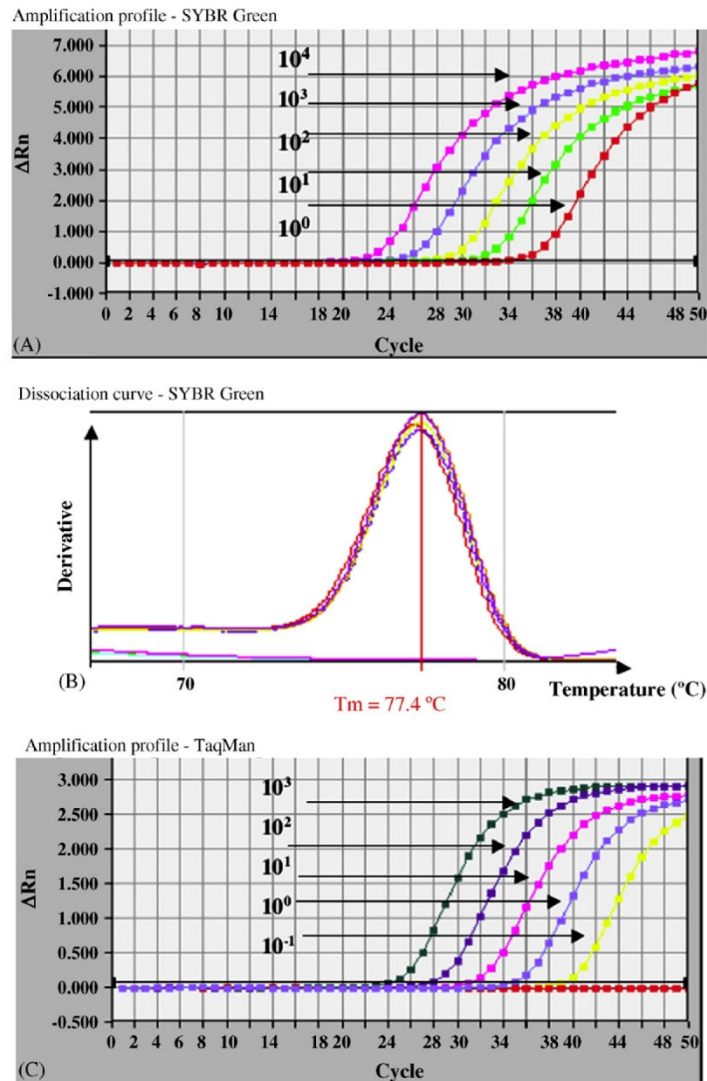


Fig. 2. Amplification profiles (A and C) and the melting curve (B) of 10-fold dilution of GA phages (genogroup II) obtained by real-time RT-PCR with GII-A primers pair. The dilution series ranged from  $10^4$  to  $10^0$  PFU/mL for SYBR Green assay (A and B) and from  $10^3$  to  $10^{-1}$  PFU/mL for TaqMan assay (C).  $T_m$ : melting temperature,  $\Delta Rn$ : fluorescence.

### 3.1.2. Efficiency of TaqMan assay

Four independent 10-fold dilution series, one for each genogroup, were prepared and tested for real-time TaqMan PCR assay with respective primers and probes. Experiments were run in triplicate. For each TaqMan assay, a linear relationship was observed between the Ct values and the starting quantity of phages. When no phage was added to the reaction tube, no Ct value was obtained. Fig. 2C shows an example of amplification profiles obtained by TaqMan real-time RT-PCR with phage GA. Fig. 1(A–D) shows the standard curves obtained for the RT-PCRs of the four specific genogroups. For phages MS2 (Fig. 1A), GA (Fig. 1B), Q $\beta$  (Fig. 1C) and SP (Fig. 1D) the slopes of the curves were, respectively,  $-3.49$ ,  $-3.69$ ,  $-3.50$  and  $-3.45$  with a squared correlation coefficient ( $R^2$ ) of 0.999 for MS2, GA and SP and 0.998 for Q $\beta$ . PCR amplification

efficiencies were then estimated to be 93, 87, 93 and 95%, respectively.

The same experiment was conducted with the FI bacteriophage belonging to genogroup IV and the results (slope and squared correlation coefficient) were similar to phage SP (data not shown).

### 3.1.3. Sensitivity of TaqMan assay

The sensitivity of TaqMan PCR assays was measured in triplicate with 10-fold serial dilution of F-specific RNA phages in phosphate buffer. The quantity of phages was measured with double agar layer plaque assay method and ranged from about  $10^5$  to  $10^{-3}$  PFU/mL. A linear response was observed from  $10^5$  to  $10^1$  for genogroup I, from  $10^5$  to  $10^{-1}$  for GII, from  $10^5$  to  $10^0$  for GIII and from  $10^5$  to  $10^{-1}$  for GIV, for each triplicate

well (100% of positive samples). An amplification curve was obtained in one well (33.3% of positive samples) for the GIV triplicate corresponding to  $10^{-2}$  PFU/mL. Then, the detection limit ranged from 1 to 10 PFU/mL for phage MS2, from 0.1 and 1 PFU/mL for phage Q $\beta$  and ranged from 0.01 and 0.1 PFU/mL for phages GA and SP.

### 3.1.4. Specificity of TaqMan assay

In the first step, the primers and probes were submitted to the BLAST test (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). For the specific genogroup forward primers, the BLAST search returned 13 (GI), 1 (GII), 10 (GIII) and 0 (GIV) sequences other than F-specific RNA phages with one to three mismatches. For the reverse primers, the BLAST search returned 3 (GI), 15 (GII), 0 (GIII) and 4 (GIV) sequences other than F-specific RNA phages with one to four mismatches. Furthermore, the mismatch sequences observed with these two BLAST tests were different. The GIV probe (16 nucleotides) was tested with the same test and no other sequence was found by the BLAST search. The GI (14 nucleotides), GII (15 nucleotides) and GIII (14 nucleotides) probes were submitted to the BLAST test for short nucleotides. For each probe, about 100 other sequences exactly the same as the F-specific RNA phages were found but, again, these sequences were not returned by the two primer BLAST tests. However, it is noteworthy that the probe and reverse primer of GI can hybridize with the B01 and ZR phages (unclassified F-specific RNA phages), which were recently sequenced in GenBank. Given that hybridization of the forward primer is necessary to allow cleavage of the probe during the extension phase, and then fluorescence emission, this PCR amplified only the expected target. Finally, the primers and probes developed in this study for each of the four different genogroups of F-specific RNA phages appear to preserve a region specific for each genogroup, which is absent in the other groups.

In the second step, the specificity of TaqMan assays was then evaluated in reaction tubes containing RNA extracted either from only one representative phage of each genogroup, or from a mixture of the four phages (MS2, GA, Q $\beta$  and SP). For each assay, the starting quantity of target phage was about  $10^2$  PFU/mL and the other phages were more concentrated (about  $10^4$  PFU/mL). The results of the cross-reactivity test are shown in Table 3. An amplification reaction was observed only in reaction tubes containing the expected phage; the presence of other viral RNA did not influence this amplification reaction. The Ct values were the same for phage alone and for mixture of phage RNA. This observation confirmed the lack of RT-PCR cross-reactivity between the different F-RNA phage genogroups.

Table 3

Ct values observed for cross-reactivity test between the four RT-PCR systems and the different F-specific RNA phages

| RT-PCR Systems | MS2 (GI) ( $10^2$ PFU/mL) | GA (GII) ( $10^2$ PFU/mL) | Q $\beta$ (GIII) ( $10^2$ PFU/mL) | SP (GIV) ( $10^2$ PFU/mL) | Mix MS2/GA/Q $\beta$ /SP <sup>a</sup> |
|----------------|---------------------------|---------------------------|-----------------------------------|---------------------------|---------------------------------------|
| Genogroup I    | 32.94                     | Negative                  | Negative                          | Negative                  | 32.61                                 |
| Genogroup II   | Negative                  | 28.11                     | Negative                          | Negative                  | 28.08                                 |
| Genogroup III  | Negative                  | Negative                  | 31.45                             | Negative                  | 31.78                                 |
| Genogroup IV   | Negative                  | Negative                  | Negative                          | 27.01                     | 27.21                                 |

<sup>a</sup> Four different mixtures were prepared, the starting quantity of expected phage was about  $10^2$  PFU/mL and the starting quantity of the others phages was about  $10^4$  PFU/mL.

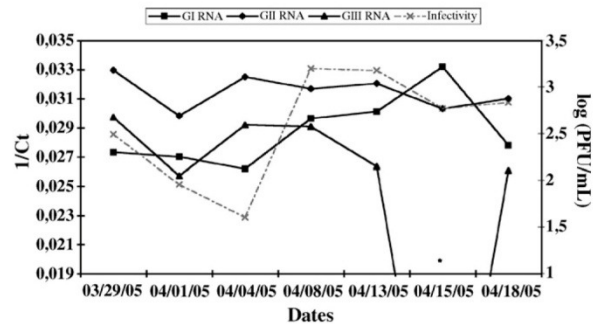


Fig. 3. Quantity of infectious F-specific RNA phages (log PFU/mL) and genogroup phage genome (1/Ct) in urban raw wastewater overtime. GIV was never detected. Asterisk (\*) denotes negative sample for GIII molecular detection.

### 3.2. Detection of F-specific RNA phages in urban raw wastewater

Seven samples were drawn during a 3-week period (about one sample every 3 days). The presence of F-specific RNA phages was evaluated by the infectivity method (double agar layer plaque assay) and by specific RT-PCRs for the genogroups. Ct values are inversely proportional to log of the starting quantity, as indicated by the negatives slopes of standard curves. Therefore, Fig. 3 represents 1/Ct for the different sampling dates and for all genogroups. Nevertheless it should be underlined that the linearity may be affected by stochastic events at low template concentration. The culture method was positive for all samples and the F-specific RNA phage concentration ranged from 1.6 to 3.2 log PFU/mL. The real-time RT-PCR assays detected GI and GII RNA in seven samples (100% positive samples), GIII RNA in six samples (85% positive samples); all samples were negative for GIV RNA. The quantity of detected genome varied greatly for GI and GIII (up to 2.5 log). This variation was lower for GII (about 1 log). The quantity of infectious viruses varied to the order of 1.5 log. It is interesting to notice that GII RNA and GIII RNA, which are supposed to be specific for human excreta, showed a similar evolution.

The relative quantity of each genogroup may be estimated using two different hypotheses. If the four RT-PCRs had different sensitivity as shown previously, it was interesting to correct Ct values using standard curves (Fig. 1). In this case, GI, GII and GIII RNA were of the same order of magnitude (<1 log difference) for all samples, except the 04/15/05. In this sample, GI RNA was 2 log units most abundant than GII RNA. GIII and GIV RNA were absent in this sample. While the four RT-PCRs exhib-



ited similar efficiency and sensitivity, explained by the presence of free RNA in different amounts between the different viral stocks, GII RNA predominated and accounted for more than 85% of the total phage RNA detected in six samples. GI and GIII RNA accounted for less than 15% of phage RNA. Depending on the samples, GI and GIII RNA were alternatively the second most predominant phage RNA. Again, in sample 04/15/05, only two phages could be found. This sample had about 90% GI RNA and 10% GII RNA. Depending on the hypothesis, the 04/15/05 sample showed a different pattern. Moreover, in this sample, concentrations of *Cryptosporidium* and *Giardia* were, respectively, 19044 oocysts/L and 10211 kysts/L. This was 4.5 and 2.5 times higher than the mean values calculated on the seven samples. This factor was, respectively, of 8.2 and 3.1 calculating the mean value without the specific 04/15/05 sample. No significant variation in *E. coli*, enterococci and infectious F-RNA phages was observed in this sample. This particular sample was obtained after a precipitation event of 8.6 mm whereas for all other samples no precipitation was observed the day before. 8.6 mm precipitation was the second most important rain event in this month.

#### 4. Discussion

Real-time amplification techniques are currently used to determine the viral contamination of many kind of samples including sea water (Brooks et al., 2005; Fuhrman et al., 2005), fresh water (Choi and Jiang, 2005; Fuhrman et al., 2005), wastewater and sewage (Le Cann et al., 2004), human or animal faeces (Jiang et al., 2005), clinical samples (Chan et al., 2006; Zhang et al., 2006) or activated sludge (Pusch et al., 2005). In fact, these non-labour intensive techniques are sensitive, specific and allow the detection of different genogroups belonging to the same viral family. For instance, Chan et al. (2006) designed a real-time RT-PCR for the detection of sapovirus GI, GII and GIII while the RT-PCR proposed by Jothikumar et al. (2005a) allowed identification of norovirus genogroups. To date, no real-time method has been described for the different genogroups of F-specific RNA bacteriophages. One study did describe a real-time RT-PCR method for the specific detection of bacteriophage MS2 (O'Connell et al., 2006), but tests were performed only with purified RNA. This "best-case" experiment was not completed with tests on real environmental samples to evaluate the efficiency and sensitivity of the PCR method. Moreover, possible cross-reactivity with other members of the *Leviviridae* family was not tested directly. PCR specificity testing was limited to BLAST trouble-shooting.

In this study, a sensitive and specific real-time RT-PCR using the TaqMan MGB probe was developed for the detection of F-specific RNA phages GI, GII, GIII and GIV in environmental water samples. This method was initially optimized with viral suspensions in phosphate buffer and then, in a second experiment, was tested on urban raw wastewater samples naturally contaminated with bacteriophages to validate the method. The aim was to obtain a method enabling detection of all known sequenced phages in each genogroup, without cross-reactivity

with other phages of the *Leviviridae* family. Selection of primers and probes was started without specifically targeting any given region of the genome, but alignment of the different sequences observed enabled identification of a specific region preserved in each genogroup.

Initially, several promising primer pairs were evaluated by real-time RT-PCR assay using the DNA-binding fluorophore SYBR Green. This method is much simpler than detection with the TaqMan probe and less expensive (Mackay et al., 2002). Consequently, more primer pairs could be tested. The specificity of the amplified product obtained with SYBR Green real-time assay is determined from the melting curve. A peak in the melting curve at the expected temperature can distinguish the target amplicon from primer dimers or other non-specific products (Ririe et al., 1997). Thus, only primer pairs with a single peak and a specific amplification were chosen.

The second step of this study was to evaluate the TaqMan real-time PCR assay with viral suspensions. Applied on 10-fold serial dilution of each genogroup of F-specific RNA phages, amplification efficiency of TaqMan assays were 93, 87, 93 and 95%, respectively, for phages MS2, GA, Q $\beta$  and SP. These values are comparable to those found in the literature. Jothikumar et al. (2005a,b) observed RT-PCR efficiency ranging between 92 and 100% for different genotypes of hepatitis A virus, and between 89 and 95% for genogroups of norovirus. Zhang et al. (2006) obtained a RT-PCR efficiency of 94–100% with human astrovirus. The sensitivity of the TaqMan assays was variable over the four genogroups in regard to the initial viral suspension titration. The genogroup I specific PCR was the least sensitive with a detection limit in the 1–10 PFU/mL range, while other systems showed a detection limit of 0.1–1 PFU/mL for GIII and 0.01–0.1 for GII and GIV. However, it is usually very difficult to generalize comparison between PFU and genome quantity (Gassilloud and Gantzer, 2005). This difference of sensitivity can be explained by a variable quantity of free RNA (usually with ratios to the order of 1–1000) in the four viral stocks or by a variation in relative RT efficiency. That's why, the RT enzyme choice was very important. Nevertheless, these detection limits should enable the detection of the four genogroups in view of the high concentration of F-specific RNA phages present in wastewater. This concentration can reach 10<sup>6</sup> PFU/100 mL (Chung et al., 1998; Long et al., 2005). In environmental waters (sea and fresh waters) the concentration of F-specific RNA phages is lower, below 10<sup>2</sup> PFU/mL (Skraber et al., 2002; Lee et al., 1997). Therefore, in some extreme cases, a concentration step can be necessary before the F-specific RNA phages molecular detection.

The specificity of the four RT-PCR assays was shown by the absence of cross-reactivity between the different genogroups of *Leviviridae*. The efficiency of real-time PCR (87–95%), the linearity of the standard curves ( $R^2 = 0.999$ ) and the specificity of each system enabled validation of these techniques for the detection of F-specific RNA phages.

The third step of this study was carried out with urban raw wastewater, a complex medium potentially containing inhibitors of PCR. All four optimised RT-PCR methods were found to be applicable for urban raw wastewater. RNA phages belonging to the *Leviviridae* family were detected. Only three genogroups,

GI, GII, and GIII, were detected: GI and GII in 100% of samples and GIII in 85% of samples. GIV genome was never found. There could be two reasons for the lack of GIV RNA detection: real absence of GIV phages or inhibition of GIV specific RT-PCR. Jiang et al. (2005) explain that the efficiency of real-time PCR can be reduced by increasing the concentration of complex organic material in the sample. In this situation, this would be highly unlikely since all four RT-PCRs were performed with the same protocol, the same reagents and especially the same samples, so that inhibition would have occurred for all genogroups. But large quantities were detected for three genogroups. In addition, the genogroup IV RT-PCR showed the best sensitivity and efficiency on viral stock. It was hypothesized that inhibition would be the same for all samples, allowing relative comparison. For the samples used in this study, considering the hypothesis of an identical sensitivity for each RT-PCR, GII was the most abundant (about 90%) in six wastewaters while GI or GIII were measured in the 1–15% range. Other studies have shown that GII and GIII predominance is mainly associated with human pollution (Cole et al., 2003; Long et al., 2005; Schaper and Jofre, 2000). Under the second hypothesis (different sensitivity), the three present genogroups were found in similar quantity. Both hypotheses could be made with the wastewater, which was used (urban wastewater which may be influenced by horse raising activities). Nevertheless, whatever the hypothesis was, in one sample, GI became predominant (at least 90%), but GII was still present (under 10%). In this sample, classic faecal indicators (*E. coli*, enterococci) or even F-specific RNA phages quantified by culture showed no change in global faecal pollution. Nevertheless, there was a strong increase in *Giardia* and *Cryptosporidium* concentration (8- and 3-fold, respectively). This was a sporadic situation since 3 days earlier and 3 days later the corresponding concentrations were well within the mean values (*Cryptosporidium* 4182 oocyst/L and *Giardia* 4075 kyst/L for the period 11/04/05–22/04/05). The prevalence of *Giardia* and *Cryptosporidium* infection in horses is high: 15–35% for *Giardia* (Olson et al., 1997; Xiao and Herd, 1994) and 8–11.5% for *Cryptosporidium* (Majewska et al., 2004; Sturdee et al., 2003). Since the samples were drawn at a site near a racetrack, this increase could be related to the presence of racehorses whose geographic location changes rapidly.

In summary, the real-time TaqMan RT-PCR assays described in this study provide a sensitive, specific, reproducible and rapid method for detection of F-specific RNA phage genogroups (GI, GII, GIII and GIV). This technique shows promise for determining the source of faecal pollution in raw wastewater and environmental waters. The next step will be to synthesise an internal control to evaluate the real quantity of F-specific RNA bacteriophage genogroups present in the water and to analyse a more significant number of samples from human and animal faecal pollution.

#### Acknowledgements

The authors thank the National Research Fund of Luxembourg for its support (SECAL Programme—FNR/03/07/07), Anjou Recherche for microbiological analysis and providing

wastewater samples, and Meteo France for providing precipitation values.

#### References

- Anon., 1997. ISO 10705-1. Water Quality—Detection and Enumeration of Bacteriophages. Part 1. Enumeration of F-Specific RNA Bacteriophages. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- Bollback, J.P., Huelsenbeck, J.P., 2001. Phylogeny, genome evolution and host specificity of single-stranded RNA bacteriophage (family *Leviviridae*). *J. Mol. Evol.* 52, 117–128.
- Brion, G.M., Meschke, J.S., Sobsey, M.D., 2002. F-specific RNA coliphages: occurrence, types, and survival in natural waters. *Water Res.* 36, 2419–2425.
- Brooks, H.A., Gersberg, R.M., Dhar, A.K., 2005. Detection and quantification of hepatitis A virus in seawater via real-time RT-PCR. *J. Virol. Methods* 127, 109–118.
- 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. *J. Virol. Methods* 134, 146–153.
- Choi, S., Jiang, S.C., 2005. Real-time PCR quantification of human adenoviruses in urban rivers indicates genome prevalence but low infectivity. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 7426–7433.
- Chung, H., Jaykus, L.A., Lovelace, G., Sobsey, M.D., 1998. Bacteriophages and bacterial as indicators of enteric viruses oysters and their harvest waters. *Water. Sci. Technol.* 38, 37–44.
- Cole, D., Long, S.C., Sobsey, M.D., 2003. Evaluation of F+RNA and DNA coliphages as source-specific indicators of fecal contamination in surface waters. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 6507–6514.
- 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. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 4523–4530.
- Gassilloud, B., Gantzer, C., 2005. Adhesion-aggregation and inactivation of poliovirus 1 in groundwater stored in a hydrophobic container. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 912–920.
- Grabow, W.O.K., 2001. Bacteriophages: update on application as models for viruses in water. *Water S.A.* 27, 251–268.
- Griffin, D.W., Stokes, R., Rose, J.B., Paul III, J.H., 2000. Bacterial indicator occurrence and the use of an F+specific RNA coliphage assay to identify fecal sources in Homosassa Springs, Florida. *Microb. Ecol.* 39, 56–64.
- Havelaar, A.H., van Olphen, M., Drost, Y.C., 1993. F-specific RNA bacteriophages are adequate model organisms for enteric viruses in fresh water. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 2956–2962.
- Hsu, F.-C., Shieh, Y.-S.C., van Duin, J., Beekwilder, M.J., Sobsey, M.D., 1995. Genotyping male-specific RNA coliphages by hybridization with oligonucleotide probes. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 3960–3966.
- IAWPRC, 1991. Bacteriophages as model viruses in water quality control. *Water Res.* 25, 529–545.
- Jiang, S., Dezfulian, H., Chu, W., 2005. Real-time quantitative PCR for enteric adenovirus serotype 40 in environmental waters. *Can. J. Microbiol.* 51, 393–398.
- Jothikumar, N., Lowther, J.A., Henshilwood, K., Lees, D.N., Hill, V.R., Vinjé, J., 2005a. Rapid and sensitive detection of noroviruses by using TaqMan-based one-step reverse-transcription PCR assays and application to naturally contaminated shellfish samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 1870–1875.
- Jothikumar, N., Cromeans, T.L., Sobsey, M.D., Robertson, B.H., 2005b. Development and evaluation of a broadly reactive TaqMan assay for rapid detection of hepatitis A virus. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 3359–3363.
- Kubista, M., Andrade, J.M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonak, J., Lind, K., Sindelka, R., Sjoback, R., Sjogreen, B., Stromborg, L., Stahlberg, A., Zoric, N., 2006. The real-time polymerase chain reaction. *Mol. Aspects Med.* 27, 95–125.
- Le Cann, P., Ranarijaona, S., Monpoeho, S., Le Guyader, F., Ferré, V., 2004. Quantification of human astroviruses in sewage using real-time RT-PCR. *Res. Microbiol.* 155, 11–15.
- Leclerc, H., Edberg, S., Pierzo, V., Delattre, J.M., 2000. Bacteriophages as indicators of enteric viruses and public health risk in groundwaters. *J. Appl. Microbiol.* 88, 5–21.

- Lee, J.V., Dawson, S.R., Ward, S., Surman, S.B., Neal, K.R., 1997. Bacteriophages are a better indicator of illness rates than bacteria amongst users of a white water course fed by a lowland river. *Water. Sci. Technol.* 35, 165–170.
- Long, S.C., El-Khoury, S.S., Oudejans, S.J.G., Sobsey, M.D., Vinjé, J., 2005. Assessment of sources and diversity of male-specific coliphages for source tracking. *Environ. Eng. Sci.* 22, 367–377.
- Mackay, I.M., Arden, K.E., Nitsche, A., 2002. Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Res.* 30, 1292–1305.
- Majewska, A.C., Solarczyk, P., Tamang, L., Graczyk, T.K., 2004. Equine *Cryptosporidium parvum* infections in western Poland. *Parasitol. Res.* 93, 274–278.
- Miyake, T., Haruna, I., Shiba, T., Ito, Y.H., Yamane, K., 1971. Grouping of RNA phages based on the template specificity of their RNA replicases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 68, 2022–2024.
- Morinigo, M.A., Wheeler, D., Berry, C., Jones, C., Munoz, M.A., Cornax, R., Borrego, J.J., 1992. Evaluation of different bacteriophage groups as fecal indicators in contaminated natural waters in southern England. *Water Res.* 26, 267–271.
- O'Connell, K.P., Bucher, J.R., Anderson, P.E., Cao, C.J., Khan, A.S., Gostomski, M.V., Valdes, J.J., 2006. Real-time fluorogenic reverse transcription-PCR assays for detection of bacteriophage MS2. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 478–483.
- Olson, M.E., Thorlakson, C.L., Deselliers, L., Morck, D.W., McAllister, T.A., 1997. *Giardia* and *Cryptosporidium* in canadian farm animals. *Vet. Parasitol.* 68, 375–381.
- Osawa, S., Furuse, K., Watanabe, I., 1981. Distribution of ribonucleic acid coliphages in animals. *Appl. Environ. Microbiol.* 41, 164–168.
- Pusch, D., Ihle, S., Leubhn, M., Graeber, I., Lopez-Pila, J.M., 2005. Quantitative detection of enteroviruses in activated sludge by cell culture and real-time RT-PCR using paramagnetic capturing. *J. Water Health* 3, 13–24.
- Ririe, K.M., Rasmussen, R.P., Wittwer, C.T., 1997. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Anal. Biochem.* 270, 154–160.
- Schaper, M., Jofre, J., 2000. Comparison of methods for detecting genotypes of F-specific RNA bacteriophages and fingerprinting the origin of faecal pollution in water samples. *J. Virol. Methods* 89, 1–10.
- Schaper, M., Jofre, J., Uys, M., Grabow, W.O.K., 2002. Distribution of genotypes of F-specific RNA bacteriophages in human and non-human sources of faecal pollution in South Africa and Spain. *J. Appl. Microbiol.* 92, 657–667.
- Scott, T.M., Rose, J.B., Jenkins, T.M., Farrah, S.R., Lukasik, J., 2002. Microbial source tracking: current methodology and future directions. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 5796–5803.
- Skraber, S., Gantzer, C., Maul, A., Schwartzbrod, L., 2002. Fate of bacteriophages and bacterial indicators in river water. *Water Res.* 36, 3621–3629.
- Sturdee, A.P., Bodley-Tickell, A.T., Archer, A., Chalmers, R.M., 2003. Long-term study of *Cryptosporidium* prevalence on a lowland farm in the United Kingdom. *Vet. Parasitol.* 116, 97–113.
- Sundram, A., Jumanlal, N., Ehlers, M.M., 2006. Genotyping of F-RNA coliphages isolated from wastewater and river water samples. *Water S.A.* 32, 65–70.
- USEPA-821-R-01-025, 2001. Method 16223: *Cryptosporidium* and *Giardia* in water by filtration/IMS/FA. US Environmental Protection Agency, Office of Water, Washington, DC, p. 20460.
- Vinjé, J., Oudejans, S.J.G., Stewart, J.R., Sobsey, M.D., Long, S.C., 2004. Molecular detection and genotyping of male-specific coliphages by reverse transcription-PCR and reverse line blot hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 5996–6004.
- Watzinger, F., Ebner, K., Lion, T., 2006. Detection and monitoring of virus infections by real-time PCR. *Mol. Aspects. Med.* 27, 254–298.
- Xiao, L., Herd, R.P., 1994. Epidemiology of equine *Cryptosporidium* and *Giardia* infections. *Equine. Vet. J.* 26, 14–17.
- Zhang, Z., Mitchell, D.K., Ajijlerbach, C., Jakab, F., Walter, J., Zhang, Y.J., Staat, M.A., Azimi, P., Matson, D.O., 2006. Quantitation of human astrovirus by real-time reverse-transcription-polymerase chain reaction to examine correlation with clinical illness. *J. Virol. Methods* 134, 190–196.

Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

Journal of Virological Methods 143 (2007) 122

[www.elsevier.com/locate/jviromet](http://www.elsevier.com/locate/jviromet)

## Erratum

Erratum to “Development of real-time RT-PCR methods for specific detection of F-specific RNA bacteriophage genogroups: Application to urban raw wastewater”  
[J. Virol. Meth. 138 (2006) 131–139]

Leslie Ogorzaly, Christophe Gantzer\*

Laboratoire de Chimie Physique et Microbiologie pour l' Environnement (LCPME), Virologie, UMR 7564 CNRS/Université Henri Poincaré (UHP)—Nancy 1, Faculté de Pharmacie, 5 rue Albert Lebrun, BP 80403, 54 001 Nancy Cedex, France

Available online 23 March 2007

The publisher regrets that an error occurred in Table 1. The corrected table now, appears below. The publisher would like to apologise for any inconvenience caused.

Table 1  
Primer and probe sequences for TaqMan real-time RT-PCR for detection of four F-specific RNA phage genogroups

| Genogroup   | Sequence (5'–3')            | Orientation | Nucleotides (bp) | Location               |
|-------------|-----------------------------|-------------|------------------|------------------------|
| <b>GI</b>   |                             |             |                  |                        |
| Forward     | TCGATGGTCCATACCTTAGATGC     | +           | 23               | 1255–1277 <sup>a</sup> |
| Reverse     | ACCCGTTAGCGAAGTTGCT         | –           | 20               | 1404–1423 <sup>a</sup> |
| Probe       | FAM-CTCGTCGACAATGG-MGBNFQ   | +           | 14               | 1362–1375 <sup>a</sup> |
| <b>GII</b>  |                             |             |                  |                        |
| Forward     | TGCAAACCTAACTCGGAATGG       | +           | 21               | 3273–3293 <sup>b</sup> |
| Reverse     | AGGAGAGAACGCAGGCTCTA        | –           | 21               | 3325–3345 <sup>b</sup> |
| Probe       | FAM-TCCCTCTATTTCCTC-MGBNFQ  | +           | 15               | 3304–3318 <sup>b</sup> |
| <b>GIII</b> |                             |             |                  |                        |
| Forward     | CCGCGTGGGGTAAATCC           | +           | 17               | 1412–1428 <sup>c</sup> |
| Reverse     | TTCTTACGATTGCGAGAAGGCT      | –           | 22               | 1506–1527 <sup>c</sup> |
| Probe       | FAM-AAGCGGGTGCAGTT-MGBNFQ   | +           | 14               | 1455–1468 <sup>c</sup> |
| <b>GIV</b>  |                             |             |                  |                        |
| Forward     | GCTACTAGCCTTCGTCGCAAGA      | +           | 22               | 4056–4077 <sup>d</sup> |
| Reverse     | GAAGGCACTGTCCTGAATCCA       | –           | 21               | 4098–4188 <sup>d</sup> |
| Probe       | FAM-AGGTCGGTACAAAGTG-MGBNFQ | +           | 16               | 4079–4094 <sup>d</sup> |

<sup>a</sup> Nucleotide positions based on Genbank accession number NC\_001417: MS2 phage.

<sup>b</sup> Nucleotide positions based on Genbank accession number NC\_001426: GA phage.

<sup>c</sup> Nucleotide positions based on Genbank accession number AF059242: MX1 phage.

<sup>d</sup> Nucleotide positions based on Genbank accession number X07489: SP phage.

DOI of original article: [10.1016/j.jviromet.2006.08.004](https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2006.08.004).

\* Corresponding author. Tel.: +33 3 83 682 291; fax: +33 3 83 682 301.

E-mail address: [christophe.gantzer@pharma.uhp-nancy.fr](mailto:christophe.gantzer@pharma.uhp-nancy.fr) (C. Gantzer).

0166-0934/\$ – see front matter © 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

doi:10.1016/j.jviromet.2007.02.002

## 2. MISE EN EVIDENCE DES ADENOVIRUS ET DES NOROVIRUS PAR AMPLIFICATION GENIQUE

Il est important de souligner que la phase d'adaptation des techniques d'amplification génique pour les adénovirus et les norovirus ont fait partie d'un contrat européen (VIROBATHE, 2005-2007). Ainsi, les adaptations décrites ci-dessous ont été réalisées au sein du laboratoire mais également dans 16 autres laboratoires européens.

### 2.1. Détection des norovirus et des adénovirus par double amplification : nested-PCR

Souvent, la recherche des génomes viraux dans les milieux environnementaux souffre de la faible densité en particules virales retrouvée dans ces échantillons. De nombreux auteurs ont donc tenté d'augmenter la sensibilité de ces techniques. L'utilisation d'un protocole de double amplification (nested et semi-nested PCR) permet de répondre à ces attentes. Ces techniques ont couramment été employées dans différents milieux pour la recherche des entérovirus (Puig *et al.*, 1994; Gantzer *et al.*, 1998), des norovirus (Gilgen *et al.*, 1997; Hafliger *et al.*, 1997; Green *et al.*, 1998; Beuret *et al.*, 2000) et des adénovirus (Puig *et al.*, 1994; Allard *et al.*, 2001). S'il est incontestable que ces méthodologies sont extrêmement sensibles, il est également reconnu qu'elles sont dangereuses du fait d'un risque important d'obtenir des faux positifs par le transfert inter-tube de produits amplifiés (Lina *et al.*, 1996; Muir *et al.*, 1999; Lamothe *et al.*, 2003). Par ailleurs, le risque d'obtention de faux négatifs dû à la présence d'inhibiteurs de PCR a également été largement discuté (Rose *et al.*, 1997; Schwab *et al.*, 2001; Gregory *et al.*, 2006; Rolfe *et al.*, 2007).

Dans notre étude, cette technique de double amplification est utilisée pour la mise en évidence des adénovirus humains par nested-PCR (Allard *et al.*, 2001) et celle des norovirus génogroupes I et II par semi-nested RT-PCR (Green *et al.*, 1998; Vennema *et al.*, 2002). Par rapport aux protocoles originaux et dans un souci de garantir l'absence de faux négatifs, nous avons choisi d'utiliser un contrôle interne d'amplification (IAC). Le contrôle interne est une séquence d'acides nucléiques, de même nature que la cible, qui est ajoutée à chaque échantillon et détectée simultanément avec les mêmes amorces que celles utilisées pour la détection du virus d'intérêt. Toutefois, afin de distinguer le contrôle interne de la cible, l'amplification engendre des amplicons de taille différente. La détection de cette molécule permet de témoigner que toutes les étapes de l'analyse se sont correctement déroulées. Dans le cas contraire, en l'absence d'un signal de détection, cela traduit soit un problème de technique analytique, soit l'éventuelle présence d'inhibiteurs de réactions enzymatiques dans l'échantillon analysé.

L'utilisation de ces IAC, lors d'une recherche de virus pathogènes par biologie moléculaire, nécessite une étape préliminaire d'optimisation durant laquelle il est indispensable de déterminer la concentration optimale d'utilisation afin d'éviter l'apparition d'éventuels phénomènes de compétition. En effet, l'utilisation d'un étalon interne, co-amplifiable avec les mêmes amorces de (RT)-PCR que celles de la séquence cible, peut induire ce type de phénomènes. Ainsi, il a fallu déterminer, à la fois la limite de détection de la cible et celle du contrôle interne d'amplification, puis réaliser des amplifications simultanées pour déterminer la concentration d'utilisation du contrôle interne. Ces expériences ont été réalisées, en duplicat, sur des gammes de dilutions logarithmiques (cible et étalon) dans de l'eau stérile exempte de RNase et de DNase.

Cette démarche expérimentale a été suivie aussi bien pour les adénovirus humains que pour les norovirus, à l'aide de l'adénovirus 2 et du norovirus génogroupe II, génotype 4 (Grimsby) comme virus modèles. Seuls les résultats obtenus pour les adénovirus humains sont décrits en détail puisque la même démarche a été employée pour les norovirus.

⇒ Nested PCR ciblant les adénovirus humains

L'ensemble des résultats obtenus, pour la détermination des limites de détection de chacune des cibles étudiées séparément, sont présentés dans le Tableau 25.

**Tableau 25. Limites de détection de l'adénovirus 2 et du contrôle interne correspondant par nested-PCR : le signe + représente la détection de la cible ou de l'étalon et inversement, le signe - représente une absence de détection, le signe +/- souligne un résultat contradictoire dans le duplicat.**

| Concentration virale (UFP/mL)         | 250 | 25 | 2,5 | 0,25 | 0,25 | 0,025 |
|---------------------------------------|-----|----|-----|------|------|-------|
| n = 2                                 | +   | +  | +/- | -    | -    | -     |
| Quantité d'IAC introduit par PCR (fg) | 500 | 50 | 5   | 0,5  | 0,05 | 0,005 |
| n = 2                                 | +   | +  | +   | +/-  | -    | -     |

L'ADN adénoviral est détecté jusqu'à une concentration de 25 UFP/mL, dans tous les cas et jusqu'à une concentration de 2,5 UFP/mL une fois sur deux. Pour le contrôle interne, un signal de PCR est observable chaque fois que la quantité introduite est supérieure ou égale à 5fg. Pour une quantité de 0,5fg, le signal est observable une fois sur deux. Dans ces conditions, des quantités d'IAC de 5 et 0,5fg sont testées en présence d'adénovirus pour évaluer les phénomènes de compétition. Les résultats obtenus lors de l'amplification simultanée de la cible et de l'IAC sont présentées dans le Tableau 26.

**Tableau 26. Résultats d'une amplification simultanée de la cible adénovirus et du contrôle interne introduit à une quantité finale de 0,5fg (A) ou 5fg (B).**

| A. Concentration virale (UFP/mL)   | 250 | 25 | 2,5 | 0,25 |
|------------------------------------|-----|----|-----|------|
| Signal du virus                    | +   | +  | -   | -    |
| Signal de l'étalon interne (0,5fg) | -   | -  | -   | -    |

| B. Concentration virale (UFP/mL) | 250 | 25 | 2,5 | 0,25 |
|----------------------------------|-----|----|-----|------|
| Signal du virus                  | +   | +  | -   | -    |
| Signal de l'étalon interne (5fg) | -   | -  | +   | +    |

La présence de l'étalon, à une quantité de 5fg, ne modifie pas la limite de détection de l'adénovirus 2 et ne masque pas le signal de la cible. Ainsi, 5fg de contrôle interne sont ajoutés à chaque mélange réactionnel de PCR avant l'analyse d'échantillons environnementaux.

⇒ Semi-nested RT-PCR ciblant les norovirus génogroupe II

En suivant la même démarche, il a été défini qu'une quantité de 50ag d'IAC serait ajoutée à chaque réaction lors de la détection des norovirus par semi nested RT-PCR.

⇒ Tests inter-laboratoires

La mise au point et l'application de ces méthodes de (semi) nested (RT)-PCR ont été évaluées lors d'un essai inter laboratoire dont le but était d'analyser, en aveugle, des suspensions virales. Pour ce faire, chacun des seize laboratoires européens participant à cet essai ont reçu six échantillons à tester. Après extraction des acides nucléiques, les extraits obtenus ont été dilués puis amplifiés. L'objectif pour chaque laboratoire était d'atteindre, au minimum quatre positifs sur six à une dilution de 1/10 pour les adénovirus et six positifs sur six à une dilution de 1/1000 pour les norovirus. Les résultats obtenus lors de cet essai en aveugle sont consignés dans le Tableau 27.

**Tableau 27. Tests inter laboratoire visant à valider les méthodes de (semi) nested (RT)-PCR au sein du laboratoire : dans le tableau figurent les critères d'évaluation, ainsi que les résultats obtenus au laboratoire.**

| Méthodes                     | Critères d'évaluation |                    | Résultats laboratoire |                    |
|------------------------------|-----------------------|--------------------|-----------------------|--------------------|
|                              | Dilution              | Nombre de positifs | Dilutions testées     | Nombre de positifs |
| Nested PCR adénovirus        | 1/10                  | 4 sur 6            | 1/10                  | 6 sur 6            |
|                              |                       |                    | 1/100                 | 4 sur 6            |
|                              |                       |                    | 1/1 000               | 0 sur 6            |
| Semi nested RT-PCR norovirus | 1/1 000               | 6 sur 6            | 1/100                 | 6 sur 6            |
|                              |                       |                    | 1/1 000               | 6 sur 6            |
|                              |                       |                    | 1/1 0000              | 4 sur 6            |

Au vu des résultats obtenus au laboratoire, les méthodes utilisées ont été validées et offrent donc des garanties satisfaisantes quant à la sensibilité de détection.

## 2.2. Quantification des adénovirus humains par PCR en temps réel

La quantification du génome des adénovirus humains par PCR en temps réel à partir d'échantillons environnementaux est réalisée à l'aide de la méthode développée par Hernroth *et al.* (2002). Initialement, cette PCR a été mise au point pour la détection et la quantification des adénovirus dans des prélèvements de coquillages, mais elle a également été largement utilisée dans différentes matrices hydriques comme les eaux usées, les eaux de rivière, les eaux d'estuaires, les eaux de mer et les eaux de distribution (Albinana-Gimenez *et al.*, 2006; Bofill-Mas *et al.*, 2006; Calgua *et al.*, 2008; Muscillo *et al.*, 2008). Dans le contexte de notre étude, cette méthode de détection, basée sur une chimie TaqMan, est employée uniquement avec la sonde nommée Ad(ACDEF). A l'origine, la recherche des adénovirus humains était réalisée avec l'ajout d'une seconde sonde Ad(B) permettant une meilleure détection de certaines souches d'adénovirus sérotype B. Cependant, lors de l'analyse d'échantillons environnementaux, il a été rapporté que l'utilisation des deux sondes n'améliorait pas les résultats obtenus avec la première sonde utilisée seule (Bofill-Mas *et al.*, 2006).

Un des avantages de cette technique réside dans le fait qu'elle permet la réalisation d'une quantification stricte du génome viral. En effet, lors d'une PCR en temps réel, selon la démarche expérimentale mise en place, il est possible de réaliser soit une quantification relative, soit une quantification absolue de la cible génomique. La quantification absolue, en opposition à la quantification relative qui mesure des variations de concentration, permet de déterminer le nombre de copies de génome cible au sein d'un échantillon donné (Mackay *et al.*, 2002). Plusieurs approches méthodologiques existent pour réaliser une quantification absolue. Dans le cadre de cette étude, tout comme cela a été initialement optimisé par Hernroth *et al.* (2002), l'approche choisie consiste à établir une gamme standard externe à partir d'une quantité parfaitement définie de plasmide porteur du gène d'intérêt.

D'un point de vue pratique, cette gamme standard de quantification a été réalisée et optimisée à partir de séries de dilutions logarithmiques du plasmide pBR322-Ad41 contenant un fragment porteur de la séquence complète du gène codant la protéine hexon d'un adénovirus 41 (Allard *et al.*, 1985). L'obtention de cette gamme standard a nécessité plusieurs étapes, à savoir la détermination de la masse du plasmide, la détermination de la concentration plasmidique et la détermination du nombre de copies de génome contenues dans notre suspension plasmidique après linéarisation et purification. La masse du plasmide utilisée est évaluée à l'aide de l'équation (1). La concentration en plasmide de notre échantillon, après extraction et linéarisation, est obtenue à partir de la valeur d'absorbance à 260 nm grâce à la l'équation (2).

$$(1) \quad m_{\text{pBR322Ad41}}(\text{g}) = n \times \left( \frac{\mathcal{M}}{\mathcal{N}_A} \right) = 13\,347 \times 1,096 \cdot 10^{-21} = 1,47 \cdot 10^{-17}$$

- avec :
- m : masse du plasmide (g)
  - n : taille de l'ADN plasmidique (pb)
  - $\mathcal{N}_A$  : nombre d'Avogadro ( $6,023 \cdot 10^{23}$  molécules/mole)
  - $\mathcal{M}$  : poids moléculaire moyen de l'ADN double brin : 660 g/mole

$$(2) \quad C_p = A_{260\text{nm}} \times 50$$

- avec :
- $C_p$  : concentration plasmidique ( $\mu\text{g/mL}$ )
  - $A_{260\text{nm}}$  : absorbance à 260 nm
  - 1 unité d'absorbance à 260 nm pour de l'ADN double brin correspond à 50  $\mu\text{g/mL}$   $\text{H}_2\text{O}$

Notre échantillon présente ainsi une concentration plasmidique de  $5 \cdot 10^{-3} \mu\text{g}/\mu\text{L}$ . A partir de cette valeur et de la masse du plasmide, il a donc été possible d'estimer que notre échantillon contenait  $3,42 \cdot 10^8$  copies de génome par microlitre. A partir de ce stock d'ADN plasmidique, nous avons réalisé des gammes de dilutions logarithmiques, en triplicat, afin d'effectuer les tests d'amplification permettant d'obtenir la gamme étalon nécessaire à la quantification par PCR en temps réel. La Figure 17 illustre les résultats obtenus.



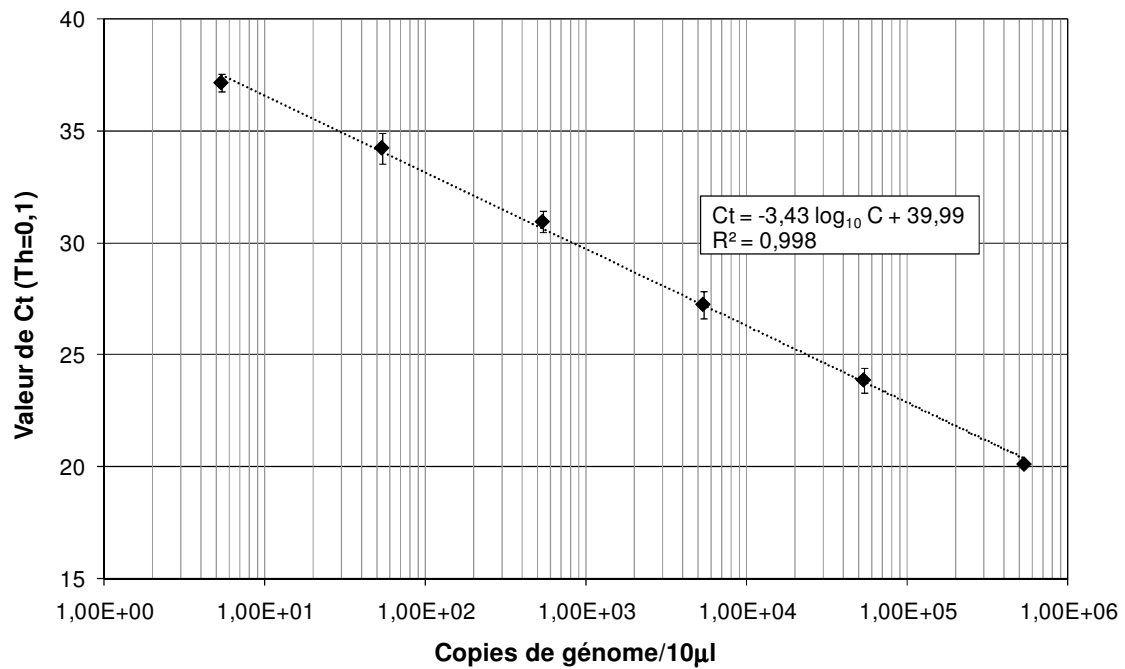


Figure 17. Gamme standard permettant la quantification absolue du génome d'adénovirus, obtenue à partir des dilutions logarithmiques du plasmide pB322-Ad41 porteur du gène d'intérêt (n=3).

La pente de la droite standard obtenue est de -3,43 avec un coefficient de détermination de 0,998. D'après la valeur de la pente, le rendement de PCR en temps réel ciblant les adénovirus est estimé à 96%. Le domaine de linéarité s'étend sur 5  $\log_{10}$  avec une limite de détection comprise entre 0,5 et 5 copies de génome par réaction (10µL d'échantillon analysé). Lors de l'analyse d'échantillons environnementaux, une gamme étalon a été systématiquement ajoutée, à chaque expérimentation, afin de réaliser la quantification en génome viral des échantillons.

### 3. METHODE DE CONCENTRATION DES VIRUS A PARTIR DES EAUX

L'analyse de la pollution fécale et virale des différents types d'eau nous a conduits à devoir sélectionner une méthode de concentration adaptée aux virus pathogènes à partir d'eau de rivière, mais également une seconde méthode adaptée à la fois aux virus pathogènes et aux bactériophages ARN F-spécifiques à partir des eaux souterraines.

#### 3.1. Concentration à partir d'eau de surface

Le contrat européen Virobathe (2005-2007) avait pour objectif de développer une méthode de concentration des virus pathogènes dans les eaux de baignade. Dans la première partie du contrat, consacrée au développement méthodologique, il a été démontré que la méthode basée sur le principe d'adsorption-élution sur laine de verre était le procédé le mieux adapté pour concentrer les virus à partir d'eaux douces chargées en matières en suspension (Virobathe, en cours de publication). Celui-ci permet de concentrer les virus pathogènes à partir d'un volume de 10L d'eau de surface. Dans un premier temps, ces 10L sont ramenés à un volume de 200mL puis à un volume de 10mL grâce à une étape de floculation organique. Le concentrat obtenu, peut être analysé aussi bien par culture cellulaire (5mL) que par biologie moléculaire (5mL).

#### 3.2. Concentration à partir d'eaux souterraines

La recherche de virus à partir d'échantillons d'eaux souterraines pose d'emblée plusieurs contraintes. Les volumes d'eau à concentrer étant supérieurs à ceux utilisés pour les eaux de surface, en général supérieurs ou égaux à 50L, il devient difficilement envisageable de modifier la composition physico-chimique de l'eau (par exemple : acidification à pH 3,5 pour une concentration sur laine de verre), d'autant plus que, dans le cadre de notre étude, le prélèvement et la concentration par filtration sont réalisés simultanément au niveau du site de forage. De plus, il est également nécessaire de concentrer les phages ARN F-spécifiques avant leur détection. Ainsi, dans un souci de simplicité et de gain de temps, cette méthode de concentration doit être adaptée aussi bien aux bactériophages qu'aux virus entériques pathogènes. Or, la méthode d'adsorption-élution sur laine de verre présente un inconvénient majeur par rapport à cela. Malgré de bons rendements de concentration pour les virus entériques, de l'ordre de 70 à 100% pour les entérovirus et de 20 à 30% pour les adénovirus et les norovirus (Lambertini *et al.*, 2008), elle ne semble pas satisfaisante pour les bactériophages. En effet, Grabow (2001) rapporte que lors d'une étude précédente (1998), le rendement de concentration du phage MS2 sur ce type de support filtrant était en moyenne de 1,1% (entre 0,3 et 1,8%). L'auteur explique ce mauvais rendement par un faible taux d'adsorption à la laine de verre (entre 17 et 36%) et par une possible inactivation des particules virales lors de l'étape d'élution à un pH de 9,5.

D'autres techniques, basées sur le même principe de fonctionnement, ont été décrites pour la concentration des bactériophages, mais avec un support filtrant du type membrane électro négative ou électro positive.

C'est par exemple le cas de la méthode de concentration sur membrane en esters de cellulose chargée négativement développée par Sobsey *et al.* (1990). Cette technique a ensuite été modifiée par Sinton *et al.* (1996) et Mendez *et al.* (2004), puis utilisée pour la recherche de phages à partir d'échantillons d'eau de rivière ou d'eaux souterraines (Lucena *et al.*, 2003; Lucena *et al.*, 2006). Comme la plupart des méthodes de concentration faisant appel à une membrane électronégative, celle-ci nécessite un prétraitement de l'eau afin de favoriser l'adsorption virale. Du chlorure de magnésium est ajouté à l'échantillon d'eau à concentrer à une concentration finale de 50 mM. Dans notre étude sur les eaux souterraines, comme signalé auparavant, il est impossible d'envisager une modification de la composition physico-chimique de l'eau.

La technique de concentration utilisant une membrane électropositive a également été utilisée avec succès pour les bactériophages (Logan *et al.*, 1980; Rose *et al.*, 1984; Shields *et al.*, 1986; Borrego *et al.*, 1991), les calicivirus (Gilgen *et al.*, 1997; Huang *et al.*, 2000; Beuret *et al.*, 2002), les entérovirus (Pina *et al.*, 1998; Chapron *et al.*, 2000) ou encore les adénovirus (Pina *et al.*, 1998; Chapron *et al.*, 2000). Ce type de protocole de concentration ne nécessite aucun prétraitement de l'eau mais peut, toutefois, être affecté par la composition physico-chimique de l'eau. En effet, Lukasik *et al.* (2000) montrent, qu'à pH neutre, il est préférable d'utiliser une membrane électropositive lorsque les concentrations en ions bivalents ( $MgCl_2$ ) sont inférieures ou égales à 5mM.

En se basant sur ces connaissances et en ayant pour objectif de définir une méthode de concentration adaptée aussi bien aux bactériophages ARN F-spécifiques qu'aux virus pathogènes, nous avons sélectionné deux membranes électropositives couramment utilisées dans ce genre d'applications environnementales. Il s'agit des membranes *Zetapor SP* (Gilgen *et al.*, 1997; Beuret, 2003; Gassilloud *et al.*, 2007; Perelle *et al.*, 2009) et *Zetaplus Virosorb 1MDS* (Sobsey et Glass, 1980; Rose *et al.*, 1984; Sobsey et Hickey, 1985; Shields *et al.*, 1986; Borrego *et al.*, 1991; Jothikumar et Cliver, 1997; Lukasik *et al.*, 2000; Polaczyk *et al.*, 2007). Les caractéristiques techniques de ces deux membranes, obtenues auprès du fournisseur, sont regroupées dans le Tableau 28.

**Tableau 28. Caractéristiques des membranes électropositives testées pour la concentration des virus : ces deux membranes sont fabriquées par la société CUNO.**

| Caractéristiques                        | <i>Zetaplus VIROSORB 1MDS</i>  | <i>Zetapor SP</i>  |
|---|--|--|
| <b>Configuration</b>                    | Disque, 47 mm de diamètre  | Disque, 47 mm de diamètre  |
| <b>Matériau de construction</b>         | Cellulose + fibre de verre   | Nylon  |
| <b>Taille des pores</b>                 | -  | 0,45 µm  |
| <b>Caractéristique physico-chimique</b> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Chargée positivement, modification de la charge</li> <li>• Utilisée pour des applications où sa qualité adsorbante est nécessaire, et non pour une filtration dite mécanique par rétention de taille des molécules</li> <li>• Adsorption électrocinétique des virus entériques</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Naturellement hydrophile</li> <li>• Chargée positivement, modification apportée à la charge pour accentuer la rétention des composés chargés négativement (endotoxines, virus, fragments d'acides nucléiques...)</li> </ul> |
| <b>Référence du fournisseur</b>         | NM04711 1MDS<br>Code 3M : 70 0200 0977 8   | NM04701 045SP<br>Code 3M : 70 0200 0719 4  |

### 3.2.1. Protocole expérimental

Les expériences visant à sélectionner la membrane la plus performante ont été effectuées avec trois eaux souterraines présentant une composition chimique différente (Tableau 29). Les eaux sélectionnées présentent des concentrations moyennes en ions divalents comprises entre 2 et 9mM. Pour deux d'entre elles, cette concentration est inférieure à la limite préconisée par Lukasik *et al.* (2000).

**Tableau 29. Caractéristiques physico-chimiques des trois eaux souterraines sélectionnées. \* Données moyennes**

| Caractéristiques                        | Site 1  | Site 2  | Site 3  |
|---|---------|---------|---------|
| Calcium (mg/L)                          | 80      | 10      | 190     |
| Magnésium (mg/L)                        | 25      | 8       | 85*     |
| Sodium (mg/L)                           | ~ 5*    | 11,5    | 160-170 |
| Sulfates (mg/L)                         | 10      | 10      | 40      |
| Bicarbonates (mg/L)                     | 355     | 70*     | 1000*   |
| pH                                      | 7,2     | 7       | 6       |
| Concentration moyenne en ions divalents | ~ 2,5mM | ~ 0,5mM | ~ 8,2mM |

Les estimations des rendements de concentration ont été accomplies à l'aide de deux virus modèles: le bactériophage MS2 et l'adénovirus 2. En pratique, un litre d'eau souterraine brute est artificiellement contaminé avec une suspension virale de manière à obtenir une concentration finale d'environ 1 UFP ou NPPUC/mL. La solution obtenue, placée sous agitation, est filtrée à l'aide du dispositif de filtration décrit précédemment (Cf. Matériels et Méthodes). La cartouche de filtration est raccordée à un flacon contenant l'échantillon d'eau et la filtration est réalisée à un débit fixe d'environ 30 litres par heure. A l'issue de la filtration, la membrane est directement soumise à l'étape d'extraction des acides nucléiques à l'aide du kit Nuclisens (Biomérieux, réf. 200293). La détection des virus et le calcul du rendement de la méthode de concentration sont, par conséquent réalisés par les outils moléculaires (Hernroth *et al.*, 2002; Ogorzaly et Gantzer, 2006). Le rendement est estimé en comparant la quantité de virus retenus sur la membrane à la quantité introduite initialement dans l'échantillon d'eau à partir de la formule (3):

$$(3) \quad \text{Rendement de concentration (\%)} = \frac{100}{10^{\left(\frac{Ct_{(0)} - Ct_{(t)}}{s}\right)}}$$

avec : -  $Ct_{(0)}$  : Ct obtenu par PCR en temps réel pour l'échantillon d'eau artificiellement contaminée  
 -  $Ct_{(t)}$  : Ct obtenu par PCR en temps réel après extraction à partir de la membrane  
 -  $s$  : pente de la courbe standard de PCR en temps réel

### 3.2.2. Choix de la membrane électropositive

Les rendements de concentration pour le phage MS2 ont été établis respectivement à partir de trois et deux expérimentations sur les membranes *Virosorb* et *Zetapor*. Pour l'adénovirus 2, deux expérimentations ont été réalisées pour estimer le rendement de concentration avec la membrane *Virosorb*. Les résultats concernant la comparaison des membranes sont présentés sur la Figure 18 et ceux concernant la comparaison entre le phage MS2 et l'adénovirus 2 sont exposés sur la Figure 19.

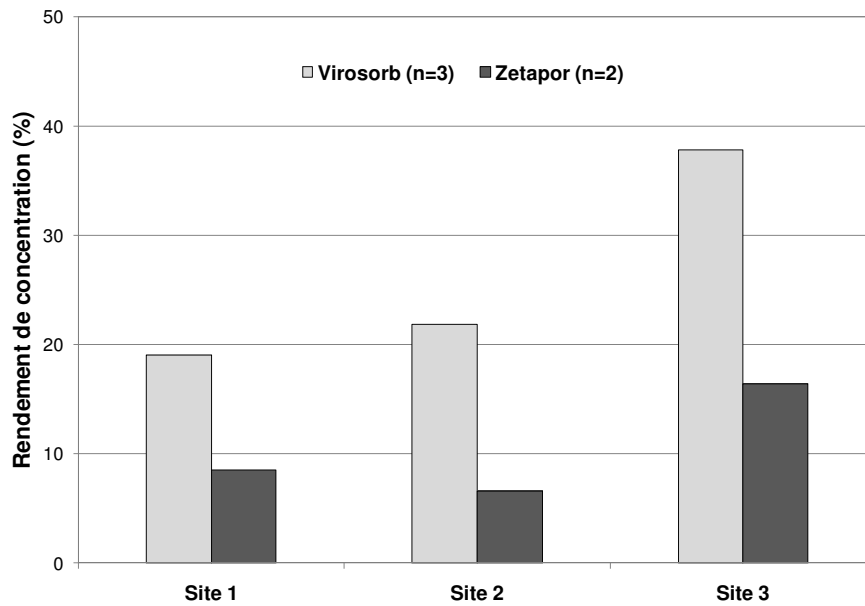


Figure 18. Comparaison des rendements de concentration (%) du phage MS2, obtenus avec les membranes *Virosorb* et *Zetapor*, pour les eaux souterraines provenant des sites 1,2 et 3.

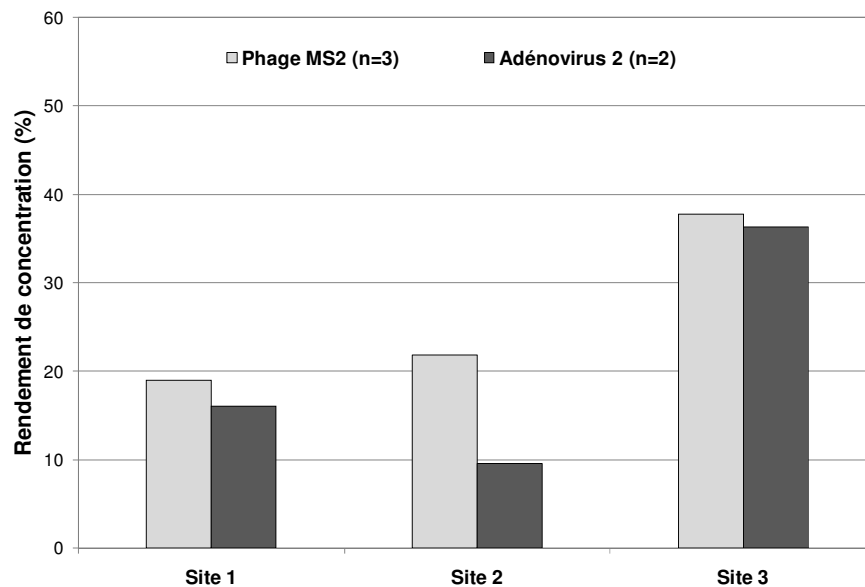


Figure 19. Comparaison des rendements de concentration (%) obtenus sur la membrane *Virosorb* avec le phage MS2 et l'adénovirus 2, pour les trois eaux souterraines provenant des sites 1, 2 et 3.

Avec la membrane *Virosorb*, les rendements de concentration obtenus pour le phage MS2 oscillent entre 20% et 40%, alors qu'avec la membrane *Zetapor* le rendement maximal observé est de 18%. Ainsi, quel que soit l'échantillon d'eau considéré, il apparaît que le rendement est toujours plus important avec la membrane *Virosorb* qu'avec la membrane *Zetapor* (Figure 18). L'analyse statistique, réalisée indépendamment du site d'étude, confirme qu'il existe bien une différence significative entre les rendements obtenus avec les deux types de membrane étudiés (test de Mann-Whitney-Wilcoxon,  $P=0,018$ ). Pour

l'adénovirus 2 et la membrane *Virosorb*, les rendements de concentration oscillent entre 10% et 40% (Figure 19) et sont donc du même ordre de grandeur que ceux obtenus avec le phage MS2 (test de Mann-Whitney-Wilcoxon,  $P=0,272$ ). Ainsi, il semble raisonnable de penser que les deux virus modèles sélectionnés se comportent de manière identique vis-à-vis de la membrane *Virosorb*. A titre de comparaison, avec ce même support filtrant, d'autres auteurs ont trouvé des rendements de concentration à partir d'eau de distribution de l'ordre de 50% pour le virus de l'hépatite A (Sobsey *et al.*, 1985), de 13 à 90% pour les *Enterovirus* (Sobsey et Glass, 1984; Ma *et al.*, 1994), de 17 à 22% pour les adénovirus (Sobsey et Glass, 1984) et de 10 à 90% pour les bactériophages (Borrego *et al.*, 1991; Polaczyk *et al.*, 2007), selon les protocoles d'éluion utilisés.

Dans un second temps, l'origine de l'eau utilisée, et donc sa composition physico-chimique semble influencer le rendement de concentration du phage MS2 et de l'adénovirus 2 (Figure 19), ce qui est confirmé par l'analyse statistique (test de Kruskal-Wallis,  $P=0,036$ ). Quel que soit le virus considéré, les meilleurs rendements de concentrations sont toujours obtenus lorsque les expérimentations sont réalisées avec l'eau du site 3 (tests de Mann-Whitney-Wilcoxon,  $P=0,016$  (site 1 *versus* site 2) et  $P=0,056$  (site 2 *versus* site 3)). Ces résultats n'appuient pas les conclusions de Lukasik *et al.* (2000), pour qui les membranes électropositives ne donnaient plus de bons rendements au delà d'une concentration en  $MgCl_2$  de 5mM. Toutefois, notre milieu d'étude est plus complexe que celui utilisé par ces auteurs.

\*\*\*\*\*

*En résumé, cette première partie de nos expérimentations, dédiée à une étude méthodologique, visait à définir l'ensemble des méthodes de concentration et de détection des virus à partir de différents types d'eaux. Après l'examen des techniques à notre disposition, trois points nous sont apparus comme essentiels à développer et/ou optimiser pour la réalisation de notre étude.*

*Ainsi, une nouvelle méthode de génotypage des phages ARN F-spécifiques a été développée. Cette méthode se base sur les techniques de biologie moléculaire permettant de mettre spécifiquement en évidence l'ARN des phages appartenant à un génogroupe donné. Cette méthode sera employée sur l'ensemble des échantillons environnementaux, quelle que soit leur nature.*

*Concernant la détection des virus pathogènes par des méthodes qualitatives, l'incorporation d'un contrôle interne d'amplification permet de vérifier, lors de chaque analyse, le bon déroulement des deux étapes d'amplification des nested-PCR, mais aussi et surtout de détecter la présence d'inhibiteurs dans l'échantillon. Il a été, en outre, vérifié que ce contrôle interne n'entraîne pas en compétition avec la cible virale recherchée. En utilisant cette technique, un échantillon obtenu négatif pourra donc être considéré comme réellement exempt de la cible recherchée. De plus, la réalisation d'un test inter laboratoire, à partir de suspensions virales analysées en aveugle, a permis de valider cette méthode en termes de sensibilité et de risque de faux positifs. Ces techniques seront principalement employées lors de la recherche des génomes des adénovirus et des norovirus génogroupes I et II à partir des échantillons d'eaux de rivière. Concernant le cas particulier des adénovirus humains, après leur mise en évidence par nested-PCR, ils pourront également être quantifiés par PCR en temps réel. Cette quantification stricte du nombre de copies de*

*génomique présentes dans un échantillon environnemental est rendue possible grâce à la création d'une droite d'étalonnage.*

*Enfin, pour la réalisation des concentrations des virus (bactériophages et virus pathogènes) à partir des eaux souterraines, nous avons choisi d'utiliser la technique d'adsorption-élution sur la membrane Virosorb. Cette méthode répond à toutes les contraintes de notre système expérimental et montre des rendements de concentration oscillant entre 10 et 40%, selon le type d'eau utilisé et le type de virus recherché. Pour les virus pathogènes, une étape de concentration sera également employée pour leur détection à partir d'échantillons d'eau de rivière. Il s'agit d'une méthode basée sur le principe d'adsorption-élution sur un support de laine de verre.*





*Chapitre 2 :*

*Génotypage des phages ARN F-spécifiques dans les eaux usées  
urbaines*





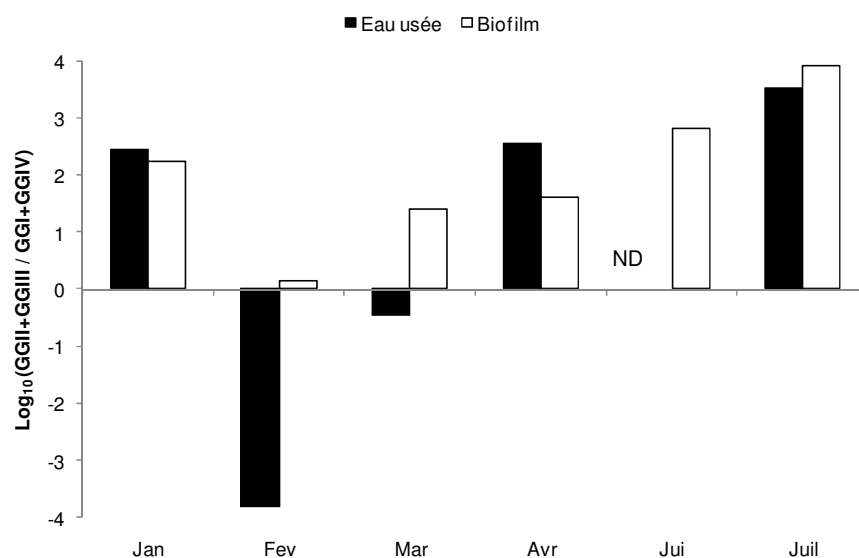
Les eaux usées constituent le premier maillon du cycle de contamination fécale et virale du milieu hydrique. C'est donc logiquement, qu'une partie de notre étude a été dédiée à une meilleure compréhension de l'écologie des phages dans ce type de milieu. Néanmoins, comme cela a auparavant été précisé dans la synthèse bibliographique, la quasi-totalité des études de génotypage ont été consacrées aux eaux usées. Il est ainsi parfaitement reconnu que les génogroupes II et III sont majoritaires dans les eaux usées urbaines, alors que ce sont les génogroupes I et IV qui prédominent dans les eaux usées animales. Ces études ont toutes été réalisées à l'aide de techniques faisant appel à une étape de culture des bactériophages. Or, la méthode de génotypage développée dans cette étude consiste à identifier, directement à partir d'un prélèvement d'eau, les différents génogroupes par RT-PCR en temps réel. Ainsi, il nous a paru important de vérifier, sur un nombre limité d'échantillons, si le génome des phages appartenant aux génogroupes II et III était bien majoritairement retrouvé dans les eaux usées urbaines.

Au cours de ce travail, nous souhaitons également vérifier si, dans ce milieu particulier, le génome viral persistait plus longtemps que les particules virales infectieuses. Ceci avait pour but de valider l'hypothèse selon laquelle la réalisation d'un génotypage direct, par les outils de biologie moléculaire, permettrait de suivre la pollution fécale sur de plus longues périodes. Grâce à une collaboration avec l'institut Gabriel Lippmann (Luxembourg), qui réalise un travail sur la prévalence des virus pathogènes dans les eaux et les biofilms, nous avons pu intégrer nos questionnements à une étude plus vaste. Ainsi, les norovirus, les entérovirus et les bactériophages ARN F-spécifiques non pas été recherchés uniquement dans les eaux usées mais, pour la première fois à notre connaissance, également dans les biofilms de stations d'épuration. Cette étude nous a permis de juger si le génome des phages présentait un comportement comparable à celui des virus pathogènes, et plus largement, si les biofilms pouvaient constituer un réservoir de virus. L'ensemble des résultats obtenus sont présentés dans un article scientifique actuellement soumis à *Water Research*.

## **1. DISTRIBUTION DES GENOGROUPES DE PHAGES ARN F-SPECIFIQUES DANS LES EAUX USEES ET LES BIOFILMS**

Six prélèvements d'eaux usées et de biofilms, répartis de janvier à juillet 2006, ont été réalisés au niveau de la station d'épuration d'Hesperange (Luxembourg). Ces échantillons ont été analysés par la méthode des plages de lyse et par RT-PCR en temps réel. Dans l'eau usée et les biofilms, les concentrations moyennes en phages ARN F-spécifiques sont respectivement de  $1,5 \cdot 10^3$  UFP/mL et de  $6,30 \cdot 10^1$  UFP/cm<sup>2</sup>.

Sous l'hypothèse d'une sensibilité équivalente des quatre RT-PCR, spécifiques de chaque génogroupes, il est possible de comparer la quantité de phages appartenant à chaque génogroupes, mais également la répartition des différents génogroupes au sein des échantillons d'eaux usées et des échantillons de biofilms. Sur la Figure 20, sont exposées les variations de concentrations des différents génogroupes, regroupés selon leur origine fécale supposée, dans l'eau usée et dans le biofilm issus de la station d'Hesperange.

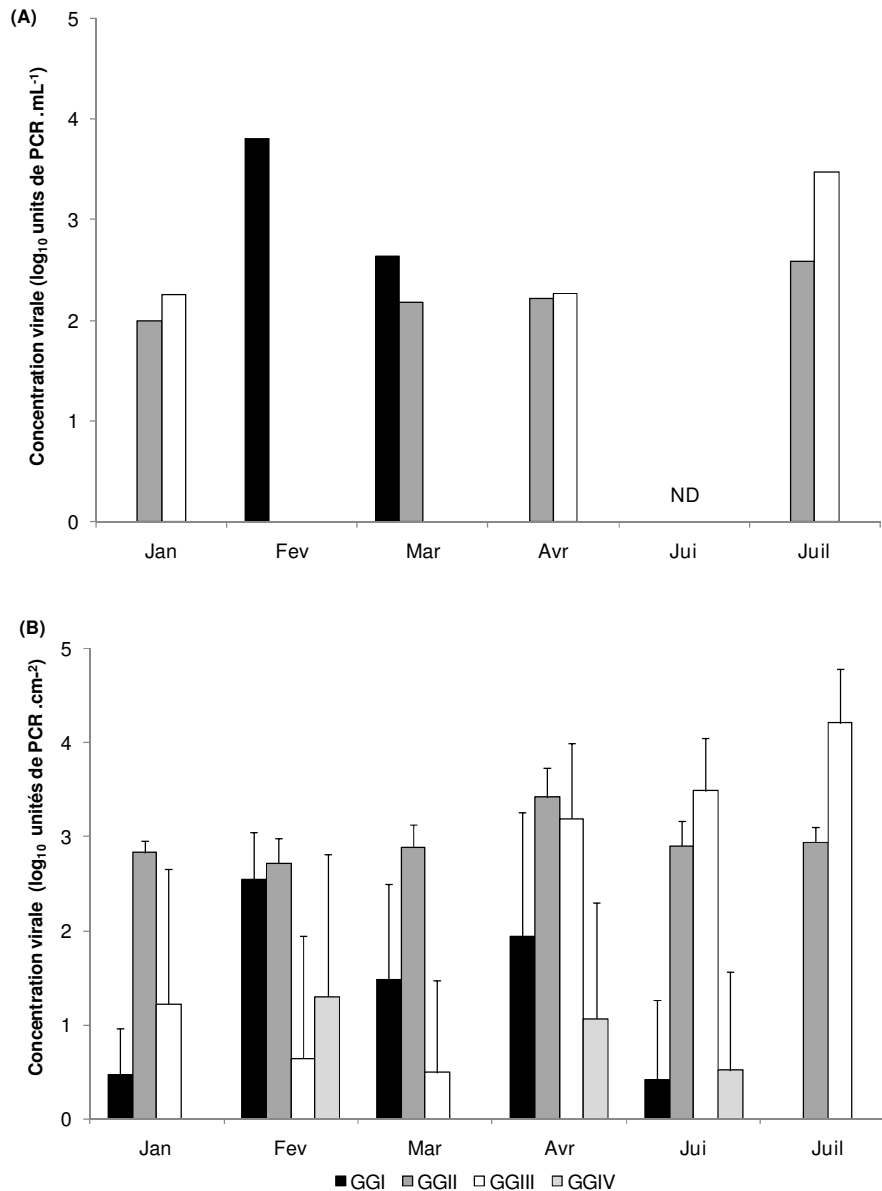


**Figure 20.** Variation du ratio des génogroupes supposés d'origine humaine et animale au cours du temps pour les prélèvements d'eau usée et de biofilms réalisés au niveau de la station d'Hesperange.

Sur la Figure 20, il apparaît que la concentration des différents génogroupes, évolue de la même manière dans les biofilms que dans l'eau usée, avec des amplitudes de variation moins importantes dans les biofilms.

Quel que soit le milieu considéré, on observe que le génogroupe II est toujours présent à une concentration stable au cours du temps, hormis au mois de février (Figure 21). Celle-ci varie de 2,0 à 2,7  $\log_{10}$  UDP/mL dans les eaux usées et de 2,7 à 3,4  $\log_{10}$  UDP/cm<sup>2</sup> dans les biofilms. Le génogroupe IV est absent des échantillons d'eaux usées et très largement minoritaire au sein des biofilms (0,5  $\log_{10}$  UDP/cm<sup>2</sup> en moyenne). Les deux autres génogroupes montrent des concentrations très variables. Dans les eaux usées, les concentrations minimales et maximales sont respectivement de 0 à 3,8  $\log_{10}$  UDP/mL et de 0 à 3,5  $\log_{10}$  UDP/mL pour le génogroupe I et le génogroupes III. De la même manière, dans les biofilms, les concentrations minimales et maximales sont respectivement de 0 à 2,5  $\log_{10}$  UDP/cm<sup>2</sup> et de 0,5 à 4,2  $\log_{10}$  UDP/cm<sup>2</sup> pour les génogroupes I et III. Concernant le génogroupe III, une augmentation de la concentration a été observée sur la période d'avril à juillet. Globalement, la répartition moyenne des génogroupes au sein des échantillons de biofilms est similaire à celle observée au niveau des échantillons d'eaux usées. Toutefois, une plus grande diversité de phages est observée au sein des biofilms (Figure 21).

De façon remarquable, la présence du génogroupe I au niveau des échantillons d'eau usée (mois de février) a pu être mise en relation avec de fortes valeurs de précipitations dans les trois jours précédents la date de prélèvement. A cette même date, les génogroupes II et III n'ont pas été mis en évidence laissant supposer une dilution de la pollution fécale par la forte pluviométrie, mais un apport de génogroupe I par des événements de ruissellement. Nous avons déjà souligné ce phénomène au niveau de la première station d'épuration étudiée (publication *Journal of Virological Methods*).



**Figure 21. Concentration des différents génogroupes au sein des échantillons d'eau usée (A) et de biofilm (B) sur un période de sept mois.**

Les prélèvements réalisés recouvrent une période de sept mois, il était alors possible d'étudier les variations de concentrations des phages ARN F-spécifiques en comparaison de celles des virus pathogènes. Pour les phages ARN F-spécifiques, les variations de concentration sont étudiées en considérant, à chaque date, le génogroupe majoritaire. De cette manière, on peut considérer que leur concentration moyenne reste stable sur la période d'étude. Pour les virus pathogènes, les prévalences saisonnières classiquement décrites dans les eaux usées ont été confirmées notamment pour le norovirus GGI et les entérovirus. Par contre, au niveau des biofilms, le génome de virus pathogènes a été détecté sur l'ensemble de la période d'analyse.

## 2. PERSISTANCE DES PHAGES ARN F-SPECIFIQUES DANS LES EAUX USEES ET LES BIOFILMS

L'expérience de persistance a été menée à partir d'échantillons d'eau et de biofilms issus de la station d'épuration de Pétange (Luxembourg). La concentration moyenne en bactériophages ARN F-spécifiques a été évaluée à  $1,30 \cdot 10^2$  UFP/mL dans les eaux usées et à  $4,97 \cdot 10^1$  UFP/cm<sup>2</sup>.

Cette étude de survie a été réalisée sur des virus « sauvages » initialement présents au sein des échantillons d'eau d'usée et de biofilm. Le choix des virus d'intérêt a donc été conditionné par les concentrations en génome viral initialement détectées dans les échantillons. Ainsi, pour les phages ARN F-spécifiques, cette étude a été effectuée à l'aide de la méthode de culture pour estimer la survie des particules virales infectieuses, mais également à l'aide de la méthode de RT-PCR en temps réel pour évaluer la persistance du génome des phages appartenant au génogroupe III et celle des norovirus génogroupe I ont pu être étudiées. Les résultats obtenus à partir des échantillons d'eau usée et de biofilms stockés à 4°C sont respectivement, illustrés sur la Figure 22 et la Figure 23.

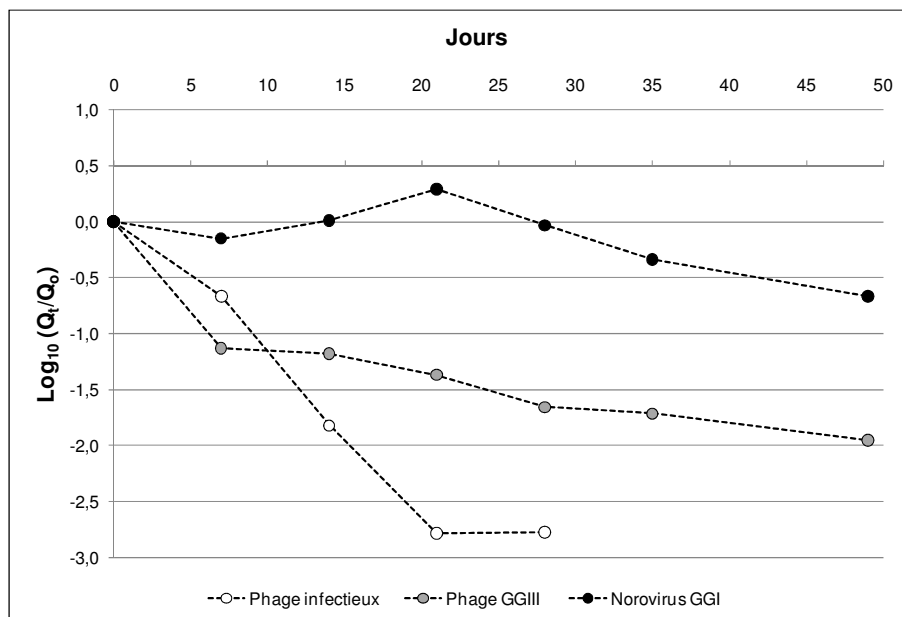
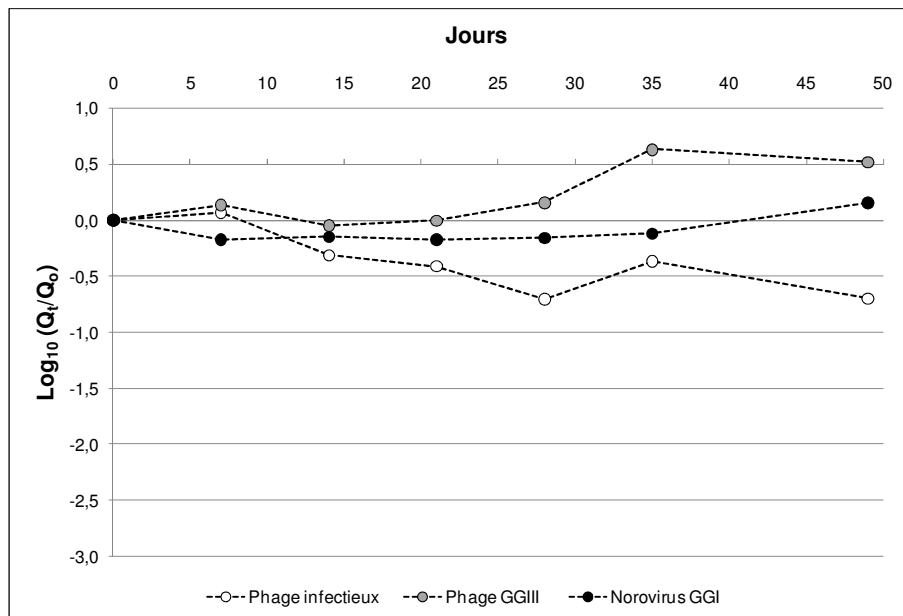


Figure 22. Cinétiques de dégradation des particules infectieuses des phages ARN F-spécifiques et du génome des bactériophages appartenant au génogroupe III (phages GGIII) et des norovirus appartenant au génogroupe I (norovirus GGI) dans l'eau usée de la station de Pétange à 4°C.



**Figure 23. Cinétiques de dégradation des particules infectieuses des phages ARN F-spécifiques et du génome des phages GGIII et des norovirus GGI dans les biofilms de la station de Pétange à 4°C.**

L'ensemble des résultats obtenus montrent que, quel que soit le type viral ou les conditions expérimentales, les particules virales tout comme le génome viral, sont plus persistantes à 4°C qu'à 20°C (Test des signes,  $P=0,03$ ) et également plus persistantes dans les échantillons de biofilm que dans l'eau usée (Test des signes,  $P=0,03$ ). Le cas des phages ARN F-spécifiques a permis de montrer que les particules virales infectieuses étaient plus rapidement inactivées que le génome et ce, dans toutes les conditions testées (t-tests,  $P<0,001$ ). Enfin, si l'on s'intéresse au comportement des deux génomes viraux en solution, il apparaît que, au niveau de l'eau usée, le génome des norovirus GGI semble plus résistant que celui des phages appartenant au génogroupe III (t-tests,  $P<0,05$ ). Ceci n'est pas le cas des échantillons de biofilms.

Article soumis à Water Research

## **Occurrence and persistence of enteroviruses, noroviruses and F-specific RNA phages in wastewater biofilms**

Skraber Sylvain<sup>1\*</sup>, Ogorzaly Leslie<sup>2</sup>, Helmi Karim<sup>1</sup>, Maul Armand<sup>3</sup>, Hoffmann Lucien<sup>1</sup>, Cauchie Henry-Michel<sup>1</sup>, Gantzer Christophe<sup>2</sup>

**Address** (1) Centre de Recherche Public - Gabriel Lippmann, Department of Environment and Agro-biotechnologies (EVA), 41 rue du Brill, L-4422 Belvaux, Luxembourg; (2) Laboratory of Physical Chemistry and Microbiology for the Environment (LCPME), UMR 7564, Nancy Université CNRS, Faculté de Pharmacie, 5, rue Albert Lebrun, F-54000 Nancy, France; (3) Université de Metz, LMAM, CNRS, UMR 7122, Ile du Saulcy, F-57045 Metz, France.

**\*Corresponding author.** Mailing address: Centre de Recherche Public - Gabriel Lippmann, Department of Environment and Agro-biotechnologies (EVA), 41 rue du Brill, L-4422 Belvaux, Luxembourg. Phone: +352 47 02 61 436. Fax: +352 47 02 64. E-mail: skraber@lippmann.lu

### **Abstract**

Enteroviruses and noroviruses are pathogenic viruses excreted by infected individuals. Discharged in wastewaters, part of these viruses can be captured by biofilms. In the present study, we assessed the occurrence and persistence of these viruses in wastewaters and in corresponding biofilms. Thus, natural wastewaters and biofilms were analyzed monthly for 6 months using real-time RT-PCR. Both enterovirus and norovirus genogroups (GG) I and II were detected in 42, 37 and 14% of the biofilm samples, respectively. Though a prevalence of enteroviruses was observed in summer and a prevalence of noroviruses was observed in winter in wastewater, both enterovirus and norovirus genomes were detected in biofilm outside the period of their prevalence in wastewater. In a laboratory experiment, persistence of enteroviruses, noroviruses and F-specific bacteriophages was assessed in wastewaters and corresponding biofilms at 4 and 20°C. F-specific bacteriophages were quantified by culture and by real-time RT-PCR considering the four genogroups. Our results demonstrate the higher persistence of both the genome and infectious F-specific phages in biofilm compared to wastewater. According to our results, wastewater biofilms may contribute to the dispersal of pathogenic viruses outside epidemic periods.

**Keywords:** *Enterovirus*, *Norovirus*, F-specific RNA phages, Genotyping, Wastewater, Biofilm,



## 1. Introduction

Pathogenic enteric viruses are excreted at high concentrations reaching up to  $10^{10}$  infectious particles per gram of faeces for long periods of time by infected persons (Leclerc et al., 2002). These viruses are further discharged in wastewaters (Lodder and Roda Husman, 2005) which represent a complex ecosystem enclosing faecal bacteria and enteric viruses including bacteriophages. The presence of pathogenic viruses in wastewaters depends on the epidemic situation in the area of sampling, which in turn can be subjected to seasonal variations. Previous observations have shown that noroviruses, which are considered as major etiological agents of gastroenteritis, are mainly detected in winter (Skraber et al., 2004; Westrell et al., 2006; Katayama et al., 2008) while enteroviruses are circulating most of the year with peaks in summer and fall (Sedmak et al., 2003; Skrabber et al., 2004; Khetsuriani et al., 2006). The level of faecal pollution in water environment is based on the detection of faecal indicators, using either classical bacterial indicators (*Escherichia coli*, *Enterococcus*) or enteric viral indicators such as F-specific RNA bacteriophages (Havelaar and Pot-Hogbeem; 1988; IAWPRC, 1991), somatic coliphages (Kott et al., 1974; IAWPRC, 1991) or phages of *Bacteroides fragilis* (Tartera and Jofre, 1987; IAWPRC, 1991). Since the excretion of these indicators occurs all year-round, their concentrations in water environment cannot be correlated to the concentrations of pathogenic viruses which in turn are related to epidemic events. Contrary to bacterial indicators that do not represent the behaviour of enteric viruses (Gerba et al., 1979; Wyer et al., 1995; Harwood et al., 2005), bacteriophages and human enteric viruses share similar physical characteristics such as the size, the shape and surface properties, which are rather different from bacteria. As a result, the behaviour of bacteriophages in water environment is likely closer to human enteric viruses than indicator bacteria. For the last decade, F-specific RNA phages have also been proposed to identify the origin of faecal pollutions (Hsu et al., 1995; Beekwilder et al., 1996). Microbial source tracking aims to improve risk assessments and help selecting effective remediation strategies to bring chronically polluted waters into compliance with regulatory policies. The F-specific RNA phages belong to the *Leviviridae* family, which is divided into two major genera: the *Levivirus* containing the genogroup I (MS2-like) and the genogroup II (GA-like) and the *Allolevivirus* containing the genogroup III (Q $\beta$ -like) and the genogroup IV (SP-like). Genogroups II and III may be more frequent in human faeces and urban wastewaters, while genogroups I and IV may be more frequent in animal faeces and waters contaminated by animal activities (Furuse et al., 1981; Havelaar et al., 1990; Schaper et al., 2002; Cole et al., 2003). Thus, determining the level of each genogroup can help tracking the source of the faecal contamination (Scott et al., 2002; Vinje et al., 2004).

In a previous study, we showed that enteric bacteriophages can transfer from wastewater to biofilms (Skraber et al., 2007). The objective of the present study was to assess if wastewater biofilms may contribute to the dissemination of pathogenic viruses outside epidemic periods. To achieve our objective, we assess the monthly occurrence of enteroviruses, noroviruses and F-specific RNA phages in wastewater biofilms during a 6 months monitoring period. Viral occurrence was assessed in 1- and 24-month old biofilms in order to compare short- and long-term contamination. In parallel, a lab experiment was conducted in order to assess the persistence of these viruses in wastewater and corresponding biofilm at 4 and 20°C. Viral detection was carried out using real-time RT-PCR protocols for enteroviruses, noroviruses GG I & GG II and F-specific RNA phages (GG I, II, III and IV) as well as standardized culture techniques for F-specific RNA phages. Results obtained from F-specific RNA phage analyses allow discussing (i) the persistence of the

genome compared to the infectious particles (ii) the origin of faecal pollution based on the prevalence of the four genogroups during the occurrence assessment.

## **2. Materials and methods**

### **2.1. Viral occurrence in wastewater and corresponding biofilms**

Occurrence of viral genome has been assessed in biofilms that develop on 1 cm-diameter polyethylene carriers exhibiting a surface of 7 cm<sup>2</sup> in a moving-bed biofilm reactor (MBBR) (COFIDO S.A., Belgium) located in Hespérange treatment plant, Luxembourg (Plattes et al., 2007). This MBBR was installed more than 2 years before the beginning of this experiment and is composed of two successive compartments. For the present study, only the first compartment receiving primarily treated wastewaters was considered. This compartment, with a volume of 2.8 m<sup>3</sup> and 510,000 carriers occupying 50% of the total filling volume, is anoxic and mechanically stirred with an average hydraulic residence time of about 4 hours. One month preceding each sampling day, new carriers were introduced into compartment 1 of the MBBR confined within a cage where water can freely circulate. On each sampling day, carriers colonized with recent biofilm (1-month old) as well as carriers colonized with mature biofilms (24-month old biofilm colonizing carriers being in the MBBR for at least 2 years) were collected monthly in order to compare short- and long-term contamination during a 6-months monitoring period. Kept at 4 °C, the carriers were transported to the laboratory where biofilms were eluted (see elution protocol below). Eluates were aliquoted and stored at -80 °C until being analyzed by molecular biology.

### **2.2. Viral persistence in wastewater and corresponding biofilms**

Viral persistence was assessed according to an experimental protocol previously described (Skraber et al., 2007). Briefly, a set of 5x15 cm removable Polyvinyl Chloride (PVC) coupons was immersed in raw wastewater of a treatment plant. After 2 months of setting in the treatment plant, four PVC coupons colonized with wastewater biofilms were collected in four 1-liter bottles filled up with sterile Phosphate Buffer Saline (PBS) pH=7.4 and kept at 4 °C. At the laboratory, each coupon was transferred in a new 1-liter bottle filled up with sterile PBS and incubated in duplicate at 4 and 20 °C. In addition, wastewater collected at the same time was distributed in 4 flasks and placed under magnetic stirring (~100 rpm) at 4 and 20 °C in duplicate (250 ml per flask). Two square centimetres of biofilm (see elution protocol below) and 10 ml of wastewater were analyzed weekly during a two-months monitoring period. Eluates and wastewaters were analyzed directly for infectious F-specific bacteriophages while aliquots were stored at -80 °C until being analyzed by molecular biology.

### **2.3. Biofilm elution**

During the occurrence experiment, one polyethylene carrier was directly resuspended in 5 ml of eluant (1% pasta beef extract [Difco, Sparks, MD], 0.4% glycine at pH=9.5) in a 15 ml centrifuge tube (Falcon). During the persistence experiment, 2 cm<sup>2</sup> of biofilm colonizing a PVC coupon was scrapped using a sterile blade and resuspended in 5 ml of eluant in a 15 ml centrifuge tube (Falcon). In both cases, biofilm and eluant

were vortexed at full speed (2,600 rpm) for 1 min before being centrifuged at 3,000 x g for 10 min (the polyethylene carrier was removed from the tube prior this centrifugation step). The pH of the supernatant was neutralized either by 10-fold dilutions in PBS (pH=7.4) for infectious bacteriophage enumerations or by adding HCl 1N in the non diluted sample aliquots before being stored at -80 °C and analyzed within 6 months for viral genome detection. All samples were made at least in duplicate.

## 2.4. Biofilm characterisation

### 2.4.1. Total bacteria and protein quantification

Total bacteria and proteins were quantified as described earlier (Skraber et al., 2007) and results are expressed in unit.cm<sup>-2</sup> and in µg.cm<sup>-2</sup>, respectively.

### 2.4.2. Infectious F-specific bacteriophages

Infectious F-specific bacteriophages were quantified using the bacterial host strains *Salmonella enterica* serovar Typhimurium WG49 according to the standardized method (ISO 10705-1, 2001).

### 2.4.3. Viral genome extraction protocol

Hundred and forty microlitres of sample (wastewater or biofilm eluate) were mixed with 560 µl of AVL lysis buffer (Qiagen, Hilden, Germany) containing 5.6 µg of carrier RNA. For samples with internal positive control (IPC), the mix was completed with 2.4 µl of a 1000 fM IPC solution in order to obtain a theoretical concentration of 40 fM in the extract, assuming 100% recovery (equivalent to 0.06 pg of IPC). This concentration allows the quantification of the IPC without competition with the enterovirus target even at low concentration (data not shown). The IPC is an original 80-nucleotide sequence designed to amplify with the norovirus GGII primers (JJV2F/COG2R) and to be detected with a specific probe (Table 1). The mix was pulse-vortexed and left for 10 min at room temperature. The total volume was centrifuged at 6,000 x g for 1 min and the supernatant was then homogenized and clarified through a QIAshredder column (Qiagen, Hilden, Germany) by centrifugation at 6,000 x g for 1 min. Five hundred and sixty microlitres of ethanol were added to the filtrate and viral RNA was further extracted using the QIAmp viral RNA kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. Hence, 60 µl of final extracted RNA solution were obtained.

### 2.4.4. Quantification of viral genomes

The RNA of noroviruses GG I and GG II were detected using two distinct one-step RT-PCRs with primers and probes described in Table 1. Briefly, 5 µl of extracted RNA was added to 20 µl of One step RT-qPCR MasterMix plus low ROX (Eurogentec, Seraing, Belgium) resulting in a final concentration of 1 X reaction buffer, 0.25 U.ml<sup>-1</sup> of Euroscript, 0.1 U.ml<sup>-1</sup> of RNase inhibitor, 1,000 nM of each primer and 100 nM of probe. The one-step RT-PCR was performed in an ABI Prism 7500Fast (Applied Biosystems). Reverse transcription was performed at 48 °C for 30 min. RNA-DNA hybrids were denatured, reverse transcriptase

was inactivated and the activity of the HotGoldStar DNA polymerase was released by heating to 95°C for 10 min. Samples were then submitted to 50 cycles (15 s at 95°C and 1 min at 60°C). All data were analyzed using the SDS v1.3.1 software (Applied Biosystems).

Enteroviruses and IPC were simultaneously detected using a two-step RT-PCR with random hexamers for the RT-step and specific primers and probes for the multiplex PCR-step (Table 1). Briefly, the reverse-transcription was performed adding 5 µl of extracted RNA to a mix (TaqMan reverse transcription reagents, Applied Biosystems, Branchburg, NJ) containing a final concentration of 1X TaqMan RT Buffer, 5.5 mM of MgCl<sub>2</sub>, 500 µM of each dNTP, 2.5 µM of random hexamers, 0.4 U.µl<sup>-1</sup> of RNase inhibitor, 1.25 U.µl<sup>-1</sup> of Multiscribe RT and 0.1 µg.µl<sup>-1</sup> of T4gene32. Reverse transcription was performed in a Whatman Biometra thermocycler at 20°C for 10 min followed by 42°C for 50 min. RNA-DNA hybrids were denatured and reverse transcriptase was inactivated by heating to 95°C for 5 min. For the PCR-step, 5 µl of cDNA were added to 20 µl of a qPCR MasterMix plus low ROX (Eurogentec, Seraing, Belgium) resulting in a final concentration of 1X MasterMix, 500 nM of Ev1 primer, 400 nM of Ev2 primer, 120 nM of Ev-P probe and 120 nM of CIPC probe. The real-time PCR assay was performed in an ABI Prism 7500Fast (Applied Biosystems). The activity of the HotGoldStar DNA polymerase was released by heating to 95°C for 10 min. The samples were then submitted to 50 cycles (10 s at 95°C, 30 s at 55°C and 15 s at 72°C). All data were analyzed using the SDS v1.3.1 software (Applied Biosystems). The IPC was used to simultaneously assess the efficiency of the extraction protocol and the presence of inhibitors in the extracts. IPC recovery rates after extraction, RT and PCR steps were calculated by comparing the measured concentration to the theoretical concentration of 40 fM (equivalent to 5.10<sup>-3</sup> pg per 5 µl of extract). The extraction and the RT-PCR efficiencies were considered as acceptable (1 to 10%) or good (>10%) as previously described (da Silva et al., 2007).

Detection of the genome of F-specific bacteriophage GG I, II, III and IV was performed using the protocol described earlier (Ogorzaly and Gantzer, 2006). Amplifications were performed in a 50-µL reaction solution with TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), on ABI Prism 7700 Sequence Detector using SDS v.1.6.3 software (Applied Biosystems).

TE buffer and water RNase DNase free were used as negative control during RT and PCR reactions while Southampton (*Norovirus* GG I.2), Oberschleissheim (*Norovirus* GG II.4), Bristol (*Norovirus* GG II.4), vaccine poliovirus-1 (*Enterovirus*) and MS2, GA, Qβ and SP phages (respectively genogroups I to IV) were used as positive controls. For each viral species, RNA concentrations present in wastewater and biofilm samples were estimated using the standard curves, according to the end-point dilution of the positive controls as previously described for noroviruses (Rutjes, 2006). Results are expressed in PCR-detectable units (PDU).ml<sup>-1</sup> or .cm<sup>-2</sup>.

#### 2.4.5. Meteorological data

Meteorological data were obtained from ASTA [Administration des services techniques de l'Agriculture] which are available on the internet (<http://www.asta.etat.lu>).

#### 2.4.6. Data analysis

Microorganism concentration values were  $\log_{10}$ -transformed before statistical analysis. For the occurrence experiment, non-parametric tests (i.e. Mann-Whitney-Wilcoxon and Kruskal-Wallis) were used to compare the distributions of microorganism concentration in various conditions. For the persistence experiment, regression analysis was used to model the survival of each virus considered under given experimental conditions as a function of the time. To this end, simple linear regression models were fitted to experimental data and allowed for estimating  $T_{90}$  reduction times. The model took the form of  $\log_{10} (Q_t/Q_0) = -at$ , where  $Q_t$  and  $Q_0$  represent the coliphage densities at time  $t$  and 0 (in day), respectively. The slopes calculated for the different microorganisms considered express the corresponding concentrations decreases in  $\log_{10}$  units per day and were the subject of statistical comparisons. On the one hand, the effects of experimental conditions (temperature, matrixes) were evaluated on viral inactivation using non-parametric tests (i.e. sign test). On the other hand, in order to reinforce these first global conclusions, the t-test was performed on the slopes taken two-by-two to determine significant differences in persistence between viruses at given conditions. All calculations were performed using XLSTAT software (Addinsoft, France).

### 3. Results

#### 3.1. Methodological aspects of biofilm analysis

Before giving the results of the occurrence study and the persistence experiment, it is important to present some methodological aspects of our biofilm analysis. Both described protocols were efficient to remove biofilms from their support. For instance, during the 6-month monitoring of wastewater biofilms, our results show that the quantities of proteins (from 40 to 72  $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) or the total numbers of bacteria (7.24 to 7.84  $\log_{10}$  unit. $\text{cm}^{-2}$ ) released from each biofilm sample did not show any statistically significant differences, regarding both the time of the year, i.e. from January to August (Kruskal-Wallis test;  $P=0.08$  for protein and  $P=0.14$  for total bacteria) and the age of the biofilm, i.e. 1-month old or older than 2 years (Mann-Whitney-Wilcoxon test;  $P=0.15$  for protein and  $P=0.66$  for total bacteria). This indicates that, in our experimental conditions, (i) one month was sufficient to develop consistent biofilm on polyethylene carriers and (ii) our biofilm elution protocol is reproducible allowing the direct comparison of the subsequent results.

Once the biofilm was detached from its support, viruses were eluted using a beef extract-based eluant at high pH. Our results show that the occurrence of viral genomes in these biofilms was not significantly different in 1-month old biofilms compared to mature biofilms (older than two years) for all viruses tested: F-specific RNA phages (Mann-Whitney-Wilcoxon test,  $P=0.06$ ), enteroviruses ( $P=0.21$ ), noroviruses GG I ( $P=0.57$ ) and noroviruses GG II ( $P=0.13$ ). Accordingly, for each of the six sampling dates, the results obtained from the analysis of 1-month ( $n=2$ ) and 24-month-old biofilms ( $n=2$ ) were pooled and considered replicates ( $n=4$ ).

During the extraction procedure, IPC was added in order to estimate the RNA recovery rates after extraction plus RT-PCR amplification. As expected, all wastewater and biofilm controls tested without the addition of IPC were negative for the presence of IPC. The efficiency of IPC recovery was considered acceptable or good for all the wastewater and biofilm samples tested. Indeed, the average percentage of RNA recovery rates from wastewater samples was 47% and was significantly higher than the percentage

calculated from the biofilm samples, i.e. 29% (Mann-Whitney-Wilcoxon test,  $P=0.03$ ). The efficiency and the reproducibility of viral RNA recovery from biofilm samples using our extraction method followed by our RT-PCR protocol were confirmed during the persistence experiment where the viral RNA concentrations remained very stable (maximum of  $0.5 \log_{10}$  variation) over the 49 days ( $n=14$ ) period of monitoring (Figure 4 a and c).

It is worthy to note that the concentrations of viruses during the occurrence study were of the same order of magnitude in both biofilm and wastewater compartments. For instance, the F-specific phages, which were detected in 100% of the samples, displayed an average of  $2.88 \log_{10}$  PDU.ml<sup>-1</sup> in wastewater and  $3.21 \log_{10}$  PDU.cm<sup>-2</sup> in biofilm. Though the concentration units are not identical precluding accurate comparisons, both wastewater and biofilm matrixes revealed a significant level of viral contamination (commonly more than  $2\text{-log}_{10}$  units above their detection limit).

### 3.2. Viral occurrence in wastewaters and corresponding biofilms

The genome of F-specific RNA phages was detected in all wastewater and biofilm samples. Three out of four genogroups were detected in wastewater while the four genogroups were detected in biofilm samples. Based on the assumption that the four genogroups are from distinct faecal origins, the pollution was characterized considering the ratio between GG II and III (presumed to be mostly human genogroups) and GG I and IV (presumed to be mostly animal genogroups). The variation of this ratio during the monitoring period is presented in Figure 1. It is interesting to note that this variation is similar in wastewater and in biofilm. In wastewater samples, cluster GGII+GGIII appears predominant, excepted in February and March when cluster GGI+GGIV is at higher concentrations. In biofilm samples, cluster GGII+GGIII is always dominant.

Regarding the results in details, genogroups that were detected in wastewaters were always detected in corresponding biofilms, but a higher diversity of genogroups was observed in biofilms (Figure 2). For instance, genogroup I was only detected in February and March in wastewater while it was detected from January to June in biofilm. It can be noticed that the highest rainfall event was recorded in February with 13.5 mm of precipitation during the 3 days preceding the sampling date. By comparison, the second maximum value of precipitation was recorded in April (0.5 mm) considering also the 3 days preceding the sampling. In March, a total of 81 cm of snow fell between the 4th and the 9th of March (11 days before the sampling date) while low temperatures were recorded (daily temperature averages ranged from  $-3.4$  to  $7.8^{\circ}\text{C}$  between the 4th of March and the day of sampling delaying the snow melting). Genogroup IV was never detected in wastewater while it was detected in February, April and June in biofilms. It is noticeable that, in February, the peak of GGI concentration in wastewater corresponds to the highest concentrations of both GGI and GGIV in biofilms.

Considering presumed human genogroups, concentrations of GGII remained stable in both kinds of matrix during the monitoring period, except in February in wastewater where GGII was not detected. Concentrations of GGIII were more important from April to July in biofilm samples and also more important in wastewater in July.

It is noticeable that during the monitoring period, the concentrations of F-specific RNA phages in biofilms increased significantly from winter to summer (Kruskal-Wallis test,  $P < 0.001$ ) (Figure 3) as a result of the GGIII concentration increase during the summer period.

Concerning pathogenic viruses, their detection in wastewater depended on the season, the norovirus GGI and GGII genomes being only detected until the end of March at concentrations varying from 3.3 to 3.5  $\log_{10}$  PDU.ml<sup>-1</sup> while enteroviral RNA was only detected in summer (July) at concentration of 2.1  $\log_{10}$  PDU.ml<sup>-1</sup>. In contrast, enterovirus and norovirus genomes were detected in biofilms throughout the monitoring period from winter to summer (Figure 3). A seasonal prevalence of noroviruses was observed only for GGI norovirus, with a concentration significantly higher in winter compared to summer (Kruskal-Wallis test,  $P = 0.01$ ). In contrast, noroviruses GGII and enteroviral RNA were detected at concentrations that did not vary significantly from winter to summer (Kruskal-Wallis test,  $P = 0.46$  for norovirus GGII,  $P = 0.24$  for enterovirus).

### 3.3 Viral persistence in wastewater and corresponding biofilms

Wastewaters and corresponding biofilms were collected in winter. The samples were placed at 4°C until their arrival in the laboratory where they were stored at 4 and 20°C. Viruses were quantified weekly in each sample prepared in duplicates with the aim to study their persistence in accordance with matrixes and temperatures. The viral analysis performed the first day revealed high concentrations of norovirus GGI and infectious F-specific RNA phages, both in wastewater and biofilms. Though norovirus GGII and enteroviral RNA were detected in biofilms at low concentrations (1.6 and 1.9  $\log_{10}$  PDU.cm<sup>-2</sup>, respectively), they could not be detected in the wastewater precluding the comparison of their persistence in water and in biofilms. Therefore, only norovirus GGI RNA (quantified using molecular techniques) and F-specific phages (quantified using both culture and molecular techniques) were considered for the persistence experiment.

Concerning F-specific RNA phages, three genogroups (GGI, GGII and GGIII) were detected in both wastewater and biofilm samples. Since GG III was predominant with concentrations at least 2- $\log_{10}$  higher than the other genogroups, only this genogroup was considered for the persistence study.

The inactivation of infectious phages and the persistence of virus RNA in wastewater and biofilm at temperature of 4 and 20°C are presented in Figure 4. A log-linear regression model expressed by  $\log_{10}(Q_t/Q_0) = at$ , was fitted to the  $\log_{10}$ -transformed data and the resulting  $T_{90}$  values are presented in Table 2. With regard to the comparison of the survival rates (i.e. the slopes of the fitted models) of all studied viruses in controlled conditions, it was shown that viruses were systematically more persistent at 4°C than at 20°C (sign test,  $P = 0.03$ ) and also more persistent in biofilm samples than in wastewater samples (sign test,  $P = 0.03$ ), whatever the viruses and the detection methods (infectious particles or genome) used. Moreover, it is interesting to note that in biofilm samples viral RNA was detected at a steady concentration (slope values were not statistically different from zero) during the 49 days of the persistence experiment.

Based on the assumption that most of the infectious F-specific RNA phages belong to the predominant GG III, the persistence of infectious F-specific phages was compared to the persistence of GGIII RNA. For all experimental conditions, comparisons of the slopes which have been taken two-by-two

have proved that inactivation of infectious particles was quicker than degradation of phage ARN (t-tests,  $P < 0.001$ ). It is also noticeable that the concentration of infectious phages decreased approximately 10-times faster in wastewater than in biofilm. In the same way, the two-by-two comparisons of the slopes between RNAs of phages belonging to GG III and norovirus GGI have shown that norovirus RNA was less quickly degraded than phage RNA, regardless the experimental conditions (t-tests,  $P < 0.05$ ).

#### **4. Discussion**

The objective of this study was to assess if wastewater biofilms may contribute to the dissemination of pathogenic viruses outside epidemic periods. Thus, the discussion will be conducted on the basis of methodological considerations and on the different aspects of virus-biofilm interactions including attachment, persistence and detachment.

##### **Was our chosen methodology adapted to biofilm analysis?**

Our study is based on the analysis of biofilms that developed on polyethylene or PVC support placed in wastewater for periods varying from 1 month to more than 2 years. Whatever the condition tested, materials were successfully colonized with consistent biofilms. For instance, we showed that one month was sufficient to allow the development of a steady biofilm on polyethylene carriers so that similar number of bacteria and equivalent amount of proteins were released compared to mature biofilms (older than 2 years).

The elution of viruses from detached biofilms was performed using high pH beef extract-based eluant while selected viruses were further detected using selective molecular and culture techniques. For RT-PCR detection methods, a general problem is the possible presence of inhibitors, which may cause false negative results or, in case of genome quantification, an underestimation of the target sequence concentration. In order to avoid false negative results, an original IPC was designed for this study and used in a multiplex enterovirus assay. The addition of this IPC at the lysis step of the extraction protocol aimed to assess simultaneously the efficiency of the RNA extraction protocol and the level of RT-PCR inhibitors in the extracts. For the specific quantification of the IPC, we used a probe previously described for environmental water analyses (Gregory et al., 2006). In the present study, we show that this probe can also be used for the analysis of complex environmental matrixes like biofilms without interfering with homologous sequences natively occurring in these samples. Based on our results, the averaged efficiency of the extraction-detection protocol was superior to 10%, which means that the uncertainties on the concentration estimate in wastewater and biofilms is less than 1 log<sub>10</sub> unit. Results obtained from the persistence experiment showed a high stability of the viral RNA in biofilms corroborating the results obtained with our IPC and therefore confirming that the extraction-detection protocol is reproducible. As a result, variations of viral RNA concentrations observed in wastewater biofilms can be attributed to real variations and not to a methodological bias.



### **Are the viruses able to attach to wastewater biofilms?**

In the occurrence study, the genome of F-specific phages was detected in all wastewater samples, which is in agreement with previous studies showing high concentrations of these phages in wastewater environments (Contreras-Coll et al., 2002; Lucena et al., 2003; Mandilara et al., 2006). Regarding pathogenic viruses in wastewater, the results of the occurrence study are in agreement with previous data showing a seasonal distribution of enteroviruses and noroviruses, the enteroviruses being mostly detected in summer and the noroviruses being mainly isolated in winter (Skraber et al., 2004). The prevalence of norovirus GG I genome compared to GG II observed in our study may be explained by different survival rates of the two genogroups in environmental samples (Haramoto et al., 2006; da Silva et al., 2007). As enteroviruses and noroviruses could be detected both in wastewater and in biofilms (regardless the age of the biofilms), our results demonstrate that these pathogenic viruses, like it has been shown for infectious bacteriophages (Skraber et al., 2007), are able to transfer from the wastewater phase to the biofilms.

It can be noted that the F-specific GG II+III cluster was prevalent in wastewaters and corresponding biofilms indicating that the faecal pollution treated at Hespérange plant is mainly originating from human sources. However, concentration peaks of GG I were observed in February and March in wastewater suggesting a sporadic animal source of contamination. Though it has still to be proven, these peaks may be due to street and/or land runoffs associated with the highest precipitation events recorded in February and March. These results corroborate other studies suggesting that monitoring the F-specific genogroups by real-time RT-PCR in polluted waters by faecal matters may be of interest for tracking the source of contamination (Kirs and Smith, 2007; Ogorzaly et al., 2009).

### **Do the viruses persist longer in biofilm than in wastewater?**

In the occurrence study, the enterovirus genome could be detected in the biofilm during the whole monitoring period, from January to July, while the norovirus genome was detected from January to June. These observations demonstrate the presence of enterovirus and norovirus genomes in wastewater biofilms outside the period of their prevalence in wastewater. It can be underlined that similar results were observed for the F-specific phages. For instance, the genogroup I was detected from January to June in biofilm samples but only from February to March in wastewater. Thus, all studied viruses could be detected in biofilms at a time their concentrations were under the limit of detection in wastewater suggesting a clear ability of these viruses to persist in biofilms.

According to our results from the persistence experiment, genome concentrations of both norovirus and F-specific bacteriophages remained stable in the biofilm for at least 2 months corresponding to the length of our experiment, at both 4 and 20 °C. In contrast, norovirus genome concentrations in wastewater decreased by approximately 2% and 10% per day at 4 °C and 20 °C, respectively. Regarding infectious particles, inactivation of F-specific phages was approximately 10-times faster in wastewater than in biofilm at both 4 and 20 °C. Thus we show that the biofilm does not only protect the genome from degradation but, to a certain extent, it preserves viral particles from inactivation as previously suggested for other microorganisms (Skraber et al., 2007; Helmi et al., 2008). So, infectious noroviruses may also persist longer in biofilms. This is consistent with previous observations indicating that infectious viruses persist longer when associated with solids than being free in the water (Smith et al., 1978; Gersberg et al., 1987, Chung and Sobsey, 1993;

Sakoda et al., 1997; Karim et al., 2004). In this study, the genome concentration of F-specific bacteriophage GG III decreased by about 3 to 5 times faster than norovirus GG I genome in wastewater but not in biofilm samples. This is not consistent with the other results obtained in surface water and groundwater, where genomes of MS2 phage and Norwalk virus show similar reduction rates (Bae et al., 2008). In summary, our results clearly show that pathogen and bacteriophage genomes but also infectious bacteriophages persist longer in biofilm than in wastewater.

### **Are the viruses able to detach from wastewater biofilms?**

If the interactions of pathogens with biofilms would be limited to attachment, the presence of biofilms would contribute to reduce the viral load of the water. In our occurrence study, neither the number of bacterial cells nor the amount of proteins increased in biofilms during the 6 months of monitoring. Moreover, the diversity of viral genome and their concentrations were similar regardless the age of the biofilm. In the same way, the variation of the ratio of phage genogroups was similar in wastewater and biofilm. All these observations tend to show that no apparent accumulation occurs over time and strengthen the hypothesis that viral occurrence in biofilms is probably the result of dynamic equilibrium between attachment and detachment processes (Skraber et al., 2007).

Detachment of biofilm portions has been observed in various conditions (Skraber et al., 2005) while evidence of viral release from wastewater or drinking water biofilms has been reported (Tam, 2007; Helmi et al., 2008). Viruses may be released as single particles or associated with biofilms. Viruses may also be released at a time the physico-chemical conditions of the water have changed (temperature, pH, UV light...) so that the fate of viruses may depend on whether they have formerly interacted with biofilms or not.

## **5. Conclusions**

During gastro enteritis outbreaks, high concentrations of viral pathogens are discharged in wastewater. Part of these viruses will attach to biofilms. As infectious particles persist longer in biofilms than in wastewater, the fate of captured infectious viruses will depend on the time of their immobilization as well as on their release as single or biofilm-associated particles. Though the exact role of biofilm remains to be elucidated, our results highlight a possible contribution of wastewater biofilms to the temporal dispersion of viral pollution in water environments. For instance, pathogenic viruses may be released from biofilms at a time the pathogen is not circulating in the wastewater anymore. Not considering the potential role of biofilms in the fate of enteric pathogens may lead to false assumptions in risk assessment, modelling research or epidemiological investigations.

### **Acknowledgments**

This work was funded by the FNR (National Research Fund) from Luxembourg (SECAL Program, KAWA Project, FNR/03/07/07). The authors thank Laurent Diez (LCPME, France), Nicolas Bonjean and Delphine Collard (CRP-GL, Luxembourg) for their excellent technical assistance as well as Romain Muno for its kind collaboration at the wastewater treatment plant from Pétange. The authors acknowledge Ana Maria

de Roda Husman and Lodder Willemijn from the RIVM institute (Bilthoven, The Netherlands) for having provided the different norovirus RNA that have been used as positive controls in this study. The authors thank Jan Vinjé for his kind cooperation providing his improved protocol for norovirus GGI detection at a time it was not published.

Table 1: Internal control sequence, primers and probes used for real-time RT-PCR

| Targets          | Primers and probes | Sequence (5' to 3')  | Reference                                   |
|------------------|--------------------|--|---|
| Norovirus GG I   | JJV1P              | FAM-TGTGGACAGGAGATCGCAATCTC-BHQ  | Jothikumar et al., 2005; Lyman et al., 2008 |
|                  | RING-1b            | FAM-AGATCGCGGTCTCCTGTCCA-BHQ   |   |
|                  | JJV1NF             | CCATGTTCCGTTGGATGC   |   |
|                  | JJV1R              | TCCTTAGACGCCATCATCAT   |   |
| Norovirus GG II  | RING2-TP           | YY-TGGGAGGGCGATCGCAATCT-BHQ  |   |
|                  | JJV2F              | CAAGAGTCAATGTTTAGGTGGATGAG   |   |
|                  | COG2R              | TCGACGCCATCTTCATTCACA  |   |
| Enterovirus      | Ev1                | GATTGTCACCATAAGCAGC  |   |
|                  | Ev2                | CCCCTGAATGCGGCTAATC  |   |
|                  | Ev-probe           | FAM-CGGAACCGACTACTTTGGGTGTCCGT-BHQ   |   |
| Internal control | CIPC probe         | YY- TGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGGGT-BHQ   | Gregory et al., 2006                        |
|                  | IPC (ARN)          | GAUUGUCACCAUAAGCAGCCAACACCCAACUUAUUCGCCUUGCA<br>GCACACCACAGAGUUAGGAUUAGCCGCAUUCAGGGG | This study                                  |

FAM (6-carboxy-fluorescein) and YY (Yakima Yellow): reporter dye, BHQ: Black Hole Quencher;

Internal control has been designed to fit with the primers Ev1/Ev2 and the probe CIPC (Gregory et al., 2006)

Table 2 - Viral inactivation and genome degradation under different matrixes and temperature conditions.

| Experimental conditions | Viruses              | Slope                | P       | Inactivation rate (%/day) | T <sub>90</sub> (day) | 95% confidence interval (day) |
|-------------------------|----------------------|----------------------|---------|---------------------------|-----------------------|-------------------------------|
| Biofilm at 4°C          | Norovirus GGI genome | ns                   |         |                           |                       |                               |
|                         | Phages GIll genome   | ns                   |         |                           |                       |                               |
|                         | Infectious phages    | - 0.0156             | P<0.001 | 3.5%                      | 64.1                  | [48.1 - 80.1]                 |
| Biofilm at 20°C         | Norovirus GGI genome | ns                   |         |                           |                       |                               |
|                         | Phages GIll genome   | ns                   |         |                           |                       |                               |
|                         | Infectious phages    | - 0.0472             | P<0.001 | 10.3%                     | 21.2                  | [16.9 - 25.5]                 |
| Wastewater at 4°C       | Norovirus GGI genome | - 0.0087             | P=0.016 | 2.0%                      | 114.9                 | [26.2 - 203.7]                |
|                         | Phages GIll genome   | - 0.0471             | P<0.001 | 10.3%                     | 21.2                  | [16.9 - 25.4]                 |
|                         | Infectious phages    | - 0.1130             | P<0.001 | 22.9%                     | 8.8                   | [8.1 - 9.6]                   |
| Wastewater at 20°C      | Norovirus GGI genome | - 0.0445             | P=0.028 | 9.7%                      | 22.5                  | [15.4 - 29.5]                 |
|                         | Phages GIll genome   | - 0.1395             | P=0.002 | 27.5%                     | 7.2                   | [4.6 - 9.7]                   |
|                         | Infectious phages    | < - 0.4 <sup>a</sup> |         | > 60%                     | < 2.4                 |                               |

ns: slope value was not significantly different from 0

<sup>a</sup> infectious phages could not be detected after day 8 in wastewater at 20°C so that the concentration value was arbitrarily set to the limit of detection.

Fig. 1 - Variation of the ratio between the  $\log_{10}$ -transformed concentration of human genogroups (GGII+GGIII) and animal genogroups (GGI+GGIV) of F-specific RNA phages during the monitoring period, in wastewater and biofilm samples. ND: not determined. ■ Wastewater, □ Biofilm.

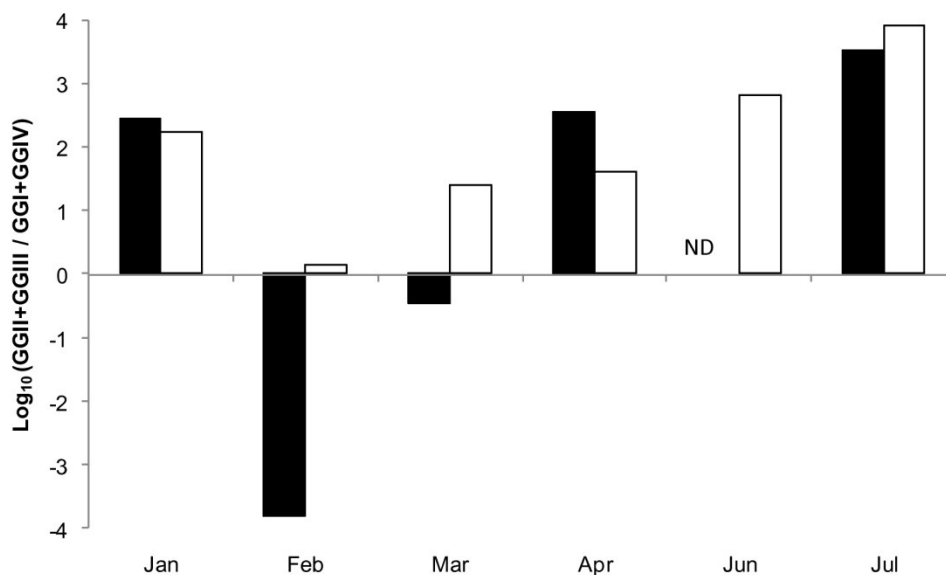


Fig. 2 - Occurrence and concentration of the four genogroups of F-specific RNA phage in wastewaters (A, n=1) and corresponding biofilms (B, n=4) through a 6-month monitoring period. Results under the detection limit were arbitrarily set to 0 for the calculation of the averages and standard deviations. ND: not determined.

■ GGI, ■ GGII, □ GGIII, ■ GGIV

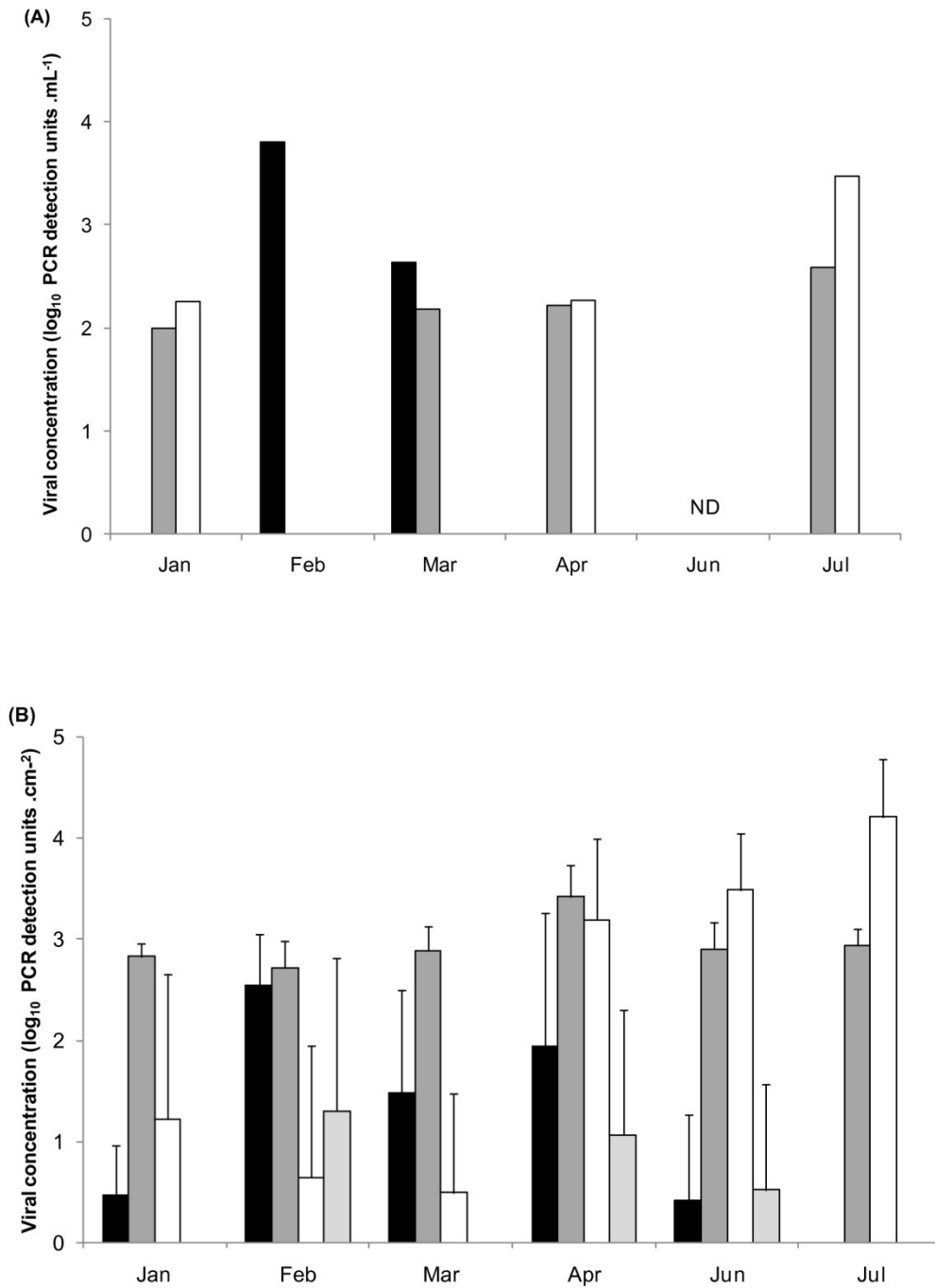


Fig. 3 - Genome concentrations of F-specific RNA phages, noroviruses GG1 and GGII and enteroviruses in biofilm in function of the seasons (n=8). The concentration of F-RNA phage was calculated considering the concentration of the predominant genogroups as indicated above the corresponding histogram. Results under detection limit were arbitrarily set to 0 for the calculation of the averages and standard deviations. □ F-specific phages, ■ Norovirus GG1, ■ Norovirus GGII, ■ Enterovirus

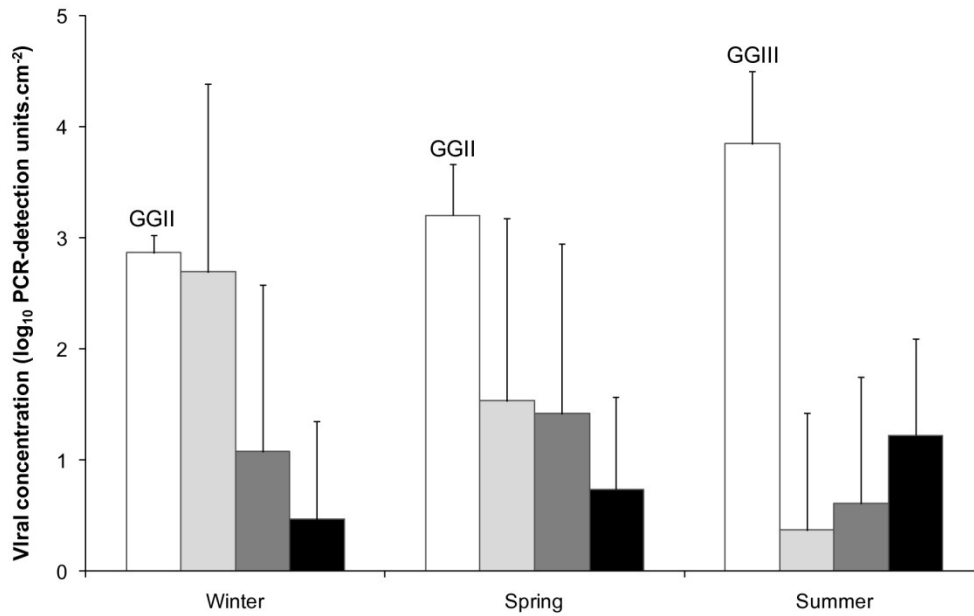
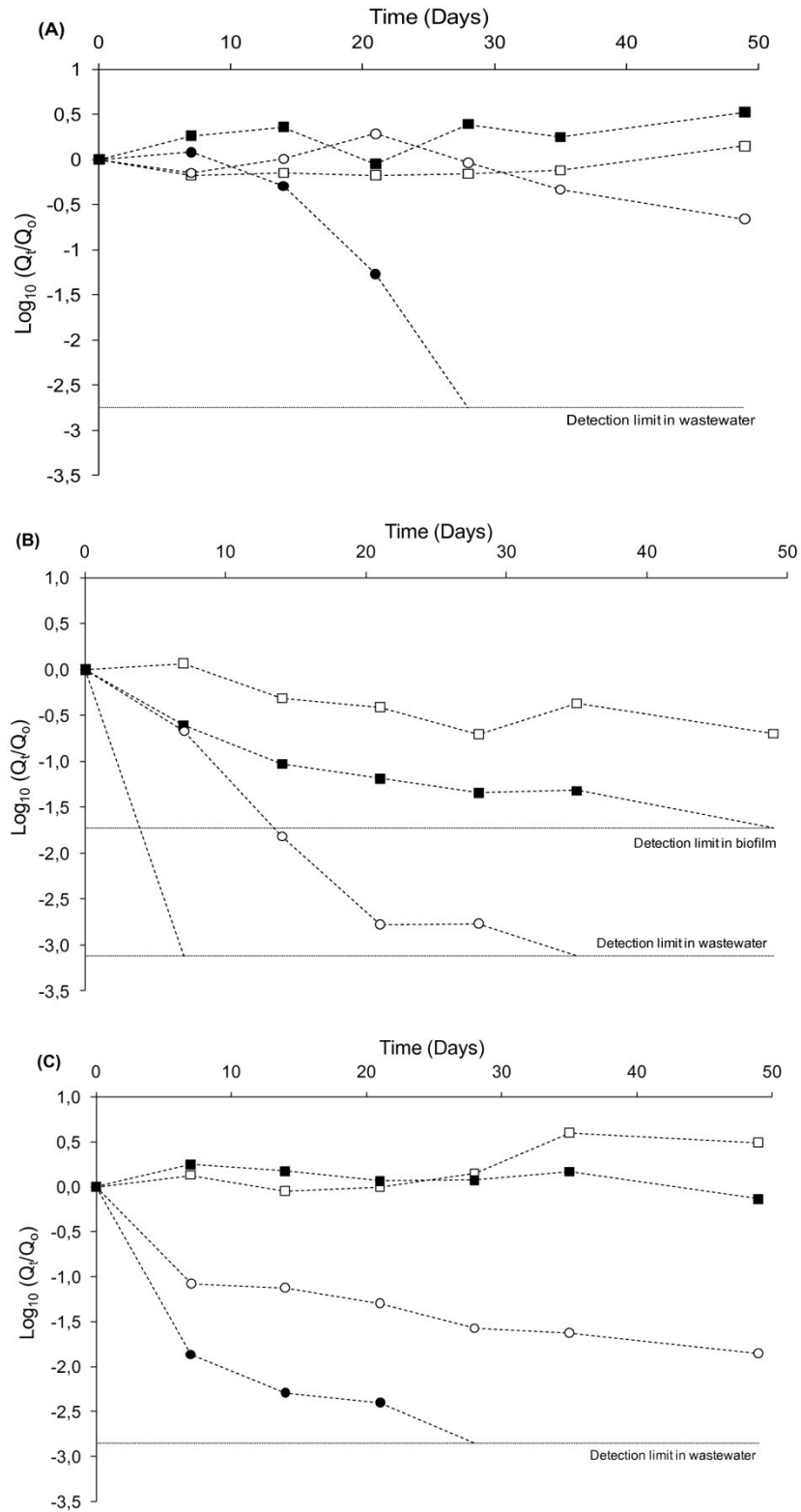


Fig. 4 - Persistence of norovirus GGI genome (A) and F-specific RNA bacteriophages considering the infectious particles (B) and the genome (C) in wastewater and in biofilm at 4 °C and 20 °C.

■ Biofilm, 20 °C; □ Biofilm, 4 °C; ● Wastewater, 20 °C; ○ Wastewater, 4 °C



## References

- Bae, J. and Schwab, K. J. (2008). Evaluation of murine norovirus, feline calicivirus, poliovirus, and MS2 as surrogates for human norovirus in a model of viral persistence in surface water and groundwater. *Applied and Environmental Microbiology* **74** (2): 477-484.
- Beekwilder, J., Nieuwenhuizen, R., Havelaar, A.H., van Duin, J. (1996) An oligonucleotide hybridization assay for the identification and enumeration of F-specific RNA phages in surface water. *Journal of Applied Bacteriology* **80** (2): 179-186.
- Chung, H., Sobsey, M.D. (1993) Comparative survival of indicator viruses and enteric viruses in seawater and sediment. *Water Science and Technology* **27** (3-4): 425-428.
- Cole, D., Long, S.C., Sobsey, M.D. (2003) Evaluation of F+ RNA and DNA coliphages as source-specific indicators of fecal contamination in surface waters. *Applied and Environmental Microbiology* **69** (11): 6507-6514.
- Contreras-Coll, N., Lucena, F., Mooijman, K., Havelaar, A., Pierz, V., Boque, M., Gawler, A., Holler, C., Lambiri, M., Miroló, G., Moreno, B., Niemi, M., Sommer, R., Valentin, B., Wiedenmann, A., Young, V., Jofre, J., (2002) Occurrence and levels of indicator bacteriophages in bathing waters throughout Europe. *Water Research* **36** (20): 4963-4974.
- 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** (24): 7891-7897.
- Furuse, K., Ando, A., Osawa, S., Watanabe, I. (1981) Distribution of ribonucleic acid coliphages in raw sewage from treatment plants in Japan. *Applied and Environmental Microbiology* **41** (5): 1139-1143.
- Gerba, C.P., Goyal, S.M., LaBelle, R.L., Cech, I., Bodgan, G.F. (1979) Failure of indicator bacteria to reflect the occurrence of enteroviruses in marine waters. *American Journal of Public Health* **69** (11): 1116-1119.
- Gersberg, R.M., Lyon, S.R., Brenner, R., Elkins, B.V. (1987) Fate of viruses in artificial wetlands. *Applied and Environmental Microbiology* **53** (4): 731-736.
- 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** (6): 3960-3967.
- Haramoto, E., Katayama, H., Oguma, K., Yamashita, H., Tajima, A., Nakajima, H., Ohgaki, S. (2006) Seasonal profiles of human noroviruses and indicator bacteria in a wastewater treatment plant in Tokyo, Japan. *Water Science and Technology* **54** (11-12): 301-308.
- Harwood, V.J., Levine, A.D., Scott, T.M., Chivukula, V., Lukasik, J., Farrah, S.R., Rose, J.B. (2005) Validity of the indicator organism paradigm for pathogen reduction in reclaimed water and public health protection. *Applied and Environmental Microbiology* **71** (6): 3163-3170.
- Havelaar, A.H., Pot-Hogbeem, W.M. (1988) F-specific RNA-bacteriophages as model viruses in water hygiene: ecological aspects. *Water Science and Technology* **20** (11-12): 399-407.



- Havelaar, A.H., Pot-Hogbeem, W.M., Furuse, K., Pot, R., Hormann, M.P. (1990) F-specific RNA bacteriophages and sensitive host strains in faeces and wastewater of human and animal origin. *Journal of Applied Bacteriology* 69 (1): 30-37.
- Helmi, K., Skraber, S., Gantzer, C., Willame, R., Hoffmann, L., Cauchie, H.M. (2008) Interactions of *Cryptosporidium parvum*, *Giardia lamblia*, vaccinal poliovirus type 1, and bacteriophages phiX174 and MS2 with a drinking water biofilm and a wastewater biofilm. *Applied and Environmental Microbiology* 74 (7): 2079-2088.
- Hsu, F.C., Shieh, Y.S., van Duin, J., Beekwilder, M.J., Sobsey, M.D. (1995) Genotyping male-specific RNA coliphages by hybridization with oligonucleotide probes. *Applied and Environmental Microbiology* 61 (11): 3960-3966.
- IAWPRC Study Group on Water Virology (1991) Bacteriophages as model viruses in water quality control. *Water Research* 25 (5): 529-545.
- ISO 10705-1 (2001) Water Quality - Detection and Enumeration of Bacteriophages - Part 1: Enumeration of F-specific RNA bacteriophages. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- Jothikumar, N., Lowther, J.A., Henshilwood, K., Lees, D.N., Hill, V.R., Vinje, J. (2005) Rapid and sensitive detection of noroviruses by using TaqMan-based one-step reverse transcription-PCR assays and application to naturally contaminated shellfish samples. *Applied and Environmental Microbiology* 71 (4): 1870-1875.
- Karim, M.R., Manshadi, F.D., Karpiscak, M.M., Gerba, C.P. (2004) The persistence and removal of enteric pathogens in constructed wetlands. *Water Research* 38 (7): 1831-1837.
- 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 (6-7): 1441-1448.
- Kirs, M. and Smith, D.C. (2007) Multiplex quantitative real-time reverse transcriptase PCR for F-specific RNA coliphages: a method for use in microbial source tracking. *Applied and Environmental Microbiology*. 73(3): 808-814.
- Khetsuriani, N., Lamonte-Fowlkes, A., Oberst, S., Pallansch, M.A. (2006) Enterovirus surveillance--United States, 1970-2005. *Morbidity and Mortality Weekly Report. Surveillance Summaries* 55 (8): 1-20.
- Kott, Y., Roze, N., Sperber, S., Betzer, N. (1974) Bacteriophages as viral pollution indicators. *Water Research* 8 (3): 165-171.
- Leclerc, H., Schwartzbrod, L., Dei-Cas, E. (2002) Microbial agents associated with waterborne diseases. *Critical Reviews in Microbiology* 28 (4): 371-409.
- Lodder, W.J., Roda Husman, A.M. (2005) Presence of noroviruses and other enteric viruses in sewage and surface waters in The Netherlands. *Applied and Environmental Microbiology* 71 (3): 1453-1461.
- Lucena, F., Mendez, X., Moron, A., Calderon, E., Campos, C., Guerrero, A., Cardenas, M., Gantzer, C., Shwartzbrood, L., Skraber, S., Jofre, J. (2003) Occurrence and densities of bacteriophages proposed as indicators and bacterial indicators in river waters from Europe and South America. *Journal of Applied Microbiology* 94 (5): 808-815.

- Lyman, W.H., Walsh, J.F., Kotch, J.B., Weber, D.J., Gunn, E., Vinje, J. (2009) Prospective Study of Etiologic Agents of Acute Gastroenteritis Outbreaks in Child Care Centers. *Journal of Pediatrics* 154(2): 253-257.
- Mandilara, G.D., Smeti, E.M., Mavridou, A.T., Lambiri, M.P., Vatopoulos, A.C., Rigas, F.P. (2006) Correlation between bacterial indicators and bacteriophages in sewage and sludge. *FEMS Microbiology Letters* 263 (1): 119-126.
- Monpoeho, S., Maul, A., Mignotte-Cadiergues, B., Schwartzbrod, L., Billaudel, S., Ferre, V. (2001) Best viral elution method available for quantification of enteroviruses in sludge by both cell culture and reverse transcription-PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 67 (6): 2484-2488.
- Ogorzaly, L., Gantzer, C. (2006) Development of real-time RT-PCR methods for specific detection of F-specific RNA bacteriophage genogroups: application to urban raw wastewater. *Journal of Virological Methods* 138 (1-2): 131-139.
- Ogorzaly, L., Tissier, A., Bertrand, I., Maul, A. and Gantzer, C. (2009) Relationship between F-specific RNA phage genogroups, faecal pollution indicators and human adenoviruses in river water. *Water Research. In Press.*
- Plattes, M., Fiorelli, D., Gille, S., Girard, C., Henry, E., Minette, F., O'Nagy, O., Schosseler, P.M. (2007) Modelling and dynamic simulation of a pilot-scale moving bed bioreactor for the treatment of municipal wastewater: model concepts and the use of respirometry for the estimation of kinetic parameters. *Water Science and Technology* 55 (8-9): 309-316.
- Rutjes, S.A., van den Berg, H.H., Lodder, W.J., Roda Husman, A.M. (2006) Real-time detection of noroviruses in surface water by use of a broadly reactive nucleic acid sequence-based amplification assay. *Applied and Environmental Microbiology* 72(8): 5349-5358.
- Sakoda, A., Sakai, Y., Hayakawa, K., Motoyuki, S. (1997) Adsorption of viruses in water environment onto solid surfaces. *Water Science and Technology* 35 (7): 107-114.
- Schaper, M., Duran, A.E., Jofre, J. (2002) Comparative resistance of phage isolates of four genotypes of f-specific RNA bacteriophages to various inactivation processes. *Applied and Environmental Microbiology* 68 (8): 3702-3707.
- Schijven, J.F., Hassanisadeh, S.J. (2000) Removal of Viruses by Soil Passage: Overview of modeling, processes, and parameters. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 30 (1): 49-107.
- Scott, T.M., Rose, J.B., Jenkins, T.M., Farrah, S.R., Lukasik, J. (2002) Microbial source tracking: current methodology and future directions. *Applied and Environmental Microbiology* 68 (12): 5796-5803.
- Sedmak, G., Bina, D., Macdonald, J. (2003) Assessment of an enterovirus sewage surveillance system by comparison of clinical isolates with sewage isolates from milwaukee, wisconsin, collected august 1994 to december 2002. *Applied and Environmental Microbiology* 69 (12): 7181-7187.
- Skraber, S., Gassilloud, B., Gantzer, C. (2004) Comparison of coliforms and coliphages as tools for assessment of viral contamination in river water. *Applied and Environmental Microbiology* 70 (6): 3644-3649.

- Skraber, S., Helmi, K., Willame, R., Ferreol, M., Gantzer, C., Hoffmann, L., Cauchie, H.M. (2007) Occurrence and persistence of bacterial and viral faecal indicators in wastewater biofilms. *Water Science and Technology* 55 (8-9): 377-385.
- Skraber, S., Schijven, J.F., Gantzer, C., Husman, A.M. (2005) Pathogenic viruses in drinking-water biofilms: a public health risk? *Biofilms* 2 1-13.
- Smith, E.M., Gerba, C.P., Melnick, J.L. (1978) Role of sediment in the persistence of enteroviruses in the estuarine environment. *Applied and Environmental Microbiology* 35 (4): 685-689.
- Tam, L.S. (2007) A pilot study for wastewater reclamation and reuse with MBR/RO and MF/RO systems. *Desalination* 202 106-113.
- Tartera, C., Jofre, J. (1987) Bacteriophages active against *Bacteroides fragilis* in sewage-polluted waters. *Applied and Environmental Microbiology* 53 (7): 1632-1637.
- Vinje, J., Oudejans, S.J., Stewart, J.R., Sobsey, M.D., Long, S.C. (2004) Molecular detection and genotyping of male-specific coliphages by reverse transcription-PCR and reverse line blot hybridization. *Applied and Environmental Microbiology* 70 (10): 5996-6004.
- Westrell, T., Teunis, P., van den Berg, H., Lodder, W., Ketelaars, H., Stenstrom, T. A. and de Roda Husman, A. M. (2006). Short- and long-term variations of norovirus concentrations in the Meuse river during a 2-year study period. *Water Research* 40 (14): 2613-2620.
- Wyer, M.D., Fleisher, J.M., Gough, J., Kay, D., Merrett, H. (1995) An investigation into parametric relationships between enterovirus and faecal indicator organisms in the coastal waters of England and Wales. *Water Research* 29 (8): 1863-1868.

\*\*\*\*\*

*En résumé, l'analyse d'eaux usées et de biofilms issus de station d'épuration, nous a, dans un premier temps, permis de confirmer la présence de deux génogroupes majoritaires, les génogroupes II et III, au niveau des rejets d'origine humaine. Toutefois, une proportion non négligeable de phages appartenant au génogroupe I ont également été mis en évidence dans ces deux types de milieux, peut-être en lien avec les précipitations. Ces conclusions générales, obtenues par une technique de biologie moléculaire, sont en accord avec celles obtenues antérieurement, dans la littérature, par les méthodes de culture.*

*Dans un deuxième temps, d'après les résultats de prévalence des phages ARN F-spécifiques, des norovirus et des entérovirus, il semble raisonnable de penser que les phages, quel que soit le génogroupe, ne puissent pas donner d'informations pertinentes quant à la présence de virus pathogènes qui présentent un caractère saisonnier au niveau des eaux usées. Ces phages ne sont donc que des indicateurs de pollution fécale de nature virale, ayant vraisemblablement un comportement plus proche de celui des virus pathogènes que les indicateurs bactériens.*

*Enfin, les résultats de l'étude de persistance, effectuée à l'aide de virus initialement présents dans les eaux usées et les biofilms, confirment qu'aussi bien les virus infectieux que le génome sont plus persistants à une température de 4 °C qu'à une température de 20 °C. Comme cela a souvent été décrit pour les virus pathogènes, la différence de persistance entre les particules virales et le génome viral qui lui est associé est ici démontrée pour les phages ARN F-spécifiques. De façon plus originale, ces résultats démontrent une meilleure persistance des virus au sein de biofilms qu'au niveau de l'eau usée. La persistance du génome viral des phages du génogroupe III est inférieure à celle des norovirus du génogroupe I. Néanmoins, certainement en raison de l'effet protecteur du biofilm, cette différence n'a pas été confirmée dans les échantillons de biofilms.*

## *Chapitre 3 :*

*Etude de la pollution fécale et virale d'une eau de rivière*





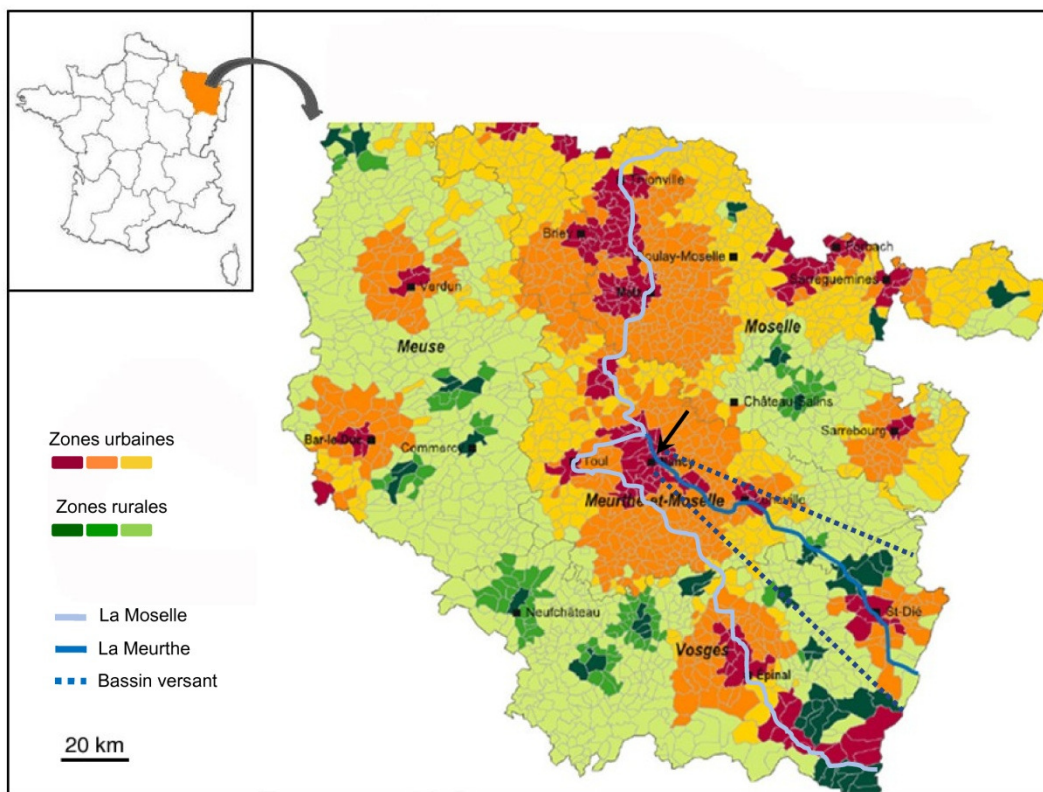
L'étude des bactériophages ARN F-spécifiques, et plus particulièrement l'étude de la distribution des quatre génogroupes qui leur sont associés, a été jugée comme un outil intéressant pour permettre de déterminer l'origine d'une pollution fécale (Blanch *et al.*, 2006). Ces conclusions ont été obtenues suite à l'analyse d'eaux usées de nature connue et spécifiquement associées à une contamination humaine (stations d'épuration municipales, eaux usées issues d'hôpitaux ou de camps militaires) ou à une contamination animale (eaux d'abattoirs ou de fermes), toutes espèces confondues. Nos résultats, obtenus sur les eaux usées urbaines, semblent conforter ces conclusions et cet intérêt.

Toutefois, l'étape suivante qui consiste à évaluer l'intérêt de ces phages dans des eaux moins chargées en termes de pollution fécale n'a que peu été décrite dans la littérature. En effet, au niveau des eaux de surface, d'autres paramètres peuvent entrer en ligne de compte. Tout d'abord, la dilution des microorganismes fécaux dans les eaux de rivière entraîne une baisse de leur concentration en comparaison de celle observée dans les eaux usées. Quelques adaptations méthodologiques ont donc été nécessaires pour adapter le volume analysé au type d'eau considéré. Ainsi, il a été décidé de concentrer les virus pathogènes à partir d'un volume de 10L et d'extraire les acides nucléiques des phages ARN F-spécifiques à partir d'un volume de 5mL (au lieu de 140µL analysés dans les eaux usées). Ensuite, la persistance des phages ARN F-spécifiques dans les eaux de rivière est un point important pour l'utilisation de ces virus comme outil de discrimination de l'origine de la pollution fécale. Or, lorsque l'on s'intéresse au caractère infectieux, certains génogroupes (III et IV) sont reconnus pour avoir une survie moindre par rapport aux deux autres génogroupes (Brion *et al.*, 2002; Schaper *et al.*, 2002a; Long et Sobsey, 2004; Muniesa *et al.*, 2009). Dans ces conditions, la pollution fécale liée aux génogroupes moins résistants ne peut être suivie que sur de courtes périodes de temps ou dans des conditions environnementales et climatiques favorables à la survie. La méthode de génotypage, développée et décrite dans la première partie des résultats, est fondée uniquement sur la détection du génome viral. Comme le démontrent les résultats obtenus lors de l'étude de persistance dans les eaux usées, le génome phagique est plus résistant que la particule infectieuse correspondante, celui-ci peut donc, a priori, être détecté sur des périodes plus longues dans les eaux de rivière. Enfin, selon le contexte géographique, les eaux de rivière sont des milieux complexes où la pollution fécale peut aussi bien être d'origine animale que d'origine humaine.

Pour réaliser ce travail, notre choix s'est porté sur un site unique situé sur la rivière Meurthe. Ce site peut être considéré comme étant essentiellement sous influence anthropique en raison de sa proximité de l'agglomération de Nancy (environ 250 000 habitants), bien qu'il soit situé en amont du rejet de la station d'épuration de la ville. Par ailleurs, il est également important de souligner que l'observation d'une pollution fécale d'origine animale n'est pas exclue, notamment en raison des activités agricoles implantées en amont de la rivière. La Figure 24 illustre la situation géographique du site de prélèvement sélectionné pour ce travail.

Dans ce contexte, l'objectif de nos travaux était double. Nous avons voulu, d'une part, définir les conditions de réalisation du génotypage des bactériophages ARN F-spécifiques par RT-PCR en temps réel dans notre milieu d'étude. Il a fallu vérifier que cette méthode était suffisamment sensible, puis également s'assurer qu'elle permettait de détecter au moins autant de phages que la méthode de culture classiquement utilisée. Enfin, il nous a semblé également très intéressant de préciser l'impact de l'étape de culture sur les

résultats de génotypage. D'autre part, nous avons tenté d'établir des corrélations entre la concentration des différents génogroupes des phages ARN F-spécifiques et la pollution fécale (*E. coli* et entérocoques), mais également entre les génogroupes et la pollution virale (norovirus et adénovirus humains).



**Figure 24.** Situation géographique du site de prélèvement sélectionné le long de la Meurthe. La flèche représente le site de prélèvement. Celui-ci est situé en amont du rejet de la station d'épuration de l'agglomération nancéenne.

Dans un premier temps, les résultats obtenus montrent qu'un volume de 5mL d'eau de rivière est suffisant pour détecter le génome des phages dans tous nos échantillons. Tous les prélèvements étaient positifs pour au moins un des quatre génogroupes. Ensuite, il a été démontré que tous les phages isolés après une étape de culture (n=84), peuvent également être détectés par RT-PCR en temps réel. Ainsi, notre méthode est capable de mettre en évidence au moins autant de phages que la méthode classique de culture. Enfin, nous nous sommes intéressés à l'influence de l'étape préalable de culture sur les résultats de génotypage. La comparaison des résultats de génotypage, réalisé avec ou sans étape de culture, montre que le ratio des deux génogroupes majoritairement observés, à savoir les génogroupes I et II, est différent selon la démarche suivie. Après culture, les génogroupes I et II sont observés en quantité similaire ( $\log_{10} GII/GI=0,30$ ), alors qu'après une recherche directe le génogroupe II est très largement majoritaire ( $\log_{10} GII/GI=1,51$ ). De la même manière, une analyse directe de l'échantillon d'eau a permis de mettre en évidence la présence des génogroupes III et IV, ce qui n'a pas été observé avec l'étape de culture. Ainsi, ces observations montrent l'influence que peut avoir l'étape de culture sur le résultat du génotypage et son



interprétation. Ce phénomène devrait donc être pris en compte lors d'études environnementales puisqu'il est susceptible d'induire un biais important dans l'interprétation des résultats.

Le second objectif de ce travail était d'évaluer les apports scientifiques du génotypage par RT-PCR en temps réel dans le cadre d'études dédiées aux pollutions fécales et virales. De manière à répondre à cet objectif, 23 prélèvements d'eau de rivière ont été effectués sur la période de Mai à Octobre 2006. L'ensemble des résultats obtenus pour les paramètres microbiologiques étudiés sont présentés sur la Figure 25. Il s'agit de valeurs moyennes, correspondantes à des mesures réalisées sur l'ensemble de la période d'étude.

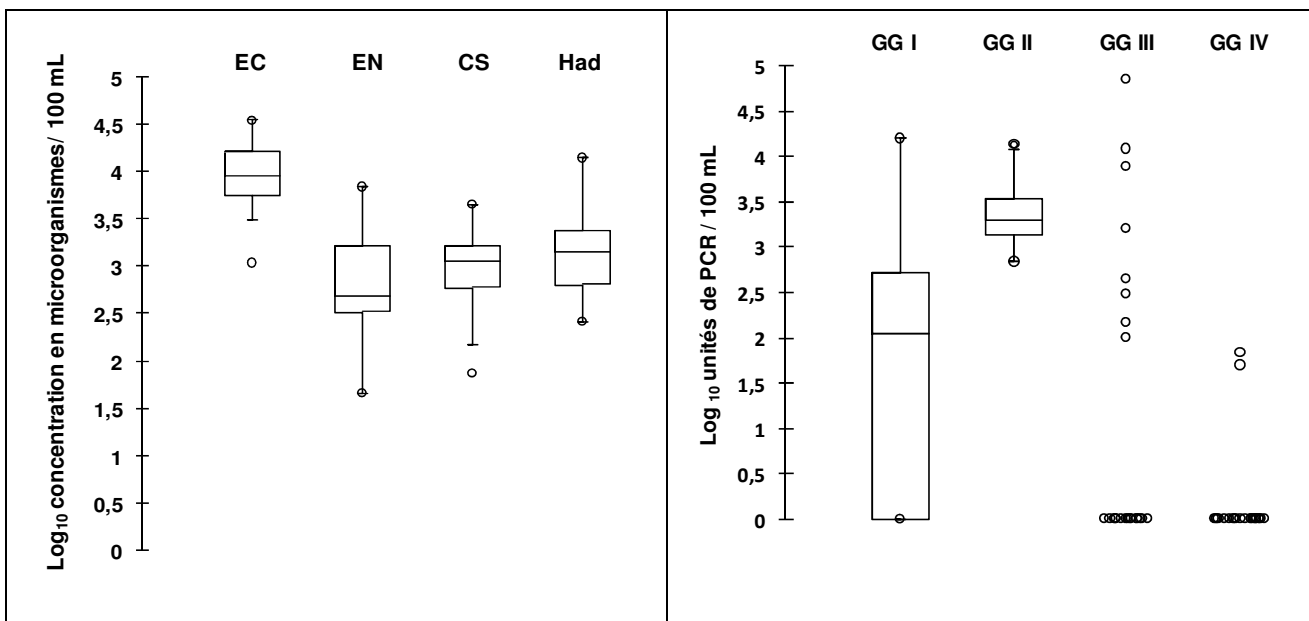


Figure 25. Concentrations des indicateurs bactériens (NPP/100mL), des indicateurs viraux (UFP/100mL et unités de PCR/100mL) et des adénovirus humains (copies de génome/100mL) dans l'eau de rivière étudiée. EC : *Escherichia coli*, EN : entérocoques, CS : coliphages somatiques, GG : génogroupes des phages ARN F-spécifiques, Had : adénovirus humains.

L'analyse en composantes principales et l'étude des corrélations ont montré que les variations de concentration du génogroupe II sont associées à celles des indicateurs bactériens et des adénovirus humains. La relation établie entre les adénovirus humains et le génogroupe II tend à prouver l'origine humaine de ce dernier. De la même manière, l'absence de corrélation entre les variations de concentration du génogroupe I et celles du génogroupe II renforce l'hypothèse d'une origine fécale différente de ces deux génogroupes. Au vu de ces résultats, nous avons évalué l'intérêt d'utiliser un ratio de concentration des deux génogroupes majoritaires pour décrire la pollution fécale de notre milieu. Comme illustré sur la Figure 26, deux groupes de points ont pu être distingués, à savoir ceux où le génogroupe I est présent à une concentration négligeable par rapport au génogroupe II ( $\log_{10} \text{GGII/GGI} > 2$ ) et ceux où sa présence est significative ( $\log_{10} \text{GGII/GGI} < 1$ ). Il a été montré que les concentrations moyennes en indicateurs de pollution fécale (*E. coli*, entérocoques et coliphages somatiques) ne diffèrent pas d'un groupe à l'autre (Tests de Mann-Whitney-Wilcoxon,  $P > 0,05$ ). A l'inverse, le seul paramètre permettant de distinguer les deux groupes

d'un point de vue physique est la turbidité de l'eau. Ce phénomène a déjà été souligné lors de l'analyse de corrélation, puisqu'une relation positive a été mise en évidence entre les variations de concentration du génogroupe I et celles de la turbidité de l'eau.

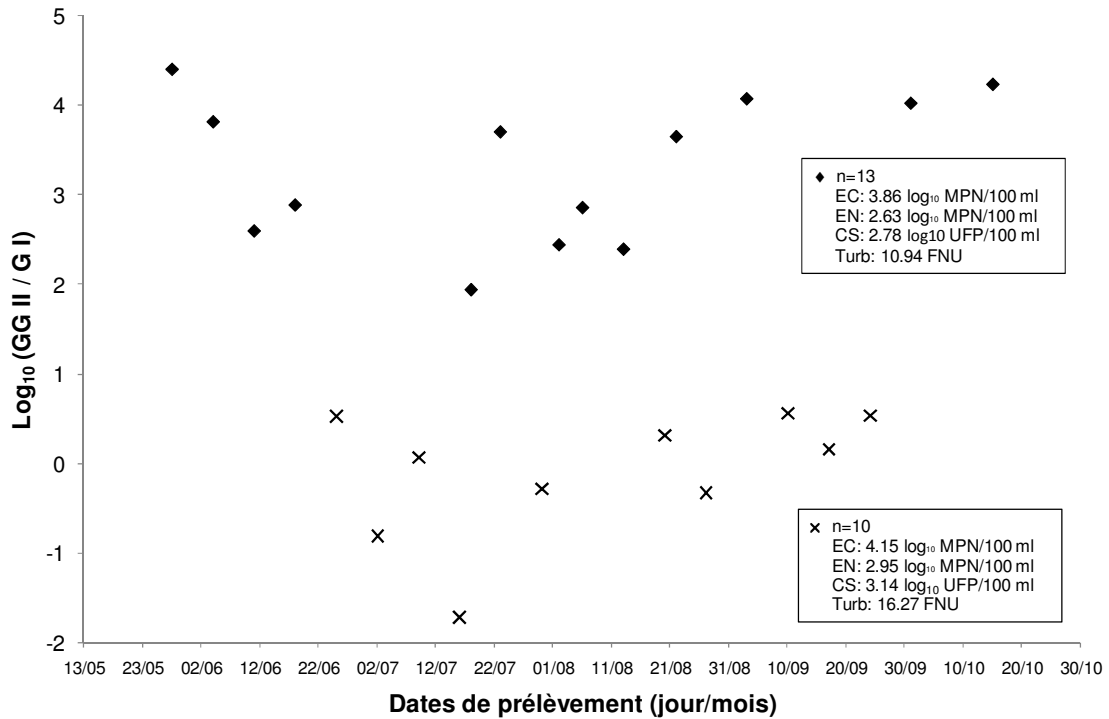


Figure 26 . Ratio de concentration des génogroupes II et I obtenu pour chaque date de prélèvement. EC : *Escherichia coli*, EN : entérocoques, CS : coliphages somatiques, GG : génogroupes des phages ARN F-spécifiques.

L'ensemble des résultats de ce travail sont présentés de façon plus détaillée sous la forme d'un article scientifique publié dans la revue *Water Research* (Ogorzaly *et al.*, 2009).

Available at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)journal homepage: [www.elsevier.com/locate/watres](http://www.elsevier.com/locate/watres)

## Relationship between F-specific RNA phage genogroups, faecal pollution indicators and human adenoviruses in river water

Leslie Ogorzaly<sup>a</sup>, Adeline Tissier<sup>a</sup>, Isabelle Bertrand<sup>a</sup>, Armand Maul<sup>b</sup>, Christophe Gantzer<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Laboratory of Physical Chemistry and Microbiology for the Environment (LCPME), UMR 7564 CNRS Nancy Université, Faculté de Pharmacie, 5 rue Albert Lebrun 54000 Nancy, France

<sup>b</sup>LMAM, CNRS UMR 7122, Ile du Saulcy, Université de Metz, 57045 Metz, France

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 3 September 2008

Received in revised form

27 November 2008

Accepted 10 December 2008

Published online 24 December 2008

#### Keywords:

F-specific RNA phages

Genotyping

Real-time RT-PCR

River water

Faecal pollution

### ABSTRACT

Recent studies have shown the increasing interest of F-specific RNA phage genotyping to identify major sources of faecal contamination in waters. This study, conducted in a river located in an urbanized watershed with recognized anthropogenic influences, was aimed at evaluating the relevance of direct phage genotyping by real-time RT-PCR. One hundred percent of positive results were obtained with a 5 mL aliquot of river water ( $n = 31$ ). Phage distribution was modified after cultivation, since the ratio of the two most abundant genogroups (II and I) reached  $1.51 \log_{10}$  by direct RT-PCR-based method versus  $0.30 \log_{10}$  after cultivation ( $n = 8$ ). For the first time, positive correlations between the concentrations of genogroup II, bacterial indicators and human adenoviruses were observed, which may indicate a human faecal pollution. No correlation between genogroups II and I has been revealed. The concentration of genogroup I was only correlated with water turbidity, suggesting an animal pollution coming from upstream after rainfall events. Among the microbiological parameters studied, only genogroup II/genogroup I ratio shows variations occurring in the major sources of faecal pollution.

© 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

F-specific RNA bacteriophages (FRNAPH) belong to the *Leviviridae* family, which is divided into two genera (*Levivirus* and *Allolevivirus*) and three unclassified groups (Bollback and Huelsenbeck, 2001). These phages are also classified into four sero- or genogroups on the basis of their serological cross-reactivity or their differences in genome organisation. The genus *Levivirus* contains genogroup I (FRNAPH I) and genogroup II (FRNAPH II), whereas the genus *Allolevivirus* contains genogroup III (FRNAPH III) and genogroup IV (FRNAPH IV).

FRNAPH II and III are generally found in human sewage while FRNAPH I and IV are generally found in animal wastes (Furuse et al., 1981; Osawa et al., 1981; Hsu et al., 1995; Cole et al., 2003).

In a multilaboratory study, supported by the European Union, various microbes and chemicals considered as potential indicators were analysed in order to distinguish human from non-human faecal sources in wastewater (Blanch et al., 2004, 2006). Among the 26 parameters studied, the authors have highlighted a number of potentially good tracers with a high discriminatory capability. After statistical treatment,

\* Corresponding author. Tel.: +33 3 83 682 291; fax: +33 3 83 682 301.

E-mail address: [christophe.gantzer@pharma.uhp-nancy.fr](mailto:christophe.gantzer@pharma.uhp-nancy.fr) (C. Gantzer).

0043-1354/\$ – see front matter © 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

doi:10.1016/j.watres.2008.12.011

they have shown that the association of somatic coliphages with phages infecting *Bacteroides thetaiotaomicron* allows 100% correct classification. The genotyping of F-specific RNA phages has also proved to be a reliable indicator. Indeed, classification using only the four genogroups of F-specific RNA phages allowed 98% of non-human and 85% of human samples to be classified correctly. Nevertheless, as this study was only conducted in wastewater, the relevance of such parameters may change as a function of their survival ability in the environment (Blanch et al., 2006).

The genotyping method classically used consists of a culture step followed by plaque hybridization with labelled oligonucleotide probes (Hsu et al., 1995; Beekwilder et al., 1996; Schaper and Jofre, 2000). This technique has, however, some downsides: it is fastidious and time-consuming, and it requires cultivation. Thus, only infectious phages can be detected. Recently, methods based on direct genome detection have been described: RT-PCR (Dryden et al., 2006), RT-PCR with reverse line blot hybridization (Vinje et al., 2004), monoplex real-time RT-PCR (O'Connell et al., 2006; Ogorzaly and Gantzer, 2006) and multiplex real-time RT-PCR (Kirs and Smith, 2007; Wolf et al., 2008). Molecular methods have the advantage to be more rapid. Moreover, it is now clearly recognized that the viral genome persists longer than the infectious character of the corresponding virus (Gassilloud et al., 2003).

However, several questions still have to be addressed before applying direct genotyping by molecular tools to river waters. On the one hand, are all of the phages detected by culture also detectable by molecular tools? Love et al. (2007) have objected that the primers and probes used for these new molecular assays were based on only a limited number of partial nucleotide sequences of environmental F-RNA phage strains. For Wolf et al. (2008), probe chemistry – minor groove binder (Ogorzaly and Gantzer, 2006) and molecular beacon (Kirs and Smith, 2007) – used in real-time RT-PCR has too high a level of specificity and this low tolerance to sequence variations might not be appropriate for detecting uncharacterized phage strains in environmental samples. On the other hand, what relationship exists between F-specific RNA phages detected by the new molecular tools and classical faecal indicators (*Escherichia coli*, enterococci and somatic coliphages) or human pathogenic viruses in river water?

The aim of the present study was to address these issues. The first part focused on the methodological aspects linked to a direct genotyping of F-specific RNA phages by real-time RT-PCR in river water. It was first investigated whether RT-PCR is able to detect all of the phages identified by culture. It was then explored whether the use of a culture step alters the ratio of genogroups. The second part of the study considered the relevance of direct FRNAPH genotyping in river water. A comparison between the level of each genogroup and that of the standard indicators of faecal pollution (*E. coli*, enterococci and somatic coliphages) was performed. This level was also compared to the level of human-specific pathogens (human adenoviruses).

For this study, water was sampled from the Meurthe, a river located in the north-eastern part of France. The selected site is located in an urbanized watershed with recognized anthropogenic influences.

## 2. Materials and methods

### 2.1. River water sampling site and collection of samples

The Meurthe River, located in the north-east of France, has a watershed of 2960 km<sup>2</sup> hosting urban areas and livestock farming. The sampling site is close to Nancy, the greatest urban area of the watershed with about 250,000 inhabitants. Therefore, it could be considered as a site under anthropogenic influence even though it is situated upstream the city's wastewater treatment plant. The sampling site could also be influenced by the population located upstream of Nancy with about 218,000 inhabitants for 15 wastewater treatment plants and by dairy activities with approximately 112,000 cows and low number of sheep (about 7500) and pigs (about 4100).

The river water samples were collected over two different time periods. The first one, called P1, was used to compare concentrations of microorganisms in river water. Twenty-three samples were collected weekly from May to October 2006. The second one, called P2, was used to evaluate effectiveness of the genotyping technique. Two water samples were collected weekly for eight weeks from March to April 2007 ( $n=16$ ). Among these 16 samples, eight were used to estimate the distribution of the genogroups in river water and the other eight were used to study the effect of phage cultivation. All the samples were placed in sterile screw cap containers, transferred to the laboratory at 4 °C and assayed within 24 h of collection for faecal bacteria and pathogen viral concentration. For phage analysis, water samples were kept frozen at -20 °C for one year maximum. During [P1], water turbidity (Turb) was measured using the standard method ISO 7027 (1999).

### 2.2. Detection and enumeration of faecal indicator bacteria

Two faecal indicators were detected in river water: enterococci (EN) and *E. coli* (EC). Standardized methods ISO 7899-1 (1998b) and ISO 9308-3 (1998a) were used to quantify these indicators and bacterial concentrations were expressed in most probable number per 100 ml of water (MPN/100 mL).

### 2.3. Detection, enumeration and isolation of infectious phages

Somatic coliphages (SOMCPH) and F-specific RNA bacteriophages (FRNAPH) were enumerated in a 5 mL volume of river water in accordance with standardized methods and their concentrations were expressed in plaque-forming units per 100 ml of water (PFU/100 mL). The somatic coliphage concentration was determined using *E. coli* strain WG5 in accordance with ISO standard 10705-2 (1995b). PFUs of F-specific phages were counted by the double-agar-layer technique using *Salmonella enterica typhimurium* strain WG49 according to ISO standard 10705-1 (1995a). F-specific RNA phages contained in one plaque were then isolated. A total of 12 plaques were isolated from each plate with well-separated plaques for each sample. If fewer than 12 plaques were present on a plate, all plaques were isolated. Plaques were

collected by micropipette aspiration and suspended in a 1 mL volume of phosphate-buffered saline (PBS, Gibco). After 1 min of agitation (1400 rpm, Thermomixer, Eppendorf) at room temperature, phage isolates were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until genotyping.

#### 2.4. Specific detection of FRNAPH genogroups by real-time RT-PCR

Genogroup-specific detection was carried out either directly on river water samples or on phage isolates obtained by the double-agar-layer method.

For river water samples, total nucleic acids were extracted from a 5 mL aliquot of river water with a NucliSens Magnetic Extraction Kit (bioMérieux, France) as previously described (Rutjes et al., 2005). The elution step was carried out twice successively and the 100  $\mu\text{L}$  of extracted nucleic acids were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . Then, genotyping was performed by the real-time RT-PCR method developed by Ogorzaly and Gantzer (2006). Concentrations of each genogroup were expressed in PCR-detection units per 100 ml of water, according to the end-point dilution of the standard sample. The Ct (cycle threshold) values were used to determine the FRNAPH II/FRNAPH I ratio in logarithmic unit, in conformity with  $\text{FRNAPH II/FRNAPH I} = (\text{Ct}_{\text{FRNAPH I}} - \text{Ct}_{\text{FRNAPH II}})/s$ , with  $s$  being the slope of the standard curve.

For the genotyping of F-specific RNA bacteriophages on plaques obtained after culture, the real-time RT-PCR detection protocol was slightly modified. Nevertheless, the same primers and probes as previously described were used. Considering the high concentration of phages in one plaque, genotyping was conducted with a One-Step RT-PCR Kit (QuantiTect Probe RT-PCR, Qiagen, France) according to the manufacturer's instructions. A 7.5  $\mu\text{L}$  aliquot of each isolate was heated for 5 min at  $95^{\circ}\text{C}$  to extract RNA. Volumes of 25  $\mu\text{L}$  of  $2 \times$  QuantiTect Probe RT-PCR Master Mix, 0.5  $\mu\text{L}$  of QuantiTect RT Mix, 0.5  $\mu\text{L}$  of 40  $\mu\text{M}$  forward primer, 0.5  $\mu\text{L}$  of 40  $\mu\text{M}$  reverse primer, 0.5  $\mu\text{L}$  of 15  $\mu\text{M}$  probe and 15.5  $\mu\text{L}$  of DNase-RNase-free water (Sigma, France) were added. Real-time RT-PCR was performed for 30 min at  $50^{\circ}\text{C}$  (RT reaction), followed by 15 min at  $95^{\circ}\text{C}$ , 45 cycles of 15 s at  $95^{\circ}\text{C}$  and 60 s at  $60^{\circ}\text{C}$  (PCR), on ABI Prism 7700 Sequence Detector using SDS v.1.6.3 software (Applied Biosystems, France). In this case, FRNAPH II/FRNAPH I ratio, expressed in logarithmic unit, was determined in conformity with  $\text{FRNAPH II/FRNAPH I} = \log_{10}(N_{\text{FRNAPH II}}/N_{\text{FRNAPH I}})$ , with  $N$  being the number of plaques obtained for each genogroup.

#### 2.5. Human adenovirus concentration and quantification

A 10 L sample of river water was concentrated on glass wool by using the slightly modified standard method AFNOR XP T90-451 (1996). This method was based on adsorption/elution principle. In contrast with the standard method, the river water sample was acidified with 1 M HCl (pH 3.5) and 10 g of compacted sterile glass wool was used for the filtration column. The concentrate obtained was stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until tested. Total nucleic acids were extracted from a 5 mL aliquot of the concentrate with NucliSens Magnetic Extraction Kit

(bioMérieux, France) as previously described. A first screening for detection of human adenoviruses (Had) was carried out by nested-PCR (Allard et al., 2001). In case of positive results, quantification was performed by real-time PCR, according to the protocol described by Hernroth et al. (2002), using degenerated primers and probe Ad(ACDEF). In real-time PCR, amplification was performed in a 25  $\mu\text{L}$  reaction solution with TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, France) on ABI Prism 7700 Sequence Detector using SDS v.1.6.3 software (Applied Biosystems, France). Standard curves used for quantitative PCR were generated by using serial dilutions of known amounts of a linearized plasmid containing the target region of the PCR. The bacteria carrier (*E. coli* JM109 competent cells) of this plasmid (pBR322) was kindly provided by Professor Girones (Department of Microbiology, University of Barcelona).

#### 2.6. Data treatment and statistical analysis

All the statistical analyses were performed using XLSTAT (Addinsoft, France) on the  $\log_{10}$ -transformed values of the various microorganism concentrations. Nonparametric tests (i.e., Wilcoxon signed test or Mann-Whitney test) were used to compare the proportion of each genogroup and quantities of microorganisms in river water samples under various conditions. Principal Component Analysis (PCA) was used in order to get a global overview of the structure of the data. This approach allows the set of original variables to be reduced to a limited number of factors. Then, projecting these variables (i.e., measured microbiological parameters and water turbidity) in a reduced space, for instance the plane of the first two factors (F1, F2), may provide a better understanding of the relationships between all variables at the same time. Moreover, the Pearson correlation coefficient was used to analyse how the studied variables, taken two by two, relate to each other in river water.

### 3. Results

#### 3.1. Methodological aspects of FRNAPH genotyping in river water

F-specific RNA phages were quantified from eight river water samples [P2]. All the samples were positive by culture (5 mL analysed) and the mean concentration was estimated to be 1.00  $\log_{10}$  PFU/mL. Eighty-four individual plaques were isolated from these eight samples. All F-specific phage isolates were subjected to the four real-time RT-PCRs. They could all be detected by one of the four TaqMan assays used. Out of these 84 isolates, known to be infectious phages, 25 (29.8%) gave a positive RT-PCR signal for FRNAPH I, 58 (69.0%) for FRNAPH II and 1 (1.2%) for FRNAPH III. None of them was identified to be FRNAPH IV. Moreover, no cross-reactivity was observed as one isolate is positive for only one specific RT-PCR. As a consequence, in the river water samples used, all phages detected by culture are also detected by real-time RT-PCR with the primers and probes proposed.

On the other eight river water samples [P2], genotyping was performed with (on plaques) and without (on water) prior cultivation. For these samples, 75 plaques could be isolated, among which 27 (36%) were found to be FRNAPH I and 48 (64%) FRNAPH II. Thus, the mean ratio between FRNAPH II and FRNAPH I, expressed in logarithmic units, was computed to be 0.30. No FRNAPH III or IV was isolated. By direct RT-PCR analysis, from a 5 mL volume of river water, the FRNAPH I to IV were detected in 72%, 100%, 25% and 6% of the samples, respectively. This initial volume was thus enough to get 100% of positive samples for at least one genogroup. The mean ratio between FRNAPH II and FRNAPH I, expressed in logarithmic units, was noted to be 1.51. This value turned out to be significantly higher than the ratio obtained after culture (Wilcoxon signed test,  $P = 0.02$ ). In addition, FRNAPH III and IV could be detected by direct RT-PCR but at a much reduced level (over 2  $\log_{10}$  units lower than the value obtained with FRNAPH I). This shows that the culture step changes the ratio of FRNAPH II to FRNAPH I.

On four river water samples, it has also been demonstrated that a preliminary freezing step ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) did not affect the distribution of the genogroups (by direct genotyping as well as by genotyping after culture) or the initial RNA amount of each genogroup (data not shown).

### 3.2. Faecal pollution load in river water

Over a 6-month period [P1], 23 river water samples were analysed in order to estimate the concentration of various microorganisms: bacterial faecal indicators (*E. coli* and enterococci), viral faecal indicators (somatic coliphages and FRNAPH genogroups) and human adenoviruses. Among all the microorganisms measured, *E. coli* showed the highest mean concentration with a value of  $3.99 \pm 0.36 \log_{10}$  MPN/100 mL, followed by somatic coliphages with a mean concentration of  $2.94 \pm 0.47 \log_{10}$  MPN/100 mL and enterococci with a mean concentration of  $2.77 \pm 0.53 \log_{10}$  MPN/100 mL. Genomes of human adenoviruses were detected in all samples with a high mean concentration of  $3.13 \pm 0.47 \log_{10}$  genome copies/100 mL. For F-specific RNA phages, the distinct genogroups were quantified and compared as shown in Fig. 1 in a box-plot format. Concentration was expressed in PCR-detection units/100 mL. Among the four genogroups, FRNAPH II was noted to be the most abundant in river water samples, followed by FRNAPH I. FRNAPH III and IV were only detected eight and two times, respectively. On the box-plot, FRNAPH II exhibited the steadiest concentrations, whereas concentrations of FRNAPH I appeared irregularly distributed.

The ratio of FRNAPH II to FRNAPH I can be used to give an idea of the relative distribution of each genogroup in the river water. The said ratio obtained for each river water sample is shown in Fig. 2. During the study period, the ratio appeared to give substantially different results with values ranging from  $-2$  to  $4 \log_{10}$  units. However, two groups of points can be distinguished on the graph: one group for which the ratio is over 2 and a second group for which the ratio is below 1. The first group illustrates a predominance of FRNAPH II, while the second group depicts mixed genogroup content. In the latter group, FRNAPH I prevailed (i.e., with a ratio  $\leq -1$ ) in two samples. In each contaminant group, the mean concentrations of EC and EN were found to be similar

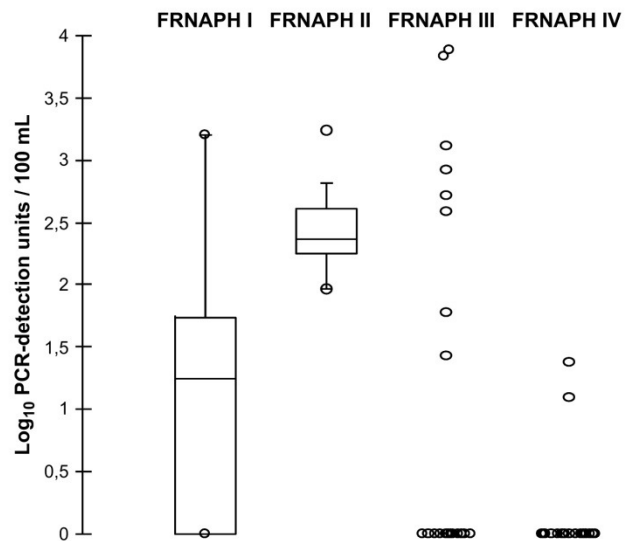


Fig. 1 – Concentration of F-specific RNA phage genogroups ( $n = 23$ ) in river water samples. Box: 25th and 75th percentiles, whisker: 10th and 90th percentiles, horizontal line within the box: median, dot: minimum and maximum values.

(Mann–Whitney test,  $P_{\text{EC}} = 0.06$ ,  $P_{\text{EN}} = 0.15$ ) whereas the mean water turbidity was significantly different (Mann–Whitney test,  $P = 0.03$ ).

### 3.3. Correlation between FRNAPH genogroups, faecal pollution indicators and human adenoviruses in river water

The global structure of the data, in terms of relationships between all these microbiological variables and water

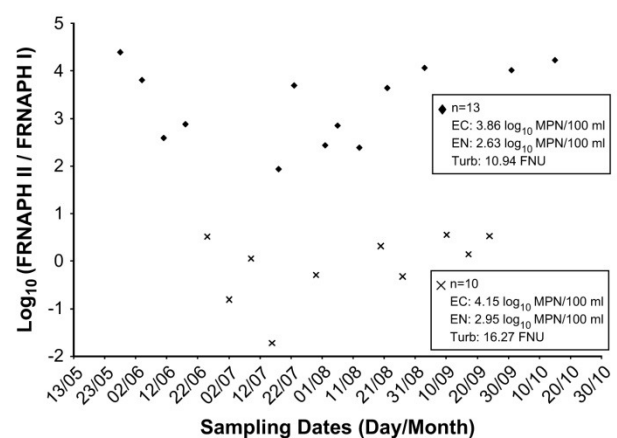


Fig. 2 – FRNAPH II/FRNAPH I ratio as a function of sampling dates. Ratios close to or above 2 are given in black. Ratios below 1 are represented by a cross. For each group, the mean concentrations of *Escherichia coli*, enterococci and turbidity are shown framed.

turbidity, was studied by Principal Component Analysis (PCA). Regarding FRNAPH genogroups, PCA was performed only with FRNAPH I and II because of too few positive results for FRNAPH III and IV. As indicated in Fig. 3, the variability explained by the first (F1) and the second (F2) factorial axes are respectively 50.41% and 21.50%, yielding thus a first plane (F1, F2) that summarizes 72% of the total information in the data. The graph of the variables on plane (F1, F2) shows that all of the variables considered are well represented with respect to the correlation circle, allowing a sound interpretation and a simple synopsis of the correlation patterns of the variables. The first factorial axis (i.e., F1) is positively correlated with most of the microbiological variables: bacterial indicators (EC and EN), SOMCPH, FRNAPH II and genome of human adenoviruses. The second factorial axis (i.e., F2) appears to be more specifically correlated with FRNAPH I and water turbidity. Moreover, it is interesting to note that the angle on the graph formed by both groups of variables indicates that the variables FRNAPH I and turbidity are rather independent from all the others, especially FRNAPH II and human adenoviruses. Assumptions made in accordance with the graphic illustration, are confirmed by the correlation matrix analysis performed on the basis of the correlation matrix as displayed in Table 1. FRNAPH I concentration is positively correlated with water turbidity ( $r=0.489$ ,  $P=0.018$ ). The five variables represented by the first factorial axis are positively correlated with one another ( $P<0.05$ ), except SOMCPH and FRNAPH II. EN and EC showed the strongest correlation ( $r=0.825$ ), followed by EN and SOMCPH ( $r=0.721$ ), and EC and FRNAPH II ( $r=0.615$ ). Human adenovirus concentration is positively correlated with concentrations of bacterial indicators (EN:  $r=0.616$ , EC:  $r=0.513$ ), somatic coliphages ( $r=0.593$ ) and FRNAPH II ( $r=0.493$ ). The genome concentration of

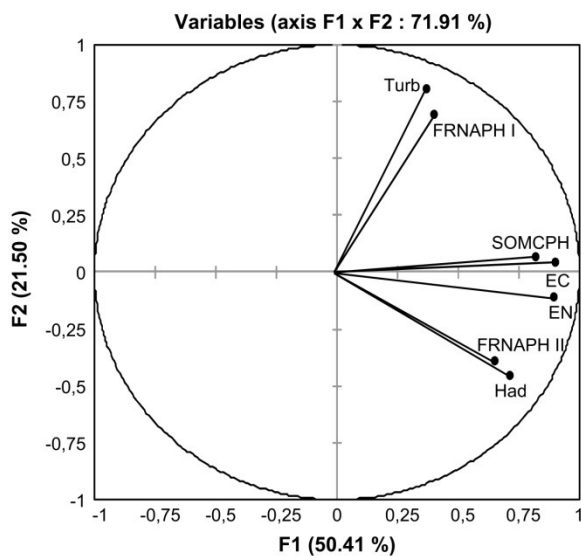


Fig. 3 – Principal component analysis on the microbiological variables plus water turbidity: graph of the variables on plane (F1, F2).

Table 1 – Correlation matrix (Pearson correlation coefficient and p-values). Values in italics are significantly different from 0.

| Variables | FRNAPH I             | FRNAPH II            | EC                   | EN                   | SOMCPH              | Had                 | Turb |
|-----------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|---------------------|---------------------|------|
| FRNAPH I  | 1                    |                      |                      |                      |                     |                     |      |
| FRNAPH II | 0.215 ( $P=0.324$ )  | 1                    |                      |                      |                     |                     |      |
| EC        | 0.398 ( $P=0.060$ )  | 0.615 ( $P=0.002$ )  | 1                    |                      |                     |                     |      |
| EN        | 0.184 ( $P=0.401$ )  | 0.501 ( $P=0.015$ )  | 0.825 ( $P<0.0001$ ) | 1                    |                     |                     |      |
| SOMCPH    | 0.254 ( $P=0.242$ )  | 0.330 ( $P=0.125$ )  | 0.596 ( $P=0.003$ )  | 0.721 ( $P<0.0001$ ) | 1                   |                     |      |
| Had       | -0.056 ( $P=0.799$ ) | 0.493 ( $P=0.017$ )  | 0.513 ( $P=0.012$ )  | 0.616 ( $P=0.002$ )  | 0.593 ( $P=0.03$ )  | 1                   |      |
| Turb      | 0.489 ( $P=0.018$ )  | -0.147 ( $P=0.502$ ) | 0.328 ( $P=0.127$ )  | 0.255 ( $P=0.240$ )  | 0.382 ( $P=0.072$ ) | 0.008 ( $P=0.973$ ) | 1    |

adenoviruses is found to increase in the same way as the concentration of FRNAPH II genome.

#### 4. Discussion

To start with, this study was aimed at optimizing the methodological aspects of genotyping implementation in river water. The use of real-time RT-PCR for F-specific RNA phage genotyping has been described as a rapid and specific approach (Ogorzaly and Gantzer, 2006). PCR efficiency has been reported as similar for the four TaqMan assays, with values ranging from 87% to 95%. Nevertheless, the sensitivity of the TaqMan assays was found to be different between the four genogroups in regard to the titration of the initial viral suspensions (from 0.1 to 10 PFU). This disparity in sensitivity could be due to different amounts of free RNA and/or different proportions of infectious or non-infectious particles in the four viral suspensions.

As regards the use of real-time RT-PCR for F-specific phage genotyping in river water, a number of drawbacks have been pointed out. First, the volume treated is usually quite limited as nucleic acid extraction procedures are often based on an initial volume of 140  $\mu$ L. This may be sufficient for samples hosting a massive viral pollution load (e.g., wastewaters) but not for less polluted waters (e.g., river waters). To overcome such a drawback, a procedure allowing the extraction of viral genome from 5 mL aliquots of river water was selected. This volume was enough to get 100% positive results for at least one genogroup in the river water samples tested ( $n=8$ ). For less polluted river waters, a concentration step based on an adsorption/elution procedure may be useful (Lucena et al., 2003). In such a case, a validation step may be necessary to establish that the four genogroups are similarly concentrated. The second drawback of the proposed RT-PCR, as underlined by Love et al. (2007), is that the primers and probes were designed with too small a number of nucleotide sequences (obtained from GenBank database). Even if only 8 river water samples were tested, our assays demonstrated that 100% of the 84 plaques obtained by culture were also detectable by real-time RT-PCR. Moreover, each selected plaque was associated with only one specific RT-PCR signal, showing that the approach is also specific for each genogroup and that the design of primers and probes used allows detection of a large number of distinct environmental plaques. The third and last matter of concern is the use of a phage cultivation step prior to genotyping. In the present work, FRNAPH II and I were found in similar proportions following the culture step, whereas by direct RT-PCR analysis the ratio clearly favoured FRNAPH II. Similar conclusions can be drawn for the other two genogroups (FRNAPH III and IV), which were hardly detectable following the culture step but clearly identified by direct RT-PCR analysis. It is well established that direct real-time RT-PCR assays detect infectious as well as non-infectious phages. Yet, the four genogroups exhibit differential decreases in infectivity over time (Brion et al., 2002; Schaper et al., 2002; Long and Sobsey, 2004) and the viral genome persists longer than the infectious character of the corresponding virus (Gassilloud

et al., 2003; Kirs and Smith, 2007). Therefore, under our conditions, the culture step might have favoured the most resistant genogroup (FRNAPH I) and underestimated the less resistant one (FRNAPH II). However, further research conducted on a larger number of samples and on various river waters is needed to confirm these results.

The second goal of this study was to find out what correlations there might be between faecal pollution indicators and FRNAPH genogroups. Bacterial (*E. coli* and enterococci) or viral (somatic coliphages) faecal indicators were investigated to characterize the overall level of faecal pollution and human adenoviruses were used to characterize the human-caused pollution (Pina et al., 1998). Those indicators revealed a high level of faecal pollution with concentrations ranging from 3 to 4  $\log_{10}$  MPN or PFU/100 mL. This can easily be explained by the proximity of a town of about 250,000 inhabitants and an overall watershed heavily populated. As already observed by other authors, *E. coli* (EC) and enterococci (EN) are strongly correlated with each other in river water (Lucena et al., 2003), in bathing water (Contreras-Coll et al., 2002) and in groundwater (Lucena et al., 2006). Moreover, at our sampling site, bacterial indicators were also correlated with somatic coliphages. The correlations between SOMCPH and the two bacterial indicators were lower compared to those between EC and EN. This observation confirms the fact that the two standard bacterial indicators seem to yield similar information on faecal pollution and that comparing one bacterial indicator to one bacteriophage could prove more interesting.

Besides, the faecal pollution observed in this river can be described as of human origin, as evidenced by the broad occurrence (100% of positive samples) and the high concentration (more than 3  $\log_{10}$  genome copies/100 mL) of the human adenovirus genome. These findings are consistent with several recent studies on quantitative assessments of the human adenovirus genome in aquatic environments. Adenoviruses were detected by real-time PCR with concentrations ranging from  $10^2$  to  $10^4$  genome copies per litre in one of California's urban rivers (Choi and Jiang, 2005), from  $7 \cdot 10^0$  to  $4 \cdot 10^3$  virus particles per litre in Lake Michigan (Xagoraki et al., 2007) and from  $2 \cdot 10^0$  to  $7 \cdot 10^3$  PCR-detection units per litre along the Tamagawa River in Tokyo (Haramoto et al., 2007).

For the study site, largely subjected to a human pollution, the relevance of FRNAPH genotyping by real-time RT-PCR was investigated. In this connection, two new points of interest were highlighted. The first one to be taken into account was the information brought by FRNAPH II, a genogroup usually detected in urban wastewaters. In the river water considered here, FRNAPH II was consistently found to be abundant and the statistical analyses have shown a positive correlation between the concentration of FRNAPH II, human adenoviruses, and bacterial indicators. Thus, their presence in our samples confirms the anthropogenic character of the faecal pollution sources found. Additionally, FRNAPH II could be giving information about the viral pollution.

Previous studies (Havelaar et al., 1993; Jiang et al., 2001; Ballester et al., 2005) have documented the existence of a relationship between the presence of F-specific phages and that of enteric viruses, especially for human enteric



adenoviruses 40 and 41. Other authors have frequently described the existence of correlations between bacterial indicators and phages proposed as indicators of faecal contamination in various kinds of samples: raw and treated wastewaters (Mandilara et al., 2006), sea water (Ibarluzea et al., 2007) or fresh water (Contreras-Coll et al., 2002). However, all these studies focused on the overall concentration of F-specific phages (PFU/mL) but not on the proportion or concentration of each genogroup. Only one study (Gourmelon et al., 2007) has underlined the existence of a link between *E. coli* concentration and the presence of human FRNAPH in French estuaries. Nevertheless, the genotyping method used was the one requiring a prior culture step (Beekwilder et al., 1996). Consequently, it is the first time that a statistical link is observed between FRNAPH II, faecal indicators and human adenoviruses. In our case, this confirms that pollution is mainly of human origin. Furthermore, the fact that FRNAPH II concentrations were found to be quite steady may be an indication of an ongoing pollution, probably coming from wastewater distribution systems or direct human activities.

The PCA and the correlation analysis have shown that FRNAPH I was correlated neither with the concentration of FRNAPH II nor with that of bacterial or viral faecal indicators. The absence of a link between the concentrations of FRNAPH I and FRNAPH II could be interpreted as a difference in faecal origin. Conversely, a relationship has been shown between FRNAPH I and the water turbidity observed at the sampling site. When turbidity increased, FRNAPH I concentration was greater. This suggests that the origin of this genogroup could be related to streaming phenomena following precipitations. Another interesting fact was the amount of FRNAPH I which was seen to be highly fluctuating. As a matter of fact, animal pollution is a sporadic occurrence because French legislation does not allow discharge of animal wastewater in rivers. Livestock waste is treated and spread on farm fields. It can therefore be assumed that water pollution comes from streaming into the river depending on meteorological factors which are inconstant and affect turbidity. As a consequence, FRNAPH II/FRNAPH I ratio may be an interesting tool for faecal source tracking. Indeed, depending on the sign of the ratio, it seems possible to determine the main source of pollution at a given point.

## 5. Conclusions

F-specific RNA phage genotyping by real-time RT-PCR was applied to river water. The results obtained reveal that:

- such an approach is useful because all water samples were positive for at least one genogroup.
- the distribution of the genogroups differs from that obtained with culture-based methods.
- the level of genogroup II is positively correlated with the concentrations of bacterial faecal indicators and human adenoviruses.
- the concentrations of genogroup I and II are not correlated, which supports the assumption of different faecal sources for these two major genogroups.

## Acknowledgments

This work was funded by an EC contract 513648, Project VIROBATHE and the Conseil Régional de Lorraine (ZAbM [Zone Atelier du bassin de la Moselle]). We thank the Chambre Régionale d'Agriculture de Lorraine for the livestock data.

## REFERENCES

- AFNOR (1996) Norm procedure XP T 90-451. Testing water: Detection of enterovirus. Method by concentration on glass wool and detection by cell culture. Association Française de Normalisation, Saint-Denis La Plaine, France.
- Allard, A., Albinsson, B., Wadell, G., 2001. Rapid typing of human adenoviruses by a general PCR combined with restriction endonuclease analysis. *Journal of Clinical Microbiology* 39 (2), 498-505.
- Ballester, N.A., Fontaine, J.H., Margolin, A.B., 2005. Occurrence and correlations between coliphages and anthropogenic viruses in the Massachusetts Bay using enrichment and ICC-nPCR. *Journal of Water and Health* 3 (1), 59-68.
- Beekwilder, J., Nieuwenhuizen, R., Havelaar, A.H., van Duin, J., 1996. An oligonucleotide hybridization assay for the identification and enumeration of F-specific RNA phages in surface water. *Journal of Applied Bacteriology* 80 (2), 179-186.
- Blanch, A.R., Belanche-Munoz, L., Bonjoch, X., Ebdon, J., Gantzer, C., Lucena, F., Ottoson, J., Kourti, C., Iversen, A., Kuhn, I., Moce, L., Muniesa, M., Schwartzbrod, J., Skraber, S., Papageorgiou, G., Taylor, H.D., Wallis, J., Jofre, J., 2004. Tracking the origin of faecal pollution in surface water: an ongoing project within the European Union research programme. *Journal of Water and Health* 2 (4), 249-260.
- Blanch, A.R., Belanche-Munoz, L., Bonjoch, X., Ebdon, J., Gantzer, C., Lucena, F., Ottoson, J., Kourti, C., Iversen, A., Kuhn, I., Moce, L., Muniesa, M., Schwartzbrod, J., Skraber, S., Papageorgiou, G.T., Taylor, H., Wallis, J., Jofre, J., 2006. Integrated analysis of established and novel microbial and chemical methods for microbial source tracking. *Applied and Environmental Microbiology* 72 (9), 5915-5926.
- Bollback, J.P., Huelsenbeck, J.P., 2001. Phylogeny, genome evolution, and host specificity of single-stranded RNA bacteriophage (family Leviviridae). *Journal of Molecular Evolution* 52 (2), 117-128.
- Brion, G.M., Meschke, J.S., Sobsey, M.D., 2002. F-specific RNA coliphages: occurrence, types, and survival in natural waters. *Water Research* 36 (9), 2419-2425.
- Choi, S., Jiang, S.C., 2005. Real-time PCR quantification of human adenoviruses in urban rivers indicates genome prevalence but low infectivity. *Applied and Environmental Microbiology* 71 (11), 7426-7433.
- Cole, D., Long, S.C., Sobsey, M.D., 2003. Evaluation of F+ RNA and DNA coliphages as source-specific indicators of fecal contamination in surface waters. *Applied and Environmental Microbiology* 69 (11), 6507-6514.
- Contreras-Coll, N., Lucena, F., Mooijman, K., Havelaar, A., Pierzo, V., Boque, M., Gawler, A., Holler, C., Lambiri, M., Mirolo, G., 2002. Occurrence and levels of indicator bacteriophages in bathing waters throughout Europe. *Water Research* 36 (20), 4963-4974.
- Dryden, S.K., Ramaswami, B., Yuan, Z., Giammar, D.E., Angenent, L.T., 2006. A rapid reverse transcription-PCR assay for F+ RNA coliphages to trace fecal pollution in Table Rock Lake on the Arkansas-Missouri border. *Water Research* 40 (20), 3719-3724.
- Furuse, K., Ando, A., Osawa, S., Watanabe, I., 1981. Distribution of ribonucleic acid coliphages in raw sewage from treatment

- plants in Japan. *Applied and Environmental Microbiology* 41 (5), 1139-1143.
- Gassilloud, B., Schwartzbrod, L., Gantzer, C., 2003. Presence of viral genomes in mineral water: a sufficient condition to assume infectious risk? *Applied and Environmental Microbiology* 69 (7), 3965-3969.
- Gourmelon, M., Caprais, M.P., Segura, R., Le Mennec, C., Lozach, S., Piriou, J.Y., Rince, A., 2007. Evaluation of two library-independent microbial source tracking methods to identify sources of fecal contamination in French estuaries. *Applied and Environmental Microbiology* 73 (15), 4857-4866.
- Haramoto, E., Katayama, H., Oguma, K., Ohgaki, S., 2007. Quantitative analysis of human enteric adenoviruses in aquatic environments. *Journal of Applied Microbiology* 103 (6), 2153-2159.
- Havelaar, A.H., van Olphen, M., Drost, Y.C., 1993. F-specific RNA bacteriophages are adequate model organisms for enteric viruses in fresh water. *Applied and Environmental Microbiology* 59 (9), 2956-2962.
- Hernroth, B.E., Conden-Hansson, A.C., Rehnstam-Holm, A.S., Girones, R., Allard, A.K., 2002. Environmental factors influencing human viral pathogens and their potential indicator organisms in the blue mussel, *Mytilus edulis*: the first Scandinavian report. *Applied and Environmental Microbiology* 68 (9), 4523-4533.
- Hsu, F.C., Shieh, Y.S., van Duin, J., Beekwilder, M.J., Sobsey, M.D., 1995. Genotyping male-specific RNA coliphages by hybridization with oligonucleotide probes. *Applied and Environmental Microbiology* 61 (11), 3960-3966.
- Ibarluzea, J.M., Santa Marina, L., Moreno, B., Serrano, E., Larburu, K., Maiztegi, M.J., Yarzabal, A., 2007. Somatic coliphages and bacterial indicators of bathing water quality in the beaches of Gipuzkoa, Spain. *Journal of Water and Health* 5 (3), 417-426.
- ISO 10705-1, 1995a. Water Quality: Detection and Enumeration of Bacteriophages. Part 1: Enumeration of F-specific RNA Bacteriophages. International Organisation for Standardisation, Geneva, Switzerland.
- ISO 10705-2, 1995b. Water Quality: Detection and Enumeration of Bacteriophages. Part 2: Enumeration of Somatic Coliphages. International Organisation for Standardisation, Geneva, Switzerland.
- ISO 9308-3, 1998a. Water Quality: Detection and Enumeration of *Escherichia coli* and Coliform Bacteria. Part 3: Miniaturized Method (most Probable Number) for the Detection and Enumeration of *E. coli* in Surface and Waste Water. International Organisation for Standardisation, Geneva, Switzerland.
- ISO 7899-1, 1998b. Water Quality: Detection and Enumeration of Intestinal Enterococci. Part 1: Miniaturized Method (most Probable Number) for Surface and Waste Water. International Organisation for Standardisation, Geneva, Switzerland.
- ISO 7027, 1999. Water Quality: Determination of Turbidity. International Organisation for Standardisation, Geneva, Switzerland.
- Jiang, S., Noble, R., Chu, W., 2001. Human adenoviruses and coliphages in urban runoff-impacted coastal waters of Southern California. *Applied and Environmental Microbiology* 67 (1), 179-184.
- Kirs, M., Smith, D.C., 2007. Multiplex quantitative real-time reverse transcriptase PCR for F+ specific RNA coliphages: a method for use in microbial source tracking. *Applied and Environmental Microbiology* 73 (3), 808-814.
- Long, S.C., Sobsey, M.D., 2004. A comparison of the survival of F+ RNA and F+ DNA coliphages in lake water microcosms. *Journal of Water and Health* 2 (1), 15-22.
- Love, D.C., Vinje, J., Khalil, S.M., Murphy, J., Lovelace, G.L., Sobsey, M.D., 2007. Evaluation of RT-PCR and reverse line blot hybridization for detection and genotyping F+ RNA coliphages from estuarine waters and molluscan shellfish. *Journal of Applied Microbiology* 104 (4), 1203-1212.
- Lucena, F., Mendez, X., Moron, A., Calderon, E., Campos, C., Guerrero, A., Cardenas, M., Gantzer, C., Shwartzbrod, L., Skrabber, S., Jofre, J., 2003. Occurrence and densities of bacteriophages proposed as indicators and bacterial indicators in river waters from Europe and South America. *Journal of Applied Microbiology* 94 (5), 808-815.
- Lucena, F., Ribas, F., Duran, A.E., Skrabber, S., Gantzer, C., Campos, C., Moron, A., Calderon, E., Jofre, J., 2006. Occurrence of bacterial indicators and bacteriophages infecting enteric bacteria in groundwater in different geographical areas. *Journal of Applied Microbiology* 101 (1), 96-102.
- Mandilara, G.D., Smeti, E.M., Mavridou, A.T., Lambiri, M.P., Vatopoulos, A.C., Rigas, F.P., 2006. Correlation between bacterial indicators and bacteriophages in sewage and sludge. *FEMS Microbiology Letters* 263 (1), 119-126.
- O'Connell, K.P., Bucher, J.R., Anderson, P.E., Cao, C.J., Khan, A.S., Gostomski, M.V., Valdes, J.J., 2006. Real-time fluorogenic reverse transcription-PCR assays for detection of bacteriophage MS2. *Applied and Environmental Microbiology* 72 (1), 478-483.
- Ogorzaly, L., Gantzer, C., 2006. Development of real-time RT-PCR methods for specific detection of F-specific RNA bacteriophage genogroups: application to urban raw wastewater. *Journal of Virological Methods* 138 (1-2), 131-139.
- Osawa, S., Furuse, K., Watanabe, I., 1981. Distribution of ribonucleic acid coliphages in animals. *Applied and Environmental Microbiology* 41 (1), 164-168.
- 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 (9), 3376-3382.
- Rutjes, S.A., Italiaander, R., van den Berg, H.H., 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 (7), 3734-3740.
- Schaper, M., Duran, A.E., Jofre, J., 2002. Comparative resistance of phage isolates of four genotypes of F-specific RNA bacteriophages to various inactivation processes. *Applied and Environmental Microbiology* 68 (8), 3702-3707.
- Schaper, M., Jofre, J., 2000. Comparison of methods for detecting genotypes of F-specific RNA bacteriophages and fingerprinting the origin of faecal pollution in water samples. *Journal of Virological Methods* 89 (1-2), 1-10.
- Vinje, J., Oudejans, S.J., Stewart, J.R., Sobsey, M.D., Long, S.C., 2004. Molecular detection and genotyping of male-specific coliphages by reverse transcription-PCR and reverse line blot hybridization. *Applied and Environmental Microbiology* 70 (10), 5996-6004.
- Wolf, S., Hewitt, J., Rivera-Aban, M., Greening, G.E., 2008. Detection and characterization of F+ RNA bacteriophages in water and shellfish: application of a multiplex real-time reverse transcription PCR. *Journal of Virological Methods* 149 (1), 123-128.
- Xagoraki, I., Kuo, D.H., Wong, K., Wong, M., Rose, J.B., 2007. Occurrence of human adenoviruses at two recreational beaches of the Great Lakes. *Applied and Environmental Microbiology* 73 (24), 7874-7881.

Dans l'article scientifique précédent, les résultats concernant les adénovirus ont été obtenus par PCR en temps réel (Hernroth *et al.*, 2002), à partir de l'analyse des concentrats issus de la filtration de 10L d'eau sur une cartouche de laine de verre (100% d'échantillon positifs, n=23). Parallèlement à cette recherche d'adénovirus, l'ensemble des concentrats a également été soumis à une nested-PCR ciblant les adénovirus humains (Allard *et al.*, 2001) avec et sans contrôle interne d'amplification, ainsi qu'à une ICC-PCR. La nested-PCR en présence d'IAC a permis à la fois de confirmer les résultats obtenus par PCR en temps réel et de déceler l'éventuelle présence d'inhibiteurs de PCR. La nested-PCR sans IAC a permis de réaliser un séquençage des produits amplifiés pour identifier les sérotypes isolés. En effet, la région amplifiée par cette méthode a été décrite comme étant assez conservée pour la détection de l'ensemble des adénovirus humains, mais également assez hétérogène pour permettre le typage des virus (Allard *et al.*, 2001). Ce séquençage a été réalisé par la société Genome Express, directement à partir des produits de nested PCR. L'ICC-PCR a permis de préciser le caractère infectieux des adénovirus isolés à partir des échantillons d'eau de rivière.

Toujours à partir des mêmes concentrats, les norovirus ont également été recherchés par semi-nested RT-PCR.

Initialement, à chaque date de prélèvement (n=23), quatre échantillons de 10L ont été soumis à l'étape de concentration, portant ainsi le nombre d'échantillons total à 92. Les analyses par nested-PCR ont été effectuées sur ces 92 échantillons.

Premièrement, les résultats des analyses par nested-PCR en présence d'IAC, nous ont permis de confirmer la présence d'adénovirus dans 100% des échantillons obtenus positifs par PCR en temps réel (n=23). La présence d'inhibiteurs de PCR a été évaluée sur l'ensemble de ces échantillons (n=92). Celle-ci n'a que très rarement été décelée, à la hauteur de 2% des échantillons. La Figure 27 expose un exemple de photographie de gel d'électrophorèse obtenu après amplification de 8 échantillons environnementaux en présence d'IAC.

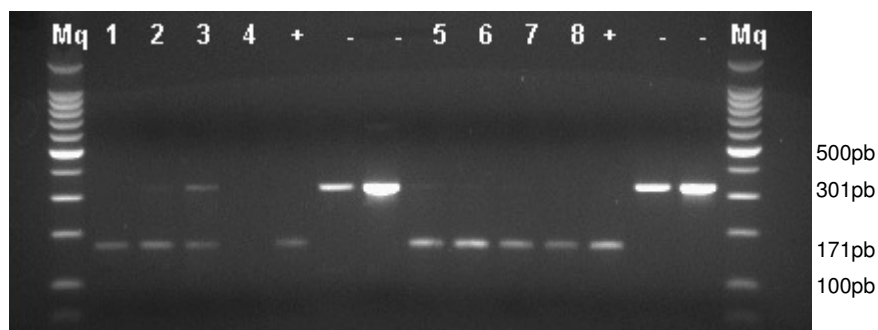


Figure 27. Exemple de photographie d'un gel d'électrophorèse obtenu après une nested PCR ciblant les adénovirus humains lors de l'analyse de 8 échantillons d'eau de rivière (1 à 8), de 2 témoins positifs (+) et de 4 témoins négatifs (-). 7 échantillons sont considérés comme positifs et l'échantillon numéro 4 est considéré comme inhibé. Mq : marqueur de poids moléculaire.

Suite à l'amplification sans IAC, l'ensemble des résultats de séquençage confirme bien la mise en évidence spécifique d'adénovirus humains. Parmi les douze échantillons soumis au séquençage, deux sérotypes ont ainsi pu être identifiés. Les deux séquences majoritairement observées correspondent aux adénovirus sérotype 41 (n=8) et sérotype 31 (n=2). Dans deux échantillons, la séquence déterminée apparaît comme étant un mélange entre les adénovirus 41 et 31. Les séquences obtenues ont été comparées aux séquences référencées disponibles dans la base de données Genbank, puis positionnées sur un arbre phylogénétique regroupant plusieurs sérotypes d'adénovirus humains (Figure 28). A titre information, comme montré sur la figure, le témoin positif utilisé dans l'ensemble des analyses consacrées aux adénovirus est un adénovirus sérotype 2.

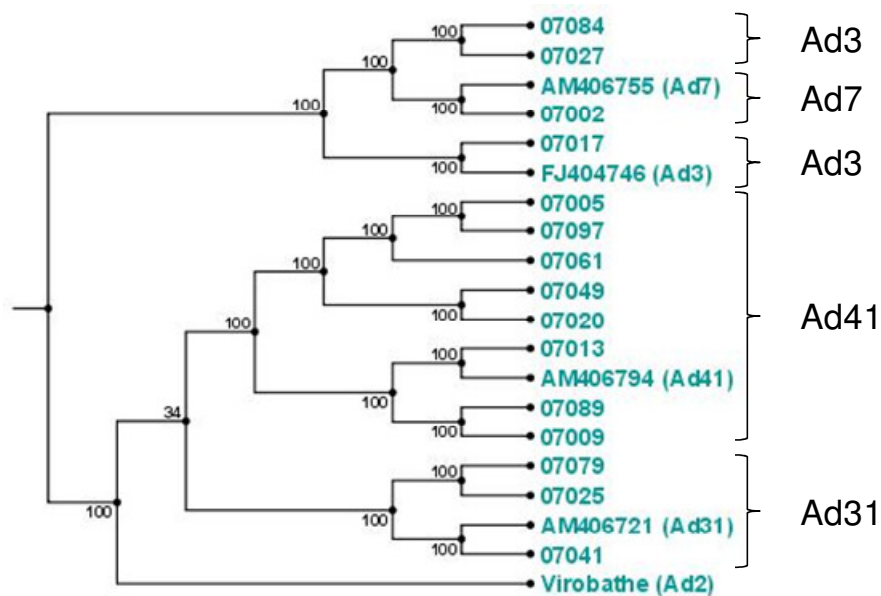


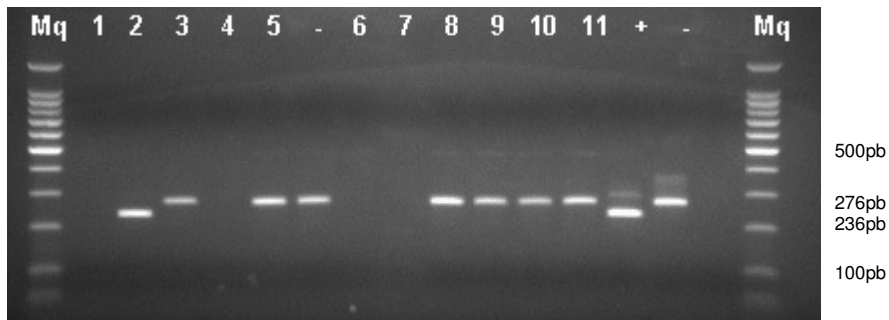
Figure 28. Arbre phylogénétique établi à partir d'une séquence de 96 nucléotides du gène codant la protéine hexon et obtenu par la méthode UPGMA, auquel sont associées des valeurs de bootstrap (logiciel CLC DNA Workbench 5.0). Les échantillons numérotés (numérotés 07---) correspondent aux adénovirus isolés à partir de l'eau de rivière par PCR directe et par ICC-PCR. Les autres numéros correspondent à des séquences référencées dans la base de données Genbank.

Deuxièmement, la recherche des adénovirus infectieux a été réalisée par ICC-PCR, c'est-à-dire la combinaison d'une étape de culture cellulaire sur les cellules A549 suivie d'une étape de détection par nested-PCR (Allard *et al.*, 2001). Les résultats de cette analyse par ICC-PCR indiquent la présence d'adénovirus infectieux dans 56% des échantillons d'eau de rivière (n=23). Pour faire le parallèle avec les résultats présentés dans l'article scientifique, une étude supplémentaire de corrélation a été entreprise pour comparer les résultats concernant les adénovirus infectieux avec ceux obtenus pour les autres microorganismes d'intérêt, c'est-à-dire les indicateurs bactériens, les indicateurs viraux et les génogroupes des bactériophages ARN F-spécifiques. Cette étude indique que la présence d'adénovirus infectieux est uniquement corrélée positivement avec la concentration en phages appartenant au génogroupe II (Test de Mann-Whitney, P=0,036). Aucun lien n'a été mis en évidence pour les autres microorganismes.

De façon similaire à la démarche expérimentale suivie lors de l'analyse directe par PCR qualitative, une partie des produits de nested-PCR, obtenus suite à l'analyse par ICC-PCR, a également été soumise à une étape de séquençage. Parmi les 5 échantillons testés, 2 ont pu être associés à un adénovirus sérotype 31, 2 autres au sérotype 3 et le dernier au sérotype 7. Par comparaison avec les résultats de séquençage obtenus lors d'une analyse directe par nested-PCR, deux sérotypes supplémentaires ont pu être identifiés (Figure 28). De plus, aucun adénovirus 41 infectieux n'a été mis en évidence. Ce résultat était attendu du fait que les adénovirus dits entériques (sérotype F) sont connus pour être généralement plus difficiles à cultiver que les autres adénovirus et aussi pour infecter les cellules sans effet cytopathogène (de Jong *et al.*, 1983). Malgré de nombreuses tentatives sur des systèmes cellulaires variés, comme les cellules 293 (Brown et Petric, 1986), les cellules PLC/PRF5 (Grabow *et al.*, 1992) ou encore les cellules CaCo-2 (Pinto *et al.*, 1995), l'isolement et la multiplication des adénovirus 40 et 41 n'est toujours pas évidente (Jiang, 2006). La lignée cellulaire A549, utilisée au cours de cette étude, a également été proposée pour la culture des adénovirus 40 (Hashimoto *et al.*, 1991) et a récemment fait l'objet d'une méthodologie permettant la détection des adénovirus entériques par la technique des plages de lyse (Cromeans *et al.*, 2008). Bien que cette méthode semble prometteuse, elle n'a pas encore permis de détecter des virus « sauvages » issus d'échantillons cliniques ou environnementaux.

Par ailleurs, il faut garder à l'esprit que, dans le contexte de notre étude, le système de PCR utilisé cible l'ensemble des adénovirus humains et que, par conséquent, le séquençage permet uniquement d'identifier la séquence génomique majoritairement présente. Néanmoins, ces observations permettent, une fois de plus, de mettre l'accent sur l'effet de la culture des microorganismes avant leur détection et leur identification, puisque celle-ci semble favoriser indirectement certaines souches ou espèces virales.

Enfin, il a également été envisagé de rechercher les norovirus par semi-nested RT-PCR. La technique d'amplification sélectionnée est une combinaison des amorces décrites par Green *et al.* (1998) et Vennema *et al.* (2002). La RT-PCR one-step est commune aux deux génogroupes, alors que la seconde PCR permet de distinguer les norovirus appartenant au génogroupe I de ceux appartenant au génogroupe II. Sur les 92 échantillons d'eau de rivière analysés, seul le génome de norovirus GGII a pu être identifié et ce, dans 7 échantillons (8%). Toutefois, il est important de souligner que la présence d'inhibiteurs de PCR a été mise en évidence dans une forte proportion des échantillons, s'élevant à environ 47% (n=92). La Figure 29 donne un exemple de gel d'électrophorèse obtenu après l'analyse d'échantillons environnementaux. Par comparaison avec les résultats obtenus pour les adénovirus, où la présence d'inhibiteurs n'a que très rarement été observée, il est raisonnable de penser que ces inhibiteurs jouent un rôle important lors de l'étape de RT-PCR one-step.



**Figure 29.** Exemple de photographie d'un gel d'électrophorèse obtenu après une nested PCR ciblant les norovirus génogroupe II : l'échantillon 2 est considéré comme positif, l'échantillon numéro 4 est considéré comme inhibé et les autres échantillons sont considérés comme négatifs. Mq : marqueurs de poids moléculaire, + : contrôle positif, - : contrôle négatif.

Aucune association n'a pu être mise en évidence entre la présence du génome de norovirus et les autres paramètres microbiologiques mesurés (Tests de Mann-Whitney-Wilcoxon,  $P > 0,05$ ). Parmi les 5 échantillons positifs obtenus, un seul a pu être séquencé. La séquence génomique obtenue a permis d'identifier un norovirus GGII, génotype 4. La faible prévalence des norovirus dans nos échantillons peut, en partie, être expliquée par la période de prélèvement recouvrant principalement la saison estivale (de mai à octobre 2006). Or, il est clair que la présence des norovirus dans les eaux de rivière, tout comme dans les eaux usées, est dépendante de la situation épidémiologique et qu'ils sont donc principalement détectés durant la saison hivernale, contrairement aux adénovirus qui sont détectés tout au long de l'année (Westrell *et al.*, 2006; Katayama *et al.*, 2008).

\*\*\*\*\*

*En résumé, cette étude réalisée à partir d'une eau de rivière nous a apporté des informations originales, à la fois, sur la réalisation du génotypage dans des eaux moins chargées en microorganismes fécaux et sur la description et la caractérisation des pollutions fécales et virales de ce type de milieu. D'un point de vue méthodologique, nous avons, tout d'abord, démontré que notre méthode de génotypage peut être directement appliquée à un échantillon d'eau sans étape préalable de culture. De plus, nous avons également souligné que cette étape de culture pouvait être à l'origine d'une interprétation différente des résultats par rapport à ceux obtenus par biologie moléculaire. Concernant la pollution fécale, pour la première fois, une corrélation positive a été établie entre les phages appartenant au génogroupe II, les indicateurs bactériens et les adénovirus humains. Par opposition, aucune corrélation n'a été observée entre les phages appartenant au génogroupe II et ceux appartenant au génogroupe I. Ce travail a également mis en évidence une forte prévalence des adénovirus humains au niveau de l'eau de rivière analysée.*

## *Chapitre 4 :*

*Etude de la pollution fécale et virale des eaux souterraines*







La présence de microorganismes dans les eaux souterraines et les aquifères dépend très largement des conditions physiques et chimiques qui gouvernent leur transport et leur devenir dans ce type d'environnement. Dans ce contexte, en raison de leur plus petite taille, les phages ont naturellement été proposés comme indicateurs de pollution et comme indicateurs du comportement des virus entériques pathogènes, à la place des bactéries fécales (Leclerc *et al.*, 2000).

Ainsi, le premier objectif de cette étude, consacrée aux eaux souterraines, était d'estimer à la fois l'inactivation des particules virales et la dégradation de leur génome dans cet environnement. L'évaluation de ces phénomènes a été réalisée en utilisant d'une part, la technique de référence qu'est la culture où le référentiel est la particule infectieuse et d'autre part, les techniques de biologie moléculaire où le référentiel est le génome viral. Au vu des résultats obtenus lors du travail sur l'eau de rivière, cette étude a été restreinte aux virus apparaissant comme les plus intéressants, c'est-à-dire les adénovirus humains et bactériophages ARN F-spécifiques, avec une attention particulière pour les phages des génogroupes I et II. De plus, ces virus sont détectables aussi bien par les méthodes de culture que par les techniques de biologie moléculaire. Le principal but de ce travail était de comparer la survie des deux génogroupes sélectionnés, mais également de la comparer à celle des adénovirus. L'ensemble des résultats, obtenus par biologie moléculaire, étaient d'autant plus intéressants que peu de données sont disponibles sur la dégradation du génome des virus sélectionnés. Enfin, nous nous sommes également intéressés à l'influence de la température de stockage (4°C *versus* 20°C), paramètre physique connu pour être le plus important facteur de l'inactivation virale (Yates *et al.*, 1985).

Le second objectif était d'évaluer la présence de génome viral au niveau de différentes eaux souterraines afin de voir si la recherche des phages ARN F-spécifiques, et plus particulièrement des génogroupes qui leur sont associés, peut être utilisée comme outil d'étude de la pollution fécale et virale dans cet environnement. A cet effet, quatre eaux d'origine distinctes ont été sélectionnées en fonction de leurs caractéristiques hydrogéologiques. Ainsi, à partir des données de l'analyse virologique, nous tenterons également de déterminer une densité en génome viral des eaux sélectionnées et de comparer les différents sites d'études entre eux. Pour atteindre cet objectif, une concentration des virus sur membrane électropositive a été utilisée (Cf. Matériels et Méthodes).

## **1. PERSISTANCE DES PARTICULES VIRALES DANS L'EAU SOUTERRAINE**

### **1.1. Démarche expérimentale**

Pour réaliser l'étude de survie, l'adénovirus 2 et les phages MS2 (génogroupe I) et GA (génogroupe II) sont pris comme modèles viraux. L'eau souterraine du site 1 est sélectionnée comme milieu d'étude (Cf. Aspect méthodologiques de la détection des virus). Cette eau est utilisée brute, c'est-à-dire qu'elle n'a subi aucun traitement préalable (ni physico-chimique, ni de décontamination) et possède donc des microorganismes autochtones. L'eau est répartie dans deux flacons en verre puis contaminée par les virus d'intérêt de manière à obtenir des solutions de travail titrant à environ  $10^6$  UFP/mL (phages) ou NPPUC/mL (adénovirus). Deux suspensions distinctes sont préparées, une, contenant de l'adénovirus et du phage MS2

et l'autre, contenant également de l'adénovirus associé du phage GA. En effet, il est indispensable de séparer les deux bactériophages car ils produisent des effets similaires sur le tapis bactérien lors de la détection par la méthode des plages de lyse. Après homogénéisation, chaque solution est aliquotée dans des cryotubes de 4,5mL puis placée à l'obscurité aux deux températures d'étude, c'est-à-dire 4 et 20°C. Le suivi de la concentration virale se fait à l'échelle des particules infectieuses, ainsi qu'au niveau du génome viral. Pour chaque condition, l'expérience est réalisée en duplicat sur une période d'environ 200 jours.

Pour l'analyse des particules infectieuses, la quantification des bactériophages ARN F-spécifiques est réalisée par la méthode des plages de lyse avec la souche *Escherichia coli* K12 Hfr (ATCC-23631) comme bactérie hôte. Les adénovirus infectieux sont quantifiés par la méthode du Nombre le Plus Probable (NPP) à l'aide des cellules A549. Les résultats issus des méthodes de culture cellulaire nous permettent de suivre l'évolution de la concentration en unités infectieuses en fonction du temps. Celle-ci est représentée par le  $\log_{10} (Q_t/Q_0)$ , où  $Q_0$  représente la concentration en unités infectieuses au début de l'expérience et  $Q_t$  représente la concentration au temps t.

Pour l'analyse du génome, l'extraction des acides nucléiques est réalisée avec le kit QIAamp RNA viral mini kit (QIAGEN, réf. 52906) à partir de 140µL d'échantillon, suivie d'une quantification par (RT)-PCR en temps réel. L'évolution de la quantité d'acides nucléiques en fonction du temps est suivie par l'intermédiaire de la valeur de Ct. En effet, cette valeur, mesurée lors de la PCR en temps réel est directement proportionnelle à la quantité de génome contenu dans l'échantillon analysé. Ainsi, la dégradation du génome viral est quantifiée à l'aide de l'équation suivante :

$$\log_{10} \frac{Q_t}{Q_0} = \frac{Ct_{(0)} - Ct_{(t)}}{s}$$

- avec :
- $Q_0$ : quantité de génome au début de l'expérience,
  - $Q_t$ : quantité de génome à un temps donné
  - $Ct_{(0)}$ : Ct obtenu par PCR en temps réel au temps  $t_0$
  - $Ct_{(t)}$ : Ct obtenu par PCR en temps réel au temps t
  - s : pente de la courbe standard de PCR en temps réel

## 1.2. Résultats de l'étude de persistance

Dans un premier temps, l'ensemble des données obtenues a été étudié de manière à définir comment modéliser au mieux les valeurs expérimentales. Les résultats des essais effectués pour tester la linéarité du modèle de survie sont présentés dans le Tableau 30. Il apparaît que, dans 8 cas sur 12, le modèle log linéaire (ou exponentiel) est adapté pour décrire la survie des particules virales et la dégradation du génome viral en fonction du temps. Les tests effectués sur la nullité du coefficient directeur de la droite de régression montrent que, 9 fois sur 12, la survie des virus décroît avec le temps. De la même manière, les tests effectués sur la nullité de l'ordonnée à l'origine montrent que cette hypothèse est acceptée dans 8 cas sur 12. Ainsi, au vu de cette analyse préliminaire, il apparaît qu'un modèle linéaire, de la forme  $\log_{10} (Q_t/Q_0) = at$ ,

est adapté à l'étude de la persistance des virus en fonction du temps. Ce modèle a, par conséquent, été utilisé pour l'ajustement de toutes les séries de données expérimentales.

**Tableau 30. Tests d'hypothèse relatifs au modèle linéaire utilisé pour l'étude de la persistance des virus en fonction du temps.  $H_0$  : hypothèse nulle.**

| Virus             | Conditions expérimentales | n  | Test de linéarité<br>( $H_0$ : modèle linéaire) | Test sur la pente<br>( $H_0$ : $\alpha=0$ ) | Test sur l'ordonnée à l'origine<br>( $H_0$ : $\beta=0$ ) |
|-------------------|---------------------------|----|---|---|--|
| Bactériophage MS2 | Infectieux / 20°C         | 6  | P = 0,0117*                                     | P = 0,005**                                 | P = 0,057  |
|                   | Infectieux / 4°C          | 30 | P = 0,0001**                                    | P < 10 <sup>-9**</sup>                      | P = 0,959  |
|                   | Génome / 20°C             | 10 | P = 0,6473                                      | P < 0,001**                                 | P = 0,607  |
|                   | Génome / 4°C              | 12 | P = 0,0137*                                     | P < 10 <sup>-6**</sup>                      | P = 0,292  |
| Bactériophage GA  | Infectieux / 20°C         | 4  | P = 0,5019                                      | P = 0,006**                                 | P = 0,616  |
|                   | Infectieux / 4°C          | 28 | P = 0,1913                                      | P < 10 <sup>-9**</sup>                      | P = 0,008**  |
|                   | Génome / 20°C             | 18 | P = 0,0547                                      | P < 10 <sup>-7**</sup>                      | P = 0,015**  |
|                   | Génome / 4°C              | 8  | P = 0,0233*                                     | P = 0,194                                   | P = 0,237  |
| Adénovirus 2      | Infectieux / 20°C         | 36 | P = 0,4315                                      | P < 10 <sup>-9**</sup>                      | P < 10 <sup>-7**</sup>                                   |
|                   | Infectieux / 4°C          | 22 | P = 0,1783                                      | P = 0,008**                                 | P < 10 <sup>-7**</sup>                                   |
|                   | Génome / 20°C             | 22 | P = 0,8578                                      | P = 0,127                                   | P = 0,343  |
|                   | Génome / 4°C              | 14 | P = 0,1032                                      | P = 0,105                                   | P = 0,395  |

\* test significatif au risque 5%, \*\* test significatif au risque 1%

Selon les résultats présentés dans le Tableau 30, trois séries de données, correspondant à la dégradation du génome adénoviral à 4 et 20°C et à celle du génome du phage GA à 4°C, n'ont pas fait l'objet d'une modélisation car les concentrations mesurées sont restées stables au cours du temps (i. e. pente non significativement différente de zéro), du moins dans le cadre de la durée de l'expérience. Les données expérimentales, ainsi que les modélisations qui leur sont associées sont présentées sur la

Figure 30, la Figure 31 ainsi que dans le Tableau 31.

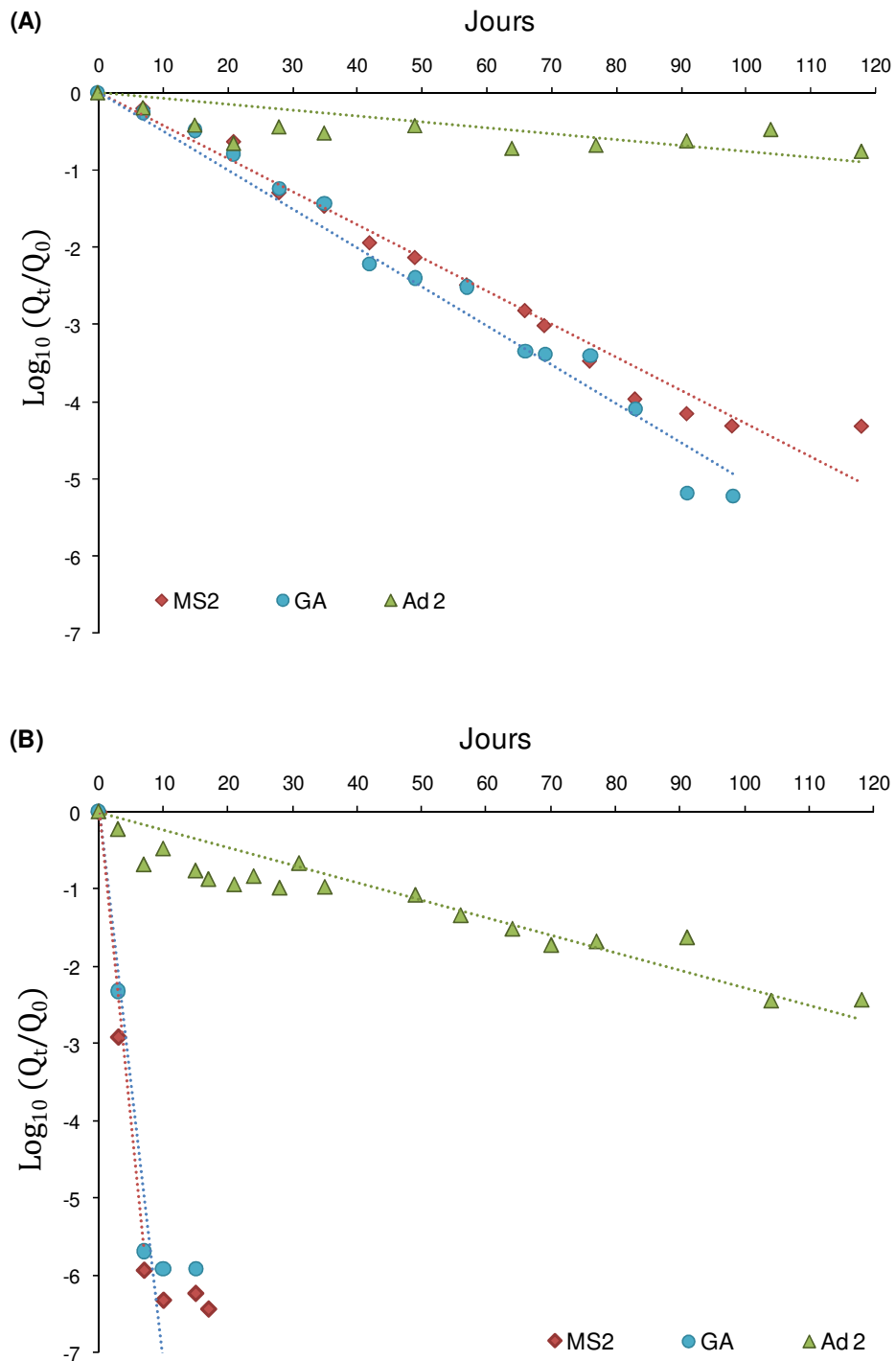


Figure 30. Cinétiques d'inactivation des particules infectieuses dans l'eau souterraine du site 1 en fonction du type viral et de la température de stockage : 4°C (A) et 20°C (B). Chaque point représente une moyenne de deux mesures expérimentales.

Pour le phage GA, la durée de l'expérience a suffi à inactiver l'ensemble des particules infectieuses aux deux températures étudiées. A 4°C, le dernier résultat positif est obtenu au jour 98, contrairement au phage MS2 qui est encore présent après 120 jours de stockage à une concentration d'environ  $10^2$  UFP/mL.

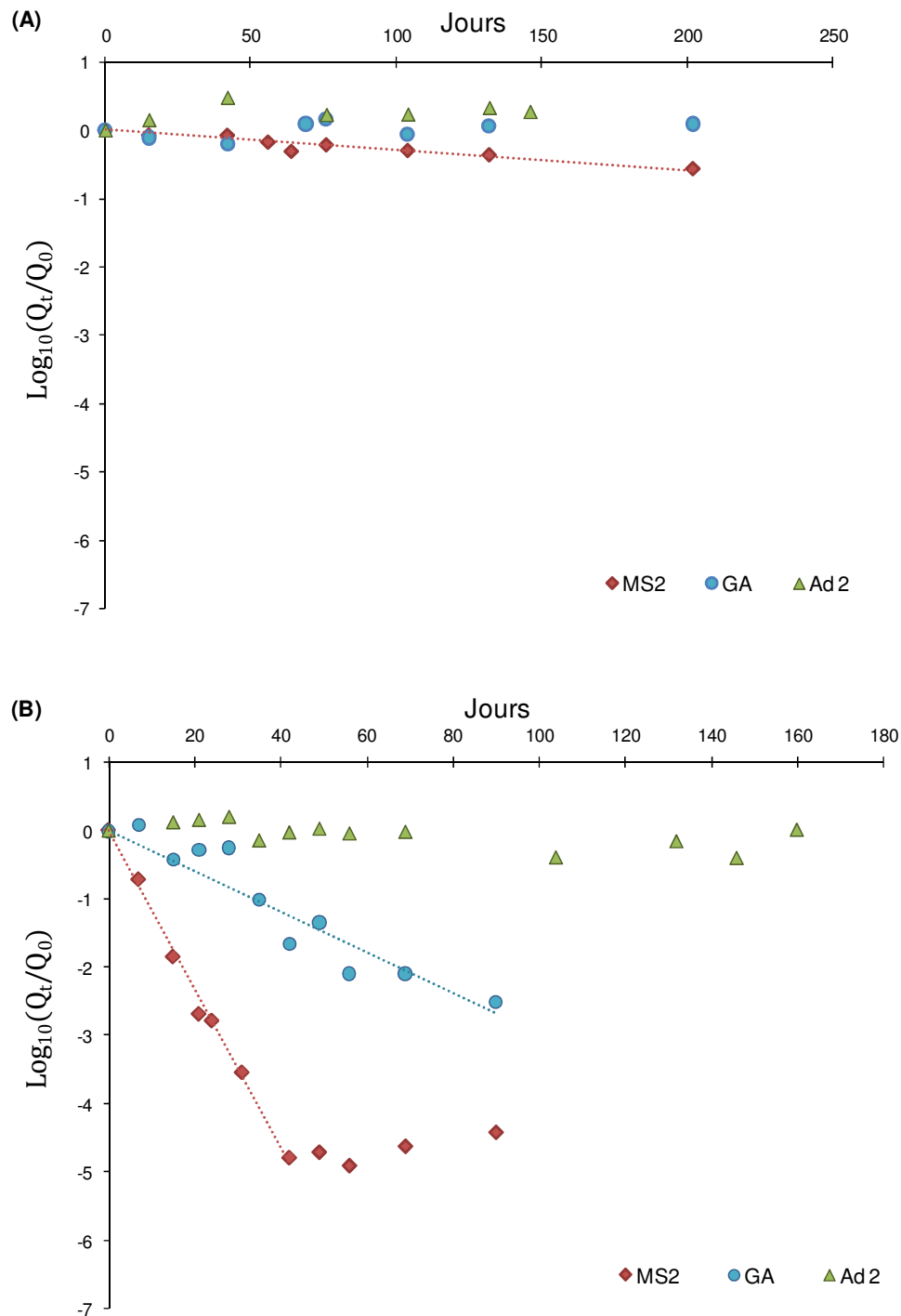


Figure 31. Cinétiques de dégradation des génomes viraux dans l'eau souterraine du site 1 en fonction du type viral et de la température de stockage : 4°C (A) et 20°C (B). Chaque point représente une moyenne de deux mesures expérimentales.

Sur la durée de l'expérience, le génome viral a toujours pu être mis en évidence à des concentrations supérieures aux limites de détection, quelles que soient les conditions expérimentales. Néanmoins, les points de mesure pour le génome des phages MS2 et GA, n'ont été réalisés que sur une période d'analyse d'environ 100 jours. A 20°C, pour le phage MS2, la cinétique de dégradation du génome viral montre une partie linéaire jusqu'à environ 40 jours, puis une deuxième partie caractérisée par une traîne proche de la

limite de détection. Les quatre derniers points de cette traine n'ont pas été pris en compte pour estimer la dégradation du génome viral.

Le Tableau 31, présenté ci-après, synthétise l'ensemble des résultats de modélisation des valeurs expérimentales. L'analyse de régression et l'ajustement d'un modèle linéaire ont permis d'estimer les taux de variation journalière et les  $T_{90}$  pour chaque virus et chaque condition expérimentale. Le  $T_{90}$  correspond au temps nécessaire pour observer une diminution de 90% de la population virale. Un intervalle de confiance à 95% a également été associé à chaque valeur de  $T_{90}$ .

**Tableau 31. Modélisation de l'inactivation des particules infectieuses et de la dégradation du génome viral en fonction du type viral et des conditions de stockage. Le modèle retenu est  $\log_{10}(Q_t/Q_0) = at$ . Valeurs de  $T_{90}$  (jours) avec intervalle de confiance à 95%**

| Virus             | Condition expérimentale | n  | Pente   | P            | Taux de variation (% / jour) | $T_{90}$ (jours) | Intervalle de confiance à 95% |
|-------------------|-------------------------|----|---------|--------------|------------------------------|------------------|-------------------------------|
| Bactériophage MS2 | Infectieux / 20°C       | 6  | -0,7195 | P < 0,0001** | 81%                          | 1,4              | [1,1 – 1,6]                   |
|                   | Infectieux / 4°C        | 30 | -0,0428 | P < 0,0001** | 9%                           | 23,4             | [22,5 – 24,2]                 |
|                   | Génome / 20°C           | 10 | -0,1166 | P < 0,0001** | 23%                          | 8,6              | [8,1 – 9,0]                   |
|                   | Génome / 4°C            | 12 | -0,0030 | P < 0,0001** | 1%                           | 333,3            | [282,7– 383,9]                |
| Bactériophage GA  | Infectieux / 20°C       | 4  | -0,8081 | P < 0,0001** | 84%                          | 1,2              | [1,1 -1,3]                    |
|                   | Infectieux / 4°C        | 28 | -0,0503 | P < 0,0001** | 11%                          | 19,9             | [19,1 – 20,7]                 |
|                   | Génome / 20°C           | 18 | -0,0299 | P < 0,0001** | 7%                           | 33,4             | [28,8 – 35,1]                 |
|                   | Génome / 4°C            | 8  |         | ns           |                              |                  |                               |
| Adénovirus 2      | Infectieux / 20°C       | 36 | -0,0279 | P < 0,0001** | 6%                           | 35,8             | [33,3 – 38,4]                 |
|                   | Infectieux / 4°C        | 22 | -0,0076 | P < 0,0001** | 2%                           | 131,6            | [100,7 – 162,8]               |
|                   | Génome / 20°C           | 22 |         | ns           |                              |                  |                               |
|                   | Génome / 4°C            | 14 |         | ns           |                              |                  |                               |

ns : non significatif, \*\* : test significatif au risque 1%

Concernant l'effet température, quel que soit le virus considéré, une élévation de la température provoque une diminution de la persistance des particules infectieuses et du génome associé (Test des signes,  $P=0,0313$ ). Cette observation de l'effet de la température, indépendamment du type de virus, a été confirmée et renforcée pour chaque condition expérimentale étudiée par des comparaisons de pentes effectuées deux à deux à l'aide de tests paramétriques (Tests de Student,  $P<0,001$ ). Nos résultats sont en adéquation avec ceux obtenus lors d'autres études sur la sensibilité des virus à la chaleur dans les eaux souterraines (Yates *et al.*, 1985; Enriquez *et al.*, 1995; Allwood *et al.*, 2003; John et Rose, 2005). A titre d'exemple, dans notre étude, les bactériophages infectieux MS2 et GA persistent environ 17 fois mieux à 4°C qu'à 20°C (rapport des pentes ou des  $T_{90}$ ). Cette valeur semble être principalement due à une très importante inactivation des particules virales à 20°C. Par comparaison avec les données existantes, Allwood *et al.* (2003) estiment, pour le phage MS2, un  $T_{90}$  de 25,7 jours à 4°C dans de l'eau du robinet déchlorée. Cette valeur est comparable à nos résultats. Par contre, à 20°C, ils estiment un  $T_{90}$  de 18,7 jours, ce qui est bien supérieur à la valeur estimée dans cette étude.

Comme attendu suite aux résultats obtenus sur l'eau usée, il a été observé que la dégradation du génome viral est toujours moins rapide que l'inactivation des particules infectieuses et ce, quel que soit le type viral et quelle que soit la température d'étude (Test des signes,  $P=0,0313$ ). Cette conclusion a également été confirmée et renforcée par l'étude de comparaison de pentes (Tests de Student,  $P<10^{-10}$ ). A ce propos, il est important de souligner que ce type de comparaison n'a que très rarement été effectué pour les phages ARN F-spécifiques et qu'il n'existe pas, à notre connaissance de données relatives à la dégradation du génome des adénovirus.

Concernant les différences de survie entre les trois virus modèles sélectionnés, l'analyse globale des résultats par un test non paramétrique n'a pas permis de hiérarchiser clairement les virus selon leur persistance (Test de Friedman,  $P=0,10$ ). Toutefois, les tests de comparaison de pentes réalisés deux à deux montrent que la persistance des adénovirus 2 est meilleure que celles des phages MS2 et GA, dans des conditions comparables (Tests de Student,  $P<10^{-6}$ ). Ainsi, à 4°C, les particules infectieuses d'adénovirus 2 sont environ 5 à 6 fois plus résistantes que celles des phages MS2 et GA. La différence est encore plus marquée à 20°C, avec une persistance environ 25 supérieure des adénovirus 2 par rapport aux phages. Ces données confortent la seule étude disponible sur la survie et l'importante persistance des adénovirus par rapport aux virus à ARN (Enriquez *et al.*, 1995). Ces auteurs montrent que, dans une eau du robinet, les adénovirus 40 et 41 sont toujours plus résistants que le virus de l'hépatite A et que le poliovirus 1, quelle que soit la température. Ceci serait expliqué par la nature du génome viral. Là encore, les résultats obtenus sur la persistance du génome viral appuient cette hypothèse car aucune dégradation de l'ADN n'a été observée contrairement à l'ARN.

Après comparaison des données de persistance des deux phages modèles sélectionnés, MS2 et GA, appartenant respectivement aux génogroupes I et II des bactériophages ARN F-spécifiques, il semble plus difficile de se prononcer quant à une quelconque hiérarchie entre les deux virus. Plus en détails, au niveau des particules infectieuses, il semblerait que l'inactivation du phage MS2 soit plus lente que celle du phage GA à 4°C (Test de Student,  $P<10^{-6}$ ). Toutefois, ces résultats peuvent être nuancés car, à cette température, les  $T_{90}$  sont respectivement de 20 et 23 jours pour les phages GA et MS2. Aucune différence significative n'est observée à 20°C (Test de Student,  $P=0,307$ ). Concernant la dégradation du génome phagique à 20°C, la comparaison de pentes montre une différence de persistance des deux molécules d'ARN, celle de GA étant plus importante que celle de MS2. A 4°C, la comparaison n'a pas pu être effectuée car dans cette condition de stockage, l'ARN du phage GA ne semble pas affecté au cours du temps.

## 2. RECHERCHE DE GENOME VIRAL DANS LES EAUX SOUTERRAINES

### 2.1. Démarche expérimentale

Afin de voir si du génome viral peut être détecté dans les eaux souterraines, nous avons réalisé des analyses virologiques sur quatre sites d'étude présentant, a priori, des caractéristiques hydrogéologiques différentes (sites nommés 1, 2, 4 et 5). Les eaux souterraines provenant du site 1 et du site 2 sont identiques à celles utilisées pour le développement et l'optimisation de la méthode de concentration sur membrane électropositive (Cf. Aspects méthodologiques de la détection des virus). Les eaux correspondant aux sites 4 et 5 peuvent être assimilées à celle du site 1 du point de vue de leur composition physico-chimique et de leur origine géologique.

Une analyse virologique d'eau se déroule de la façon suivante (Figure 32):

- filtration (100L/h) sur site de 50 litres d'eau à l'aide du dispositif de filtration décrit précédemment (Cf. Matériels et Méthodes)
- extraction des acides nucléiques (Nuclisens kit) directement à partir de la membrane électropositive (Cf. Matériels et Méthodes)
- recherche des virus d'intérêt par (RT)-PCR en temps réel (Hernroth *et al.*, 2002; Ogorzaly et Gantzer, 2006)

Il a été décidé de réaliser 60 prélèvements d'eau souterraine, répartis de manière égale sur les 4 sites sélectionnés. Il a également été établi qu'un échantillon d'eau serait déclaré positif pour la présence de génome viral uniquement si deux analyses indépendantes de ce même échantillon s'avéraient positives.

Par ailleurs, de manière à s'assurer de la qualité des analyses effectuées, deux types de témoins négatifs ont été introduits au cours du déroulement de l'analyse virologique. Le premier se situe au niveau de l'étape de concentration et consiste à ajouter une cartouche qui ne subira pas de filtration mais qui sera ultérieurement analysée en aveugle. Le second témoin est ajouté au laboratoire au moment de l'étape d'extraction des acides nucléiques. Ces deux types de témoins négatifs ont subi l'ensemble des analyses virologiques, à savoir la recherche de génome d'adénovirus humains et des quatre génogroupes de phages ARN F-spécifiques.

En cas d'échantillon positif, des investigations supplémentaires ont été envisagées (Figure 32). Dans un premier temps, une recherche de particules virales infectieuses a été conduite par ICC-PCR, à partir de nouveaux prélèvements d'eau souterraine. Dans un deuxième temps, les échantillons présentant du génome viral lors de l'analyse par (RT)-PCR en temps réel, ont été soumis à une autre amplification, afin de pouvoir procéder à un séquençage du fragment amplifié.

Enfin, parallèlement à la recherche de génome viral, des indicateurs fécaux, à savoir les coliformes totaux, les coliformes fécaux, *Escherichia coli*, et les coliphages somatiques, ont également été systématiquement recherchés par les méthodes de référence, à partir de 250mL d'eau.



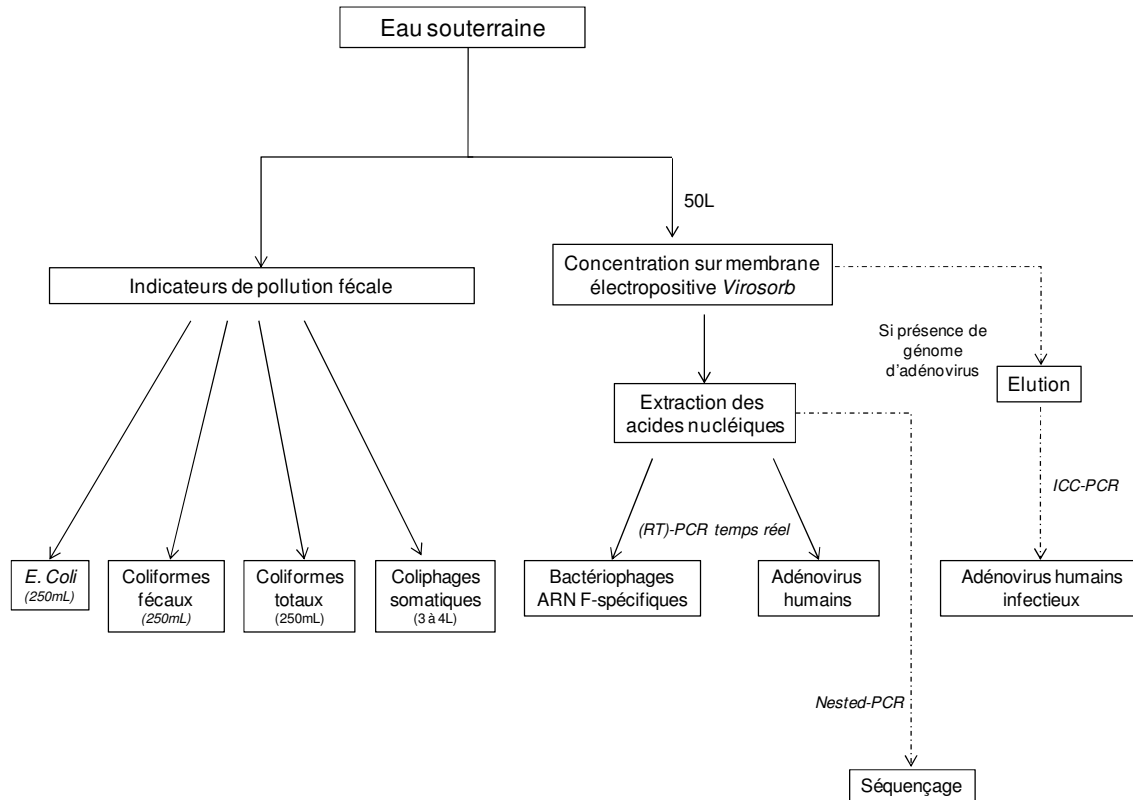


Figure 32. Schéma général des différentes étapes réalisées sur un prélèvement d'eau souterraine.

## 2.2. Résultats de l'analyse virologique des eaux souterraines

Sur la période d'étude considérée, la totalité des recherches consacrées aux indicateurs de pollution fécale (*E. coli*, coliphages somatiques et coliformes totaux et fécaux) s'est avérée négative.

Les résultats obtenus pour la recherche des différents types viraux sont regroupés dans le Tableau 32. Concernant les bactériophages ARN F-spécifiques, uniquement du génome appartenant aux phages de génogroupe I a été mis en évidence. Les trois autres génogroupes n'ont jamais été observés. Sur l'ensemble de la période de travail, seulement un échantillon, correspondant à un prélèvement effectué au niveau du site 1, s'est avéré positif. Concernant les adénovirus humains, du génome viral a été mis en évidence dans 7 échantillons sur les 60 analysés. Ces 7 échantillons sont répartis de la manière suivante parmi les différents sites : 1 sur le site 1, 2 sur le site 2, 4 sur le site 4 et 0 sur le site 5.

De la même manière, les deux types de témoins négatifs inclus au cours des analyses ont été analysés pour la présence des différents virus. Au total, sur les 200 analyses effectuées, aucune ne s'est montrée positive, au vu des critères fixés au début de cette étude.

**Tableau 32. Proportion d'échantillons positifs obtenus pour chaque site d'étude et pour chaque type de virus.**

| Virus                               | Site 1      | Site 2      | Site 4      | Site 5      | Total par type de virus |
|-------------------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------------------|
| Phages génogroupe I                 | 1/15        | 0/15        | 0/15        | 0/15        | 1/60                    |
| Phages génogroupe II                | 0/15        | 0/15        | 0/15        | 0/15        | 0/60                    |
| Phages génogroupe III               | 0/15        | 0/15        | 0/15        | 0/15        | 0/60                    |
| Phages génogroupe IV                | 0/15        | 0/15        | 0/15        | 0/15        | 0/60                    |
| Adénovirus humains                  | 1/15        | 2/15        | 4/15        | 0/15        | 7/60                    |
| <b>Total (tous virus confondus)</b> | <b>2/75</b> | <b>2/75</b> | <b>4/75</b> | <b>0/75</b> | <b>8/300</b>            |

➤ Dans un premier temps, à partir des résultats expérimentaux obtenus, la probabilité d'obtenir un échantillon positif pour la présence de génome viral a pu être calculée pour chaque site et pour l'ensemble des sites. Pour estimer cette probabilité, nous avons considéré l'ensemble des virus recherchés de manière globale, c'est-à-dire les adénovirus et les phages GGI, GGII, GGIII et GGIV. Le nombre d'analyses positives est la réalisation d'une variable aléatoire  $X$ , distribuée suivant une loi binomiale  $\mathcal{B}(n, \pi)$ , où  $n$  désigne le nombre d'échantillons analysés, tandis que  $\pi$  représente la probabilité inconnue d'observer un résultat positif. Les estimations de  $\pi$ , avec un intervalle de confiance à 95%, sont présentées dans le Tableau 33 pour chacun des quatre sites de prélèvements.

**Tableau 33. Estimation, avec intervalle de confiance à 95%, de la probabilité d'observer un résultat positif (tous virus confondus, n=75) pour les quatre sites de prélèvement et les témoins.**

| Echantillon<br>(nombre de positifs/nombre d'analyses) | Estimation de la probabilité<br>d'observer un échantillon positif | Intervalle de confiance<br>à 95% |
|---|---|----------------------------------|
| Site 1 (2/75)   | 0,027   | [0,003 ; 0,093]                  |
| Site 2 (2/75)   | 0,027   | [0,003 ; 0,093]                  |
| Site 4 (4/75)   | 0,053   | [0,015 ; 0,131]                  |
| Site 5 (0/75)   | 0,000   | [0,000 ; 0,048]                  |
| Témoins (0/200)                                       | 0,000   | [0,000 ; 0,002]                  |

La comparaison des probabilités estimées pour chaque site a également été réalisée. Les proportions d'échantillons positifs, tous virus confondus, ne sont pas statistiquement différents (test du rapport de vraisemblance,  $P=0,1297$ ). Il semble donc que les quatre sites soient caractérisés par des taux de contamination en génome viral équivalents. Dans l'éventualité d'une probabilité unique d'observer un échantillon positif, c'est-à-dire identique pour chacun des quatre sites étudiés, cette probabilité commune, calculée à partir des résultats, est estimée à 0,027 avec un intervalle de confiance à 95% compris entre [0,012 ; 0,052]. Une analyse complémentaire a été réalisée avec les résultats propres aux adénovirus humains. Le test du rapport de vraisemblance ( $P=0,082$ ) n'a pas permis de distinguer les quatre sites. Ainsi, il semble que les sites ne présentent pas des taux de contamination en adénovirus différents.

➤ Dans un deuxième temps, la comparaison des proportions d'échantillons positifs observées pour les eaux souterraines et pour les témoins négatifs a permis de montrer que, globalement (tous virus confondus et quel que soit le site), les échantillons analysés faisaient bien l'objet d'une contamination en génome viral (Test exact de Fisher,  $P=0,0162$ ) de nature intrinsèque (Tableau 34). Une origine exogène,

c'est-à-dire survenue pendant ou après l'étape de prélèvement des échantillons, par exemple lors des manipulations des cartouches, n'est cependant pas totalement exclue. Si l'on s'intéresse aux espèces virales, l'analyse montre que la présence de génome viral observée serait principalement due aux adénovirus humains (Test exact de Fisher,  $P=0,024$ ) et non aux phages ARN F-spécifiques (Test exact de Fisher,  $P>0,05$ ). Une étude similaire a été envisagée pour le cas particulier de chaque site de prélèvement. Les probabilités critiques correspondantes aux différents tests de comparaison, entre les sites et les témoins, sont consignées dans le Tableau 34.

**Tableau 34. Probabilités critiques obtenues lors de la comparaison des proportions d'échantillons positifs observés pour les eaux souterraines et pour les témoins négatifs (Test exact de Fisher).**

| Témoin  | Site 1<br>(2/75) | Site 2<br>(2/75) | Site 4<br>(4/75)             | Site 5<br>(0/75) | Ensemble des sites<br>(8/300) |
|---|------------------|------------------|------------------------------|------------------|-------------------------------|
| Ensemble des témoins négatifs pour un site donné (0/50) | $P=0,3581$       | $P=0,3581$       | $P=0,1254$                   | $P=1,000$        | -                             |
| Ensemble des témoins négatifs (0/200)                   | $P=0,0737$       | $P=0,0737$       | <b><math>P=0,0052</math></b> | $P=1$            | <b><math>P=0,0162</math></b>  |

Les résultats du Tableau 34 montrent que tous les tests de comparaison, à l'exception du test concernant le site 4 *versus* l'ensemble des témoins négatifs (Test exact de Fisher,  $P=0,0052$ ), sont non significatifs (Test exact de Fisher,  $P>0,05$ ). La différence significative notée au niveau du site 4 est également observée lorsque l'on s'intéresse uniquement aux résultats des adénovirus (Test exact de Fisher,  $P=0,004$ ). Ainsi, les sites 1, 2 et 5 ne sont pas significativement différents, en termes de taux de contamination virale (totale ou adénovirus) des témoins qui leur sont associés, ni de l'ensemble des témoins, contrairement au site 4. Au vu de ces résultats, il apparaît vraisemblable que la présence de génome d'adénovirus humains au niveau du site 4 soit due à une contamination intrinsèque. Par contre, aucune contamination virale particulière ne semble caractériser les sites de prélèvement 1, 2 et 5. L'ensemble des analyses statistiques décrites précédemment ont également été réalisées pour les bactériophages ARN F-spécifiques, tous génogroupes confondus, et aussi pour le cas particulier des bactériophages du génogroupe I. Aucun test ne s'est révélé significatif ( $P>0,15$ ). Ainsi, aucune contamination phagique ne semble caractériser les 4 sites sélectionnés.

Ces observations et conclusions peuvent être partiellement expliquées par les résultats obtenus lors de l'étude de survie. En effet, il a été clairement démontré que les adénovirus étaient beaucoup plus persistants que les bactériophages dans l'eau souterraine. De plus, sur une période d'environ 200 jours, aucune dégradation de l'ADN adénoviral n'a été observée, même à 20 °C. Or, il est généralement admis que la température de l'eau au niveau d'un aquifère soit aux alentours de 15 °C (Gordon et Toze, 2003), ce qui laisse supposer un temps de séjour potentiellement conséquent des molécules d'ADN.

➤ Suite à la mise en évidence de la présence de génome adénovirus au niveau du site 4 et comme cela avait été défini initialement, une recherche d'adénovirus infectieux a été entreprise. Pour ce faire, un prélèvement supplémentaire (6 cartouches de filtration) a été réalisé. En effet, il était impossible de

rechercher directement des adénovirus infectieux à partir des échantillons montrant la présence de génome viral puisque la membrane électropositive permettant de concentrer les virus a immédiatement été soumise à l'étape d'extraction des acides nucléiques. Les résultats obtenus par ICC-PCR se sont avérés négatifs (n=3). Cependant, il est important de souligner que, parallèlement à la recherche de particules infectieuses, une recherche de génome viral a été effectuée. Cette analyse s'est également montrée négative, ne permettant pas de conclure quant à la présence éventuelle d'adénovirus infectieux.

L'ensemble des échantillons présentant du génome d'adénovirus ont ultérieurement été soumis à une seconde étape d'amplification par nested-PCR sans IAC, afin de disposer de produits d'amplification pour réaliser un séquençage. Ceci avait pour but de confirmer l'appartenance du génome à des adénovirus et éventuellement d'identifier le sérotype. Sur l'ensemble des sept échantillons positifs obtenus, cinq ont pu être séquencés (Figure 33). Les deux échecs de séquençage concernent des positifs observés au niveau du site 4.

```

Site1      -TCAGAAACCCCACTGTGGCTCCGACCCACGATGTAACCACAGACAGGTCACAGCGACTG  59
Site2      -TCAGAAACCCCACTGTGGCTCCGACCCACGATGTAACCACAGACAGGTCACAGCGACTG  59
Site4      TTCAGAAACCCCACTGTGGCTCCGACCCACGATGTAACCACAGACAGGTCACAGCGACTG  60
Site4      -----CCACTGTGGCTCCGACCCACGATGTAACCACAGACAGGTCACAGCGACTG  50
Site2      -TCAGAAACCCCACTGTGGCTCCGACCCACGATGTAACCACAGACAGGTCACAGCGACTG  59
          *****

Site1      ACGCTGCGATTTCGTGCCAGTCGACCGCGAGGAC  92
Site2      ACGCTGCGATTTCGTGCCAGTCGACCGCGAGGAC  92
Site4      ACGCTGCGATTTCGTGCCAGTCGACCGCGAGGAC  93
Site4      ACGCTGCGATTTCGTGCCAGTCG-----  72
Site2      ACGCTGCGATTTCGTGCCAGTCGACNCGAG---  89
          *****
    
```

**Figure 33. Alignement des séquences nucléotidiques obtenues pour les échantillons d'eau souterraine positifs pour la présence de génome d'adénovirus (logiciel ClustalW : <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>).**

Comme le montre la Figure 33, les séquences obtenues pour les différents échantillons sont identiques, quels que soient le site et la date de prélèvement. Par comparaison avec les séquences disponibles dans la banque de données Genbank (test Blast), la séquence détectée a été identifiée comme un adénovirus F, sérotype 41. A titre informatif, il est intéressant de souligner que la recherche d'adénovirus infectieux n'aurait certainement pas abouti à un résultat positif, même si du génome viral avait été mis en évidence, car ce sérotype est connu pour être difficilement cultivable sur les systèmes cellulaires classiques de laboratoire. Ainsi, il semble cohérent de ne pas avoir pu mettre en évidence d'adénovirus infectieux, malgré une présence probable de génome d'adénovirus 41 dans l'eau souterraine du site 4.

➤ Dans un dernier temps, il semblait intéressant de tenter d'estimer la densité en génome viral propre à chaque site de prélèvement. Bien que ce calcul paraissait facilement envisageable au vu des résultats quantitatifs des analyses virologiques, il n'a pas été possible de réaliser une estimation juste et précise de cette densité pour chaque type viral. En effet, d'un point de vue statistique, les résultats quantitatifs de la densité virale propre à chaque site sont assez pauvres, puisque seuls 15 dénombrements sont disponibles par espèce de virus, ce qui ne permet guère d'envisager une analyse statistique inférentielle dans des conditions satisfaisantes.

\*\*\*\*\*

*En résumé, l'expérience de persistance, à partir d'eau souterraine artificiellement contaminée, démontre que, pour l'adénovirus 2 et les phages MS2 et GA, l'inactivation des particules infectieuses est plus rapide que la dégradation du génome viral. Les résultats obtenus pour les bactériophages ARN F-spécifiques complètent ceux déjà obtenus lors de l'étude consacrée aux eaux usées urbaines. Ces résultats renforcent aussi l'idée d'une très grande résistance des adénovirus par rapport aux autres virus entériques, dans des conditions environnementales et apporte, pour la première fois, des données sur la persistance du génome des adénovirus.*

*Lors de l'analyse virologique, les phages ARN F-spécifiques n'ont quasiment pas été observés et ce, quel que soit le génogroupe. Seul, du génome d'adénovirus 41 a pu être mis en évidence. Cette observation, couplée aux données de persistance de ces virus, supporte l'idée que l'ADN des adénovirus est un marqueur très conservateur qui permet de détecter des pollutions fécales a priori très anciennes.*



*Discussion générale - Conclusion*





L'objectif de notre travail était de préciser les relations entre la présence des différents génogroupes de phages ARN F-spécifiques et la pollution fécale et virale du milieu hydrique. L'ensemble des résultats obtenus amène au moins trois points de discussion fondamentaux.

Nous avons tout d'abord développé les premières RT-PCR en temps réel capables de géotyper les phages ARN F-spécifiques dans les environnements aquatiques. Il convient donc de discuter des avantages et des limites de cette approche par rapport aux outils existants. L'utilisation de cette méthode implique un changement de référentiel, puisque celle-ci met directement en évidence du génome viral et non plus des particules virales infectieuses. Ainsi, dans un deuxième temps, afin d'appréhender le changement de référentiel, nous avons étudié la répartition des quatre génogroupes dans des eaux usées urbaines. Ces dernières, considérées comme le premier maillon du cycle de pollution fécale des eaux naturelles, correspondent au milieu le mieux caractérisé en termes de présence des génogroupes de bactériophages ARN F-spécifiques. Par conséquent, il convient de comparer nos résultats à ceux existants dans la littérature. Enfin, la distribution des quatre génogroupes a été étudiée dans deux cas particuliers, totalement différents en termes de pollution fécale : une eau de rivière et des eaux souterraines. A propos de ces eaux, peu de choses sont décrites dans la littérature et il est donc intéressant de discuter de la présence des différents génogroupes par rapport au niveau de pollution fécale et virale de ces milieux.

Le premier aspect de notre étude a été consacré au développement d'une technique capable de détecter et de quantifier les quatre génogroupes des phages ARN F-spécifiques de façon rapide, sensible et spécifique. Notre choix s'est donc tout naturellement porté vers la RT-PCR en temps réel. Lors de la mise en place de ces expérimentations, aucune étude n'était publiée sur la détection des génogroupes par RT-PCR en temps réel. Seule une étude proposait l'utilisation d'une RT-PCR, ciblant spécifiquement les deux genres *Levivirus* et *Allolevivirus*, suivie d'une hybridation inverse permettant de distinguer les principaux phages de chaque génogroupe (Vinjé *et al.*, 2004). Notre démarche scientifique a consisté à cibler des zones conservées du génome viral spécifiques de chaque génogroupe. Les systèmes de RT-PCR ont été positionnés au niveau du gène de la réplicase pour les génogroupes II et IV, et au niveau du gène de la protéine de capsid pour les génogroupes I et III. Dans des études récentes (Kirs et Smith, 2007; Wolf *et al.*, 2008), visant également la mise au point de méthodes de RT-PCR en temps réel spécifiques des génogroupes, les auteurs sont arrivés à des conclusions similaires puisque, les gènes codant pour la réplicase et la protéine de capsid sont les plus fréquemment ciblés.

A partir de suspensions de phages purifiés, les quatre RT-PCR montrent toutes une linéarité sur 5 ou 6 unités logarithmiques avec des efficacités de PCR comprises entre 87% et 95%. La sensibilité des quatre RT-PCR en temps réel a été évaluée en effectuant, en parallèle, une quantification des phages infectieux par la méthode de culture. Ces sensibilités sont comprises entre  $2 \cdot 10^{-2}$  et  $2 \cdot 10^{-1}$  UFP/réaction pour le génogroupe I,  $2 \cdot 10^{-4}$  et  $2 \cdot 10^{-3}$  UFP/réaction pour les génogroupes II et IV, et entre  $2 \cdot 10^{-3}$  et  $2 \cdot 10^{-2}$  UFP/réaction pour le génogroupe III. Il apparaît donc d'emblée une différence de sensibilité importante à deux niveaux : d'une part entre la méthode de culture et la méthode de RT-PCR en temps réel ( $2 \cdot 10^{-4}$ ), et d'autre part entre les différentes RT-PCR ( $2 \cdot 10^{-1}$  versus  $2 \cdot 10^{-4}$ ). La différence de sensibilité entre les méthodes d'amplification génique et les méthodes de culture a déjà été largement décrite (Vantarakis et Papapetropoulou, 1998; Choi et Jiang, 2005; Muscillo *et al.*, 2008). Ainsi, les méthodes de PCR peuvent être

de 10 à 10 000 fois plus sensibles que les méthodes de culture cellulaire (Kopecka *et al.*, 1993; Thi *et al.*, 2006). Cependant, ces deux procédés ne sont pas directement comparables puisqu'ils ne quantifient pas les mêmes entités. Les méthodes de culture cellulaire mettent en évidence uniquement des particules virales infectieuses, alors que les techniques de PCR amplifient le génome viral, indépendamment du caractère infectieux. Dans la plupart des situations, et notamment lors de la préparation des stocks viraux, le rapport entre le nombre d'unités infectieuses et le nombre de copies de génome n'est pas connu (Callahan *et al.*, 2001; Thomas *et al.*, 2007). De nombreux facteurs peuvent modifier ce rapport, comme le type viral, les lignées cellulaires, la préparation des échantillons ou encore les conditions de culture (He et Jiang, 2005). Une différence dans le rapport particules infectieuses/nombre de copies de génome dans chacun des stocks de phages modèles utilisés peut aussi expliquer la différence de sensibilité apparente entre les quatre RT-PCR développées. Effectivement, il est peu probable que des RT-PCR comparables, avec de bonnes efficacités, présentent de telles variations de sensibilité. A titre de comparaison, dans une étude visant à développer des RT-PCR en temps réel pour détecter quatre sérotypes du virus de la dengue (Johnson *et al.*, 2005), les auteurs rapportent aussi des différences de sensibilité entre les quatre systèmes de RT-PCR ( $8.10^{-3}$  à  $5.10^{-1}$  UFP). Ils justifient ces variations de sensibilité par des proportions différentes de particules infectieuses et non infectieuses de leurs suspensions virales. De manière générale, les sensibilités de PCR exprimées en unités infectieuses sont assez variables et de l'ordre de  $10^1$  à  $10^{-4}$  UFP/réaction (Jothikumar *et al.*, 2005; Das *et al.*, 2008; Wolf *et al.*, 2008), contrairement aux sensibilités exprimées en nombre de copies de génome qui sont souvent de l'ordre de  $10^0$  à  $10^2$  copies/réaction (Heim *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2006; Kirs et Smith, 2007).

L'évaluation de la spécificité des amorces et des sondes a constitué une étape cruciale de notre étude. Celle-ci a été évaluée d'une part, en faisant appel à la recherche Blast, et d'autre part, en utilisant la RT-PCR lors de tests croisés sur des suspensions purifiées de phages modèles. Ces deux étapes ont permis de conclure que les systèmes de PCR dessinés donnent lieu à une détection spécifique des quatre génogroupes. Cette spécificité a également été évaluée sur des phages environnementaux, isolés à partir de prélèvements d'eau de rivière. Les résultats montrent que l'ensemble des plages de lyse obtenues ont pu être associées spécifiquement à un seul génogroupe, sans aucune ambiguïté dans les résultats, confirmant une nouvelle fois la spécificité de nos systèmes de PCR.

La nouvelle méthode de génotypage a ensuite été testée sur des échantillons environnementaux. Sur l'ensemble des analyses réalisées à partir de prélèvements d'eaux usées et d'eau de rivière, 100% des échantillons se sont révélés positifs pour au moins un génogroupe sur les quatre et ce, quelle que soit la nature des échantillons. Ainsi, les systèmes de PCR dessinés apparaissent tout à fait appropriés à l'analyse d'échantillons environnementaux, malgré un nombre limité de séquences génomiques disponibles au moment de leur construction.

Par ailleurs, notre méthode de génotypage s'affranchit totalement de l'étape de culture des phages. Ainsi, nous avons vérifié que notre technique permettait de détecter au moins autant de phages que ceux mis en évidence par la culture (méthode de référence). L'analyse moléculaire de plages de lyse isolées à partir d'échantillons d'eau de rivière, a montré que tous les phages cultivables étaient également détectables par RT-PCR en temps réel. De manière plus intéressante, nous avons parallèlement étudié l'impact de cette étape préliminaire de culture sur les résultats de génotypage. Après multiplication des phages infectieux présents au niveau des échantillons d'eau de rivière, seuls les génogroupes I et II ont pu être mis en

évidence dans des proportions comparables ( $\log_{10} \text{GGII}/\text{GGI}=0,30$ ). Par contre, sur les mêmes prélèvements d'eau, la RT-PCR en temps réel a identifié les quatre génogroupes, avec une très forte proportion de génogroupe II qui sont plus de 20 fois supérieure à celle du génogroupe I ( $\log_{10} \text{GGII}/\text{GGI}=1,5$ ). De manière très claire, l'étape de culture modifie la répartition des génogroupes en faveur du génogroupe I. Le peu de données disponibles dans la littérature concernant la recherche directe des génogroupes dans les eaux de rivière ne permet pas de confirmer cette observation, qui est pourtant d'une importance capitale lors de la détermination de l'origine de la pollution fécale. Toutefois, il est possible de souligner qu'après une étape de culture, il est unanimement montré que les génogroupes I et II sont toujours très majoritairement observés dans les eaux de surface (Brion *et al.*, 2002; Cole *et al.*, 2003; Stewart-Pullaro *et al.*, 2006; Love *et al.*, 2007). Dans l'ensemble de ces travaux, les phages infectieux appartenant au génogroupe I représentaient toujours au minimum 80% de la population totale observée, quelles que soient les origines supposées de pollution. Par analogie avec notre observation, les ratios de deux génogroupes majoritaires ( $\log_{10} \text{GGII}/\text{GGI}$ ), calculés à partir des résultats de ces quatre études sont très en faveur du génogroupe I (-1,09 à -1,32). Si l'on s'intéresse maintenant aux résultats de génotypage obtenus par RT-PCR directe, une seule étude nous apporte des informations (Wolf *et al.*, 2008). A partir d'échantillons d'eau de rivière ( $n=10$ ), ces auteurs rapportent des pourcentages d'échantillons positifs de respectivement 50%, 90%, 60% et 0% pour les génogroupes I à IV. Ceci est en conformité avec nos résultats, puisque dans notre étude sur l'eau de rivière ( $n=23$ ), respectivement 69%, 100%, 35% et 7% des échantillons étaient positifs pour la présence de génome viral appartenant respectivement aux quatre génogroupes. Par RT-PCR directe, les phages du génogroupe I ne sont donc pas majoritairement mis en évidence. Ainsi la confrontation de nos résultats aux données de la littérature tend à prouver un biais de l'étape de culture lors des études de génotypage et confirment ainsi les soupçons de Field et Samadpour (2007) quant à l'influence des cultures de laboratoire sur l'analyse des communautés de microorganismes environnementaux.

Plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour expliquer l'augmentation apparente de la proportion de génogroupe I après une étape de culture. Tout d'abord, une différence d'efficacité dans les processus d'infection des phages appartenant aux différents génogroupes a été suggérée (Kirs et Smith, 2007). La seconde hypothèse concerne la persistance des phages ARN F-spécifiques dans l'environnement. Il a été rapporté, à plusieurs reprises, que le taux de survie des phages infectieux était influencé par le génogroupe viral (Brion *et al.*, 2002; Schaper *et al.*, 2002a; Long et Sobsey, 2004; Muniesa *et al.*, 2009), pouvant par conséquent, biaiser les études de répartition des génogroupes à partir d'échantillons environnementaux (Schaper *et al.*, 2002b; Muniesa *et al.*, 2009). Selon les études et les conditions expérimentales, le phage MS2 (GGI) est soit décrit comme plus persistant que le phage GA (GGII) (Schaper *et al.*, 2002a; Long et Sobsey, 2004), soit présenté comme ayant une survie similaire à celle du phage GA (Kirs et Smith, 2007; Muniesa *et al.*, 2009). Une seule étude a comparé la dégradation de l'ARN de phages des quatre génogroupes (Kirs et Smith, 2007). Cette étude, réalisée dans de l'eau de mer exposée à la lumière et à une température de 20°C, montre que, sur une période de 7 jours, le génome des quatre phages modèles est dégradé de façon comparable. Sur la durée de l'expérience, cette dégradation a été estimée à environ 1  $\log_{10}$ . Notre étude, menée en eau souterraine sur les phages MS2 et GA, tend à montrer que la survie des phages infectieux est comparable ( $T_{90}$  de 20 à 23 jours à 4°C), mais que le génome du phage GA est dégradé moins rapidement que celui du phage MS2 ( $T_{90}$  de 33 (GA) et 9 (MS2) jours à 20°C). Au vu de l'ensemble de ces résultats, il est envisageable que notre méthode de génotypage par analyse directe

détecte davantage les phages appartenant au génogroupe II, contrairement à la méthode de culture qui semble favoriser les phages du génogroupe I.

En revanche, même si la différence de persistance entre les génogroupes n'est pas tranchée à l'heure actuelle, nos résultats montrent clairement que l'inactivation des phages infectieux (phages modèles ou phages « sauvages ») est plus rapide que la dégradation du génome viral et ce, quel que soit le milieu d'étude (eaux usées ou eaux souterraines) et quelle que soit la température de stockage (4°C ou 20°C). Par exemple, dans l'eau usée placée à 4°C, les valeurs de  $T_{90}$  sont respectivement de 21 jours pour le génome des phages appartenant au génogroupe III et de 9 jours pour les particules infectieuses. Ainsi, les résultats de génotypage obtenus, en ne tenant compte que des phages infectieux, peuvent souffrir du fait que ces derniers sont rapidement inactivés après avoir été déchargés dans les eaux. En utilisant les techniques de PCR pour les études de génotypage, il semble donc possible de suivre le génome phagique sur de plus longues périodes, alors même que les phages infectieux ne sont plus détectables. Cette différence de persistance entre les particules infectieuses et le génome viral avait déjà été largement documentée pour les virus pathogènes (Arnal *et al.*, 1998; Gassilloud *et al.*, 2003; Skraber *et al.*, 2004; Espinosa *et al.*, 2008), mais pas pour les phages ARN F-spécifiques, jusqu'à très récemment (Kirs et Smith, 2007; Bae et Schwab, 2008).

En résumé, nous avons développé la première méthode de génotypage des phages ARN F-spécifiques par RT-PCR en temps réel. Celle-ci peut être décrite comme étant sensible, spécifique et rapide. Elle permet de s'affranchir de l'étape préliminaire de culture et donc, en même temps, de minimiser les problèmes engendrés par des taux d'inactivation importants des particules infectieuses. De plus, elle permet aussi de mettre en évidence au moins autant de phages que la méthode de référence. A la lumière des résultats obtenus, il semble raisonnable de penser que cette méthode offre l'avantage de mettre en évidence les différents génogroupes sur une plus longue période de temps. L'inconvénient de cette approche concerne, bien évidemment, l'absence de données sur le caractère infectieux des phages détectés. Par conséquent, il n'est pas exclu d'observer des pollutions fécales relativement anciennes.

Le second niveau de discussion de notre étude concerne l'écologie des phages ARN F-spécifiques dans des eaux usées urbaines. Nous nous sommes intéressés à des eaux usées provenant de trois stations d'épuration différentes. Tous les prélèvements ont été effectués après le traitement primaire d'épuration. Dans ce type de milieux, les concentrations globales en phages ARN F-spécifiques infectieux ont été estimées respectivement à  $5,8 \cdot 10^4$  UFP/100mL (Maisons-Laffitte, France),  $1,5 \cdot 10^5$  UFP/100mL (Hesperange, Luxembourg) et à  $1,3 \cdot 10^4$  UFP/100mL (Pétange, Luxembourg). La comparaison de ces résultats à ceux obtenus lors de la synthèse des données bibliographiques, montre clairement que ces concentrations sont comprises entre celles des eaux usées brutes (de l'ordre de  $10^5$  à  $10^6$  UFP/100mL) et celles des eaux ayant subi un traitement secondaire (de l'ordre de  $10^3$  à  $10^4$  UFP/100mL) (Jofre, 2007).

Les quatorze prélèvements effectués sur l'ensemble des trois sites ont ensuite été analysés de manière plus précise en effectuant le génotypage direct des phages ARN F-spécifiques par RT-PCR en temps réel. Tous les échantillons se sont avérés positifs pour au moins un des quatre génogroupes (140µL analysés). En termes de proportions d'échantillons positifs, des signaux spécifiques des génogroupes I, II, III

et IV ont été obtenus dans respectivement 12, 13, 11 et 0 prélèvements sur les 14 réalisés. D'après l'ensemble des données regroupées au cours de l'analyse bibliographique, la contamination des eaux usées urbaines par le génogroupe IV apparaît très sporadique. Ce dernier représente, en moyenne, moins de 2% de la population de phages observée. En termes de concentration, les génogroupes II et III ont toujours majoritairement été observés par rapport aux deux autres génogroupes. Malgré le changement de méthodologie, ceci entérine la littérature puisque ces deux génogroupes sont identifiés comme représentant, en moyenne, environ 39% (GGII) et 46% (GGIII) de l'ensemble des phages isolés dans les eaux usées urbaines. Dans nos prélèvements, le génogroupe II présentait, en général, une concentration relativement constante, contrairement au génogroupe III qui semblait être plus sujet aux variations de concentration, pouvant ainsi ponctuellement être en supériorité par rapport au génogroupe II (5 cas sur 14). Ces fluctuations et ces inversions de génogroupes majoritaires (II ou III) ont été décrites parmi des échantillons provenant de différentes eaux usées urbaines mais également dans divers échantillons issus d'une même station (Schaper *et al.*, 2002b). Au sujet du génogroupe I, les résultats indiquent que celui-ci est présent dans plus de 80% de nos échantillons mais à des concentrations très variables. La prévalence de ce génogroupe dans les eaux usées urbaines vient étayer les données existantes, puisque l'analyse bibliographique montre que ce génogroupe représente, en moyenne, 13% de l'ensemble des individus isolés. Dans nos prélèvements, cette proportion résulte, en partie, de la mise en évidence ponctuelle de très fortes concentrations en génome appartenant au génogroupe I. Des hypothèses ont été émises pour tenter d'expliquer la présence de ces phages dans les eaux usées urbaines, alors même que ce génogroupe n'a jamais été observé dans les selles humaines (Osawa *et al.*, 1981; Havelaar *et al.*, 1990; Schaper *et al.*, 2002b). Les animaux domestiques (chiens et chats) et les oiseaux ont été suspectés d'être partiellement à l'origine de cette présence, notamment au travers de phénomènes de ruissellement (Schaper *et al.*, 2002b). Nos investigations ont permis le suivi de la pollution fécale sur une durée de plusieurs semaines à plusieurs mois pour deux des trois stations étudiées. Les relevés des précipitations, effectués sur ces mêmes périodes, ont permis de préciser que les pics de concentration observés pour les phages du génogroupe I étaient associés à de fortes valeurs de pluviométrie dans les jours précédents (1 à 3 jours) la date de prélèvement. Deux observations supplémentaires méritent également d'être soulignées, même si elles ne font référence qu'à des événements ponctuels. Lorsque la concentration en génogroupe I augmentait suite aux précipitations, nous avons observé d'une part, une diminution de la densité en génogroupe II, ce qui suggère une dilution de la pollution fécale (GGII et GGIII). D'autre part, une élévation de la concentration des microorganismes pathogènes à caractère zoonotique (*Cryptosporidium* et *Giardia*) a aussi été identifiée, suggérant une augmentation de l'apport de pollution animale. Bien que non confirmées, ces informations semblent étayer l'hypothèse émise par Schaper *et al.* (2002b) à propos des phénomènes de ruissellement. Ainsi, malgré le changement de référentiel, l'ensemble de ces résultats obtenus par RT-PCR en temps réel, corroborent les données de la littérature quant à l'écologie des phages dans les eaux usées urbaines. Celles-ci sont donc, a priori, essentiellement responsables d'un apport de phages appartenant aux génogroupes II et III au niveau des eaux de surface.

Une des originalités de notre travail repose sur la comparaison des résultats de géotypage avec ceux de la prévalence des virus pathogènes dans les eaux usées. Comme cela a été explicité auparavant, le génome des phages ARN F-spécifiques a été détecté à une concentration relativement stable au cours du temps, même si des inversions du génogroupe majoritaire ont été identifiées. Au contraire, les

concentrations en virus pathogènes ont montré des fluctuations importantes au cours du temps. Un pic de norovirus génogroupe I a été observé en hiver, confirmant le pic épidémiologique hivernal classique pour les gastroentérites (Katayama *et al.*, 2008). Les entérovirus ont été mis en évidence dans les eaux usées qu'au mois de Juillet, validant la possibilité d'un pic de concentration de ces virus à la fin de l'été (Sedmak *et al.*, 2003). Toutefois, l'absence de signal dans les autres échantillons ne signifie pas une absence de virus car la prise d'essai n'était que de 140µL. Par conséquent, les phages des génogroupes II et III, majoritaires dans les eaux usées urbaines, ne peuvent pas prédire la présence de norovirus et d'entérovirus dans ces eaux car la présence de ces derniers dépend de la situation épidémiologique.

Un autre aspect inédit de ce travail est la recherche des phages ARN F-spécifiques et des génogroupes associés dans les biofilms d'eaux usées. Par comparaison aux eaux usées, une plus grande diversité de génogroupes a été observée. De plus, de façon remarquable, le génogroupe IV a pu être isolé dans la moitié des échantillons de biofilm, ce qui n'était pas le cas dans les eaux usées. Celui-ci est toujours présent de manière concomitante à la présence du génogroupe I. Dans ce type d'échantillons, les virus pathogènes ont pu être détectés sur l'ensemble de la période d'étude, indépendamment de la période épidémique. Dans un second temps, l'étude de persistance a permis de démontrer que le génome viral, mais aussi les particules virales, présentaient des temps de survie supérieurs dans les biofilms que dans l'eau usée. Ainsi, l'ensemble de ces observations ont permis de mettre en évidence un effet protecteur du biofilm par rapport aux processus d'inactivation virale dans ce type de milieu. Cet effet protecteur peut, en partie, expliquer la présence de phages du génogroupe IV dans les biofilms, alors qu'il n'a jamais été observé dans les eaux usées.

Ainsi, les résultats obtenus dans les eaux usées corroborent les données de la littérature. Le changement de référentiel (phage infectieux *versus* génome viral) ne remet pas en cause l'origine des différents génogroupes. La présence des quatre génogroupes est bien liée à la pollution fécale, mais les variations de concentration de ces derniers ne peuvent pas traduire celles des virus pathogènes, tels que les norovirus et les entérovirus.

Le troisième point de notre étude a été consacré au recensement des différents génogroupes dans deux types d'eaux naturelles, complètement opposés en termes de la pollution fécale. Notre choix s'est porté, d'une part, sur une eau de rivière principalement influencée par des rejets d'origine anthropique, mais pouvant aussi être potentiellement soumise aux activités d'élevage situées en amont. D'autre part, nous avons également sélectionné quatre eaux souterraines présentant des caractéristiques hydrogéologiques différentes.

Au niveau des échantillons d'eau de rivière, la méthode de détection par RT-PCR en temps réel a permis de mettre en évidence les quatre génogroupes. Parmi les vingt-trois prélèvements analysés, les génogroupes III (8 positifs) et IV (2 positifs) ont été observés de manière occasionnelle, avec des concentrations souvent proches des limites de détection. En revanche, les génogroupes I et II ont été isolés dans respectivement 65% (15 positifs) et 100% des échantillons. D'après les résultats observés dans les eaux usées, l'absence de génome appartenant aux phages du génogroupe III peut paraître surprenante, mais va dans le même sens que les récents résultats de la littérature sur les eaux de surface (Cole *et al.*,

2003; Stewart-Pullaro *et al.*, 2006; Love *et al.*, 2007). Les conclusions obtenues lors d'études s'intéressant au caractère infectieux indiquent que les phages appartenant à ce génogroupe, ainsi que ceux du génogroupe IV, sont les plus affectés par les traitements d'épuration (Schaper *et al.*, 2002b; Muniesa *et al.*, 2009). Ainsi, dans des effluents de station, ils représentaient moins de 10% de la population totale, alors qu'initialement, dans l'eau usée brute, ils représentaient plus de la moitié de cette même population (Muniesa *et al.*, 2009). Bien que les résultats ne soient pas directement comparables, en raison d'une méthode de détection différente, cela pourrait expliquer nos observations, même si l'effet d'un tel traitement sur le génome viral n'est pas documenté. Malgré une persistance plus importante du génome en comparaison des particules infectieuses, celui du génogroupe III semble tout de même être éliminé assez rapidement.

Selon la distribution des différents génogroupes, et dans le but d'évaluer l'intérêt de la recherche du génome des phages ARN F-spécifiques comme indicateur de pollution fécale et virale, nous nous sommes donc focalisés sur les deux génogroupes les plus abondants. Les concentrations moyennes en *E. coli*, entérocoques et coliphages somatiques étaient respectivement de  $4 \log_{10}$  NPP/100mL,  $2,8 \log_{10}$  NPP/100mL et  $2,9 \log_{10}$  UFP/100mL, indiquant un niveau de pollution fécale considérable au niveau de notre site d'étude. La présence des indicateurs bactériens en très forte concentration, alors qu'ils sont connus pour être plus rapidement inactivés que les bactériophages dans les eaux environnementales (Duran *et al.*, 2002; Noble *et al.*, 2004), laisse supposer une contamination fécale récente. De façon remarquable, une corrélation positive a été mise en évidence entre les variations de concentration des indicateurs bactériens (*E. coli* et entérocoques) et celles des phages appartenant au génogroupe II. Jusqu'alors, seules des relations entre la population globale de phages et celles des indicateurs bactériens avaient été documentées (Sundram *et al.*, 2002; Horman *et al.*, 2004; Gourmelon *et al.*, 2007). Parmi ces études, Gourmelon et ses collaborateurs (2007) avaient signalé une relation entre les génogroupes supposés d'origine humaine (GGII et GGIII) et la concentration en *E. coli*. Par ailleurs, une corrélation positive a également été observée entre les variations de concentration en génome d'adénovirus humains et celles des phages du génogroupe II, attestant de l'origine humaine de ce génogroupe. La probabilité d'observer des adénovirus humains infectieux est aussi en relation avec la densité de phages appartenant au génogroupe II. Ainsi, l'ensemble de ces résultats justifient que dans cette eau de rivière, les phages du génogroupe II soient issus d'une pollution fécale mais aussi d'une pollution humaine. La concentration en génome relatif à ce génogroupe, relativement stable au cours du temps, peut être la conséquence d'apports réguliers de pollution fécale, au travers des activités humaines proches du site de prélèvement.

La fréquence de détection des norovirus, dans les échantillons d'eau de rivière, était relativement faible. Ceci est aisément explicable par le fait que nos prélèvements ont tous été réalisés au cours de la période estivale, alors qu'au niveau des eaux de surface, les norovirus sont préférentiellement observés en hiver (Westrell *et al.*, 2006). Cette observation est parfaitement cohérente avec les résultats obtenus à partir des échantillons d'eaux usées. Contrairement aux norovirus, les adénovirus humains ont été détectés à une concentration importante sur l'ensemble de la période d'analyse. D'autres études décrivent une forte prévalence de ces virus dans les eaux de rivière et ce, tout au long de l'année (Tani *et al.*, 1995; Castignolles *et al.*, 1998; Choi et Jiang, 2005; van Heerden *et al.*, 2005b). Cette absence de saisonnalité est très certainement à l'origine de la corrélation positive établie entre ces virus et les phages du génogroupe II.

Par conséquent, au même titre que les bactériophages ARN F-spécifiques, les adénovirus pourraient jouer le rôle d'indicateurs de pollution fécale.

Les données relatives aux phages appartenant au génogroupe I nous ont aussi apporté des informations originales. Tout d'abord, les variations de concentration de ce génogroupe n'ont été associées ni aux phages appartenant au génogroupe II, ni aux adénovirus ; ce qui soutient fortement l'hypothèse d'une origine différente des phages de ce génogroupe. Sur l'ensemble de la période d'étude, ces phages ont été observés à des concentrations très hétérogènes. Ces fortes variations de concentration ont pu être corrélées aux fluctuations de la turbidité de l'eau de rivière, laissant pressentir un apport aléatoire de phages appartenant au génogroupe I, certainement en relation avec des phénomènes de ruissellement ou de précipitation, comme cela avait déjà été souligné dans les eaux usées urbaines. Une relation entre l'augmentation de la proportion d'échantillons positifs en phages ARN F-spécifiques dans des eaux de surface et des événements de précipitation avait déjà été décrite (Brion *et al.*, 2002). Aucune relation n'a été observée entre les phages du génogroupe I et les indicateurs de pollution fécale. Ceci peut être interprété par le contexte de contamination fécale de notre site d'étude. Selon les corrélations établies entre le génogroupe II et les indicateurs bactériens, il est raisonnable de penser que les indicateurs mesurés soient principalement issus de la pollution humaine. Lors d'événements ponctuels de pollution animale, les indicateurs apportés seraient vraisemblablement minoritaires par rapport à ceux issus des contaminants humains. De plus, en fonction de la distance du point d'émission des polluants animaux, il est également envisageable que ces indicateurs d'origine animale soient inactivés avant leur arrivée au site d'étude.

En fonction de ces résultats, l'utilisation d'un ratio de concentration des génomes relatifs aux génogroupes I et II est susceptible de donner une information quant à la source principale de contamination fécale observée dans un échantillon donné. Sur la période de travail, nos résultats ont montré que ce ratio était soumis à de grandes variations, alors même que le niveau global de pollution fécale, décrit à l'aide des indicateurs conventionnels, restait stable. Avec la turbidité de l'eau, ce ratio a été le seul paramètre permettant de distinguer une modification dans la nature de la pollution fécale. A titre d'exemple, pour une concentration en *E. coli* de  $3,6 \log_{10}$  NPP/100mL, la valeur du  $\log_{10}$  (GGII/GGI) peut être aussi bien de 3,8 que de -1,7. L'hypothèse est que dans le deuxième cas, il y a un apport de pollution animale via des phénomènes de ruissellement (turbidité de l'eau de 7,7 *versus* 23,3).

Au cours de cette étude, nous n'avons pas eu l'opportunité de travailler avec des eaux de surface soumises à de fortes pollutions fécales animales, i.e.  $\log_{10}$  (GGII/GGI) > -2. Ainsi, afin de valider la pertinence de cet outil pour déterminer la principale source de la pollution fécale, nous proposons d'évaluer l'intérêt de ce ratio dans d'autres eaux de surface, soumises à des sources de contaminations fécales majoritairement animales. L'utilisation de ce ratio présente l'avantage de travailler avec les deux génogroupes les plus couramment observés dans les eaux naturelles et potentiellement les plus persistants dans les environnements hydriques.

La seconde étude de cas a été consacrée à des eaux souterraines a priori protégées vis-à-vis de sources de pollution fécale, de part leur contexte hydrogéologique. Ces sites semblent bel et bien être préservés des pollutions fécales puisque l'ensemble des analyses consacrées aux indicateurs bactériens (*E. coli*, coliformes totaux et fécaux, 250mL) et viraux (coliphages somatiques, 3-4L) s'est avéré négatif



(n=20). Au niveau de ces sites, il devenait alors intéressant de rechercher les marqueurs les plus abondants dans les eaux superficielles. Ainsi, d'après les études menées précédemment, il apparaissait judicieux de choisir les adénovirus et les phages ARN F-spécifiques appartenant aux génogroupes I et II. Dans ce milieu, l'étude menée au laboratoire a révélé une grande persistance des génomes appartenant à l'adénovirus 2 et aux phages MS2 et GA. Pour le génome des phages, les  $T_{90}$  ont été estimés à plus de 330 jours à 4°C, mais seulement de 9 (MS2) et 33 (GA) jours à 20°C. Pour l'adénovirus, aucune dégradation n'a été mise en évidence sur les 200 jours de l'expérience et ce, aussi bien à une température de stockage de 4°C que de 20°C. L'adénovirus 2 infectieux montre également une grande résistance, puisque les  $T_{90}$  calculés sont respectivement de 132 et 36 jours à 4°C et 20°C. Ces données complètent et renforcent la seule étude disponible sur la survie de ces virus dans les eaux (Enriquez *et al.*, 1995), puisque dans cette étude, les  $T_{90}$  obtenus pour l'adénovirus 41 sont, respectivement, de 152 et de 38 jours à 4 et 23°C, dans de l'eau de distribution. Concernant la dégradation du génome, à notre connaissance, aucune donnée n'a encore été publiée. Ainsi, il semble légitime de penser que l'ADN des adénovirus soit le paramètre le plus stable parmi ceux testés. Les mécanismes de diffusion des virus dans les sols étant très complexes, il faut tout de même reconnaître que ces expériences ne fournissent que des éléments très partiels quant au comportement des virus dans les eaux souterraines.

Au niveau des analyses virologiques des eaux souterraines, la présence de faux positifs était le premier écueil à éviter. A cet effet, la démarche scientifique établie consistait à inclure de nombreux témoins négatifs testés en aveugle et à soumettre l'ensemble des résultats obtenus à une analyse statistique. Ainsi, même si deux échantillons (n=75) ont été obtenus positifs au niveau du site 1 et du site 2, il n'a pas été possible de les distinguer des témoins en termes de présence de pollution virale. Par contre, au niveau du site 4, les méthodes statistiques employées ont permis de conclure que la proportion d'échantillons positifs observée était significativement différente de celle associée aux témoins négatifs. Le génome mis en évidence a pu être identifié comme appartenant à un adénovirus sérotype 41.

Dans ce type de milieu extrêmement protégé, il apparaît donc indispensable de disposer d'un marqueur persistant. En fonction des résultats obtenus, la recherche de génome d'adénovirus pourrait apporter des informations sur d'éventuels événements de pollution fécale et virale. Toutefois, afin de pouvoir évaluer un risque, ce marqueur devrait être couplé à des méthodes permettant de déterminer le caractère infectieux des pathogènes mis en évidence, comme par exemple, la méthode d'ICC-PCR développée au cours de ce travail. Toutefois, ces méthodes de culture présentent également leurs limites, car de nombreux microorganismes pathogènes, comme c'est le cas de l'adénovirus 41 mis en évidence dans nos échantillons d'eaux souterraines, ne sont pas cultivables sur les systèmes cellulaires classiques de laboratoire.

Pour conclure, ce travail démontre l'intérêt des techniques de biologie moléculaire, et plus particulièrement de la RT-PCR en temps réel, pour réaliser le génotypage des phages ARN F-spécifiques au sein d'échantillons environnementaux, plus ou moins complexes. Par rapport aux techniques précédemment décrites, celle-ci permet d'obtenir une réponse rapide, sensible et surtout spécifique des quatre génogroupes. De plus, elle est applicable aux différents environnements aquatiques existants. Dans le cadre d'études relatives à la pollution fécale et virale du milieu hydrique, l'originalité de notre travail repose sur la

recherche, non plus d'une population de phages infectieux, mais de génome phagique spécifique d'un génogroupe. Lorsqu'on s'intéresse à la pollution fécale et virale des eaux superficielles, cette approche offre l'opportunité de suivre la pollution dans une dimension spatio-temporelle plus vaste, en raison d'une meilleure persistance du génome aux stress environnementaux, en comparaison à celle des particules infectieuses. A l'issue des travaux réalisés sur l'eau de rivière, le ratio de concentration des génogroupes I et II apparaît comme un outil intéressant permettant la mise en évidence d'une pollution fécale mais également d'en identifier l'origine principale. Afin de pouvoir évaluer la pertinence de cet outil, d'autres recherches sont encore nécessaires notamment dans des eaux de surface majoritairement soumises à des pollutions animales. Il faudrait également régler définitivement les questions de persistance des différents génogroupes, aussi bien au niveau des particules infectieuses qu'au niveau du génome viral afin de pouvoir apporter des réponses plus précises quant à l'utilisation de ces phages comme outil de discrimination de l'origine des pollutions fécales. Enfin, dans des eaux souterraines fortement protégées, la méthode de génotypage des phages ARN F-spécifiques semble montrer ses limites, probablement en raison d'une persistance trop faible des molécules d'ARN. Dans ce type de milieu, l'utilisation de marqueurs plus persistants s'impose. Le génome des adénovirus semble pouvoir remplir cette fonction, mais il serait intéressant de poursuivre les analyses afin de confirmer ces résultats.

## *Références Bibliographiques*



- Abbaszadegan, M., Stewart, P. and LeChevallier, M.** (1999). A strategy for detection of viruses in groundwater by PCR. *Applied and Environmental Microbiology* **65** (2): 444-449.
- Adhin, M. R., Alblas, J. and van Duin, J.** (1990). Secondary structure at the 3' terminal region of RNA coliphages: comparison with tRNA. *Biochemica et Biophysica Acta* **1050** (1-3): 110-118.
- Adhin, M. R., Hirashima, A. and van Duin, J.** (1989). Nucleotide sequence from the ssRNA bacteriophage JP34 resolves the discrepancy between serological and biophysical classification. *Virology* **170** (1): 238-242.
- AFNOR, Norm procedure XP T 90-451.** (1996). Testing water: Detection of enterovirus. Method by concentration on glass wool and detection by cell culture. Association Française de Normalisation, Saint-Denis La Plaine, France.
- AFSSA.** (2007). Bilan des connaissances relatives aux virus transmissibles à l'homme par voie orale. Pothier, P., Bultel, C., Grimault, L., Bertagnoli, S., Carre, J., Deportes, I., De Valk, H., Dubois, E., Dubrou, S., Dussaix, E., Ferré-Aubineau, V., Gantzer, C., Hartemann, P., Legeay, O., Le Guyader, S., Lina, B., Montiel, A., Picoche, B., Vilagines, P. AFSSA, Maison Alfort.
- Ahmed, W.** (2007). Limitations of library-dependent microbial source tracking methods. *Journal of the Australian Water Association* **34** (1): 96-101.
- Ahmed, W., Neller, R. and Katouli, M.** (2005a). Faecal source tracking in surface waters: A review of faecal indicator microorganisms and current methods. *Environmental Health* **5** (4): 51-68.
- Ahmed, W., Neller, R. and Katouli, M.** (2005b). Host species-specific metabolic fingerprint database for enterococci and *Escherichia coli* and its application to identify sources of fecal contamination in surface waters. *Applied and Environmental Microbiology* **71** (8): 4461-4468.
- Ahmed, W., Stewart, J., Gardner, T., Powell, D., Brooks, P., Sullivan, D. and Tindale, N.** (2007). Sourcing faecal pollution: a combination of library-dependent and library-independent methods to identify human faecal pollution in non-sewered catchments. *Water Research* **41** (16): 3771-3779.
- Ahmed, W., Tucker, J., Harper, J., Neller, R. and Katouli, M.** (2006). Comparison of the efficacy of an existing versus a locally developed metabolic fingerprint database to identify non-point sources of faecal contamination in a coastal lake. *Water Research* **40** (12): 2339-2348.
- Albinana-Gimenez, N., Clemente-Casares, P., Bofill-Mas, S., Hundesa, A., Ribas, F. and Girones, R.** (2006). Distribution of human polyomaviruses, adenoviruses, and hepatitis E virus in the environment and in a drinking-water treatment plant. *Environmental Science and Technology* **40** (23): 7416-7422.
- Allard, A., Albinsson, B. and Wadell, G.** (2001). Rapid typing of human adenoviruses by a general PCR combined with restriction endonuclease analysis. *Journal of Clinical Microbiology* **39** (2): 498-505.
- Allard, A. K., Wadell, G., Evander, K. M. and Lindman, G. K.** (1985). Specific properties of two enteric adenovirus 41 clones mapped within early region 1A. *Journal of Virology* **54** (1): 145-150.
- Allwood, P. B., Malik, Y. S., Hedberg, C. W. and Goyal, S. M.** (2003). Survival of F-specific RNA coliphage, feline calicivirus, and *Escherichia coli* in water: a comparative study. *Applied and Environmental Microbiology* **69** (9): 5707-5710.
- Araujo, R. M., Puig, A., Lasobras, J., Lucena, F. and Jofre, J.** (1997). Phages of enteric bacteria in fresh water with different levels of faecal pollution. *Journal of Applied Microbiology* **82** (3): 281-286.
- Armon, R. and Kott, Y.** (1996). Bacteriophages as indicators of pollution. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* **26** (4): 299-335.
- Arnal, C., Crance, J. M., Gantzer, C., Schwartzbrod, L., Deloince, R. and Billaudel, S.** (1998). Persistence of infectious hepatitis A virus and its genome in artificial seawater. *Zentralblatt für Hygiene und Umweltmedizin* **201** (3): 279-284.
- Ashbolt, N. J.** (2004). Microbial contamination of drinking water and disease outcomes in developing regions. *Toxicology* **198** (1-3): 229-238.
- Atmar, R. L. and Estes, M. K.** (2006). The epidemiologic and clinical importance of norovirus infection. *Gastroenterology Clinics of North America* **35** (2): 275-290.

- Bae, J. and Schwab, K. J.** (2008). Evaluation of murine norovirus, feline calicivirus, poliovirus, and MS2 as surrogates for human norovirus in a model of viral persistence in surface water and groundwater. *Applied and Environmental Microbiology* **74** (2): 477-484.
- Baggi, F., Demarta, A. and Peduzzi, R.** (2001). Persistence of viral pathogens and bacteriophages during sewage treatment: lack of correlation with indicator bacteria. *Research in Microbiology* **152** (8): 743-751.
- Ball, L. A.** (1973). Secondary structure and coding potential of the coat protein gene of bacteriophage MS2. *Nature: New biology* **242** (115): 44-45.
- Ballester, N. A., Fontaine, J. H. and Margolin, A. B.** (2005). Occurrence and correlations between coliphages and anthropogenic viruses in the Massachusetts Bay using enrichment and ICC-nPCR. *Journal of Water and Health* **3** (1): 59-68.
- Baron, R. C., Murphy, F. D., Greenberg, H. B., Davis, C. E., Bregman, D. J., Gary, G. W., Hughes, J. M. and Schonberger, L. B.** (1982). Norwalk gastrointestinal illness: an outbreak associated with swimming in a recreational lake and secondary person-to-person transmission. *American Journal of Epidemiology* **115** (2): 163-172.
- Beekwilder, J., Nieuwenhuizen, R., Havelaar, A. H. and van Duin, J.** (1996a). An oligonucleotide hybridization assay for the identification and enumeration of F-specific RNA phages in surface water. *Journal of Applied Bacteriology* **80** (2): 179-186.
- Beekwilder, J., Nieuwenhuizen, R., Poot, R. and van Duin, J.** (1996b). Secondary structure model for the first three domains of Q beta RNA. Control of A-protein synthesis. *Journal of Molecular Biology* **256** (1): 8-19.
- Beekwilder, M. J., Nieuwenhuizen, R. and van Duin, J.** (1995). Secondary structure model for the last two domains of single-stranded RNA phage Q beta. *Journal of Molecular Biology* **247** (5): 903-917.
- Bell, J. B., Elliott, G. E. and Smith, D. W.** (1983). Influence of sewage treatment and urbanization on selection of multiple resistance in fecal coliform populations. *Applied and Environmental Microbiology* **46** (1): 227-232.
- Beller, M., Ellis, A., Lee, S. H., Drebot, M. A., Jenkerson, S. A., Funk, E., Sobsey, M. D., Simmons, O. D., Monroe, S. S., Ando, T., Noel, J., Petric, M., Middaugh, J. P. and Spika, J. S.** (1997). Outbreak of viral gastroenteritis due to a contaminated well. International consequences. *Journal of the American Medical Association* **278** (7): 563-568.
- Belliot, G., Laveran, H. and Monroe, S. S.** (1997). Outbreak of gastroenteritis in military recruits associated with serotype 3 astrovirus infection. *Journal of Medical Virology* **51** (2): 101-106.
- Bernhard, A. E. and Field, K. G.** (2000). A PCR assay to discriminate human and ruminant feces on the basis of host differences in *Bacteroides-Prevotella* genes encoding 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* **66** (10): 4571-4574.
- Betancourt, W. Q. and Rose, J. B.** (2005). Microbiological assessment of ambient waters and proposed water sources for restoration of a Florida wetland. *Journal of Water and Health* **3** (2): 89-100.
- Beuret, C.** (2003). A simple method for isolation of enteric viruses (noroviruses and enteroviruses) in water. *Journal of Virological Methods* **107** (1): 1-8.
- Beuret, C., Kohler, D., Baumgartner, A. and Luthi, T. M.** (2002). Norwalk-like virus sequences in mineral waters: one-year monitoring of three brands. *Applied and Environmental Microbiology* **68** (4): 1925-1931.
- Beuret, C., Kohler, D. and Luthi, T.** (2000). Norwalk-like virus sequences detected by reverse transcription-polymerase chain reaction in mineral waters imported into or bottled in Switzerland. *Journal of Food Protection* **63** (11): 1576-1582.
- Blanch, A. R., Belanche-Munoz, L., Bonjoch, X., Ebdon, J., Gantzer, C., Lucena, F., Ottoson, J., Kourtis, C., Iversen, A., Kuhn, I., Moce, L., Muniesa, M., Schwartzbrod, J., Skrabber, S., Papageorgiou, G., Taylor, H. D., Wallis, J. and Jofre, J.** (2004). Tracking the origin of faecal pollution in surface water: an ongoing project within the European Union research programme. *Journal of Water and Health* **2** (4): 249-260.
- Blanch, A. R., Belanche-Munoz, L., Bonjoch, X., Ebdon, J., Gantzer, C., Lucena, F., Ottoson, J., Kourtis, C., Iversen, A., Kuhn, I., Moce, L., Muniesa, M., Schwartzbrod, J., Skrabber, S., Papageorgiou, G. T., Taylor, H., Wallis, J. and Jofre, J.** (2006). Integrated analysis of established and novel microbial and chemical methods for microbial source tracking. *Applied and Environmental Microbiology* **72** (9): 5915-5926.

- Blanton, L. H., Adams, S. M., Beard, R. S., Wei, G., Bulens, S. N., Widdowson, M. A., Glass, R. I. and 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** (3): 413-421.
- Bloch, A. B., Stramer, S. L., Smith, J. D., Margolis, H. S., Fields, H. A., McKinley, T. W., Gerba, C. P., Maynard, J. E. and Sikes, R. K.** (1990). Recovery of hepatitis A virus from a water supply responsible for a common source outbreak of hepatitis A. *American Journal of Public Health* **80** (4): 428-430.
- Bofill-Mas, S., Albinana-Gimenez, N., Clemente-Casares, P., Hundesa, A., Rodriguez-Manzano, J., Allard, A., Calvo, M. and Girones, R.** (2006). Quantification and stability of human adenoviruses and polyomavirus JCPyV in wastewater matrices. *Applied and Environmental Microbiology* **72** (12): 7894-7896.
- Bollback, J. P. and Huelsenbeck, J. P.** (2001). Phylogeny, genome evolution, and host specificity of single-stranded RNA bacteriophage (family *Leviviridae*). *Journal of Molecular Evolution* **52** (2): 117-128.
- Bon, F., Fascia, P., Dauvergne, M., Tenenbaum, D., Planson, H., Petion, A. M., Pothier, P. and Kohli, E.** (1999). Prevalence of group A rotavirus, human calicivirus, astrovirus, and adenovirus type 40 and 41 infections among children with acute gastroenteritis in Dijon, France. *Journal of Clinical Microbiology* **37** (9): 3055-3058.
- Bonjoch, X., Balleste, E. and Blanch, A. R.** (2004). Multiplex PCR with 16S rRNA gene-targeted primers of bifidobacterium spp. to identify sources of fecal pollution. *Applied and Environmental Microbiology* **70** (5): 3171-3175.
- Boom, R., Sol, C. J., Salimans, M. M., Jansen, C. L., Wertheim-van Dillen, P. M. and van der Noordaa, J.** (1990). Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal of Clinical Microbiology* **28** (3): 495-503.
- Borchardt, M. A., Bertz, P. D., Spencer, S. K. and Battigelli, D. A.** (2003). Incidence of enteric viruses in groundwater from household wells in Wisconsin. *Applied and Environmental Microbiology* **69** (2): 1172-1180.
- Borchardt, M. A., Haas, N. L. and Hunt, R. J.** (2004). Vulnerability of drinking-water wells in La Crosse, Wisconsin, to enteric-virus contamination from surface water contributions. *Applied and Environmental Microbiology* **70** (10): 5937-5946.
- Borrego, J. J., Cornax, R., Preston, D. R., Farrah, S. R., McElhaney, B. and Bitton, G.** (1991). Development and application of new positively charged filters for recovery of bacteriophages from water. *Applied and Environmental Microbiology* **57** (4): 1218-1222.
- Bosch, A., Pinto, R. M., Villena, C. and Abad, F. X.** (1997). Persistence of human astrovirus in fresh and marine water. *Water Science and Technology* **35** (11-12): 243-247.
- Brion, G. M., Meschke, J. S. and Sobsey, M. D.** (2002). F-specific RNA coliphages: occurrence, types, and survival in natural waters. *Water Research* **36** (9): 2419-2425.
- Brown, M. and Petric, M.** (1986). Evaluation of cell line 293 for virus isolation in routine viral diagnosis. *Journal of Clinical Microbiology* **23** (4): 704-708.
- Burgener, M., Candrian, U. and Gilgen, M.** (2003). Comparative evaluation of four large-volume RNA extraction kits in the isolation of viral RNA from water samples. *Journal of Virological Methods* **108** (2): 165-170.
- Byappanahalli, M. N., Przybyla-Kelly, K., Shively, D. A. and Whitman, R. L.** (2008). Environmental occurrence of the enterococcal surface protein (esp) gene is an unreliable indicator of human fecal contamination. *Environmental Science and Technology* **42** (21): 8014-8020.
- Calci, K. R., Burkhardt, W., 3rd, Watkins, W. D. and Rippey, S. R.** (1998). Occurrence of male-specific bacteriophage in feral and domestic animal wastes, human feces, and human-associated wastewaters. *Applied and Environmental Microbiology* **64** (12): 5027-5029.
- Calgua, B., Mengewein, A., Grunert, A., Bofill-Mas, S., Clemente-Casares, P., Hundesa, A., Wyn-Jones, A. P., Lopez-Pila, J. M. and Girones, R.** (2008). Development and application of a one-step low cost procedure to concentrate viruses from seawater samples. *Journal of Virological Methods* **153** (2): 79-83.
- Callahan, J. D., Wu, S. J., Dion-Schultz, A., Mangold, B. E., Peruski, L. F., Watts, D. M., Porter, K. R., Murphy, G. R., Suharyono, W., King, C. C., Hayes, C. G. and Temenak, J. J.** (2001). Development and evaluation of serotype- and group-specific fluorogenic reverse transcriptase PCR (TaqMan) assays for dengue virus. *Journal of Clinical Microbiology* **39** (11): 4119-4124.

- Callahan, K. M., Taylor, D. J. and Sobsey, M. D.** (1995). Comparative survival of hepatitis A virus, poliovirus and indicator viruses in geographically diverse seawaters. *Water Science and Technology* **31** (5-6): 189-193.
- Carraro, E., Perosa, A. H., Siqueira, I., Pasternak, J. and Martino, M. D.** (2008). Rotavirus infection in children and adult patients attending in a tertiary hospital of Sao Paulo, Brazil. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases* **12** (1): 44-46.
- Carroll, S., Hargreaves, M. and Goonetilleke, A.** (2005). Sourcing faecal pollution from onsite wastewater treatment systems in surface waters using antibiotic resistance analysis. *Journal of Applied Microbiology* **99** (3): 471-482.
- Carson, C. A., Shear, B. L., Ellersieck, M. R. and Asfaw, A.** (2001). Identification of fecal *Escherichia coli* from humans and animals by ribotyping. *Applied and Environmental Microbiology* **67** (4): 1503-1507.
- Carson, C. A., Shear, B. L., Ellersieck, M. R. and Schnell, J. D.** (2003). Comparison of ribotyping and repetitive extragenic palindromic-PCR for identification of fecal *Escherichia coli* from humans and animals. *Applied and Environmental Microbiology* **69** (3): 1836-1839.
- Carter, M. J.** (2005). Enterically infecting viruses: pathogenicity, transmission and significance for food and waterborne infection. *Journal of Applied Microbiology* **98** (6): 1354-1380.
- Castignolles, N., Petit, F., Mendel, I., Simon, L., Cattolico, L. and Buffet-Janvresse, C.** (1998). Detection of adenovirus in the waters of the Seine River estuary by nested-PCR. *Molecular and Cellular Probes* **12** (3): 175-180.
- Cevenini, R. F., Mazaracchio, R., Rumpianesi, F. F., Donati, M. F., Moroni, A. F., Sambri, V. F. and La Placa, M.** (1987). Prevalence of enteric adenovirus from acute gastroenteritis: a five year study. *European Journal of Epidemiology* **3** (2): 147-150.
- Chapron, C. D., Ballester, N. A., Fontaine, J. H., Frades, C. N. and Margolin, A. B.** (2000). Detection of astroviruses, enteroviruses, and adenovirus types 40 and 41 in surface waters collected and evaluated by the information collection rule and an integrated cell culture-nested PCR procedure. *Applied and Environmental Microbiology* **66** (6): 2520-2525.
- Cho, H. B., Lee, S. H., Cho, J. C. and Kim, S. J.** (2000). Detection of adenoviruses and enteroviruses in tap water and river water by reverse transcription multiplex PCR. *Canadian Journal of Microbiology* **46** (5): 417-424.
- Choi, S. and Jiang, S. C.** (2005). Real-time PCR quantification of human adenoviruses in urban rivers indicates genome prevalence but low infectivity. *Applied and Environmental Microbiology* **71** (11): 7426-7433.
- Chung, H., Jaykus, L. A., Lovelace, G. and Sobsey, M. D.** (1998). Bacteriophages and bacteria as indicators of enteric viruses in oysters and their harvest waters. *Water Science and Technology* **38** (12): 37-44.
- Cole, D., Long, S. C. and Sobsey, M. D.** (2003). Evaluation of F+ RNA and DNA coliphages as source-specific indicators of fecal contamination in surface waters. *Applied and Environmental Microbiology* **69** (11): 6507-6514.
- Colford, J. M., Jr., Wade, T. J., Schiff, K. C., Wright, C. C., Griffith, J. F., Sandhu, S. K., Burns, S., Sobsey, M., Lovelace, G. and Weisberg, S. B.** (2007). Water quality indicators and the risk of illness at beaches with nonpoint sources of fecal contamination. *Epidemiology* **18** (1): 27-35.
- Contreras-Coll, N., Lucena, F., Mooijman, K., Havelaar, A., Pierzo, V., Boque, M., Gawler, A., Holler, C., Lambiri, M. and Mirolo, G.** (2002). Occurrence and levels of indicator bacteriophages in bathing waters throughout Europe. *Water Research* **36** (20): 4963-4974.
- Cornax, R., Morinigo, M. A., Balebona, M. C., Castro, D. and Borrego, J. J.** (1991). Significance of several bacteriophage groups as indicators of sewage pollution in marine waters. *Water Research* **25** (6): 673-678.
- Craun, G. F., Calderon, R. L. and Craun, M. F.** (2004). Waterborne outbreaks caused by zoonotic pathogens in the USA in Waterborne zoonoses: identification, causes and control. Cotruvo, J. A., Dufour, A., Rees, G., Bartrum, J., Carr, R., Cliver, D. O., Craun, G. F., Fayer, R. and Gannon, V. P. J. London, UK, World Health Organization, IWA Publishing: 120-135.
- Cromeans, T. L., Lu, X., Erdman, D. D., Humphrey, C. D. and Hill, V. R.** (2008). Development of plaque assays for adenoviruses 40 and 41. *Journal of Virological Methods* **151** (1): 140-145.



- D'Angelo, L. J., Hierholzer, J. C., Keenlyside, R. A., Anderson, L. J. and Martone, W. J.** (1979). Pharyngoconjunctival fever caused by adenovirus type 4: report of a swimming pool-related outbreak with recovery of virus from pool water. *Journal of Infectious Diseases* **140** (1): 42-47.
- Das, S., Pingle, M. R., Munoz-Jordan, J., Rundell, M. S., Rondini, S., Granger, K., Chang, G. J., Kelly, E., Spier, E. G., Larone, D., Spitzer, E., Barany, F. and Golightly, L. M.** (2008). Detection and serotyping of dengue virus in serum samples by multiplex reverse transcriptase PCR-ligase detection reaction assay. *Journal of Clinical Microbiology* **46** (10): 3276-3284.
- Davison, A. J., Benko, M. and Harrach, B.** (2003). Genetic content and evolution of adenoviruses. *Journal of General Virology* **84** (11): 2895-2908.
- de Jong, J. C., Kapsenberg, J. G., Muzerie, C. J., Wermenbol, A. G., Kidd, A. H., Wadell, G., Firtzlaff, R. G. and Wigand, R.** (1983). Candidate adenoviruses 40 and 41: Fastidious adenoviruses from human infant stool. *Journal of Medical Virology* **11** (3): 215-231.
- Debartolomeis, J. and Cabelli, V. J.** (1991). Evaluation of an *Escherichia coli* host strain for enumeration of F male-specific bacteriophages. *Applied and Environmental Microbiology* **57** (5): 1301-1305.
- Diviza, M., de Filippis, P., di Napoli, A., Venuti, A., Perez-Bercoff, R. and Pana, A.** (1989). Isolation of wild-type hepatitis A virus from the environment. *Water Research* **23** (9): 1155-1160.
- Divizia, M., Gabrieli, R., Donia, D., Macaluso, A., Bosch, A., Guix, S., Sanchez, G., Villena, C., Pinto, R. M., Palombi, L., Buonomo, E., Cenko, F., Leno, L., Bebeci, D. and Bino, S.** (2004). Waterborne gastroenteritis outbreak in Albania. *Water Science and Technology* **50** (1): 57-61.
- Dombek, P. E., Johnson, L. K., Zimmerley, S. T. and Sadowsky, M. J.** (2000). Use of repetitive DNA sequences and the PCR to differentiate *Escherichia coli* isolates from human and animal sources. *Applied and Environmental Microbiology* **66** (6): 2572-2577.
- Dryden, S. K., Ramaswami, B., Yuan, Z., Giammar, D. E. and Angenent, L. T.** (2006). A rapid reverse transcription-PCR assay for F+ RNA coliphages to trace fecal pollution in Table Rock Lake on the Arkansas-Missouri border. *Water Research* **40** (20): 3719-3724.
- Duizer, E., Schwab, K. J., Neill, F. H., Atmar, R. L., Koopmans, M. P. and Estes, M. K.** (2004). Laboratory efforts to cultivate noroviruses. *Journal of General Virology* **85** (Pt 1): 79-87.
- Duran, A. E., Muniesa, M., Mendez, X., Valero, F., Lucena, F. and Jofre, J.** (2002). Removal and inactivation of indicator bacteriophages in fresh waters. *Journal of Applied Microbiology* **92** (2): 338-347.
- Ebdon, J. E. and Taylor, H. D.** (2006). Geographical stability of enterococcal antibiotic resistance profiles in Europe and its implications for the identification of fecal sources. *Environmental Science and Technology* **40** (17): 5327-5332.
- Edge, T. A. and Hill, S.** (2005). Occurrence of antibiotic resistance in *Escherichia coli* from surface waters and fecal pollution sources near Hamilton, Ontario. *Canadian Journal of Microbiology* **51** (6): 501-505.
- Edlind, T. D. and Bassel, A. R.** (1977). Secondary structure of RNA from bacteriophages f2, Q $\beta$ , and PP7. *Journal of Virology* **24** (1): 135-141.
- Emerson, S. U. and Purcell, R. H.** (2003). Hepatitis E virus. *Reviews in Medical Virology* **13** (3): 145-154.
- Enriquez, C. E., Hurst, C. J. and Gerba, C. P.** (1995). Survival of the enteric adenoviruses 40 and 41 in tap, sea, and waste water. *Water Research* **29** (11): 2548-2553.
- Espinosa, A. C., Mazari-Hiriart, M., Espinosa, R., Maruri-Avidal, L., Méndez, E. and Arias, C. F.** (2008). Infectivity and genome persistence of rotavirus and astrovirus in groundwater and surface water. *Water Research* **42** (10-11): 2618-2628.
- 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. and Jiang, X.** (2004). Genetic diversity among sapoviruses. *Archives of Virology* **149** (7): 1309-1323.
- Fauquet, C. M., Mayo, M. A., Maniloff, J., Desselberger, U. and Ball, L. A.** (2005). Virus taxonomy. Classification and nomenclature of viruses. Eighth report of the International Committee on taxonomy of viruses. Elsevier Academic Press.

- Field, K. G.** (2004). Faecal source identification in Waterborne zoonoses: identification, causes and control Cotruvo, J. A., Dufour, A., Rees, G., Bartrum, J., Carr, R., Cliver, D. O., Craun, G. F., Fayer, R. and Gannon, V. P. J. Londres, U.K., World Health Organization. IWA Publishing: 349-366.
- Field, K. G., Chern, E. C., Dick, L. K., Fuhrman, J., Griffith, J., Holden, P. A., LaMontagne, M. G., Le, J., Olson, B. and Simonich, M. T.** (2003). A comparative study of culture-independent, library-independent genotypic methods of fecal source tracking. *Journal of Water and Health* **1** (4): 181-194.
- Field, K. G. and Samadpour, M.** (2007). Fecal source tracking, the indicator paradigm, and managing water quality. *Water Research* **41** (16): 3517-3538.
- Fiers, W., Contreras, R., Duerinck, F., Haegeman, G., Iserentant, D., Merregaert, J., Min Jou, W., Molemans, F., Raeymaekers, A., Van den Berghe, A., Volckaert, G. and Ysebaert, M.** (1976). Complete nucleotide sequence of bacteriophage MS2 RNA: primary and secondary structure of the replicase gene. *Nature* **260** (5551): 500-507.
- Fleet, G. H., Heiskanen, P., Reid, I. and Buckle, K. A.** (2000). Foodborne viral illness--status in Australia. *International Journal of Food Microbiology* **59** (1-2): 127-136.
- Foley, B., O'Mahony, J., Morgan, S. M., Hill, C. and Morgan, J. G.** (2000). Detection of sporadic cases of Norwalk-like virus (NLV) and astrovirus infection in a single Irish hospital from 1996 to 1998. *Journal of Clinical Virology* **17** (2): 109-117.
- Fong, T. T., Griffin, D. W. and Lipp, E. K.** (2005). Molecular assays for targeting human and bovine enteric viruses in coastal waters and their application for library-independent source tracking. *Applied and Environmental Microbiology* **71** (4): 2070-2078.
- Fong, T. T. and Lipp, E. K.** (2005). Enteric viruses of humans and animals in aquatic environments: health risks, detection, and potential water quality assessment tools. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **69** (2): 357-371.
- Fout, G. S., Martinson, B. C., Moyer, M. W. and Dahling, D. R.** (2003). A multiplex reverse transcription-PCR method for detection of human enteric viruses in groundwater. *Applied and Environmental Microbiology* **69** (6): 3158-3164.
- Fujioka, R. S. and Yoneyama, B. S.** (2002). Sunlight inactivation of human enteric viruses and fecal bacteria. *Water Science and Technology* **46** (11-12): 291-295.
- Furuse, K., Ando, A., Osawa, S. and Watanabe, I.** (1981). Distribution of ribonucleic acid coliphages in raw sewage from treatment plants in Japan. *Applied and Environmental Microbiology* **41** (5): 1139-1143.
- Furuse, K., Osawa, S., Kawashiro, J., Tanaka, R., Ozawa, A., Sawamura, S., Yanagawa, Y., Nagao, T. and Watanabe, I.** (1983). Bacteriophage distribution in human faeces: continuous survey of healthy subjects and patients with internal and leukaemic diseases. *Journal of General Virology* **64** ((Pt 9)): 2039-2043.
- Furuse, K., Sakurai, T., Hirashima, A., Katsuki, M., Ando, A. and Watanabe, I.** (1978). Distribution of ribonucleic acid coliphages in south and east Asia. *Applied and Environmental Microbiology* **35** (6): 995-1002.
- Gantzer, C., Maul, A., Audic, J. M. and Schwartzbrod, L.** (1998). Detection of infectious enteroviruses, enterovirus genomes, somatic coliphages, and *Bacteroides fragilis* phages in treated wastewater. *Applied and Environmental Microbiology* **64** (11): 4307-4312.
- Gassilloud, B., Huguet, L., Maul, A. and Gantzer, C.** (2007). Development of a viral concentration method for bottled water stored in hydrophobic support. *Journal of Virological Methods* **142** (1-2): 98-104.
- Gassilloud, B., Schwartzbrod, L. and Gantzer, C.** (2003). Presence of viral genomes in mineral water: a sufficient condition to assume infectious risk ? *Applied and Environmental Microbiology* **69** (7): 3965-3969.
- Geary, P. M. and Davies, C. M.** (2003). Bacterial source tracking and shellfish contamination in a coastal catchment. *Water Science and Technology* **47** (7-8): 95-100.
- Genthe, B., Gericke, M., Bateman, B., Mjoli, N. and Kfir, R.** (1995). Detection of enteric adenoviruses in south African waters using gene probes. *Water Science and Technology* **31** (5-6): 345-350.
- Gerba, C. P.** (2007). Virus occurrence and survival in the environmental waters in Perspectives in Medical Virology. Bosch, A., Elsevier. **17**: 91-108.

- Gerba, C. P., Goyal, S. M., LaBelle, R. L., Cech, I. and Bodgan, G. F.** (1979). Failure of indicator bacteria to reflect the occurrence of enteroviruses in marine waters. *American Journal of Public Health* **69** (11): 1116-1119.
- Gerba, C. P., Gramos, D. M. and Nwachuku, N.** (2002). Comparative inactivation of enteroviruses and adenovirus 2 by UV light. *Applied and Environmental Microbiology* **68** (10): 5167-5169.
- Gerba, C. P., Rose, J. B., Haas, C. N. and Crabtree, K. D.** (1996). Waterborne rotavirus: a risk assessment. *Water Research* **30** (12): 2929-2940.
- Gilgen, M., Germann, D., Luthy, J. and Hubner, P.** (1997). Three-step isolation method for sensitive detection of enterovirus, rotavirus, hepatitis A virus, and small round structured viruses in water samples. *International Journal of Food Microbiology* **37** (2-3): 189-199.
- Gilpin, B., James, T., Nourozi, F., Saunders, D., Scholes, P. and Savill, M.** (2003). The use of chemical and molecular microbial indicators for faecal source identification. *Water Science and Technology* **47** (3): 39-43.
- Girones, R., Jofre, J. and Bosch, A.** (1989). Natural inactivation of enteric viruses in seawater. *Journal of Environmental Quality* **18** (1): 34-39.
- Girones, R., Puig, M., Allard, A., Lucena, F., Wadell, G. and Jofre, J.** (1995). Detection of adenovirus and enterovirus by PCR amplification in polluted waters. *Water Science and Technology* **31** (5-6): 351-357.
- Goffi-Laroche, L., Gratacap-Cavallier, B., Demanse, D., Genoulaz, O., Seigneurin, J. M. and Zmirou, D.** (2003). Are waterborne astrovirus implicated in acute digestive morbidity (E.M.I.R.A. study) ? *Journal of Clinical Virology* **27** (1): 74-82.
- Golmohammadi, R., Fridborg, K., Bundule, M., Valegard, K. and Liljas, L.** (1996). The crystal structure of bacteriophage Q beta at 3.5 A resolution. *Structure* **4** (5): 543-554.
- Golmohammadi, R., Valegard, K., Fridborg, K. and Liljas, L.** (1993). The refined structure of bacteriophage MS2 at 2.8 A resolution. *Journal of Molecular Biology* **234** (3): 620-639.
- Gordon, C. and Toze, S.** (2003). Influence of groundwater characteristics on the survival of enteric viruses. *Journal of Applied Microbiology* **95** (3): 536-544.
- Gordon, D. M. and Cowling, A.** (2003). The distribution and genetic structure of *Escherichia coli* in Australian vertebrates: host and geographic effects. *Microbiology* **149** (Pt 12): 3575-3586.
- Gourmelon, M., Caprais, M. P., Segura, R., Le Mennec, C., Lozach, S., Piriou, J. Y. and Rince, A.** (2007). Evaluation of two library-independent microbial source tracking methods to identify sources of fecal contamination in French estuaries. *Applied and Environmental Microbiology* **73** (15): 4857-4866.
- Grabow, W.** (2001). Bacteriophages: update on application as models for viruses in water. *Water SA* **27** (2): 251-268.
- Grabow, W. O., Puttergill, D. L. and Bosch, A.** (1992). Propagation of adenovirus types 40 and 41 in the PLC/PRF/5 primary liver carcinoma cell line. *Journal of Virological Methods* **37** (2): 201-217.
- Grabow, W. O. K., Neubrech, T. E., Holtzhausen, C. S. and Jofre, J.** (1995). *Bacteroides fragilis* and *Escherichia coli* bacteriophages: excretion by humans and animals. *Water Science and Technology* **31** (5-6): 223-230.
- Grandien, M., Pettersson, C. A., Svensson, L. and Uhnoo, I.** (1987). Latex agglutination test for adenovirus diagnosis in diarrheal disease. *Journal of Medical Virology* **23** (4): 311-316.
- Graves, A. K., Hagedorn, C., Brooks, A., Hagedorn, R. L. and Martin, E.** (2007). Microbial source tracking in a rural watershed dominated by cattle. *Water Research* **41** (16): 3729-3739.
- Graves, A. K., Hagedorn, C., Teetor, A., Mahal, M., Booth, A. M. and Reneau, R. B., Jr.** (2002). Antibiotic resistance profiles to determine sources of fecal contamination in a rural Virginia watershed. *Journal of Environmental Quality* **31** (4): 1300-1308.
- Gray, J. J., Green, J., Cunliffe, C., Gallimore, C., Lee, J. V., Neal, K. and Brown, D. W.** (1997). Mixed genogroup SRSV infections among a party of canoeists exposed to contaminated recreational water. *Journal of Medical Virology* **52** (4): 425-429.

- Green, J., Henshilwood, K., Gallimore, C. I., Brown, D. W. and Lees, D. N.** (1998). A nested reverse transcriptase PCR assay for detection of small round-structured viruses in environmentally contaminated molluscan shellfish. *Applied and Environmental Microbiology* **64** (3): 858-863.
- Gregory, J. B., Litaker, R. W. and 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** (6): 3960-3967.
- Griffin, D. D., Fletcher, M., Levy, M. E., Ching-Lee, M., Nogami, R., Edwards, L., Peters, H., Montague, L., Gentsch, J. R. and Glass, R. I.** (2002). Outbreaks of adult gastroenteritis traced to a single genotype of rotavirus. *Journal of Infectious Diseases* **185** (10): 1502-1505.
- Griffin, D. W., Gibson, C. J., 3rd, Lipp, E. K., Riley, K., Paul, J. H., 3rd and Rose, J. B.** (1999). Detection of viral pathogens by reverse transcriptase PCR and of microbial indicators by standard methods in the canals of the Florida Keys. *Applied and Environmental Microbiology* **65** (9): 4118-4125.
- Griffith, J. F., Weisberg, S. B. and McGee, C. D.** (2003). Evaluation of microbial source tracking methods using mixed fecal sources in aqueous test samples. *Journal of Water and Health* **1** (4): 141-151.
- Grist, N. R., Bell, E. J. and Assaad, F.** (1978). Enteroviruses in human disease. *Progress in medical virology* **24** 114-157.
- Groeneveld, H., Thimon, K. and van Duin, J.** (1995). Translational control of maturation-protein synthesis in phage MS2: a role for the kinetics of RNA folding ? *RNA-A Publication of the RNA Society* **1** (1): 79-88.
- Grohmann, G. S., Glass, R. I., Pereira, H. G., Monroe, S. S., Hightower, A. W., Weber, R. and Bryan, R. T.** (1993). Enteric viruses and diarrhea in HIV-infected patients. Enteric Opportunistic Infections Working Group. *New England Journal of Medicine* **329** (1): 14-20.
- Guan, S., Xu, R., Chen, S., Odumeru, J. and Gyles, C.** (2002). Development of a procedure for discriminating among *Escherichia coli* isolates from animal and human sources. *Applied and Environmental Microbiology* **68** (6): 2690-2698.
- Guelin, A. and Gozda Wa-Le Bris, J.** (1952). Application of the research on bacteriophages to the study of polluted water. *Annales de l'Institut Pasteur* **82** (1): 78-89.
- Guisez, Y., Robbens, J., Remaut, E. and Fiers, W.** (1993). Folding of the MS2 coat protein in *Escherichia coli* is modulated by translational pauses resulting from mRNA secondary structure and codon usage: a hypothesis. *Journal of Theoretical Biology* **162** (2): 243-252.
- Hafliger, D., Gilgen, M., Luthy, J. and Hubner, P.** (1997). Seminested RT-PCR systems for small round structured viruses and detection of enteric viruses in seafood. *International Journal of Food Microbiology* **37** (1): 27-36.
- Hagedorn, C., Crozier, J. B., Mentz, K. A., Booth, A. M., Graves, A. K., Nelson, N. J. and Reneau, R. B.** (2003). Carbon source utilization profiles as a method to identify sources of faecal pollution in water. *Journal of Applied Microbiology* **94** (5): 792-799.
- Hagedorn, C., Robinson, S. L., Filtz, J. R., Grubbs, S. M., Angier, T. A. and Reneau, R. B.** (1999). Determining sources of fecal pollution in a rural Virginia watershed with antibiotic resistance patterns in fecal streptococci. *Applied and Environmental Microbiology* **65** (12): 5522-5531.
- Hansman, G. S., Oka, T., Katayama, K. and Takeda, N.** (2007a). Human sapoviruses: genetic diversity, recombination, and classification. *Reviews in Medical Virology* **17** (2): 133-141.
- Hansman, G. S., Sano, D., Ueki, Y., Imai, T., Oka, T., Katayama, K., Takeda, N. and Omura, T.** (2007b). Sapovirus in water, Japan. *Emerging Infectious Diseases* **13** (1): 133-135.
- Haramoto, E., Katayama, H., Oguma, K. and Ohgaki, S.** (2007). Quantitative analysis of human enteric adenoviruses in aquatic environments. *Journal of Applied Microbiology* **103** (6): 2153-2159.
- Haramoto, E., Katayama, H., Phanuwan, C. and Ohgaki, S.** (2008). Quantitative detection of sapoviruses in wastewater and river water in Japan. *Letters in Applied Microbiology* **46** (3): 408-413.
- Harigai, H., Furuse, K., Inokuchi, Y. and Hirashima, A.** (1986). Characterization of an intergroup serological mutant from group II RNA phage GA. *Microbiology and Immunology* **30** (12): 1247-1257.

- Harwood, V. J., Levine, A. D., Scott, T. M., Chivukula, V., Lukasik, J., Farrah, S. R. and Rose, J. B.** (2005). Validity of the indicator organism paradigm for pathogen reduction in reclaimed water and public health protection. *Applied and Environmental Microbiology* **71** (6): 3163-3170.
- Harwood, V. J., Whitlock, J. and Withington, V.** (2000). Classification of antibiotic resistance patterns of indicator bacteria by discriminant analysis: use in predicting the source of fecal contamination in subtropical waters. *Applied and Environmental Microbiology* **66** (9): 3698-3704.
- Harwood, V. J., Wiggins, B., Hagedorn, C., Ellender, R. D., Gooch, J., Kern, J., Samadpour, M., Chapman, A. C., Robinson, B. J. and Thompson, B. C.** (2003). Phenotypic library-based microbial source tracking methods: efficacy in the California collaborative study. *Journal of Water and Health* **1** (4): 153-166.
- Hasegawa, M., Yasunaga, T. and Miyata, T.** (1979). Secondary structure of MS2 phage RNA and bias in code word usage. *Nucleic Acids Research* **7** (7): 2073-2079.
- Hashimoto, S., Sakakibara, N., Kumai, H., Nakai, M., Sakuma, S., Chiba, S. and Fujinaga, K.** (1991). Fastidious human adenovirus type 40 can propagate efficiently and produce plaques on a human cell line, A549, derived from lung carcinoma. *Journal of Virology* **65** (5): 2429-2435.
- Havelaar, A. H.** (1993). Bacteriophages as models of human enteric viruses in the environment. *ASM News* **59** 12-15.
- Havelaar, A. H., Furuse, K. and Hogeboom, W. M.** (1986). Bacteriophages and indicator bacteria in human and animal faeces. *Journal of Applied Bacteriology* **60** (3): 255-262.
- Havelaar, A. H. and Hogeboom, W. M.** (1984). A method for the enumeration of male-specific bacteriophages in sewage. *Journal of Applied Bacteriology* **56** (3): 439-447.
- Havelaar, A. H. and Pot-Hogeboom, W. M.** (1988). F-specific RNA-bacteriophages as model viruses in water hygiene: ecological aspects. *Water Science and Technology* **20** (11-12): 399-407.
- Havelaar, A. H., Pot-Hogeboom, W. M., Furuse, K., Pot, R. and Hormann, M. P.** (1990). F-specific RNA bacteriophages and sensitive host strains in faeces and wastewater of human and animal origin. *Journal of Applied Bacteriology* **69** (1): 30-37.
- Havelaar, A. H., van Olphen, M. and Drost, Y. C.** (1993). F-specific RNA bacteriophages are adequate model organisms for enteric viruses in fresh water. *Applied and Environmental Microbiology* **59** (9): 2956-2962.
- He, J. W. and Jiang, S.** (2005). Quantification of enterococci and human adenoviruses in environmental samples by real-time PCR. *Applied and Environmental Microbiology* **71** (5): 2250-2255.
- Heim, A., Ebnet, C., Harste, G. and Pring-Akerblom, P.** (2003). Rapid and quantitative detection of human adenovirus DNA by real-time PCR. *Journal of Medical Virology* **70** (2): 228-239.
- Herrnroth, B. E., Conden-Hansson, A. C., Rehnstam-Holm, A. S., Girones, R. and Allard, A. K.** (2002). Environmental factors influencing human viral pathogens and their potential indicator organisms in the blue mussel, *Mytilus edulis*: the first scandinavian report. *Applied and Environmental Microbiology* **68** (9): 4523-4533.
- Hill, V. R., Kahler, A. M., Jothikumar, N., Johnson, T. B., Hahn, D. and Cromeans, T. L.** (2007). Multistate evaluation of an ultrafiltration-based procedure for simultaneous recovery of enteric microbes in 100-liter tap water samples. *Applied and Environmental Microbiology* **73** (13): 4218-4225.
- Hoebe, C. J., Vennema, H., de Roda Husman, A. M. and van Duynhoven, Y. T.** (2004). Norovirus outbreak among primary schoolchildren who had played in a recreational water fountain. *Journal of Infectious Diseases* **189** (4): 699-705.
- Hopkins, R. S., Gaspard, G. B., Williams, F. P., Jr., Karlin, R. J., Cukor, G. and Blacklow, N. R.** (1984). A community waterborne gastroenteritis outbreak: evidence for rotavirus as the agent. *American Journal of Public Health* **74** (3): 263-265.
- Horman, A., Rimhanen-Finne, R., Maunula, L., von Bonsdorff, C. H., Torvela, N., Heikinheimo, A. and Hanninen, M. L.** (2004). *Campylobacter* spp., *Giardia* spp., *Cryptosporidium* spp., noroviruses, and indicator organisms in surface water in southwestern Finland, 2000-2001. *Applied and Environmental Microbiology* **70** (1): 87-95.
- Hot, D., Legeay, O., Jacques, J., Gantzer, C., Caudrelier, Y., Guyard, K., Lange, M. and Andreoletti, L.** (2003). Detection of somatic phages, infectious enteroviruses and enterovirus genomes as indicators of human enteric viral pollution in surface water. *Water Research* **37** (19): 4703-4710.

- Hrdy, D. B.** (1987). Epidemiology of rotaviral infection in adults. *Reviews of Infectious Diseases* **9** (3): 461-469.
- Hsu, F. C., Shieh, Y. S., van Duin, J., Beekwilder, M. J. and Sobsey, M. D.** (1995). Genotyping male-specific RNA coliphages by hybridization with oligonucleotide probes. *Applied and Environmental Microbiology* **61** (11): 3960-3966.
- Huang, P. W., Laborde, D., Land, V. R., Matson, D. O., Smith, A. W. and Jiang, X.** (2000). Concentration and detection of caliciviruses in water samples by reverse transcription-PCR. *Applied and Environmental Microbiology* **66** (10): 4383-4388.
- Hughes, J. H., Tuomari, A. V., Mann, D. R. and Hamparian, V. V.** (1984). Latex immunoassay for rapid detection of rotavirus. *Journal of Clinical Microbiology* **20** (3): 441-447.
- Hundesda, A., Maluquer de Motes, C., Bofill-Mas, S., Albinana-Gimenez, N. and Girones, R.** (2006). Identification of human and animal adenoviruses and polyomaviruses for determination of sources of fecal contamination in the environment. *Applied and Environmental Microbiology* **72** (12): 7886-7893.
- Hung, T., Chen, G. M., Wang, C. G., Yao, H. L., Fang, Z. Y., Chao, T. X., Chou, Z. Y., Ye, W., Chang, X. J., Den, S. S. and et al.** (1984). Waterborne outbreak of rotavirus diarrhoea in adults in China caused by a novel rotavirus. *Lancet* **1** (8387): 1139-1142.
- IAWPRC** (1991). Bacteriophages as model viruses in water quality control. *Water Research* **25** (5): 529-545.
- Ibarluzea, J. M., Santa Marina, L., Moreno, B., Serrano, E., Larburu, K., Maiztegi, M. J. and Yarzabal, A.** (2007). Somatic coliphages and bacterial indicators of bathing water quality in the beaches of Gipuzkoa, Spain. *Journal of Water and Health* **5** (3): 417-426.
- Inokuchi, Y., Jacobson, A. B., Hirose, T., Inayama, S. and Hirashima, A.** (1988). Analysis of the complete nucleotide sequence of the group IV RNA coliphage SP. *Nucleic Acids Research* **16** (11): 6205-6221.
- Inokuchi, Y., Takahashi, R., Hirose, T., Inayama, S., Jacobson, A. B. and Hirashima, A.** (1986). The complete nucleotide sequence of the group II RNA coliphage GA. *J Biochem (Tokyo)* **99** (4): 1169-1180.
- Irving, L. G. and Smith, F. A.** (1981). One-year survey of enteroviruses, adenoviruses, and reoviruses isolated from effluent at an activated-sludge purification plant. *Applied and Environmental Microbiology* **41** (1): 51-59.
- Iserentant, D. and Fiers, W.** (1979). Secondary structure of the 5' end of bacteriophage MS2 RNA methoxyamine and kethoxal modification. *European Journal of Biochemistry* **102** (2): 595-604.
- ISO 7899-1.** (1998). Water quality: Detection and enumeration of intestinal enterococci. Part 1: Miniaturized method (most probable number) for surface and waste water. International Organisation for Standardisation, Geneva, Switzerland.
- ISO 9308-1.** (2000). Water quality: Detection and enumeration of *Escherichia coli* and coliform bacteria. Part 1: Membrane filtration method. International Organisation of Standardisation, Geneva, Switzerland.
- ISO 9308-3.** (1998). Water quality: Detection and enumeration of *Escherichia coli* and coliform bacteria. Part 3: Miniaturized method (most probable number) for the detection and enumeration of *E. coli* in surface and waste water. International Organisation for Standardisation, Geneva, Switzerland.
- ISO 10705-1.** (1995). Water quality: Detection and enumeration of bacteriophages. Part 1: Enumeration of F-specific RNA bacteriophages. International Organisation for Standardisation, Geneva, Switzerland.
- ISO 10705-2.** (1995). Water quality: Detection and enumeration of bacteriophages. Part 2: Enumeration of somatic coliphages. International Organisation for Standardisation, Geneva, Switzerland.
- Jacobson, A. B.** (1976). Studies on secondary structure of single-stranded RNA from bacteriophage MS2 by electron microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **73** (2): 307-311.
- Jacobson, A. B., Arora, R., Zuker, M., Priano, C., Lin, C. H. and Mills, D. R.** (1998). Structural plasticity in RNA and its role in the regulation of protein translation in coliphage Q beta. *Journal of Molecular Biology* **275** (4): 589-600.
- Jenkins, M. B., Hartel, P. G., Olexa, T. J. and Stuedemann, J. A.** (2003). Putative temporal variability of *Escherichia coli* ribotypes from yearling steers. *Journal of Environmental Quality* **32** (1): 305-309.

- Jiang, S., Noble, R. and Chu, W.** (2001). Human adenoviruses and coliphages in urban runoff-impacted coastal waters of Southern California. *Applied and Environmental Microbiology* **67** (1): 179-184.
- Jiang, S. C.** (2006). Human adenoviruses in water: occurrence and health implications: a critical review. *Environmental Science and Technology* **40** (23): 7132-7140.
- Jiang, S. C. and Chu, W.** (2004). PCR detection of pathogenic viruses in southern California urban rivers. *Journal of Applied Microbiology* **97** (1): 17-28.
- Jiang, S. C., Chu, W. and He, J. W.** (2007). Seasonal detection of human viruses and coliphage in Newport Bay, California. *Applied and Environmental Microbiology* **73** (20): 6468-6474.
- Jiang, X., Wang, M., Wang, K. and Estes, M. K.** (1993). Sequence and genomic organization of Norwalk virus. *Virology* **195** (1): 51-61.
- Jimenez-Clavero, M. A., Escribano-Romero, E., Mansilla, C., Gomez, N., Cordoba, L., Roblas, N., Ponz, F., Ley, V. and Saiz, J. C.** (2005). Survey of bovine enterovirus in biological and environmental samples by a highly sensitive real-time reverse transcription-PCR. *Applied and Environmental Microbiology* **71** (7): 3536-3543.
- Jimenez-Clavero, M. A., Fernandez, C., Ortiz, J. A., Pro, J., Carbonell, G., Tarazona, J. V., Roblas, N. and Ley, V.** (2003). Teschoviruses as indicators of porcine fecal contamination of surface water. *Applied and Environmental Microbiology* **69** (10): 6311-6315.
- Jofre, J.** (2007). Indicators of waterborne enteric viruses in *Perspectives in Medical Virology*. Bosch, A., Elsevier. **17**: 227-249.
- Jofre, J., Bosch, A., Lucena, F., Girones, R. and Tartera, C.** (1986). Evaluation of *Bacteroides-fragilis* bacteriophages as indicators of the virological quality of water. *Water Sci Technol* **18** (10): 167-173.
- John, D. E. and Rose, J. B.** (2005). Review of factors affecting microbial survival in groundwater. *Environmental Science and Technology* **39** (19): 7345-7356.
- Johnson, B. W., Russell, B. J. and Lanciotti, R. S.** (2005). Serotype-specific detection of dengue viruses in a fourplex real-time reverse transcriptase PCR assay. *Journal of Clinical Microbiology* **43** (10): 4977-4983.
- Johnson, D. C., Enriquez, C. E., Pepper, I. L., Davis, T. L., Gerba, C. P. and Rose, J. B.** (1997). Survival of *Giardia*, *Cryptosporidium*, poliovirus and *Salmonella* in marine waters. *Water Science and Technology* **35** (11-12): 261-268.
- Johnson, L. K., Brown, M. B., Carruthers, E. A., Ferguson, J. A., Dombek, P. E. and Sadowsky, M. J.** (2004). Sample size, library composition, and genotypic diversity among natural populations of *Escherichia coli* from different animals influence accuracy of determining sources of fecal pollution. *Applied and Environmental Microbiology* **70** (8): 4478-4485.
- Jothikumar, N. and Cliver, D. O.** (1997). Elution and reconcentration of coliphages in water from positively charged membrane filters with urea-arginine phosphate buffer. *Journal of Virological Methods* **65** (2): 281-286.
- Jothikumar, N., Cromeans, T. L., Sobsey, M. D. and 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** (6): 3359-3363.
- Kaplan, J. E., Feldman, R., Campbell, D. S., Lookabaugh, C. and Gary, G. W.** (1982). The frequency of a Norwalk-like pattern of illness in outbreaks of acute gastroenteritis. *American Journal of Public Health* **72** (12): 1329-1332.
- Kaspar, C. W., Burgess, J. L., Knight, I. T. and Colwell, R. R.** (1990). Antibiotic resistance indexing of *Escherichia coli* to identify sources of fecal contamination in water. *Canadian Journal of Microbiology* **36** (12): 891-894.
- Katayama, H., Haramoto, E., Oguma, K., Yamashita, H., Tajima, A., Nakajima, H. and Ohgaki, S.** (2008). One-year monthly quantitative survey of noroviruses, enteroviruses, and adenoviruses in wastewater collected from six plants in Japan. *Water Research* **42** (6-7): 1441-1448.
- Khatib, L. A., Tsai, Y. L. and Olson, B. H.** (2002). A biomarker for the identification of cattle fecal pollution in water using the LTIIa toxin gene from enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **59** (1): 97-104.

- Khatib, L. A., Tsai, Y. L. and Olson, B. H.** (2003). A biomarker for the identification of swine fecal pollution in water, using the STII toxin gene from enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **63** (2): 231-238.
- Kibbey, H. J., Hagedorn, C. and McCoy, E. L.** (1978). Use of fecal streptococci as indicators of pollution in soil. *Applied and Environmental Microbiology* **35** (4): 711-717.
- Kim, S. H., Cheon, D. S., Kim, J. H., Lee, D. H., Jheong, W. H., Heo, Y. J., Chung, H. M., Jee, Y. and Lee, J. S.** (2005). Outbreaks of gastroenteritis that occurred during school excursions in Korea were associated with several waterborne strains of norovirus. *Journal of Clinical Microbiology* **43** (9): 4836-4839.
- Kirs, M. and Smith, D. C.** (2007). Multiplex quantitative real-time reverse transcriptase PCR for F<sup>+</sup>-specific RNA coliphages: a method for use in microbial source tracking. *Applied and Environmental Microbiology* **73** (3): 808-814.
- Kittigul, L., Raengsakulrach, B., Siritantikorn, S., Kanyok, R., Utrarachkij, F., Diraphat, P., Thirawuth, V., Siripanichgon, K., Pungchitton, S., Chitpirom, K., Chaichantanakit, N. and Vathanophas, K.** (2000). Detection of poliovirus, hepatitis A virus and rotavirus from sewage and water samples. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* **31** (1): 41-46.
- Klovins, J., Overbeek, G. P., van den Worm, S. H., Ackermann, H. W. and van Duin, J.** (2002). Nucleotide sequence of a ssRNA phage from *Acinetobacter*: kinship to coliphages. *Journal of General Virology* **83** (Pt 6): 1523-1533.
- Koopmans, M. and Duizer, E.** (2004). Foodborne viruses: an emerging problem. *International Journal of Food Microbiology* **90** (1): 23-41.
- Koopmans, M., von Bonsdorff, C. H., Vinje, J., de Medici, D. and Monroe, S.** (2002). Foodborne viruses. *FEMS Microbiology Reviews* **26** (2): 187-205.
- Kopecka, H., Dubrou, S., Prevot, J., Marechal, J. and Lopez-Pila, J. M.** (1993). Detection of naturally occurring enteroviruses in waters by reverse transcription, polymerase chain reaction, and hybridization. *Applied and Environmental Microbiology* **59** (4): 1213-1219.
- Kott, Y., Roze, N., Sperber, S. and Betzer, N.** (1974). Bacteriophages as viral pollution indicators. *Water Research* **8** (3): 165-171.
- Krikelis, V., Markoulatos, P., Spyrou, N. and Serie, C.** (1985). Detection of indigenous enteric viruses in raw sewage effluents of the city of Athens, Greece, during a two year survey. *Water Science and Technology* **17**: 159-164.
- Krumperman, P. H.** (1983). Multiple antibiotic resistance indexing of *Escherichia coli* to identify high-risk sources of fecal contamination of foods. *Applied and Environmental Microbiology* **46** (1): 165-170.
- Kukkula, M., Arstila, P., Klossner, M. L., Maunula, L., Bonsdorff, C. H. and Jaatinen, P.** (1997). Waterborne outbreak of viral gastroenteritis. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* **29** (4): 415-418.
- Kukkula, M., Maunula, L., Silvennoinen, E. and von Bonsdorff, C. H.** (1999). Outbreak of viral gastroenteritis due to drinking water contaminated by Norwalk-like viruses. *Journal of Infectious Diseases* **180** (6): 1771-1776.
- Kutyavin, I. V., Afonina, I. A., Mills, A., Gorn, V. V., Lukhtanov, E. A., Belousov, E. S., Singer, M. J., Walburger, D. K., Likhov, S. G., Gall, A. A., Dempcy, R., Reed, M. W., Meyer, R. B. and Hedgpeth, J.** (2000). 3'-minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures. *Nucleic Acids Research* **28** (2): 655-661.
- Lambertini, E., Spencer, S. K., Bertz, P. D., Loge, F. J., Kieke, B. A. and Borchardt, M. A.** (2008). Concentration of enteroviruses, adenoviruses, and noroviruses from drinking water by use of glass wool filters. *Applied and Environmental Microbiology* **74** (10): 2990-2996.
- Lamendella, R., Domingo, J. W., Oerther, D. B., Vogel, J. R. and Stoeckel, D. M.** (2007). Assessment of fecal pollution sources in a small northern-plains watershed using PCR and phylogenetic analyses of *Bacteroidetes* 16S rRNA gene. *FEMS Microbiology Ecology* **59** (3): 651-660.
- Lamothe, G. T., Putallaz, T., Joosten, H. and Marugg, J. D.** (2003). Reverse transcription-PCR analysis of bottled and natural mineral waters for the presence of noroviruses. *Applied and Environmental Microbiology* **69** (11): 6541-6549.



- Langlet, J., Ogorzaly, L., Schrotter, J. C., Machinal, C., Gaboriaud, F., Duval, J. F. L. and Gantzer, C.** (2009). Efficiency of MS2 phage and Qbeta phage removal by membrane filtration in water treatment: Applicability of real-time RT-PCR method. *Journal of Membrane Science* **326** 111-116.
- Lasobras, J., Dellunde, J., Jofre, J. and Lucena, F.** (1999). Occurrence and levels of phages proposed as surrogate indicators of enteric viruses in different types of sludges. *Journal of Applied Microbiology* **86** (4): 723-729.
- Lawson, H. W., Braun, M. M., Glass, R. I., Stine, S. E., Monroe, S. S., Atrash, H. K., Lee, L. E. and Englender, S. J.** (1991). Waterborne outbreak of Norwalk virus gastroenteritis at a southwest US resort: role of geological formations in contamination of well water. *Lancet* **337** (8751): 1200-1204.
- Leclerc, H., Edberg, S., Pierzo, V. and Delattre, J. M.** (2000). Bacteriophages as indicators of enteric viruses and public health risk in groundwaters. *Journal of Applied Microbiology* **88** (1): 5-21.
- Lee, J. V., Dawson, S. R., Ward, S., Surman, S. B. and Neal, K. R.** (1997). Bacteriophages are a better indicator of illness rates than bacteria amongst users of a white water course fed by a lowland river. *Water Science and Technology* **35** (11-12): 165-170.
- Lee, S. H. and Kim, S. J.** (2002). Detection of infectious enteroviruses and adenoviruses in tap water in urban areas in Korea. *Water Research* **36** (1): 248-256.
- Lee, S. H., Lee, C., Lee, K. W., Cho, H. B. and Kim, S. J.** (2005). The simultaneous detection of both enteroviruses and adenoviruses in environmental water samples including tap water with an integrated cell culture-multiplex-nested PCR procedure. *Journal of Applied Microbiology* **98** (5): 1020-1029.
- Leung, K. T., Mackereth, R., Tien, Y.-C. and Topp, E.** (2004). A comparison of AFLP and ERIC-PCR analyses for discriminating *Escherichia coli* from cattle, pig and human sources. *FEMS Microbiology Ecology* **47** (1): 111-119.
- Lewis, D. C., Lightfoot, N. F., Cubitt, W. D. and Wilson, S. A.** (1989). Outbreaks of astrovirus type 1 and rotavirus gastroenteritis in a geriatric in-patient population. *Journal of Hospital Infection* **14** (1): 9-14.
- Ley, V., Higgins, J. and Fayer, R.** (2002). Bovine enteroviruses as indicators of fecal contamination. *Applied and Environmental Microbiology* **68** (7): 3455-3461.
- Lina, B., Pozzetto, B., Andreoletti, L., Beguier, E., Bourlet, T., Dussaix, E., Grangeot-Keros, L., Gratacap-Cavallier, B., Henquell, C., Legrand-Quillien, M. C., Novillo, A., Palmer, P., Petitjean, J., Sandres, K., Dubreuil, P., Fleury, H., Freymuth, F., Leparc-Goffart, I., Hober, D., Izopet, J., Kopecka, H., Lazizi, Y., Lafeuille, H., Lebon, P., Roseto, A., Marchadier, E., Masquelier, B., Picard, B., Puel, J., Seigneurin, J. M., Watre, P. and Aymard, M.** (1996). Multicenter evaluating of a commercially available PCR assay for diagnosing enterovirus infection in a panel of cerebrospinal fluid specimens. *Journal of Clinical Microbiology* **34** (12): 3002-3006.
- Locas, A., Barthe, C., Barbeau, B., Carriere, A. and Payment, P.** (2007). Virus occurrence in municipal groundwater sources in Quebec, Canada. *Canadian Journal of Microbiology* **53** (6): 688-694.
- Locas, A., Barthe, C., Margolin, A. B. and Payment, P.** (2008). Groundwater microbiological quality in Canadian drinking water municipal wells. *Canadian Journal of Microbiology* **54** (6): 472-478.
- Lodder, W. J. and de Roda Husman, A. M.** (2005). Presence of noroviruses and other enteric viruses in sewage and surface waters in The Netherlands. *Applied and Environmental Microbiology* **71** (3): 1453-1461.
- Logan, K. B., Rees, G. E., Seeley, N. D. and Primrose, S. B.** (1980). Rapid concentration of bacteriophages from large volumes of freshwater: evaluation of positively charged, microporous filters. *Journal of Virological Methods* **1** (2): 87-97.
- Long, S. C., El-Khoury, S. S., Oudejans, S. J. G., Sobsey, M. D. and Vinjé, J.** (2005). Assessment of sources and diversity of male-specific coliphages for source tracking. *Environmental Engineering Science* **22** (3): 367-377.
- Long, S. C. and Sobsey, M. D.** (2004). A comparison of the survival of F+RNA and F+DNA coliphages in lake water microcosms. *Journal of Water and Health* **2** (1): 15-22.
- Love, D. C. and Sobsey, M. D.** (2007). Simple and rapid f+ coliphage culture, latex agglutination, and typing assay to detect and source track fecal contamination. *Applied and Environmental Microbiology* **73** (13): 4110-4118.

- Love, D. C., Vinje, J., Khalil, S. M., Murphy, J., Lovelace, G. L. and Sobsey, M. D.** (2007). Evaluation of RT-PCR and reverse line blot hybridization for detection and genotyping F+ RNA coliphages from estuarine waters and molluscan shellfish. *Journal of Applied Microbiology* **104** (4): 1203-1212.
- Lucena, F., Mendez, X., Moron, A., Calderon, E., Campos, C., Guerrero, A., Cardenas, M., Gantzer, C., Schwartzbrod, L., Skraber, S. and Jofre, J.** (2003). Occurrence and densities of bacteriophages proposed as indicators and bacterial indicators in river waters from Europe and South America. *Journal of Applied Microbiology* **94** (5): 808-815.
- Lucena, F., Ribas, F., Duran, A. E., Skraber, S., Gantzer, C., Campos, C., Moron, A., Calderon, E. and Jofre, J.** (2006). Occurrence of bacterial indicators and bacteriophages infecting enteric bacteria in groundwater in different geographical areas. *Journal of Applied Microbiology* **101** (1): 96-102.
- Lukasik, J., Scott, T. M., Andryshak, D. and Farrah, S. R.** (2000). Influence of salts on virus adsorption to microporous filters. *Applied and Environmental Microbiology* **66** (7): 2914-2920.
- Ma, J. F., Naranjo, J. and Gerba, C. P.** (1994). Evaluation of MK filters for recovery of enteroviruses from tap water. *Applied and Environmental Microbiology* **60** (6): 1974-1977.
- Mackay, I. M., Arden, K. E. and Nitsche, A.** (2002). Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Research* **30** (6): 1292-1305.
- Madeley, C. R. and Cosgrove, B. P.** (1975). Letter: Viruses in infantile gastroenteritis. *Lancet* **2** (7925): 124.
- Maluquer de Motes, C., Clemente-Casares, P., Hundesa, A., Martin, M. and Girones, R.** (2004). Detection of bovine and porcine adenoviruses for tracing the source of fecal contamination. *Applied and Environmental Microbiology* **70** (3): 1448-1454.
- Mandilara, G. D., Smeti, E. M., Mavridou, A. T., Lambiri, M. P., Vatopoulos, A. C. and Rigas, F. P.** (2006). Correlation between bacterial indicators and bacteriophages in sewage and sludge. *FEMS Microbiology Letters* **263** (1): 119-126.
- Martone, W. J., Hierholzer, J. C., Keenlyside, R. A., Fraser, D. W., D'Angelo, L. J. and Winkler, W. G.** (1980). An outbreak of adenovirus type 3 disease at a private recreation center swimming pool. *American Journal of Epidemiology* **111** (2): 229-237.
- Marx, F. E., Taylor, M. B. and Grabow, W. O. K.** (1997). A comparison of two sets of primers for the RT-PCR detection of astroviruses in environmental samples. *Water SA* **23** (3): 257-262.
- Maul, A.** (1991). Echantillonnage et inférence statistique in *Virologie des milieux hydriques*. Tec and Doc. Paris, Lavoisier: 36-69.
- Maunula, L., Kalso, S., Von Bonsdorff, C. H. and Ponka, A.** (2004). Wading pool water contaminated with both noroviruses and astroviruses as the source of a gastroenteritis outbreak. *Epidemiology and Infection* **132** (4): 737-743.
- Maunula, L., Miettinen, I. T. and von Bonsdorff, C. H.** (2005). Norovirus outbreaks from drinking water. *Emerging Infectious Diseases* **11** (11): 1716-1721.
- McLellan, S. L., Daniels, A. D. and Salmore, A. K.** (2003). Genetic characterization of *Escherichia coli* populations from host sources of fecal pollution by using DNA fingerprinting. *Applied and Environmental Microbiology* **69** (5): 2587-2594.
- Meays, C. L., Broersma, K., Nordin, R. and Mazumder, A.** (2004). Source tracking fecal bacteria in water: a critical review of current methods. *Journal of Environmental Health* **73** (1): 71-79.
- Medema, G. J., van Asperen, I. A. and Havelaar, A. H.** (1997). Assessment of the exposure of swimmers to microbiological contaminants in fresh waters. *Water Science and Technology* **35** (11-12): 157-163.
- Mendez, J., Audicana, A., Isern, A., Llana, J., Moreno, B., Tarancon, M. L., Jofre, J. and Lucena, F.** (2004). Standardised evaluation of the performance of a simple membrane filtration-elution method to concentrate bacteriophages from drinking water. *Journal of Virological Methods* **117** (1): 19-25.
- Metcalf, T. G., Melnick, J. L. and Estes, M. K.** (1995). Environmental virology: from detection of virus in sewage and water by isolation to identification by molecular biology: a trip of over 50 years. *Annual Review of Microbiology* **49** 461-487.

- Min Jou, W., Haegeman, G., Ysebaert, M. and Fiers, W.** (1972). Nucleotide sequence of the gene coding for the bacteriophage MS2 coat protein. *Nature* **237** (5350): 82-88.
- Miyake, T., Haruna, I., Shiba, T., Ito, Y. H. and Yamane, K.** (1971). Grouping of RNA phages based on the template specificity of their RNA replicases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **68** (9): 2022-2024.
- Moce-Llivina, L., Lucena, F. and Jofre, J.** (2005). Enteroviruses and bacteriophages in bathing waters. *Applied and Environmental Microbiology* **71** (11): 6838-6344.
- Mooijman, K. A., Bahar, M., Muniesa, M. and Havelaar, A. H.** (2002). Optimisation of ISO 10705-1 on enumeration of F-specific bacteriophages. *Journal of Virological Methods* **103** (2): 129-136.
- Moore, D. F., Harwood, V. J., Ferguson, D. M., Lukasik, J., Hannah, P., Getrich, M. and Brownell, M.** (2005). Evaluation of antibiotic resistance analysis and ribotyping for identification of faecal pollution sources in an urban watershed. *Journal of Applied Microbiology* **99** (3): 618-628.
- Moriñigo, M. A., Wheeler, D., Berry, C., Jones, C. R., Muñoz, M. A., Cornax, R. and Borrego, J. J.** (1992). Evaluation of different bacteriophage groups as faecal indicators in contaminated natural waters in southern England. *Water Research* **26** (3): 267-271.
- Muir, P., Ras, A., Klapper, P. E., Cleator, G. M., Korn, K., Aepinus, C., Fomsgaard, A., Palmer, P., Samuelsson, A., Tenorio, A., Weissbrich, B. and van Loon, A. M.** (1999). Multicenter quality assessment of PCR methods for detection of enteroviruses. *Journal of Clinical Microbiology* **37** (5): 1409-1414.
- Muniain-Mujika, I., Calvo, M., Lucena, F. and Girones, R.** (2003). Comparative analysis of viral pathogens and potential indicators in shellfish. *International Journal of Food Microbiology* **83** (1): 75-85.
- Muniesa, M. and Jofre, J.** (2004). Factors influencing the replication of somatic coliphages in the water environment. *Antonie Van Leeuwenhoek* **86** (1): 65-76.
- Muniesa, M., Moce-Llivina, L., Katayama, H. and Jofre, J.** (2003). Bacterial host strains that support replication of somatic coliphages. *Antonie Van Leeuwenhoek* **83** (4): 305-315.
- Muniesa, M., Payan, A., Moce-Llivina, L., Blanch, A. R. and Jofre, J.** (2009). Differential persistence of F-specific RNA phage subgroups hinders their use as single tracers for faecal source tracking in surface water. *Water Research* **43** (6): 1559-1564.
- Muscillo, M., Pourshaban, M., Iaconelli, M., Fontana, S., Di Grazia, A., Manzara, S., Fadda, G., Santangelo, R. and La Rosa, G.** (2008). Detection and quantification of human adenoviruses in surface waters by nested PCR, TaqMan real-time PCR and cell culture assays. *Water, Air, & Soil Pollution* **191** (1): 83-93.
- Myoda, S. P., Carson, C. A., Fuhrmann, J. J., Hahm, B. K., Hartel, P. G., Yampara-Lquise, H., Johnson, L., Kuntz, R. L., Nakatsu, C. H., Sadowsky, M. J. and Samadpour, M.** (2003). Comparison of genotypic-based microbial source tracking methods requiring a host origin database. *Journal of Water and Health* **1** (4): 167-180.
- Nasser, A. M. and Oman, S. D.** (1999). Quantitative assessment of the inactivation of pathogenic and indicator viruses in natural water sources. *Water Research* **33** (7): 1748-1752.
- Nasser, A. M., Tchorsh, Y. and Fattal, B.** (1993). Comparative survival of *E. coli*, F+ bacteriophages, HAV and poliovirus 1 in wastewater and groundwater. *Water Science and Technology* **27** (3-4): 401-407.
- Ngazoa, E. S., Fliss, I. and Jean, J.** (2008). Quantitative study of persistence of human norovirus genome in water using TaqMan real-time RT-PCR. *Journal of Applied Microbiology* **104** (3): 707-715.
- Nishihara, T., Fujisaki, S., Nishimura, Y., Minami, Y. and Yubisui, T.** (2006). Analysis of six new genes encoding lysis proteins and coat proteins in Escherichia coli group A RNA phages. *Microbiology and Immunology* **50** (1): 61-66.
- Noble, R. T., Allen, S. M., Blackwood, A. D., Chu, W., Jiang, S. C., Lovelace, G. L., Sobsey, M. D., Stewart, J. R. and Wait, D. A.** (2003). Use of viral pathogens and indicators to differentiate between human and non-human fecal contamination in a microbial source tracking comparison study. *Journal of Water and Health* **1** (4): 195-207.
- Noble, R. T., Lee, I. M. and Schiff, K. C.** (2004). Inactivation of indicator micro-organisms from various sources of faecal contamination in seawater and freshwater. *Journal of Applied Microbiology* **96** (3): 464-472.

- O'Brien, R. T. and Newman, J. S. (1977). Inactivation of polioviruses and coxsackieviruses in surface water. *Applied and Environmental Microbiology* **33** (2): 334-340.
- Ogorzaly, L. and Gantzer, C. (2006). Development of real-time RT-PCR methods for specific detection of F-specific RNA bacteriophage genogroups: application to urban raw wastewater. *Journal of Virological Methods* **138** (1-2): 131-139.
- Ogorzaly, L., Tissier, A., Bertrand, I., Maul, A. and Gantzer, C. (2009). Relationship between F-specific RNA phage genogroups, faecal pollution indicators and human adenoviruses in river water. *Water Research* **43** (5): 1257-1264.
- Oishi, I., Yamazaki, K., Kimoto, T., Minekawa, Y., Utagawa, E., Yamazaki, S., Inouye, S., Grohmann, G. S., Monroe, S. S. and Stine, S. E. (1994). A large outbreak of acute gastroenteritis associated with astrovirus among students and teachers in Osaka, Japan. *Journal of Infectious Diseases* **170** (2): 439-443.
- Okabe, S., Okayama, N., Savichtcheva, O. and Ito, T. (2007). Quantification of host-specific *Bacteroides-Prevotella* 16S rRNA genetic markers for assessment of fecal pollution in freshwater. *Applied Microbiology and Biotechnology* **74** (4): 890-901.
- Olive, D. M. and Bean, P. (1999). Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *Journal of Clinical Microbiology* **37** (6): 1661-1669.
- Osawa, S., Furuse, K. and Watanabe, I. (1981). Distribution of ribonucleic acid coliphages in animals. *Applied and Environmental Microbiology* **41** (1): 164-168.
- Panda, S. K., Thakral, D. and Rehman, S. (2007). Hepatitis E virus. *Reviews in Medical Virology* **17** (3): 151-180.
- Papapetropoulou, M. and Vantarakis, A. C. (1998). Detection of adenovirus outbreak at a municipal swimming pool by nested PCR amplification. *Journal of Infection* **36** (1): 101-103.
- Parveen, S., Hodge, N. C., Stall, R. E., Farrah, S. R. and Tamplin, M. L. (2001). Phenotypic and genotypic characterization of human and nonhuman *Escherichia coli*. *Water Research* **35** (2): 379-386.
- Parveen, S., Murphree, R. L., Edmiston, L., Kaspar, C. W., Portier, K. M. and Tamplin, M. L. (1997). Association of multiple-antibiotic-resistance profiles with point and nonpoint sources of *Escherichia coli* in Apalachicola Bay. *Applied and Environmental Microbiology* **63** (7): 2607-2612.
- Parveen, S., Portier, K. M., Robinson, K., Edmiston, L. and Tamplin, M. L. (1999). Discriminant analysis of ribotype profiles of *Escherichia coli* for differentiating human and nonhuman sources of fecal pollution. *Applied and Environmental Microbiology* **65** (7): 3142-3147.
- Payan, A., Ebdon, J., Taylor, H., Gantzer, C., Ottoson, J., Papageorgiou, G. T., Blanch, A. R., Lucena, F., Jofre, J. and Muniesa, M. (2005). Method for isolation of *Bacteroides* bacteriophage host strains suitable for tracking sources of fecal pollution in water. *Applied and Environmental Microbiology* **71** (9): 5659-5662.
- Payment, P., Berte, A., Prevost, M., Menard, B. and Barbeau, B. (2000). Occurrence of pathogenic microorganisms in the Saint Lawrence River (Canada) and comparison of health risks for populations using it as their source of drinking water. *Canadian Journal of Microbiology* **46** (6): 565-576.
- Payment, P., Franco, E. and Fout, G. S. (1994). Incidence of Norwalk virus infections during a prospective epidemiological study of drinking water-related gastrointestinal illness. *Canadian Journal of Microbiology* **40** (10): 805-809.
- Payment, P., Siemiatycki, J., Richardson, L., Renaud, G., Franco, E. and Prevost, M. (1997). A prospective epidemiological study of gastrointestinal health effects due to the consumption of drinking water. *International Journal of Environmental Health Research* **7** (1): 5 - 31.
- Payment, P., Tremblay, M. and Trudel, M. (1985a). Relative resistance to chlorine of poliovirus and coxsackievirus isolates from environmental sources and drinking water. *Applied and Environmental Microbiology* **49** (4): 981-983.
- Payment, P., Trudel, M. and Plante, R. (1985b). Elimination of viruses and indicator bacteria at each step of treatment during preparation of drinking water at seven water treatment plants. *Applied and Environmental Microbiology* **49** (6): 1418-1428.

- Perelle, S., Cavellini, L., Burger, C., Blaise-Boisseau, S., Hennechart-Collette, C., Merle, G. and Fach, P.** (2009). Use of a robotic RNA purification protocol based on the NucliSens® easyMAG(TM) for real-time RT-PCR detection of hepatitis A virus in bottled water. *Journal of Virological Methods* **157** (1): 80-83.
- Pina, S., Puig, M., Lucena, F., Jofre, J. and 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** (9): 3376-3382.
- Pinto, R. M., Abad, F. X., Gajardo, R. and Bosch, A.** (1996). Detection of infectious astroviruses in water. *Applied and Environmental Microbiology* **62** (8): 3073.
- Pinto, R. M., Gajardo, R., Abad, F. X. and Bosch, A.** (1995). Detection of fastidious infectious enteric viruses in water. *Environmental Science and Technology* **29** (10): 2636-2638.
- Pinto, R. M. and Saiz, J. C.** (2007). Enteric hepatitis viruses in Perspectives in Medical Virology. Bosch, A., Elsevier. **17**: 39-67.
- Polaczyk, A. L., Roberts, J. M. and Hill, V. R.** (2007). Evaluation of 1MDS electropositive microfilters for simultaneous recovery of multiple microbe classes from tap water. *Journal of Microbiological Methods* **68** (2): 260-266.
- Pourcher, A. M., Devriese, L. A., Hernandez, J. F. and Delattre, J. M.** (1991). Enumeration by a miniaturized method of *Escherichia coli*, *Streptococcus bovis* and enterococci as indicators of the origin of faecal pollution of waters. *Journal of Applied Bacteriology* **70** (6): 525-530.
- Priano, C., Arora, R., Butke, J. and Mills, D. R.** (1995). A complete plasmid-based complementation system for RNA coliphage Q beta: three proteins of bacteriophages Q beta (group III) and SP (group IV) can be interchanged. *Journal of Molecular Biology* **249** (2): 283-297.
- Pruss, A.** (1998). Review of epidemiological studies on health effects from exposure to recreational water. *International Journal of Epidemiology* **27** (1): 1-9.
- Puig, A., Queralt, N., Jofre, J. and Araujo, R.** (1999). Diversity of bacteroides fragilis strains in their capacity to recover phages from human and animal wastes and from fecally polluted wastewater. *Applied and Environmental Microbiology* **65** (4): 1772-1776.
- Puig, M., Jofre, J., Lucena, F., Allard, A., Wadell, G. and Girones, R.** (1994). Detection of adenoviruses and enteroviruses in polluted waters by nested PCR amplification. *Applied and Environmental Microbiology* **60** (8): 2963-2970.
- Pusch, D., Oh, D. Y., Wolf, S., Dumke, R., Schroter-Bobsin, U., Hohne, M., Roske, I. and Schreier, E.** (2005). Detection of enteric viruses and bacterial indicators in German environmental waters. *Archives of Virology* **150** (5): 929-947.
- Reid, T. M. and Robinson, H. G.** (1987). Frozen raspberries and hepatitis A. *Epidemiology and Infection* **98** (1): 109-112.
- Reischer, G. H., Kasper, D. C., Steinborn, R., Farnleitner, A. H. and Mach, R. L.** (2007). A quantitative real-time PCR assay for the highly sensitive and specific detection of human faecal influence in spring water from a large alpine catchment area. *Letters in Applied Microbiology* **44** (4): 351-356.
- Reischer, G. H., Kasper, D. C., Steinborn, R., Mach, R. L. and Farnleitner, A. H.** (2006). Quantitative PCR method for sensitive detection of ruminant fecal pollution in freshwater and evaluation of this method in alpine karstic regions. *Applied and Environmental Microbiology* **72** (8): 5610-5614.
- Reynolds, K. A., Gerba, C. P., Abbaszadegan, M. and Pepper, L. L.** (2001). ICC/PCR detection of enteroviruses and hepatitis A virus in environmental samples. *Canadian Journal of Microbiology* **47** (2): 153-157.
- Reynolds, K. A., Roll, K., Fujioka, R. S., Gerba, C. P. and Pepper, I. L.** (1998). Incidence of enteroviruses in Mamala Bay, Hawaii using cell culture and direct polymerase chain reaction methodologies. *Canadian Journal of Microbiology* **44** (6): 598-604.
- Ritter, K. J., Carruthers, E., Carson, C. A., Ellender, R. D., Harwood, V. J., Kingsley, K., Nakatsu, C., Sadowsky, M., Shear, B., West, B., Whitlock, J. E., Wiggins, B. A. and Wilbur, J. D.** (2003). Assessment of statistical methods used in library-based approaches to microbial source tracking. *Journal of Water and Health* **1** (4): 209-223.

- Rolfe, K. J., Parmar, S., Mururi, D., Wreghitt, T. G., Jalal, H., Zhang, H. and Curran, M. D.** (2007). An internally controlled, one-step, real-time RT-PCR assay for norovirus detection and genogrouping. *Journal of Clinical Virology* **39** (4): 318-321.
- Rose, J. B., Mullinax, R. L., Singh, S. N., Yates, M. V. and Gerba, C. P.** (1987). Occurrence of rotaviruses and enteroviruses in recreational waters of Oak Creek, Arizona. *Water Research* **21** (11): 1375-1381.
- Rose, J. B., Singh, S. N., Gerba, C. P. and Kelley, L. M.** (1984). Comparison of microporous filters for concentration of viruses from wastewater. *Applied and Environmental Microbiology* **47** (5): 989-992.
- Rose, J. B., Zhou, X., Griffin, D. W. and Paul, J. H.** (1997). Comparison of PCR and plaque assay for detection and enumeration of coliphage in polluted marine waters. *Applied and Environmental Microbiology* **63** (11): 4564-4566.
- Rosenblum, L. S., Mirkin, I. R., Allen, D. T., Safford, S. and Hadler, S. C.** (1990). A multifocal outbreak of hepatitis A traced to commercially distributed lettuce. *American Journal of Public Health* **80** (9): 1075-1079.
- Russell, W. C.** (2000). Update on adenovirus and its vectors. *Journal of General Virology* **81** (Pt 11): 2573-2604.
- Rutjes, S. A., Italiaander, R., van den Berg, H. H., Lodder, W. J. and 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** (7): 3734-3740.
- Samadpour, M., Roberts, M. C., Kitts, C., Mulugeta, W. and Alfi, D.** (2005). The use of ribotyping and antibiotic resistance patterns for identification of host sources of *Escherichia coli* strains. *Letters in Applied Microbiology* **40** (1): 63-68.
- Sanchez, G., Pinto, R. M., Vanaclocha, H. and Bosch, A.** (2002). Molecular characterization of hepatitis A virus isolates from a transcontinental shellfish-borne outbreak. *Journal of Clinical Microbiology* **40** (11): 4148-4155.
- Santo Domingo, J. W., Bambic, D. G., Edge, T. A. and Wuertz, S.** (2007). Quo vadis source tracking ? Towards a strategic framework for environmental monitoring of fecal pollution. *Water Research* **41** (16): 3539-3552.
- Schaper, M., Duran, A. E. and Jofre, J.** (2002a). Comparative resistance of phage isolates of four genotypes of F-specific RNA bacteriophages to various inactivation processes. *Applied and Environmental Microbiology* **68** (8): 3702-3707.
- Schaper, M. and Jofre, J.** (2000). Comparison of methods for detecting genotypes of F-specific RNA bacteriophages and fingerprinting the origin of faecal pollution in water samples. *Journal of Virological Methods* **89** (1-2): 1-10.
- Schaper, M., Jofre, J., Uys, M. and Grabow, W. O.** (2002b). Distribution of genotypes of F-specific RNA bacteriophages in human and non-human sources of faecal pollution in South Africa and Spain. *Journal of Applied Microbiology* **92** (4): 657-667.
- Schwab, K.** (2007). Waterborne gastroenteritis viruses in *Perspectives in Medical Virology*. Bosch, A., Elsevier. **17**: 27-38.
- Schwab, K. J., Neill, F. H., Le Guyader, F., Estes, M. K. and Atmar, R. L.** (2001). Development of a reverse transcription-PCR-DNA enzyme immunoassay for detection of "Norwalk-like" viruses and hepatitis A virus in stool and shellfish. *Applied and Environmental Microbiology* **67** (2): 742-749.
- Scott, T. M., Jenkins, T. M., Lukasik, J. and Rose, J. B.** (2005). Potential use of a host associated molecular marker in *Enterococcus faecium* as an index of human fecal pollution. *Environmental Science and Technology* **39** (1): 283-287.
- Scott, T. M., Parveen, S., Portier, K. M., Rose, J. B., Tamplin, M. L., Farrah, S. R., Koo, A. and Lukasik, J.** (2003). Geographical variation in ribotype profiles of *Escherichia coli* isolates from humans, swine, poultry, beef, and dairy cattle in Florida. *Applied and Environmental Microbiology* **69** (2): 1089-1092.
- Scott, T. M., Rose, J. B., Jenkins, T. M., Farrah, S. R. and Lukasik, J.** (2002). Microbial source tracking: current methodology and future directions. *Applied and Environmental Microbiology* **68** (12): 5796-5803.
- Sedmak, G., Bina, D. and MacDonald, J.** (2003). Assessment of an enterovirus sewage surveillance system by comparison of clinical isolates with sewage isolates from Milwaukee, Wisconsin, collected August 1994 to December 2002. *Applied and Environmental Microbiology* **69** (12): 7181-7187.

- Seiler, R. L., Zaugg, S. D., Thomas, J. M. and Howcroft, D. L.** (1999). Caffeine and pharmaceuticals as indicators of waste water contamination in wells. *Ground Water* **37** (3): 405-410.
- Sellwood, J., Dadswell, J. V. and Slade, J. S.** (1981). Viruses in sewage as an indicator of their presence in the community. *Journal of Hygiene* **86** (2): 217-225.
- Seurinck, S., Defoirdt, T., Verstraete, W. and Siciliano, S. D.** (2005a). Detection and quantification of the human-specific HF183 *Bacteroides* 16S rRNA genetic marker with real-time PCR for assessment of human faecal pollution in freshwater. *Environmental Microbiology* **7** (2): 249-259.
- Seurinck, S., Verstraete, W. and Siciliano, S. D.** (2005b). Microbial source tracking for identification of fecal pollution. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* **4** (1): 19-37.
- Sghir, A., Gramet, G., Suau, A., Rochet, V., Pochart, P. and Dore, J.** (2000). Quantification of bacterial groups within human fecal flora by oligonucleotide probe hybridization. *Applied and Environmental Microbiology* **66** (5): 2263-2266.
- Shanks, O. C., Domingo, J. W., Lu, J., Kelty, C. A. and Graham, J. E.** (2007). Identification of bacterial DNA markers for the detection of human fecal pollution in water. *Applied and Environmental Microbiology* **73** (8): 2416-2422.
- Shanks, O. C., Nietch, C., Simonich, M., Younger, M., Reynolds, D. and Field, K. G.** (2006). Basin-wide analysis of the dynamics of fecal contamination and fecal source identification in Tillamook Bay, Oregon. *Applied and Environmental Microbiology* **72** (8): 5537-5546.
- Shieh, Y. S., Baric, R. S. and Sobsey, M. D.** (1997). Detection of low levels of enteric viruses in metropolitan and airplane sewage. *Applied and Environmental Microbiology* **63** (11): 4401-4407.
- Shields, P. A., Ling, T. F., Tjatha, V., Shah, D. O. and Farrah, S. R.** (1986). Comparison of positively charged membrane filters and their use in concentrating bacteriophages in water. *Water Research* **20** (2): 145-151.
- Sigler, V. and Pasutti, L.** (2006). Evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis to differentiate *Escherichia coli* populations in secondary environments. *Environmental Microbiology* **8** (10): 1703-1711.
- Sinton, L. W., Finlay, R. K. and Lynch, P. A.** (1999). Sunlight inactivation of fecal bacteriophages and bacteria in sewage-polluted seawater. *Applied and Environmental Microbiology* **65** (8): 3605-3613.
- Sinton, L. W., Finlay, R. K. and Reid, A. J.** (1996). A simple membrane filtration-elution method for the enumeration of F-RNA, F-DNA and somatic coliphages in 100-ml water samples. *Journal of Microbiological Methods* **25** 257-269.
- Sinton, L. W., Hall, C. H., Lynch, P. A. and Davies-Colley, R. J.** (2002). Sunlight inactivation of fecal indicator bacteria and bacteriophages from waste stabilization pond effluent in fresh and saline waters. *Applied and Environmental Microbiology* **68** (3): 1122-1131.
- Skraber, S., Gantzer, C., Maul, A. and Schwartzbrod, L.** (2002). Fates of bacteriophages and bacterial indicators in the Moselle river (France). *Water Research* **36** (14): 3629-3637.
- Skraber, S., Gassilloud, B., Schwartzbrod, L. and Gantzer, C.** (2004). Survival of infectious Poliovirus-1 in river water compared to the persistence of somatic coliphages, thermotolerant coliforms and Poliovirus-1 genome. *Water Research* **38** (12): 2927-2933.
- Skripkin, E. A., Adhin, M. R., de Smit, M. H. and van Duin, J.** (1990). Secondary structure of the central region of bacteriophage MS2 RNA: conservation and biological significance. *Journal of Molecular Biology* **211** (2): 447-463.
- Smith, J. L.** (2001). A review of hepatitis E virus. *Journal of Food Protection* **64** (4): 572-586.
- Sobsey, M., Schwab, K. J. and Handzel, T. R.** (1990). A simple membrane filter method to concentrate and enumerate male-specific RNA coliphages. *J Am Water Works Assoc* **82** (9): 52-59.
- Sobsey, M. D. and Glass, J. S.** (1980). Poliovirus concentration from tap water with electropositive adsorbent filters. *Applied and Environmental Microbiology* **40** (2): 201-210.
- Sobsey, M. D. and Glass, J. S.** (1984). Influence of water quality on enteric virus concentration by microporous filter methods. *Applied and Environmental Microbiology* **47** (5): 956-960.

- Sobsey, M. D. and Hickey, A. R.** (1985). Effects of humic and fulvic acids on poliovirus concentration from water by microporous filtration. *Applied and Environmental Microbiology* **49** (2): 259-264.
- Sobsey, M. D., Oglesbee, S. E. and Wait, D. A.** (1985). Evaluation of methods for concentrating hepatitis A virus from drinking water. *Applied and Environmental Microbiology* **50** (6): 1457-1463.
- Souza, V., Rocha, M., Valera, A. and Eguiarte, L. E.** (1999). Genetic structure of natural populations of *Escherichia coli* in wild hosts on different continents. *Applied and Environmental Microbiology* **65** (8): 3373-3385.
- Stewart-Pullaro, J., Daugomah, J. W., Chestnut, D. E., Graves, D. A., Sobsey, M. D. and Scott, G. I.** (2006). F+ RNA coliphage typing for microbial source tracking in surface waters. *Journal of Applied Microbiology* **101** (5): 1015-1026.
- Stewart, P. L., Fuller, S. D. and Burnett, R. M.** (1993). Difference imaging of adenovirus: bridging the resolution gap between X-ray crystallography and electron microscopy. *The EMBO Journal* **12** (7): 2589-2599.
- Stoeckel, D. M., Mathes, M. V., Hyer, K. E., Hagedorn, C., Kator, H., Lukasik, J., O'Brien, T. L., Fenger, T. W., Samadpour, M., Strickler, K. M. and Wiggins, B. A.** (2004). Comparison of seven protocols to identify fecal contamination sources using *Escherichia coli*. *Environmental Science and Technology* **38** (22): 6109-6117.
- Straub, T. M., Honer zu Bentrup, K., Orosz-Coghlan, P., Dohnalkova, A., Mayer, B. K., Bartholomew, R. A., Valdez, C. O., Bruckner-Lea, C. J., Gerba, C. P., Abbaszadegan, M. and Nickerson, C. A.** (2007). In vitro cell culture infectivity assay for human noroviruses. *Emerging Infectious Diseases* **13** (3): 396-403.
- Sundram, A., Donnelly, A., Ehlers, M. M., Vrey, A., Grabow, W. and Bailey, I. W.** (2002). Evaluation of F-RNA coliphages as indicators of viruses and the source of faecal pollution. *Water SA Special Edition* 86-91.
- Sundram, A., Jumanlal, N. and Ehlers, M. M.** (2006). Genotyping of F-RNA coliphages isolated from wastewater and river water samples. *Water SA* **32** (1): 65-70.
- Tani, N., Dohi, Y., Kurumatani, N. and Yonemasu, K.** (1995). Seasonal distribution of adenoviruses, enteroviruses and reoviruses in urban river water. *Microbiology and Immunology* **39** (8): 577-580.
- Tars, K., Bundule, M., Fridborg, K. and Liljas, L.** (1997). The crystal structure of bacteriophage GA and a comparison of bacteriophages belonging to the major groups of *Escherichia coli* leviviruses. *Journal of Molecular Biology* **271** (5): 759-773.
- Tartera, C. and Jofre, J.** (1987). Bacteriophages active against *Bacteroides fragilis* in sewage-polluted waters. *Applied and Environmental Microbiology* **53** (7): 1632-1637.
- Tartera, C., Lucena, F. and Jofre, J.** (1989). Human origin of *Bacteroides fragilis* bacteriophages present in the environment. *Applied and Environmental Microbiology* **55** (10): 2696-2701.
- Taylor, J. W., Gary, G. W., Jr. and Greenberg, H. B.** (1981). Norwalk-related viral gastroenteritis due to contaminated drinking water. *American Journal of Epidemiology* **114** (4): 584-592.
- Taylor, M. B., Cox, N., Vrey, M. A. and Grabow, W. O. K.** (2001). The occurrence of hepatitis A and astroviruses in selected river and dam waters in South Africa. *Water Research* **35** (11): 2653-2660.
- Thi, T. N., Deback, C., Malet, I., Bonnafous, P., Ait-Arkoub, Z. and Agut, H.** (2006). Rapid determination of antiviral drug susceptibility of herpes simplex virus types 1 and 2 by real-time PCR. *Antiviral Research* **69** (3): 152-157.
- Thomas, M. A., Lichtenstein, D. L., Krajcsi, P. and Wold, W. S.** (2007). A real-time PCR method to rapidly titer adenovirus stocks. *Methods in Molecular Medicine* **130** 185-192.
- Thurston-Enriquez, J. A., Haas, C. N., Jacangelo, J., Riley, K. and Gerba, C. P.** (2003). Inactivation of feline calicivirus and adenovirus type 40 by UV radiation. *Applied and Environmental Microbiology* **69** (1): 577-582.
- Turner, M., Istre, G. R., Beauchamp, H., Baum, M. and Arnold, S.** (1987). Community outbreak of adenovirus type 7a infections associated with a swimming pool. *Southern Medical Journal* **80** (6): 712-715.
- USEPA, EPA 821-R-01-030.** (2001). Method 1601: Male-specific (F+) and somatic coliphage in water by two-step enrichment procedure. USEPA Office of water, Washington.
- USEPA, EPA 821-R-01-029.** (2001). Method 1602: Male-specific (F+) and somatic coliphage in water by single agar layer (SAL) procedure. USEPA Office of water, Washington.



- USEPA, EPA/600-R-05-064.** (2005). Microbial source tracking guide document. USEPA Office of research and development, Washington.
- Valegård, K., Fridborg, K. and Liljas, L.** (1994). Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of the bacteriophage Qbeta. *Acta Crystallographica Section D, Biological Crystallography* **50** (Pt 1): 105-109.
- Valegård, K., Liljas, L., Fridborg, K. and Unge, T.** (1990). The three-dimensional structure of the bacterial virus MS2. *Nature* **345** (6270): 36-41.
- van Asperen, I. A., Medema, G., Borgdorff, M. W., Sprenger, M. J. and Havelaar, A. H.** (1998). Risk of gastroenteritis among triathletes in relation to faecal pollution of fresh waters. *International Journal of Epidemiology* **27** (2): 309-315.
- van Heerden, J., Ehlers, M. M., Heim, A. and Grabow, W. O. K.** (2005a). Prevalence, quantification and typing of adenoviruses detected in river and treated drinking water in South Africa. *Journal of Applied Microbiology* **99** (2): 234-242.
- van Heerden, J., Ehlers, M. M., van Zyl, W. B. and Grabow, W. O. K.** (2003). Incidence of adenoviruses in raw and treated water. *Water Research* **37** 3704-3708.
- van Heerden, J., Ehlers, M. M., Vivier, J. C. and Grabow, W. O.** (2005b). Risk assessment of adenoviruses detected in treated drinking water and recreational water. *Journal of Applied Microbiology* **99** (4): 926-933.
- van Zyl, W. B., Page, N. A., Grabow, W. O., Steele, A. D. and Taylor, M. B.** (2006). Molecular epidemiology of group A rotaviruses in water sources and selected raw vegetables in southern Africa. *Applied and Environmental Microbiology* **72** (7): 4554-4560.
- Vantarakis, A. C. and Papapetropoulou, M.** (1998). Detection of enteroviruses and adenoviruses in coastal waters of SW Greece by nested polymerase chain reaction. *Water Research* **32** (8): 2365-2372.
- Venieri, D., Vantarakis, A., Komninou, G. and Papapetropoulou, M.** (2004). Differentiation of faecal *Escherichia coli* from human and animal sources by random amplified polymorphic DNA-PCR (RAPD-PCR). *Water Science and Technology* **50** (1): 193-198.
- Vennema, H., de Bruin, E. and Koopmans, M.** (2002). Rational optimization of generic primers used for Norwalk-like virus detection by reverse transcriptase polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Virology* **25** (2): 233-235.
- Versalovic, J., Koeuth, T. and Lupski, J. R.** (1991). Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Research* **19** (24): 6823-6831.
- Vilagines, P., Sarrette, B., le Guyader, M., Cun, C. and Vilagines, R.** (1997). Relationship between cultivable viruses, F-specific RNA phages and the principal fecal bacterial indicators in raw waters, treated wastewaters and surface water. *Journal Européen d'Hydrologie* **28** (2): 201-220.
- Villena, C., Gabrieli, R., Pinto, R. M., Guix, S., Donia, D., Buonomo, E., Palombi, L., Cenko, F., Bino, S., Bosch, A. and Divizia, M.** (2003). A large infantile gastroenteritis outbreak in Albania caused by multiple emerging rotavirus genotypes. *Epidemiology and Infection* **131** (3): 1105-1110.
- Vinje, J. and Koopmans, M. P.** (2000). Simultaneous detection and genotyping of "Norwalk-like viruses" by oligonucleotide array in a reverse line blot hybridization format. *Journal of Clinical Microbiology* **38** (7): 2595-2601.
- Vinje, J., Oudejans, S. J., Stewart, J. R., Sobsey, M. D. and Long, S. C.** (2004). Molecular detection and genotyping of male-specific coliphages by reverse transcription-PCR and reverse line blot hybridization. *Applied and Environmental Microbiology* **70** (10): 5996-6004.
- VIROBATHE-European Project Number 513648.** (2005-2007). Methods for the concentration and detection of adenoviruses and noroviruses in european bathing waters with reference to the revision of the bathing water directive 76/160/EEC
- Vivier, J. C., Ehlers, M. M. and Grabow, W. O.** (2004). Detection of enteroviruses in treated drinking water. *Water Research* **38** (11): 2699-2705.
- Wait, D. A. and Sobsey, M. D.** (2001). Comparative survival of enteric viruses and bacteria in Atlantic Ocean seawater. *Water Science and Technology* **43** (12): 139-142.

- Wallis, J. L. and Taylor, H. D.** (2003). Phenotypic population characteristics of the enterococci in wastewater and animal faeces: implications for the new European directive on the quality of bathing waters. *Water Science and Technology* **47** (3): 27-32.
- Walter, J. E. and Mitchell, D. K.** (2000). Role of astroviruses in childhood diarrhea. *Current Opinion in Pediatrics* **12** (3): 275-279.
- Walter, J. E. and Mitchell, D. K.** (2003). Astrovirus infection in children. *Current Opinion in Infectious Diseases* **16** (3): 247-253.
- Walter, R., Macht, W., Dürkop, J., Hecht, R., Hornig, U. and Schulze, P.** (1989). Virus levels in river waters. *Water Research* **23** (2): 133-138.
- Walters, S. P., Gannon, V. P. and Field, K. G.** (2007). Detection of Bacteroidales fecal indicators and the zoonotic pathogens *E. coli* 0157:H7, salmonella, and campylobacter in river water. *Environmental Science and Technology* **41** (6): 1856-1862.
- Watanabe, I., Miyake, T., Sakurai, T., Shina, T. and Ohno, T.** (1967). Isolation and grouping of RNA phages. *Proceedings of the Japan Academy* **43** 204-209.
- Westrell, T., Teunis, P., van den Berg, H., Lodder, W., Ketelaars, H., Stenstrom, T. A. and de Roda Husman, A. M.** (2006). Short- and long-term variations of norovirus concentrations in the Meuse river during a 2-year study period. *Water Research* **40** (14): 2613-2620.
- Whitlock, J. E., Jones, D. T. and Harwood, V. J.** (2002). Identification of the sources of fecal coliforms in an urban watershed using antibiotic resistance analysis. *Water Research* **36** (17): 4273-4282.
- Wiggins, B. A.** (1996). Discriminant analysis of antibiotic resistance patterns in fecal streptococci, a method to differentiate human and animal sources of fecal pollution in natural waters. *Applied and Environmental Microbiology* **62** (11): 3997-4002.
- Wiggins, B. A., Andrews, R. W., Conway, R. A., Corr, C. L., Dobratz, E. J., Dougherty, D. P., Eppard, J. R., Knupp, S. R., Limjoco, M. C., Mettenburg, J. M., Rinehardt, J. M., Sonsino, J., Torrijos, R. L. and Zimmerman, M. E.** (1999). Use of antibiotic resistance analysis to identify nonpoint sources of fecal pollution. *Applied and Environmental Microbiology* **65** (8): 3483-3486.
- Wiggins, B. A., Cash, P. W., Creamer, W. S., Dart, S. E., Garcia, P. P., Gerecke, T. M., Han, J., Henry, B. L., Hoover, K. B., Johnson, E. L., Jones, K. C., McCarthy, J. G., McDonough, J. A., Mercer, S. A., Noto, M. J., Park, H., Phillips, M. S., Purner, S. M., Smith, B. M., Stevens, E. N. and Varner, A. K.** (2003). Use of antibiotic resistance analysis for representativeness testing of multiwatershed libraries. *Applied and Environmental Microbiology* **69** (6): 3399-3405.
- Wilson, R., Anderson, L. J., Holman, R. C., Gary, G. W. and Greenberg, H. B.** (1982). Waterborne gastroenteritis due to the Norwalk agent: clinical and epidemiologic investigation. *American Journal of Public Health* **72** (1): 72-74.
- 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. and Virgin, H. W.** (2004). Replication of Norovirus in cell culture reveals a tropism for dendritic cells and macrophages. *PLoS Biology* **2** (12): e432.
- Wobus, C. E., Thackray, L. B. and Virgin, H. W. t.** (2006). Murine norovirus: a model system to study norovirus biology and pathogenesis. *Journal of Virology* **80** (11): 5104-5112.
- Wolf, S., Hewitt, J., Rivera-Aban, M. and Greening, G. E.** (2008). Detection and characterization of F+ RNA bacteriophages in water and shellfish: Application of a multiplex real-time reverse transcription PCR. *Journal of Virological Methods* **149** (1): 123-128.
- Wood, S. F., Rogen, A. S., Bell, E. J. and Grist, N. R.** (1978). Role of Coxsackie B viruses in myocardial infarction. *British heart journal* **40** (5): 523-525.
- Woody, M. A. and Cliver, D. O.** (1995). Effects of temperature and host cell growth phase on replication of F-specific RNA coliphage Q beta. *Applied and Environmental Microbiology* **61** (4): 1520-1526.
- Wyer, M. D., Fleisher, J. M., Gough, J., Kay, D. and Merrett, H.** (1995). An investigation into parametric relationships between enterovirus and faecal indicator organisms in the coastal waters of England and Wales. *Water Research* **29** (8): 1863-1868.

- Wyn-Jones, A. P. and Sellwood, J.** (2001). Enteric viruses in the aquatic environment. *Journal of Applied Microbiology* **91** (6): 945-962.
- Xagorarakis, I., Kuo, D. H., Wong, K., Wong, M. and Rose, J. B.** (2007). Occurrence of human adenoviruses at two recreational beaches of the great lakes. *Applied and Environmental Microbiology* **73** (24): 7874-7881.
- Yan, T. and Sadowsky, M. J.** (2007). Determining sources of fecal bacteria in waterways. *Environmental Monitoring and Assessment* **129** 97-106.
- Yates, M. V., Gerba, C. P. and Kelley, L. M.** (1985). Virus persistence in groundwater. *Applied and Environmental Microbiology* **49** (4): 778-781.
- Zhang, Z., Mitchell, D. K., Afflerbach, C., Jakab, F., Walter, J., Zhang, Y. J., Staat, M. A., Azimi, P. and Matson, D. O.** (2006). Quantitation of human astrovirus by real-time reverse-transcription-polymerase chain reaction to examine correlation with clinical illness. *Journal of Virological Methods* **134** (1-2): 190-196.
- Zheng, D. P., Ando, T., Fankhauser, R. L., Beard, R. S., Glass, R. I. and Monroe, S. S.** (2006). Norovirus classification and proposed strain nomenclature. *Virology* **346** (2): 312-323.
- Zmirou, D., Ferley, J. P., Balducci, F., Baleux, B., Fera, P., Larbaitg, G., Jacq, E., Moissonnier, B., Blineau, A. and Boudot, J.** (1990). Evaluation of microbial indicators of health risk related to river swimming places. *Revue d'Epidémiologie et de Santé Publique* **38** (2): 101-110.
- Zmirou, D., Pena, L., Ledrans, M. and Letertre, A.** (2003). Risks associated with the microbiological quality of bodies of fresh and marine water used for recreational purposes: summary estimates based on published epidemiological studies. *Archives of Environmental Health* **58** (11): 703-711.



# *Annexes*





Contents lists available at ScienceDirect

## Journal of Membrane Science

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/memsci](http://www.elsevier.com/locate/memsci)

## Efficiency of MS2 phage and Q $\beta$ phage removal by membrane filtration in water treatment: Applicability of real-time RT-PCR method

Jérémie Langlet<sup>a,1</sup>, Leslie Ogorzaly<sup>a,1</sup>, Jean-Christophe Schrotter<sup>b</sup>, Claire Machinal<sup>b</sup>, Fabien Gaboriaud<sup>c</sup>, Jérôme F.L. Duval<sup>d</sup>, Christophe Gantzer<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratoire de Chimie Physique et Microbiologie pour l'Environnement (LCPME), Nancy Université, CNRS, 5 rue Albert Lebrun, 54000 Nancy, France

<sup>b</sup> Water Research Center, Veolia Environnement, Chemin de la Digue, 78603 Maisons-Laffitte, France

<sup>c</sup> Laboratoire de Chimie Physique et Microbiologie pour l'Environnement (LCPME), Nancy Université, CNRS, 405 rue de Vandoeuvre, F-54600 Villers-lès-Nancy, France

<sup>d</sup> Laboratoire Environnement et Minéralurgie (LEM), Nancy Université, CNRS, 15 avenue du Charmois, B.P. 40, 54501 Vandoeuvre-l s-Nancy Cedex, France

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 26 February 2008

Received in revised form

16 September 2008

Accepted 18 September 2008

Available online 2 October 2008

## Keywords:

MS2 phage

Q $\beta$  phage

Filtration

Virus removal

Real-time RT-PCR

## ABSTRACT

MS2 phage is currently used as a surrogate to evaluate pathogenic virus removal efficiency by filtration membrane during water treatment. Phage removal is commonly defined upon comparing number of infectious units in permeate with that in feed solution by PFU method. This method may lead to overestimation of the virus removal because of possible occurrence of viruses aggregation.

In this study, we report the removal efficiencies of various conventional membranes used in water treatment technology, with respect to suspensions of MS2 and Q $\beta$  bacteriophages. These phages – known to exhibit distinct interfacial characteristics in terms of electrostatic charge and degree of hydrophobicity – were used in conditions where viral particle aggregation is negligible. Under such conditions, the feasibility of fast, easy to handle, molecular biology method, *i.e.* real-time RT-PCR, for measuring virus removal rates is clearly addressed. Comparison of the results provided by this method with those obtained *via* more traditional procedure is given. On the basis of the filtration results, it is shown that Q $\beta$  phages are eliminated to a lower extent than MS2 phages, this being the case for all membranes considered here. Accordingly, the analysis questions the choice of MS2 phage as the best surrogate classically used for characterizing membrane virus removal propensity in worst possible conditions.

  2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Membrane filtration processes constitute an alternative to traditional disinfection treatments for eliminating pathogenic microorganisms from water. Among those pathogens, enteric viruses (*e.g.* *Norovirus*, *Hepatitis A virus*, *Enterovirus*) are recognized as the most difficult microorganisms to be removed essentially because of their small size, typically in the range 20–30 nm diameter. The estimation of molecular weight cut-off (MWCO) or mean pore size of filtration membranes is commonly carried out by analysis of filtration experiments that involve model molecules like dextran [1]. Though useful, this procedure – which aims at addressing the performance of filtration membranes employed in water treatment processes – is inadequate to estimate the efficiency of a membrane with respect to another for removing viral particles. This is so because viruses and dextran macromolecules exhibit

significantly different properties in terms of charge, structure or hydrodynamic permeability, all of them playing a key-role in defining the interactions membrane-particles and thereby the ability of a membrane to capture or not a given colloidal entity [2,3]. For these reasons, the MS2 viral particle has been proposed as a surrogate to evaluate pathogenic virus removals by membrane filtration [4–7]. This choice is commonly motivated by the peculiar physico-chemical characteristics of MS2 phage which make it the worst-case scenario [8,9] in terms of virus removal by membrane filtration. These characteristics of MS2 phage may be summarized as follows: (i) a small size (~25 nm diameter) that critically limits the removal by simple size exclusion, (ii) a low isoelectric point ( $pI = 3.5–3.9$ ) [10–12] which indicates a significant negative charge carried by the virus at neutral pH conditions [3] and thus inoperative adsorption of MS2 particles onto negatively charged membranes as classically used in water treatment processes and (iii) a degree of hydrophobicity [13] which excludes the possibility of significant adsorption onto hydrophilic membranes classically encountered in water treatment technology.

To concretely determine virus removal by a given membrane, MS2 phages are classically poured at high concentration (up to

\* Corresponding author. Tel.: +33 3 83 68 22 91; fax: +33 3 83 68 23 01.  
E-mail address: [Christophe.Gantzer@pharma.uhp-nancy.fr](mailto:Christophe.Gantzer@pharma.uhp-nancy.fr) (C. Gantzer).

<sup>1</sup> These authors contributed equally to this work.

$10^6$  PFU/mL) in phosphate buffer saline (PBS) solution and subsequently filtered through the membrane of interest [4,5]. Phage removal is then defined upon comparing the number of infectious units in permeate with that in feed solution by means of plaque forming units (PFU) method [14]. The above standard procedure may be critically discussed on at least three points that we now detail.

The first point concerns the technique employed for the detection of the phages. The PFU method allows the counting of the only infectious MS2 particles, *i.e.* those able to infect bacteria. Said differently, it comes that one PFU unit may be defined either as the count of an isolated infectious viral particle or as an aggregate made of several infectious viruses. Use of PFU technique leads to entirely disregarding the stability of the suspension of infectious particles (aggregated or not) in permeate and thereby may provide overestimation of the virus removal capacity of the membrane investigated. This has been recently demonstrated by Langlet et al. [15] who quantitatively showed that viral particles aggregation strongly decreases MS2 PFU counts. It is relevant to recall here that the occurrence of aggregation after filtration is strongly favoured by the confinement of the particles which have crossed the membrane pores under the action of hydrodynamic convection, which ultimately leads to suppression of the long-range inter-particle electrostatic repulsion at the benefit of short-range specific inter-particle binding. Despite this limitation of PFU method, it is widely adopted by the community and further considered as the reference technique to be adopted in virus elimination processes. In addition, PFU method is very time-consuming since it generally takes about 24 h to carry out a complete detection of infectious units in a permeate sample. Promising alternative methods for counting viruses in permeate solution are those classically employed in molecular biology, *e.g.* real-time RT-PCR, and rely on the detection of viral genome [16]. Unlike PFU method, the latter techniques are very rapid to handle, routinely customized and do not suffer from limitations inherent to the occurrence of aggregation. Actually, prior to detection by real-time RT-PCR, extraction of genome is necessarily required, which treatment ensures the dissociation of any aggregates present in solution. The main drawback of RT-PCR remains its ability to detect viral genome stemming from infectious as well as non-infectious viruses (included naked genome), the ratio between these two types of particles possibly varying from one viral suspension to the other [17]. In view of these elements, virus removal estimation from real-time RT-PCR is relevant providing a linear correlation is demonstrated with that derived from the PFU reference method. Till now, the evaluation of virus removal by filtration with real-time RT-PCR has never been validated.

The second aspect is related to the impact of particle aggregation not on the detection of infectious viruses in permeate by PFU method as extensively commented above, but on the very removal of organisms present in the feed solution. On the basis of simple size exclusion consideration, large aggregates of viral particles are likely to be more easily removed as compared to their small unitary entity taken separately [6,9,18]. As a result, the occurrence of particle aggregation—which intrinsically depends on the physico-chemical conditions of the medium (pH, ionic strength, temperature and nature of ions present in solution) and on the interfacial properties of the viruses, may result in significant overestimation of the propensity of membranes to remove viruses. Despite this, the stability of the viral population against aggregation in the feed solution is rarely discussed in filtration studies.

Finally, the third aspect pertains to the use of MS2 phage as the “worst-case” scenario (for the reasons previously given, *i.e.* high negative charge, relative hydrophobicity and small size) for microorganisms elimination by membrane filtration. For membranes of which the pore size largely exceeds that of the viral

particles, virus adhesion onto the membrane is the major process that results in virus removal by filtration. Adhesion of viral particles onto charged membranes strongly depends on the charge carried by the virus and its hydrophobicity [8,9,13]. Given that the membranes used in water treatment processes are generally negatively charged and hydrophilic, the worst case in terms of virus removal efficiency is therefore met when considering the removal of highly negatively charged viruses so that electrostatic repulsion between viruses and membrane is largely sustained. MS2 phage, namely because of its low isoelectric point (3.9), expresses a significant negative charge over a wide range of pH and ionic strength conditions. Notwithstanding this peculiar property that has justified in the past decade MS2 phage as the ideal candidate for testing the removal capability of a given membrane, force is to recognize that the comparison of MS2 charge level with that of other viruses has never been performed so far. In a recent analysis, Langlet et al. [3] shed some light on the physical meaning of the isoelectric point and interfacial properties of multi-layered soft particles, bacteriophage MS2 being an illustrative representative. In particular, they showed that the conventional picture of “surface charge” for permeable particles like viruses is physically erroneous and that the nucleic acids distributed within the MS2 phage significantly – if not predominantly – determine the electrostatic properties of the virus as a whole and thereby its interaction with the close environment. Q $\beta$  phage, another F-specific RNA phage, has a similar structure and a comparable size than MS2 phage albeit with a longer genome (4160 nucleotides for Q $\beta$  as compared to 3569 for MS2). Following the theoretical and experimental analyses carried out in Ref. [3], Q $\beta$  phage is expected to express a larger overall negative charge than MS2 phage. In addition, systematic size measurements in various pH and ionic strength conditions [19] suggests that Q $\beta$  phage exhibits a larger relative hydrophobicity than MS2 phage. These elements lead us to propose Q $\beta$  phage as a potential better candidate than MS2 phage to perform virus challenge test in worst case scenario for membranes characterization. The hydrophobic character of Q $\beta$  phage goes in the sense of less favourable elimination because the membranes commonly used in water treatment are very hydrophilic thus minimizing the eventual occurrence of significant attractive hydrophobic interactions with the virus.

Following the above discussion, the objective of this study is (i) to compare the removal efficiencies of initially stable (non-aggregated) colloidal feed suspensions of MS2 and Q $\beta$  viruses by various conventional hydrophilic and negatively charged microfiltration and ultrafiltration membranes used in water treatment technology (isoelectric point goes from 2 to 3.5 and hydrophobicity given by the contact angles which go from 0° to 40°) and (ii) to address the feasibility of the quick real-time RT-PCR method for effectively measuring virus removal rates, keeping in mind that the outcome of this method, unlike that by PFU, is not biased by the occurrence of aggregation processes.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Preparations of MS2 and Q $\beta$ bacteriophage suspensions

MS2 phages (ATCC 15597-B1) and Q $\beta$  phages (provided by Pr Jofre, Barcelona) were replicated according to the procedure extensively discussed in [15]. Briefly, the bacteriophage strains MS2 and Q $\beta$  were replicated according to standard procedure [14] without the CHCl<sub>3</sub> lysis step and using *Escherichia coli* Hfr K12 (ATCC 23631) as bacterial host. After replication, the viral suspensions were centrifuged (Beckman, model J2-22, 27,000  $\times$  g, 60 min, 4 °C) and the supernatant filtered through a 0.22  $\mu$ m membrane (Millipore, SLGP033RS). The viral suspension was stored as stock suspension



**Table 1**

Membranes and bench-scale modules characteristics. The MWCO, pore size and fibre diameter were provided by the manufacturer. The permeability of the bench-scale modules was measured. Mean pore size is an estimation. Consequently, one has to keep in mind the true distributions for the pore (and virus) size (s). On the basis of such e.g. Gaussian like distributions, it is easy to realize that viral particles smaller than those of mean size value can go through pores of size larger than that indicated by the mean pore size value.

|     | Material          | Membrane characteristics |                                  |                                     |                                     | Bench-scale module characteristics |                  |  |
|-----|-------------------|--------------------------|----------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|------------------------------------|------------------|--|
|     |                   | MWCO (kDa)               | Mean pore size ( $\mu\text{m}$ ) | Internal diameter of the fibre (mm) | External diameter of the fibre (mm) | Configuration                      | Number of fibres | Permeability ( $\text{L/h m}^2 \text{ bar, } 20^\circ\text{C}$ ) |
| MF1 | PVDF <sup>a</sup> | ND                       | 0.1                              | 0.5                                 | 0.8                                 | External–internal                  | 21               | 266.6 $\pm$ 55.8   |
| UF2 | PES <sup>b</sup>  | 100                      | 0.05                             | 0.8                                 | 1.3                                 | Internal–external                  | 21               | 646.9 $\pm$ 66.4   |
| UF3 | PES <sup>b</sup>  | 150                      | 0.025                            | 0.8                                 | 1.2                                 | Internal–external                  | 21               | 354.0 $\pm$ 53.6   |
| UF1 | Cellulose         | 100                      | 0.01                             | 0.93                                | 1.2                                 | Internal–external                  | 18               | 163.2 $\pm$ 13.6   |

<sup>a</sup> Polyvinylidene fluoride.

<sup>b</sup> Polyethersulfone.

at 4 °C and filtered (0.22  $\mu\text{m}$ ) prior to filtration experiments with membranes.

Size measurements (see Section 2.4) of the viral particles require the bacteriophage suspension to be dialyzed (100 kDa MWCO, Spectrum, 235071) first against deionised water (0.1  $\mu\text{S/cm}$ ) for 14 h and then against a PBS solution ( $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.2 mM, pH 6.7) for 14 h and subsequently filtered (0.22  $\mu\text{m}$ ). The dialyzed viral suspension was stored at 4 °C and filtered (0.22  $\mu\text{m}$ ) before use.

The double agar layer procedure [14] was followed to quantify the number of infectious units in 1-mL volume of suspension. The final viral concentration for the different viral stock suspensions was about  $10^{11}$  PFU/mL.

## 2.2. Quantification of viral genome

- Viral RNA extraction. Viral RNA was extracted from 140  $\mu\text{L}$  using the QIAamp<sup>®</sup> viral RNA mini kit (QIAGEN, 52906) according to the manufacturer's instructions. Extracted RNA was eluted in 60  $\mu\text{L}$  of elution buffer and stored at  $-80^\circ\text{C}$ .
- Real-time RT-PCR. Quantification of MS2 and Q $\beta$  genome was performed using the method developed by Ogorzaly and Gantzer [16] with several modifications of the reverse transcriptase (RT) procedure. During the first step of the RT, 5  $\mu\text{L}$  of extracted RNA were mixed with 1  $\mu\text{L}$  of 20  $\mu\text{M}$  reverse primer at 65 °C for 5 min and immediately incubated on ice at least for 1 min. The reaction mixture consisted of 4  $\mu\text{L}$  of 5 $\times$  reverse transcription buffer, 1  $\mu\text{L}$  (40 U/ $\mu\text{L}$ ) of RNase Inhibitor (Promega, N2115), 2  $\mu\text{L}$  of 10 mM dNTPs (Applied Biosystems, N8080260), 1  $\mu\text{L}$  (10 U/ $\mu\text{L}$ ) of AMV reverse transcriptase (Promega, M5108) and 6  $\mu\text{L}$  of DNase-RNase-free water (Sigma, W4502). Reverse transcription was performed at 42 °C for 60 min, followed by 5 min at 95 °C to inactivate the reaction. The resulting cDNA was then quantified by TaqMan real-time PCR using primers and probes designed for the genogroups I (MS2) and III (Q $\beta$ ) as previously described by Ogorzaly and Gantzer [16].

## 2.3. Membranes

Four membranes were selected for estimating their virus removal efficiencies in bench-scale experiments: one microfiltration membrane denoted in the following as MF1 and three ultrafiltration membranes (UF1, UF2 and UF3), all of them being hollow fibres assembled in bench-scale modules. The respective characteristics of MF1 and UF1, 2, 3 (mean pore size, MWCO, etc.) and those of the bench-scale modules of filtration are presented in Table 1. It is important to note that no correlation between mean pore size and MWCO could be observed for UF membranes. Mean pore size will be the variable of interest in this paper. It is also important to emphasize that all membranes studied (PVDF,

PES and cellulose based materials) were chemically treated by the membrane manufacturer in order to provide a highly hydrophilic membrane material (the contact angles go from 0° to 40°). Each bench-scale module is tested prior to experiment in order to check its integrity: the membrane is then pressurized (1 bar) in closed loop during 1 min and the loss of pressure is evaluated (data not shown). A bench-scale module is considered intact when no loss of pressure is detected. An evaluation of the permeability of the bench-scale module to phosphates solution (0.2 mM in concentration) was also carried out (Table 1).

## 2.4. Size measurements

Particle size was measured at  $23 \pm 0.1^\circ\text{C}$  using the Zetasizer Nano ZS instrument (He–Ne red laser (633 nm)–Malvern Instruments). Experiments were driven by the Dispersion Technology Software provided by Malvern Instruments. The particle size distribution in the viral suspensions under investigation was determined by size analysis using dynamic light scattering (DLS also known as PCS – photon correlation spectroscopy). The sensitivity of the apparatus requires high viral suspension concentrations (up to  $10^9$  PFU/mL). To reach those, the dialyzed viral suspensions in PBS ( $10^{11}$  PFU/mL) was filtered (0.22  $\mu\text{m}$ ) prior to size measurements and then poured in 600  $\mu\text{L}$  disposable cells (Malvern, UK).

## 2.5. Experimental design of filtration equipment

Bacteriophage removal by the filtration membranes described in Section 2.3 was monitored on a bench-scale apparatus schematically depicted in Fig. 1. 5-L volume of viral suspension (MS2 or Q $\beta$ ) with known initial viral concentrations ( $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$  or  $10^3$  PFU/mL) were prepared in 0.2 mM PBS solution at pH 6.7. The suspensions were subjected to agitation in an inox container connected to the bench-scale apparatus of filtration and submitted to pressure gradient by means of a compressed air-flux. Three bench-scale modules (identical or not) are placed in parallel in the filtration apparatus as illustrated in Fig. 1. Filtrations are carried out under pressure (0.2 bars) in frontal mode, at ambient temperature ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ) and for a variable time depending on the permeability of the tested membranes. Four hundred milliliters of viral suspension were filtered. We verified that this quantity was large enough to reach equilibrium as indicated by time-independent virus removal data (not shown). Samples of viral solutions were taken before (feed solution) and after filtration (permeate), and were subsequently frozen prior to analysis by molecular biology (real-time RT-PCR) and PFU methods. After each filtration experiment, a new test of permeability is carried out in order to verify the integrity of the membranes contained in the filtration module.

Statistic analyses were realized with XLSTAT 2007 software (Addinsoft, France) for comparing the results of filtration obtained

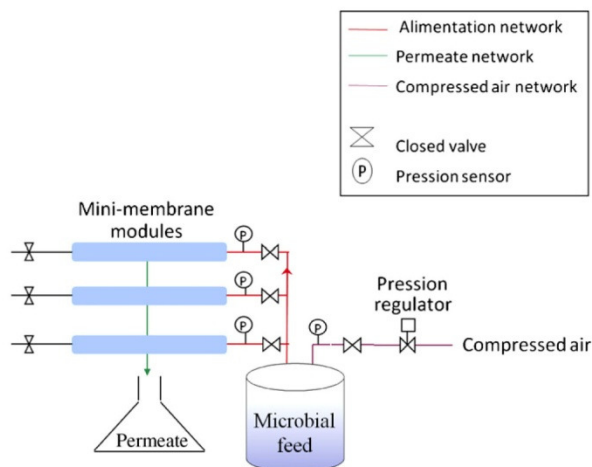


Fig. 1. Schematic representation of the bench-scale filtration apparatus.

with the different phages and different membranes and for the regression analysis.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Size of viral particles

The size of viral particles suspended in PBS solution was determined in  $10^{11}$  PFU/mL viral stock suspensions. In agreement with previous analysis carried out in  $\text{NaNO}_3$  electrolyte solutions [19], diameters of the nearly spherical MS2 and Q $\beta$  phages are found to be  $23 \pm 1$  nm and  $27 \pm 2$  nm in 0.2 mM PBS solution, respectively. These measurements denote the absence of any aggregation of the particles, despite the fairly high viral concentration used ( $10^{11}$  PFU/mL). Working with Q $\beta$  and MS2 phage requires precautions because previous study observed that aggregation can occur for low pH or high ionic strength [19]. Accordingly, working at lower viral concentration levels in 0.2 mM PBS solution – as within the framework of filtration experiments (maximum  $10^6$  PFU/mL) – ensures obtaining MS2 and Q $\beta$  particle removal results which are not biased by the presence of any aggregates. Previous study has reported large removal rates of Q $\beta$  and MS2 phages by microfiltration due to the occurrence of aggregation especially by adding

HCl [6]. These authors also observed a propensity for Q $\beta$  phages to be removed by MF membranes at pH values upper than for MS2 phages. This result may be explained by the recent analysis [19] where the strong and minor impacts of increasing ionic strength at neutral pH on Q $\beta$  and MS2 phages aggregation are detailed, respectively. As such, it highlights the mandatory prerequisite for avoiding particles aggregation – by appropriate medium preparation – to allow comparison of membrane removal rates of different viruses under isolated state, thus preventing from any possible overestimation of the membrane removal capacity due to particle aggregation, as discussed in the introduction. Our results guaranty that 0.2 mM PBS suspensions of MS2 and Q $\beta$  viral particles submitted to filtration experiments satisfy this requirement.

#### 3.2. Real-time RT-PCR as a method to estimate virus removal

For the four selected microfiltration and ultrafiltration membranes and the two phages (MS2 and Q $\beta$ ) of interest here, virus removals were evaluated according to two different methods: PFU method and specific real-time RT-PCR. Fig. 2 shows the relationship between virus removal rates as obtained *via* the aforementioned methods. Fig. 2 collects removal rates determined for the two different phages (MS2 and Q $\beta$ ) initially present in the feed solution at various concentrations ( $10^3$  to  $10^6$  PFU/mL) and the four selected membranes (microfiltration and ultrafiltration). As far as removal rates of MS2 phages are concerned, a linear relationship is satisfactorily obtained – within experimental error – between virus removal rates evaluated by PFU method and that estimated by real-time RT-PCR method. Although the number of Q $\beta$  filtration experiments is lower ( $n=9$ ) than the one for MS2, similar conclusion is reached for Q $\beta$  removal. More in details, the statistical trends of the data reported in Fig. 2 clearly indicate that phage removal rates obtained with PFU method are  $1 \log_{10}$  higher than those determined with real-time RT-PCR procedure. Two hypotheses may be given to explain this observation:

- Aggregation during the filtration step may decrease PFU counts. During filtration viral particle may be forced to go through the pores of the membrane *via e.g.* hydrodynamic convergent fluxes close to the pore. This allows viral particles to go close to each other despite of the repulsive inter particular electrostatic interactions and low viral concentrations in the bulk medium. This may enhance the probability of virus encounter and thereby provoke aggregation during the time course of filtration even if no aggregation is detected in the feed solution.

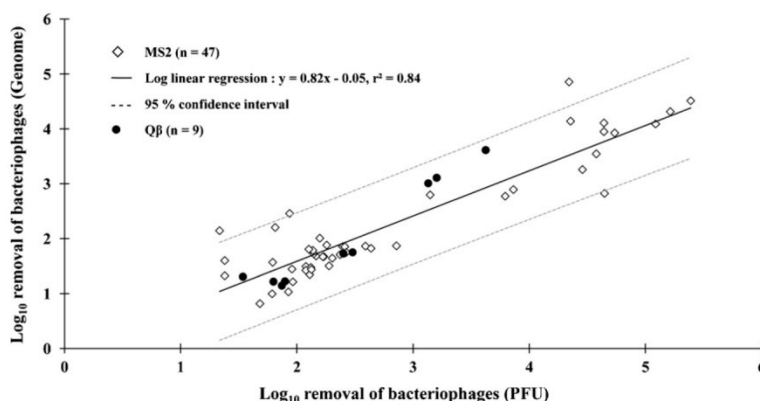


Fig. 2. MS2 (◇) and Q $\beta$  (●) phage removal rates by bench-scale membrane filtration in 0.2 mM PBS solution at neutral pH with microfiltration and ultrafiltration membranes. Phage removal rates obtained by PFU method (x-axis) and real-time RT-PCR method (y-axis) are expressed in  $\log_{10}$ .

**Table 2**

Virus removal rates of MS2 and Q $\beta$  phages obtained by microfiltration (MF1) and ultrafiltration membranes (UF1, 2, 3). Permeates were analyzed by means of real-time RT-PCR. Permeate is considered as positive when genome is detected.

| Membranes | Mean pore size ( $\mu\text{m}$ ) | MS2                |                                    | Q $\beta$          |                                    |
|-----------|----------------------------------|--------------------|------------------------------------|--------------------|------------------------------------|
|           |                                  | Positive permeates | Virus removal rate ( $\log_{10}$ ) | Positive permeates | Virus removal rate ( $\log_{10}$ ) |
| MF1       | 0.1                              | 100% ( $n=3$ )     | $1.79 \pm 0.09$                    | 100% ( $n=3$ )     | $1.25 \pm 0.05$                    |
| UF2       | 0.05                             | 100% ( $n=3$ )     | $3.54 \pm 0.56$                    | 100% ( $n=3$ )     | $1.54 \pm 0.32$                    |
| UF3       | 0.025                            | 33% ( $n=3$ )      | $>4.89$                            | 100% ( $n=3$ )     | $3.25 \pm 0.32$                    |
| UF1       | 0.01                             | 0% ( $n=3$ )       | $>6$                               | 0% ( $n=3$ )       | $>6$                               |

- Non-infectious particles are eliminated less efficiently than the infectious ones.

To the best of our knowledge, no actual technology is available for verifying the validity of these hypotheses. Regardless the origin of these discrepancies, this being beyond the scope of the current analysis, Fig. 2 illustrates that both approaches are relevant for quantifying removal rates of viruses by different filtration membranes. Real-time RT-PCR is faster and allows analysing a higher number of samples within a given time delay. It further allows an investigation of the filtration efficiency of membranes with respect to mixture of both phages essentially because the underlying measuring method is designed to specifically detect the desired organism [16]. Such investigation is not possible with PFU method. Under the conditions of interest here, real-time RT-PCR method is clearly feasible and advantageous for estimating virus removal by membrane filtration. To go further and validate this method for larger scales filtration experiments, it is anticipated that precautions should be taken, especially in the standardisation of the viral stock preparation, in order to have a constant ratio between concentrations of infectious and non-infectious particles.

### 3.3. Virus removals by MF and UF membranes

Taking into consideration the previous results, real-time RT-PCR method seems as effective as PFU method for determining and thus comparing MS2 and Q $\beta$  phage removal rates by micro- and ultrafiltration membranes. For this reason, only real-time RT-PCR results will be commented in the following.

Estimation of the efficiency of the four selected membranes to eliminate MS2 and Q $\beta$  phages was carried out. For the bench scale study, membranes with different physico-chemical characteristics and mean pore sizes were selected. All of these membranes are electronegative at neutral pH and hydrophilic. Table 2 gathers the results obtained with the different selected membranes and the two phages MS2 and Q $\beta$ . The microfiltration membrane (MF1) has mean pore size four times larger than the diameter of the phage. In this case, adhesion process should play a predominant role in virus elimination. Three ultrafiltration membranes with different mean pore size (provided by the membrane supplier) were also used in our study. The first one (UF1) corresponds to a mean pore size of around 10 nm, *i.e.* lower than the size of phages, thus favouring physical retention as the main process for particle elimination. Two other membranes (UF2 and UF3) of identical composition (PES) were investigated: one (UF3) with a mean pore size equal to the typical diameter of the phages of interest (25 nm) and another (UF2) which corresponds to a mean pore size twice larger than the size of the virus. Based on the data of Table 2, MS2 phage removal increase significantly (Student *t*-test,  $p < 0.05$ ) when mean pore size decreases (from 1.8 PCR  $\log_{10}$  with MF1 to  $>6$  PCR  $\log_{10}$  with UF1 for MS2 phages), as intuitively expected. Similarly, a significant increase of Q $\beta$  phages removal is observed for decreasing mean pore size (from 1.25 PCR  $\log_{10}$  with MF1 to  $>6$  PCR  $\log_{10}$  with UF1).

The results commented above and obtained with the microfiltration membranes are in agreement with those reported in the

literature. According to Jacangelo et al. [5], MS2 removal by microfiltration range from 0.5 to 1  $\log_{10}$ . Other authors [20,21] have reported large removal rates of F-specific phages (up to 3.8  $\log_{10}$ ). However, in these studies, microfiltration is used to remove phages present in secondary wastewater treatment effluent and influent. Phages retention could be thus significantly favoured by the presence of organic components and/or membrane fouling. On the other hand, no MS2 removal by hydrophilic 0.22  $\mu\text{m}$  membrane was detected [18] with viruses suspended in a representative Norwegian raw water source.

Results obtained with ultrafiltration membranes lead to the following comments: as Jacangelo et al. [5] pointed out, MS2 removal rates strongly depend on the membrane characteristics in particular the mean pore size and building component (1.5 to more than 7  $\log_{10}$ ). Madaeni et al. [22] have also reported important removal rates in ultrafiltration, *e.g.* more than 4  $\log_{10}$  for the poliovirus. As expected, there is a significant difference between removal rates obtained with MF1 membrane and the one obtained with all ultrafiltration membranes (Student *t*-test,  $p < 0.05$ ) except for Q $\beta$  removal with MF1 and UF2 (Student *t*-test,  $p > 0.05$ ). Among the four membranes, UF1 is the most efficient in view of the large removal rates obtained with this membrane.

With regard to the comparison of the removal rates of MS2 and Q $\beta$  bacteriophages in controlled conditions, it is noted that Q $\beta$  phages are systematically eliminated to a lesser extent than MS2 phages (Student *t*-test,  $p < 0.05$ ) in bench-scale experiments, whatever the detection method and membranes used. Moreover, the percentage of positive permeates, *i.e.* permeates where genome is detected (see Table 2) for the membrane UF2 of mean pore size equal to the diameter of phages—differs for MS2 and Q $\beta$  phages. Thirty-three percent of permeates are positive for MS2 phages whereas 100% of permeates are positive for Q $\beta$  phages. This suggests that Q $\beta$  phage constitutes a “worse-case” scenario than MS2 for microorganisms elimination. These results are consistent with the expectations of a significant contribution of the inner nucleic acids (bound to the proteic capsid as demonstrated for MS2 in Ref. [3]) to the overall negative charge of the particles. Indeed, Q $\beta$  phage presents a longer genome than MS2 phage (4160 *versus* 3569 nucleotides, respectively) that may lead to a larger effective repulsion for the particle–particle or particle–membrane interactions as both are negatively charged. However, this study points out the intricate relationships between membrane virus removal efficiency and interfacial properties of such multi-layered soft particles. Therefore, to fully understand the mechanisms involved in membrane filtration of virus, systematic and extensive studies of virus presenting different interfacial properties need to be performed in combination with the advanced experimental and theoretical analyses as recently done in Ref. [3].

## 4. Conclusions

The results reported in this study show that knowledge of the membrane characteristics and interfacial properties of viral particles is important for interpreting virus removal rate obtained by

membrane filtration. Comparison of removal rates by membrane filtration for two different viral particles in terms of physico-chemical properties (MS2 and Q $\beta$ ) shows the importance of electrostatic interactions in adhesion of these viruses onto conventional hydrophilic and negatively charged membranes used in water treatment. In medium where viral aggregation is absent or insignificant, removal rate of Q $\beta$  phages is always lower than MS2 phages regardless the nature of the membrane. Therefore according to these results, we suggest that Q $\beta$  phage is a better candidate than MS2 phage for characterizing membrane virus removal rate in worst-case conditions.

This work also shows the feasibility of real-time RT-PCR method to quantify virus removal by membrane filtration. Although this counting method is demonstrated to be particularly powerful within the framework of the experimental conditions investigated here, it should undoubtedly be validated for large scale experimentation and in particular, special care should be devoted to standardize the stock solution that contains the viruses to be eliminated.

### Nomenclature

|       |                                     |
|-------|-------------------------------------|
| AMV   | Avian myeloblastosis virus          |
| cDNA  | complementary deoxyribonucleic acid |
| dNTPs | deoxyribonucleotide triphosphate    |
| MF    | microfiltration                     |
| MWCO  | molecular weight cut-off (kDa)      |
| pI    | isoelectric point                   |
| PBS   | phosphate buffer saline             |
| PCR   | polymerase chain reaction           |
| PES   | polyethersulfone                    |
| PFU   | plaque forming unit                 |
| PVDF  | polyvinylidene fluoride             |
| RNA   | ribonucleic acid                    |
| RT    | retro transcription                 |
| UF    | ultrafiltration                     |

### References

- [1] R. van Reis, A.L. Zydney, Bioprocess membrane technology, *J. Membr. Sci.* 297 (2007) 16–50.
- [2] E. Rotureau, F. Thomas, J.F.L. Duval, Relationship between swelling and electrohydrodynamic properties of functionalized carboxymethyl dextran macromolecules, *Langmuir* 23 (2007) 8460–8473.
- [3] J. Langlet, F. Gaboriaud, C. Gantzer, J.F.L. Duval, Impact of chemical and structural anisotropy on the electrophoretic mobility of spherical soft-multilayer particles: the case of bacteriophage MS2, *Biophys. J.* 94 (2008) 3293–3312.
- [4] J.G. Jacangelo, R. Rhodes Trussell, M. Watson, Role of membrane technology in drinking water treatment in the United States, *Desalination* 113 (1997) 119–127.
- [5] J.G. Jacangelo, S.S. Adham, J.M. Laine, Mechanism of cryptosporidium, giardia, and MS2 virus removal by MF and UF, *J. Am. Water Work Assoc.* (1995) 107–121.
- [6] G. Herath, K. Yamamoto, T. Urase, Removal of viruses by microfiltration membranes at different solution environments, *Water Sci. Technol.* 40 (1999) 331–338.
- [7] J.Y. Hu, S.L. Ong, L.F. Song, Y.Y. Feng, W.T. Liu, T.W. Tan, L.Y. Lee, W.J. Ng, Removal of MS2 bacteriophage using membrane technologies, *Water Sci. Technol.* 47 (2003) 163–168.
- [8] J.F. Schijven, M. Hassanizadeh, Removal of viruses by soil passage: overview of modeling, processes, and parameters, *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 30 (2000) 49–127.
- [9] E.M. van Voorthuizen, N.J. Ashbolt, A.I. Schafer, Role of hydrophobic and electrostatic interactions for initial enteric virus retention by MF membranes, *J. Membr. Sci.* 194 (2001) 69–79.
- [10] S.L. Penrod, T.M. Olson, S.B. Grant, Whole particle microelectrophoresis for small viruses, *J. Colloid Interface Sci.* 173 (1995) 521–523.
- [11] L.R. Overby, G.H. Barlow, R.H. Doi, M. Jacob, S. Spiegelman, Comparison of two serologically distinct ribonucleic acid bacteriophages. I. Properties of the viral particles, *J. Bacteriol.* 91 (1966) 442–448.
- [12] K.S. Zarda, C.P. Gerba, Agarose isoelectrofocusing of intact virions, *J. Virol. Methods* 9 (1984) 1–6.
- [13] P.A. Shields, S.R. Farrah, Determination of the electrostatic and hydrophobic character of enteroviruses and bacteriophages, in: *Proceedings of the 87th Annual Meeting on American Society of Microbiology*, Washington, 1987.
- [14] International Organisation for Standardisation, Water quality: detection and enumeration of bacteriophages. Part 1. Enumeration of F-specific RNA bacteriophages, (1995) ISO 10705-1.
- [15] J. Langlet, F. Gaboriaud, C. Gantzer, Effects of pH on plaque forming unit counts and aggregation of MS2 bacteriophage, *J. Appl. Microbiol.* 103 (2007) 1632–1638.
- [16] L. Ogorzal, C. Gantzer, Development of real-time RT-PCR methods for specific detection of F-specific RNA bacteriophage genogroups: application to urban raw wastewater, *J. Virol. Methods* 138 (2006) 131–139.
- [17] B. Gassilloud, L. Schwartzbrod, C. Gantzer, Presence of viral genomes in mineral water: a sufficient condition to assume infectious risk? *Appl. Environ. Microbiol.* 69 (2003) 3965–3969.
- [18] L. Fiksdal, T.O. Leiknes, The effect of coagulation with MF/UF membrane filtration for the removal of virus in drinking water, *J. Membr. Sci.* 279 (2006) 364–371.
- [19] J. Langlet, F. Gaboriaud, J.F.L. Duval, C. Gantzer, Aggregation and surface properties of F-specific RNA phages: implication for membrane filtration processes, *Water Res.* 42 (2008) 2769–2777.
- [20] K. Farahbakhsh, D.W. Smith, Removal of coliphages in secondary effluent by microfiltration—mechanisms of removal and impact of operating parameters, *Water Res.* 38 (2004) 585–592.
- [21] L. Moce-Llivina, J. Jofre, M. Muniesa, Comparison of polyvinylidene fluoride and polyether sulfone membranes in filtering viral suspensions, *J. Virol. Methods* 109 (2003) 99–101.
- [22] S.S. Madaeni, A.G. Fane, G.S. Grohmann, Virus removal from water and wastewater using membranes, *J. Membr. Sci.* 102 (1995) 65–75.





## Liste des publications

---

- 1- **Ogorzaly L.**, Gantzer C.  
Development of real-time RT-PCR methods for specific detection of F-specific RNA bacteriophage genogroups: Application to urban raw wastewater. *Journal of Virological Methods* (2006), 138: 131-139.  
Impact factor (2006): 1,933.
- 2- Langlet J\*, **Ogorzaly L\***, Schrotter J.C., Machinal C., Gaboriaud F., Duval J.F.L., Gantzer C.  
Efficiency of MS2 phage and Q $\beta$  phage removal by membrane filtration in water treatment: applicability of real-time RT-PCR method. *Journal of Membrane Science* (2009), 326: 111-116.  
\*Contribution identique des auteurs, Impact factor (2007): 2,43.
- 3- **Ogorzaly L.**, Tissier A., Bertrand I., Maul A., Gantzer C.  
Relationship between F-specific RNA phage genogroups, faecal pollution indicators and human adenoviruses in river water. *Water Research* (2009), 43: 1257-1264.  
Impact factor (2007): 3,43.
- 4- Skraber S., **Ogorzaly L.**, Helmi K., Maul A., Hoffmann L., Cauchie H. M., Gantzer C.  
Occurrence and persistence of enteroviruses, noroviruses and F-specific RNA phages in wastewater biofilms. *Soumise à Water Research*.

## Liste des communications

---

### Communications orales internationales :

- 5- **Ogorzaly L.**, Tissier A., Bertrand I., Diez L., Gantzer C.  
F-specific RNA phage genotyping in river water by real-time RT-PCR.  
6<sup>th</sup> IWA World Water Congress, *Water and Health*, Vienne (Autriche), 2008.
- 6- Langlet J., **Ogorzaly L.**, Schrotter J.C., Machinal C., Gantzer C.  
Elimination of MS2 and Q $\beta$  bacteriophages by membrane filtration under conditions which favor individual particles and surface charge expression.  
14<sup>th</sup> International Symposium on Health-Related Water Microbiology, Tokyo (Japon), 2007.
- 7- **Ogorzaly L.**, Gantzer C.  
F-specific RNA bacteriophages genotyping in wastewater and river water.  
10<sup>th</sup> Saar-Lor-Lux Workshop on virus research, Nancy (France) 2006.

### Communications orales nationales :

- 8- **Ogorzaly L.**, Gantzer C.  
Intérêt du génotypage des bactériophages ARN F-spécifiques au niveau de la Meurthe.  
Séminaire annuel de la Zone Atelier Moselle (ZAM), Champenoux (France) 2008.
- 9- **Ogorzaly L.**, Gantzer C.  
Génotypage des bactériophages ARN F-spécifiques dans les eaux usées et dans l'eau de rivière.  
Journée Scientifiques LCPME, Nancy (France) 2006.

### Communications affichées :

- 10- Bertrand I., **Ogorzaly L.**, Schwartbrod J., Gantzer C.  
Génotypages des phages ARN F-spécifiques et de *Giardia lamblia* dans les eaux : intérêt pour la discrimination de l'origine de la pollution fécale. LCPME, Nancy (France) 2007.
- 11- **Ogorzaly L.**, Gantzer C.  
Intérêt du génotypage des bactériophages ARN F-spécifiques pour l'estimation de la pollution fécale et virale des eaux. Doctoriales de Lorraine, La Bresse (France) 2006.
- 12- Langlet J., **Ogorzaly L.**, Gantzer C.  
Aggregation of F-specific RNA bacteriophages in aqueous media.  
13<sup>th</sup> International Symposium on Health-Related Water Microbiology, Swansea (Pays de Galle) 2005.







## Résumé

Les bactériophages ARN F-spécifiques sont des virus qui infectent *Escherichia coli* et possèdent une structure et une taille comparables à celles des principaux virus entériques pathogènes. Ils sont proposés comme indicateurs de pollution fécale du milieu hydrique, comme modèles du comportement des virus pathogènes dans l'environnement et comme outil de discrimination de l'origine de la pollution fécale. En effet, dans les eaux usées, il a été rapporté que les génogroupes II et III avaient principalement une origine humaine alors que les génogroupes I et IV avaient, quant à eux, plutôt une origine animale. Paradoxalement, peu de données existent quant à la répartition des différents génogroupes dans les eaux naturelles.

L'objectif de ce travail a, par conséquent, été de préciser les relations existantes entre les différents génogroupes des phages ARN F-spécifiques et la pollution fécale et virale des eaux naturelles.

Tout d'abord, nous avons développé les premiers systèmes de RT-PCR en temps réel capables d'identifier les quatre génogroupes dans les eaux environnementales. La sensibilité, la spécificité et la rapidité de détection constituent les avantages majeurs de cette approche. Par rapport aux outils existants, cette méthode permet de s'affranchir de l'étape de culture et donc de minimiser les problèmes engendrés par des taux d'inactivation importants des particules virales infectieuses, en réponse aux stress environnementaux. En effet, les études de persistance, réalisées aussi bien dans l'eau usée que dans l'eau souterraine, démontrent que, selon les conditions expérimentales, le génome phagique est de 3 à 20 fois plus résistant que les phages infectieux.

Dans un second temps, l'analyse d'échantillons d'eaux usées urbaines nous a permis de vérifier que, malgré le changement de référentiel de mesure (génome *versus* particule infectieuse) inhérent à notre méthode de détection, les bactériophages ARN F-spécifiques pouvaient donner des informations intéressantes quant à la caractérisation de la pollution fécale. Dans ce type de milieu, les génogroupes II et III sont majoritairement retrouvés à des concentrations relativement stables au cours du temps. De manière ponctuelle, la présence du génogroupe I a pu, à la fois, être mise en relation avec les précipitations et avec la présence de pathogènes à caractère zoonotique (*Cryptosporidium* et *Giardia*), suggérant un apport de pollution animale par des phénomènes de ruissellement. Ceci a conforté l'idée que le génotypage pourrait constituer un outil intéressant de discrimination de l'origine de la pollution fécale. En revanche, la comparaison des résultats de génotypage aux concentrations en virus pathogènes montre que ces phages ne sont pas adaptés à la prédiction de la présence de norovirus et d'entérovirus, en raison d'un caractère saisonnier de ces derniers.

Les deux études de cas consacrées aux eaux naturelles constituent l'étape majeure de notre étude. Dans un contexte de pollution principalement anthropique, il est démontré qu'au niveau de l'eau de rivière, le génogroupe II est très majoritairement observé. Les variations de concentration de ce génogroupe ont pu être corrélées positivement avec les indicateurs bactériens (*E. coli*, entérocoques) et avec les adénovirus humains attestant de son origine fécale humaine. Le génogroupe I est également très souvent représenté mais avec de plus amples variations de concentration. Ce génogroupe n'a été corrélé ni aux indicateurs bactériens, ni au génogroupe II, ni aux adénovirus humains, étayant l'hypothèse d'une autre origine de ce génogroupe. La corrélation positive avec les valeurs de turbidité de l'eau laisse supposer un apport de ces phages suite à des événements de ruissellement. Ainsi, dans l'eau de rivière, les génogroupes I et II semblent apporter des informations intéressantes quant à l'origine de la pollution fécale. Dans ce cadre, nous proposons l'utilisation d'un ratio de concentrations des génogroupes I et II pour caractériser la pollution fécale. A titre d'exemple, pour une concentration en *E. coli* de 3,6 log<sub>10</sub> NPP/100mL, la valeur du log<sub>10</sub> (GGII/GGI) peut être aussi bien de 3,8 que de -1,7. Avec la turbidité de l'eau, ce ratio a été le seul paramètre permettant de distinguer une modification dans la nature de la pollution fécale. Le génome des phages ARN F-spécifiques n'a pas été mis en évidence dans les prélèvements d'eaux souterraines protégées de la pollution fécale. Par contre, du génome d'adénovirus humains a été identifié dans 7 échantillons sur 60. Ainsi, des marqueurs plus persistants que le génome des phages ARN F-spécifiques peuvent être détectés. Au cours de l'étude de persistance menée dans ce milieu, aucune dégradation de l'ADN n'a été observée sur les 200 jours de l'expérience, supportant l'idée que l'ADN est un marqueur de pollution fécale extrêmement conservateur.

Finalement, les méthodes nouvellement développées au cours de cette thèse ont abouti à une meilleure connaissance de la distribution des différents génogroupes au sein des eaux naturelles. Le génotypage des phages ARN F-spécifiques apporte des informations originales par rapport aux indicateurs bactériens, mais ne constitue pas, à lui seul, l'indicateur universel de pollution fécale ou virale des eaux.