

# Intéraction de bactériophages avec des surfaces colonisées par des biofilms d'eau potable et évaluation de protocoles de nettoyage

Sandra Pelleïeux

▶ **To cite this version:**

Sandra Pelleïeux. Intéraction de bactériophages avec des surfaces colonisées par des biofilms d'eau potable et évaluation de protocoles de nettoyage. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université de Lorraine, 2013. Français. NNT : 2013LORR0082 . tel-01749845

**HAL Id: tel-01749845**
**https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01749845**

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

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.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

UNIVERSITÉ DE LORRAINE

## Ecole Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)

## Thèse

**Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de**

**DOCTEUR DE l'UNIVERSITE DE LORRAINE**

**Mention : « Sciences de la Vie et de la Santé »**

par **Sandra PELLEÏEUX**

# Interaction de bactériophages avec des surfaces colonisées par des biofilms d'eau potable et évaluation de protocoles de nettoyage

Le 18 juin 2013

**MEMBRES DU JURY**

**Rapporteurs**

| | |
|---|---|
| **Dr R. Briandet** | Directeur de recherche à l'INRA-AgroTech UMR 1319, MICALIS, Massy |
| **Pr O. Traoré** | Laboratoire Microorganismes : Génome et Environnement UMR 6023 CNRS Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand |

**Examinateurs**

| | |
|---|---|
| **Pr P. Pothier** | Centre National de Référence des virus entériques, CHU - Université de Bourgogne, Dijon |
| **Dr L. Mathieu** | EPHE-LCPME UMR 7564 CNRS Université de Lorraine, Nancy |
| **Pr A.L. Carducci** | Laboratory of Hygiene and Environmental Virology Université de Pise, Italie |
| **Pr C. Gantzer** | LCPME, UMR 7564 CNRS Université de Lorraine, Nancy<br>Directeur de thèse |
| **Dr I. Bertrand** | LCPME, UMR 7564 CNRS Université de Lorraine, Nancy<br>Co-directeur de thèse |

LCPME, UMR 7564 CNRS-Université de Lorraine, Nancy
Equipe Microbiologie Environnementale

*A mes parents.*

# *Remerciements*

*Ces quelques lignes de remerciements introduisent ce manuscrit et signent pour moi la fin de ma thèse. Ainsi s'achèvent mes longues études, non pas sans une pointe de nostalgie.*

*Pour la seconde fois, je vais donc satisfaire au traditionnel mais difficile exercice des remerciements. Je souhaiterais d'une façon générale adresser mes remerciements les plus sincères à toutes les personnes qui m'ont apporté leur aide et qui ont contribué à l'élaboration de ce travail. Tout d'abord, les résultats de la partie expérimentale ont été obtenus dans le cadre du programme de recherche Biofilm VIII, coordonné par l'Université de Lorraine (Nancy, France) et financé par Véolia Environnement Recherche et Innovation (VERI), Veolia Eau, le Syndicat des Eaux d'Ile de France (SEDIF) et l'Agence de l'Eau Seine Normandie (AESN). Je remercie vivement tous les représentants de ces entreprises pour leurs déplacements semestriels, pour m'avoir accordé leur attention et aiguillée dans mes recherches afin d'accomplir un travail le plus appliqué possible.*

*Mes remerciements vont également aux membres du jury qui m'ont fait l'honneur de bien vouloir accepter cette tâche.*

*C'est avec beaucoup d'émotion que je tiens à présenter ma profonde gratitude au professeur* ***Christophe Gantzer****, mon directeur de thèse qui m'a apporté son soutien ces cinq dernières années, tant sur le plan scientifique que humain. Ce fut un réel plaisir de travailler à tes cotés, merci de m'avoir accueillie au sein de ton équipe, accordé du temps et de m'avoir transmis le « virus » de la recherche. Tu as su me laisser la liberté nécessaire à l'accomplissement de mes travaux, tout en y gardant un œil critique et avisé. Trouve dans ces quelques lignes l'expression de ma profonde reconnaissance.*

*A* ***Isabelle Bertrand,*** *qui m'a fait l'honneur de co-diriger ce travail. Merci de m'avoir accompagnée dans cette aventure, ta disponibilité, ta patience, tes encouragements et tes corrections y sont pour beaucoup dans la qualité de ce travail. Je suis fière d'avoir été ta première thésarde. Trouve dans ces quelques lignes le témoignage de mon profond respect et de ma reconnaissance.*

*A mes rapporteurs, Monsieur* ***Ousmane Traoré*** *et Monsieur* ***Romain Briandet*** *qui ont accepté cette tâche toujours quelque peu contraignante. Je suis sensible à cet honneur et leur adresse mes respectueux remerciements pour l'intérêt porté à ce travail.*

*Je remercie également Monsieur* ***Pierre Pothier*** *et Madame* ***Annalaura Carducci*** *pour avoir accepté de juger ce travail. Je tiens à vous exprimer ma respectueuse considération et ma sincère gratitude. Un merci particulier à Madame* ***Laurence Mathieu*** *qui me fait également l'honneur de juger ce travail. Merci pour cette agréable collaboration que nous avons eu l'occasion de partager dans le cadre du projet Biofilm VIII, j'ai eu grand plaisir à travailler avec toi. Veuillez tous croire en ma profonde reconnaissance.*

*A monsieur* ***Jean-Claude Block****, qui malgré ses nombreuses occupations a toujours trouvé du temps pour me conseiller et m'aider lors des travaux ainsi que lors de la rédaction des publications scientifiques. Si je sors grandie de cette expérience c'est en partie grâce à toi, sois assuré de ma profonde reconnaissance.*

*Je voudrais également adresser mes sincères remerciements à Monsieur* ***Sylvain Fass*** *avec qui j'ai eu un grand plaisir à collaborer ainsi qu'à Monsieur* ***Grégory Francius*** *pour m'avoir initiée à la Microscopie à Force Atomique. Un merci particulier à Monsieur* ***Salah Skali-Lami*** *pour le temps qu'il m'a accordé et pour m'avoir initiée à la mécanique des fluides. Grâce à toi, je me surprends parfois à répondre à des questions par des équations…Enfin à Monsieur* ***Jean-Yves Morel*** *pour avoir participé à l'élaboration des réacteurs.*

*A Monsieur **Alain Walcarius** directeur du LCPME ainsi qu'à toute l'équipe, site pôle de l'eau et Villers pour leur chaleureux accueil.*

*Je souhaite également témoigner ma reconnaissance à l'ensemble des personnes de l''équipe "microbiologie environnementale" pour l'agréable collaboration que j'ai eu le plaisir de partager tout au long de ces années au laboratoire. Parmi elles, Sandrine L et son confortable fauteuil du secrétariat, nos petites discussions me manquent déjà. David, pour sa disponibilité et son aide technique lors de la préparation des expérimentations, Erell, pour nos échanges musicaux et ses précieux conseils. Mais également Sandrine B, Aurélie, Edith, Hélène, Christophe M, Marjorie… Merci pour votre accueil, pour tous les services rendus et pour votre bonne humeur qui ont apporté une ambiance de travail chaleureuse et conviviale. Aux stagiaires, Chloé, Sandra, Nicolas et Carole que j'ai eu le plaisir d'encadrer et qui m'ont accompagnée dans la contribution de ce travail. Je vous souhaite à tous un parcours à la hauteur de vos espérances. Un merci particulier à Joël, plombier de la faculté de Pharmacie, pour ta réactivité et ta disponibilité à chaque souci avec l'un de mes réacteurs, mais également à Jean-Paul Moulin pour son aide technique précieuse et les moments partagés.*

*Un merci particulier à Christelle, avec qui j'ai eu le plaisir de travailler depuis le master 2. Ta compagnie a été un petit rayon de soleil pour moi dans les moments les plus critiques. Sois assurée de ma profonde et sincère amitié. A Aline, à la fois une précieuse collègue, un petit chef de cuisine, une redoutable joueuse de poker, une amie hors pair et une copine de fiesta. Merci pour tes encouragements et ton soutien indéfectible tant sur le plan professionnel que personnel. Aux autres membres du laboratoire que j'ai eu le plaisir de côtoyer en dehors du contexte du travail et notamment à Sébastien mon "cyber-mari" depuis bientôt quatre années maintenant, mais également à Pépé et Asfa qui sont toujours de bonne compagnie.*

*Alors que cette thèse s'achève, j'aborde une nouvelle aventure professionnelle avec un poste d'AHU. Je tiens à remercier très chaleureusement le professeur **Jean-Luc Olivier** pour m'avoir offert l'opportunité de travailler à ses cotés au sein de l'équipe de Biochimie Spécialisée au CHU ainsi qu'au sein de l'équipe BFLA, je lui en suis infiniment reconnaissante. Je voudrais également remercier Madame **Frances Yen-Potin** pour m'avoir chaleureusement accueillie au sein de son laboratoire, ainsi que mes nouveaux collègues Mélanie, Julie, Annabelle, Anthony, Laurent, Hamad, Hélène, Benoit… Vous m'avez offert un précieux soutien dès mon arrivée et j'ai grand plaisir à travailler avec vous.*

*J'ai la chance d'être fabuleusement bien entourée et à travers ces quelques lignes je souhaite remercier tous mes amis qui ont contribué chacun à leur façon à l'accomplissement de ce travail. A mon frère Stéphan, à présent que mes études sont finies j'espère avoir un peu plus de temps à partager avec toi. Tu n'es pas physiquement là, mais je sais que tes pensées et tes encouragements m'accompagnent en ce jour. Aux intemporels Seb, Sévy, Jean-Louis, Fannou, Docteur Muhamet, Doudou, Chtoko, Micka, Laurette, Stephanie, Sylvain, Yoan… nos retrouvailles sont toujours une bouffée d'oxygène ! A l'éternelle Pharmily, il me tarde nos prochaines retrouvailles ! Aux « Nancéens » qui sont récemment entrés dans ma vie et m'ont fait découvrir les joies d'habiter dans cette jolie ville, Nico, Lorrine, Bertrou, Bamdad, Horacio, Jack, Aurore, Pierre, Ozo, Loïc… Milles excuses à ceux que je n'ai pas cités, la place manque sur cette page mais pas dans mon cœur.*

*Enfin, à mes parents, qui me font l'honneur d'être tous les deux présents. Aujourd'hui peut-être comprendrez-vous ce que j'ai fait ces dernières années dans « le nord ». Je suis à présent à présent engagée dans une nouvelle aventure, mais nous en parlerons lors de ma prochaine thèse… Merci pour toutes les valeurs que vous m'avez transmises, de m'avoir donné les moyens de faire ces longues études et pour être toujours là quand j'ai besoin de vous. Sans votre soutien rien n'aurait été possible. Soyez assurés de ma reconnaissance et de mon amour. Ce travail vous est légitimement dédié, j'espère que vous en serez fiers.*

# *Liste des abréviations*

**ADN** : Acide désoxyribonucléique

**ADNc** : ADN complémentaire

**AFM** : Atomic Force Microscopy

**ARN** : Acide ribonucléique

**CE** : Communauté Européenne

**CFM** : Chemical Force Microscopy

**C.t** : Concentration (mg/L) x temps de contact (min)

$\mathbf{C_t}$ : Cycle threshold

**CUGN** : Communauté Urbaine du Grand Nancy

**Da** : Dalton

**db** : Double brin

**DSL :** Diffusion Light Scattering

**DI50** : Dose Médiane Infectieuse

**E** : Efficacité ou rendement de PCR

**FCV** : calicivirus félin

**FRET** : Fluorescence Resonance Energy Transfert

**GG** : Génogroupe

**InVS** : Institut de Veille Sanitaire

**Kp** : Kilo paire de base

**$\log_{10}$ éq.UFP** : logarithme des équivalents UFP

**MNV** : norovirus murin

**$NaNO_3$**: Nitrate de sodium

**NPPUC** : nombre le plus probable d'unités cytopathiques

**NTR** : non-translated terminal region

**OMS** : Organisation Mondiale pour la Santé

**pb** : paire de bases

**PBS** : Phosphate Buffered Saline

**PCR** : Polymerase Chain Reaction

**PEHD:** Polyéthylène haute densité

**p*I*** : Point Isoélectrique

**PV** : poliovirus

**PVC** : Chlorure de Polyvinyle

**qPCR** : Quantitative PCR

**RMS** : Root-mean square

**rpm** : rotations par minute

**RT :** Reverse Transcription

**sb** : simple brin

**TYGA** : Tryptone Yeast Glucose Agar

**TYGB** : Tryptone Yeast Glucose Broth

**UFC** : Unité Formant Colonie

**UFP** : Unité Formant Plage

**UTR** : untranslated terminal region

**VHA** : virus de l'hépatite A

**VHE** : virus de l'hépatite E

**WHO** : World Health Organisation

**VLP** : Virus Like Particles

**μ** : Mobilité électrophorétique

*Sommaire*


**Introduction –Objectifs de l'étude……..1**

**Etude Bibliographique……..4**

**I.Le danger microbiologique en réseau de distribution d'eau..... 4**
1.Les origines possibles de la contamination fécale des systèmes de distribution d'eau ..... 5
1.1.Contamination de la ressource en eau ..... 5
1.2.Contamination microbiologique consécutive à une défaillance lors du traitement de potabilisation…….7
1.3.Contamination résultant d'un accident sur le réseau de distribution d'eau ..... 9
2.Exemples d'épidémies virales liées à la consommation d'eau contaminée..... 9
2.1.Epidémies virales liées à la consommation d'eau de distribution en France ..... 10
2.2.Epidémies virales liées à la consommation d'eau de distribution dans d'autres pays développés……..11

**II.Les virus entériques retrouvés en milieu hydrique..... 12**
1.Les virus entériques pathogènes pour l'homme ..... 12
1.1.Généralités sur les virus entériques pathogènes ..... 12
1.2.Les virus entériques les plus fréquemment responsables d'épidémies d'origine hydrique dans les pays développés ..... 14
1.2.1.Les entérovirus ..... 14
1.2.2.Les virus des gastroentérites..... 17
1.2.3.Les virus des hépatites..... 18
2.Les bactériophages fécaux..... 20
2.1.Taxonomie..... 20
2.2.Les phages en tant qu'indicateurs alternatifs de pollution fécale d'origine virale et modèles d'étude des virus entériques pathogènes. ..... 21

**III.Les bactériophages ARN F-spécifiques..... 24**
1.Structure des phages ARN F-spécifiques..... 24
1.1.Le génome des phages ARN F-spécifiques ..... 25
1.2. La capside……..……..26
2.Propriétés de surface des phages ARN F-spécifiques ..... 27
2.1.La charge globale de surface ..... 27
2.1.1.Notion d'interface virale ..... 27
2.1.2.Détermination de la charge de l'interface virale..... 27
2.2.La balance hydrophile/hydrophobe……..…30

**IV.Etude de l'adsorption virale sur les biofilms ..... 32**
1.La notion de biofilm dans les réseaux de distribution d'eau..... 32
1.1.Les étapes de formation d'un biofilm ..... 33
1.2.Organisation des biofilms d'eau potable ..... 35
1.2.1.Les bactéries composant le biofilm ..... 35
1.2.2.Autres microorganismes composant le biofilm ..... 36
1.2.3.Propriétés de surface des biofilms d'eau potable ..... 37
2.Adsorption virale sur les biofilms..... 37
2.1.Facteurs physico-chimiques influençant l'adhésion-agrégation des virus ..... 38
2.1.1.Le pH..... 38

2.1.2.La composition ionique du milieu ..... 39
2.1.3.La charge du support ..... 40
2.1.4.Autres paramètres impliqués dans l'adhésion-agrégation des virus ..... 41
2.2.Impact de l'hydrodynamique sur l'adsorption virale à des surfaces ..... 42
2.2.1.Conditions hydrostatiques et diffusion Brownienne ..... 42
2.2.2.Conditions hydrodynamiques et transfert convectif ..... 43
3.Interactions entre les virus et les biofilms ..... 44
3.1.Conditions expérimentales à prendre en considération ..... 45
3.2.Recherche de virus dans les biofilms environnementaux prélevés *in situ* ..... 46
3.3.Expérimentations d'adhésion virale sur des biofilms formés en laboratoire à l'aide de réacteurs ..... 48
3.4.Persistance des virus dans les biofilms ..... 52
3.5.Relargage des virus à partir du biofilm ..... 54

**V.Evaluation de l'inactivation des virus entériques par chloration ..... 55**
1.Persistance des virus dans le milieu hydrique ..... 55
2.Inactivation virale par l'hypochlorite de sodium ..... 58
2.1.Inactivation de virus entériques dans l'eau par l'hypochlorite de sodium ..... 59
2.2.Inactivation virale au sein d'un biofilm par l'hypochlorite de sodium ..... 65

**Matériels et Méthodes ..... 66**

**PARTIE I: Les bactériophages ARN F-spécifiques ..... 66**

**I.Production et contrôle des suspensions de bactériophages ARN F-spécifiques ..... 66**
1.Production de la bactérie hôte *Escherichia coli* ..... 66
1.1.Production des cultures d'essai ..... 66
1.2.Etalonnage des mesures de turbidité ..... 66
2.Production et dénombrement des bactériophages infectieux ..... 67
2.1.Production des bactériophages ..... 67
2.2.Dénombrement des bactériophages infectieux ..... 68
2.2.1.Dénombrement des phages en suspension ..... 68
2.2.2.Elution-concentration des phages présents sur les surfaces ..... 68

**II.Quantification du génome phagique ..... 70**
1.Extraction du génome viral ..... 70
2.Quantification du génome viral par RT-qPCR ..... 70
2.1.Rétro-transcription (RT) ..... 72
2.2.PCR en temps réel ..... 72

**III.Mesure de la taille des particules phagiques par Diffusion Light Scattering ..... 73**
1.Purification des bactériophages ..... 73
2.Mesure de la taille des particules virales ..... 74

**PARTIE II: Les réacteurs ..... 74**

**I.Le réacteur à disque rotatif ..... 74**
1.Description générale du réacteur à disque rotatif ..... 75
2.Conditions hydrodynamiques appliquées au réacteur à disque rotatif ..... 77

3.Matériaux utilisés pour l'étude ..... 78
3.1.Inox 316L……..78
3.2.PEHD……..78

**II.Les réacteurs Propella ..... 79**

**III.Nettoyage des coupons et des réacteurs ..... 80**

**PARTIE III: Protocoles expérimentaux……..81**

**I.Etude du biofilm d'eau de distribution formé dans le réacteur ..... 81**
1.Protocole de formation du biofilm dans le réacteur à disque rotatif ..... 81
2.Analyse bactériologique du biofilm ..... 81
2.1.Dénombrement des bactéries totales et des bactéries présentant une membrane intègre……..81
2.2.Dénombrement des bactéries hétérotrophes cultivables ..... 82

**II.Etude de la sorption phagique sur les surfaces ..... 83**
1.Adsorption phagique en conditions hydrostatisques ..... 83
1.1.Adsorption phagique en conditions hydrostatiques en fonction de la concentration en phage dans l'eau……83
1.2.Etude cinétique de l'adsorption phagique en conditions hydrostatiques ..... 84
2.Adsorption phagique en conditions hydrodynamiques ..... 85

**III.Evaluation de l'efficacité de protocoles de nettoyage sur les phages ..... 86**
1.Etude de la désorption phagique et évaluation de l'efficacité d'un nettoyage hydrodynamique . 86
1.1.Etude de la désorption phagique ..... 87
1.2.Nettoyage par augmentation du gradient pariétal de vitesse ..... 88
2.Etude de l'efficacité de la chloration sur les phages et les bactéries ..... 88
2.1.Préparation de la solution de chlore ..... 89
2.1.1.Principe du dosage du chlore libre ..... 89
2.1.2.Dosage du chlore libre ..... 90
2.2.Evaluation de l'efficacité d'un nettoyage par chloration en réacteurs Propella™ ..... 90
2.3.Evaluation de l'efficacité d'une chloration associée à une augmentation des contraintes hydrodynamiques en réacteur à disque rotatif ..... 91

**Résultats**……..93

**PARTIE I: Validations méthodologiques……95**

**I.Validation de la technique de détection par RT-PCR en temps réel ..... 96**
1.Pureté des suspensions de travail ..... 96
2.Gammes étalon ..... 96
2.1.Variabilité intra-essai et inter-expérimentation ..... 99
2.2.La sensibilité et la limite de détection ..... 100
2.3.Domaine de linéarité, pente de la droite et coefficient de détermination ..... 100

**II.Test d'inhibition de la détection phagique par RT-PCR temps réel ..... 102**

**III.Impact d'une étape de congélation sur la quantification des phages ..... 103**

**IV.Mesure de la taille des particules phagiques dans l'eau potable ..... 104**
1.Mesure de la taille des particules dans des suspensions contenant un seul génogroupe phagique……105
2.Mesure de la taille des particules dans une suspension contenant un mélange des trois phages 105

**PARTIE II: Sorption des phages MS2, GA et Qβ en conditions hydrostatiques et hydrodynamiques……..……..…….108**

**I.Description du biofilm ..... 108**

**II.Adsorption des bactériophages en conditions hydrostatiques ..... 110**
1.Evolution de la concentration phagique sur les surfaces en fonction de la concentration en phages dans l'eau……...111
1.1.Adsorption phagique sur PEHD " abiotique " ou colonisé par un biofilm de deux mois…….111
1.2.Normalisation des données ..... 113
2.Adsorption phagique sur des surfaces en PEHD et inox 316L colonisées ou non par un biofilm 116
2.1.Influence de l'état de colonisation de la surface sur l'adsorption phagique..... 116
2.1.1.Expérimentations réalisées avec des surfaces en PEHD ..... 116
2.1.2.Expérimentations réalisées avec des surfaces en inox 316L ..... 118
2.2.Influence de la présence d'un biofilm de 60 jours sur des surfaces en PEHD……..…….120

**III.Adsorption des bactériophages en conditions hydrodynamiques..... 122**
1.Etude de l'influence de six gradients pariétaux de vitesse sur l'adsorption phagique……..…123
2.Etude de l'influence de la présence d'un biofilm sur l'adsorption phagique en conditions dynamiques ..... 125
2.1.Cinétiques d'adhésion sur des surfaces en PEHD colonisées ou non par un biofilm de 60 jours…….126
2.2.Cinétiques d'adhésion sur des surfaces en inox 316L colonisées ou non par un biofilm de 60 jours…….127

**PARTIE III Evaluation de l'efficacité de protocoles de nettoyage sur le biofilm ainsi que sur les phages adsorbés aux surfaces ou en suspension dans l'eau……..…….132**

**I.Evaluation d'un protocole de nettoyage par augmentation du gradient pariétal de vitesse……..…….133**
1.Etude de la désorption des bactériophages adsorbés sur le biofilm ..... 133
2.Evaluation d'un protocole de nettoyage des surfaces par augmentation des contraintes hydrodynamiques ..... 134
2.1.Impact d'une augmentation des contraintes hydrodynamiques sur les bactéries constituant le biofilm…….134
2.2.Impact sur les bactériophages adsorbés sur les surfaces..... 136

**II.Impact de la chloration sur l'infectiosité et la détection génomique des phages ..... 137**
1.Définition des conditions de chloration ..... 137

1.1.Etablissement d'une droite étalon pour le dosage du chlore ..... 137
1.2.Suivi de la concentration en chlore dans les réacteurs ..... 138
1.2.1.Suivi de la consommation en chlore pour une chloration à 5 mg/L en réacteur Propella™ ..... 138
1.2.2.Suivi de la consommation en chlore pour une chloration à 4 mg/L en réacteur à disque rotatif ..... 139
2.Effet de la chloration sur les bactériophages en suspension dans l'eau ..... 140
2.1.Effet d'une chloration à 5 mg/L en réacteur Propella™ ..... 141
2.2.Effet d'une chloration à 4 mg/L en réacteur à disque rotatif ..... 142
3.Impact d'un nettoyage par chloration sur les phages adsorbés sur les surfaces en réacteur Propella™ ..... 143
4.Impact d'un nettoyage par chloration associé à une augmentation des contraintes hydrodynamiques en réacteur à disque rotatif ..... 145
4.1.Influence sur les bactéries du biofilm ..... 145
4.2.Influence du protocole de nettoyage sur les phages infectieux et le génome phagique ..... 147
4.3.Influence de la chloration en fonction du génogroupe phagique ..... 149

**Discussion - Conclusion ..... 154**

**I.Etude de l'adsorption phagique sur les surfaces ..... 155**
1.Analyse des biofilms d'eau potable de 60 jours ..... 155
2.Influence des propriétés physico-chimiques des surfaces et des phages ..... 156
3.Influence des conditions hydrodynamiques appliquées dans le réacteur ..... 159

**II.Evaluation de protocoles de nettoyage sur les biofilms et les phages ..... 160**
1.Etude de l'efficacité d'un nettoyage hydrodynamique ..... 162
2.Etude de l'efficacité d'un nettoyage par chloration ..... 163

**Références bibliographiques ..... 170**

**Annexes ..... 190**

# *Introduction – Objectifs de l'étude*

Les réseaux de distribution d'eau potable sont constitués d'un maillage complexe de canalisations et de réservoirs. Ces systèmes sont continuellement soumis à un flux de matière provenant de la ressource en eau ou étant la conséquence d'incidents sur le système (Nedellec *et al.,* 1996; Curriero *et al.,* 2001; Tillaut *et al.,* 2004). Bien qu'une concentration résiduelle en biocide soit maintenue jusqu'au point de distribution, l'eau potable contient une flore microbienne autochtone qui ne constitue aucun danger direct pour la santé humaine. Il est bien connu à présent que les microorganismes constituant cette flore microbienne vont pour une partie d'entre eux adhérer sur les surfaces et former une structure communément appelée biofilm (Flemming *et al.,* 2002). Le terme biofilm désigne toute communauté microbienne adhérant sur une surface et généralement enchâssée dans une matrice de polymères extracellulaires. Des bactéries, protozoaires, levures, champignons, virus et des algues ont été identifiés dans les biofilms (Berry *et al.,* 2006). Les bactéries sont les microorganismes les plus représentés avec une densité comprise entre $10^5$ et $10^8$ cellules/$cm^2$ pour un biofilm d'eau potable (Boe-Hansen *et al.,* 2002; Batté *et al.,* 2003; Langmark *et al.,* 2005). Malgré tous les efforts mis en œuvre pour produire et distribuer une eau de bonne qualité, l'eau destinée à la consommation est une ressource sensible, qui peut subir différents types de pollution et notamment des contaminations de nature chimique ou microbiologique pouvant avoir un impact direct sur la santé des populations exposées. Les exigences de qualité pour l'eau de distribution sont fixées par une directive européenne (Directive 98/83/CE), transposée en droit français (Décret N°2001-1220 du 20 décembre 2011). Elles se fondent sur les valeurs guides proposées par l'Organisation Mondiale de la Santé (recommandations de l'OMS révisées en 2004). Cette dernière définit une valeur guide comme étant « une estimation de la concentration d'une substance dans l'eau de boisson qui ne présente aucun risque pour la santé d'une personne qui consommerait cette eau pendant toute sa vie ». Le code de la santé publique (Art. R1321-2) spécifie également que « les eaux destinées à la consommation humaine, ne doivent pas contenir un nombre ou une concentration de microorganismes, de parasites ou de toutes autres substances constituant un danger potentiel pour la santé des personnes ». Les efforts des distributeurs d'eau potable pour fournir une eau de bonne qualité, ainsi que le contrôle réglementaire organisé par les autorités sanitaires apparaissent globalement efficaces compte tenu du faible nombre d'épidémies d'origine hydrique relevées depuis 1998 par l'Institut de Veille Sanitaire (InVS), avec en moyenne une situation épidémique relevée par an. Cependant lors d'introduction accidentelle d'une pollution d'origine fécale dans le réseau, des microorganismes indésirables et potentiellement pathogènes pour l'homme peuvent être retrouvés dans l'eau

et ont déjà été responsables de pathologies directement liées à la consommation d'eau de distribution, y compris dans les pays développés (Payment *et al.*, 1991 et 1997; de Serre *et al.*, 1999; Nygard *et al.*, 2003). Les microorganismes les plus fréquemment responsables de maladies d'origine hydrique sont les bactéries, les parasites et les virus. Ces derniers sont régulièrement mis en cause lors d'épidémies liées à la consommation d'eau potable contaminée (Koopmans *et al.*, 2002), ils constitueront l'objet de ce travail. Les virus les plus couramment impliqués dans ce contexte sont les norovirus, le virus de l'hépatite A et les rotavirus.

Suite à la contamination microbiologique d'un réseau de distribution, il est nécessaire d'appliquer des traitements, basés dans la plupart des cas sur une désinfection par chloration. Afin d'évaluer l'efficacité virucide d'une désinfection, il est préférable de conserver comme référentiel l'infectiosité virale. Cependant, les virus entériques les plus significatifs d'un point de vue épidémiologique ne sont pas ou difficilement cultivables et les techniques de biologie moléculaire n'apportent pas d'informations concernant leur caractère infectieux (Gassilloud *et al.*, 2003). Dans ce contexte, des virus modèles sont couramment utilisés et notamment les bactériophages ARN F-spécifiques (Schaper *et al.*, 2002; Thurston-Enriquez *et al.*, 2003; Cromeans *et al.*, 2010; Kahler *et al.*, 2010). Ces phages sont retrouvés dans des pollutions d'origine fécale et présentent une structure et une taille comparables à la majorité des virus entériques pathogènes. La détection de ces phages est possible par biologie moléculaire (Ogorzaly et Gantzer, 2006), mais également par culture par des méthodes rapides, faciles et peu coûteuses (Norme ISO 10705-1, 1995).

Dans ce contexte, l'objectif principal de ce travail a été d'améliorer les connaissances sur le devenir des virus entériques au sein d'un réseau de distribution d'eau et d'évaluer l'efficacité de protocoles de nettoyages sur ces virus. Afin de modéliser le devenir de virus entériques pathogènes dans un réseau de distribution d'eau, il est nécessaire de prendre en compte certains paramètres tels que la survie dans cet environnement ou les capacités virales d'adhésion et de relargage. Pour cela, il est nécessaire de disposer de données cinétiques, or à l'heure actuelle aucune étude cinétique du comportement de virus entériques pathogènes dans un système de distribution d'eau n'est disponible. Pour autant, ces données sont nécessaires dans un souci d'amélioration de la prise en charge lors d'accidents pouvant survenir sur les réseaux d'eau potable. En effet, afin de décontaminer un réseau, il faut non seulement prendre en compte les virus présents dans la phase aqueuse, mais également ceux ayant adsorbés sur le biofilm. Pour cela, trois bactériophages ARN F-spécifiques, MS2, GA et

Qβ, ont été introduits au sein de réacteurs reproduisant au mieux un système de distribution d'eau et permettant un contrôle rigoureux des conditions expérimentales. Nos travaux se sont orientés selon deux axes :

Dans un premier temps, nous avons fait varier différents paramètres tels que l'hydrodynamique du milieu, l'état de colonisation des surfaces par un biofilm d'eau potable ou la concentration en phages dans l'eau, afin de mieux comprendre les mécanismes intervenant dans le transport et l'adhésion des virus sur les surfaces. Pour cela, des cinétiques suivant la concentration phagique dans l'eau et sur les surfaces ont été effectuées. Des analyses ont été menées en conditions hydrostatiques, c'est-à-dire sans flux d'eau à la surface, mais également en conditions hydrodynamiques en appliquant différents gradients pariétaux de vitesse, c'est-à-dire différentes vitesses d'eau sur la paroi. L'étude de l'influence des propriétés de surface des phages sur leur adhésion a été possible par l'utilisation de trois bactériophages présentant des différences notamment en termes d'hydrophobicité. Enfin, les expérimentations ont été effectuées sur des surfaces en inox 316L ou en PEHD soit "abiotiques", c'est-à-dire sans biofilm à leur surface, soit colonisées par un biofilm de deux ou 60 jours. Afin de distinguer les différents génotypes phagiques étudiés, la détection a été effectuée par biologie moléculaire lors de cette étape.

Dans un second temps, nous avons évalué l'efficacité d'un protocole de nettoyage par chloration à forte dose sur les bacériophages. Lors de certains essais, la chloration a été couplée à un nettoyage hydrodynamique, ce qui constitue un des aspects originaux de ce travail. L'efficacité des protocoles de nettoyage a pu être évaluée sur les phages en suspension dans l'eau ainsi que sur les phages adsorbés sur des surfaces en PEHD colonisées par des biofilms d'eau potable de 60 jours. La capacité des phages à infecter les bactéries étant importante lors de l'évaluation de l'efficacité de protocoles de nettoyage, les concentrations phagiques ont été suivies par culture en complément des analyses par biologie moléculaire, permettant de distinguer les trois bactériophages.

Pour retranscrire les résultats obtenus dans le cadre de ce travail, le présent rapport s'articule en quatre parties. La première s'attache à présenter le contexte scientifique dans lequel ces travaux ont été effectués. La seconde partie regroupe les différentes méthodes nécessaires à la réalisation de ce travail. Dans une troisième partie les résultats seront présentés en fonction des deux principaux axes de recherche exposés ci-dessus. Enfin une quatrième partie est consacrée à une discussion générale ainsi qu'aux perspectives soulevées par ces travaux.

# *Etude Bibliographique*

## I. Le danger microbiologique en réseau de distribution d'eau

La qualité de l'eau de distribution et par conséquent la santé humaine peuvent être affectées par la présence de microorganismes pathogènes, accidentellement introduits dans le réseau de distribution d'eau. Les principaux microorganismes à transmission hydrique sont les bactéries, les protozoaires et les virus, ils sont présentés dans le **tableau 1**.

**Tableau 1. Exemples de microorganismes pathogènes pour l'homme transmissibles par l'eau de distribution (Adapté de Ashbolt, 2004).**

| **Bactéries** | **protozoaires** | **Virus** |
|---|---|---|
| *Salmonella spp.* | *Acanthamoeba spp.* | Enterovirus (Poliovirus, Coxsackie virus) |
| *Shigella spp.* | *Balantidium coli* | Rotavirus |
| *Vibrio cholerae* | *Cryptosporidium parvum, hominis* | Adénovirus |
| *Escherichia coli (souches pathogènes)* | *Entamoeba histolytica* | Norovirus |
| *Yersinia enterocolitica* | *Giardia lamblia* | Sapovirus |
| *Campylobacter jejuni* | *Naeglarie fowleri* | Virus de l'hépatite A |
| *Legionella pneumophila* | | Virus de l'hépatite E |
| *Leptospira spp.* | | |
| Mycobactéries variées | | |

Les bactéries couramment impliquées dans des contaminations liées à l'eau sont *Escherichia coli* (*E. coli*), *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter* et *Yersina* (Boring *et al.*, 1971; Eden *et al.*, 1977; Mentzing, 1981; Taylor *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2001; Clark *et al.*, 2003; Hrudey *et al.*, 2003). Les parasites présentent comme particularité de comporter dans leur cycle de développement une forme infectieuse, appelée kyste ou oocyste, très résistante aux conditions environnementales et aux traitements de désinfection. Les parasites les plus couramment décrits lors d'épidémies liées à l'ingestion d'eau contaminée sont *Cryptosporidium*, *Giardia* et les amibes pathogènes telles qu'*Entamoeba histolytica*. Enfin, les virus entériques pathogènes impliqués sont essentiellement les virus des gastro-entérites (rotavirus, norovirus) et les virus des hépatites A et E. Dans le cadre de ce travail, seul le danger de contamination du système par des virus entériques sera développé.

## 1. Les origines possibles de la contamination fécale des systèmes de distribution d'eau

L'eau potable est initialement captée dans un environemment naturel, puis traitée dans une usine de traitement, stockée dans des réservoirs, avant d'être acheminée jusqu'au robinet du consommateur. Une pollution accidentelle d'origine fécale peut être introduite à différents niveaux du système, lors de la collecte, de la production et de la distribution de l'eau en France. L'étude Padea (Pollutions accidentelles des eaux d'alimentation), menée entre 1991 et 1994, a permis d'identifier l'origine de 192 pollutions accidentelles de réseaux de distribution d'eau. La répartition de ces événements selon le point d'introduction de la pollution est donnée en **tableau 2**.

**Tableau 2. Pollutions accidentelles de l'eau de distribution recensées en France entre 1991 et 1994 (Nedellec *et al.*, 1996).**

| | | Point de contamination | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Nombre | Ressource | Captage | Usine de traitement | Réseau de distribution | Réservoir | Autre |
| Ensemble des accidents | 192 | 69% | 8% | 1% | 20% | 1% | 2% |
| Pollution microbiologique détectée | 57 | 63% | 14% | 2% | 21% | 0% | 0% |
| Epidémie de gastroentérite | 6 | 33% | 17% | 0% | 50% | 0% | 0% |

### 1.1. Contamination de la ressource en eau

Les ressources en eau utilisées pour la production d'eau destinée à la consommation sont essentiellement de deux types, les eaux de surface (rivière, lac) et les eaux souterraines. La qualité de la source en eau utilisée pour approvisionner le système joue un rôle important sur la filière de traitement mise en œuvre pour répondre aux exigences de qualité de l'eau distribuée. Ces ressources sont normalement protégées par un périmètre de sécurité visant à éviter le contact avec une éventuelle pollution microbiologique. Cependant, une contamination par une pollution fécale inhabituelle peut notamment survenir si ce périmètre est inexistant ou mal évalué, mais aussi en cas de crues, de contact accidentel avec des effluents de station d'épuration, des décharges de bassins de stabilisation d'eaux usées, des débordements de réseaux d'égout ou des fuites de fosses septiques (Curriero *et al.*, 2001;

Tillaut *et al.,* 2004). Si une pollution virale d'origine fécale est bien présente au niveau des eaux usées et des eaux de surface, elle peut également être détectée dans les eaux souterraines dans le monde entier. Le **tableau 3** donne un aperçu des concentrations en virus observées dans différents types d'eau.

**Tableau 3. Présence et concentration des virus entériques pathogènes dans différents types d'eau.** **UFP : unité formant plage, NPPUC : nombre le plus probable d'unités cythopathogènes, ICC-PCR : culture cellulaire suivie d'une PCR, cg : copie de génome.**

| Type d'eau | Lieu | Virus-Concentration | Pourcentage d'échantillons positifs | Référence |
|---|---|---|---|---|
| Eau usée brute | **Espagne** | HAV (PCR) : 4 log cg/100 mL<br>HEV (PCR) : 3 log cg/100 mL | | Rodriguez-Manzano *et al.,* 2010 |
| Eau usée brute | **Royaume-Uni** | Norovirus (PCR) : 6 log cg/100mL | | Laverick *et al.,* 2004 |
| Rivière | **Corée** | Entérovirus (ICC-PCR) | 33,3% | Lee *et al*., 2005 |
| Rivière | **Pays-Bas** | Entérovirus : 0,3-2 UFP/L<br>Rotavirus (PCR) : 57-5386 | | Lodder et de Roda Husman, 2005 |
| Barrage | **Afrique du sud** | Rotavirus | 13% | Van Zyl *et al.,* 2006 |
| Rivière | **France** | Entérovirus (culture)<br>Entérovirus (PCR)<br>HAV (PCR)<br>Norovirus GI (PCR)<br>Astrovirus (PCR) | 3%<br>88%<br>1,5%<br>1,5%<br>3% | Hot *et al.,* 2003 |
| Rivière<br>Barrage | **Afrique du sud** | HAV (PCR)<br>HAV (PCR) | 35,3%<br>37,3% | Taylor *et al.,* 2001 |
| Rivière | **Espagne** | Adénovirus (PCR) : 1-4 log cg/L | 90% | Albinana-Gimenez *et al.,* 2009 |
| Canaux | **Thaïlande** | HAV (PCR) | 15% | Kittigul *et al*., 2000 |
| Puits | **Etats-Unis (Wisconsin)** | HAV (PCR)<br>Rotavirus (PCR)<br>Entérovirus (PCR)<br>Norovirus (PCR) | 6%<br>2%<br>2%<br>2% | Borchardt *et al.,* 2003 |

### 1.2. Contamination microbiologique consécutive à une défaillance lors du traitement de potabilisation

Avant d'être distribuée l'eau destinée à la consommation subie des traitements afin que son utilisation ne présente aucun danger pour la santé. Dans la plupart des cas, une approche à barrières multiples est appliquée, incluant des traitements physiques tels que la coagulation, la floculation, la sédimentation, la filtration et des traitements par désinfection avec des oxydants (**Figure 1**). Ces procédés de traitement sont interdépendants et chaque étape aura un impact sur l'efficacité globale du traitement de potabilisation.

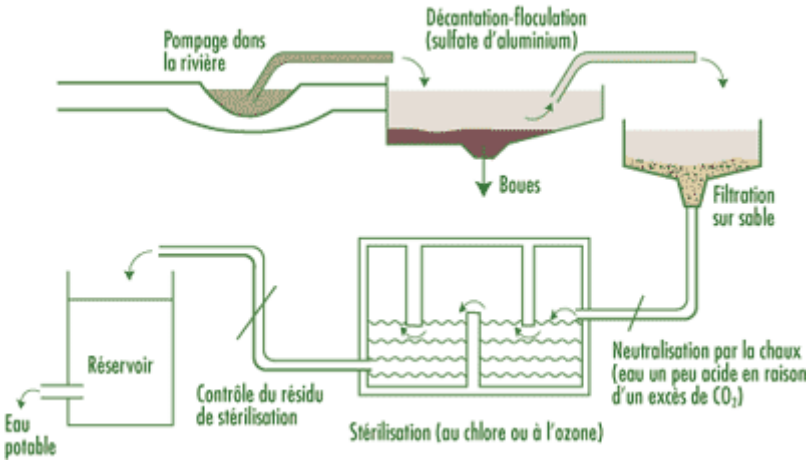



**Figure 1. Schéma simplifié du fonctionnement d'une station de potabilisation des eaux (http://crdp.ac-amiens.fr/enviro/eau_maj_solution_p3.htm).**

Ces traitements appliqués dans les stations de potabilisation peuvent être momentanément inefficaces ou inadaptés notamment lors d'une pollution ponctuelle de la ressource en eau à des concentrations supérieures aux valeurs habituelles. Une étude américaine reporte 25 épidémies liées à la consomation d'eau de distribution entre 2001 et 2002. Parmis ces épidémies, 10 seraient liées à une contamination d'eaux souterraines et 7 à une défaillance lors du traitement de potabilisation (Blackburn *et al.*, 2004). Une mauvaise hydraulique au niveau des décanteurs, des concentrations insuffisantes en coagulant, floculant, oxydant, ainsi qu'une filtration inadaptée peuvent être responsables de la présence de microorganismes dans l'eau distribuée (Mac Kenzie *et al*., 1994; Mansotte et Beaudeau, 1999; Beaudeau *et al.*, 1999). Une interruption de la filière de traitement peut également aboutir au non respect de la qualité microbiologique de l'eau par relargage de microorganismes lors de la remise en service des systèmes de filtration. Des contrôles microbiologiques sont effectués à différents niveaux, le **tableau 4** présente les limites et

références de qualité, d'un point de vue microbiologique, fixées par le Décret n°2001-1220 du 20 décembre 2001.

**Tableau 4. Limites et références de qualité microbiologique des eaux destinées à la consommation humaine (Décret n°2001-1220 du 20 décembre 2001)**

| Paramètre | Limites de qualité (nombre/100 mL) | Références de qualité (nombre/100 mL d'eau) |
|---|---|---|
| Numération de germes aérobies revivifiables à 22°C et 37°C | | Variation d'un facteur 10 par rapport à la valeur habituelle |
| *Escherichia coli* | 0 | |
| Entérocoques | 0 | |
| Bactéries coliformes | | 0 |
| Bactéries sulfito-réductrices y compris les spores (SBASR) | | 0 |

Les indicateurs de pollution fécale déterminant les limites de qualité microbiologique de l'eau potable sont uniquement de nature bactérienne et doivent impérativement être absents dans 100 mL d'eau potable analysée. *E. coli* appartient aux coliformes thermotolérants c'est un hôte normal de l'intestin de l'homme et des animaux. Cette bactérie est l'indicateur de pollution fécale le plus utilisé et elle est considérée comme un indicateur certain de pollution fécale. Les entérocoques sont également des bactéries de la flore digestive de l'homme et des animaux. Ils sont plus résistants que les coliformes face à des conditions environnementales difficiles telles qu'un pH élevé ou une forte concentration en sel.

Les indicateurs microbiologiques utilisés par la législation française comme références de qualité des eaux destinées à la consommation humaine sont essentiellement utilisés pour évaluer l'efficacité des traitements de potabilisation. En effet, les spores de *Clostridium perfringens* ont une résistance aux traitements de potabilisation qui s'approche de celle des microorganismes fécaux les plus résistants. De plus, de par leur taille, les spores sont considérées comme de bons indicateurs de l'efficacité des procédés de filtration en association avec les mesures de turbidité de l'eau. Les coliformes totaux sont utilisés comme témoins de l'efficacité de l'étape de désinfection.

### 1.3. Contamination résultant d'un accident sur le réseau de distribution d'eau

Les pollutions sur le réseau de distribution d'eau sont plus fréquentes que sur les stations de potabilisation, du fait de l'absence de moyen de détection et de barrières. La probabilité qu'elles conduisent à des effets de santé est deux à trois fois plus élevée que pour les pollutions survenant en amont (**tableau 2**).

La contamination du réseau peut se produire par le biais de fissures au niveau des réservoirs d'eau potable, par des retours d'eau contaminée lors de ruptures de canalisations, en cas d'accidents associés aux opérations de réparation et d'entretien du réseau ou lors d'immersion du système suite à des inondations (Deshayes and Schmitt, 2001). Une potentielle contamination extérieure peut entrer dans un réseau de distribution d'eau lorsque ce dernier est mis en dépression, par exemple à l'occasion de coupure d'eau ou lors de la remise en eau du système (Walski et Lutes, 1994; Qaqish *et al.,* 1995). Karim *et al.* (2003) ont analysé 66 échantillons de sol et d'eau directement en contact avec des canalisations d'arrivée d'eau potable dans des toilettes publiques. L'objectif était de déterminer l'éventuelle présence de microorganismes pathogènes en contact avec les tuyaux. Plus de la moitié des échantillons contenaient des coliformes fécaux indiquant la présence d'une pollution fécale. La présence de génome viral a été détectée dans 19% des échantillons de sol et 47% des échantillons d'eau. La présence de virus entériques infectieux a été détectée dans 12% des échantillons de sol et d'eau. La pollution virale était essentiellement composée d'entérovirus (souche vaccinale de poliovirus) mais également de norovirus ainsi que de VHA, prouvant clairement la présence de pollution fécale d'origine humaine en contact direct avec les canalisations du réseau de distribution.

## 2. Exemples d'épidémies virales liées à la consommation d'eau contaminée

Des épidémies virales d'origine hydrique sont observées dans le monde entier, y compris dans les pays développés qui possèdent pourtant des systèmes de traitement et de distribution de l'eau performants, associés à des contrôles microbiologiques réguliers.

## 2.1. Epidémies virales liées à la consommation d'eau de distribution en France

Plusieurs épidémies consécutives à une contamination du réseau d'eau potable par des virus entériques ont été recensées en France depuis les années 2000 (extraits des rapports de l'Institut de Veille Sanitaire, InVS).

En août-septembre 2000, 1037 personnes ont présenté des symptômes de gastro-entérites et ont eu recourt à une consultation médicale à Gourdon (Lot). Les analyses d'eau ont révélé une non-conformité microbiologique. L'enquête a mis en évidence un dysfonctionnement dans le système de chloration du réseau d'adduction comme étant responsable de la présence de microorganismes pathogènes dans l'eau. Les analyses de selles de 24 patients malades ont révélé la présence de rotavirus dans 71% des échantillons, de calicivirus dans 21% des échantillons et de *Campylobacter coli* dans 3% des échantillons.

En septembre 2001, une augmentation anormalement élevée des cas de gastro-entérites sur les communes de Dracy-le-Fort et Givry (Côte d'Or) a été signalée par SOS médecin. 397 cas certains et 86 cas probables de contaminations liées à la consommation d'eau ont été répertoriés. Une enquête environnementale et des examens microbiologiques des selles et de l'eau du réseau d'adduction d'eau ont été réalisés. L'analyse des selles des patients a révélé la présence de *Cryptosporidium parvum* (31,6%), de rotavirus (20%), d'entérovirus (14%), de *Campylobacter jejuni* (14%), d'*E. coli* entéro-pathogènes (12%) et d'adénovirus (6%) dans les échantillons. La contamination du réseau d'eau potable était due à un dysfonctionnement d'une valve avec reflux des eaux usées vers le système d'adduction.

En 2002, plusieurs communes d'Isère ont été victimes d'une épidémie à norovirus (génogroupe II) suite à la contamination du réseau d'eau de distribution par de l'eau de rivière. L'enquête a révélé plusieurs anomalies. De fortes pluies ont provoqué un dysfonctionnement d'une station d'épuration en amont du captage d'eau destinée à la production d'eau potable. Ces fortes pluies ont également engendré le débordement de la rivière dans laquelle était déversée l'eau usée traitée. Ceci a eu pour conséquence l'inondation du périmètre de protection du captage. De plus, le puits de captage étant en mauvais état, une pollution fécale anormalement élevée a été retrouvée dans la station de potabilisation. La présence de norovirus a été retrouvée à la fois dans les selles des patients et dans les prélèvements d'eau confirmant ainsi l'implication de l'eau de distribution.

## 2.2. Epidémies virales liées à la consommation d'eau de distribution dans d'autres pays développés

En 2002, en Irlande, deux avions atterrissent avec à leur bord de nombreuses personnes présentant simultanément des diarrhées et vomissements d'apparition soudaine. Une enquête a révélé que ces personnes provenaient toutes de Soldeu (Andorre) et qu'elles avaient été contaminées par un norovirus. Les données suggèrent que l'infection serait survenue par l'ingestion de glaçons consommés dans les boissons, bien que l'origine de la contamination de l'eau ayant servie à la fabrication des glaçons n'aie pas été identifiée (Eurosurveillance, janvier 2003).

Une contamination fécale d'un puits de captage d'eau potable à la suite d'un débordement d'un réseau d'égoût situé à proximité du puits, a provoqué l'apparition de 200 cas de gastro-entérite entre mai et juin 2001 à Stockholm (Suède) (Nygard *et al.*, 2003). Un génotype émergent de norovirus (GG IIb) a été détecté à la fois dans les selles des patients et dans les échantillons d'eau analysés.

Payment *et al.* (1991 et 1997) ont conduit deux études épidémiologiques qui ont suggéré que des contaminations de réseaux de distribution d'eau potable étaient en partie responsables de l'augmentation des maladies entériques. Ces études ont été menées en comparant la santé de personnes consommant de l'eau de distribution avec celle de personnes consommant cette même eau traitée par osmose inverse et en analysant les éventuels épisodes de gastro-entérites. Les deux études soulignent que les personnes consommant de l'eau de distribution présentaient des épisodes de pathologies intestinales plus souvent que le groupe de personnes consommant de l'eau traitée par osmose inverse. De plus, les personnes vivant le plus loin de la station de potabilisation présentaient un risque plus fort de contracter des maladies gastro-intestinales. Des modélisations de la pression au sein du réseau de distribution d'eau (Kirmeyer *et al.*, 2001) ont également montré que le tronçon de réseau analysé par Payment *et al.* (1991 et 1997) était fortement sujet aux diminutions de pression avec plus de 90% des nœuds de connexion de ce système présentant des pressions négatives. De plus, le système situé dans les environs de Montréal a subi de nombreuses ruptures de canalisation notamment durant l'hiver et l'automne à cause de fortes variations de température. Enfin, il a également été montré que l'eau contenait une très faible concentration en désinfectant résiduel particulièrement à la fin du système. Ces différents éléments ont permis de faire un lien entre la présence d'une pollution fécale à

proximité du réseau de distribution d'eau, les faiblesses du système de distribution et l'occurrence de maladies gastro-intestinales chez les consommateurs d'eau.

Une vingtaine de cas d'hépatite A ont été recensés dans une petite commune rurale du Québec en 1995. Le génome du virus de l'hépatite A a été recherché par biologie moléculaire et trouvé dans l'eau d'un puits, les selles des patients contaminés et dans une fosse septique. La fosse septique avait contaminé le puits d'eau potable mais également d'autres puits jusqu'à 60 mètres de distance (de Serres *et al.*, 1999).

Enfin, en Finlande à Nokia, suite à une erreur d'un employé, 450 000 litres d'eau usée ont été déversés dans le réseau de distribution d'eau potable. Plus de 1 000 personnes présentant des symptômes de gastro-entérite ont eu recourt à une consultation médicale. La présence de différents virus a été détectée à la fois dans les selles des patients, dans l'eau contaminée et dans les eaux usées responsables de la contamination. Ainsi, il a été possible d'identifier par biologie moléculaire, des norovirus, des astrovirus, des rotavirus, des adénovirus et des entérovirus.

## II. Les virus entériques retrouvés en milieu hydrique

Les virus responsables d'infections d'origine hydrique sont des virus capables de se multiplier dans le tractus digestif humain et/ou animal d'où le terme de " virus entériques ". Ils sont incapables de se reproduire hors d'une cellule hôte, ils peuvent donc être considérés comme des particules sans aucun métabolisme dans l'environnement. Ces virus sont associés à une pollution d'origine fécale, ils peuvent être pathogènes pour l'homme (virus entériques pathogènes) ou vivre aux dépens de bactéries intestinales sans pour autant être pathogènes (bactériophages fécaux). Le présent chapitre décrira dans un premier temps les virus entériques pathogènes pour l'homme, puis les bactériophages fécaux.

### 1. Les virus entériques pathogènes pour l'homme

#### 1.1. Généralités sur les virus entériques pathogènes

Parmi les microorganismes pathogènes pour l'homme transmissibles par l'eau, les virus jouent un rôle important (Kukkula *et al.*, 1999; Koopmans *et al.*, 2002). La majorité des virus entériques pathogènes présentent des similitudes structurales sur plusieurs points (**Tableau 5**). Il s'agit de virus nus c'est-à-dire qu'ils ne possèdent pas d'enveloppe et leur

capside mesure entre 20 et 34 nm de diamètre pour la majorité d'entre eux. Cependant, certains virus entériques peuvent mesurer jusqu'à 110 nm (Fauquet *et al.*, 2005). La capside est constituée de sous-unités protéiques qui s'assemblent selon une symétrie cubique pour prendre une forme d'icosaèdre. Le support de l'information génétique est majoritairement un ARN simple brin et la taille du génome est généralement comprise entre 7 et 9 kilo bases (kb). Deux familles se distinguent des autres virus entériques par le diamètre plus important de leur capside ainsi que par la nature et la taille du support de l'information génétique. En effet, les virus du genre *Adenovirus* de la famille des *Adenoviridae* présentent une capside plus complexe constituée de trois protéines majoritaires (Stewart *et al.*, 1993) et dont le diamètre est compris entre 80 et 110 nm (Fauquet *et al.*, 2005). Ils possèdent un génome à ADN double brin, ce qui explique leur nom, mesurant de 26 à 45 kb (Davison *et al.*, 2003). Les *Rotavirus* de la famille des *Reoviridae* ont, quant à eux, un génome constitué de 11 segments d'ARN double brin de 19 à 32 kb. La capside virale, d'environ 75 nm de diamètre, est constituée de trois couches superposées (Fauquet *et al.*, 2005). Certains virus entériques doivent leur nom de genre à leur morphologie particulière observée en microscopie électronique. Ainsi, les *Rotavirus* ont l'aspect d'une roue et les *Astrovirus* celui d'une étoile (**Figure 2**).

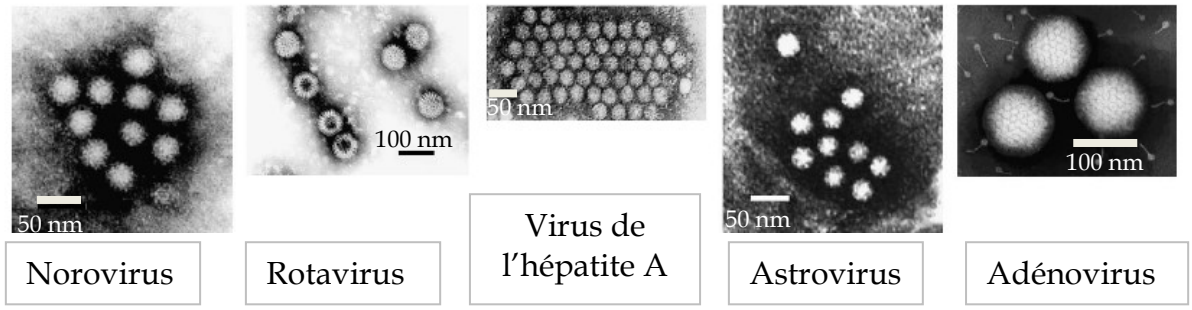



**Figure 2. Observation en microscopie électronique de virus entériques pathogènes (Koopmans et Duizer, 2004)**

La dose médiane infectieuse (DI50), c'est-à-dire la dose de microorganismes suffisante pour provoquer l'apparition de symptômes cliniques chez 50% des individus, est faible de l'ordre de 10 à 100 particules virales infectieuses pour la majorité des virus (**Tableau 5**). Une DI50 de l'ordre de $10^4$ particules virales est cependant décrite pour les *Enterovirus*. La durée d'incubation peut varier de quelques jours pour la majorité des virus, à plus de 50 jours pour les virus des hépatites A et E. Les quantités excrétées sont importantes puisqu'elles sont comprises entre $10^6$ et $10^{11}$ particules virales par gramme de selle. Des particules virales

peuvent être retrouvées dans les selles plusieurs jours après la disparition des symptômes. A titre d'exemple, les échovirus peuvent être excrétés jusqu'à 42 jours après l'infection, cependant pour la majorité des virus la durée d'excrétion est d'une dizaine de jours. Tous ces éléments associés à une bonne résistance aux conditions environnementales peuvent expliquer l'impact épidémiologique des virus entériques.

Une dizaine de genres viraux différents ont été impliqués dans des épisodes épidémiques et plus de 140 sérotypes de virus entériques pathogènes pour l'homme ont été décrits (Taylor *et al.,* 2001). Les principaux genres viraux incriminés dans les épidémies liées à l'eau potable en France mais également au niveau mondial sont les entérovirus, les virus responsables de gastroentérites tels que les *Norovirus* et les *Rotavirus* (Chikki Brachet *et al.,* 2002; Anderson et Weber, 2004; Lopman *et al.,* 2004) et les virus des hépatites A et E (Koopmans *et al.,* 2002).

## 1.2. Les virus entériques les plus fréquemment responsables d'épidémies d'origine hydrique dans les pays développés

Les infections dues aux virus entériques peuvent rester asymptomatiques ou engendrer des troubles plus ou moins sévères (Wyn-Jones et Sellwood, 2001). Ainsi, les virus entériques peuvent être classés en fonction de leur pathogénicité (**Tableau 5**). Ils provoquent différentes pathologies telles que des gastro-entérites, des hépatites ou d'autres pathologies liées aux infections à *Enterovirus* telles que des paralysies, des méningites ou la polyomyélite.

### 1.2.1. Les entérovirus

Ces virus appartiennent à la famille des *Picornaviridae* et au genre *Enterovirus* qui se divise en quatre groupes A, B, C et D. Dans le genre *Enterovirus* figurent les coxsackievirus A (23 sérotypes), B (6 sérotypes), les poliovirus (3 sérotypes), les échovirus (31 sérotypes) et d'autres entérovirus. Ce sont des virus à ARN monocaténaire de polarité positive. La capside icosaédrique est composée de quatre protéines appelées VP1, VP2, VP3 et VP4 et mesure de 20 à 30 nm de diamètre.

La période d'incubation est généralement inférieure à sept jours et les pathologies liées à ces virus sont très variées. L'infection par des entérovirus peut être asymptomatique. Les symptômes bénins comprennent de la fièvre, des malaises, une irritation de la gorge, des

vomissements, des éruptions cutanées ou des maladies des voies aériennes supérieures. Les entérovirus peuvent être à l'origine de pathologies graves, telle que la poliomyélite, et des complications peuvent survenir telles que des paralysies, des méningites, des encéphalites, et des atteintes cardiaques qui sont dues au passage du virus dans le sang. En effet, les virus du genre *Enterovirus* sont capables de se multiplier dans les cellules intestinales puis d'infecter d'autres organes tels que le système nerveux central.

Certains travaux suggèrent un lien possible entre des infections à entérovirus et l'apparition d'un diabète insulino-dépendant (Nairn *et al.,* 1999; Lönnrot *et al.,* 2000). Les infections à entérovirus atteindraient leur pic au cours de l'été ou au début de l'automne (Nwachuku et Gerba, 2006; Pallansch et Roos, 2007).

**Tableau 5. Pathogénicité et caractéristiques des principaux virus humains responsables d'infections liées à l'eau (Koopmans et Duizer, 2004; Carter, 2005; Fauquet *et al.*, 2005; Rapport AFSSA, 2007).** sb : simple brin, db : double brin, * : les entérovirus sont responsables d'une grande variété de symptômes, DI50 : Dose médiane infectieuse.

| Maladie | Famille | Genre | Nom commun | Capside icosaedrique Taille (nm) | Nature du génome | DI50 | Durée d'incubation (jours) | Durée excrétion (jours) | Quantité excrétée (par gramme de selle) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Gastroentérite** | *Caliciviridae* | *Norovirus* | Norovirus | 27-30 | ARN sb | 10 | 1 à 2 | 7 à 10 | $10^7$ à $10^{10}$ |
| | *Caliciviridae* | *Sapovirus* | Sapovirus | 27-30 | ARN sb | | 5 à 10 | 5 à 10 | $10^{11}$ |
| | *Reoviridae* | *Rotavirus* | Rotavirus | 75 | ARN db | 5 | 1 à 2 | 7 | $10^9$ |
| | *Astroviridae* | *Mamastrovirus* | Astrovirus | 28-30 | ARN sb | | 1 à 4 | 7 | 10/mL |
| | *Adenoviridae* | *Mastadenovirus* | Adénovirus 40 et 41 | 80-110 | ADN db | ≈ 10 | 3 à 10 | 10 | $10^6$ |
| **Hépatite** | *Picornaviridae* | *Hepatovirus* | Virus de l'hépatite A | 27-32 | ARN sb | 10 à 100 | 10 à 50 | 15 à 30 | $10^6$ |
| | *Hepeviridae* | *Hepevirus* | Virus de l'hépatite E | 30-34 | ARN sb | 100 | 14 à 63 | 7 à 28 | |
| **Autres*** | *Picornaviridae* | *Enterovirus* | Poliovirus | 20-30 | ARN sb | 1000 | < 7 | 28 à 42 | $10^7$ |
| | | | Echovirus | 20-30 | ARN sb | 15000 | < 7 | 28 à 42 | $10^7$ |
| | | | Coxsackievirus | 20-30 | ARN sb | | < 7 | 28 à 42 | $10^7$ |

### 1.2.2. Les virus des gastroentérites

Au moins quatre genres, incluant plusieurs espèces et génogroupes, sont impliqués dans des gastroentérites, les norovirus, les rotavirus, les astrovirus et certains adénovirus. Seuls les virus ayant l'impact épidémiologique le plus important dans les pays développés seront décrits.

• Les norovirus sont des virus à ARN monocaténaire de polarité positive, avec une capside composée de deux protéines VP1 et VP2. Ils appartiennent à la famille des *Caliciviridae*. Ils peuvent être génétiquement classés en cinq génogroupes différents (GI, GII, GIII, GIV et GV). Ces différents génogroupes peuvent eux-mêmes être divisés en génotypes. Ainsi, le génogroupe II, qui constitue le génogroupe humain le plus répandu, contient actuellement 17 génotypes. Les génogroupes I, II et IV infectent l'homme et le génogroupe II - génotype 4 (G II-4) est le plus fréquemment isolé chez l'homme (Tu *et al.,* 2007). Bien que la plupart des norovirus semblent spécifiques à l'hôte, des variants de norovirus II humain auraient été isolés chez des animaux de ferme (Mattison *et al.,* 2007). Le génogroupe III est associé aux infections des bovins, enfin le génogroupe V a été récemment isolé chez des souris. Les norovirus auraient une faible dose médiane infectieuse, environ dix virions, et une grande résistance dans l'environnement (Blanton *et al.,* 2006). Ils constituent la cause principale de gastroentérites virales dans les pays développés (Carter, 2005) et touchent toutes les classes d'âge. La période d'incubation s'étend de 24 à 48 heures (Chin, 2000) et les effets sont généralement spontanément résolutifs après 24 à 48 heures. De nombreuses épidémies de gastroentérites à norovirus ont été observées dans des établissements de vie collective tels que des écoles, des camps de vacances, des maisons de retraites ou des bateaux de croisière (Harris *et al.,* 2010; Vivancos *et al*., 2010). Les infections à norovirus sont saisonnières avec un pic épidémique observé durant les mois d'hiver (Mounts *et al.,* 2000; Maunula *et al.,* 2005).

• Les rotavirus sont des virus non enveloppés à ARN bicaténaire, d'environ 75 nm de diamètre appartenant à la famille des *Reoviridae*. Ils sont divisés en six génogroupes (A à F). Les génogroupes A, B et C provoquent des diarrhées sévères surtout chez les enfants (Schwab, 2007). Le groupe A est endémique dans le monde entier, il est le plus répandu des

six groupes. Les espèces des groupes D, E, F et G infectent uniquement les animaux, bien que des études suggèrent un potentiel zoonotique de certains de ces rotavirus (Cook *et al.,* 2004; Gabbay *et al.,* 2008; Steyer *et al.,* 2008). La période d'incubation est de un à deux jours et les symptômes durent généralement de cinq à huit jours. La dose infectieuse médiane pour le rotavirus est de l'ordre de cinq particules (Haas *et al.,* 1999). Des manifestations extra-intestinales (symptômes respiratoires, convulsions) ont déjà été observées chez des jeunes enfants dans les pays développés (Candy, 2007). Les rotavirus sont associés à des diarrhées infantiles dont le pic se situe en hiver.

### 1.2.3. Les virus des hépatites

• Le virus de l'hépatite A (VHA) est un virus à ARN monocaténaire qui appartient à la famille des *Picornaviridae* et au genre *Hepatovirus* dont il est le seul représentant (Carter, 2005). Ce genre se divise en six génotypes (I à VI), mais seuls les génotypes I, II et III, chacun subdivisés en deux génogroupes (A et B), peuvent contaminer l'homme. Ils sont responsables d'hépatites aiguës dont les symptômes se présentent sous la forme de fatigue associée à de la fièvre, une anorexie et une gêne abdominale suivie d'un ictère. La gravité de l'infection dépend en partie de l'âge de la personne infectée. En effet, plus de 90 % des enfants de moins de 5 ans présentent une forme asymptomatique (Yayli *et al.,* 2002), alors que les adultes développent majoritairement une forme ictérique (Pinto et Saiz, 2007). La période d'incubation peut s'étendre entre 10 et 50 jours, elle est inversement proportionnelle à la quantité de virus ingérés (Hollinger et Emerson, 2007). La convalescence peut être longue (8 à 10 semaines) et des rechutes durant 12 mois ou plus, ont été observées (Carter, 2005). Les formes graves subfulminantes ou fulminantes s'observent plutôt chez les adultes porteurs d'une hépatopathie chronique sous-jacente. En 1999, selon l'InVS, 31 % des patients présentant une hépatite A ont été hospitalisés et 1 % d'entre eux ont présenté une forme fulminante. D'après Koopmans *et al.* (2002), 84 000 cas d'hépatite A sont recensés chaque année parmi lesquels 5% seraient directement liés à l'eau et à l'alimentation. La plupart des cas d'hépatite A dans les pays développés sont des cas d'importation et les infections par ce virus sont majoritairement rencontrées dans les pays en voie de développement (**Figure 3**).

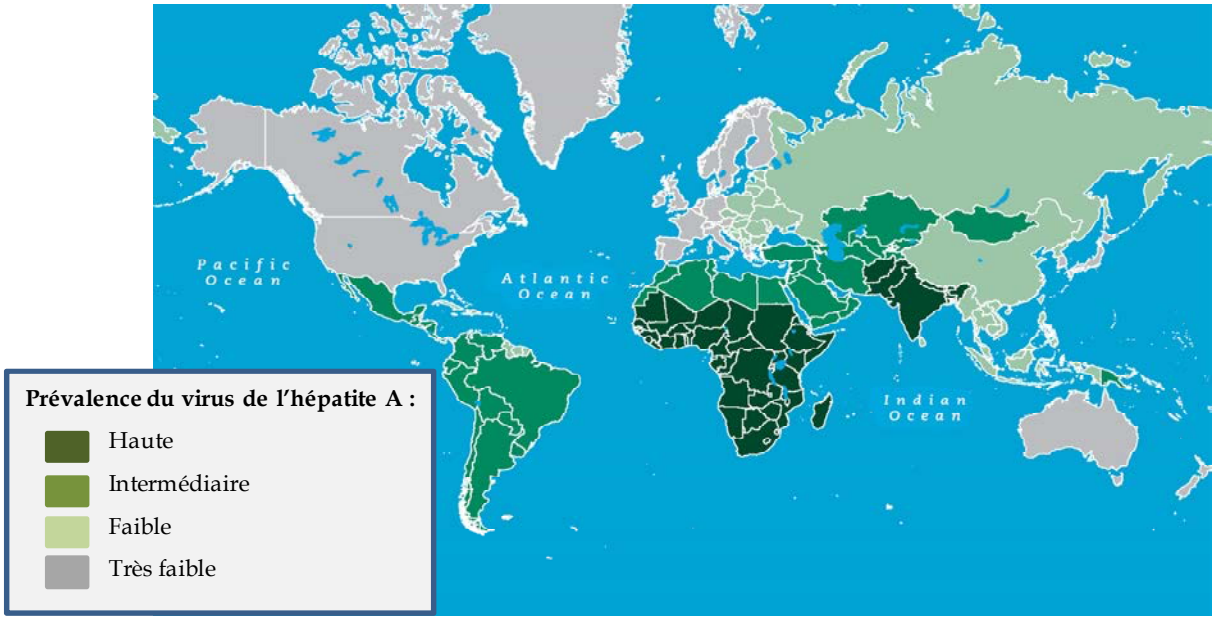



**Figure 3. Estimation de la prévalence du virus de l'hépatite A dans le monde (Center for Disease Control and Prevention, CDCP d'après les données recueillies entre 1990 et 2005).**

• Le virus de l'hépatite E (VHE) a été découvert dans les années 1980. C'est un virus à ARN polyadénylé monocaténaire. On distingue quatre génotypes majeurs pouvant contaminer l'homme (1 à 4), le 1 est retrouvé en Asie et en Afrique, le 2 au Mexique et en Asie, le 3 est ubiquitaire et le 4 n'est retrouvé qu'en Asie (Panda *et al.*, 2007). D'un point de vue clinique il est impossible de différencier le VHE du VHA. Le VHE est responsable d'hépatites aiguës le plus souvent spontanément résolutives qui n'évoluent pas vers la chronicité (Panda *et al.*, 2007). Comme pour l'hépatite A, les formes ictériques s'observent plus fréquemment chez les adultes. La période d'incubation varie de 14 à 63 jours et les virions sont excrétés dans les selles pendant une semaine ou plus après l'apparition des symptômes (Percival *et al.*, 2004). Il est actuellement démontré que le virus de l'hépatite E, notamment les génotypes 3 et 4, est une zoonose (Wu *et al.*, 2000; Smith *et al.*, 2002; Panda *et al.*, 2007). La présence de VHE a été démontrée dans les denrées alimentaires issues du porc, comme le foie (Colson *et al.*, 2010). La transmission peut survenir par ingestion de viande infectée ou par contact avec le réservoir animal (Pavio *et al.*, 2010). De même la faune sauvage, telle que les sangliers, les cygnes et les cerfs, représente un réservoir important de VHE (Temman *et al.*, 2012). La transmission du VHE par l'eau concerne essentiellement les génotypes 1 et 2 (Purcell et Emerson, 2010). Contrairement à la prévalence observée pour le virus de l'hépatite A, des cas sporadiques et autochtones, en partie dus à la transmission par les animaux, sont observés dans les pays développés (**Figure 4**).

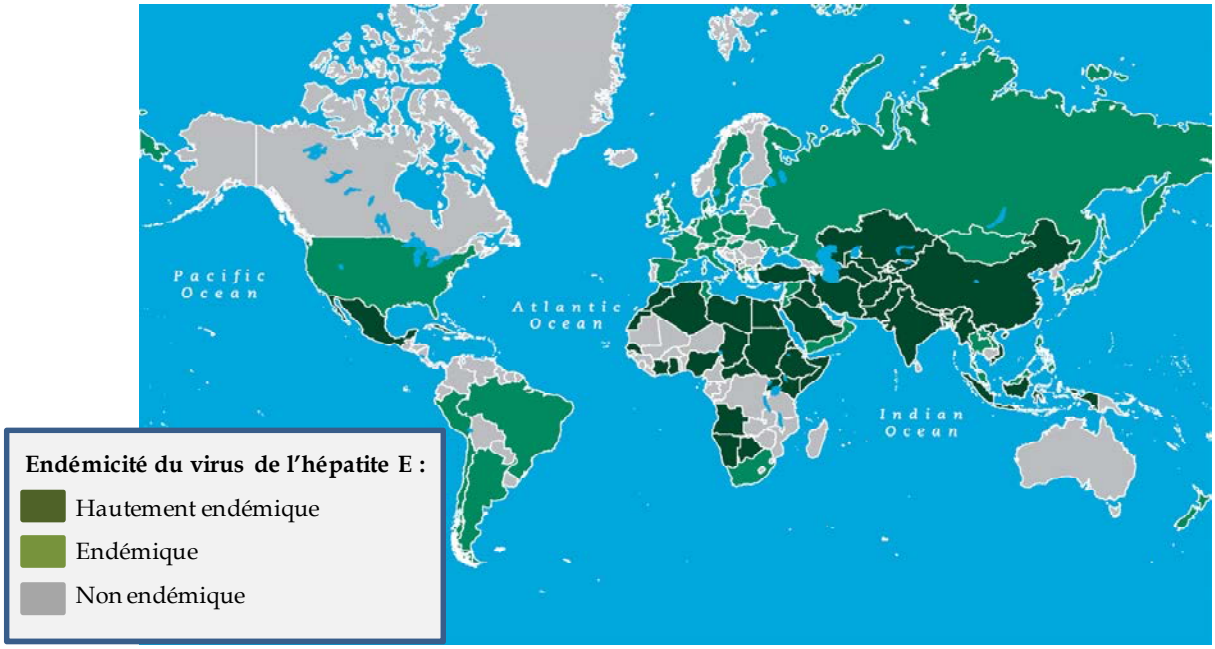



**Figure 4. Endémicité du virus de l'hépatite E dans le monde (CDCP, d'après les données recueillies en 2010).**

## 2. Les bactériophages fécaux

Parallèlement aux virus entériques pathogènes pour l'homme, d'autres virus appelés bactériophages fécaux (ou phages) sont associés à une pollution microbiologique d'origine fécale et peuvent être retrouvés dans le milieu hydrique.

### 2.1. Taxonomie

Depuis le développement des méthodes de coloration négative en 1959, 5568 phages ont été répertoriés et observés par microscopie électronique (Ackermann, 2007). Selon l'ICTV (comité international sur la taxonomie des virus), un seul ordre est reconnu pour les bactériophages : les *Caudovirales* ou phages à queue. Cet ordre regroupe trois familles, *Myoviridae*, *Podoviridae* et *Siphoviridae,* représentant respectivement 24 %, 14 % et 59 % des phages. Plus de 96% des bactériophages sont des virus nus à ADN double brin, dont la taille oscille entre 47 et 105 nm et qui présentent une queue, comme illustré sur la **figure 5** (Banque de données de l'ICTV et d'Ackermann, 2007).

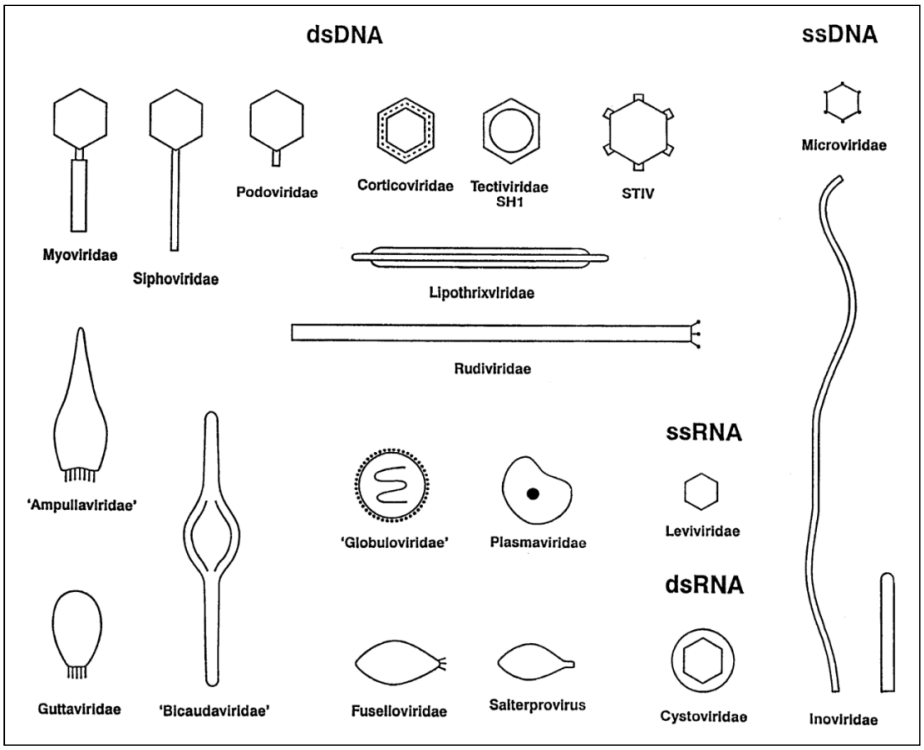



**Figure 5. Représentation schématique des principaux groupes de bactériophages (Ackermann, 2007).** **dsDNA = ADN double brin ; ssDNA = ADN simple brin ; ssRNA = ARN simple brin ; dsRNA = ARN double brin.**

Les autres phages sont regroupés sous l'appellation PFP en raison de leur morphologie (Polyèdre, Filamenteux, Pléomorphe). Ils sont au nombre de 208 et représentent moins de 4 % des phages identifiés. Ils ne font pas partie de l'ordre établi des *Caudovirales* et sont dispersés dans 17 familles et 20 genres différents (banque de données de l'ICTV) (Ackermann, 2007). Les bactériophages présentant une structure comparable à la majorité des virus entériques pathogènes pour l'homme appartiennent à la famille des *Leviviridae*, ils sont constitués d'une capside polyédrique de 22 à 30 nm de diamètre (**Figure 5**) et leur génome est constitué d'un ARN simple brin, comme c'est le cas pour les enterovirus, les virus des hépatites A et E, les astrovirus, les norovirus et les sapovirus.

## 2.2. Les phages en tant qu'indicateurs alternatifs de pollution fécale d'origine virale et modèles d'étude des virus entériques pathogènes

Tous les bactériophages dits fécaux, dont la bactérie hôte colonise le tractus intestinal, sont susceptibles d'être retrouvés dans les matières fécales humaines. Ils se multiplient aux dépens de bactéries du tractus digestif, sont excrétés en grande quantité dans les matières

fécales, puis disséminés dans l'environnement comme les virus entériques pathogènes. Les phages ne peuvent se multiplier qu'à l'intérieur d'une bactérie hôte qui est en croissance. De ce fait, les conditions pour la multiplication phagique sont identiques à celles permettant la croissance optimale de leur bactérie hôte (Grabow, 2001; Jofre, 2008). Ces conditions sont réunies dans le tractus gastro-intestinal des humains et des animaux à sang chaud. De ce fait, la multiplication phagique en dehors de ces conditions est très peu probable (Grabow, 2001; Jofre, 2007).

Trois catégories de bactériophages ont été proposées en tant qu'indicateurs de pollution fécale d'origine virale dans le milieu hydrique et en tant que modèles d'étude du devenir des virus entériques dans l'environnement. Il s'agit des coliphages somatiques, des phages de *Bacteroides fragilis* et des bactériophages ARN-F spécifiques (Kott *et al.,* 1974; Dutka *et al.,* 1987; Tartera et Jofre 1987; Havelaar et Pot-Hogeboom, 1988; Borrego *et al.,* 1990; Ogorzaly et Gantzer, 2006).

Les coliphages somatiques sont des phages à ADN appartenant à quatre familles différentes, *Myoviridae*, *Siphoviridae*, *Podoviridae* et *Microviridae*. Leur morphologie est assez hétérogène puisque certains phages possèdent une queue alors que d'autres non (**Figure 5**). Ils se fixent sur la paroi de la bactérie *E. coli* par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques. Les concentrations retrouvées dans les selles sont comprises entre $10^4$ et $10^6$ Unité Formant Plage (UFP) par gramme de selle (Osawa *et al.,* 1981; Havelaar *et al.,* 1986) et leur concentration dans les eaux usées peut atteindre $10^6$ à $10^7$ UFP/100 mL (Contreras-Coll *et al.*, 2002; Lodder et de Roda Husman, 2005). Ces phages seraient plus sensibles aux méthodes de désinfection que les autres virus entériques notamment vis-à-vis du chlore (Havelaar *et al.,* 1987) et des UV (Niewstad *et al.,* 1991). Dans la famille des *Microviridae* figure le phage ϕX174 qui est souvent utilisé comme modèle pour l'étude des virus entériques pathogènes (Hock et Botzenhart, 2002; Storey et Ashbolt, 2003; Helmi *et al.,* 2008). Il s'agit d'un phage à ADN simple brin circulaire avec une capside icosaédrique d'un diamètre de 30 nm environ (Tromans et Horne, 1961).

Les phages de *Bacteroides fragilis* constituent un groupe plus homogène puisqu'ils appartiennent tous à la famille des *Siphoviridae*. Ils infectent spécifiquement *Bacteroides fragilis* par un récepteur situé au niveau de la paroi bactérienne. Ces phages sont présents dans les

selles humaines à des concentrations très variables comprises entre $10^2$ et $10^8$ UFP par gramme de selle (Grabow *et al.*, 1995) et les concentrations retrouvées dans les eaux usées varient de $10^4$ à $10^5$ UFP/100mL (Contreras *et al.*, 2002; Lucena *et al.*, 2003). Leur méthode de détection nécessite des conditions de culture anaérobies qui sont contraignantes.

Les bactériophages ARN F-spécifiques et ADN F-spécifiques appartiennent respectivement à la famille des *Leviviridae* et des *Inoviridae*. Ces phages ont la particularité d'infecter spécifiquement les bactéries possédant des pili sexuels ou F-pili dont *E. coli*. Les bactériophages dont la structure s'approche le plus des virus entériques pathogènes sont les bactériophages ARN F-spécifiques. En effet, les phages de la famille des *Leviviridae* ont une capside polyédrique, un génome à ARN simple brin et une taille (20 à 30 nm) similaire à celles de la majorité des virus entériques pathogènes, ce qui n'est pas le cas des coliphages somatiques et des phages de *B. fragilis*. Les bactériophages ARN F-spécifiques sont retrouvés dans les selles humaines à des concentrations de l'ordre de $10^4$ UFP par gramme de selle et dans les eaux usées à des concentrations variant de $10^5$ à $10^6$ UFP/100mL (Lucena *et al.*, 2003; Gourmelon *et al.*, 2007; Jofre, 2007 ). Ces phages seraient au moins aussi résistants que les virus entériques pathogènes face aux procédés de désinfection de l'eau et leur survie dans l'environnement est plus importante que celle des indicateurs bactériens (Grabow, 2001). Ces virus sont détectables par des techniques simples et rapides permettant soit la détection de leur infectiosité (Norme ISO 10705-1, 1995), soit la quantification spécifique des génogroupes présents dans l'eau par biologie moléculaire (Ogorzaly et Gantzer, 2006).

Un intérêt supplémentaire des bactériophages ARN F-spécifiques est qu'ils peuvent constituer des marqueurs permettant de discriminer une contamination virale d'origine humaine ou animale. En effet, parmi les quatres génogroupes appartenant aux bactériophages ARN F-spécifiques, les génogroupes GI et GIV sont majoritairement associés à une pollution fécale d'origine animale alors que les génogroupes GII et GIII sont associés à une pollution d'origine humaine (Brion *et al.*, 2002; Cole *et al.*, 2003; Ogorzaly et Gantzer, 2006). Enfin, les études récentes des propriétés de surface de ces phages ont notamment permis d'apporter des informations sur la charge et la balance hydrophile/hydrophobe de la surface des bactériophages MS2 (GI), GA (GII), Qβ (GIII) et SP (G IV) (Langlet *et al.*, 2008; Dika *et al.*, 2013). Ce point sera détaillé dans le chapitre suivant.

Dans ce contexte, les phages ARN F-spécifiques ont été sélectionnés pour de nombreux travaux en tant qu'indicateurs potentiels de pollution fécale d'origine virale

(Brion *et al.*, 2002; Ogarzaly et Gantzer, 2006; Ogorzaly *et al.*, 2009), témoins de l'efficacité des traitements de désinfection mais également en tant que modèles d'étude des virus pathogènes dans le cadre du transport des virus dans les sols et les aquifères (Bales *et al.*, 1993; Collins *et al.*, 2006; DeBorde *et al.*, 1999; Schijven et Simunek, 2002; Sinclair *et al.*, 2009).

## III. Les bactériophages ARN F-spécifiques

Ce chapitre présentera tout d'abord une description structurale des phages ARN F-spécifiques, afin d'apprécier leurs différents points communs avec la majorité des virus entériques pathogènes. Une seconde partie consistera en une analyse bibliographique des données publiées sur les propriétés physico-chimiques exprimées par la surface de ces phages, ce point constituant l'originalité de l'utilisation des bactériophages ARN F-spécifiques étant donné que la description des propriétés de surfaces n'est, pour l'heure, pas décrite pour des virus entériques pathogènes.

### 1. Structure des phages ARN F-spécifiques

Les bactériophages ARN F-spécifiques de la famille des *Leviviridae* sont les phages dont la structure est la plus proche de celle des virus entériques pathogènes. En effet, ce sont des virus nus, d'un diamètre compris entre 20 et 30 nm et ils sont constitués d'une capside polyédrique de nature protéique à l'intérieur de laquelle se trouve un génome à ARN simple brin qui est le support de l'information génétique (**Figure 6**). Il existe deux genres : les *Levivirus*, exemple des phages MS2 (génogroupe I) et GA (génogroupe II), et les *Allolevivirus*, exemple des phages Qβ (génogroupe III) et SP (génogroupe IV).

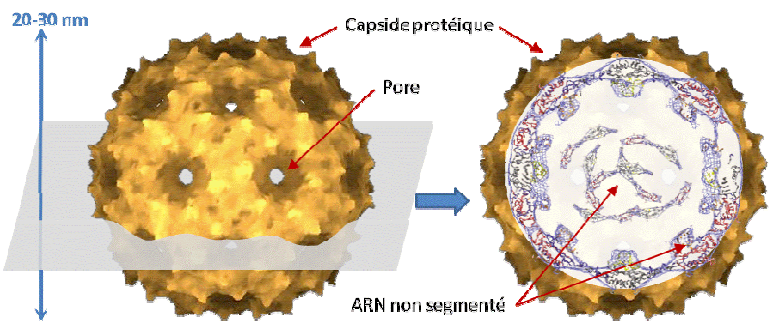



**Figure 6. Schéma d'un bactériophage ARN F-spécifique (Extrait de Langlet, 2008).**

### 1.1. Le génome des phages ARN F-spécifiques

L'ARN de ces bactériophages comporte quatre gènes dont trois sont communs à la famille des *Leviviridae* alors que le dernier gène est dépendant du genre auquel appartient le phage. Les gènes communs sont les gènes codants :

- La protéine de maturation (ou protéine A) qui est indispensable à l'interaction entre le phage et le récepteur cellulaire.
- La protéine constitutive de la capside.
- La réplicase, qui est une ARN polymérase ARN dépendante, nécessaire à la réplication du génome viral dans la cellule bactérienne.

Le dernier gène est, soit une protéine de lyse impliquée dans la lyse bactérienne pour le genre *Levivirus* (bactériophages MS2 et GA), soit une protéine " readthrough " pour les *Allolevivirus* (bactériophages Qβ et SP). Dans ce dernier cas, la lyse de la cellule est assurée par la protéine de maturation et la protéine " readthrough " intervient au niveau de l'infectivité des bactériophages (Klovins *et al.,* 2002).

La taille du génome diffère en fonction du genre, celui des *Allolevivirus* est 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). Pour tous ces bactériophages, une partie du génome est en contact avec la face interne de la capside protéique (**Figure 6**).

Pour chacun des deux genres, les phages sont répartis en génogroupes : génogroupes I et II pour les *Levivirus*, génogroupes III et IV pour les *Allolevivirus*. Selon l'analyse phylogénétique de Bollback et Huelsenbeck (2001), l'ancêtre commun serait plus proche du genre actuel *Levivirus* (levi vient du latin " léger "). Il y aurait eu, par la suite, une expansion de gènes par mutations aboutissant au genre *Allolevivirus* (allo vient du grec " autre ") et par conséquent la séparation en deux groupes (**Figure 7**).

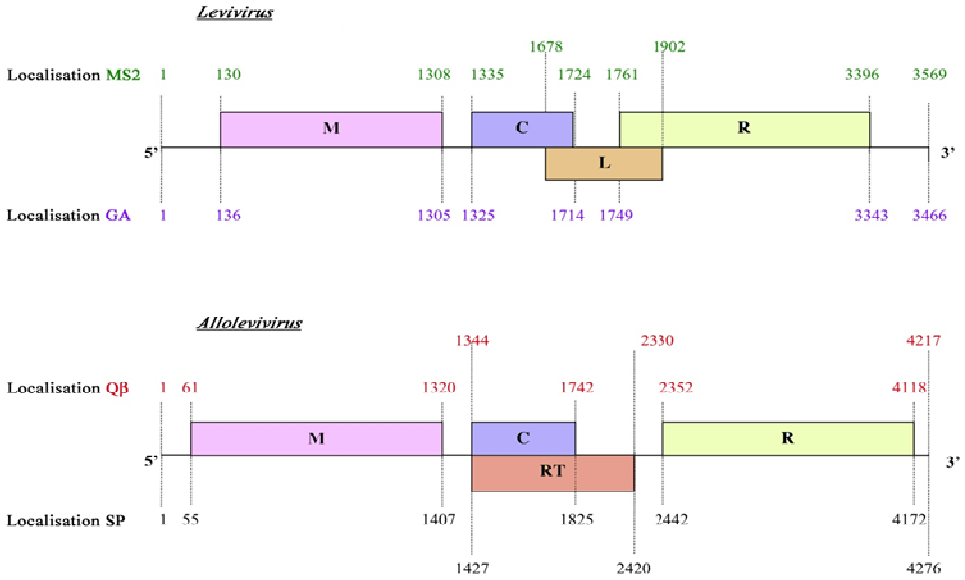



**Figure 7. Organisation génétique de l'ARN des bactériophages MS2 et Qβ (Inokuchi *et al.*, 1986; Inokuchi *et al.*, 1988; Priano *et al.*, 1995; Bollback et Huelsenbeck, 2001).** **M : gène de la protéine de maturation, C : gène de la protéine de capside, R : gène de la réplicase, L : gène de la protéine de lyse, RT : gène de la protéine " readthrough ". Les gènes communs sont représentés au-dessus du génome et le gène différent en-dessous. Les localisations des gènes des phages MS2 et Qβ sont indiquées dans les parties supérieures des schémas. Les séquences sont issues de la base de données Genbank avec les références suivantes : MS2 (NC_001417) et Qβ (AY099114) (extrait de Ogorzaly, 2009).**

## 1.2. La capside

La capside est une " coque " de nature uniquement protéique 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 sont regroupées en unités morphologiques : les capsomères. Cette protéine de capside, constituée de 130 acides aminés pour les *Levivirus* et 132 pour les *Allolevivirus*, présente trois conformations différentes : A, B et C. L'assemblage d'un exemplaire de chacune des trois conformations forme un capsomère. 60 capsomères s'associent entre eux pour former un icosaèdre. Chaque particule virale possède donc 180 copies de la protéine de capside. Une seconde protéine appelée protéine de maturation est présente en un seul exemplaire. Les protéines de capside et la protéine de maturation présentent des régions hydrophobes, hydrophiles et chargées, qui auront une influence sur les propriétés de surface de ces bactériophages.

# 2. Propriétés de surface des phages ARN F-spécifiques

## 2.1. La charge globale de surface

### 2.1.1. Notion d'interface virale

Une nouvelle définition de la surface virale a été proposée en 2008 en ce qui concerne les bactériophages ARN F-spécifiques MS2, Qβ, GA et SP (Langlet *et al.,* 2008). En effet, ces travaux ont montré qu'une partie du génome viral était accolé à la face interne de la capside et que les propriétés physico-chimiques du génome pouvaient ainsi s'exprimer à travers les pores et influencer les propriétés physico-chimiques de la capside. Ceci a été confirmé par Dika *et al.* (2012) qui ont travaillé sur des bactériophages MS2 et des VLP (Virus Like Particle, ou capside théoriquement dépourvue de génome) de phage MS2 et démontré une différence de comportement en termes d'agrégation et de mobilité électrophorétique. Une particule virale interagirait donc avec son environnement à travers une interface, notion qui permet de prendre en compte la souplesse de la particule d'un point de vue mécanique mais également sa perméabilité hydrodynamique.

### 2.1.2. Détermination de la charge de l'interface virale

Les protéines constitutives de la capside sont composées d'acides aminés pouvant exprimer une charge au niveau de leur chaîne latérale ainsi qu'à leurs extrémités. Cette charge est notamment due aux groupements carboxyles et amines. Au niveau de la chaîne latérale des acides aminés, les groupements ($NH_2$, COOH, SH…) définis par leur pKa (constantes d'ionisation), peuvent s'ioniser en fonction des valeurs de pH du milieu, donnant ainsi une certaine charge globale à la protéine. Le point isoélectrique (*pI*) d'une particule défini le pH en dessous duquel la particule présentera une charge globale positive et au-dessus duquel la particule sera chargée négativement (**Figure 8**). Trois approches ont été utilisées ces dernières années pour déterminer le point isoélectrique de particules virales. Il s'agit de méthodes permettant d'avoir une approche qualitative comme le calcul théorique et la détermination expérimentale par électrophorèse, ou de méthodes quantitatives avec la détermination expérimentale à partir de données de mobilité électrophorétique. Bien que des différences soient mesurées en fonction de la méthode de détermination, de manière générale on peut estimer que l'interface des particules virales à des pH voisins de la neutralité est chargée négativement (Michen et Graule, 2010).

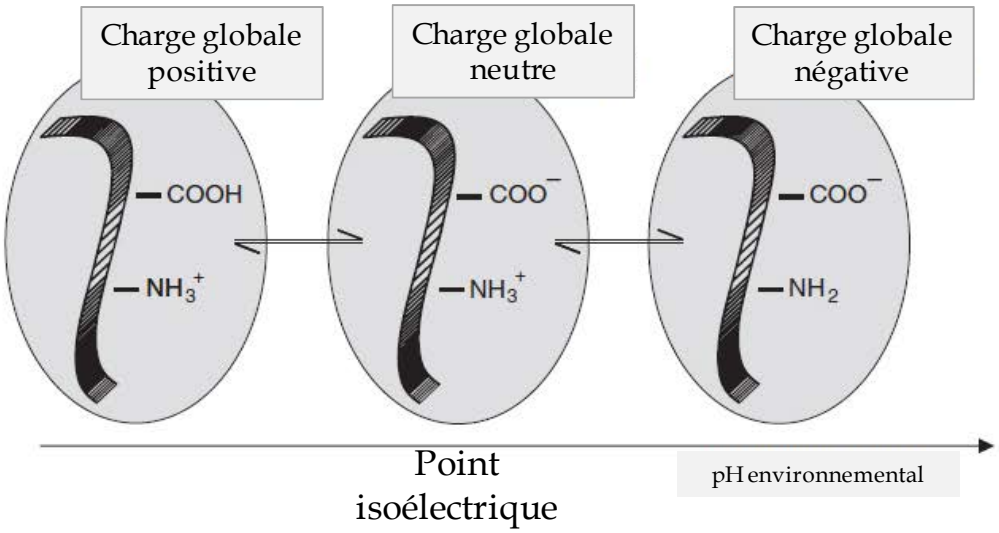



**Figure 8. Représentation schématique de l'état d'ionisation des protéines en fonction du pH (Michen et Graule, 2010).**

- Méthodes qualitatives de détermination du point isoélectrique

La détermination du point isoélectrique peut se faire par le biais d'un calcul théorique ou par des mesures expérimentales de focalisation isoélectriques ou d'électrophorèse. (i) Le calcul théorique des charges interfaciales peut être réalisé à partir des pKa des acides aminés des protéines de la capside. Ceci implique de ne prendre en compte ni les liaisons peptidiques, ni le repliement des protéines, ni *a fortiori* l'influence des charges du génome. Ce mode de détermination du p*I* donne des valeurs supérieures à 7. Par exemple, pour les phages ARN F-spécifiques ce calcul conduit à des valeurs comprises entre 8,2 pour le phage MS2 et 9,7 pour le phage GA (Langlet, 2008). (ii) La détermination expérimentale des *pI* par focalisation isoélectrique ou électrophorèse donne, des valeurs inférieures à celles obtenues lors du calcul théorique. Par exemple, d'après cette méthode de détermination, le point isoélectrique du phage MS2 se situe entre 3,5 et 3,9 (Overby *et al.*, 1966; Zerba *et al.*, 1982; Penrod *et al.*, 1995) et celui du phage Qβ serait de 5,3 (Overby *et al.*, 1966). Toutefois, ces techniques nécessitent un marquage par immuno-fluorescence ou immuno-radiomarquage et donc l'utilisation de molécules pouvant modifier en partie les propriétés physico-chimiques de la particule virale, dont sa charge. Ces modes de détermination du point isoélectrique permettent uniquement de qualifier la surface de positive ou négative en fonction du pH (Michen et Graule, 2010). Afin d'obtenir des informations quantitatives sur la charge virale d'autres mesures peuvent être envisagées.

- Méthodes quantitatives de détermination du point isoélectrique

Afin d'avoir une approche quantitative de la charge de surface des particules virales, la mobilité électrophorétique de particules non marquées a été étudiée en mesurant leur vitesse de migration lorsqu'elles sont soumises à un champ électrique. Cette vitesse de migration rapportée au champ électrique permet d'estimer la mobilité électrophorétique (μ). Le *pI* correspond au pH pour laquelle la mobilité électrophorétique est nulle. Dans une solution de $NaNO_3$ à 1 mM et pH 6, Langlet *et al*. (2008) observent que la mobilité électrophorétique du phage Qβ est plus négative que la mobilité électrophorétique du phage MS2 (μQβ < μMS2), les valeurs sont respectivement d'environ $-3.10^{-8} m^2.V^{-1}.s^{-1}$ et $-2.10^{-8} m^2.V^{-1}.s^{-1}$ à pH 6. En maintenant le pH à 6 et en augmentant la force ionique ($NaNO_3$ à 100 mM), leur mobilité électrophorétique augmente (la valeur absolue de μ diminue) et la différence entre ces deux bactériophages est moins marquée puisque les deux valeurs sont voisines de $-1.10^{-8} m^2.V^{-1}.s^{-1}$ (**Figure 9**). Lorsque la force ionique augmente ou lorsque le pH diminue, des phénomènes d'agrégation apparaissent (Langlet *et al*., 2008) et l'interprétation des valeurs de mobilité électrophorétique devient délicate.

Ainsi, même si les données de la littérature sont encore très fragmentaires, elles mettent en évidence une différence de mobilité entre les phages MS2 et Qβ à faible force ionique pour un pH de 6. Ces travaux ont permis de déterminer des valeurs de points isoélectriques de 3,1 pour le phage MS2, de 2,1 pour le phage GA, de 2,7 pour le phage Qβ et de 2,1 pour le phage SP.

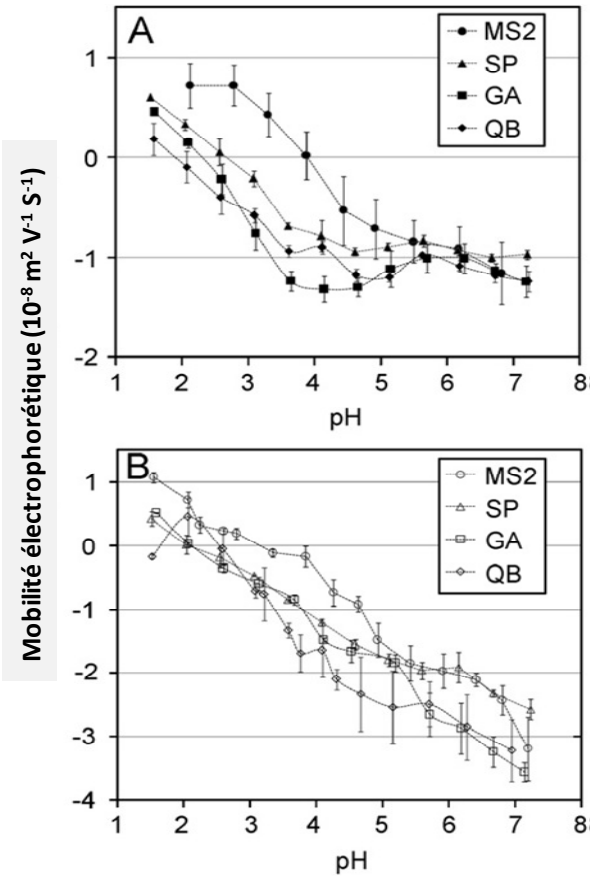



**Figure 9. Mesures de mobilité électrophorétique pour les phages ARN F-spécifiques dans du $NaNO_3$ à faible (1mM) et forte (100 mM) force ionique (Langlet *et al.*, 2008).**

## 2.2. La balance hydrophile/hydrophobe

La capside virale, de nature protéique, comporte des domaines hydrophobes et des domaines hydrophiles liés à la nature des acides aminés qui la constituent, ainsi qu'aux structures secondaires et tertiaires des protéines. Le ratio entre ces domaines (*i.e.* la balance hydrophile-hydrophobe) est considéré comme un paramètre essentiel pour prédire la capacité d'adhésion du virus à des surfaces (Gerba, 1984). Les interactions hydrophobes sont non covalentes et non électrostatiques. Pour van Oss (2003), les interactions hydrophobes sont, d'un point de vue quantitatif, les interactions les plus fortes dans le milieu aqueux. En effet, dans l'eau, des interactions polaires ou acide-base de Lewis se forment entre groupements et molécules polaires capables de former ou d'accepter des liaisons hydrogène. Des composés ou des groupements apolaires, qui ne peuvent ni accepter, ni former de liaisons hydrogène, auront tendance à se rassembler pour minimiser leur contact avec l'eau.

Plusieurs approches ont été utilisées pour estimer le caractère hydrophile-hydrophobe des microorganismes, telles que la chromatographie d'interaction hydrophobe (CIH) ou la

mesure de l'adhésion à une surface plus ou moins hydrophobe solide ou liquide, réalisée dans les tests MATH (Test d'Adhésion Microbienne aux Hydrocarbures). Cependant, il a été montré que la majorité des adsorbants utilisés dans les tests MATH ou pour la CIH véhiculent une charge négative causée en partie par l'orientation des molécules d'eau à l'interface eau-solvant et génèrent des interactions électrostatiques (Busscher *et al.*, 1995; Ahimou *et al.*, 2001). L'interprétation des résultats obtenus avec ces méthodes s'avère donc difficile car il faudrait connaître précisément les charges associées à la surface afin de pouvoir déduire la balance hydrophile-hydrophobe de la particule virale. Néanmoins, si l'on néglige ces biais méthodologiques il a été démontré que les interactions hydrophobes jouent un rôle important dans l'attachement des particules virales à des solides (Van Voorthuizen *et al.*, 2001; Shield et Farrah, 2002). Shield et Farrah (2002) constatent que de nombreux virus s'adsorbent massivement sur une membrane hydrophobe (octyl sépharose) suite à l'écrantage des charges de surface de la membrane et des virus dans une solution de NaCl 4M à pH 7.

Une autre approche consiste à étudier l'agrégation des virus. Elle est observée lorsque les charges de la surface virale sont masquées par les ions de la solution. Des études d'agrégation phagique dans le but d'évaluer l'hydrophobicité ont ainsi été réalisées dans des solutions de $NaNO_3$ pour des phages ARN F-spécifiques appartenant à différents génogroupes (Langlet *et al.*, 2008). Les résultats obtenus indiquent que les bactériophages GA et SP s'agrègent quel que soit le pH (de 2 à 7) et la force ionique (1 et 100 mM) du milieu. Par contre, le pH et la force ionique vont influencer la capacité d'agrégation des phages MS2 et Qβ. Ainsi, le phage MS2 ne s'agrège que pour des pH inférieurs à 4,5 quelle que soit la force ionique appliquée (1 ou 100 mM). Le phage Qβ présente, quant à lui, un comportement similaire à MS2, pour une force ionique de 1 mM, en s'agrégeant à pH acide (pH=4). A forte force ionique, le phage Qβ s'agrège dès que le pH est inférieur à une valeur de 6. On observe donc une différence nette de comportement entre les phages des différents génogroupes avec la détermination d'une séquence d'hydrophobicité du type GA, SP > Qβ > MS2, le bactériophage MS2 étant le moins hydrophobe.

Les virus vont donc présenter à leur interface des propriétés qui leurs sont propres et résultent en partie, de leur charge globale, directement dépendante de l'équilibre entre les charges de la capside et du génome, et de la balance hydrophile-hydrophobe de leur capside.

## IV. Etude de l'adsorption virale sur les biofilms

Les surfaces rencontrées par les virus possédent elles aussi des propriétés physico-chimiques qui leurs sont propres et qui interviennent dans les phénomènes d'adhésion virale. Dès lors qu'une surface est en contact avec de l'eau, une partie des microorganismes présents dans celle-ci vont adhérer sur les surfaces et former une matrice complexe communément appelée biofilm. Il existe de grandes variétés de biofilms, les biofilms dentaires, les biofilms formés dans les rivières d'eau douce ou sur les récifs d'eau de mer, mais également dans les systèmes de traitement des eaux usées ou les systèmes de distribution d'eau potable, pour ne citer que quelques exemples. Dans le présent chapitre, seuls les biofilms d'eau de distribution seront abordés. Dans un premier temps une définition de la notion de biofilm sera proposée. Une analyse des facteurs influençant les interactions entre des particules colloïdales telles que les virus et une surface telle que le biofilm constituera la seconde partie.

### 1. La notion de biofilm dans les réseaux de distribution d'eau

Très rapidement après leur mise en service, les parois des réseaux de distribution d'eau sont colonisées par une structure complexe communément appelée biofilm. Cela découle du fait que ces réseaux sont continuellement exposés à un flux de matière, dont des microorganismes naturellement présents dans l'eau et ne présentant aucun danger pour la santé humaine. Ainsi, dans les réseaux de distribution d'eau, la plus forte densité de microorganismes se rencontre à la surface des matériaux constituant ces réseaux (Flemming *et al.,* 2002). La résistance et la prolifération des bactéries dans ces conditions sont dues à leur organisation en biofilm, correspondant à l'association de microorganismes inclus dans une matrice d'exopolymères contenant également des débris particulaires et des produits de corrosion à la surface des différents matériaux. Des champignons, algues, levures, virus et protozoaires sont également retrouvés dans les biofilms.

Comme vu précédemment, des incidents survenant au niveau des stations de potabilisation des eaux ou sur les réseaux peuvent être à l'origine de la présence de microorganismes indésirables dans l'eau et ceci malgré la présence d'une concentration résiduelle en chlore circulant, généralement de l'ordre de 0,1 mg/L (De serre *et al.,* 1999; Nygard *et al.,* 2003; Maunula *et al.,* 2009). Les virus entériques peuvent être considérés comme des biocolloides inertes dans un tel environnement et leur devenir va dépendre de

plusieurs paramètres. En effet, l'hydrodynamique du réseau, les conditions physico-chimiques du milieu ainsi que les propriétés de surface exprimées par les parois du réseau et donc *a fortiori* le biofilm vont avoir un impact direct sur l'adsorption des virus. Il est important avant tout de définir la notion de biofilm afin d'envisager l'étude des interactions entre les virus et les biofilms.

### 1.1. Les étapes de formation d'un biofilm

Les principaux microorganismes responsables de la formation d'un biofilm sont les bactéries, en effet ces dernières sont capables d'adhérer, de se répliquer et de sécréter des exopolymères consolidant la biomasse formée à la surface des réseaux de distribution d'eau. D'autres organismes tels que des protozoaires, des virus, des algues, des champignons vont ensuite être capables de se fixer et d'intégrer cette biomasse. Nous nous attarderons spécialement sur la composante bactérienne du biofilm. La prolifération bactérienne sous forme de biomasse est le résultat d'un ensemble de processus physiques, chimiques et biologiques qui se produisent en plusieurs étapes (**Figure 10**).

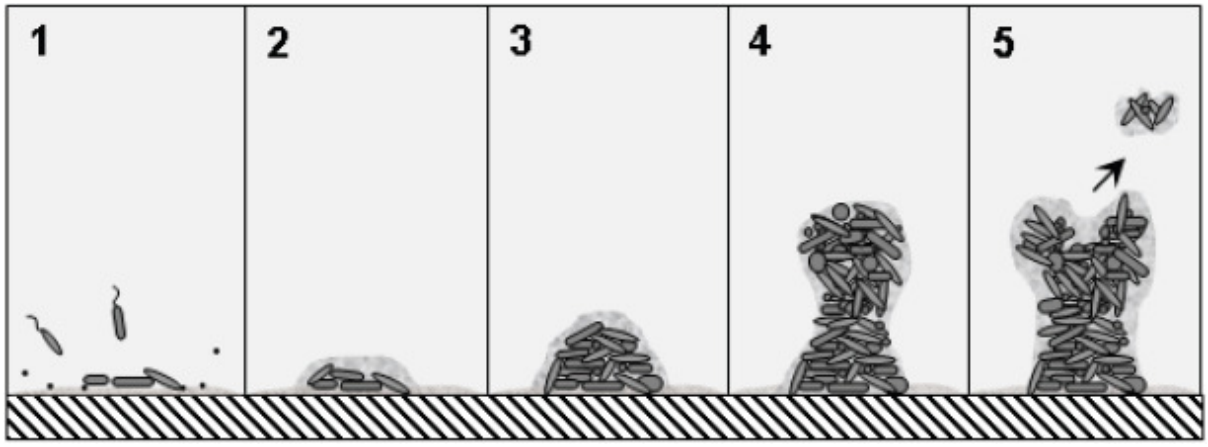



**Figure 10. Etapes de formation d'un biofilm d'eau de distribution (Poitelon *et al.*, 2011) 1 : adhésion de polymères (conditionnement de la surface), 2 : adhésion de bactéries, 3 : synthèse d'une matrice de biopolymères, 4 : Croissance du biofilm, 5 : relargage de portions de biofilm.**

L'étape initiale est la formation d'un film conditionnant (**Figure 10, étape 1**) résultant de l'adsorption de biomolécules (protéines, lipides, minéraux, fragments d'ADN…). Il s'agit de molécules de petite taille, quelques nanomètres, ce qui leur permet une diffusion plus

grande et d'atteindre la surface plus rapidement que les microorganismes. Ce dépôt va très rapidement modifier la surface et ses propriétés physico-chimiques (Schneider, 1997; Abe *et al.*, 2011). Ce film est potentiellement favorable au dépot des microorganismes circulant dans l'eau. Il s'ensuit alors le dépôt des microorganismes sur la surface, qui peut se produire par sédimentation, mouvement brownien, convection, résulter de turbulences dans le flux d'eau ou tout simplement par mobilité des microorganismes éventuellement couplée avec des phénomènes de chimiotactisme dus aux molécules composant le film conditionnant (Busscher et Weerkamp, 1987).

Une seconde étape consiste en l'attachement des microorganismes, et notamment des bactéries, à la surface des conduites du réseau (**Figure 10, étape 2**). Cette étape peut être divisée en deux principaux phénomènes : l'adhérence puis l'adhésion. L'adhérence correspond à une adsorption réversible des cellules, par le biais d'interactions électrostatiques, hydrophobes et d'interactions de Van der Walls. Cette étape est souvent aspécifique et de courte durée (5 à 10 heures) (Gauthier et Isoard, 1989). Elle est suivie par l'étape d'adhésion qui est la fixation irréversible des bactéries. Elle fait appel au métabolisme bactérien par sécrétion d'exopolymères qui consolident leur attachement au support et stabilisent le biofilm (**Figure 10, étape 3**). Les bactéries, qui contrairement aux virus sont capables de se multiplier dans un tel environnement, se multiplient et colonisent le support en formant des colonies structurées dans une matrice d'exopolymères (**Figure 10, étape 4**).

Enfin la maturation du biofilm se poursuit jusqu'à atteindre un équilibre entre d'une part le taux d'accumulation et de croissance du biofilm et d'autre part le taux de détachement de matière par relargage de portions superficielles dans l'eau circulante (**Figure 10, étape 5)**. Deux phénomènes de régulation de l'épaisseur du biofilm sont observés. Les phénomènes d'érosion surviennent quotidiennement et correspondent à des pertes de biomasse localisées à la surface du biofilm. Les phénomènes de dépouillement sont des pertes de portions entières de biofilm pouvant survenir lors de turbulences hydrauliques au sein du réseau (Skraber *et al.*, 2005). Il existe également des phénomènes de prédation essentiellement dus à des protozoaires tels que les amibes et qui peuvent être responsables de l'élimination partielle de la biomasse (Paris *et al.*, 2009).

## 1.2. Organisation des biofilms d'eau potable

### 1.2.1. Les bactéries composant le biofilm

Les premières observations microscopiques de biofilms d'eau potable les décrivaient comme des microcolonies bactériennes aléatoirement déposées sur la surface et composées d'une grande diversité de cellules dominées par des bactéries en bâtonnet (Allen et Geldreich, 1977; Ridgway et Olson, 1981). La composition des biofilms est bien évidemment influencée par la nature de l'eau à partir de laquelle ils se sont formés, mais également par la vitesse d'écoulement de l'eau et la nature de la surface des matériaux composants les parois. Ainsi Percival *et al*. (1999) ont observé, pour des biofilms de 5 mois et une vitesse de l'eau de 0,32 $m.s^{-1}$, que le biofilm est essentiellement composé de bactéries en bâtonnet, de diatomées, de quelques hyphes fongiques et de bactéries filamenteuses. Pour une vitesse de l'eau de 1,75 $m.s^{-1}$ la quantité de biomasse après un mois de contact est augmentée ($2,4.10^5$ cellules/$cm^2$) par rapport à une vitesse de 0,32 $m.s^{-1}$ ($3,2.10^3$ cellules/$cm^2$) et le nombre de bactéries filamenteuses plus important (Percival *et al.,* 1999). Plus récemment, Martiny *et al.* (2003) ont étudié la morphologie d'un biofilm de trois ans formé dans un pilote alimenté par de l'eau de distribution et composé d'une boucle de 12 mètres à la surface de laquelle étaient disposés des coupons d'inox. Ils ont pu déterminer que la colonisation du support se fait à partir de bactéries isolées qui se multiplient pour former des microcolonies et qu'après trois ans la biomasse recouvrait 76% de la surface pour une épaisseur pouvant varier entre 15 et 30 µm. La densité bactérienne d'un biofilm de réseau d'eau potable sur les parois est généralement comprise entre $10^5$ et $10^8$ cellules/$cm^2$ (Boe-Hansen *et al*., 2002; Batté *et al*., 2003; Langmark *et al.,* 2005), pour une biomasse bactérienne circulant dans l'eau comprise entre $10^3$ et $10^6$ cellules/mL (Block *et al*., 1993; Servais *et al*., 1995; Sibille *et al.,* 1997). Par contre, seulement 1 à 9% des bactéries composant cette biomasse sont cultivables sur gélose après 15 jours de culture, ce qui explique que l'identification des espèces bactériennes composant cette biomasse soit difficile. Les progrès en biologie moléculaire ont permis une identification plus précise des populations bactériennes composant un biofilm d'eau potable. Ainsi, Martiny *et al.* (2005) ont identifié 12 groupes bactériens dans leurs biofilms parmi lesquels *Acidobacteria*, *Nitrospirae* et *Planctomycetes,* alors que les bactéries cultivables les plus fréquemment mises en évidence appartiennent aux groupes *Proteobacteria* et *Bacteriodetes*.

La structure des biofilms d'eau potable formés en conditions naturelles n'est que partiellement élucidée, en partie en raison de la difficulté à prélever des échantillons *in situ*

dans les réseaux de distribution. Les principales informations sur les biofilms du milieu hydrique ont été obtenues à partir de biofilms générés en laboratoire à l'aide de pilotes d'étude également appelés réacteurs. Ces informations sont ensuite extrapolées à des biofilms *in situ* (Block et Appenzeller, 2001; Paris *et al.,* 2009; Abe *et al.,* 2012). Les biofilms des réseaux de distribution apparaissent globalement comme des structures hétérogènes et discontinues, composées d'agrégats dispersés à la surface du matériau. Le biofilm est composé d'une biomasse stratifiée qui doit être appréhendée comme une structure à trois dimensions (Abe *et al.,* 2011 et 2012). Certaines études effectuées sur des biofilms monoespèces ont permis de déterminer que les agrégats bactériens sont entourés de canaux qui peuvent occuper jusqu'à 50% du volume total du biofilm et qui permettent la circulation d'eau, de nutriments, de particules et éventuellement de microorganismes (Briandet *et al.,* 2008). L'activité métabolique des microorganismes varie en fonction de leur localisation dans le biofilm. En effet, lorsque le biofilm présente une faible épaisseur le transfert d'oxygène et de nutriments ne serait pas limité. Par contre, lorsque le biofilm est plus épais, l'activité respiratoire serait plus faible au niveau des couches profondes et les bactéries présentes seraient protégées de la présence de biocide résiduel circulant dans l'eau.

### 1.2.2. Autres microorganismes composant le biofilm

Les biofilms sont également composés de protozoaires ainsi que d'autres organismes tels que des micromycètes et des microalgues. La population de protozoaires a pu être estimée à $10^3$ cellules/$cm^2$ (Sibille *et al.,* 1998) et les espèces les plus fréquemment identifiées sont *Acanthamoeba*, *Hartmannella* et *Naegleria* (Block *et al.,* 1993; Roger *et al*., 1994). Leur activité de prédation sur les bactéries a pu être supposée dans certains travaux (Pedersen, 1990; Paris *et al*., 2009). Des champignons microscopiques ont également pu être identifiés dans des biofilms d'eau de distribution (Siqueira *et al.,* 2011). Doggett (2000) a dénombré entre 4 et 25 UFC/$cm^2$ pour les micromycètes et jusqu'à 8,9 UFC/$cm^2$ de levures sur des biofilms d'eau de distribution prélevés *in situ*. Concernant les champignons filamenteux, une étude de Gonçalves *et al.* (2006) rapporte que 76% des biofilms formés sur PVC et 54% de biofilms formés sur acier inoxydable présentaient à leur surface la présence de telles structures.

### 1.2.3. Propriétés de surface des biofilms d'eau potable

De par la complexité de composition et d'organisation d'une telle biomasse, il est très difficile d'en étudier les propriétés de surface. En effet, s'il est admis que les biofilms modifient les propriétés de surface originelles des matériaux notamment en termes de charge et la balance hydrophile/hydrophobe (Paris *et al.*, 2009), l'étude des propriétés de surface d'un biofilm s'avère très complexe. A notre connaissance, aucune étude ne donne de conclusions précises quand aux modifications de charge et d'hydrophobicité des surfaces suite à la formation d'un biofilm. Certaines études ont cependant permis d'étudier par des techniques de microscopie à force atomique (AFM) les modifications intervenant dans les phases précoces, de l'ordre de l'heure, lors de la formation du biofilm (Abe *et al.*, 2011 et 2012). Ces auteurs ont montré que dès les premières heures de contact entre des surfaces en verre et de l'eau de distribution, la surface était colonisée par des polymères constituant le film conditionnant pouvant couvrir jusqu'à 11% de la surface. 90% de ces polymères seraient de nature polysaccharidique et 10% de nature protéique (Van Nevel *et al.*, 2012; Abe *et al.* 2011 et 2012).

## 2. Adsorption virale sur les biofilms

Accidentellement introduits dans un réseau de distribution d'eau, les virus entériques vont pouvoir persister dans cet environnement, être transportés, interagir avec les surfaces et éventuellement se fixer au biofilm. Afin de gérer au mieux l'élimination de telles particules, il est nécessaire d'obtenir des informations sur leur devenir dans un tel système. L'adsorption de virus entériques sur les surfaces, en dehors de l'adhésion à leurs cellules hôtes, n'est pas un phénomène d'adsorption spécifique. Le phénomène d'adsorption de ces biocolloïdes sur les surfaces va alors dépendre de deux types de paramètres. Le premier concerne les interactions physico-chimiques qui seront dépendantes des propriétés physico-chimiques de la surface, des propriétés interfaciales des virus, des conditions environnementales (pH, force ionique, température…). Le second implique l'hydrodynamique du système et dépend notamment de la vitesse d'écoulement de l'eau au sein du réseau.

## 2.1. Facteurs physico-chimiques influençant l'adhésion-agrégation des virus

L'adsorption et l'agrégation des virus sont des phénomènes principalement gouvernés par les interactions électrostatiques qui font intervenir les charges de surface et qui sont de plus grande portée que les interactions hydrophobes (Langlet *et al*., 2008; Michen et Graule, 2010). Ces dernières interviennent essentiellement lorsque les charges de surface sont proches de la neutralité. Les interactions de Van der Waals dont le rôle est encore mal identifié dans l'adhésion-agrégation des particules virales seraient de faible intensité mais pourraient jouer un rôle important par leur nombre élevé par comparaison aux interactions électrostatiques et hydrophobes (Sigg *et al.,* 2006).

Ces interactions vont être notamment influencées par les caractéristiques du milieu, comme le pH, la force ionique mais également par les propriétés physico-chimiques du support.

### 2.1.1. Le pH

Le pH va conditionner les interactions des virus avec leur environnement en déterminant la charge globale de la particule virale. Lorsque le pH est égal au *pI* la charge globale de la particule est nulle (**Figure 11**), ce sont les interactions hydrophobes et les forces de Van der Waals qui prédominent sur les interactions électrostatiques. Lorsque ces dernières sont " annulées ", les particules virales peuvent s'agréger. Ainsi, l'agrégation des bactériophages T4, Qβ, MS2 et fr est maximale pour des pH voisins de leur *pI* (Herath *et al.,* 1999). Langlet *et al.* (2008) ont étudié l'agrégation de phages ARN F-spécifiques dans du $NaNO_3$ 1mM pour une gamme de pH décroissante allant de 7 à 2. Les particules de phages Qβ et MS2 sont isolées à pH neutre, s'agrègent à partir de leur point isoélectrique (2 et 4 respectivement) et le restent pour des pH plus faibles. Lorsque le pH atteint le *pI* de la particule, les forces de nature hydrophobe interviennent. Ces forces hydrophobes sont telles que même lorsque le pH redescend en dessous du *pI* des particules, celles-ci restent agrégées alors que théoriquement les particules sont chargées positivement et devraient subir des forces de répulsion électrostatiques. Enfin, pour des pH supérieurs à leur *pI,* ces bactériophages sont chargés négativement et les forces de répulsion de nature électrostatique interviennent. Pour des pH environnementaux la majorité des virus entériques présentent une charge globale négative (**Figure 11**).

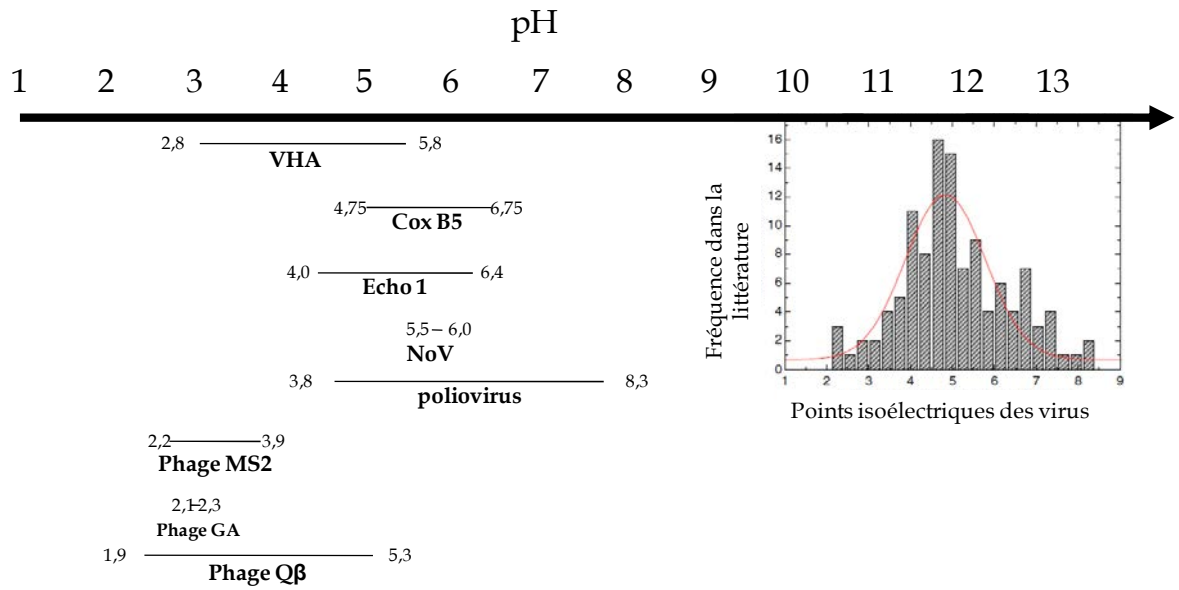



**Figure 11. Points isoélectriques décrits dans la littérature, pour différents virus entériques ainsi que pour les bactériophages ARN F-spécifiques MS2, GA et Qβ (Adapté de Michen et Graule, 2010).** **VHA : Virus de l'hépatite A, Cox B5 : Coxsackievirus B5, Echo 1 : Echovirus 1, NoV : Norovirus.**

### 2.1.2. La composition ionique du milieu

La force ionique du milieu influence le comportement de la particule virale notamment par des phénomènes d'écrantage de la charge de surface. En effet, une augmentation de la force ionique pour un pH maintenu à 7 tend à faire diminuer l'adhésion du bactériophage MS2, chargé négativement, sur une membrane chargée positivement en diminuant les attractions électrostatiques (Shields et Farrah, 2002). Le passage d'une solution tampon contenant 5,28 ± 0,48 log UFP/mL de phage MS2 sur du sable modifié (présentant une charge positive) à pH 7 entraîne un abattement en phage de 5,23 ± 0,51 log UFP/mL dans la solution tampon. Par contre, l'abattement phagique est de 0,12 ± 0,18 log UFP/mL lorsque le tampon est enrichi avec 0,1 M de citrate de sodium. Les ions apportés par le citrate de sodium ont empêché les interactions électrostatiques de se produire et les phages de s'adsorber sur le sable chargé positivement (Lukasik *et al.*, 2000). Ainsi une force ionique élevée entraine un écrantage des charges de surface et les interactions hydrophobes sont alors favorisées.

La valence des ions présents en solution est également un paramètre clé pour favoriser l'adhésion de virus sur un support chargé (Lipson et Stotzky, 1983; Bales *et al.*, 1991; Quignon *et al.*, 1998; Lukasik *et al.*, 2000). En effet, la présence de cations bivalents dans la

solution réduirait non seulement la double couche, couche de Stern et couche de Gouy, qui entoure la particule (**Figure 12**) mais favoriserait aussi la formation d'interactions cationiques pontantes, ou ponts salins, entre la particule et le support (Syngouna et Chryskopoulos, 2010). Pham *et al.* (2009) ont étudié l'influence de deux cations, $Ca^{2+}$ et $Mg^{2+}$, sur l'attachement du phage MS2 à une matrice chargée négativement. Ces auteurs ont observé que la présence d'ion $Ca^{2+}$ en solution favorisait l'adhésion du phage à la matrice par rapport à la présence d'ion $Mg^{2+}$. L'hypothèse émise par les auteurs serait la capacité des ions calcium à former un pont salin entre la surface de la matrice chargée négativement et les charges négatives exprimées par la surface du phage, alors que les ions magnésium ne produiraient qu'un simple écrantage des charges.

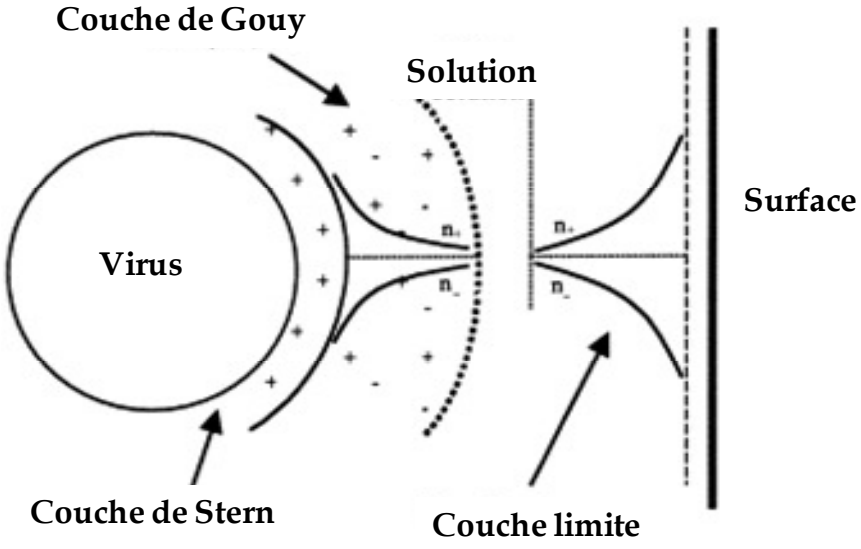



**Figure 12. Apercu schématique de la double couche composant une particule virale (Voorthuizen *et al.*, 2001, adapté de Gerba, 1984).**

### 2.1.3. La charge du support

Lorsque la particule et le support présentent la même charge, des forces de répulsion de nature électrostatique vont intervenir pour repousser les particules, ce qui va avoir pour conséquence de limiter le phénomène d'adhésion. A titre d'exemple, le niveau d'adsorption de VLP (Virus Like Particles, c'est-à-dire particules virales théoriquement dépourvues de génome) de *Norovirus* (nVLP, dont le *pI* est de 5), sur du quartz (chargé négativement pour un pH supérieur ou égal à 2) passe de 99,99% pour un pH de 5 à 17% pour un pH de 7. A un pH de 5 la particule présente une charge globale nulle, d'autres types d'interactions de plus

courte distance peuvent donc intervenir (Redman *et al.,* 1997). Par contre, lorsque le pH augmente, les particules de nVLP vont se charger négativement et le quartz étant également chargé négativement des forces de répulsion de nature électrostatique limitent l'adhésion virale. A l'inverse, lorsque les particules et le support présentent une charge opposée, la particule va être attirée par la surface et son taux d'adhésion adhésion augmenté. Ce principe est utilisé pour concentrer les virus sur des membranes de filtration chargées. A pH 3,5, la charge globale de la capside de la majorité des virus entériques est positive (**Figure 11**), l'utilisation de membranes électronégatives va donc permettre une adsorption virale par l'intervention d'interactions électrostatiques (Gerba *et al.,* 1978; Sobsey *et al.,* 1985; Payment *et al.,* 1989). Le principe inverse peut également être utilisé. Pour des pH supérieurs au *pI* des particules virales, celles-ci présenteront une charge globale négative et l'utilisation de membranes chargées positivement favorisera leur rétention à leur surface. A titre d'exemple, Lukasik *et al*. (2000) ont analysé l'élimination de particules de phage MS2 par filtration sur du sable naturel ou modifié par 0,1 M de $FeCl_3$, lui conférant ainsi une charge positive. Les auteurs ont trouvé une corrélation positive entre la concentration de sel utilisée pour modifier le sable et le taux de rétention des phages par le sable. Des abattements de 7,7 log UFP/mL en présence de sable chargé positivement et un abattement de 0,3 ± 0,3 log UFP/mL sur du sable non traité ont été mesurés témoignant de l'importance de la charge de surface lors des phénomènes d'adsorption (Lukasik *et al.,* 1999).

### 2.1.4. Autres paramètres impliqués dans l'adhésion-agrégation des virus

La température, la concentration en matière organique et en particules virales peuvent également influencer l'adhésion virale aux surfaces. En théorie, l'augmentation de la température du milieu augmente l'agitation thermique et favorise le nombre de collisions entre les particules et le support. Elle serait donc par exemple favorable à une augmentation du phénomène d'agrégation (Rafikova *et al.,* 2003). La présence de matières organiques dans le milieu diminuerait l'adsorption virale sur des surfaces. Cela résulterait de la compétition entre la matière organique et les virus pour les sites d'adsorption (Moore *et al.,* 1981; Sobsey et Hickey, 1985). Enfin, plus la concentration virale augmente dans une solution plus la probabilité de rencontre entre les virus et la surface augmente. Cependant, la probabilité de choc efficace va directement dépendre des propriétés physico-chimiques des particules virales, des supports, mais également des conditons hydrodynamiques du milieu régissant le transport des particules.

## 2.2. Impact de l'hydrodynamique sur l'adsorption virale à des surfaces

Le transport des microorganismes dans le milieu hydrique est fortement influencé par l'absence (conditions hydrostatiques) ou la présence (conditions hydrodynamiques) d'un flux d'eau. Ce transport des particules fait intervenir, la diffusion Brownienne, la convection, éventuellement la migration (pour les microorganismes dotés d'un flagelle par exemple) et enfin la sédimentation pour les particules dont la taille dépasse le micromètre. Les virus entériques, de par leur taille comprise entre 20 et 30 nm, peuvent être considérés comme des biocolloïdes inertes qui ne sont pas soumis à la sédimentation, ni à la migration. Pour les virus, le nombre de Peclet étant le rapport entre la convection et la diffusion est très petit, ce qui induit une diffusion pure même en absence d'écoulement. Les parois sont alors le siège de l'adsorption des particules virales qui subissent la diffusion Brownienne (Bird, 2007). Les conditions hydrodynamiques du milieu vont également conditionner leur transport vers les surfaces. De ce fait, ces particules virales sont théoriquement soumises à la diffusion Brownienne en l'absence de flux et à la diffusion ainsi qu'au transfert convectif en présence d'un écoulement (Bird, 2007).

### 2.2.1. Conditions hydrostatiques et diffusion Brownienne

En absence d'écoulement, les particules colloïdales en suspension ne sont jamais immobiles, elles sont soumises à l'agitation thermique responsable d'un mouvement rapide et désordonné des particules qui s'entrechoquent aléatoirement entre elles ainsi qu'avec les molécules du fluide qui les entoure. Ce mouvement aléatoire détermine leur coefficient de diffusion, lequel est inversement proportionnel à la taille des particules, cela signifie que plus la particule est petite, plus elle va diffuser rapidement dans le milieu (**Equation 1**, Stokes-Einstein).

$$D = \frac{K_B \times T}{6 \times \pi \times \mu \times r} \qquad \textbf{Equation 1}$$

Avec $K_B$ la constante de Boltzmann ($1{,}38.10^{-3}$ J/K), T la température (K), μ la viscosité dynamique de l'eau ($10^{-3}$ $m^2.s^{-1}$) et r (m) le rayon de la particule colloïdale. Une éventuelle agrégation des particules virales aura une incidence directe sur le coefficient de diffusion et

le transfert des particules. Le coefficient de diffusion dépend également de la viscosité du milieu dans lequel la particule se trouve puisque son augmentation entraîne une diminution de la diffusion des particules. Enfin, une augmentation de la température va provoquer une augmentation de la diffusion des particules.

### 2.2.2. **Conditions hydrodynamiques et transfert convectif**

En présence d'un flux hydrodynamique, les particules sont convectées par l'écoulement tout en subissant la diffusion Brownienne. Ce transport convectif dépend fortement de la nature de l'écoulement qui peut être de deux natures, laminaire ou turbulent. En conditions laminaires d'écoulement, les lignes de coutant restent parallèles et le profil de vitesse décrit une parabole (**Figure 13**). Dans des conditions d'écoulement turbulent, des tourbillons hydrodynamiques induisent un brassage important au cœur de l'écoulement ce qui modifie très fortement le profil de vitesse et notament les gradients de vitesse près de la paroi (**Figure 13**).

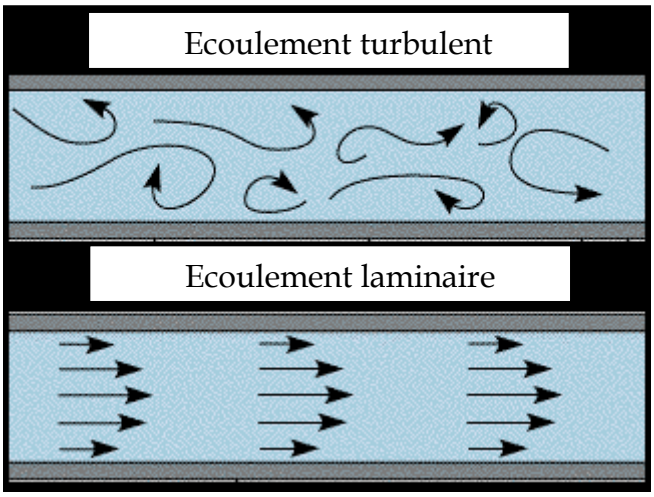



**Figure 13. Représentation schématique d'un écoulement laminaire ou turbulent.**

En conditions d'écoulement laminaire, le flux (Ø) de virus arrivant à la surface (A) va dépendre de la concentration virale dans l'eau ($C_0$), du gradient pariétal de vitesse ($\gamma$), de l'eau à la surface qui est directement lié à la vitesse de l'eau, du coefficient de diffusion (D) de la particule et donc de sa taille, et enfin des dimensions de la surface d'observation (L : longueur de la surface A considérée) (**Equation 2**).

$$Ø = A \times C_0 \left(\frac{\gamma \times D^2}{L}\right)^{1/3}$$ **Equation 2**

En théorie, A et L sont constantes. Lors d'un écoulement laminaire, plus la vitesse du fluide est importante plus le flux de virus arrivant à la surface est important. Ceci est valable jusqu'à un certain seuil où les forces de cisaillement, qui sont proportionelles au gradient pariétal (γ), commencent à arracher les particules virales adhérées à la paroi.

La plupart des études consacrées à l'adsorption de microorganismes sur des surfaces concernent des bactéries et des résultats contradictoires sont retrouvés dans la littérature. En effet, certaines études montrent qu'une augmentation de la vitesse d'écoulement correspond à une augmentation du nombre de bactéries formant le biofilm (Percival *et al.,* 1999; Ollos *et al.,* 2003; Lehtola *et al.,* 2006). En revanche, d'autres auteurs montrent le phénomène inverse, avec une augmentation de la vitesse d'écoulement d'eau aboutissant à une diminution de la biomasse du biofilm (Donlan et Pipes, 1988; Ragazzo, 2002). Ces résultats contradictoires montrent la difficulté à déterminer la limite entre les effets favorables à l'adsorption et ceux favorables à l'arrachage. En effet, les bactéries ont la capacité de se reproduire dans l'environnement hydrique, leur nombre dans le milieu ainsi que dans le biofilm peut donc évoluer au cours du temps.

Lors d'un écoulement turbulent les particules colloïdales auraient une plus forte probabilité de rencontrer la surface du fait du brassage plus important et la quantité de bactéries adsorbées sur les surfaces serait théoriquement plus importantes en conditions turbulentes par comparaison à un flux laminaire.

## 3. Interactions entre les virus et les biofilms

L'étude des interactions entre les virus entériques et les biofilms sous-entend de prendre en considération l'adsorption virale sur les biofilms, la persistance des virus infectieux au sein des biofilm, ainsi que l'effet protecteur que peut leur procurer le biofilm notamment vis-à-vis des biocides présents dans l'eau. Il est également important d'évoquer la notion de relargage ou de désorption des particules virales adsorbées à des portions de biofilm. Un faible nombre d'études a été consacré à l'interaction des virus avec les biofilms et la majorité d'entre elles concerne des travaux réalisés dans des pilotes permettant la maîtrise

de paramètres nécessaires à l'interprétation des résultats. Le bactériophage le plus couramment choisi dans la littérature en temps que modèle pour l'étude de l'adsorption virale sur les surfaces colonisées par des biofilms est le phage MS2 (Hock et Botzenhart, 2002; Storey et Ashbolt, 2001 et 2003; Helmi *et al.,* 2008).

Avant de faire une revue de la littérature concernant l'état des connaissances sur les interactions entre les virus et les biofilms, il est important d'évoquer des éléments purement méthodologiques soulignant la complexité de telles analyses et la variabilité des mesures effectuées.

### 3.1. Conditions expérimentales à prendre en considération

Les conditions expérimentales retrouvées dans la littérature concernant les interactions entre les virus et les biofilms sont loin d'être homogènes. Ainsi, il est nécessaire de prendre en considération certains éléments méthodologiques avant d'effectuer une confrontation des résultats bibliographiques.

Tout d'abord, la majorité des études sont réalisées dans des pilotes artificiellement contaminés par un type et une quantité de virus choisis. L'utilisation de pilotes permet également de maîtriser certains paramètres tels que la température, l'eau à partir de laquelle le biofilm sera formé (eau potable, eau usée, eau de mer…), l'âge du biofilm, les matériaux étudiés (fonte, PVC, PEHD, ciment…). Ces éléments sont autant de variables retrouvées dans les travaux.

Le protocole choisi pour récupérer les virus infectieux adsorbés sur le biofilm constitue un autre élément de variabilité. La récupération de virus afin de détecter leur infectiosité nécessite de les éluer dans un tampon et implique la notion de rendement d'élution. A titre d'exemple, Quignon *et al.* (1997) estiment qu'ils récupèrent 18% de poliovirus 1 lors de l'analyse d'un biofilm d'eau potable de 30 jours. Storey et Ashbolt (2001) obtiennent un rendement de récupération de 83% pour le bactériophage MS2 au sein d'un biofilm d'eau potable de 70 jours. Hock et Botzenhart (2002) ont mesuré les taux de récupération virale obtenus pour huit tampons d'élution et ceux-ci variaient de 5 à 60%. Helmi *et al.* (2010) ont comparé six protocoles d'élution utilisant du lait écrémé ou de l'extrait de bœuf comme éluant, ainsi que différents traitements physiques adjuvants (sonication, centrifugation). Ils ont déterminé que sur des biofilms d'eau potable de sept semaines, le protocole de récupération le plus efficace pour le phage MS2 consistait en une élution avec un tampon

contenant de l'extrait de bœuf (1%) à pH 9 et de la glycine (50 mM) suivie d'une sonication, d'une centrifugation à 1500 g, puis d'une neutralisation du pH du surnageant pour éviter l'inactivation des particules virales par un pH basique. Les virus étaient ensuite concentrés sur des colonnes Macrosep chargées positivement.

Afin d'éviter cette étape d'élution virale, une alternative basée sur la détection du génome devrait permettre d'obtenir des rendements plus importants. Il s'agit d'effectuer une lyse directe des particules virales sur le coupon et ainsi de s'affranchir de l'étape d'élution/concentration. Il faut tout de même s'assurer de l'absence d'inhibiteurs de PCR afin d'obtenir des résultats optimaux (Helmi *et al.*, 2010). Dans ces conditions, le référentiel n'est plus la particule virale infectieuse mais plutôt la présence d'une copie de génome.

Au vu de ces différents éléments, la comparaison des études est extrêmement délicate. Seules les données obtenues dans des conditions expérimentales strictement identiques permettraient de comparer de manière rigoureuse les taux d'adsorption virale.

### 3.2. Recherche de virus dans les biofilms environnementaux prélevés *in situ*

Les études effectuées *in situ* sont rares de par la difficulté d'accès aux systèmes de distribution d'eau et le manque de connaissances des conditions subies durant la formation des biofilms. Le cas le plus simple consiste en l'analyse d'eaux usées dans lesquelles la concentration en virus entériques est suffisamment élevée pour permettre une quantification virale. Il est ainsi possible de faire le lien entre la concentration virale dans l'eau et celle dans le biofilm correspondant. Ainsi Skraber *et al.* (2009) ont étudié, durant sept mois, à l'aide de réacteurs placés à l'entrée de stations de traitement des eaux usées, la concentration virale de l'eau usée ainsi que celle du biofilm formé sur les parois. Ils ont notamment recherché la présence d'entérovirus, de norovirus et de phages ARN F-spécifiques, à l'aide de techniques de biologie moléculaire. Tous les virus identifiés dans l'eau ont également été identifiés au sein du biofilm ce qui témoigne bien d'un transfert des virus de l'eau vers les biofilms. Cependant, l'eau ne présentait du génome d'entérovirus que durant un mois et du génome de norovirus que durant trois mois, alors que le biofilm contenait du génome viral durant l'intégralité de la période d'analyse (sept mois). De tels résultats soulignent la persistance des virus dans cet environnement. Des résultats présentant des conclusions similaires avaient été précédemment obtenus par Skraber *et al.* (2007).

Des expérimentations ont également été réalisées à l'aide de réacteurs placés au sein de réseaux de distribution d'eau. Hock et Botzenhart (2002) ont placé des réacteurs équipés de coupons de polyéthylène, de PVC, de cuivre ou d'inox (n=92) présentant une surface moyenne de 27,6 $cm^2$ sur des périodes comprises entre six semaines et 2 ans. La présence de génome d'entérovirus (n=92), de rotavirus (n=48) et de norovirus (n=40), ainsi que la présence d'entérovirus (n=92), de coliphages somatiques (n=92) et de phages ARN F-spécifiques (n=88) infectieux a été recherchée au sein des biofilms. Un seul prélèvement s'est avéré positif et contenait des coliphages somatiques infectieux. Une étude de Lethola *et al*. (2005) était basée sur l'utilisation d'un pilote constitué de deux boucles successives de 100 mètres chacune en cuivre ou en matériau composite polyéthylène-aluminium-polyéthylène. Ce pilote a été alimenté durant 308 jours par de l'eau potable. Les auteurs ont récupéré le biofilm sur les surfaces à l'aide d'un traitement physique (agitation en présence de billes de verre) et filtration de la suspension obtenue sur une membrane de porosité 0,02 µm. Ils ont mis en évidence la présence de particules fluorescentes après marquage de leur suspension avec du SYBR Green I. Les auteurs ont considéré ces particules fluorescentes comme des particules virales de par leur petite taille, sans pour autant confirmer leur hypothèse par des techniques de détection spécifiques aux virus (Lehtola *et al.*, 2005).

Peu d'études décrivent des analyses de biofilms prélevés *in situ*, soit directement sur le réseau de distribution d'eau potable, soit dans des usines de traitement des eaux en vue de leur potabilisation. Skraber *et al.* (2005) reportent les données d'une étude effectuée par Vanden Bossche (1994) qui a prélevé des biofilms au sein d'une station de potabilisation et détecté des entérovirus infectieux dans l'intégralité des échantillons (n=4). En effet, des prélèvements de biofilms effectués au niveau des filtres à sable et à charbon actif ainsi que sur une canalisation de sortie d'usine, auraient révélé la présence d'echovirus et de coxsackievirus B infectieux. Plus récemment, l'analyse de biofilms âgés de 1 à 100 ans présents sur des conduites d'un réseau de distribution d'eau potable en PVC, acier et fonte n'a pas mis en évidence de génome d'entérovirus (n=18), de rotavirus (n=7) et de norovirus (n=5) (Hock et botzenhart, 2002). Enfin, Lethola *et al.* (2004) ont appliqué un protocole de nettoyage basé sur l'application d'un jet d'eau et d'air sur les parois d'une conduite d'eau âgée de 40 ans. Ils ont ensuite recherché par biologie moléculaire la présence de norovirus dans les échantillons de biofilms récupérés, mais tous les échantillons se sont avérés négatifs.

Ainsi, concernant les études *in situ*, il est impossible de déterminer des taux d'adsorption viraux étant donné que la quantité de virus présents dans le milieu est inconnue. Ces études démontrent seulement que le transfert des particules virales de l'eau vers les surfaces est possible selon un coefficient de partage indéterminé.

### 3.3. Expérimentations d'adhésion virale sur des biofilms formés en laboratoire à l'aide de réacteurs

A l'heure actuelle, le nombre d'études consacrées à l'adsorption des virus entériques sur des biofilms est limité. Afin de pouvoir interpréter au mieux les résultats obtenus, il est nécessaire de maîtriser certains paramètres tels que la concentration virale initialement présente dans l'eau et le temps de contact entre l'eau contaminée et le biofilm, ce qui explique la nécessité d'utiliser des pilotes d'étude. Une revue de la littérature sous-entend de prendre en considération des conditions expérimentales extrêmement différentes et limite la comparaison des résultats obtenus. Cependant, certaines conclusions peuvent tout de même être tirées si l'on prend en considération l'ensemble des données reportées dans le **tableau 6**.

**Tableau 6. Conditions expérimentales des études traitant de l'adhésion de virus sur des biofilms constitués en réacteurs (adapté de Skraber *et al.*, 2005 ; Pelleïeux, 2012).** UFP : Unité Formant Plage; NPPUC : Nombre le Plus Probable d'Unités Cytopathogènes ; $TCID_{50}$ : Median Tissue Culture Infective Dose, C : conductivité ; uPVC : unplasticized PVC ; PV-1 : Poliovirus 1 ; B40-8 : phage de *Bacteroides fragilis* ; 28B : phage de *Salmonella typhimurium*.

| Virus | Concentrations inoculées log NPPUC ou UFP.mL$^{-1}$ | Concentration dans les biofilms log NPPUC ou UFP .cm$^{-2}$ | Pourcentages d'adhésion | Coupons | Eau | Biofilm (âge / surface) | Temps de contact (heure) | Débit d'eau (L.h$^{-1}$) | Type de réacteur | Références |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **PV-1** | 3,5.10$^3$ à 9,0.10$^3$ NPPUC/mL | 0 à 52 NPPUC/cm$^2$ | 2,2 à 81,8 % | PVC | Eau de distribution Chlore libre < 0,04 mg.L$^{-1;}$ C = 0,6 mS.cm$^{-1}$ | 30 jours/1 cm$^2$ | 4 à 28 | 500 | Longueur = 90 m; Volume = 50 L; Surface = 75000 cm$^2$ | **Quignon *et al.* (1997 a, b)** |
| **MS2** | 1.10$^8$ UFP/mL | > 10$^3$ UFP/µg de protéines /cm$^2$ | | PVC | pH = 8,7 (± 0,14), chlore libre = 0,56 (±0,12)mg.L$^{-1}$ | 70 jours/6 cm$^2$ | 24 | 1152 | Modified Robbins' device (MRDs) puis biofilm réacteur | **Storey et Ashbolt (2001)** |
| **B40-8** | | > 10$^4$ UFP/µg de protéines /cm$^2$ | | inox | | | | | | |
| **PV-1** | 7,2.10$^4$, 1,3.10$^6$, 5,0.10$^6$ NPPUC/mL | 27, 35, 267 NPPUC/cm$^2$ | | verre | Eau de distribution | 2 à 9 semaines | 1 | 3 | 100 mL | **Hock et Botzenhart (2002)** |
| **ϕX174** | 1,2.10$^6$ UFP/mL | 16 UFP/cm$^2$ | | | | | | | | |
| **MS2** | 1,6.10$^6$ UFP/mL | 6 UFP/cm$^2$ | | | | | | | | |
| **ϕX174** | 1.10$^8$ à 1.10$^{10}$ UFP/mL | 1.10$^7$ UFP/cm$^2$ | approximativement 1% pour les phages | inox | Eau de distribution | 90 jours/6 cm$^2$ | 24 | 360 | Modified Robbins' device (MRDs) puis Biofilm Reactor | **Storey et Ashbolt (2003)** |
| **MS2** | | 1.10$^8$ UFP/cm$^2$ | | PVC | | | | | | |
| **B40-8** | | 1.10$^8$ UFP/cm$^2$ | | | | | | | | |
| **sphères latex 20 nm** | | < limite de détection | | | | | | | | |
| **billes hydrophobes** | 1.10$^9$ à 1.10$^{11}$ billes ou UFP/mL | 32 ± 8 à 528 ± 372 billes/cm$^2$ | 0,1 à 0,4% | verre | Eau de distribution traitée par chloration; 7,5<pH<8,5; chlore libre 0,05 à 0,25 mg.L$^{-1}$ | 8 semaines | 24 | | conduite de 1 km | **Langmark *et al.* (2005)** |
| **billes hydrophiles** | | 110 ± 37 à 2860 ± 1580 billes | 0,3 à 1,1% | | | | | | | |
| **phage 28B** | | 4 ± 6 à 26 ± 5 UFP/cm$^2$ | < 0,001 % | | | | | | | |
| **billes hydrophobes** | 1.10$^9$ à 1.10$^{11}$ billes ou UFP/mL | 91 ± 66 à 151 ± 31 billes/cm$^2$ | 0,2 à 0,3 % | verre | Eau de distribution traitée aux Ultra violets; 7,5<pH<8,5; chlore libre 0,05 à 0,25 mg.L$^{-1}$ | 8 semaines | 24 | | conduite de 1 km | **Langmark *et al.* (2005)** |
| **billes hydrophiles** | | 172 ± 113 à 713 ± 108 billes /cm$^2$ | 0,5 à 0,6 % | | | | | | | |
| **phage 28B** | | 6 ± 2 à 21 ± 13 UFP/cm$^2$ | < 0,001 % | | | | | | | |
| **PV-1** | 5,04 log NPPUC | 1,49 ± 0,16 log NPPUC/cm$^2$ | | Polycarbonate | C = 385 µS.cm$^{-1}$; pH=7,67; 10°C; Chlore libre < 0,02 mg.L$^{-1}$ | 218 jours/18,75 cm$^2$ | 1 | 6 | Rotating annular reactor (1L) | **Helmi *et al.* (2008)** |
| **ϕX174** | 5,58 log UFP/mL | 1,81 ± 0,02 log UFP/cm$^2$ | | | | | 24 | | | |
| **MS2** | 6,11 log UFP/mL | 2,04 ± 0,15 log UFP/cm$^2$ | | | | | 48 | | | |
| **PV-1** | 6,57 log NPPUC/mL | 2,65 ± 0,21 log NPPUC/cm$^2$ | | Polycarbonate | Usée traitée biologiquement (4°C) | 14 jours/18,75 cm$^2$ | 1 | 6 | Rotating annular reactor (1L) | **Helmi *et al.* (2008)** |
| **MS2** | 5,72.10$^4$ éq UFP/20L | ≈ 1 PFU/cm$^2$ | 1,8.10$^{-5}$ à 2,9.10$^{-3}$ % | PVC , fonte | Eau de distribution + 1% eau usée, 15°C, pH = 7, chlore libre 0,06 mg/L | 8 semaines | 1 | 120 | Pilote développé par le Centre de Recherche sur l'Eau (20L) | **Helmi *et al.* (2010)** |
| **Adénovirus type 5** | 2,77.10$^5$ $TCID_{50}$/20L | 10 à 33 $TCID_{50}$ / cm$^2$ | 1,3.10$^{-6}$ à 1,7.10$^{-5}$% | PVC , fonte | Eau de distribution + 1% eau usée, 15°C, pH = 7, chlore libre 0,06 mg/L | 8 semaines | 1 | 120 | Pilote développé par le Centre de Recherche sur l'Eau (20L) | **Helmi *et al.* (2010)** |

Tout d'abord, l'adsorption virale apparait comme étant un phénomène plutôt rapide. En effet, Helmi *et al*. (2008) ont inoculé du poliovirus ainsi que des phages MS2 et ϕX174, dans un pilote. Pour une concentration en poliovirus de 6,57 log NPPUC (Nombre le Plus Probable d'Unités Cytopathogènes)/mL dans une eau en contact avec un biofilm de 14 jours formé sur du polycarbonate, 2,65 log NPPUC/cm$^2$ sont mesurés dans le biofilm après 1 heure de contact. Ces auteurs avaient également inoculé des oocystes et des kystes de protozoaires (*Cryptosporidium parvum* et *Giardia lamblia*). Bien qu'ils aient observé le même taux d'adhésion après 1 heure pour le phage MS2 et les protozoaires, ils ont également constaté que les virus avaient atteint leur taux d'adhésion maximum au biofilm dès 1 heure alors que l'adhésion maximale des parasites au biofilm nécessitait 24 heures. Les auteurs ont émis l'hypothèse que cette différence pourrait être liée à la taille des microorganismes (20 nm et 5 µm) qui est un des paramètres pouvant influencer la vitesse d'adhésion. Hock et Botzenhart (2002) confirment que l'adsorption virale sur des surfaces est un phénomène rapide puisqu'ils mesurent entre 27 et 267 NPPUC/cm$^2$ pour des inoculums de poliovirus compris entre $7{,}2.10^4$ et $5{,}0.10^6$ NPPUC/mL après une heure de contact. D'après les résultats de ces mêmes auteurs, la concentration virale retrouvée sur les biofilms serait liée à celle présente dans l'eau. En effet, la concentration en virus mesurée sur les surfaces augmente lorsque la quantité virale en poliovirus augmente dans l'eau. Ainsi, pour des inoculums de $7{,}2.10^4$, $1{,}3.10^5$ et $5{,}0.10^5$ NPPUC/mL les concentrations mesurées sur un biofilm de 70 jours formé sur du verre atteignent respectivement 27, 35 et 267 NPPUC/cm$^2$.

Les taux d'adsorption virale (en pourcentages) sur des biofilms d'eau potable sont couramment calculés dans la littérature comme étant la concentration en virus mesurée sur les surfaces (par cm$^2$) divisée par la concentration virale dans l'eau (par mL). Les taux relevés dans la littérature sont globalement peu élevés, de l'ordre de 1%. Même si les taux d'adhésion ne sont théoriquement comparables qu'au sein d'une même étude, il est possible de souligner leur variabilité. En effet, Storey et Ashbolt (2003) retrouvent environ 1% des phages MS2, ϕX174 et B40-8 sur un biofilm de 90 jours après 24 heures de contact. D'autres études révèlent des taux d'adsorption encore plus faibles, compris entre $1{,}7.10^{-5}$% pour des particules d'adénovirus 5 sur un biofilm de 8 semaines après une heure de contact (Helmi *et al.,* 2010) et moins de 0,001% pour des phages 28B sur des biofilms de huit semaines après 24 heures de contact (Langmark *et al.,* 2005). Les seuls auteurs qui ont décrit des taux d'adhésion virale importants sont Quignon *et al.* (1997) qui ont mesuré des taux d'adhésion de poliovirus sur un biofilm de 30 jours variant de 2 à 81% après 4 à 28 heures de

contact. Toutefois, ces auteurs ont estimé ces taux d'adhésion par modélisation à partir des concentrations mesurées dans l'eau en entrée et en sortie de réacteur.

Les études montent également des taux d'adsorption sur les biofilms différent en fonction des virus, confirmant que leur adsorption aux surfaces est dépendante de leurs propriétés physico-chimiques. Les deux phages les plus fréquemment utilisés pour l'étude des interactions des virus avec les biofilms sont les phages MS2 et ϕX174. D'après Helmi *et al.* (2010) la différence de valeur de point isoélectrique (p*I*) existant entre ces deux virus (respectivement 3,9 et 6,6) pourrait permettre d'étendre les informations obtenues pour ceux-ci à une large gamme de virus entériques pathogènes. En effet, le p*I* étant estimé pour la majorité des virus, il permet de relier le taux d'adsorption virale au point isoélectrique et par extension, à la charge de la particule virale. Cependant, une telle interprétation apparait trop restrictive puisque d'une part le p*I* n'est pas directement relié à l'intensité de la charge de surface et que d'autre part la balance hydrophile/hydrophobe de la surface virale est elle aussi impliquée. Ainsi Langmark *et al.* (2005) ont analysé l'adsorption de particules de polystyrènes de 1 µm hydrophiles ou hydrophobes sur ce biofilm. Ils ont observé que la concentration en billes hydrophiles mesurée dans des biofilms de 8 semaines était significativement plus importante que celle des billes hydrophobes pour des inoculum comparables. Les conclusions observées quant au taux d'adhésion pour un virus donné restent délicates à interpréter. En effet, Storey et Ashbolt (2001 et 2003) décrivent des concentrations phagiques de MS2 et ϕX174, sur des biofilms de 90 jours, équivalentes pour deux études réalisées dans un même laboratoire. D'autres études donnent parfois des résultats inverses. Ainsi, Hock et Botzenhart (2002) ont détecté une concentration en phage ϕX174 plus importante que celle du phage MS2 pour des inoculum comparables. Helmi *et al.* (2008 et 2010) ont également observé que le phage MS2 adhère en plus grande quantité que le phage ϕX 174.

Dans ces différentes études, il est fait mention de l'adhésion des virus sur les biofilms sans que ce phénomène n'ait toutefois été démontré. En effet, dans le cas de biofilms épais (formés à partir d'eaux usées, biofilms mono-espèces…) et hydratés, les virus peuvent être simplement présents dans l'eau composant la surface des biofilms. Dans le cas de biofilms d'eau potable, ne couvrant pas forcément toute la surface, les résultats obtenus ne permettent pas de s'assurer que le virus adhère sur la biomasse et non sur les portions de surface non colonisées. Briandet *et al.* (2008) ont inoculé des phages de *Lactococcus* c2 sur des biofilms mono-espèces sa bactérie hôte, *Lactococcus lactis*, ou de *Stenotrophomonas maltophilia* et ont

observé une diffusion rapide des phages en profondeur dans le biofilm. De telles capacités de diffusion vont à l'encontre d'une adsorption forte sur la biomasse. Storey et Ashbolt (2003) ont inoculé des billes de latex fluorescentes de 20 nm ainsi que des phages B 40-8 dans de l'eau en contact pendant 24 heures avec un biofilm d'eau potable de 90 jours. Les billes fluorescentes et les phages ont été détectés par fluorescence dans les profondeurs du biofilm et dans les micropores, de façon comparable à ce qui a été observé par Briandet *et al.* (2008). Toutefois, Storey et Ashbolt (2003) ont également observé une accumulation de billes et de virus sur les micro-colonies bactériennes du biofilm. Cette observation réalisée par microscopie à fluorescence confirme non seulement l'adhésion virale sur le biofilm, mais également une diffusion plus en profondeur. Une autre étude démontre, elle aussi, l'adhésion des virus sur les biofilms en utilisant une stratégie totalement différente. Helmi *et al.* (2008) ont décroché un biofilm d'eau potable de sept mois. Après une centrifugation de la phase aqueuse à vitesse faible (1250 g pendant 15 min), ne permettant pas la sédimentation des virus, les virus ont été retrouvés à des concentrations 68 fois plus élevées dans le culot que dans l'eau. La sédimentation des virus serait alors due à leur adhésion au biofilm. Ainsi, ces études (Storey et Ashbolt, 2003; Helmi *et al.*, 2008) mettent en avant une potentielle adhésion des virus aux biofilms plutôt qu'un simple partage entre les phases eau et biofilm.

En résumé, l'extrême variabilité des résultats décrits dans ces études souligne la complexité des phénomènes intervenant dans l'interaction entre les virus et les biofilms. En considérant les variations imposées par l'utilisation de systèmes et de protocoles différents (réacteurs, virus, méthodes de calcul, protocoles de récupération des virus, composition physico-chimique de l'eau et nature du biofilm), il est toutefois possible d'observer que l'adhésion des virus aux biofilms est un phénomène rapide, bien qu'aucune cinétique d'adhésion des virus aux biofilms n'ait été réalisée. Cette adhésion n'interdit pas de considérer comme possible la diffusion des virus dans des biofilms épais. De façon générale, le taux de recouvrement du support par les biofilms, les conditions de formation de celui-ci, la morphologie des virus et les propriétés de surface des différents virus sont des paramètres encore trop souvent négligés dans les discussions des résultats expérimentaux.

### 3.4. Persistance des virus dans les biofilms

Après une phase d'adhésion, la persistance des virus au sein des biofilms dépend d'une part de leur résistance aux facteurs susceptibles de les dégrader (température, pH,

concentration résiduelle en chlore…) et d'autre part de leur relargage dans la phase aqueuse. Il est généralement très difficile de dissocier complètement ces deux phénomènes. Par ailleurs, l'étude de la dégradation d'une particule virale peut s'envisager selon deux référentiels. Le premier prend en compte le caractère infectieux des virus qui ne peut être estimé à l'heure actuelle qu'en faisant appel aux méthodes de culture. La perte d'infectivité peut résulter d'une altération de la capside et/ou du génome. On parlera alors d'inactivation ou de survie des virus. Le deuxième référentiel ne prend en compte que la persistance du génome viral détecté par les techniques de biologie moléculaire. Dans ce cas, un signal peut être observé alors même que le virus est inactivé. Ainsi, à l'heure actuelle il est largement reconnu dans la communauté scientifique que la persistance d'un signal moléculaire (RT-PCR) ne peut pas être reliée à l'état infectieux du virus (Gassilloud *et al.*, 2003; Helmi *et al.*, 2008).

Hock et Botzenhart (2002) ont étudié la persistance de virus et bactériophages infectieux (poliovirus 1, phages MS2 et ΦX174) dans un biofilm. Après inoculation d'une quantité connue de virus dans des réacteurs de laboratoire comportant des biofilms d'eau potable à leur surface, les concentrations initiales en poliovirus 1, en phages MS2 et ΦX174 infectieux sont respectivement de 27 à 267 UFP/cm², 6 UFP/cm² et 16 UFP/cm² après une heure de contact. Des virus infectieux ont été mis en évidence dans le biofilm jusqu'à 24 heures pour le phage ΦX174, 48 heures pour le phage MS2 et 14 jours pour le poliovirus, après inoculation dans les réacteurs. Helmi *et al.* (2008) ont constitué un biofilm d'eau potable sur 218 jours à 10°C dans un réacteur annulaire rotatif dans lequel le volume de la phase aqueuse est de 1 litre, sous un régime laminaire. Ils ont ensuite inoculé du poliovirus 1 et des phages ϕX174 et MS2 infectieux dans l'eau du réacteur. A partir de concentrations initiales en poliovirus 1 infectieux, génome de poliovirus 1, phages ΦX174 et MS2 infectieux atteignant respectivement 1,49 log NPPUC/cm², 1,74 éq log NPPUC/cm², 1,81 log UFP/cm² et 2,04 log UFP/cm² de biofilm, la persistance de ces virus et bactériophages au sein de ce biofilm a été suivie. La totalité de l'eau du réacteur a alors été renouvelée tous les sept jours. Dans ces conditions, le poliovirus infectieux et les deux bactériophages sont retrouvés dans le biofilm jusqu'à six jours et du génome de poliovirus a été détecté pendant les 34 jours d'expérimentation. Storey et Ashbolt (2003) ont réalisé un biofilm d'eau potable de trois mois avant de le mettre en contact avec des phages B40-8 et MS2. A partir d'une concentration initiale dans le biofilm d'environ $10^6$ UFP/cm², ces virus ont été retrouvés dans le biofilm durant 30 jours même en présence d'une concentration en chlore dans l'eau de 0,19 mg/L. Pour modéliser la persistance virale, les auteurs ont préféré appliquer à leurs résultats un

modèle biphasique, plutôt qu'une simple régression linéaire. D'après la modélisation de leurs résultats, une sub-population virale représentant 0,01 % des virus initialement retrouvés dans le biofilm aurait la capacité de persister durant une longue période, estimée à plus de 100 jours par extrapolation du modèle.

Des données obtenues sur des biofilms issus de l'environnement semblent confirmer ces résultats. En effet, Skraber *et al.* (2009) ont observé des phénomènes saisonniers dans la présence de virus dans l'eau usée. Par exemple, le génome de norovirus (génogroupes I et II) décrit un pic hivernal dans les eaux usées tandis que le génome des entérovirus est détecté principalement en juillet. Ceci n'est pas surprenant puisque les épidémies de gastro-entérites à norovirus sont observées en hiver et les épidémies à entérovirus sont estivo-automnales. Par contre, dans les biofilms d'eaux usées, ces auteurs observent une concentration en génome d'entérovirus et de norovirus du génogroupe II quasiment constante durant une grande partie de l'année (neuf mois). Le génome du norovirus génogroupe I a été détecté en plus forte concentration dans le biofilm en hiver. Ces observations confortent l'hypothèse selon laquelle les virus, ou du moins leur génome, persistent dans le biofilm en dehors des pics épidémiques. Ces mêmes auteurs ont placé des biofilms d'eaux usées naturelles dans un tampon et ont suivi l'inactivation des coliphages somatiques et des phages ARN F-spécifiques à 4°C et 20°C. Ils ont parallèlement suivi l'inactivation phagique dans l'eau usée correspondante. L'inactivation est entre 2,3 et 15 fois plus importante dans l'eau quels que soient le phage considéré et la température de l'eau. Ainsi, les biofilms auraient un rôle protecteur sur les virus, en particulier les biofilms issus d'eaux usées.

L'ensemble de ces études souligne la possible persistance des virus au sein des biofilms même en présence de chlore libre. Il est cependant difficile de comparer ces études entre elles car les conditions expérimentales sont totalement différentes. Par ailleurs, le nombre d'études est encore trop restreint pour estimer l'influence du type de virus et de la nature du biofilm sur la persistance virale au sein de ceux-ci.

### 3.5. Relargage des virus à partir du biofilm

En ce qui concerne le relargage des virus à partir du biofilm, quelques études évoquent une libération virale par érosion du biofilm. Il est extrêment difficile d'étudier le relargage de biofilms dans l'eau potable *in situ*, les expériences en laboratoire représentent alors une

alternative intéressante pour tenter d'appréhender ce qui se produit en conditions réelles. C'est le cas dans l'étude de Helmi *et al*. (2008) où un système rotatif a été mis en place pour permettre la croissance d'un biofilm d'eau potable pendant sept mois sous un régime laminaire (30 rpm). Après contamination par du poliovirus 1, le biofilm contenait 1,74 ± 0,17 $log_{10}$ éq NPPUC/$cm^2$ (1,49 ± 0,16 $log_{10}$ NPPUC/$cm^2$). Des vidanges successives de l'eau du réacteur avec un renouvellement par de l'eau de distribution tous les sept jours (passage de 50 L d'eau de distribution en huit heures puis arrêt) montrent que du génome de poliovirus est encore retrouvé dans l'eau après la deuxième vidange (7ème jour d'expérimentation) et que le biofilm en contient encore environ 1 $log_{10}$ éq NPPUC/$cm^2$. Aucun génome n'est détecté dans l'eau lors des vidanges suivantes alors qu'il est toujours détecté dans le biofilm jusqu'à la 5ème vidange. Ces résultats démontrent qu'un transfert de virus du biofilm à l'eau est possible, vraisemblablement selon les principes de l'équilibre. Lorsque les auteurs appliquent un régime turbulent (380 rpm) au 42ème jour d'expérimentation, le génome du virus est à nouveau détecté dans la phase aqueuse. Ainsi, l'érosion du biofilm a également permis le " décrochage " des virus et leur passage dans la phase aqueuse.

Skraber *et al*. (2005) citent des études qui émettent l'hypothèse d'un relargage possible des virus du biofilm vers la phase eau via l'érosion du biofilm en conditions naturelles. Cette érosion serait provoquée par les forces de cisaillement dues à l'écoulement de l'eau.

En résumé, les virus peuvent persister dans les biofilms pendant des durées variables suivant les virus considérés, le type de biofilm, les conditions expérimentales et être relargués dans la phase aqueuse. Des études ont également montré l'effet protecteur du biofilm par une augmentation de la survie ou de la persistance du génome de virus et de bactériophages.

## V. Evaluation de l'inactivation des virus entériques par chloration

Avant d'envisager l'inactivation virale par l'hypochlorite de sodium il est nécessaire de faire un point sur les différents facteurs influant sur la persistance des virus entériques dans l'eau.

### 1. Persistance des virus dans le milieu hydrique

Après contamination du milieu hydrique par une pollution fécale contenant des virus entériques, le risque de contamination humaine va dépendre d'une part de leur concentration initiale dans le milieu, d'autre part de leur survie. En effet, les virus entériques

sont incapables de se multiplier en dehors d'une cellule hôte (Jofre, 2007), le nombre de particules virales ne peut donc que diminuer ou rester stable dans l'environnement.

Avec l'apparition de techniques de biologie moléculaire de plus en plus perfectionnées permettant une quantification virale, les études de persistance font appel à la fois à une détection par culture cellulaire pour quantifier le nombre de particules virales infectieuses, mais également à la détection génomique. Bien que très utiles pour les virus ne possédant pas de méthodes de détection par culture cellulaire, tels que les norovirus, les résultats obtenus par biologie moléculaire sont à interpréter avec précaution. En effet, la détection de génome ne peut pas être directement reliée à la présence de particules virales infectieuses. Ceci a été démontré pour l'Adénovirus 2 pour lequel les résultats d'abattement obtenus 4°C dans une eau souterraine n'ont montré aucune diminution du génome durant 385 jours, alors qu'un abattement de 0,0076 $log_{10}$/jour était mesuré lors de la détection des virus infectieux (Ogorzaly *et al.,* 2010). Le même constat a été effectué pour le virus de l'hépatite A dans de l'eau de mer (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), mais également pour les astrovirus, rotavirus, calicivirus ou certains bactériophages (Espinosa *et al.,* 2008; Bae et Schwab, 2008).

Différents facteurs environnementaux peuvent conditionner la survie des virus dans les eaux. La température est considérée comme l'un des facteurs les plus importants conditionnant la survie des particules virales et ceci pour tous les virus comme illustré dans le **tableau 7**. Il a été démontré que plus la température du milieu augmente plus la survie des virus entériques dans l'eau est courte (Yates *et al.,* 1985; Fong *et al.,* 2005; Bae et Schwab, 2008; Ogorzaly *et al*., 2010). A titre d'exemple, dans de l'eau de distribution, pour le VHA, le temps nécessaire pour observer un abattement de 1 $log_{10}$ passe de 28 jours à 4°C à 13,5 jours pour une température de 23 °C (Enriquez *et al.,* 1995). Une étude récente (Ogorzaly *et al.,* 2010) a suivi la quantité d'Adénovirus 2, en termes de copies de génome et de virus infectieux, inoculés dans de l'eau souterraine. Les auteurs ont souligné une meilleure conservation de l'infectiosité virale à 4°C par rapport à 20°C. En effet, l'abattement viral était de 0,0076 $log_{10}$/jour à 4°C et de 0,0279 $log_{10}$/jour à 20°C.

**Tableau 7. Survie et persistance du génome dans de l'eau (Bertrand *et al.*, 2012, d'après des données de COST 929, http://www.cost929.pcrlabnet/login.php).** **θ°C : température, TFL : temps nécessaire pour observer un abattement de 1 $log_{10}$, ND: non déterminé.**

| | Virus | Type d'eau | θ (°C) | TFL (j) | Référence |
|---|---|---|---|---|---|
| Culture cellulaire | **VHA** | Eau déchlorée | 4 | 28 | Enriquez *et al.*, 1995 |
| | | | 23 | 13,5 | |
| | | Eau | 63 | $4,2\ 10^{-4}$ | Hewitt *et al.*, 2009 |
| | **Poliovirus** | Eau filtrée | 37 | 3,8 | Enriquez *et al.*, 1993 |
| | | Eau déchlorée | 4 | 20,5 | Enriquez *et al.*, 1995 |
| | | | 15 | 12 | |
| | | | 23 | 5,5 | |
| | **Adénovirus 40** | Eau de distribution déchlorée | 4 | 46 | Enriquez *et al.*, 1995 |
| | | | 15 | 43,5 | |
| | **Adénovirus 41** | Eau de distribution déchlorée | 23 | 30 | |
| | | | 4 | 152 | |
| | | | 15 | 62 | |
| | | | 23 | 42 | |
| | **MNV** | Eau | 63 | $6,3\ 10^{-4}$ | Hewitt *et al.*, 2009 |
| | **FCV** | Eau | 4 | 15,6 | Allwood *et al.*, 2005 |
| | | Eau chlorée à 0,1 ppm | 25 | 4,0 | |
| | **Phage MS2** | Eau de distribution | 23 | 2,1 | Governal et Gerba, 1997 |
| | **Phage MS2** | Eau de distribution | 4 | 7,2 | Allwood *et al.*, 2005 |
| | | | 25 | 6,5 | |
| | | | 37 | 6,2 | |
| | **Phage MS2** | Eau souterraine | 4°C | 23,4 | Ogorzaly *et al.*, 2010 |
| | | | 20°C | 1,4 | |
| | **Phage GA** | | 4°C | 19,9 | |
| | | | 20°C | 1,2 | |
| | **Adénovirus 2** | | 4°C | 131,6 | |
| | | | 20°C | 35,6 | |
| Détection génomique | **VHA** | Eau | 63 | $1,39.10^{-2}$ | Hewitt *et al.*, 2009 |
| | | | 72 | $6,94.10^{-3}$ | |
| | **Norovirus GGI-2** | Eau | 63 | $4,63.10^{-2}$ | Hewitt *et al.*, 2009 |
| | **GGI-2** | | 72 | $1,98.10^{-2}$ | |
| | **GGII-4** | | 63 | $4,63.10^{-2}$ | |
| | **GGII-4** | | 72 | $8,68\ 10^{-3}$ | |
| | **MNV** | Eau | 63 | $7,01.10^{-3}$ | Hewitt *et al.*, 2009 |
| | | | 72 | $6,81.10^{-3}$ | |
| | **Phage MS2** | Eau souterraine | 4°C | 344,8 | Ogorzaly *et al.*, 2010 |
| | | | 20°C | 8,6 | |
| | **Phage GA** | | 4°C | 2500 | |
| | | | 20°C | 35,9 | |
| | **Adénovirus 2** | | 4°C | ND | |
| | | | 20°C | 278 | |

La survie des virus dans l'eau est également directement liée à leur exposition à la lumière et plus particulièrement aux rayonnements ultraviolets (UV). L'exposition des particules virales aux rayonnements UV diminuerait leur persistance dans l'environnement. Plusieurs études ont montré une inactivation virale plus importante en été qu'en l'hiver, bien que cette observation puisse être la résultante de la différence de température ainsi qu'une exposition aux UV plus importante (Sinton *et al.*, 1999; Noble *et al.*, 2004). La composition ionique de l'eau apparait également étant un facteur influençant, la survie des virus. Celle-ci semble améliorée dans l'eau douce par comparaison à l'eau de mer (Bosch *et al.*, 1997; Sinton *et al.*, 2002).

## 2. Inactivation virale par l'hypochlorite de sodium

Les oxydants traditionnellement utilisés dans le traitement des eaux, tels que les rayonnements UV, l'ozone ou le chlore, sont efficaces vis-à-vis des virus. L'inactivation virale par oxydation a été largement étudiée quelque soit l'oxydant considéré. De façon similaire à l'étude des interactions entre les virus et les biofilms, les conditions expérimentales présentées dans la littérature étant très différentes et peu détaillées voire non contrôlées, la comparaison des résultats est rendue difficile. A ceci s'ajoute le fait que le phénomène d'inactivation virale par les oxydants est influencé par de nombreux paramètres. En effet, l'efficacité des traitements de désinfection est directement liée aux caractéristiques physiques du milieu hydrique, en particulier la température, le pH, la turbidité, l'agrégation/dispersion des microorganismes et la présence de matière organique (Barbeau *et al.*, 2005). Le manque de détails techniques tels que le suivi de la concentration en oxydant dans le milieu étudié rend les conclusions délicates car les concentrations en oxydant décrites ne traduisent pas la réelle exposition du microorganisme à l'oxydant. Parmi les paramètres importants intervenant lors de l'inactivation d'un point de vue microbiologique, la concentration en chlore ainsi que le temps de contact entre le microorganisme et celui-ci sont des facteurs déterminants. C'est pourquoi, il est de coutume dans ce domaine d'utiliser le paramètre C.t pour comparer les données. Ce paramètre est obtenu en multipliant la concentration en oxydant initialement introduite dans le système (mg/L) par le temps de contact appliqué (minutes). Cependant, étant donné que la plupart des travaux ne présentent pas la consommation en oxydant par le milieu et n'indiquent que la concentration initialement inoculée, il est indispensable de faire référence à des milieux sans demande en oxydant pour utiliser correctement ce paramètre. Bien que la valeur de C.t soit empiriquement et largement

utilisée dans la littérature pour comparer les résultats, il est important de garder en mémoire qu'un même C.t peut traduire des conditions expérimentales très différentes. A titre d'exemple, un C.t de 12 mg/L.min peut être obtenu en appliquant 6 mg/L de chlore durant 2 minutes ou 0,1 mg/L de chlore pendant 120 minutes. L'inactivation virale ne sera évidement pas la même, l'expression des données sous la forme d'un C.t ne représente donc en rien une prédiction de l'inactivation microbiologique. Il s'agit plutôt d'un outil qui ne donne un sens à la comparaison de résultats que s'il est utilisé pour comparer des valeurs obtenues dans des conditions similaires en termes de concentration en chlore, de temps de contact et de demande en chlore notamment.

### 2.1. Inactivation de virus entériques dans l'eau par l'hypochlorite de sodium

Une solution d'hypochlorite de sodium (NaOCl) communément nommée eau de Javel, est composée d'acide hypochloreux (HClO) en équilibre avec l'ion hypochlorite $ClO^-$. Cet équilibre est température et pH dépendant. L'acide hypochloreux est le principal agent de l'action désinfectante de l'hypochlorite de sodium en milieux aqueux. La plus faible action désinfectante de $ClO^-$ serait due à sa charge qui limiterait sa diffusivité dans les structures biologiques (Scarpino *et al.*, 1974).

Quelques résultats d'inactivation observés sur différents virus entériques pathogènes ainsi que sur des bactériophages ARN F-spécifiques en suspension dans l'eau sont présentés dans le **tableau 8**. Les taux d'inactivation correspondent à des mesures de l'infectiosité virale, sauf mention contraire, en fonction de différents paramètres tels que la température, le pH, la concentration en chlore et le temps d'exposition. Les abréviations utilisées dans ce tableau sont les suivantes : FRNAPH : bactériophages ARN F-spécifiques, CVB : virus Coxsackie B, VHA : virus de l'hépatite A, GG : génogroupe, BDF : tampon sans demande en chlore, T : température, NS : non spécifié.

Lors des études présentées dans le **tableau 8**, les températures de l'eau varient de 5°C (Cromeans *et al.*, 2010; Kahler *et al.*, 2010; Lim *et al.*, 2010) à 25°C (Abad *et al.*, 1994) et les valeurs de pH de 7 (Cromeans *et al.*, 2010; Kahler *et al.*, 2010; Lim *et al.*, 2010) à 8,2 (Thurston-Enriquez *et al.*, 2003). Les concentrations en chlore varient de 0,17 mg/L (Lim *et al.*, 2010) à 1,2 mg/L (Schaper *et al.*, 2002) et les temps d'exposition de 0,2 min (Cromeans *et al.*, 2010; Kahler *et al.*, 2010) à 105 min (Abad *et al.*, 1994). **Le tableau 8** illustre bien la variabilité des

conditions expérimentales et, par voie de conséquence, la difficulté à comparer les résultats. On peut cependant extraire plusieurs informations de ces études.

**Tableau 8. Inactivation de bactériophages et de virus entériques pathogènes par l'hypochlorite de sodium en fonction de la température, du pH de l'eau, de la concentration en chlore et du temps d'exposition.** * modélisation des données expérimentales, a valeurs estimées des graphiques.

| Famille | Genre | Virus étudié | Milieu | T °C | pH | Concentration initiale en chlore (mg/L) | Temps d'exposition (min) | C.t (mg.min/L) | Taux d'inactivation ($log_{10}$) | Référence |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| *Picornaviridae* | *Hepatovirus* | VHA | Eau de distribution autoclavée | 25 °C | 7,5 | 0,5 | 1,5 [a] | | 2 | Abad *et al.*, 1994 |
| | | | | | | 1 | 15 [a] | | | |
| | *Enterovirus* | Poliovirus 1 | Eau de distribution autoclavée | 25 °C | 7,5 | 0,2 | <1 [a] | | 2 | |
| | | | | | | 0,5 | <1 [a] | | | |
| | | CVB 3 | BDF | 5 °C | 7 | 0,2 | 3,6 [a] | 0,97* | 2 | Cromeans *et al.*, 2010 |
| | | | | | 8 | | 2,8 [a] | 0,65* | | |
| | | CVB5 | BDF | 5 °C | 7 | 0,2 | 12 | 3,6 | 2 | Cromeans *et al.*, 2010 |
| | | | | | 8 | | 20 | 4,7 | | |
| | | | Eau souterraine | 5 °C | 7 | 0,2 | 17 [a] | 3,5 | 3 | Kahler *et al.*, 2010 |
| | | | | | 8 | | | 2,3 | 3 | |
| | | | | 15 °C | 7 | | | 1,2 | | |
| | | | | | 8 | | | 0,73 | | |
| | | Echovirus 1 | Eau souterraine | 5 °C | 7 | 0,2 | 3,4 [a] | 0,84 | 3 | Kahler *et al* ., 2010 |
| | | | | | 8 | | | 0,8 | | |
| | | | | 15 °C | 7 | | | 0,4 | | |
| | | | | | 8 | | | 0,3* | | |
| | | | BDF | 5 °C | 7 | 0,2 | 2,5 [a] | 0,96* | 2 | Cromeans *et al* ., 2010 |
| | | | | | 8 | | 4,0 [a] | 0,99* | | |
| | | Echovirus 11 | BDF | 15 °C | 7 | 0,2 | 4,0 [a] | 0,82* | 2 | Cromeans *et al* ., 2010 |
| | | | | | 8 | | 2,4 [a] | 0,54* | | |
| *Caliciviridae* | *Norovirus* | Norovirus murin | Eau souterraine | 5 °C | 7 | 0,2 | 0,1 [a] | 0,023 | 3 | Kahler *et al.*, 2010 |
| | | | | | 8 | | | | | |
| | | | | 15 °C | 7 | | | | | |
| | | | | | 8 | | | | | |
| | | | BDF | 5 °C | 7 | 0,2 | 0,1 [a] | < 0,07 | 2 | Cromeans *et al* ., 2010 |
| | | | | | 8 | | 0,1 [a] | < 0,08 | | |
| | | | BDF | 5 °C | 7,2 | 0,184-0,193 | 0,75 [a] | 0,141* | 2 | Abad *et al.*, 1994 |
| | | | | 20 °C | | | 0,4 [a] | 0,061* | | |
| | *Vesivirus* | FCV | Eau souterraine déchlorée | 15 °C | 8-8,2 | 0,18 | 1 | 0,21* | 2 | Thurston-Enriquez *et al.*, 2003 |
| *Leviviridae* | *Levivirus* | Phage MS2 | BDF | 5°C | 7,2 | 0,172-0,174 | 1,5 [a] | 0,242* | 2 | Lim *et al.*, 2010 |
| | | | | 20°C | | | 0,5 [a] | 0,080* | | |
| | | FRNAPH - GGI | Eau minérale | 21°C | NS | 1,2 | 5 | | 0,6 | Schaper *et al.*, 2002 |
| | | | | | | | 10 | | 3,7 | |
| | | FRNAPH - GGII | | | | | 5 | | 1,2 | |
| | | | | | | | 10 | | 5,2 | |
| | *Allolevivirus* | FRNAPH - GGIII | | | | | 5 | | 2,4 | |
| | | | | | | | 10 | | 5,9 | |
| | | FRNAPH - GGIV | | | | | 5 | | 4,3 | |
| | | | | | | | 10 | | 6,2 | |
| *Adenoviridae* | *Mastadenovirus* | Adenovirus 40 | Eau souteraine déchlorée | 15°C | 8–8,2 | 0,5 | 2,5 | 1.51* | 2 | Thurston-Enriquez *et al.*, 2003 |
| | | | BDF | 5°C | 7-8 | 0,2 | | <0.02* | 2 | Cromeans *et al.*, 2010 |
| | | Adenovirus 2 | | | 7-8 | 0,2 | 0,2 [a] | 0,02-0,04 | 2 | |
| | | | Eau souterraine | 5°C | 7 | 0,2 | 0,2 [a] | 0,035 | 3 | Kahler *et al.*, 2010 |
| | | | | | 8 | | | 0,037 | | |
| | | | | 15°C | 7 | | | <0,040 | | |
| | | | | | 8 | | | <0,020 | | |

Parmi les bactériophages ARN F-spécifiques, le phage MS2 est le phage le plus étudié comme modèle de prédiction de l'efficacité de désinfection pour les virus entériques pathogènes pour l'homme. Schaper *et al.* (2002) ont analysé le taux d'inactivation de MS2 dans l'eau minérale à 21°C et ont constaté, pour une concentration en chlore ajouté de 1,2 mg/L, un abattement de 0,6 $log_{10}$ après 5 minutes et de 3,7 $log_{10}$ après 10 minutes. Lim *et al.* (2010) ont constaté une moins grande résistance du phage MS2 lors de la chloration dans un tampon sans demande de chlore. En effet, un abattement de 2 $log_{10}$ est obtenu après avoir appliqué une concentration en chlore de 0,17 mg/L pendant 30 secondes environ (pH 7,2; température : 20°C). Cependant, le fait de travailler dans une solution tampon sans demande de chlore, implique une meilleure disponibilité du chlore étant donné qu'il n'est pas consommé par des éléments en suspension dans l'eau. L'étude de Schaper *et al.* (2002) comparent les différents génogroupes (GI, GII, GIII et GIV) de la famille des *Leviviridae* et met en évidence une sensibilité différente des phages face à une dose de chlore de 1,2 mg/L. La séquence de sensibilité au chlore serait du type G I < G II < G III < G IV, le génogroupe I (comprenant le phage MS2) étant le moins sensible à la chloration et le génogroupe IV (comprenant le phage SP) étant le plus sensible.

Afin de simplifier la comparaison de la résistance au chlore des virus entériques pathogènes pour l'homme, nous avons présenté, **figure 14**, les abattements de différents virus entériques obtenus par des études réalisées dans des conditions comparables : milieu sans demande de chlore, pH compris entre 6 et 7,8 et température de 5°C pour des concentrations en chlore comprises entre 0,2 et 0,5 mg/L. Ces données sont issues de cinq études distinctes.

L'analyse des informations présentées dans cette bibliographie peut s'envisager de deux façons, soit par une comparaison des résultats obtenus dans les conditions très proches (**figure 14)** soit par une confrontation des informations figurant sur la **figure 14** avec celles du **tableau 8** provenant de conditions expérimentales plus hétérogènes.

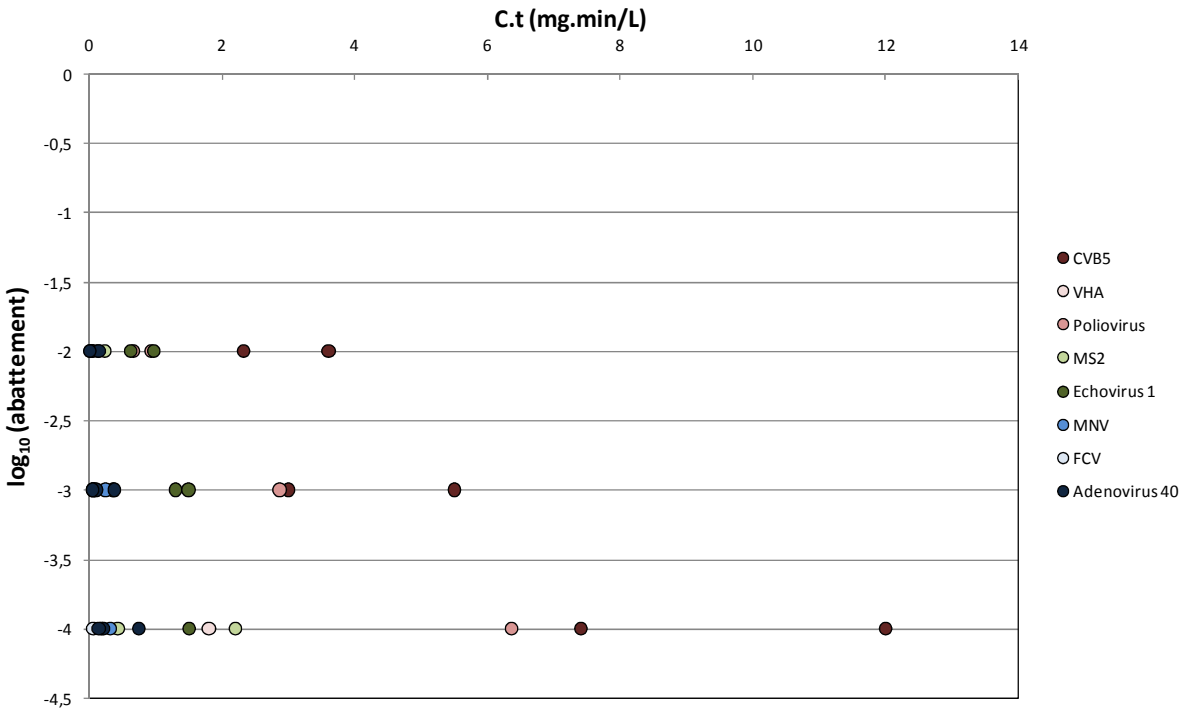



**Figure 14. Abattement viral obtenu pour différents virus entériques en fonction du C.t dans des milieux sans demande en chlore, à 5°C, pour des pH de 6 à 7,8 et des concentrations en hypochlorite de sodium comprises entre 0,2 et 0,5 mg/L de chlore (Engelbrecht *et al.*, 1980; Sobsey *et al.*, 1988; Thurston-Enriquez *et al.*, 2003; Cromeans *et al.*, 2010; Lim *et al.*, 2010).**

L'analyse de la **figure 14** ne montre aucune tendance particulière dans l'inactivation virale par chloration. Il est toutefois possible d'observer que, d'après ces données, le virus le plus résistant à la chloration est le coxsackievirus B5, suivi du poliovirus-1 et de l'échovirus 1. Le VHA, le bactériophage MS2 ainsi que l'adénovirus 40 semblent avoir une position intermédiaire et les virus les plus sensibles à la chloration sont les norovirus murins (MNV) et félins (FCV). Ces résultats peuvent être tempérés avec certains travaux de Abad *et al.* (1994) (**tableau 8**) qui, bien que conduits dans des conditions différentes, laissent apparaître le VHA comme un virus extrêmement résistant à la chloration. En effet, ces auteurs ont observé un abattement de 2 $\log_{10}$ pour une concentration en chlore de 0,5 mg/L et un temps d'exposition de 105 minutes dans de l'eau de distribution autoclavée (pH 7,5 ; 25°C). Toujours selon le **tableau 8,** le deuxième virus le plus résistant à la chloration serait le coxsackievirus B5. Cromeans *et al.* (2010) ainsi que Kahler *et al.* (2010) ont travaillé à 5°C et pH 7 et ont appliqué 0,2 mg/L de chlore pour obtenir un abattement viral de 2 $\log_{10}$ en 12 minutes et de 3 $\log_{10}$ en 17 minutes, respectivement. Le coxsackievirus B3 présente lui une sensibilité plus élevée à la chloration que le coxsackievirus B5 puisque dans les mêmes

conditions un abattement de 2 $log_{10}$ est obtenu après seulement 3,6 minutes de contact avec le chlore (Cromeans *et al.*, 2010).

MNV et l'adénovirus 2 semblent être les virus les moins résistants à l'hypochlorite de sodium. Dans des conditions comparables (5°C, pH 7) trois études ont montré que pour une concentration en chlore d'approximativement 0,2 mg/L, il fallait moins de 45 secondes pour obtenir un abattement viral du MNV de 2 $log_{10}$ (Cromeans *et al.*, 2010; Lim *et al.*, 2010) et 3 $log_{10}$ (Kahler *et al.*, 2010). Dans les mêmes conditions, il faut moins de 12 secondes pour inactiver 2 $log_{10}$ (Cromeans *et al.*, 2010) ou 3 $log_{10}$ (Kahler *et al.*, 2010) d'un adénovirus 2. Enfin les échovirus, le poliovirus 1, l'adénovirus 40 et le coxsackievirus B3 présentent une sensibilité au chlore intermédiaire en comparaison avec les virus cités ci-dessus puisque une concentration en chlore de 0,2 à 0,5 mg/L abouti à un abattement de 2 à 3 $log_{10}$ en 1 à 4 minutes pour des températures comprises entre 5 et 15 °C et des pH de 7 à 8,2 (Abad *et al.*, 1994; Thurston-Enriquez *et al.*, 2003; Cromeans *et al.*, 2010; Kahler *et al.*, 2010).

L'effet du chlore peut être influencé par une augmentation de la température et/ou du pH. Cromeans *et al.* (2010) montrent que pour le coxsackievirus B5 le même abattement viral est obtenu après 12 et 20 minutes respectivement pour des pH de 7 et 8. Kahler *et al.* (2010) montrent que pour un coxsackievirus B5 un abattement de 3 $log_{10}$ est obtenu après application d'un C.t de 3,5 et 1,2 mg/L.min si la température est augmentée de 5 à 15°C respectivement. Lim *et al.* (2010) montrent également qu'une augmentation de la température (de 5 à 20° C) permet une diminution du C.t (de 0,242 à 0,080 mg.min/L) pour obtenir un abattement de 2 $log_{10}$ du bactériophage MS2. Toutefois, aucune hypothèse mécanistique n'a été proposée pour expliquer cette observation.

Bien qu'il soit difficile de tirer des conclusions claires concernant l'inactivation virale par le chlore de par l'hétérogénéité des protocoles expérimentaux et l'importance que peut avoir chacun des paramètres (pH, température, type d'eau…) sur l'action de l'hypochlorite de sodium, il est néanmoins possible de constater que les différents génogroupes de bactériophages ARN F-spécifiques présentent une sensibilité variable au chlore bien qu'ils aient une structure très proche (Schaper *et al.*, 2002). Les virus entériques pathogènes présentent en plus des différences structurales pouvant renforcer les différences de sensibilité à l'hypochlorite de sodium. Il ressort tout de même que le coxsackievirus B5 et le VHA seraient les virus les plus résistants à un traitement par l'hypochlorite de sodium tandis

que le norovirus murin serait le virus le plus sensible. Le bactériophage MS2 aurait une position intermédiaire au même titre que le poliovirus ou que l'échovirus.

### 2.2. Inactivation virale au sein d'un biofilm par l'hypochlorite de sodium

L'effet de la chloration sur des virus adsorbés sur/dans des biofilms reste peu étudié. Quignon *et al.* (1997) ont inoculé une quantité connue de poliovirus dans un pilote en PVC colonisé par un biofilm d'eau potable de 1 mois. En absence de chlore, ils estiment, par modélisation de leurs résultats, à 30% le taux de poliovirus présents dans l'eau et à 70% le taux de virus ayant adsorbé sur le biofilm. Ils ont constaté qu'en présence de 0,02 à 0,04 mg/L de chlore, le taux de poliovirus adsorbé au biofilm est de 8,9% alors que celui présent dans l'eau était proche zéro. Ces résultats soutiennent l'hypothèse d'une protection des virus par le biofilm face aux méthodes de désinfection. Storey et Ashbolt (2003) ont étudié la persistance des phages B40-8 et MS2 dans un biofilm d'eau potable de trois mois formé en réacteur. Une modélisation de leurs résultats suggère que 0,01% des phages initialement introduits dans l'eau pourraient persister au sein du biofilm durant une période estimée à plus de 100 jours pour le phage B40-8 et 1000 jours pour le phage MS2 pour une concentration en chlore dans l'eau de 0,19 ± 0,29 mg/L et un pH de 8,7. Dans ces conditions expérimentales aucun phage n'est plus détecté dans l'eau.

Ces études sont encore trop peu nombreuses pour tirer des conclusions quant à l'effet protecteur du biofilm sur les virus face à la chloration. Le biofilm semble toutefois avoir un effet protecteur pour les virus qui y ont adhéré par rapport à des virus restés en suspension dans la phase aqueuse. Comme observé dans l'eau, la persistance des virus dans les biofilms semble varier en fonction du virus considéré.

# *Matériels et Méthodes*

# PARTIE I. Les bactériophages ARN F-spécifiques

## I. Production et contrôle des suspensions de bactériophages ARN F-spécifiques

Dans cette étude, trois bactériophages ARN F-spécifiques appartenant à trois génogroupes différents de la famille des *Leviviridae* sont utilisés. Le phage MS2 du génogroupe I est une souche référencée (ATCC 15597-B1), et les phages GA et Qβ appartenant respectivement aux génogroupes II et III ont été fournis par le Professeur J. Jofre (Université de Barcelone, Espagne). La production et le contrôle des suspensions de travail des bactériophages ARN F-spécifiques et de leur bactérie hôte (*Escherichia coli* K12 Hfr, ATCC 23631) sont effectués selon la norme ISO 10705-1 (1995). La préparation des réactifs nécessaires à la production et au dénombrement des phages est décrite en **annexe 1.**

### *1.* Production de la bactérie hôte *Escherichia coli*

La première étape consiste à produire une culture d'*Escherichia coli* K12 Hfr (*E. coli* K12 Hfr). Dans un second temps, des mesures de turbidité ainsi qu'un comptage des colonies sont effectuées afin de situer la phase exponentielle de croissance bactérienne, phase durant laquelle les bactéries sont les plus sensibles à l'infection par les bactériophages.

#### 1.1. Production des cultures d'essai

Une culture mère d'*E. coli* K12 Hfr est ensemencée sur trois boîtes de milieu MacConkey. Après 18 heures d'incubation à 37°C, cinq colonies rouges (lactose-positives) sont sélectionnées et inoculées dans 50 mL de milieu liquide TYGB à 1% de glucose-calcium (**Annexe 1**). Après cinq heures d'incubation à 37°C et sous agitation (100 rpm), 10 mL de glycérol stérile (autoclavé 21 minutes à 212°C) sont ajoutés dans le milieu. La culture d'essai est aliquotée et conservée à - 80°C.

#### 1.2. Etalonnage des mesures de turbidité

La bactérie hôte *E. coli* K12 Hfr doit être en phase exponentielle de croissance lors de la réalisation du dénombrement des phages infectieux. Le contrôle suivant vise à déterminer la densité optique (λ = 600 nm) correspondant à ce stade.

Pour cela, 500 µL de culture d'essai sont décongelés et inoculés dans 50 mL de milieu liquide TYGB à 1% de glucose-calcium. Le milieu est incubé à 37°C sous agitation (100 rpm) et 1 mL de culture est prélevé toutes les 30 minutes pendant 3 heures 30. Sur chaque échantillon, un dénombrement des bactéries cultivables (en UFC : Unité Formant Colonie) sur milieu TYGA solide ainsi que la mesure de densité optique à une longueur d'onde (λ) de 600 nm sont effectués. Selon la norme ISO 10705-1 (1995), une densité optique comprise entre 0,3 et 0,5 correspond à la phase exponentielle de croissance de la bactérie et à une concentration en bactéries cultivables de l'ordre de $10^7$ UFC/100µL.

Lors de notre étude des valeurs de turbidité comprises entre 0,25 et 0,5, obtenues entre 150 et 200 minutes de temps de culture, correspondent à la phase de croissance exponentielle de la bactérie. Pour ces valeurs de densité optique, les concentrations en bactéries cultivables sont comprises entre $1{,}2.10^7$ et $2{,}6.10^7$ UFC/100 µL. Lors de l'étape de titrage des bactériophages, les cultures bactériennes seront systématiquement prélevées entre 150 et 200 minutes et la densité optique sera contrôlée afin de se situer dans la fenêtre optimale pour l'infection des bactéries par les phages.

## 2. Production et dénombrement des bactériophages infectieux

La production des bactériophages se fait par infection de la bactérie hôte *E. coli* K12 Hfr dans laquelle ils se multiplient. Le dénombrement des phages infectieux est effectué par la technique des plages de lyse qui ne permet pas la distinction des génogroupes.

### 2.1. Production des bactériophages

Les trois stocks de phages MS2, GA et Qβ sont produits selon le même protocole (ISO 10705-1, 1995), sans étape de traitement au chloroforme.

Pour cela, 500 µL de culture d'essai d'*E. coli* K12 Hfr sont inoculés dans 50 mL de milieu liquide TYGB à 1% de glucose-calcium. La culture est incubée à 37°C sous agitation pendant 18 heures afin d'obtenir une pré-culture en phase stationnaire avancée. Une seconde culture est alors réalisée en inoculant 500 µL de la pré-culture dans 50 mL de milieu liquide TYGB à 1% de glucose-calcium. Après 90 minutes d'incubation à 37°C sous agitation, le phage est ajouté pour obtenir une concentration finale de $10^7$ UFP/mL dans le milieu TYGB. Après 5 heures d'incubation à 37°C, sous agitation, le milieu est centrifugé à 3000 g pendant 20 minutes. Le surnageant est filtré sur un filtre-seringue de porosité 0,22 µm (Millipore,

Millex GP, réf. 5CG033RS). La suspension phagique ainsi obtenue est stockée à 4°C, à l'obscurité.

## 2.2. Dénombrement des bactériophages infectieux

### 2.2.1. Dénombrement des phages en suspension

Le dénombrement des plages de lyse s'effectue par la méthode en double couche, toujours selon la norme ISO 10705-1 (1995).

Pour cela, 500 µL d'une culture d'*E. coli* K12 Hfr sont inoculés dans 50 mL de milieu liquide TYGB à 1% de glucose-calcium. La culture est incubée à 37°C sous agitation (100 rpm). Deux séries de dilutions d'ordre 10 du stock phagique sont préparées dans du tampon PBS stérile (Gibco, réf. 18912-014). Dans des tubes à hémolyse, sont déposés 2,5 mL de milieu semi-solide TYGA à 1% de glucose-calcium en surfusion (50°C), 1 mL de suspension bactérienne en phase exponentielle de croissance et 1 mL d'une dilution phagique précédemment préparée. Le contenu de chaque tube est coulé sur boîte de milieu solide TYGA puis incubé à l'étuve à 37°C pendant 18 heures. Le décompte des plages de lyse est réalisé afin de déterminer le titre du stock phagique en UFP/mL (UFP : Unité Formant Plage).

Les stocks phagiques obtenus après la production présentent une concentration de l'ordre de $10^{11}$ UFP/mL pour les phages MS2 et Qβ et de l'ordre de $10^{10}$ UFP/mL pour le phage GA. Ce protocole est utilisé pour la quantification des bactériophages infectieux dans les suspensions de travail, ainsi que dans les échantillons d'eau et sur les surfaces des réacteurs. Dans le dernier cas un protocole d'élution-concentration est appliqué au préalable (Helmi *et al.*, 2010).

### 2.2.2. Elution-concentration des phages présents sur les surfaces

Pour la détection des bactériophages infectieux sur les coupons, une étape d'élution-concentration est nécessaire. Nous avons choisi de suivre le protocole décrit par Helmi *et al.* (2010).

- Elution des bactériophages

Lors de l'étape d'élution, les coupons sont immergés dans 20 mL de tampon d'élution (1% d'extrait de bœuf, Glycine 50 mM, pH 9), puis traités aux ultrasons (Sonde à ultrasons

Vibra Cell ; puissance 250W, 20 KHz) à raison de deux traitements d'une minute à 20-25 Watts, les tubes étant immergés dans de la glace. Le coupon est maintenu à 1 cm de la sonde à ultrasons. Les échantillons sont ensuite clarifiés par centrifugation à 1500 g pendant 10 minutes à 4°C. Le pH est ajusté à 7,2 par l'ajout d'HCl 1 M. L'éluat est ensuite conservé à 4°C en attendant l'étape de concentration sur colonne.

- Concentration des phages sur colonne

L'étape de concentration des phages présents dans le tampon d'élution à l'extrait de bœuf est réalisée sur des colonnes Macrosep (PALL Life Sciences). Les éléments constitutifs d'une colonne Macrosep sont présentés sur la **figure 15**.

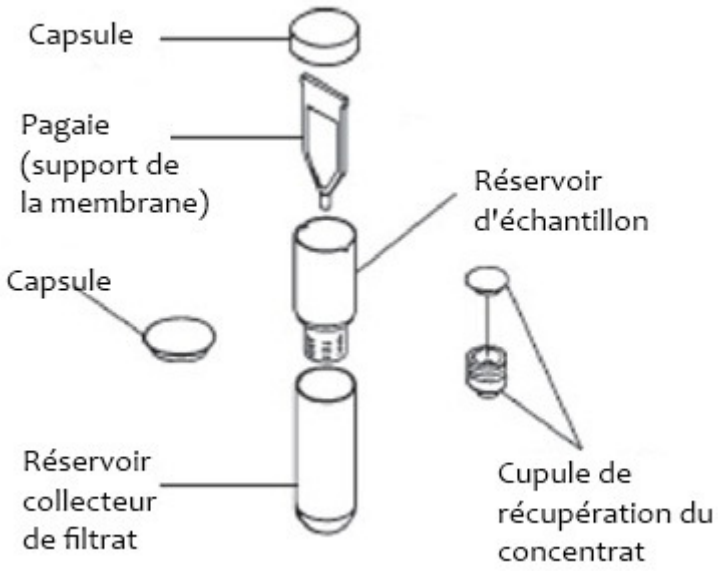



**Figure 15. Eléments constitutifs d'une colonne de concentration Macrosep (PALL Life Sciences).**

Les 20 mL d'éluat sont versés dans le réservoir d'échantillon et concentrés par 2 centrifugations successives à 3 500 g pendant 1 heure à 4°C. Une étape supplémentaire de centrifugation à 3 500 g pendant 15 minutes à 4°C est nécessaire pour obtenir un volume de concentrat ne dépassant pas 2 mL. Le concentrat est récupéré en vissant la cupule de récupération sur le réservoir d'échantillon, puis en centrifugeant la colonne à 3 500 g pendant 2 minutes à 4°C. Si le volume de concentrat dans la cupule de récupération est inférieur à 2 mL, il est complété avec du PBS stérile puis stocké à 4°C. A partir de ce

concentrat les phages infectieux sont dénombrés par la méthode des plages de lyse (paragraphe I.2.2.1) et le génome viral est extrait puis quantifié par RT-qPCR (paragraphes II.1 et II.2).

## II. Quantification du génome phagique

### 1. Extraction du génome viral

L'extraction du génome viral des phages en suspension est effectuée avec le kit QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, réf. 52906) selon le protocole adapté pour les grands volumes défini par le fournisseur. Pour cela, 1 mL échantillon est ajouté à 4 mL de tampon de lyse AVL, homogénéisé au vortex et un temps d'incubation de 10 minutes à température ambiante est appliqué afin de lyser les particules virales. Quatre mL d'éthanol absolu sont ensuite ajoutés et l'ensemble est homogénéisé par agitation au vortex. L'échantillon est déposé sur colonne de silice QIAamp et aspiré par un système de pompe à vide. L'ARN phagique est retenu sur la colonne. Deux lavages sont réalisés, avec le tampon AW1 et une centrifugation à 6000 g durant 1 minute, puis avec le tampon AW2 et une centrifugation à 14000 g pendant 3 minutes. L'ARN viral est récupéré par ajout de 100 µL de tampon d'élution (AVE) sur la colonne, après un temps d'incubation d'1 minute et une dernière centrifugation (1 minute à 6000 g). Les ARN sont immédiatement congelés à -80°C.

Dans le cadre des expérimentations en réacteur, l'extraction de l'ARN viral est réalisée directement sur les surfaces, et une adaptation du protocole a été nécessaire. Les coupons sont récupérés dans des tubes en polypropylène de 50 mL (Dutscher, réf. 227261) contenant 4 mL de tampon de lyse AVL afin de respecter le ratio entre les échantillons et les réactifs. Ce volume de tampon de lyse permet d'immerger totalement le coupon. Après homogénéisation au vortex et incubation pendant 10 minutes à température ambiante, 4 mL d'éthanol absolu sont ajoutés. La suite du protocole d'extraction est identique à celui de l'extraction des phages en suspension.

### 2. Quantification du génome viral par RT-qPCR

La quantification du génome se fait suivant le protocole développé par Ogorzaly et Gantzer (2006). La méthode consiste en l'amplification d'une séquence spécifique du génome

du bactériophage que l'on recherche. Les gènes cibles de la quantification par PCR sont les gènes de la protéine de capside et de la protéine de maturation pour le génogroupe I (phage MS2), le gène de la réplicase pour le génogroupe II (phage GA) et le gène de la protéine de capside pour le génogroupe III (phage Qβ). L'étape de rétro-transcription (RT) permet la synthèse du brin complémentaire (ADNc) à partir de l'ARN viral par une transcriptase inverse. L'étape de PCR en temps réel permet ensuite d'amplifier le fragment d'ADNc. Les produits amplifiés sont directement révélés au cours de l'amplification grâce à la mesure de la fluorescence émise lors de la PCR. Dans notre cas, une sonde TaqMan® MGB (Minor Groove Binder), permettant la reconnaissance de petites séquences nucléotidiques, et deux amorces (sens et anti-sens) sont utilisées ainsi que des nucléotides et une ADN polymérase. La sonde, complémentaire d'une séquence située entre les deux amorces, est caractérisée par la présence en 5' d'un reporter ou fluorophore (R) qui émet de la fluorescence et en 3' d'un quencher non fluorescent (Q) absorbant la fluorescence par phénomène de FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfert). Au cours de l'élongation, la dégradation de la sonde entraîne l'éloignement de ces deux éléments et l'émission de fluorescence. La mesure de la fluorescence émise à chaque cycle aboutit à une courbe d'allure sigmoïdale (**Figure 16, A**). Chaque échantillon est caractérisé par un Ct (cycle threshold) qui correspond au nombre de cycles à partir duquel le signal de fluorescence devient significativement supérieur au bruit de fond. Le Ct est inversement proportionnel au logarithme de la quantité de matériel génétique présente dans l'échantillon (**Figure 16, B**). L'avantage de cette technique, outre sa rapidité, est de pouvoir différencier directement les génogroupes par l'utilisation d'amorces et de sondes ciblant une séquence spécifique de chaque génogroupe.

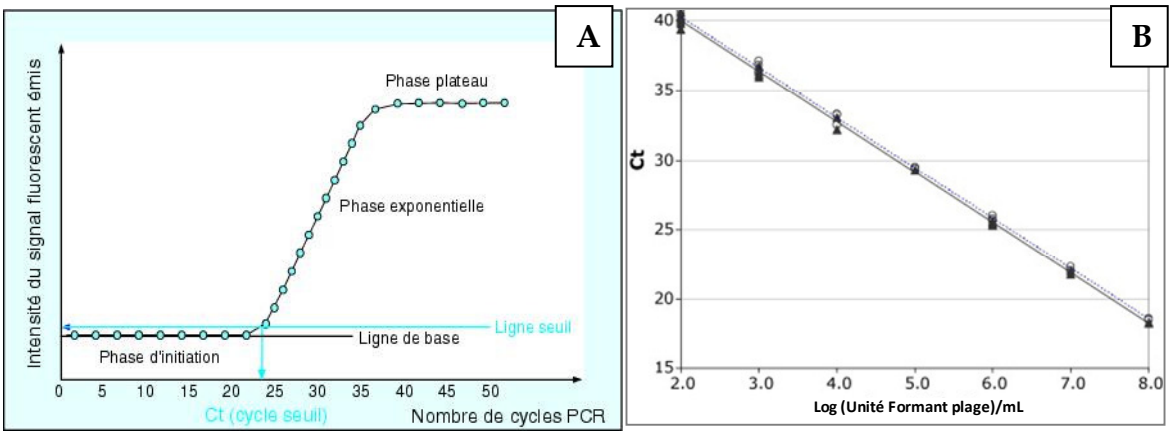



**Figure 16. Courbe d'émission de fluorescence en PCR temps réel (A) et droite étalon obtenue dans le cas de la quantification de phages (B).**

## 2.1. Rétro-transcription (RT)

La rétro-transcription se déroule en deux étapes. Elles sont présentées dans le **tableau 9** et sont effectuées dans un thermocycleur Veriti® (Life technologies) dans des microtubes de 0,2 mL (Life technologies, réf. N8010540).

La première étape d'incubation permet l'hybridation des amorces avec l'ARN, et la seconde étape permet la synthèse de l'ADNc grâce à l'action de la transcriptase inverse.

**Tableau 9. Protocole de rétro-transcription d'ARN viral (Ogorzaly et Gantzer, 2006).**

| **1ère étape de rétro-transcription (volume total 13 µL / tube)** | **Volume (µL) / tube** |
|---|---|
| dNTP (10mM, 2,5mM de chaque) | 1 |
| Amorce antisens (20 µM) | 1 |
| Eau DNase RNase free | 3,5 |
| Répartir 5,5 µL de milieu réactionnel par tube | |
| Ajouter 7,5 µL d'extrait par tube | |
| Incubation : 5 min à 65°C | |
| **2ème étape de rétro-transcription (volume total 20 µL/tube)** | **Volume (µL) / tube** |
| Tampon 5X | 4 |
| DTT 0,1 M | 1 |
| RNase inhibitor à 40 U/µL | 1 |
| Superscript III à 200 U/µL | 0,7 |
| Eau RNase-DNase free | 0,3 |
| Ajouter 7 µL de milieu réactionnel par tube | |
| Incubation : 1 h à 50°C puis 15 min à 70 °C | |

Amorce anti-sens (Proligo-Sigma), dNTPs (Life technologies, réf. N8080260), eau DNase RNase free (Sigma, réf. W4502), tampon 5X (Fischer scientific, réf. M43853), DTT (Fischer scientific, réf. M43853), RNase inhibitor (Promega, réf. N2115), superscript III RT (Fischer scientific, réf. M43853).

## 2.2. PCR en temps réel

L'étape de PCR en temps réel est présentée dans le **tableau 10**. Elle est réalisée dans une plaque de 96 puits (Life technologies, réf. 4366932). La réaction de PCR est effectuée dans le thermocycleur StepOne Plus™ (Life technologies).

Les résultats de détection de fluorescence sont analysés en temps réel avec le logiciel StepOne Software v2.0 (Life technologies), qui permet de déterminer le cycle seuil de détection de fluorescence ou Ct pour chaque échantillon.

**Tableau 10. Protocole de PCR en temps réel (Ogorzaly et Gantzer, 2006).**

| Réactifs | Concentration initiale | Concentration finale | Volume par puits (µL) |
|---|---|---|---|
| TaqMan Universal Master Mix | 2X | 1X | 12,5 |
| Amorce sens | 40 µM | 1 µM | 0,65 |
| Amorce anti-sens | 40 µM | 1 µM | 0,65 |
| Sonde TaqMan MGB | 15 µM | 0,3 µM | 0,5 |
| Eau RNase-DNase free | | | 5,7 |
| ADNc | | | 5 |

Mix TaqMan (Applied Biosystems, réf. 4304437), amorces (Proligo-Sigma), eau RNase DNase free (Sigma, réf. W4502), sonde TaqMan (Applied Biosystems).

## III. Mesure de la taille des particules phagiques par Diffusion Light Scattering

Lors de la production des phages, ces derniers peuvent se trouver à l'état de particules isolées ou sous forme d'agrégats. Il est important de connaitre l'état d'agrégation des particules phagiques car cela va influencer à la fois la diffusion des phages en suspension, mais également avoir un impact sur l'efficacité de la chloration quant à l'inactivation des bactériophages. Le protocole utilisé pour mesurer la taille des bactériophages ARN F-spécifiques utilisés dans ce travail a été développé par Langlet *et al.* (2008). Avant de mesurer la taille des particules virales en suspension, il est nécessaire d'avoir recours à une étape de purification.

### 1. Purification des bactériophages

Pour étudier la taille des particules virales, il est nécessaire de purifier, par dialyse, les phages préalablement produits (Langlet *et al*., 2008).

La suspension de phages est répartie dans des tubes adaptés pour réaliser une ultracentrifugation (SORVALL WX80, Thermo Scientific, réf. 314348), puis centrifugée à 27 000 g pendant 1 heure, à 4°C (Thermo Scientific). Le surnageant est filtré à l'aide d'un filtre-seringue de porosité 0,22 µm. Le filtrat est déposé dans une membrane de dialyse de 100 kDa

(Spectrum Laboratories, réf. 131420), fermée par des pinces. La suspension virale est alors dialysée dans un volume de 20 L d'eau osmosée, pendant 14 heures minimum, sous faible agitation et à 4°C. Une deuxième étape de dialyse est réalisée dans 20 L de $NaNO_3$ à 1 mM (pH = 6,5 ± 0,5). Après 14 heures minimum d'incubation, sous faible agitation et à 4°C, le contenu de la membrane de dialyse est filtré à l'aide d'un filtre-seringue de porosité 0,22 µm. Le stock de phage ainsi purifié est conservé à 4°C.

### 2. Mesure de la taille des particules virales

Pour réaliser la mesure de taille des particules virales, le titre du stock phagique purifié doit être au minimum de $10^{10}$ UFP/mL. Immédiatement avant la mesure de taille, les stocks phagiques purifiés sont filtrés à nouveau à l'aide de filtres-seringue de porosité 0,22 µm.

La taille des particules est étudiée dans de l'eau du réseau de distribution à différentes valeurs de pH (de 6 à 10, et au pH initial de l'eau du réseau). Les mesures de taille sont effectuées dans le Zeta-Sizer Nano ZS (Malvern Instruments). Un mL d'échantillon soit 500 µL de suspension phagique filtrée et 500 µL d'eau du réseau sont introduits dans une cuve qui est placée dans le Zeta-Sizer. La mesure est réalisée avec le logiciel DTS (Dispersion Technology Software, Malvern Instruments) selon le protocole décrit par Langlet *et al*. (2008).

## Partie II. Les réacteurs

### I. Le réacteur à disque rotatif

Le réacteur utilisé lors de ces expérimentations a été spécifiquement conçu pour l'étude Biofilm VIII par le Laboratoire d'Energétique et de Mécanique Théorique et Appliquée (LEMTA, Nancy). Ce réacteur est composé d'une cuve et d'un disque rotatif affleurant l'eau contenue dans la cuve. Sa particularité est de permettre d'obtenir un flux laminaire à la surface du disque, mais également de pouvoir réguler la vitesse de rotation du disque et ainsi d'obtenir différents gradients pariétaux de vitesse à sa surface. Le présent chapitre décrira dans un premier temps le réacteur, puis dans un second temps les conditions hydrodynamiques pouvant être appliquées dans le système et enfin les matériaux utilisés lors de cette étude.

## 1. Description générale du réacteur à disque rotatif

Chaque réacteur se compose d'une cuve cylindrique en Plexiglas®, de 25 cm de rayon et 30 cm de hauteur, pouvant contenir 35 litres d'eau avec une entrée et une sortie d'eau situées sur la partie supérieure de la cuve, comme schématisé sur la **figure 17**. L'arrivée d'eau est connectée au réseau de distribution d'eau de la Communauté Urbaine du Grand Nancy (CUGN) à un débit de 1 litre par minute. L'eau sortant de la cuve est éliminée vers le réseau d'eaux usées. Un disque en Plexiglas® d'un diamètre de 20 cm est disposé à la surface de l'eau, ce disque est équipé d'un moteur permettant de régler sa vitesse de rotation qui est mesurée à l'aide d'un tachymètre. La face du disque rotatif en contact avec l'eau présente des loges circulaires disposées sur quatre cercles concentriques de 24,5 à 90,5 mm de rayon (**Figure 17**). Dans les loges sont disposés des coupons du matériau à étudier. Les coupons sont maintenus dans les loges à l'aide d'aimants. Un aimant est collé à la surface du coupon et un second aimant amovible est disposé sur l'autre face du disque de Plexiglas®, ce qui permet la récupération individuelle de chaque coupon. Pour chaque réacteur, 40 coupons peuvent être utilisés, dont 4 pour le cercle de 24,5 mm de rayon et 12 pour les autres cercles.

Quatre réacteurs ont été utilisés pour ces expérimentations, ils sont indépendants les uns des autres et sont placés dans une cuve en PVC remplie d'eau maintenue à une température de 20°C ± 1°C (**Figure 18**). Le système est maintenu à l'obscurité.

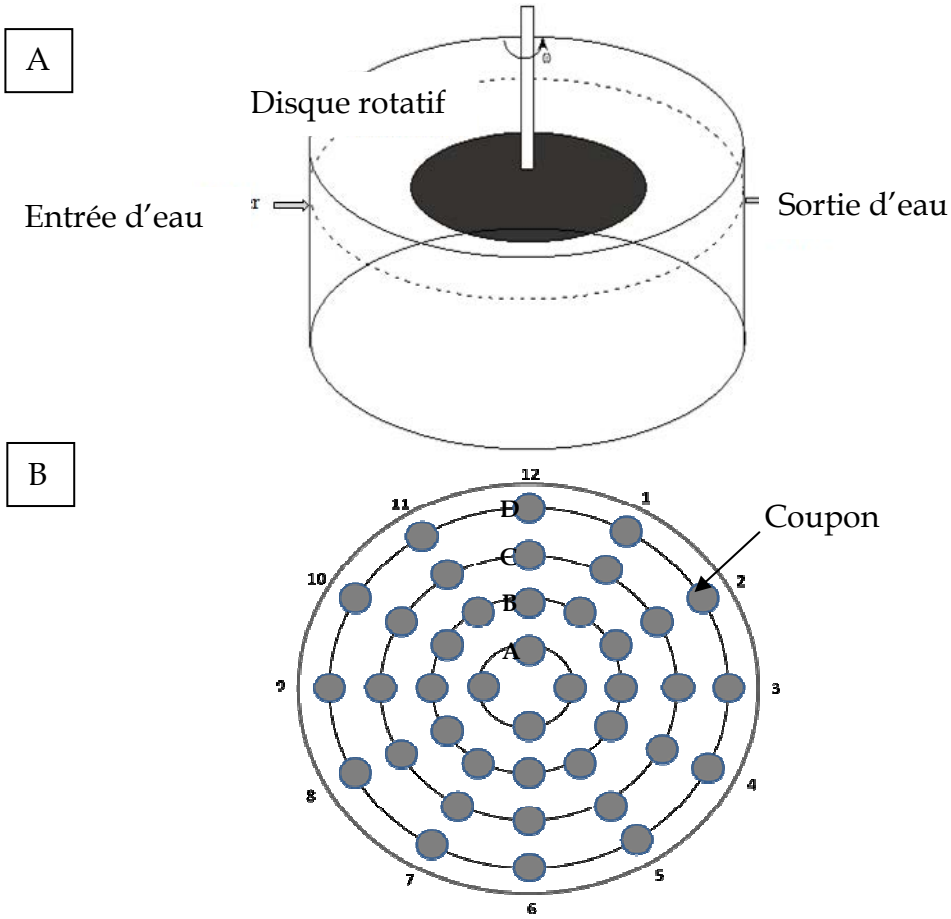



**Figure 17. Schéma d'un réacteur à disque rotatif composé d'un réservoir de 35 litres (rayon = 25 cm et hauteur=30 cm)(A) et d'un disque rotatif composé de loges disposées en quatre cercles concentriques (rayon A=24,5 mm, B=46,5 mm, C=68,5 mm et D=90,5mm)(B).**



**Figure 18 : Cuve de thermostatation en PVC pouvant contenir quatre réacteurs à disque rotatif.**

## 2. Conditions hydrodynamiques appliquées au réacteur à disque rotatif

La rotation du disque sur l'eau crée un gradient pariétal de vitesse ($\gamma$ en $s^{-1}$) sur le disque. Le flux d'eau à la surface du disque est laminaire. D'après les équations de Navier-Stokes, les gradients pariétaux de vitesse augmentent du centre du disque vers l'extérieur. En effet, le gradient pariétal de vitesse est proportionnel au rayon du disque considéré (r en m), à la vitesse de rotation du disque ($\omega^{3/2}$ en $rd.s^{-1}$) et dépend de la viscosité cinématique du milieu ($\nu = 10^6$ pour l'eau). Ainsi, la valeur de gradient pariétal ($\gamma$) à la surface de chaque coupon peut être calculée suivant l'**équation 3** (Schlichting, 1955).

$$\gamma = 0,792 \quad r \sqrt{\frac{\omega^3}{\nu}}$$

**Equation 3**

Chaque valeur de gradient pariétal de vitesse peut être transposée en vitesse d'eau dans une canalisation d'un diamètre donné. Le **tableau 11** présente les différentes vitesses de rotation du disque appliquées lors des expérimentations et une évaluation des vitesses d'eau pour une canalisation de 20 cm de diamètre.

**Tableau 11 : Différentes conditions hydrodynamiques appliquées au pilote et vitesse d'eau pour une canalisation de 20 cm de diamètre.**

| **Vitesse de rotation du disque ω (rpm)** | **0** | **21** | **75** | **344** |
|---|---|---|---|---|
| **Gradient pariétal de vitesse γ ($s^{-1}$)** | 0 | 65 à 236 | 450 à 1640 | 4 300 à 15 700 |
| **Vitesse de l'eau ($m.s^{-1}$) pour une canalisation de 20 cm de diamètre** | 0 | 0,1 à 0,3 | 0,4 à 0,9 | 1,6 à 3,4 |

## 3. Matériaux utilisés pour l'étude

Lors de nos expérimentations, deux matériaux ont été utilisés pour les coupons : l'inox 316L et le PolyEthylène Haute Densité (PEHD).

### 3.1. Inox 316L

Les coupons en inox 316L (RELLY, réf. 9DVB8412) ont un diamètre de 1,8 cm et mesurent 2 mm d'épaisseur (**Figure 19).** La surface de coupon en contact avec l'eau est de 2,4 $cm^2$. L'inox 316 L est utilisé notamment dans l'industrie agro-alimentaire. Le « L » dans la désignation signifie faible teneur en carbone (<0,03% de la masse totale) ce qui réduit les possibilités de corrosion (Choubey *et al.,* 2009). Une grande partie des réseaux de distribution est encore constituée de canalisations en fonte. La fonte s'oxyde au contact de l'eau. Etant donné que la détection des particules phagiques à la surface des coupons est effectuée par biologie moléculaire dans notre étude, il était préférable de ne pas utiliser de matériaux pouvant se corroder afin d'éviter la présence d'oxydes de fer pouvant interférer avec la détection par RT-qPCR. C'est pourquoi le choix d'un matériau métallique de référence pour cette étude s'est porté sur l'inox 316L.

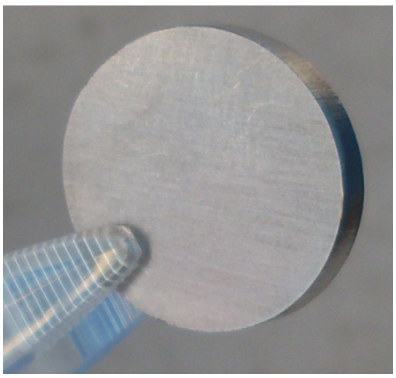


**Figure 19 : Photographie d'un coupon en inox 316L (diamètre : 1,8 cm, épaisseur 2 mm).**

### 3.2. PEHD

Les coupons en PEHD, polyéthylène haute densité « bande bleue », ont un diamètre de 1,8 cm et une épaisseur de 2,5 mm. Ils présentent une surface en contact avec l'eau de 2,4 $cm^2$ (**Figure 20**). Le PEHD « bande bleue » est un matériau utilisé dans les réseaux de distribution d'eau potable. La fabrication de plaques a été effectuée à partir de granules de PEHD (RYB S.A., St Etienne de St Geoirs, France et LIM, Laboratoire d'Ingénierie des

Matériaux, ENSAM CER Paris, France) et la découpe des coupons a été effectuée par Aqua Découpe (Uriménil, France).

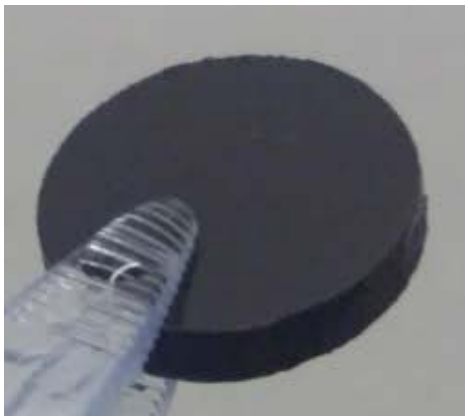


**Figure 20 : Photographie d'un coupon en polyéthylène haute densité (diamètre : 1,8 cm, épaisseur : 2,5 mm).**

Les coupons présentant une épaisseur différente en fonction du matériau (2 mm pour l'inox 316L et 2,5mm pour le PEHD), des disques rotatifs ont été fabriqués spécifiquement pour chacun d'eux, afin que chaque coupon affleure à la surface des disques.

## II. Les réacteurs Propella

Le réacteur Propella™ a été développé conjointement par Nancy Université et le Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) pour conduire des travaux de recherche sur les biofilms d'eau potable.

Ce réacteur est constitué d'une colonne en PEHD de 50 cm de hauteur pouvant contenir 2 L d'eau (**Figure 21**). Cette colonne possède 20 loges dans lesquelles sont disposées des coupons. Un système d'entrée et de sortie d'eau est placé sur la partie supérieure. Une hélice placée au centre de la colonne permet le mouvement de l'eau dans le réacteur, sa vitesse est réglée à l'aide d'un moteur paramétrable. Pour la formation du biofilm, le réacteur est alimenté en eau de la CUGN à un débit de 0,16 L/heure durant 3 ou 5 mois, la vitesse de rotation de l'hélice est fixée à 840 tours/min. En raison du faible nombre de coupons par réacteur, aucune analyse des bactéries constituant les biofilms n'a été effectuée sur les réacteurs Propella™.

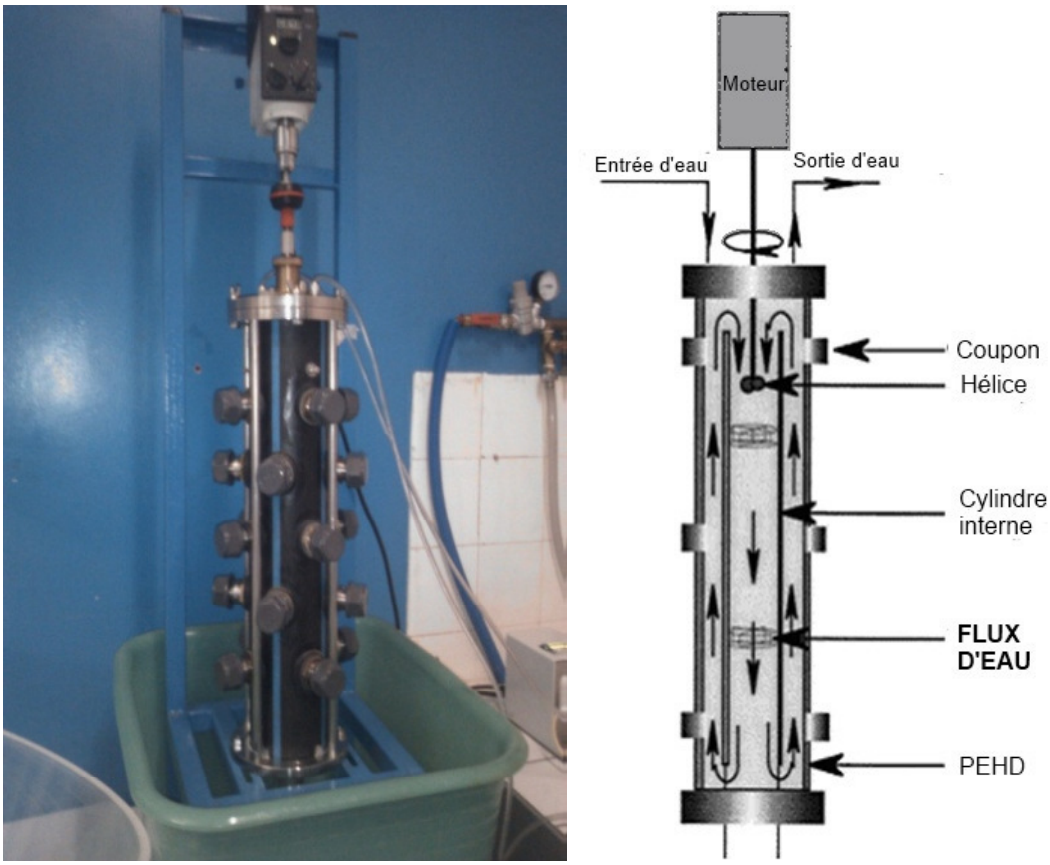



**Figure 21. Photographie (A) et représentation schématique(B) d'un réacteur Propella™.**

Les coupons (Xénard Mécanique de Précision) ont une surface convexe de 2 cm² et un diamètre de 1,6 cm. Les coupons utilisés dans nos travaux sont constitués de PEHD, polyéthylène haute densité « bande bleue ».

## III. Nettoyage des coupons et des réacteurs

Avant chaque expérimentation, les coupons ainsi que les réacteurs suivent un protocole de nettoyage à l'aide de RBS® 25 MD (VWR, réf. 148-0552), un détergent anionique dilué à 2%, pendant 20 minutes à température ambiante suivie de 6 étapes de rinçage à l'eau du robinet et d'un séchage à l'air libre.

# PARTIE III. Protocoles expérimentaux

## I. Etude du biofilm d'eau de distribution formé dans le réacteur

### 1. Protocole de formation du biofilm dans le réacteur à disque rotatif

Le réacteur est relié au réseau d'eau de distribution pendant 60 jours à un débit de 1L/h. Le disque supportant les coupons est mis en rotation à une vitesse de 75 rpm et la température est maintenue à 20 ± 1°C. Le système est placé à l'obscurité pendant toute la durée de formation du biofilm. Après 60 jours, l'entrée et la sortie d'eau du réacteur sont fermées de sorte à se trouver en système clos et les trois bactériophages sont inoculés dans l'eau du réacteur. Juste avant l'inoculation des phages, des coupons sont prélevés afin de réaliser une analyse bactériologique du biofilm et sont remplacés par des coupons propres.

### 2. Analyse bactériologique du biofilm

Les biofilms d'eau potable ont été caractérisés d'un point de vue bactériologique après 60 jours de circulation d'eau. Pour cela, un à deux coupons ont été prélevés pour chaque gradient pariétal de vitesse afin d'évaluer les densités bactériennes du biofilm en termes de bactéries totales, de bactéries présentant une membrane intègre et de bactéries cultivables (UFC-15j à 20°C).

Chaque coupon est alors transféré dans un tube contenant 25 mL d'eau distillée et 20 mg de thiosulfate de sodium, puis soumis à un traitement aux ultrasons à l'aide d'une sonde (Vibra Cell; puissance 250 W, 20 kHz) placée à 1 cm de la surface du coupon pendant 2 minutes. La puissance délivrée par la sonde à ultrasons est de 10 W.

#### 2.1. Dénombrement des bactéries totales et des bactéries présentant une membrane intègre

Le nombre total de bactéries ainsi que le nombre de bactéries présentant une membrane intègre sont déterminés à l'aide du kit Live/Dead® Baclight™ (Molecular Probes, réf. L- 7012). Ce kit met en jeu l'utilisation simultanée de deux fluorochromes: le Syto 9 et l'iodure de propidium (PI). Le Syto 9 pénètre dans toutes les cellules alors que le PI pénètre seulement dans les cellules dont la membrane est endommagée. Sous excitation en lumière bleue, le Syto 9 émet une fluorescence verte tandis que le PI émet une fluorescence rouge, ce

qui permet de différencier les bactéries possédant une membrane intègre de celles endommagées.

Le marquage des bactéries par le Syto 9 et le PI s'effectue selon le protocole proposé par Boulos *et al.* (1999). Pour cela, 30 µL de solution contenant le PI et le Syto9 sont ajoutés à 1 ml d'échantillon (dilué ou non) et laissés en contact pendant 15 minutes à l'abri de la lumière et à température ambiante (20-25°C). L'échantillon est ensuite filtré sur une membrane noire (25 mm de diamètre, 0,2 µm de porosité) (Millipore, réf. GTBP02500) et rincé deux fois avec 10 mL d'eau distillée stérile. Le filtre est séché à l'étuve à 37°C puis monté entre lame et lamelle avec l'huile fournie dans le kit. L'observation est effectuée avec un microscope à épifluorescence (BX40, Olympus) équipé d'un objectif à immersion x100 et d'un système de filtres optiques correspondant aux longueurs d'ondes d'excitation (470-490 nm) et d'émission (520 nm) des deux fluorochromes. La totalité des cellules marquées (fluorescence verte ou rouge) est dénombrée et représente le nombre total de bactéries dans l'échantillon. Seules les cellules ayant une fluorescence verte sont dénombrées comme étant des bactéries possédant une membrane intègre. Trente champs microscopiques sont observés pour chaque filtre. La concentration bactérienne est déterminée par la formule suivante : $N = N' \times F1 \times F2 / V$, où N est le nombre de bactéries par mL, N' le nombre moyen de bactéries par champ, F1 la surface de filtration ($cm^2$), F2 l'inverse de la surface d'un champ ($cm^{-2}$) et V le volume filtré (mL). F1 et F2 dépendent du matériel utilisé. Pour le microscope utilisé dans le cadre de ces expérimentations, F1=2,84 $cm^2$ et F2= $1/1,56. 10^{-2}$ $mm^{-2}$. La limite de détection de cette méthode dépend du volume filtré. Pour 1 mL d'échantillon analysé, le seuil est de $6,07. 10^2$ cellules.

## 2.2. Dénombrement des bactéries hétérotrophes cultivables

Le dénombrement des bactéries hétérotrophes cultivables est effectué à partir de la norme standard (AFNOR, 1999). Un millilitre de chaque dilution décimale (effectuée dans de l'eau peptonée stérile) de l'échantillon est ensemencé par incorporation dans la gélose PCA (plate count agar) dans des boîtes de Pétri de 90 mm de diamètre. Les boîtes sont placées à l'étuve à 20 ± 2°C pendant 15 jours. Les colonies sont dénombrées après 3 et 15 jours d'incubation. La limite de lisibilité est de 300 UFC par boîte de Pétri. Les résultats sont exprimés en UFC/$cm^2$.

## II. Etude de la sorption phagique sur les surfaces

L'étude de l'adsorption des trois phages, MS2, GA et Qβ, sur les surfaces est effectuée en conditions hydrostatiques (en petits volumes ou dans les réacteurs) et hydrodynamiques.

Pour les deux types de réacteurs, le jour de l'expérimentation, l'entrée et la sortie d'eau sont coupées afin de se trouver dans un système clos. Les trois bactériophages sont inoculés, à une concentration de $10^6$ UFP/mL chacun, dans l'eau des réacteurs. Après un temps d'homogénéisation de 1 minute, 1 mL d'eau est prélevé pour déterminer la concentration phagique initiale pour chaque phage. Pour les expérimentations en réacteur Propella™ les coupons sont déjà en place sur la colonne. Pour les expérimentations réalisées en réacteur à disque rotatif, le disque rotatif est ensuite remis en place à la surface de l'eau (t=0). Pour chaque temps d'analyse les coupons sont prélevés en duplicat.

Pour toutes les expérimentations, les coupons sont rincés délicatement durant 1 minute dans de l'eau de distribution dépourvue de bactériophages avant analyse, afin d'éliminer les phages qui n'auraient pas réellement adhéré aux surfaces.

### 1. Adsorption phagique en conditions hydrostatisques

En conditions hydrostatiques, des expérimentations ont tout d'abord été réalisées afin d'évaluer l'influence de la concentration en phages dans l'eau sur la concentration en phages présents sur les surfaces colonisées ou non par un biofilm d'eau de distribution. Des cinétiques d'adsorption phagiques ont ensuite été réalisées pour une concentration de $10^6$ UFP/mL pour chaque phage dans l'eau.

#### 1.1. Adsorption phagique en conditions hydrostatiques en fonction de la concentration en phages dans l'eau

Une série de dilution d'ordre dix d'un mélange des trois phages est effectuée pour des concentrations phagiques allant de 2,1. $10^3$ à 3,2. $10^7$ éq UFP/mL pour chaque phage. L'étude de la sorption phagique est effectuée en duplicat pour chaque concentration testée en petits volumes, dans des piluliers contenant 20 mL de suspension phagique, à 20 ± 1°C. La sorption des phages est quantifiée après trois heures de temps de contact sur des coupons en PEHD dits « abiotiques » et colonisés par un biofilm de 60 jours.

### 1.2. Etude cinétique de l'adsorption phagique en conditions hydrostatiques

Le disque contenant les coupons à analyser est placé à la surface de l'eau sans aucune vitesse de rotation de sorte à se trouver en conditions hydrostatiques. Trois catégories de surfaces sont analysées :

- Des surfaces « abiotiques », c'est-à-dire placées sur le disque rotatif immédiatement avant l'inoculation des phages.

- Des surfaces ayant séjourné 48 heures dans le réacteur avant l'inoculation phagique, afin de voir si les dépôts se formant précocement sur les surfaces peuvent modifier les capacités d'adsorption des phages.

- Des surfaces colonisées par un biofilm d'eau potable de 60 jours.

Le détail des expérimentations effectuées sur les différents types de surface est présenté dans le **tableau 12**.

**Tableau 12. Temps d'analyse des coupons en fonction des expérimentations effectuées en conditions hydrostatiques.**

| | | **Temps des prélèvements: 2 coupons et 1 mL d'eau** |
|---|---|---|
| **Etude de surfaces ayant séjounées 48 heures dans l'eau** | **Inox « abiotique »** | 30 minutes, 1, 2, 6 et 8 heures |
| | **Inox « 48h »** | |
| | **PEHD « abiotique »** | |
| | **PEHD « 48h »** | |
| **Etude d'un biofilm de 60 jours** | **PEHD « abiotique »** | 5, 10, 15, 20, 30 minutes<br>puis 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9 et 10 heures |
| | **PEHD « 60 jours »** | 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30 minutes<br>puis 1, 2, 3, 5, 6, 8 et 10 heures |

## 2. Adsorption phagique en conditions hydrodynamiques

Des surfaces « abiotiques » ou colonisées par un biofilm d'eau potable de 60 jours ont été analysées. Le disque contenant les coupons à analyser est placé à la surface de l'eau et une vitesse de rotation de 21 ou 75 rpm est appliquée. Ces vitesses de rotation permettent l'étude de gradients pariétaux de 65, 120, 175 et 236 $s^{-1}$ pour une vitesse de rotation fixée à 21 rpm et de 452, 830, 1 212 et 1642 $s^{-1}$ pour une vitesse de 75 rpm.

Pour chaque temps d'analyse, deux coupons sont prélevés par gradient pariétal, soit 2 coupons D, 2 coupons C et 2 coupons B **(Figure 17, B)**, ainsi que 1 mL d'eau des réacteurs. Les coupons A sont au nombre de quatre, ils sont réservés pour l'analyse de la densité bactérienne à la surface. Les temps d'analyse sont présentés dans le **tableau 13**.

**Tableau 13. Temps de prélèvement des coupons en fonction des expérimentations effectuées en conditions hydrodynamiques (N=nombre d'expérimentation, n=nombre de coupons prélevés par temps d'analyse).**

| | **Support** | **Vitesse de rotation du disque (rpm)** | **Temps de prélèvement: 2 coupons par gradient pariétal 1 mL d'eau** |
|---|---|---|---|
| **Etude de l'influence du gradient pariétal de vitesse** | PEHD + Biofilm 60 jours | 21 (N=1, n=2) | 2, 4, 6, 8, 10 et 12 heures |
| | | 75 (N=1, n=2) | |
| **Etude de l'influence d'un biofilm** | PEHD | 75 (N=2, n=6) | 2, 4, 6, 8, 10, 12, 15, 18, 20 et 27 heures |
| | PEHD + Biofilm 60 jours | | 2, 4, 6, 8, 10, 12, 15, 18, 20, 22 et 27 heures |
| | Inox 316L + Biofilm 60 jours | 21 (N=1, n=2) | 2, 4, 6, 8 et 10 heures |
| | | 75 (N=1, n=2) | |

Pour l'étude de l'influence d'un biofilm sur les surfaces en PEHD, l'évolution de l'accumulation phagique sur les surfaces n'a pas pu être effectuée en une seule expérimentation de 27 heures. Deux expérimentations ont été réalisées de 2 à 12 heures (N=2, n=6) et deux autres de 12 à 27 heures (N=2, n=6).

## III. Evaluation de l'efficacité de protocoles de nettoyage sur les phages

Deux types de nettoyage ont été appliqués en réacteurs **(i)** Un nettoyage par augmentation de la vitesse de rotation du disque et donc du gradient pariétal de vitesse, afin d'évaluer l'arrachage des particules phagiques de la surface. **(ii)** Un nettoyage par chloration de l'eau. Ce deuxième traitement a été évalué en réacteur Propella™ et en réacteur à disque rotatif. Pour les expérimentations en réacteur à disque rotatif, la chloration a pu être combinée avec une augmentation de la vitesse de rotation du disque.

### 1. Etude de la désorption phagique et évaluation de l'efficacité d'un nettoyage hydrodynamique

Deux essais ont été effectués au sein de réacteurs à disque tournant colonisés par des biofilms de deux mois. Le protocole appliqué est présenté sur la **figure 22**. A chaque temps d'analyse 6 coupons sont prélevés et analysés par RT-PCR temps réel après avoir été rincés dans de l'eau dépourvue de phages durant une minute. Une quantification des bactéries composant le biofilm est également effectuée.

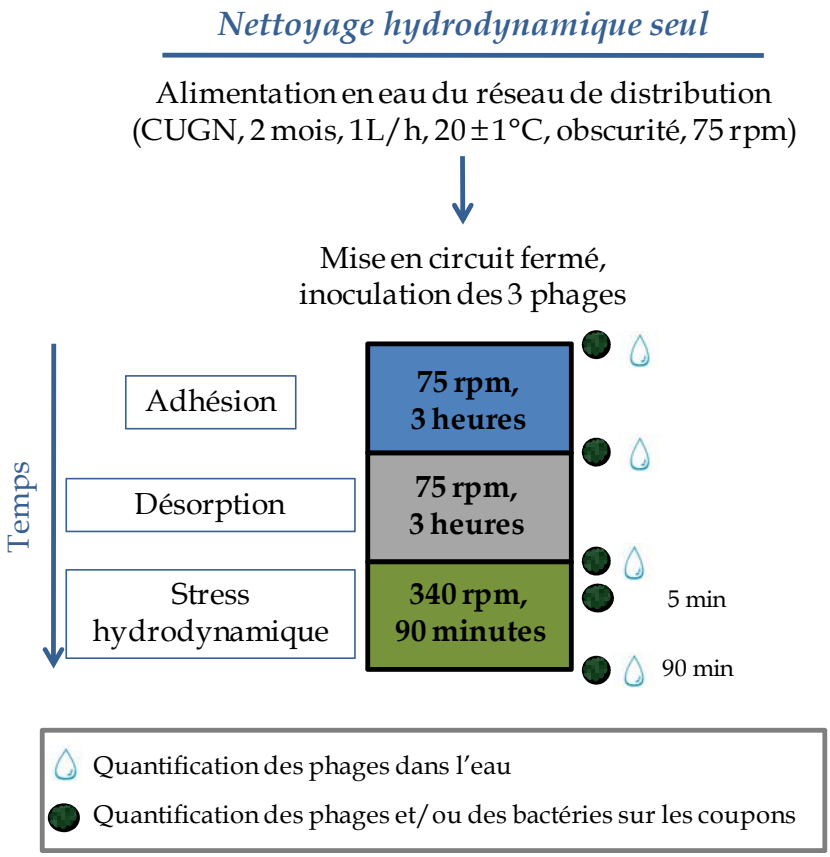



**Figure 22. Protocole expérimental appliqué pour l'évaluation de la désorption phagique et de l'efficacité d'un nettoyage par augmentation de la vitesse de rotation du disque (N=2, n=6).**

### 1.1. Etude de la désorption phagique

Après inoculation des phages, le disque, mis en rotation à 75 rpm, est laissé en contact trois heures afin de permettre l'adhésion des phages sur les surfaces avant d'étudier la désorption phagique. La quantité de phages et de bactéries mesurée sur les surfaces à t = 3h servira de concentration $C_0$ (éq UFP/cm² ou UFP/cm² et UFC/cm²) pour calculer l'abattement viral et bactérien.

Le disque, présentant à sa surface le biofilm de 60 jours ainsi que les phages adsorbés, est ensuite transféré sur une cuve de 35 L contenant de l'eau du réseau dépourvue de bactériophages. Le disque est mis en rotation durant 3 heures à 75 rpm. Après ces trois heures six coupons sont prélevés afin de mesurer par RT-qPCR la concentration en bactériophage $C_{dés}$ et de la comparer à $C_0$.

### 1.2. Nettoyage par augmentation du gradient pariétal de vitesse

Suite à l'étude de la désorption phagique, la vitesse de rotation du disque tournant est augmentée de manière à atteindre 340 rpm et est maintenue pendant 90 min (soit des vitesses d'eau de 1,6 à 3,4 m/s dans une canalisation de 20 cm de diamètre). La quantité de génome viral est évaluée à 5 et 90 minutes sur les coupons puis comparée aux concentrations initiales ($C_0$) afin d'estimer l'abattement (A) en génome viral suivant **l'équation 4.**

$$A = \log_{10} (C/C_0)$$ **Equation 4**

Des coupons sont prélevés à l'issue du nettoyage hydrodynamique afin d'évaluer l'abattement bactérien par augmentation des contraintes hydrodynamiques.

## 2. Etude de l'efficacité de la chloration sur les phages et les bactéries

Deux types d'essais ont été réalisés. D'une part une chloration à 5 mg/L d'hypochlorite de sodium dans des réacteurs Propella™ présentant à leur surface un biofilm de 3 ou 5 mois. D'autre part, une chloration à 4 mg/L d'hypochlorite de sodium, a été réalisée dans les réacteurs à disque rotatif pendant 60 minutes, associée à une augmentation de la vitesse de rotation du disque à 340 rpm durant 90 minutes. L'efficacité du nettoyage sur les phages a été évaluée sur les surfaces en termes de quantité de génome et de particules virales infectieuses (**figure 23**).

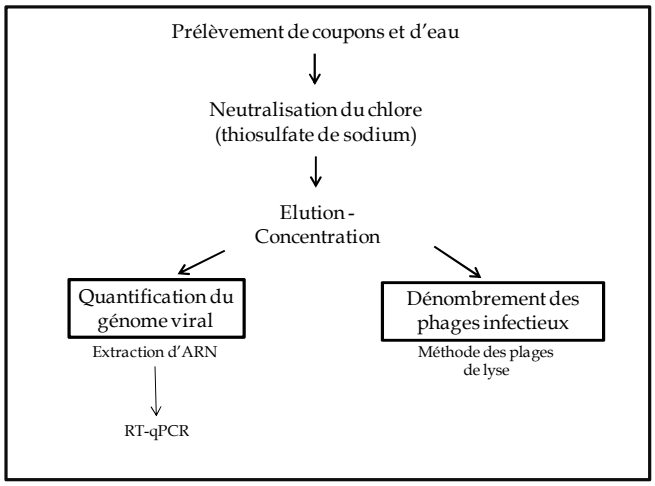



**Figure 23. Quantification des phages dans l'eau et sur les surfaces lors de l'étude de la chloration (L'étape d'élution-concentration n'est effectuée que pour les coupons).**

## 2.1. Préparation de la solution de chlore

Une solution de chlore à 27 g $Cl_2$/L est préparée à partir de berlingots d'eau de Javel (NaOCl).

### 2.1.1. Principe du dosage du chlore libre

Le chlore libre est dosé par méthode spectrophotométrique à la N,N-DiéthylPhénylène-1,4 Diamine (DPD) (AFNOR T 90-038, 1987). La préparation des réactifs nécessaires à ce dosage est présentée en **annexe 2**. En présence de chlore, la DPD est oxydée, et donne, à un pH compris entre 6,2 et 6,5, une coloration rouge pouvant être dosée par colorimétrie en comparaison avec une échelle d'étalon. Nous avons utilisé cette méthode afin de doser le chlore libre dans l'eau grâce à une gamme étalon.

Pour la réalisation de la gamme étalon, une gamme de dilution d'iodate ioduré équivalent à une concentration comprise entre 0 et 2,5 mg/L de chlore est préparée dans de l'eau ultra-pure (**Tableau 14**). Cinq mL d'une solution tampon (**Annexe 2**) et 5 mL de DPD sont déposés dans un Erlenmeyer et la totalité de la dilution à tester (100 mL) est ajoutée. Après homogénéisation, l'absorbance de la solution est mesurée immédiatement ($\lambda$ = 515 nm). Le blanc du spectrophotomètre est réalisé avec le témoin (équivalent 0 mg/L $Cl_2$). Les valeurs d'absorbance obtenues pour les différentes concentrations en chlore permettent de tracer la droite d'étalonnage.

**Tableau 14. Gamme de dilution d'iodate ioduré à réaliser pour l'étalonnage du dosage du chlore.**

| *Equivalent $Cl_2$* | *0 mg/L $Cl_2$* | *0,3 mg/L $Cl_2$* | *0,5 mg/L $Cl_2$* | *1 mg/L $Cl_2$* | *1,5 mg/L $Cl_2$* | *2 mg/L $Cl_2$* | *2,5 mg/L $Cl_2$* |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Iodate ioduré (mL)** | 0 | 3 | 5 | 10 | 15 | 20 | 25 |
| **Eau ultra-pure (mL)** | 50 | 47 | 45 | 40 | 35 | 30 | 25 |
| **$H_2SO_4$ 2N (mL)** | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Attendre une minute (formation de $I_3^-$) | | | | | | | |
| **NaOH 2N (mL)** | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| **Eau ultra-pure** | Compléter à 100 mL | | | | | | |

### 2.1.2. Dosage du chlore libre

La verrerie est nettoyée au préalable à l'eau de Javel à 27 g/L puis rincée à l'eau ultra-pure, afin d'éliminer toute matière organique susceptible d'interférer dans le dosage.

Pour le dosage du chlore libre, 5 mL d'échantillon à doser sont introduits dans un tube en verre contenant depuis moins d'une minute 250 µL d'une solution tampon (pH 6,2-6,5) et 250 µL de DPD à 0,1%. Après agitation au vortex, une mesure au spectrophotomètre est effectuée à 515 nm en ayant pris le zéro de l'appareil sur le témoin (eau distillée sans chlore). Si besoin, l'échantillon à doser est dilué dans de l'eau ultra-pure (volume final de 5 mL) afin de le placer dans les limites de détection de la méthode (de 0,03 à 5 mg/L de $Cl_2$). La concentration de chlore est déterminée à l'aide de **l'équation 5**. Le résultat est exprimé en mg d'équivalent chlore.

$[Cl_2]$ en mg/L = (DO)/0,2204 **Equation 5**

## 2.2. Evaluation de l'efficacité d'un nettoyage par chloration en réacteurs Propella™

Les expérimentations sont réalisées dans deux réacteurs Propella™ équipés de coupons de PEHD et alimentés par de l'eau du réseau de Nancy. Un des réacteurs présente à sa surface un biofilm de 3 mois, le second un biofilm de 5 mois. En raison du nombre de coupons, aucune analyse des bactéries composant le biofilm n'a été effectuée.

Les bactériophages sont inoculés dans le réacteur à une concentration finale de $10^6$ UFP/mL, 1 mL de milieu est récupéré afin de déterminer la concentration virale initiale. Le système est remis en marche en position batch pendant 4 heures. Cette étape est réalisée afin d'obtenir une adhésion initiale de chaque phage sur le biofilm. Un mL d'eau ainsi que la moitié des coupons sont prélevés pour analyse. Une chloration à l'hypochlorite de sodium (Richet, réf. EMB 02737) est ensuite effectuée à 5 mg/L pendant 30 minutes (**figure 24**).

Le chlore résiduel présent dans le réacteur est régulièrement dosé pendant le temps de chloration. Après 30 minutes, 1 mL d'eau ainsi que l'autre moitié des coupons sont prélevés. Pour ces prélèvements, le chlore résiduel est alors neutralisé avant analyse par ajout d'une solution de thiosulfate de sodium (Prolabo, réf. 27 909.296) à raison de deux moles de thiosulfate pour une mole de chlore théorique initial. Les coupons subissent une étape d'élution-concentration. Le concentrat obtenu ainsi que l'eau prélevée sont alors analysés par

RT-qPCR ainsi que par la méthode des plages de lyse afin de déterminer les concentrations en génome viral et en phages infectieux. Un schéma (**Figure 24**) résume les différentes étapes citées ci-dessus.

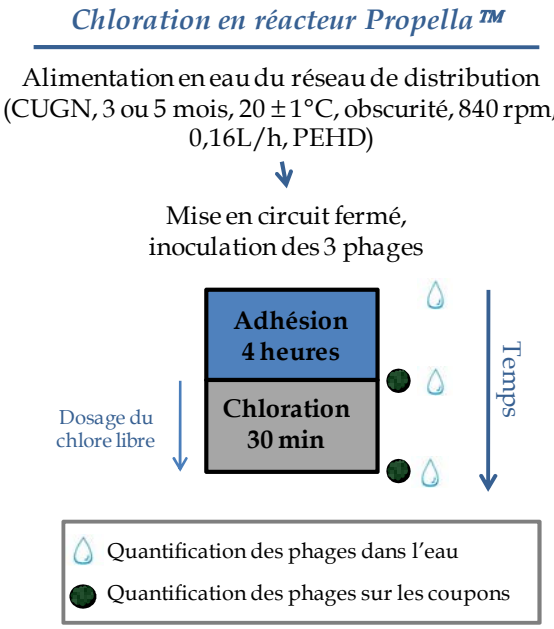



**Figure 24. Schéma général des expérimentations effectuées en réacteur Propella™ pour l'évaluation de l'efficacité d'un nettoyage par chloration.**

### 2.3. Evaluation de l'efficacité d'une chloration associée à une augmentation des contraintes hydrodynamiques en réacteur à disque rotatif

Des biofilms d'eau potable ont été formés pendant 60 jours à un débit de 1L/h dans les réacteurs à disque tournant équipés de coupons en PEHD. Après ce temps de colonisation, le réacteur est mis en circuit fermé (pas d'entrée et sortie d'eau) et deux essais sont réalisés. Les bactériophages sont inoculés à une concentration théorique de $10^6$ UFP/mL chacun dans l'eau et laissés en contact 3 heures avec le disque rotatif à 75 rpm. Après les trois heures de contact, trois coupons sont prélevés afin de mesurer la quantité de génome phagique et de phages infectieux à la surface. La quantité de phages trouvée sur les surfaces à t = 3h servira de concentration $C_0$ (éq UFP/cm² ou UFP/cm²) pour calculer l'abattement viral.

Trois coupons sont prélevés au différents temps d'analyse afin d'évaluer la densité bactérienne du biofilm (en termes de bactéries totales, de bactéries présentant une membrane intègre et de bactéries cultivables) ainsi que trois coupons pour évaluer la concentration en

bactériophages (en termes de copie génome et de phages infectieux). La **figure 25** présente le protocole expérimental de façon schématique.

Une solution d'hypochlorite de sodium est ensuite injectée dans l'eau du réacteur afin d'obtenir une concentration de 4 mg/L. Trois coupons ainsi que de l'eau sont prélevés après 30 et 60 minutes de contact avec le chlore afin de procéder à la quantification des phages et des bactéries sur les surfaces et dans l'eau. Après ces 60 minutes une augmentation des contraintes hydrodynamiques (de 75 à 344 rpm) est effectuée pendant 90 minutes pendant que la chloration se poursuit et trois coupons ainsi que de l'eau sont prélevés à l'issue des 150 minutes d'expérimentation afin de procéder à la quantification des phages et des bactéries sur les surfaces et dans l'eau.

Aux différents temps d'analyse de l'eau et des coupons, le chlore résiduel est neutralisé avant analyse par ajout d'une solution de thiosulfate de sodium à raison de deux moles de thiosulfate pour une mole de chlore. La concentration en chlore résiduel est suivie tout le long de l'expérimentation (150 minutes).

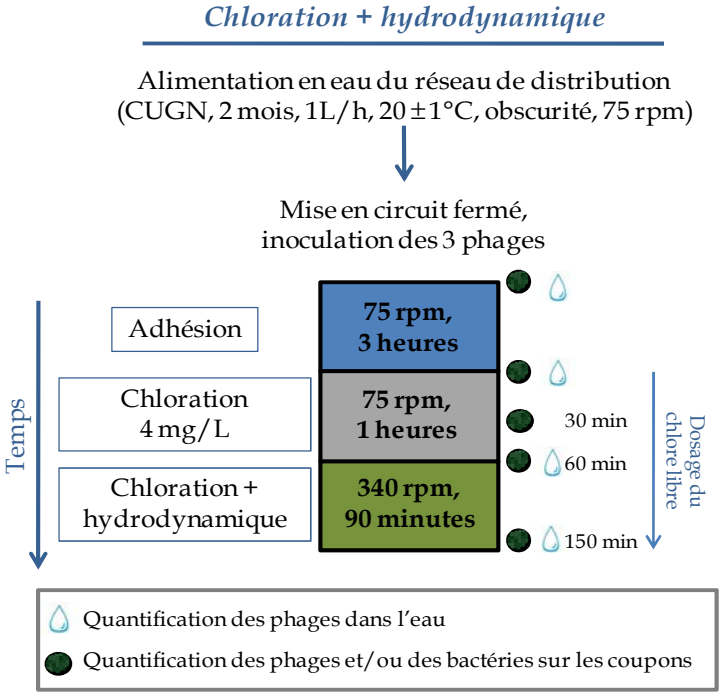



**Figure 25. Schéma général des expérimentations effectuées en réacteur à disque rotatif pour l'évaluation de l'efficacité d'un nettoyage par chloration associé à une augmentation des contraintes hydrodynamiques.**

# *Résultats*

Afin de modéliser le devenir de virus entériques pathogènes dans un réseau de distribution d'eau, il est nécessaire de disposer de données cinétiques décrivant l'adsorption des virus sur les surfaces, or à l'heure actuelle aucune étude cinétique du comportement de virus entériques pathogènes dans un système de distribution d'eau n'est disponible. Pour autant, ces données sont nécessaires dans un souci d'amélioration de la prise en charge lors d'accidents pouvant survenir sur les réseaux d'eau potable afin de prendre en compte les virus présents dans la phase aqueuse, mais également ceux ayant adsorbés sur le biofilm. Pour cela, des cinétiques suivant la concentration phagique dans l'eau et sur les surfaces ont été effectuées. Des analyses ont été menées en conditions hydrostatiques, c'est-à-dire sans flux d'eau à la surface, mais également en conditions hydrodynamiques en appliquant différents gradients pariétaux de vitesse, c'est-à-dire différentes vitesses d'eau sur la paroi. L'étude de l'influence des propriétés de surface des phages sur leur adhésion a été possible par l'utilisation de trois bactériophages présentant des différences notamment en termes d'hydrophobicité. Enfin, les expérimentations ont été effectuées sur des surfaces en inox 316L ou en PEHD soit "abiotique", c'est-à-dire sans biofilm à leur surface, soit colonisées par un biofilm de deux ou 60 jours. Afin de distinguer les différents génotypes phagiques étudiés, la détection a été effectuée par biologie moléculaire lors de cette étape.

L'ensemble des expérimentations est réalisé dans des réacteurs connectés au réseau de distribution d'eau de la Communauté Urbaine du Grand Nancy. L'eau présente un pH moyen de 8,1 ± 0,2 pour une conductivité moyenne de 345 ± 75 µS/cm et une concentration en chlore résiduel inférieure à 0,02 mg $Cl_2$/L. La concentration moyenne en bactéries totales est de 3,3 ± 2,6.$10^7$ cellules/L avec moins de $10^5$ UFC/L après 15 jours de culture à 20°C (n=10). Les expérimentations ont été réalisées à l'aide de bactériophages ARN F-spécifiques utilisés comme modèles des virus entériques pathogènes. Aucun phage ARN F-spécifique n'a été détecté dans l'eau utilisée pour les expérimentations avant l'inoculation artificielle des phages MS2, GA et Qβ. Les résultats présentés dans ce manuscrit s'articuleront autour de trois grandes parties:

- La validation de la méthode de quantification des phages MS2, GA et Qβ par RT-PCR temps réel a été effectuée, afin d'éliminer l'hypothèse d'une éventuelle interférence de notre système d'étude avec cette méthode. Des mesures de la taille des particules phagiques en suspension dans de l'eau de distribution ont également été réalisées, afin de savoir si les phages se trouvent sous forme de particules isolées ou agrégées.
- L'adsorption des trois bactériophages a été suivie sur des surfaces en inox 316L et en PEHD présentant différents niveaux de colonisation par des biofilms d'eau potable.

L'analyse bactériologique des biofilms d'eau potable de 60 jours a été effectuée par des mesures de la densité bactérienne en fonction de différentes conditions hydrodynamiques. L'adsorption des phages sur les surfaces a été étudiée en conditions hydrostatiques et hydrodynamiques et en présence ou en absence de biofilm afin d'évaluer l'importance relative de ces paramètres dans le phénomène d'adhésion des phages aux surfaces.

- Enfin, l'évaluation de l'efficacité de protocoles de nettoyage par augmentation des contraintes hydrodynamiques sur la paroi et par chloration a été effectuée sur les bactéries composant le biofilm mais également sur les bactériophages en suspension dans l'eau ou ayant adsorbés sur les surfaces.

## PARTIE I. Validations méthodologiques

Afin de suivre l'évolution du comportement des bactériophages MS2, GA et Qβ, il a été nécessaire d'utiliser des méthodes permettant leur quantification. Deux options sont possibles et ont été utilisées lors de ce travail, les méthodes de culture et les méthodes de biologie moléculaire. Les méthodes de culture présentent l'avantage de ne cibler que les particules infectieuses, mais nécessite l'utilisation de protocoles d'élution douce permettant la récupération des phages infectieux adsorbés sur les surfaces. Le protocole utilisé a été mis au point et optimisé par Helmi *et al.* (2010), il est adapté à la récupération et à la quantification de bactériophages infectieux sur des surfaces colonisées par des biofilms. Les méthodes de biologie moléculaires ne permettent pas de tenir compte du caractère infectieux, mais permettent de récupérer l'ensemble des génomes phagiques indépendamment des propriétés de surface des virus. Nous avons choisi de privilégier la détection moléculaire car il a été démontré que les phages étudiés ont des propriétés de surface différentes (Langlet *et al.,* 2008), qui pourraientt avoir un impact sur les taux de récupérations par élution et de ce fait induire un biais dans nos conclusions en termes d'adhésion des phages étudiés aux biofilms. L'extraction des acides nucléiques est donc réalisée directement sur les surfaces et la détection phagique est ensuite réalisée par RT-PCR temps réel selon le protocole développé par Ogorzaly et Gantzer (2006). Ce protocole permet la quantification spécifique du génome de chaque génogroupe.

Nous avons cherché à déterminer l'influence de différents paramètres sur le phénomène d'adsorption phagique, tels que le type de bactériophage étudié, le type surface considéré (inox 316 et PEHD, plus ou moins colonisés par des biofilms) et les conditions hydrodynamiques appliquées. Cependant, la réalisation des expérimentations s'étant échelonnée sur une période de trois ans, les résultats sont donc soumis à des variations environnementales et expérimentales pouvant influencer la quantification par RT-PCR temps réel. Pour cela, il a donc paru indispensable de vérifier la variabilité de notre méthode de détection par RT-PCR temps réel. Des validations méthodologiques ont également été effectuées afin de s'assurer que la méthode de détection ne subissait pas d'interférences de la part de notre système d'étude et que la congélation des échantillons ne modifiait pas la quantification phagique. Enfin, la taille des bactériophages a été analysée dans l'eau du réseau de distribution de la Communauté urbaine du grand Nancy. En effet, lorsque l'on travaille avec de fortes concentrations en phage, il est possible d'observer une agrégation des

particules. Or, la taille des particules a un effet majeur à la fois sur le transport des particules, mais également sur l'efficacité de protocoles de désinfection.

## I. Validation de la technique de détection par RT-PCR en temps réel

### 1. Pureté des suspensions de travail

Trois bactériophages ARN F-spécifiques appartenant à trois génogroupes différents G I (phage MS2), G II (phage GA) et G III (phage Qβ) sont utilisés pour ce travail. La bactérie hôte utilisée, *E. coli* K12 Hfr, est utilisée pour la multiplication et la détection des trois bactériophages, c'est pourquoi il a été nécessaire de contrôler que chaque nouvelle suspension de phage produite ne contenait qu'un seul génogroupe. Pour cela, avant d'effectuer le titrage des phages infectieux ainsi que la gamme étalon de chaque phage par RT-PCR temps réel, un contrôle de pureté est effectué. Le génome des trois génogroupes de bactériophages ARN F-spécifiques est recherché dans chaque nouveau stock de phage. Pour chaque suspension de bactériophage produite et utilisée dans le cadre de ce travail, seul le génogroupe phagique attendu a été détecté.

### 2. Gammes étalon

Cinq stocks différents de phages MS2, GA et Qβ ont été produits et utilisés pour l'ensemble de l'étude. Chaque suspension est tout d'abord titrée par la méthode des plages de lyse (Norme ISO 10705-1, 1995) afin de déterminer la concentration en phages infectieux. Les suspensions présentaient une concentration phagique moyenne sur l'intégralité des stocks de $2{,}8.10^{11} \pm 1{,}2.10^{11}$, $3{,}2.10^{10} \pm 1{,}2.10^{10}$ et $1{,}9.10^{11} \pm 1{,}3.10^{11}$ UFP (Unité Formant Plage) /mL respectivement pour les phages MS2, GA et Qβ.

Une série de dilutions d'ordre dix est ensuite effectuée et analysée en triplicat, l'ARN phagique est extrait de chaque dilution puis analysé par RT-PCR en temps réel (Ogorzaly et Gantzer, 2006). Ceci permet d'obtenir une valeur de Ct en fonction de la quantité initiale en équivalent bactériophages infectieux par réaction de RT-PCR (éq UFP/réaction de RT-PCR). La technique de détection a été validée en fonction de quatre critères déterminés à partir des droites étalon obtenues pour chaque stock de phage :

- Le coefficient de variation intra-essai ou reproductibilité.
- Le coefficient de variation inter-expérimentation, que l'on peut interpréter comme étant la robustesse.

- La sensibilité et la limite de détection.
- Les caractéristiques de chaque gamme étalon : le domaine de linéarité, le coefficient de détermination $R^2$ et la pente, ainsi que l'efficacité (E) ou rendement de PCR temps réel déterminé à partir de la valeur de la pente.

Les droites étalon obtenues pour chaque stock de chaque phage sont présentées sur la **figure 26.**

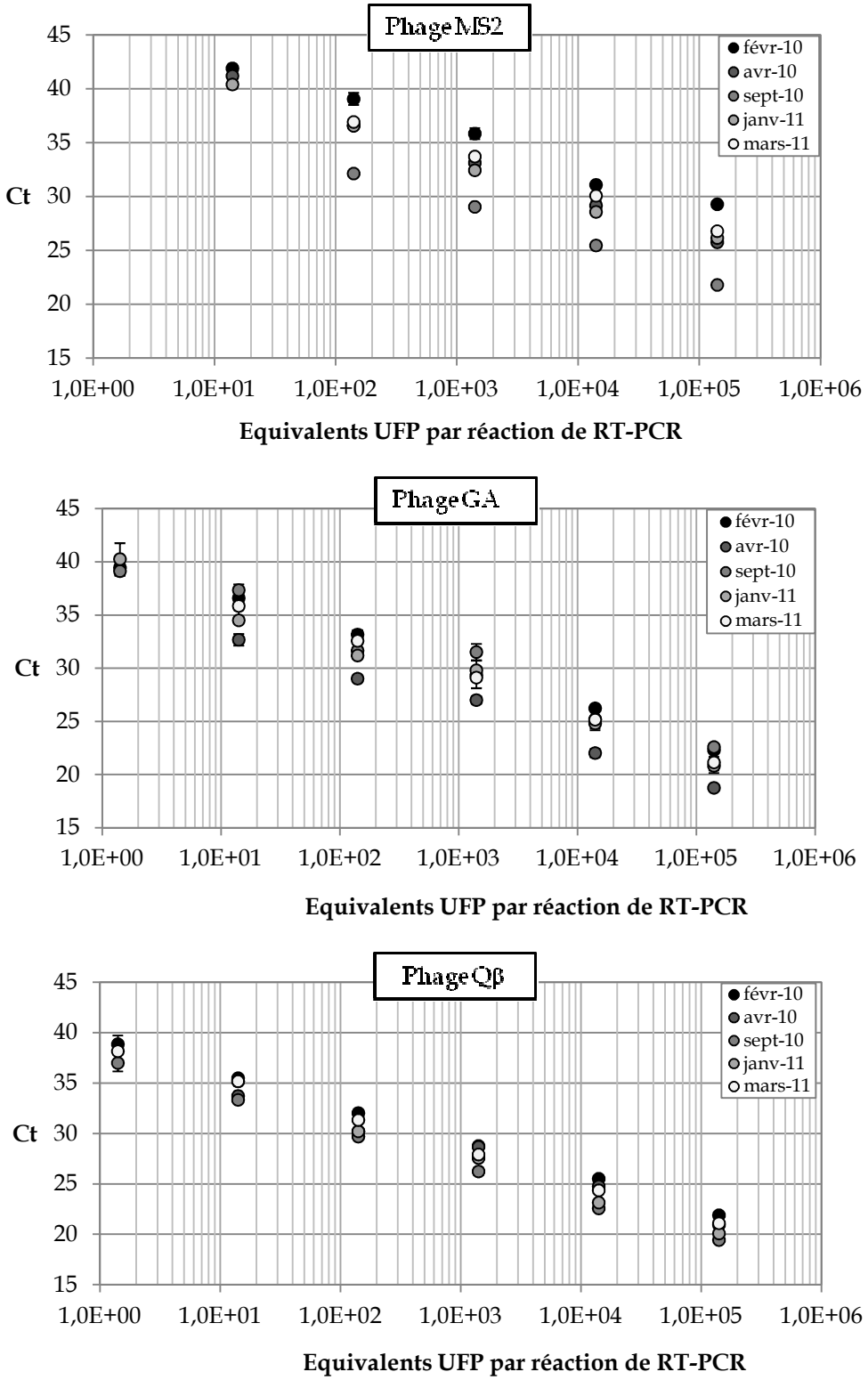



**Figure 26. Droites étalon pour des gammes de dilution d'ordre 10 des phages MS2, GA et Qβ pour les cinq stocks phagiques utilisés dans ce travail (Février 2010, avril 2010, septembre 2010, janvier 2011 et mars 2011). Chaque point représente les Ct moyens (n=3) obtenus en fonction de la concentration en bactériophages.**

### 2.1. Variabilité intra-essai et inter-expérimentation

La validation du protocole de détection nécessite d'évaluer la variabilité de la méthode.

- La variabilité intra-essai a été déterminée pour une gamme de dilution d'ordre 10 réalisée pour chaque stock de bactériophage (N=5) dont le titre en phage infectieux était connu. Chaque gamme a été rétro-transcrite et amplifiée simultanément en triplicat (n=3).

- La variabilité inter-expérimentation a été estimée à partir des gammes étalon obtenues pour les cinq suspensions de travail utilisées (N=5), entre février 2010 et mars 2011, pour chaque bactériophage (MS2, GA et Qβ). Ces gammes ont été rétro-transcrites et amplifiées séparément (N=5, n=3, N représente le nombre de répétitions et n le nombre de réplicats).

L'estimation de la variabilité est effectuée à partir des Ct obtenus pour chaque phage. Pour chaque dilution testée, un coefficient de variation (CV) est calculé selon **l'équation 6**, σ étant l'écart-type. Les résultats obtenus pour chaque phage sont présentés dans le **tableau 15**.

$$\mathrm{CV} = \left(\frac{\sigma}{moyenne\ des\ Ct}\right) \times 100 \qquad \textbf{Equation 6}$$

**Tableau 15. Coefficients de variation des valeurs de Ct (en %) intra-essai et inter-expérimentation pour chaque bactériophage.**

| | Nombre d'équivalent UFP par réaction de RT-PCR | $1{,}4.10^1$ | $1{,}4.10^2$ | $1{,}4.10^3$ | $1{,}4.10^4$ | $1{,}4.10^5$ | $1{,}4.10^6$ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **MS2** | CV % intra-essai | 1,1 | 0,4 – 3,1 | 0,2 – 0,8 | 0,2 – 1,8 | 0,2 – 1,7 | 0,07 – 1,1 |
| | CV % inter-expérimentation | 4,5 | 6,6 | 6,9 | 6,9 | 9,7 | 9,2 |
| **GA** | CV % intra-essai | 0,5 – 3,7 | 0,4 – 1,4 | 0,4 – 1,2 | 0,2 – 3,0 | 0,1 – 1,9 | 0,6 – 2,8 |
| | CV % inter-expérimentation | 3,1 | 4,9 | 4,8 | 5,4 | 5,9 | 6,8 |
| **Qβ** | CV % intra-essai | 0,6 – 2,3 | 0,3 – 1,3 | 0,2 – 0,9 | 0,2 – 1,4 | 0,3 – 0,9 | 0,1 – 2,6 |
| | CV % inter-expérimentation | 2,5 | 2,7 | 2,9 | 3,5 | 4,6 | 4,4 |

Il apparaît que pour le phage MS2, les coefficients de variation intra-essai varient de 0,07% pour une quantité de $1{,}4.10^6$ éq UFP à 3,1%pour une quantité de $1{,}4.10^2$ éq UFP. Pour le phage GA, l'échelle de variation est de 0,1% pour $1{,}4.10^5$ éq UFP à 3,7% pour une quantité de $1{,}4.10^1$ éq UFP. Enfin, concernant le phage Qβ les coefficients de variation se situent entre 0,1 et 2,6%, tous les deux pour une quantité de $1{,}4.10^6$ éq UFP. Ainsi, quel que soit le phage considéré la variabilité intra-essai s'échelonne globalement entre 0,07 et 3,7%.

D'après l'étude de la variabilité inter-expérimentation la RT-PCR temps réel spécifique du phage MS2 présente les coefficients de variabilité les plus élevés (entre 4,5 et 9,7%) et la RT-PCR temps réel spécifique du phage Qβ les plus faibles (entre 2,5 et 4,6%).

Les coefficients de variation mesurés sont systématiquement inférieurs à 3,7% pour la variabilité intra-essai et inférieurs à 9,7% pour la variabilité inter-expérimentation. Nos trois protocoles peuvent donc être considérés comme suffisamment robustes et la variabilité acceptable, pour suivre l'évolution de la quantité des trois génomes dans la suite de nos expérimentations. En effet, le Codex Alimentarius (CAC/GL 74/2010) situe la limite de variabilité intra-essai d'une méthode de quantification par PCR à 25% et la limite de variabilité inter-expérimentation à 35%.

### 2.2. La sensibilité et la limite de détection

La sensibilité de la RT-PCR temps réel correspond à la dernière dilution pour laquelle tous les réplicats sont positifs. La sensibilité pour les trois bactériophages est de l'ordre de $1{,}4.10^2$ éq UFP/réaction de RT-PCR ce qui correspond à $1{,}4.10^3$ éq UFP/mL.

La limite de quantification est la dernière dilution pour laquelle au moins un réplicat est positif, elle est de l'ordre de 10 éq UFP par réaction de RT-PCR temps réel pour les trois phages étudiés. D'après ces résultats, il est possible de déterminer que la limite de quantification par coupon (2,54 $cm^2$) est d'environ 50 éq UFP/$cm^2$.

### 2.3. Domaine de linéarité, pente de la droite et coefficient de détermination

Le domaine de linéarité d'une droite étalon doit s'étendre sur au moins quatre unités logarithmiques et avoir un coefficient de détermination ($R^2$) supérieur à 0,99. A partir de la **figure 26** on peut voir qu'il existe une relation linéaire entre le Ct et le logarithme du nombre de copies de phage sur cinq unités logarithmiques pour tous les stocks. Le domaine de linéarité correspond à des quantités initiales comprises entre $1{,}4.10^1$ et $1{,}4.10^6$ éq UFP par

réaction de RT-PCR pour le phage MS2 et 1,4 et $1{,}4.10^5$ éq UFP par réaction de RT-PCR pour les phages GA et Qβ.

Les pentes des droites étalon permettent de déterminer l'efficacité (E) de la PCR temps réel selon **l'équation 7**. L'efficacité de la PCR temps réel doit être comprise entre 75% et 125% (Norme NF T 90-471, avril 2010).

$$E = ((10^{-1/\text{pente}})-1) \times 100 \qquad \textbf{Equation 7}$$

Les coefficients de détermination ainsi que l'efficacité de la méthode pour chaque phage sont présentés dans le **tableau 16**.

**Tableau 16. Paramètres obtenus d'après les différentes droites étalon pour les trois phages étudiés.**

| | Stock | Pente de la droite | Efficacité % | Ordonnée à l'origine | Coefficient de détermination |
|---|---|---|---|---|---|
| **Phage MS2** | Fev-2010 | - 3,5 | 93,1 | 46,4 | 0,99 |
| | Avr-2010 | -3,8 | 83,3 | 47,7 | 0,99 |
| | Sep-2010 | -3,5 | 93,1 | 40,1 | 0,99 |
| | Jan-2011 | -3,6 | 89,6 | 44,3 | 0,99 |
| | Mar-2011 | -3,3 | 100,9 | 43,6 | 0,99 |
| **Phage GA** | Fev-2010 | -3,4 | 96,8 | 43,6 | 0,99 |
| | Avr-2010 | -3,6 | 89,6 | 43,5 | 0,99 |
| | Sep-2010 | -3,4 | 96,8 | 43,7 | 0,99 |
| | Jan-2011 | -3,6 | 89,6 | 43,5 | 0,99 |
| | Mar-2011 | -3,5 | 93,1 | 42,3 | 0,99 |
| **Phage Qβ** | Fev-2010 | -3,4 | 96,8 | 42,7 | 0,99 |
| | Avr-2010 | -3,1 | 110,2 | 41,5 | 0,99 |
| | Sep-2010 | -3,5 | 93,1 | 40,9 | 0,99 |
| | Jan-2011 | -3,5 | 93,1 | 41,8 | 0,99 |
| | Mar-2011 | -3,7 | 86,3 | 44,0 | 0,99 |

Les valeurs de pente sont comprises entre -3,1 et -3,8. D'après ces valeurs, les rendements, ou efficacité, des RT-PCR temps réel sont compris entre 83% et 110%. Les valeurs de coefficient de détermination sont de 0,99 pour les trois bactériophages étudiés et pour chaque suspension utilisée. Ces droites remplissent tous les critères nécessaires à l'utilisation d'une droite étalon dans le cadre d'une quantification par RT-PCR temps réel (Norme NF T 90-471, avril 2010).

## II. Test d'inhibition de la détection phagique par RT-PCR temps réel

Les échantillons analysés sont constitués de coupons, auxquels est fixé, à l'aide de colle, un aimant. Les coupons sont, ou non, colonisés par un biofilm d'eau potable de 60 jours et l'étude de l'évolution de la concentration phagique sur ces surfaces est effectuée en fonction de différents paramètres.

Avant d'effectuer des quantifications de bactériophages sur les surfaces, il a fallu vérifier qu'aucun composant constituant l'échantillon, à savoir la colle, l'aimant ou le biofilm, n'interférait avec la méthode d'analyse. Le **tableau 17** présente les valeurs de Ct obtenues pour 1 mL de suspensions contenant $10^5$ UFP de phages MS2, GA et Qβ, ainsi que pour des suspensions contenant (i) un coupon, (ii) un aimant et un coupon et enfin (iii) un aimant et un coupon colonisé par un biofilm de 60 jours. L'extraction de l'ARN phagique est ensuite effectuée directement sur les 1 mL de suspension en présence ou non des différents types de coupons selon les conditions.

**Tableau 17. Ct mesurés par RT-PCR temps réel pour des suspensions contenant les trois bactériophages à une concentration de $10^5$ UFP/mL, en fonction de la présence d'un coupon en PEHD, d'un aimant et d'un biofilm d'eau potable.**

| | | Suspension phagique | | Suspension + coupon | | Suspension + coupon + aimant | | Suspension + coupon + aimant + biofilm |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Phage MS2 | $10^5$ UFP/mL | 25,9 | 25,9 | 25,7 | 25,7 | 25,9 | 26,2 | 26,6 |
| | Dilution $1/10^e$ | 29,8 | 29,7 | 29,3 | 29,6 | 29,8 | 29,5 | 30,1 |
| | Dilution $1/100^e$ | 32,8 | 32,7 | 32,8 | 32,9 | 33,1 | 32,9 | 34,0 |
| Phage GA | $10^5$ UFP/mL | 24,5 | 24,5 | 24,5 | 24,5 | 24,6 | 24,5 | 25,0 |
| | Dilution $1/10^e$ | 28,2 | 28,2 | 28,3 | 28,0 | 28,2 | 28,6 | 28,9 |
| | Dilution $1/100^e$ | 31,4 | 31,5 | 31,8 | 31,5 | 31,6 | 31,4 | 31,2 |
| Phage Qβ | $10^5$ UFP/mL | 24,9 | 24,8 | 24,4 | 24,7 | 24,7 | 24,5 | 25,7 |
| | Dilution $1/10^e$ | 27,9 | 28,6 | 28,5 | 28,6 | 28,3 | 28,3 | 29,0 |
| | Dilution $1/100^e$ | 31,8 | 31,5 | 31,9 | 31,9 | 31,9 | 31,9 | 32,4 |

Plusieurs informations peuvent être obtenues à partir de ces résultats. Tout d'abord, concernant une éventuelle interaction entre la méthode de détection et le système d'étude, les Ct obtenus lors de l'analyse des suspensions pures ou contenant des coupons avec aimant et biofilm ne diffèrent pas de façon significative et ceci pour les trois phages étudiés ($p>0,67$, Mann-Withney, $\alpha=0,05$). Nous pouvons donc en conclure que la colle, les aimants ainsi que la présence d'un biofilm de deux mois sur les surfaces n'interfèrent pas avec la quantification phagique par RT-PCR temps réel et ceci pour les trois phages étudiés.

Les échantillons ont également été analysés parès dilution au dixième et au centième, afin de voir une éventuelle inhibition de PCR par l'un des constituants de notre système. Pour le phage MS2, il existe une différence moyenne de Ct de 3,7 entre la suspension pure et la suspension diluée au dixième, et une différence moyenne de 3,3 entre la suspension diluée au dixième et la suspension diluée au centième. Ces différences de Ct sont respectivement de 3,7 et 3,2 pour le phage GA et 3,7 et 3,4 pour le phage Qβ. La différence attendue devant être comprise entre 2,8 et 4,2, pentes respectivement observées pour des efficacités de 75 et 125%. Il en résulte qu'aucune inhibition de PCR n'est observée dans nos conditions de travail et que la quantification des phages par RT-PCR temps réel peut être effectuée sur les coupons équipant les réacteurs.

## III. Impact d'une étape de congélation sur la quantification des phages

Lors des expérimentations de chloration, il a été nécessaire, pour une partie des échantillons, d'ajouter une étape de congélation avant extraction de l'ARN phagique. Il a donc fallu vérifier que cette étape n'influençait pas la quantification des phages lors de l'analyse des coupons et de l'eau des réacteurs. Pour cela les bactériophages MS2, GA et Qβ sont inoculés dans 1 litre d'eau du réseau à une concentration finale de $10^6$ UFP/mL pour chacun des phages. Vingt mL de cette eau sont ensuite aliquotés dans des piluliers contenant chacun un coupon, le système est laissé en contact pendant cinq heures. Après ces cinq heures, la moitié des coupons (n=3) ainsi que l'eau correspondante (n=3) sont analysés directement après extraction et RT-PCR temps réel. L'autre moitié des coupons et les échantillons d'eau correspondants subissent l'effet du tampon de lyse durant 10 minutes puis sont congelés. L'extraction est achevée le lendemain et suivie d'une quantification par RT-PCR temps réel. Les résultats obtenus sont présentés dans le **tableau 18.**

**Tableau 18. Ct moyens (n=3) mesurés pour les trois bactériophages sur des échantillons extraits et analysés immédiatement après le prélèvement ou ayant subit une étape de congélation après l'étape de lyse des particules virales.**

| | **MS2** | | **GA** | | **Qβ** | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Sans congélation | Avec congélation | Sans congélation | Avec congélation | Sans congélation | Avec congélation |
| **Coupon** | 30,5 ± 0,2 | 30,2 ± 0,5 | 29,9 ± 0,8 | 29,6 ± 0,8 | 25,3 ± 0,8 | 24,9 ± 0,07 |
| **Eau** | 21,9 ± 0,2 | 21,8 ± 0,1 | 24,1 ± 0,04 | 24,2 ± 0,3 | 22,6 ± 0,06 | 22,9 ± 0,3 |

Pour le bactériophage MS2, le Ct moyen (n=3) mesuré sur les coupons est respectivement de 30,5 ± 0,2 et 30,3 ± 0,5 pour l'extraction sans congélation et l'extraction après une étape de congélation. Pour le bactériophage GA, le Ct moyen (n=3) est de 29,9 ± 0,8 sans congélation et de 29,6 ± 0,8 avec congélation. Enfin pour le phage Qβ, les Ct moyens (n=3) mesurés sont respectivement de 25,3 ± 0,8 et 24,9 ± 0,07 sans et avec l'étape de congélation.

En ce qui concerne la détection dans l'eau, les valeurs de Ct mesurées sans ou avec congélation sont respectivement de 21,9 ± 0,2 et 21,8 ± 0,1 pour le phage MS2, de 24,1 ± 0,04 et 24,2 ± 0,3 pour le phage GA et enfin de 22,6 ± 0,06 et 22,9 ± 0,3 pour le phage Qβ.

D'après ces résultats, il n'y a pas de différence significative entre l'analyse directe des échantillons et l'analyse comprenant une étape de congélation de 24 heures ($p>0,88$, Mann-Whitney, $\alpha=0,05$). Les échantillons peuvent donc être congelés après l'étape de lyse des particules virales pour ensuite reprendre l'extraction des ARN et leur quantification par RT-PCR en temps réel.

## IV. Mesure de la taille des particules phagiques dans l'eau potable

Une éventuelle agrégation des bactériophages pourrait avoir des conséquences directes à la fois sur l'adsorption des phages sur les surfaces et sur l'efficacité de la désinfection par chloration. C'est pourquoi, des mesures de taille des phages MS2, GA et Qβ sont réalisées afin de déterminer s'ils sont à l'état de particules isolées ou agrégées lors de nos expérimentations.

Les mesures sont réalisées dans de l'eau du réseau de distribution de sorte à se trouver dans une situation proche de celle créée dans les réacteurs. Ces mesures sont effectuées pour des valeurs de pH allant de 6 à 10 ainsi qu'au pH de l'eau du réseau de distribution de la CUGN, soit 8,2 ± 1. Le protocole utilisé a été précédemment mis au point par Langlet *et al*. (2008) et utilise des suspensions phagiques dialysées à des concentrations d'au moins $10^{10}$ UFP/mL. Le Zétasizer (Malvern) équipé du logiciel d'analyse des données (DTS) est utilisé pour indiquer la taille des particules constituant la population majoritaire. Dans notre cas, cette population majoritaire représente 96 à 100 % des particules détectées.

## 1. Mesure de la taille des particules dans des suspensions contenant un seul génogroupe phagique

La **figure 27** présente les valeurs de taille (en nm) obtenues lors de deux analyses effectuées en triplicat (N=2, n=3. N représente le nombre d'analyses et n le nombre de réplicats).

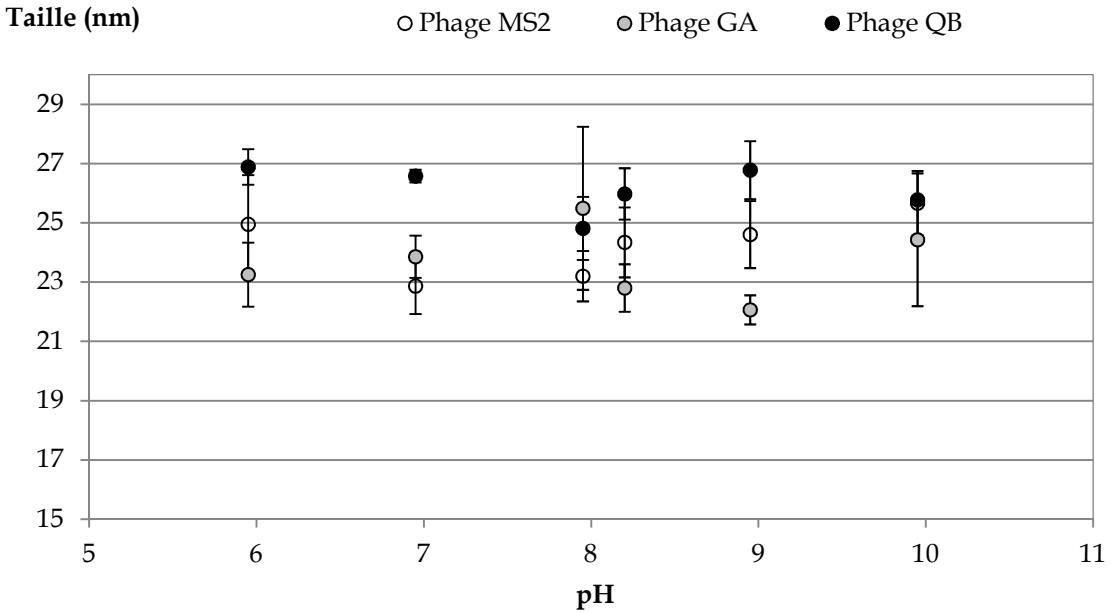



**Figure 27. Mesure de la taille des particules phagiques dans de l'eau de distribution pour les phages MS2, GA et Qβ analysés séparément. Chaque point représente deux expérimentations effectuées en triplicat (N=2 et n=3).**

La taille moyenne des particules pour le phage MS2 est de 24,3 ± 1,1 nm et plus de 96% des particules mesurées présentaient une taille de 25,1 nm. Pour le phage GA, la taille moyenne est de 23,6 ± 1,2 et plus de 98% des particules mesurent 24,6 nm. Enfin, concernant le phage Qβ, la taille moyenne observée est de 26,1 ± 0,8 nm et plus de 96% des particules mesurent 26,2 nm. Globalement la taille des particules virales est homogène, conforme aux données retrouvées dans la littérature et indique que ces particules sont isolées dans nos conditions expérimentales.

## 2. Mesure de la taille des particules dans une suspension contenant un mélange des trois phages

Lors de nos expérimentations les trois phages, MS2, GA et Qβ sont inoculés en même temps dans l'eau. C'est pourquoi une analyse de la taille des particules pour un mélange des

trois phages, à une concentration moyenne de $10^{10}$ UFP/mL pour chaque bactériophage, est réalisée en triplicat dans de l'eau du réseau (**Figure 28)**.

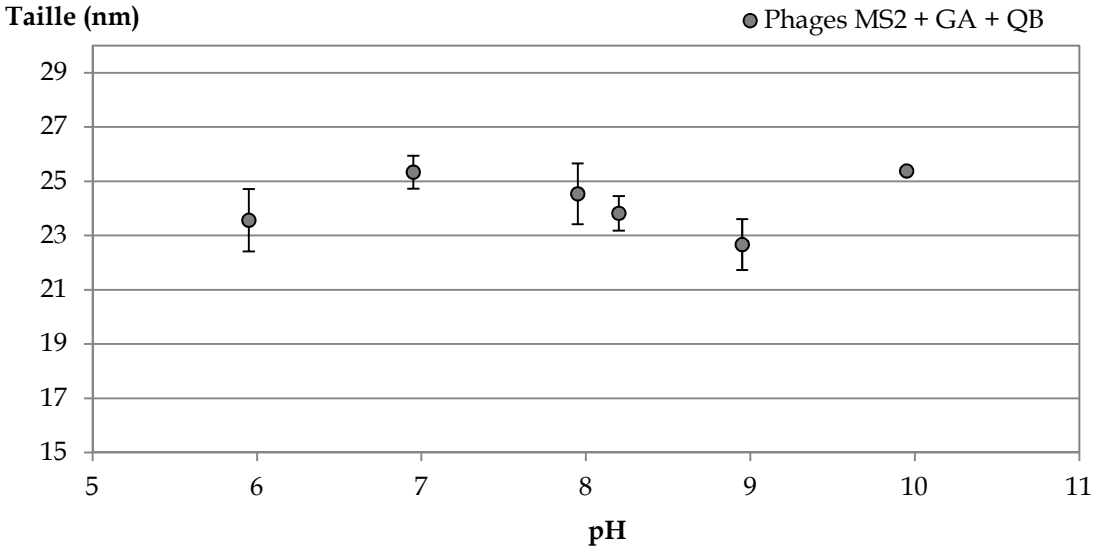



**Figure 28. Mesure de la taille des particules phagiques dans de l'eau de distribution pour un mélange des trois phages MS2, GA et Qβ (N=1 et n=3).**

La taille moyenne des particules est de 24,2 ± 1,1 nm, ce qui correspond à la taille moyenne d'une particule phagique isolée et plus de 97% des particules présentent une taille de 24,8 nm.

Etant donné qu'aucune agrégation n'est observée pour un mélange des trois phages à une concentration de $10^{10}$ UFP/mL dans de l'eau du réseau, il est possible de faire l'hypothèse que dans nos conditions de travail en réacteur, à $10^{6}$ UFP/mL les bactériophages sont également à l'état de particules isolées.

*En résumé, toutes les suspensions de bactériophages produites et utilisées pour nos expérimentations ne contenaient qu'un seul génogroupe phagique. La variabilité intra-essai est comprise entre 0,07% et 3,7 % et la variabilité inter-expérimentation entre 2,5% et 9,7 %. Notre méthode de quantification par RT-PCR temps réel peut donc être considérée comme suffisamment robuste pour être utilisée dans notre système d'étude. La sensibilité de la quantification est de 1,4.10² éq UFP par réaction de RT-PCR, ce qui correspond à environ 50 éq UFP/cm². Enfin, le domaine de linéarité des droites étalon s'étend sur au moins cinq unités logarithmiques et l'efficacité de la méthode est comprise entre 83% et 110%.*

*Notre système d'étude consiste à quantifier le nombre de particules phagiques à la surface de coupons. Le dispositif complet comprend un coupon, un aimant, de la colle et la surface peut être colonisée par un biofilm d'eau potable de 60 jours. Aucun des constituants de ce dispositif n'interfère sur la méthode de quantification par RT-PCR temps réel. De même, aucune inhibition de RT-PCR n'a été détectée.*

*Certaines de nos expérimentations, notament celles portant sur l'efficacité de la chloration, nécessitent, pour des raisons techniques, de congeler les échantillons après l'étape de lyse des particules phagiques. La comparaison des deux protocoles d'extraction des ARN phagiques, avec ou sans cette étape de congélation, a montré que la congélation n'entraine pas de dégradation des acides nucléiques et peut donc être appliquée lors de nos expérimentations.*

*Enfin, les mesures de taille réalisées dans de l'eau de distribution utilisée pour l'alimentation des réacteurs montrent que plus de 96% des phages mis en suspension dans cette eau se trouvent à l'état de particules isolées.*

## PARTIE II. Sorption des phages MS2, GA et Qβ en conditions hydrostatiques et hydrodynamiques

### I. Description du biofilm

L'étude de la sorption phagique a été effectuée sur des surfaces dites " abiotiques ", c'est-à-dire mises en place dans le réacteur juste avant l'inoculation des phages, ou sur des surfaces colonisées par des biofilms d'eau potable de 60 jours. La formation des biofilms a été effectuée à l'obscurité, dans une eau thermostatée à 20 ± 1°C, avec une vitesse de rotation du disque permettant l'étude de gradients pariétaux de vitesse de 65, 120, 175, 240 $s^{-1}$ pour une rotation à 21 rpm et des gradients de 450, 830, 1210 et 1640 $s^{-1}$ pour une vitesse fixée à 75 rpm. La **figure 29** représente une vue macroscopique de coupons d'inox 316L et de PEHD colonisés par un biofilm d'eau de distribution de 60 jours.

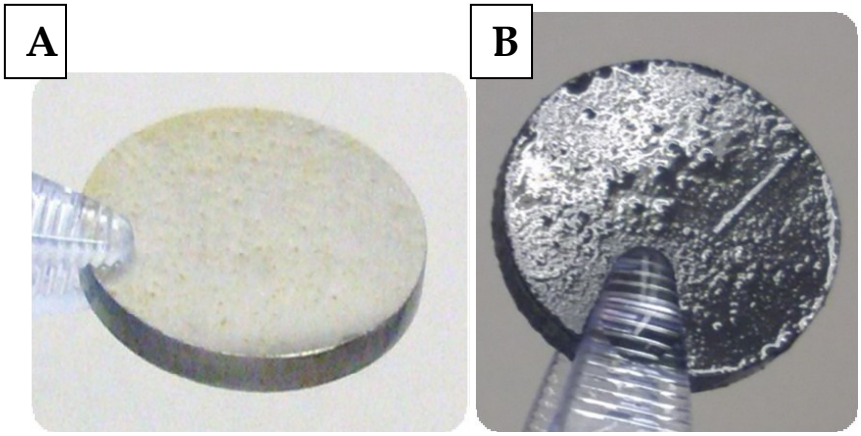



**Figure 29. Coupons (1,8 cm de diamètre) d'inox 316L (A) et de PEHD (B) colonisés par un biofilm de 60 jours.**

Avant l'inoculation des bactériophages dans les réacteurs, deux coupons colonisés par un biofilm de 60 jours ont été prélevés pour chaque gradient pariétal de vitesse afin d'évaluer la densité bactérienne à la surface. Les analyses de densité cellulaire ont été effectuées à l'aide de la technique du Backlight™ permettant d'obtenir deux informations. Tout d'abord, un marquage au SYTO 9 qui permet de dénombrer les bactéries totales, puis un marquage à l'iodure de propidium (PI) permettant de visualiser les bactéries dont la perméabilité membranaire est altérée. Les concentrations en bactéries cultivables ont également été déterminées. **Les figures 30 et 31** représentent la densité bactérienne (bactéries.$cm^{-2}$) retrouvées à la surface des coupons en PEHD et en inox 316L en fonction du gradient pariétal appliqué.

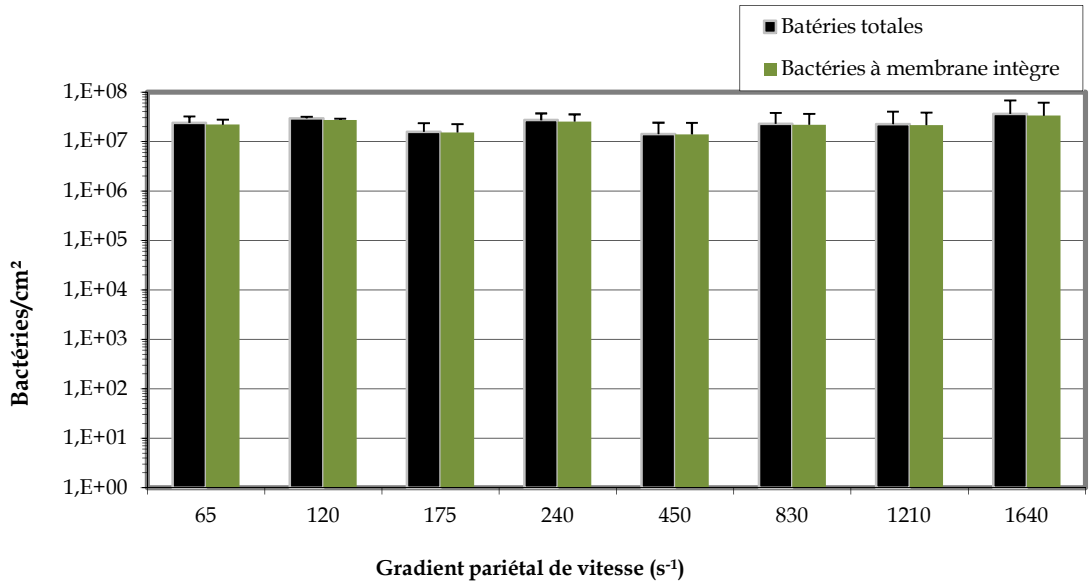



**Figure 30. Nombre de bactéries totales et nombre de bactéries présentant une membrane intègre mesurées sur PEHD après 60 jours dans l'eau en fonction de différents gradients pariétaux de vitesse (N=2, n=2).**

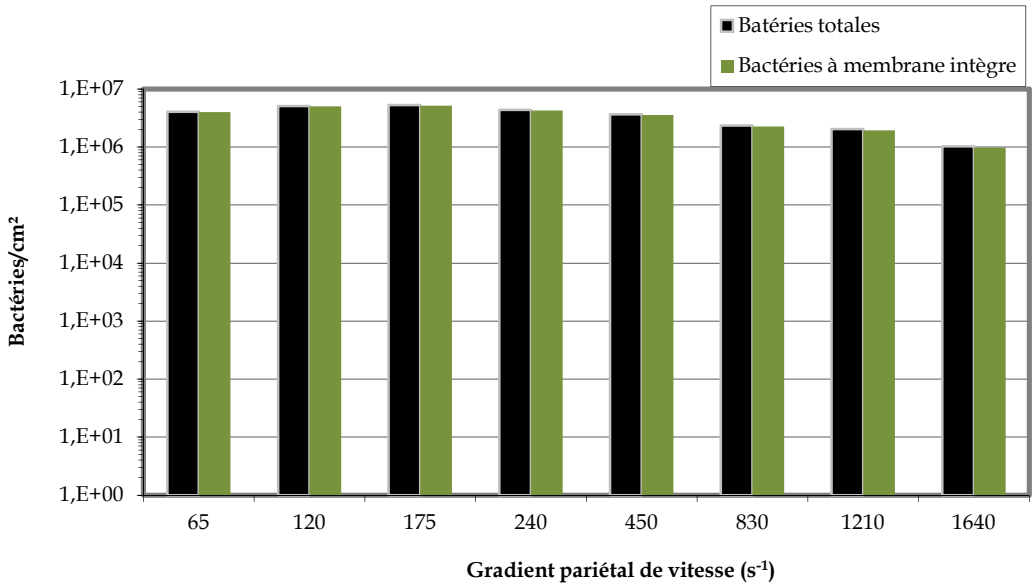



**Figure 31. Nombre de bactéries totales et nombre de bactéries présentant une membrane intègre mesurées sur inox 316L après 60 jours dans l'eau en fonction de différents gradients pariétaux de vitesse (N=1, n=2).**

Sur les surfaces en PEHD, le nombre de bactéries fixées ne diffère pas significativement en fonction du gradient pariétal de vitesse entre 65 et 1640 $s^{-1}$, avec la méthode de détection utilisée ($p>0,05$, Mann et Whitney, $\alpha=0,05$). Ainsi la densité bactérienne la plus faible est mesurée pour un gradient pariétal de 450 $s^{-1}$ ($1,4.10^7 \pm 9,8.10^6$ bactéries/$cm^2$) et la plus importante est mesurée pour un gradient pariétal de 1640 $s^{-1}$ ($3,6.10^7 \pm 3,2.10^7$ bactéries/$cm^2$). Le nombre total de bactéries mesurées à la surface des coupons est en moyenne de $2,5.10^7 \pm 1,9.10^7$ cellules/$cm^2$ sur les coupons en PEHD. Cette absence de différence de densité pourrait être due à un écart trop faible entre les deux valeurs extrêmes de gradient pariétal de vitesse testées et/ou à un temps d'expérimentation suffisamment long (60 jours) pour que les différences initiales liées à ces gradients soient nivelées par un dépôt maximal et une multiplication des cellules.

Sur les surfaces en inox 316L, la densité bactérienne retrouvée sur les surfaces semble diminuer légèrement avec l'augmentation du gradient pariétal de vitesse. Cependant, le nombre de mesures effectuées n'a pas parmi d'effectuer un test statistique. La densité bactérienne la plus faible est mesurée pour un gradient de 1640 $s^{-1}$ ($1,0.10^6$ bactéries/$cm^2$) et la plus importante pour un gradient de 175 $s^{-1}$ ($5,3.10^6$ bactéries/$cm^2$). Le nombre moyen de cellules mesurées à la surface des coupons en inox 316L est de $3,5.10^6 \pm 1,5.10^6$ bactéries/$cm^2$. La densité cellulaire mesurée sur inox 316L est inférieure d'une unité logarithmique à la densité cellulaire mesurée sur des surfaces en PEHD. Ceci est probablement dû aux différences de propriétés de surfaces entre l'inox 316L et le PEHD.

Pour ces deux types de surfaces, plus de 95% des bactéries possèdent une membrane intègre et moins de 0,1% sont cultivables en milieu gélosé après 15 jours à 20°C.

## II. Adsorption des bactériophages en conditions hydrostatiques

Une étude de l'adsorption phagique en conditions hydrostatiques, c'est-à-dire sans flux d'eau sur les surfaces, a été menée à la fois sur des surfaces dites " abiotiques" et sur des surfaces colonisées par un biofilm d'eau potable de 60 jours. Dans un premier temps, une analyse de l'évolution de la concentration phagique sur les surfaces en fonction de la concentration en phages dans l'eau, de $2,1.10^3$ à $3,2.10^7$ éq UFP/mL, a été effectuée pour un temps d'analyse de trois heures. Dans un second temps, la concentration surfacique a été suivie durant huit à dix heures pour une concentration phagique dans l'eau de $10^6$ éq UFP/mL.

# 1. Evolution de la concentration phagique sur les surfaces en fonction de la concentration en phages dans l'eau

## 1.1. Adsorption phagique sur PEHD " abiotique " ou colonisé par un biofilm de deux mois

L'analyse de l'adsorption des phages MS2, GA et Qβ, sur les surfaces en fonction de la concentration phagique dans l'eau a été effectuée en petits volumes en travaillant avec de l'eau du réseau de distribution. Les concentrations en phage dans l'eau variaient entre $2{,}1.10^3$ et $3{,}2.10^7$ éq UFP/mL. Les mesures de concentration en phages sur les surfaces ont été effectuées après trois heures de contact en conditions hydrostatiques. Ces mesures ont été effectuées sur des coupons de PEHD en présence ainsi qu'en absence de biofilm sur les surfaces. La **figure 32** présente les résultats obtenus sur PEHD " abiotique ", c'est-à-dire en l'absence de biofilm, et la **figure 33** correspond aux données obtenues sur PEHD colonisé par un biofilm d'eau potable de 60 jours.

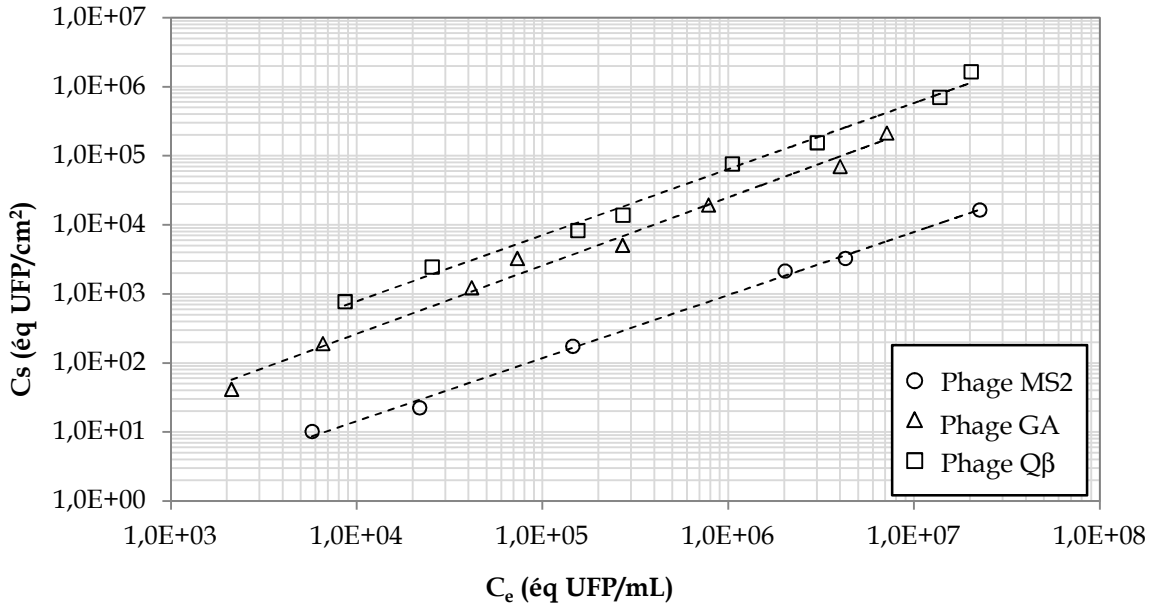



**Figure 32. Concentrations en phages adsorbés sur les surfaces en PEHD " abiotiques " en fonction de la concentration phagique dans l'eau après 3 heures de contact. $C_s$ : concentration surfacique (éq UFP/cm²) et $C_e$ : concentration dans l'eau (éq UFP/mL).**

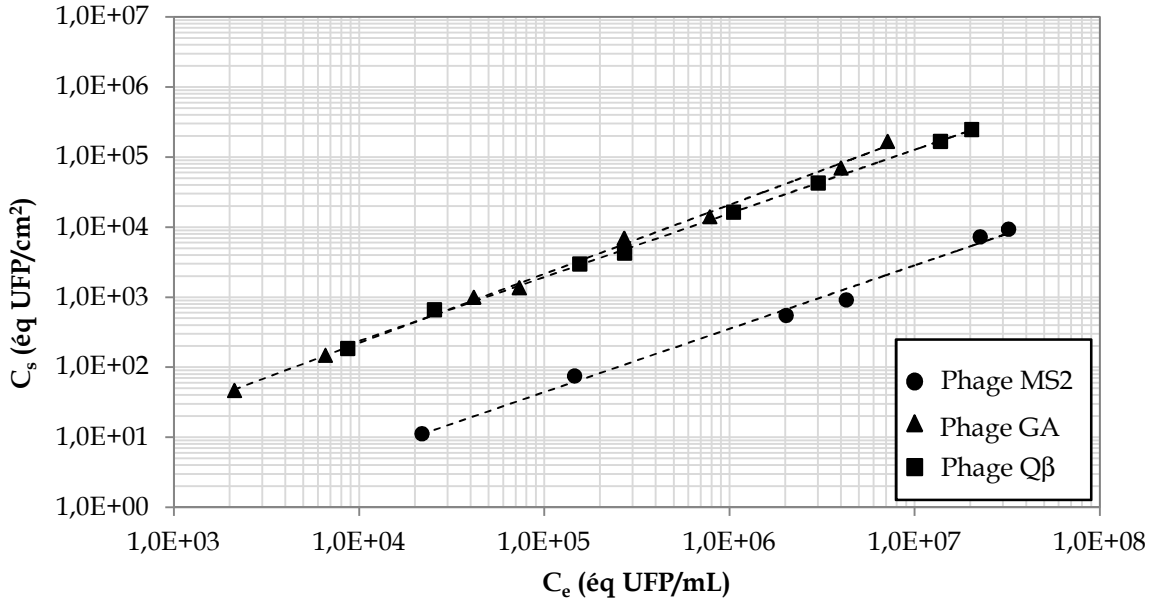



**Figure 33. Concentrations en phages adsorbés sur les surfaces en PEHD colonisées par un biofilm de deux mois en fonction de la concentration phagique dans l'eau après 3 heures de contact. $C_s$ : concentration surfacique (éq UFP/cm²) et $C_e$ : concentration dans l'eau (éq UFP/mL).**

Une relation log-linéaire entre les concentrations en phages dans l'eau et celles mesurées sur les coupons est mise en évidence, quel que soit le niveau de colonisation de la surface par un biofilm et quel que soit le phage considéré. Les caractéristiques des droites obtenues sont présentées dans le **tableau 19**.

**Tableau 19. Pentes (a) et ordonnées à l'origine (b) des droites obtenues sur PEHD " abiotique " ou colonisé par un biofilm de 60 jours.**

| | MS2 | | GA | | Qβ | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | PEHD abiotique | Biofilm de 60 jours | PEHD abiotique | Biofilm de 60 jours | PEHD abiotique | Biofilm de 60 jours |
| **a** | 0,94 | 0,92 | 0,99 | 0,99 | 0,96 | 0,91 |
| **b** | 0,003 | 0,001 | 0,03 | 0,03 | 0,12 | 0,05 |

Les coefficients de détermination de ces différentes droites sont de 0,99. Les pentes des droites sont comprises entre 0,91 et 0,99 et sont donc assez proche de 1, ce qui implique que l'adsorption des phages sur du PEHD, colonisé ou non par un biofilm, s'effectue selon la même proportion pour une concentration en phages dans l'eau comprise entre $2{,}1.10^3$ et $3{,}2.10^7$ éq UFP/mL. Il est à noter que ces pentes diffèrent peu en fonction du phage et de l'état de surface. Cependant, bien que la présence d'un biofilm n'ait pas d'impact sur la valeur de la pente de la droite observée ce dernier a une influence sur l'ordonnée à l'origine

pour les phages MS2 et Qβ. En effet, pour ces deux bactériophages une ordonnée à l'origine plus faible est observée en présence de biofilm puisqu'elle passe alors de 0,003 à 0,001 pour le phage MS2 et de 0,12 à 0,05 pour le phage Qβ. Ceci traduit une diminution des quantités mesurées pour ces deux phages lorsque les surfaces sont colonisées par un biofilm de 60 jours. Enfin, les concentrations en bactériophage MS2 mesurées sur les surfaces sont systématiquement inférieures à celles mesurées pour les phages GA et Qβ. La différence est d'au moins 1 $\log_{10}$ quel que soit l'état de surface.

### 1.2. Normalisation des données

Les résultats des expérimentations présentées dans cette partie présentent l'adsorption phagique au cours du temps pour des inoculum théoriques de $10^6$ UFP/mL pour chaque bactériophage. Lors des inoculations des phages dans l'eau, l'interprétation des résultats de densité virale sur les surfaces a été compliquée par le fait que les concentrations mesurées dans l'eau n'étaient pas toutes exactement de $10^6$ éq UFP/mL. En effet, au cours des différents essais, les concentrations dans l'eau étaient comprises entre $7{,}9.10^4$ et $1{,}6.10^6$ éq UFP/mL. Or, les résultats précédents indiquent que la concentration phagique mesurée sur les surfaces est proportionnelle à celle initialement présente dans l'eau.

Dans l'objectif de confirmer les résultats obtenus précédemment en petit volume, nous avons réalisé une cinétique d'adsorption phagique en réacteur à disque rotatif, en conditions hydrostatiques (aucune vitesse de rotation n'est appliquée au disque), sur des surfaces en PEHD "abiotique". Les concentrations en phages MS2, GA et Qβ initialement inoculées dans les réacteurs sont présentées dans le **tableau 20** et les concentrations en phages mesurées sur les surfaces en fonction du temps sur la **figure 34**. L'utilisation d'une échelle logarithmique n'intervient que dans un souci de simplification pour présenter les résultats.

**Tableau 20. Concentration en bactériophages MS2, GA et Qβ dans l'eau (éq UFP/mL) lors des expérimentations n°1 et n°2.**

| **Concentration dans l'eau (éq UFP/mL)** | **Bactériophage** | | |
|---|---|---|---|
| | MS2 | GA | Qβ |
| **Expérimentation n°1** | $8{,}3.10^5$ | $4{,}8.10^5$ | $1{,}4.10^6$ |
| **Expérimentation n°2** | $7{,}3.10^4$ | $7{,}2.10^5$ | $1{,}4.10^5$ |

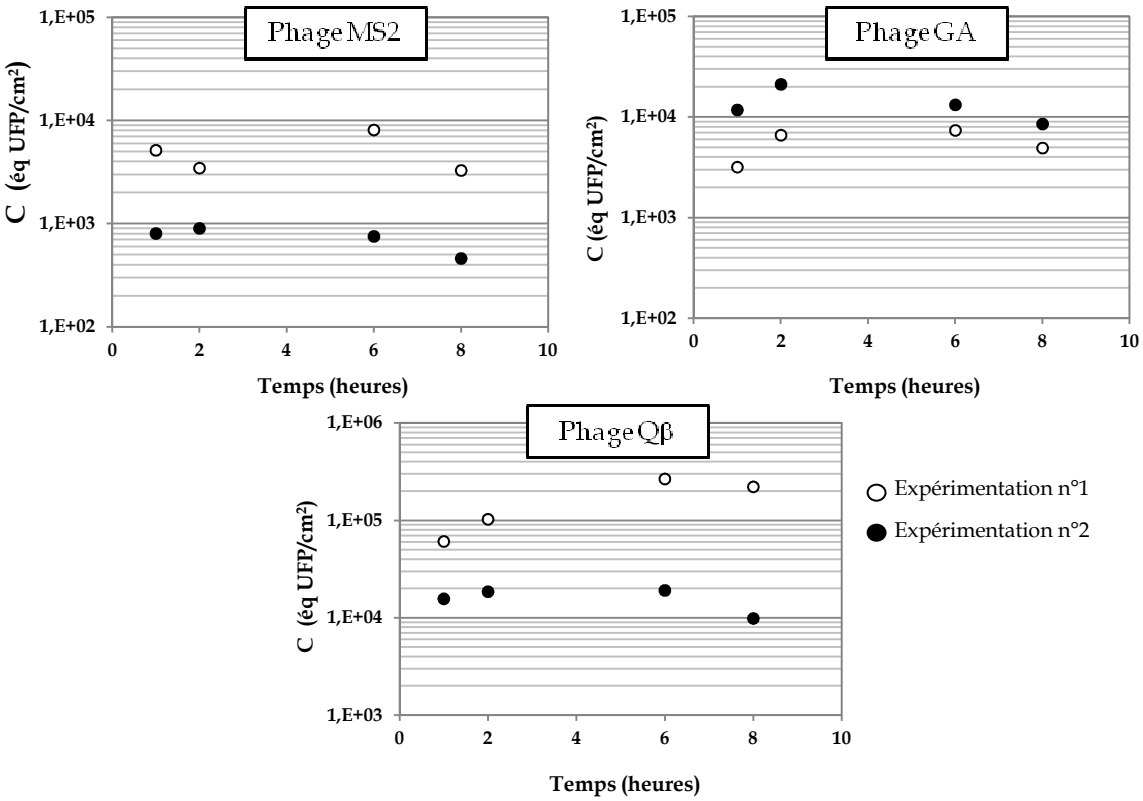



**Figure 34. Concentrations surfaciques (éq UFP/cm²) mesurées (n=2) en fonction du temps pour les phages MS2, GA et Qβ pour deux inoculum différents (1 et 2). C : concentration phagique sur les surfaces (éq UFP/cm²).**

Pour chaque phage, les concentrations surfaciques observées lors des expérimentations n°1 et 2 (**figure 34**) présentent des différences significatives. Ainsi, le bactériophage MS2 est présent en moins grande quantité dans l'eau lors de l'expérimentation n°2 et la concentration phagique mesurée sur les surfaces est significativement moins importante que lors de la première expérimentation (p= 0,001, Mann-Withney, α=0,05). Il en est de même pour le phage Qβ (p= 0,001, Mann-Withney, α=0,05). La concentration en phage GA est plus importante lors de l'expérimentation n°2 ce qui a pour conséquence une concentration surfacique significativement plus élevée (p= 0,001, Mann-Withney, α=0,05) par rapport à l'essai n°1. Ces résultats, obtenus en réacteur, confirment les résultats précédemment obtenus en petits volumes. Ainsi, la concentration phagique mesurée sur les surfaces est dépendante de la concentration en phage initialement inoculée dans l'eau.

Etant donné que la concentration en phages dans l'eau influence de façon log-linéaire celle détectée sur les surfaces, une normalisation des résultats a été réalisée par l'utilisation de **l'équation 8**.

$$C_{cor} = C_s \times \frac{10^6}{C_{eau}}$$ **Equation 8**

$C_{cor}$ (éq UFP/cm²) correspond à la concentration surfacique théorique pour un inoculum phagique de $10^6$ UFP/mL. $C_s$ représente la concentration mesurée sur les surfaces (éq UFP/cm²), $C_{eau}$ correspond à la concentration mesurée dans l'eau après inoculation (éq UFP/mL) et $10^6$ est la concentration phagique théoriquement attendue dans l'eau (éq UFP/mL).

La **figure 35** représente l'application de **l'équation 8** sur les résultats présentés sur la **figure 34**.

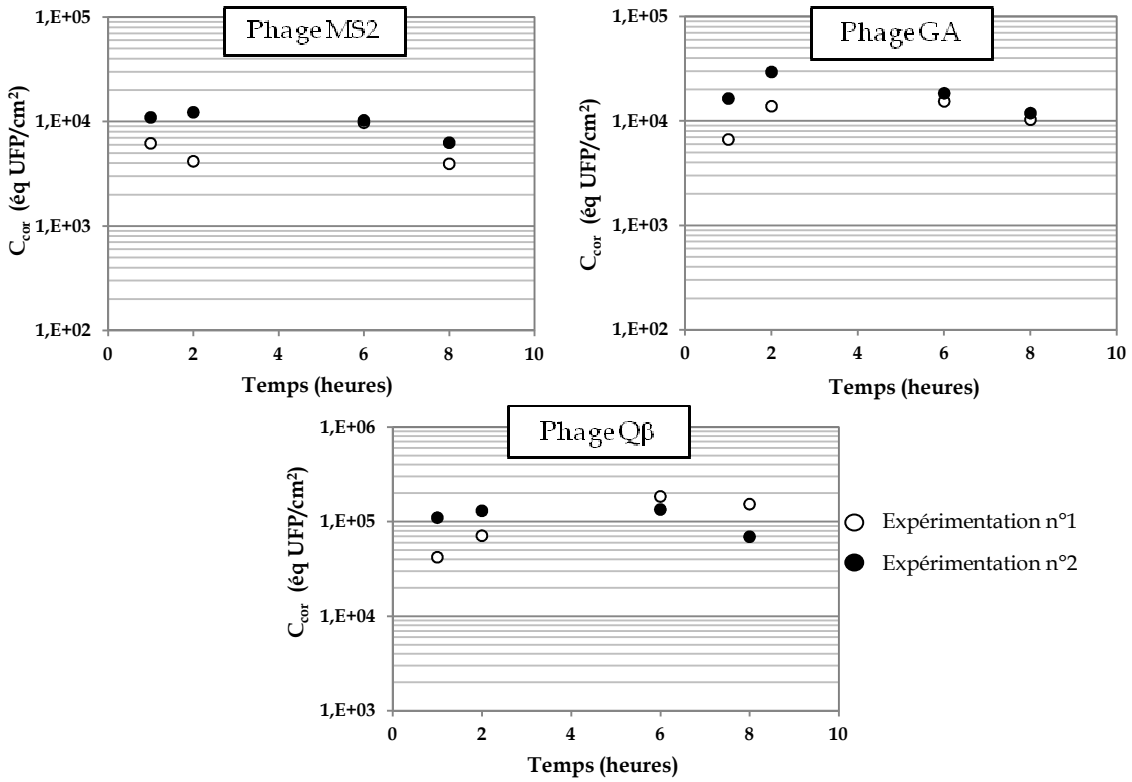



**Figure 35. Concentrations surfaciques (n=2) corrigées par l'équation 8 pour les phages MS2, GA et Qβ pour deux inoculum différents (1 et 2). $C_{cor}$ : concentration phagique mesurées sur les surfaces corrigées par l'équation 8 (éq UFP/cm²).**

L'application de **l'équation 8** sur les résultats bruts a bien pour conséquence de diminuer la différence entre les concentrations phagiques mesurées sur les surfaces lors des expérimentations n°1 et 2. Il en résulte que la densité surfacique observée pour les trois phages lors des deux expérimentations ne diffère plus de façon significative pour les phages MS2 (p=0,073), GA (p=0,05) et Qβ (p=1) (Mann-Withney, α=0,05).

Cette étude analysant l'influence de nombreux paramètres sur l'adsorption phagique, tels que le phage étudié, la nature de la surface analysée ou les conditions hydrodynamiques, nous avons fait le choix de corriger les résultats présentés dans cette partie par l'**équation 8** afin de ne pas introduire une variabilité supplémentaire due aux quantités de phages initialement inoculées.

## 2. Adsorption phagique sur des surfaces en PEHD et inox 316L colonisées ou non par un biofilm

### 2.1. Influence de l'état de colonisation de la surface sur l'adsorption phagique

Afin d'étudier l'adsorption phagique sur les surfaces, les trois bactériophages ont été inoculés en même temps dans l'eau des réacteurs. Le disque n'est pas mis en rotation de façon à se trouver en conditions hydrostatiques. Des coupons sont prélevés à différents temps et la concentration phagique surfacique est mesurée par RT-PCR en temps réel. Deux types de matériaux ont été utilisés lors de cette étape, le PEHD et l'inox 316L, ce dernier en tant que surface de référence.

Dès la mise en contact des surfaces avec de l'eau du réseau, celle-ci va être colonisée par un "film conditionnant". L'influence de la modification de la surface des coupons de PEHD et d'inox 316L par ce "film conditionnant" a été analysée par la comparaison de l'adsorption phagique sur des coupons dits " abiotiques ", mis en place immédiatement avant inoculation des phages, et des coupons ayant séjourné 48 heures dans le réacteur avant l'inoculation. Les deux catégories de coupons sont régulièrement prélevées en duplicat durant 8 heures. Une échelle logarithmique est utilisée en ordonnée afin de faciliter la comparaison des niveaux de l'adsorption des trois phages.

#### 2.1.1. Expérimentations réalisées avec des surfaces en PEHD

Les concentrations en bactériophages MS2, GA et Qβ dans l'eau sont mesurées immédiatement après l'inoculation dans le réacteur ainsi qu'à chaque temps d'analyse des coupons sur toute la durée des expérimentations. La concentration dans l'eau est constante durant les 8 heures d'analyse pour les trois phages. Les résultats de l'adsorption phagique sur les surfaces sont présentés sur la **figure 36**.

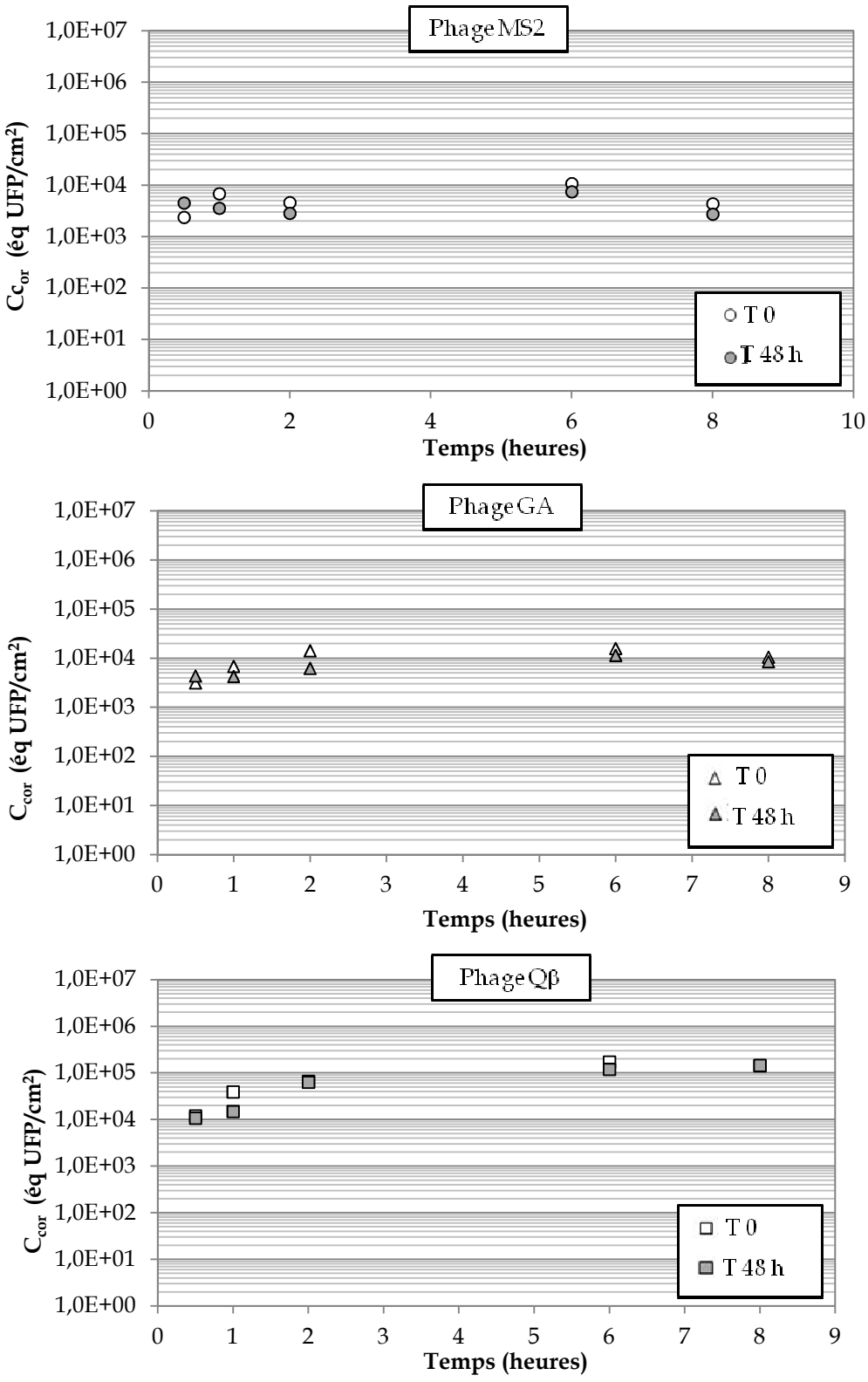



**Figure 36. Concentrations en phages MS2, GA et Qβ sur des surfaces en PEHD soit " abiotiques ", soit ayant séjourné 48 heures dans le réacteur avant l'inoculation des trois bactériophages (n=2). $C_{cor}$ : concentrations phagiques mesurées sur les surfaces et corrigées par l'équation 8 (éq UFP/cm²).**

Dès 30 minutes de contact, des concentrations comprises entre $2{,}4.10^3$ éq UFP/cm² pour le phage MS2 et $1{,}2.10^4$ éq UFP/cm² pour le phage Qβ sont mesurées sur les coupons de PEHD " abiotiques ". Après 8 heures de contact, les concentrations mesurées sur les surfaces sont respectivement de $4{,}3.10^3$, $1{,}1.10^4$ et $1{,}4.10^5$ éq UFP/cm² pour les phages MS2, GA et Qβ. Le profil d'adsorption observé sur les surfaces ayant séjourné 48 heures dans l'eau avant l'inoculation des phages est similaire à celui observé sur des surfaces " abiotiques ". Les concentrations mesurées après 30 minutes de contact sont alors comprises entre $4{,}4.10^3$ éq UFP/cm² pour le phage MS2 et $1{,}1.10^4$ éq UFP/cm² pour le phage Qβ. A la fin de l'analyse, les concentrations surfaciques mesurées sont respectivement de $2{,}7.10^3$, $8{,}5.10^3$ et $1{,}5.10^5$ éq UFP/cm² pour les phages MS2, GA et Qβ. La présence d'un "film conditionnant" de 48 heures sur les coupons ne modifie pas de façon significative les quantités adsorbées pour les trois phages ($p=0{,}4$, 0,8 et 0,4 respectivement pour les phages MS2, Qβ et GA, Mann et Whitney, $\alpha=0{,}05$). La séquence d'adhésion est de type MS2 < GA < Qβ, MS2 étant le bactériophage détecté en plus faible concentration sur les surfaces qu'elles soient " abiotiques " ou qu'elles aient séjourné 48 heures dans le réacteur.

### 2.1.2. Expérimentations réalisées avec des surfaces en inox 316L

Le concentrations en bactériophages MS2, GA et Qβ dans l'eau sont mesurées juste après leur inoculation dans le réacteur ainsi qu'à chaque temps d'analyse des coupons jusqu'à la fin des expérimentations. La concentration dans l'eau est constante durant les huit heures d'analyse pour les trois phages. Les résultats de l'adsorption phagique sont présentés sur la **figure 37**.

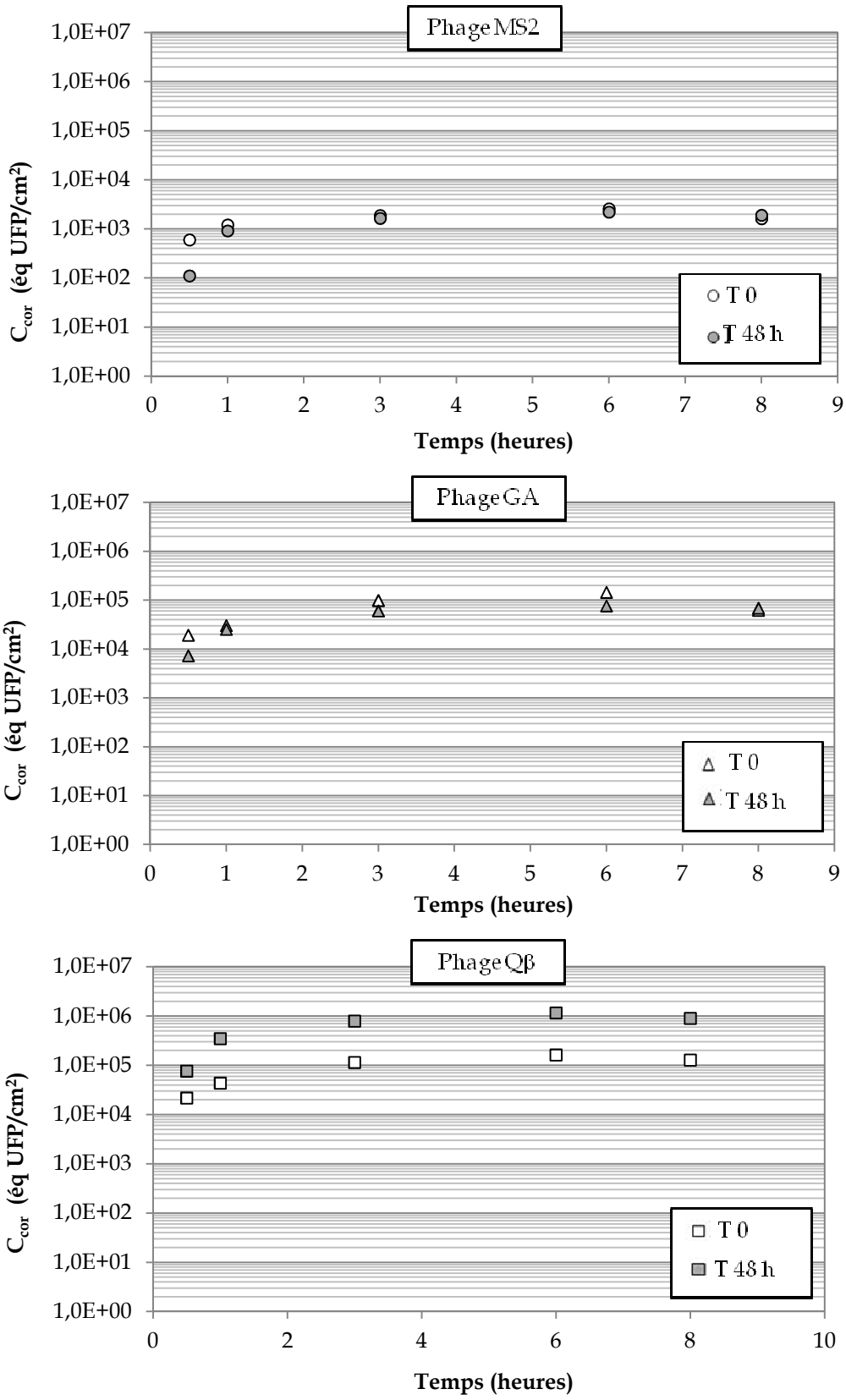



**Figure 37. Concentrations en phages MS2, GA et Qβ sur des surfaces en inox 316L soit " abiotiques ", soit ayant séjourné 48 heures dans le réacteur avant l'inoculation des trois bactériophages (n=2). $C_{cor}$ : concentrations phagiques mesurées sur les surfaces et corrigées par l'équation 8 (éq UFP/cm²).**

Le profil d'adsorption des phages sur l'inox 316L est identique à celui observé sur des surfaces en PEHD. Sur inox 316L " abiotique ", la concentration mesurée pour le phage MS2 est de $5{,}9.10^2$ éq UFP/cm² après 30 minutes de contact et atteint $1{,}6.10^3$ éq UFP/cm² après 8 heures. Les concentrations phagiques mesurées après 30 minutes et 8 heures sont respectivement de $2{,}2.10^4$ et $1{,}3.10^5$ éq UFP/cm² pour le phage GA, elles atteignent respectivement $1{,}9.10^4$ et $6{,}2.10^4$ éq UFP/cm² pour le phage Qβ.

La présence d'un "film conditionnant" de 48 heures à la surface des coupons en inox 316L ne modifie pas de façon significative les quantités adsorbées pour les phages MS2 et GA ($p=0{,}6$ et $p=0{,}4$ respectivement pour MS2 et GA, Mann et Whitney, $\alpha=0{,}05$). Par contre, une diminution de la densité surfacique est observée pour le phage Qβ lorsque l'inox 316L a séjourné 48 heures dans l'eau avant l'étude ($p=0{,}002$, Mann et Whitney, $\alpha=0{,}05$). La séquence d'adhésion sur inox 316L "abiotique" ou ayant séjourné 48 heures dans l'eau, est de type MS2 < GA < Qβ, comme observé pour des coupons en PEHD.

Ces résultats permettent également la comparaison de la quantité de phages adsorbés sur le PEHD et l'inox 316L. L'adsorption du phage MS2 est significativement plus faible sur des surfaces en inox par comparaison à des surfaces en PEHD "abiotiques" ($p=0$, Mann et Whitney, $\alpha=0{,}05$). Le nombre de particules de phage GA est quand à lui significativement plus important sur les coupons en inox ($p<0{,}0001$, Mann et Whitney, $\alpha=0{,}05$), et l'adsorption n'est pas significativement différente pour le phage Qβ ($p=0{,}66$, Mann et Whitney, $\alpha=0{,}05$) pour des surfaces constituées d'inox 316L ou de PEHD "abiotiques".

## 2.2. Influence de la présence d'un biofilm de 60 jours sur des surfaces en PEHD

L'influence de la présence d'un biofilm d'eau potable de 60 jours, sur des coupons en PEHD, a été étudiée en comparant l'adsorption phagique sur des coupons "abiotiques" et sur des coupons ayant séjourné 60 jours dans le réacteur. Une cinétique détaillée du suivi de la concentration en phages sur ces surfaces a pu être effectuée. Les coupons sont prélevés en duplicat à chaque temps d'analyse. Les expérimentations ont été effectuées une fois sur PEHD "abiotique" ($N=1$, $n=2$) et deux fois sur PEHD colonisé par un biofilm de deux mois ($N=2$, $n=2$). Les résultats sont présentés sur la **figure 38**.

Les concentrations en bactériophages MS2, GA et Qβ dans l'eau sont mesurées immédiatement après l'inoculation dans le réacteur ainsi qu'à chaque temps d'analyse

jusqu'à la fin des expérimentations. Les concentrations sont constantes durant les 10 heures d'analyse pour les trois phages.

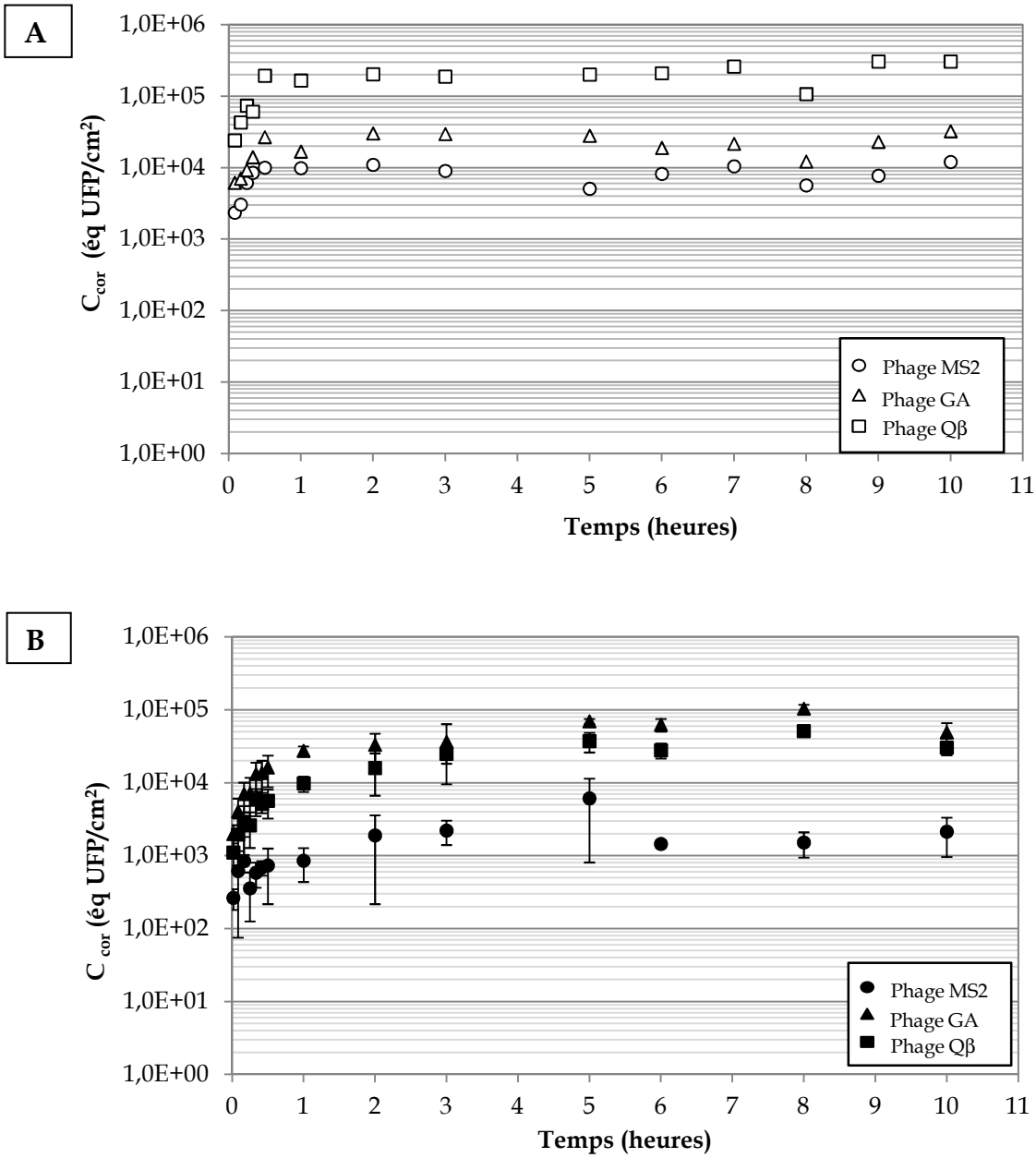



**Figure 38. Cinétiques d'adsorption des phages MS2, GA et Qβ sur des surfaces en PEHD " abiotiques " (A, N=1, n=2) ou ayant séjourné 60 jours dans le réacteur (B, N=2, n=2). $C_{cor}$ : concentrations phagiques mesurées sur les surfaces et corrigées par l'équation 8 (éq UFP/cm²).**

Après 5 minutes de contact, des concentrations de $2{,}4.10^3$ éq UFP/cm² pour le phage MS2, $6{,}8.10^3$ éq UFP/cm² pour le phage GA et $2{,}4.10^4$ éq UFP/cm² pour le phage Qβ sont mesurées sur les coupons de PEHD " abiotique " (**Figure 38, A).** Les concentrations en phages augmentent jusqu'à 30 minutes puis semblent se stabiliser jusqu'au dernier point d'analyse

correspondant à 10 heures de contact. Un pseudo-équilibre d'adsorption est atteint et les concentrations moyennes, entre 30 minutes et 10 heures, sont alors respectivement de $9{,}0.10^3 \pm 3{,}7.10^3$, $2{,}2.10^4 \pm 8{,}1.10^3$ et $2{,}1.10^5 \pm 6{,}8.10^4$ éq UFP/cm² pour les phages MS2, GA et Qβ (n= 20, étant donné que deux coupons sont prélevés à chaque temps d'analyse). La quantité de phages adhérées est significativement différente entre les trois phages ($p<0{,}0001$, Mann et Whitney, $\alpha=0{,}05$). La séquence d'adsorption est de type MS2 < GA < Qβ, ce qui confirme les observations effectuées lors de l'étude de l'adsorption en fonction de la concentration en phage dans l'eau (**Figures 32 et 33**).

La même expérimentation a été effectuée sur PEHD colonisé par un biofilm de 60 jours (**Figure 38, B**). L'adsorption phagique en présence d'un biofilm est également un phénomène rapide puisque dès une minute les concentrations virales mesurées sont respectivement de $2{,}1.10^2 \pm 8{,}1.10^1$, $1{,}9.10^3 \pm 6{,}5.10^2$ et $1{,}0.10^3 \pm 3{,}3.10^2$ éq UFP/cm² pour les phages MS2, GA et Qβ (n=4 puisque deux coupons sont prélevés pour chaque expérimentation et que deux essais ont été effectués). L'apparition du pseudo-équilibre d'adhésion est retardée par rapport à l'analyse sur PEHD " abiotique " puisque ce dernier n'apparait qu'après trois heures de contact. Les concentrations virales moyennes mesurées entre 3 heures et 10 heures sont alors de $3{,}5.10^3 \pm 2{,}7.10^3$, $7{,}1.10^4 \pm 2{,}6.10^4$ et $3{,}2.10^4 \pm 1{,}1.10^3$ éq UFP/cm² respectivement pour les phages MS2, GA et Qβ (n=20 puisque deux coupons sont prélevés pour chaque expérimentation). Les concentrations mesurées sont significativement différentes entre les trois phages ($p<0{,}002$, Mann et Whitney, $\alpha=0{,}05$). La présence d'un biofilm sur la surface provoque une diminution significative du taux de phages MS2 et Qβ adsorbés de 0,6 $\log_{10}$ et 0,8 $\log_{10}$ respectivement ($p<0{,}0001$, Mann et Whitney, $\alpha=0{,}005$) et une augmentation non significative de 0,5 $\log_{10}$ pour le phage GA ($p=0{,}45$). La présence d'un biofilm d'eau potable de 60 jours sur la surface conduit à une modification de la séquence d'adsorption qui devient alors : MS2 < Qβ < GA. Dans toutes ces expérimentations, le bactériophage MS2 est celui qui présente systématiquement les concentrations les plus faibles sur les surfaces.

## III. Adsorption des bactériophages en conditions hydrodynamiques

Afin d'étudier l'effet d'un flux d'eau laminaire appliqué aux surfaces sur l'adsorption des phages, des cinétiques d'adsorption ont été réalisées en conditions hydrodynamiques, c'est-à-dire en mettant le disque en rotation à une vitesse maitrisée. Les résultats présentés

dans cette partie visaient d'une part à évaluer l'influence de six gradients pariétaux de vitesse, de 120 à 1640 $s^{-1}$, sur l'adsorption phagique et d'autre part à apprécier l'influence d'un biofilm de 60 jours sur l'adsorption de phages en conditions hydrodynamiques. La correction des données numériques a été appliquée sur les valeurs brutes des résultats selon **l'équation 8**. L'utilisation d'une échelle logarithmique dans les figures n'intervient que dans un souci de simplification pour présenter les résultats.

## 1. Etude de l'influence de six gradients pariétaux de vitesse sur l'adsorption phagique

Les expérimentations ont été effectuées sur PEHD colonisé par des biofilms de 60 jours. Sur le disque rotatif, les coupons A étant au nombre de quatre, ils ont été réservés pour l'analyse de la densité bactérienne, ainsi lors de la quantification phagique, trois gradients pariétaux de vitesse différents ont pu être étudiés lors de chaque expérimentation. Deux expérimentations ont été effectuées avec une vitesse de rotation du disque fixée à 21 rpm permettant l'étude de gradients de vitesse de 120, 175 et 236 $s^{-1}$ et deux expérimentations ont été réalisées avec une vitesse de 75 rpm permettant l'étude des gradients 830, 1210, 1640 $s^{-1}$. Les résultats des quatre essais, et donc des six conditions hydrodynamiques, sont représentés sur un même graphique pour chaque bactériophage en fonctions du temps (**Figure 39**).

Les concentrations en phages inoculés dans l'eau sont mesurées au début de chaque expérimentation et suivies durant les 12 heures d'expérimentation. Les concentrations virales sont constantes durant toute la durée des essais pour les trois bactériophages.

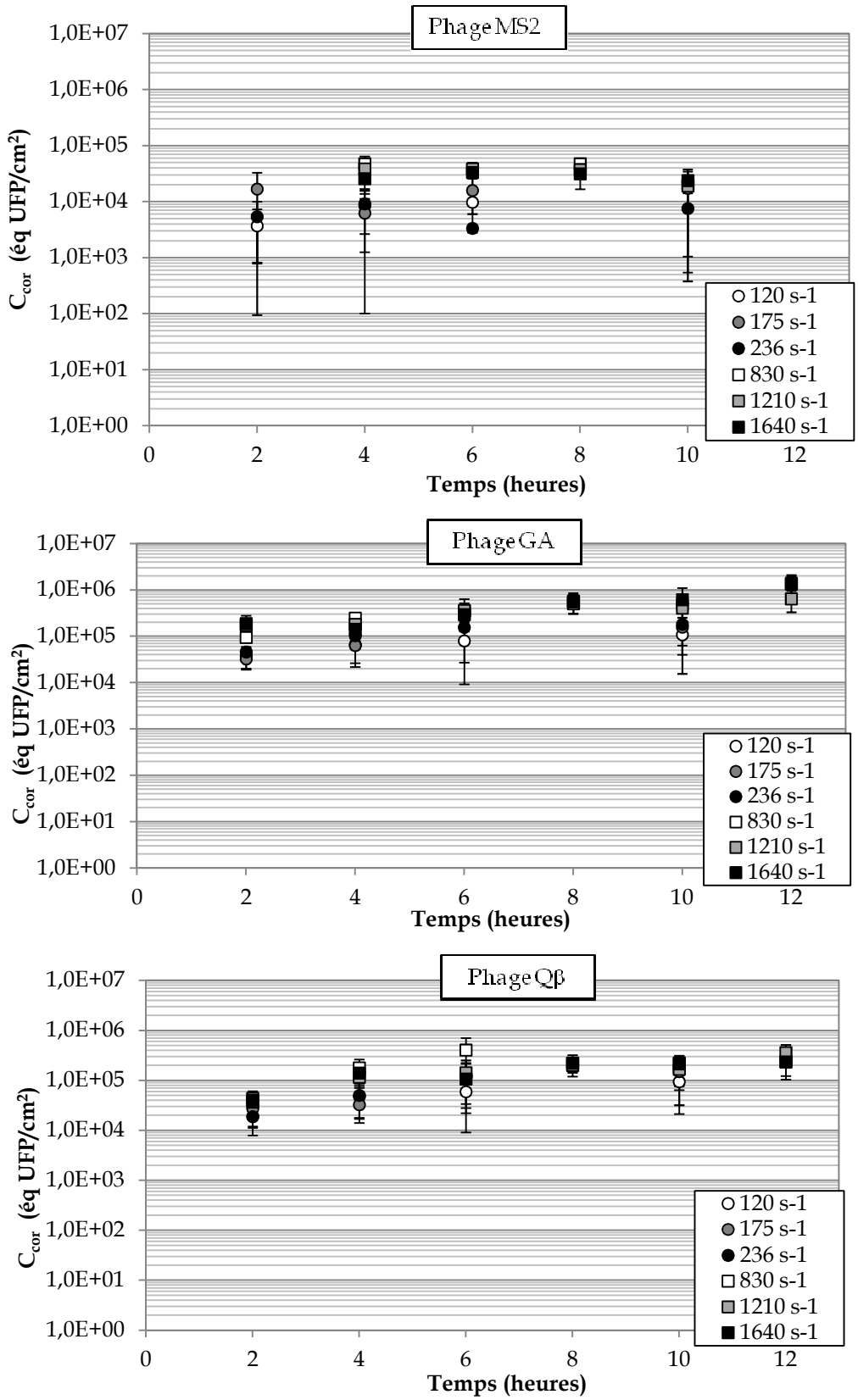



**Figure 39. Cinétiques d'adsorption des phages MS2, GA et Qβ en conditions laminaires pour six gradients pariétaux de vitesse (120 à 1640 $s^{-1}$) sur des surfaces en PEHD colonisées par un biofilm de 60 jours. $C_{cor}$ : concentrations phagiques mesurées sur les surfaces et corrigées par l'équation 8 (éq UFP/$cm^2$).**

Le profil d'adsorption en conditions hydrodynamiques est identique à celui observé en conditions hydrostatiques. C'est un phénomène rapide et le nombre de phage détecté sur les surfaces augmente durant les premières heures puis se stabilise pour former un pseudo-équilibre d'adsorption. Ce profil est observé quel que soit le gradient pariétal ou le phage considéré. Aucune différence d'adhésion n'est observée en fonction des six gradients pariétaux de vitesse étudiés, ceci a été confirmé par une analyse statistique pour laquelle les valeurs p obtenues ont toutes été supérieures à 0,05 quels que soit le phage et le gradient pariétal de vitesse considérés (Mann et Whitney, $\alpha$=0,05). Ainsi, pour le phage MS2, après deux heures d'expérimentation, la plus faible concentration est mesurée pour un gradient de 120 $s^{-1}$ ($7{,}2.10^{2}$ éq UFP/$cm^2$) et la plus élevée pour un gradient de 175 $s^{-1}$ ($4{,}2.10^{4}$ éq UFP/$cm^2$). Pour le phage GA, la plus faible concentration est mesurée pour 175 $s^{-1}$ ($1{,}8.10^{4}$ éq UFP/$cm^2$) et la plus forte pour 1640 $s^{-1}$ ($1{,}8.10^{5}$ éq UFP/$cm^2$). Enfin, pour le phage Q$\beta$, la concentration la plus faible est mesurée pour 120 $s^{-1}$ ($9{,}1.10^{3}$ éq UFP/$cm^2$) et la plus élevée pour 175 $s^{-1}$ ($5{,}5.10^{4}$ éq UFP/$cm^2$). La séquence d'adsorption des trois phages est identique à celle observée lors des essais précédents sur biofilm à savoir que le phage MS2 est celui qui adhère en moins grande quantité et le phage GA est celui détecté en plus grande quantité.

Etant donné que les différents gradients pariétaux étudiés ne conduisent pas à des différences significatives concernant les concentrations en phages mesurées sur les surfaces, la moyenne de toutes les concentrations surfaciques obtenues à chaque temps d'analyse peut être utilisée pour interpréter nos données.

## 2. Influence de la présence d'un biofilm sur l'adsorption phagique en conditions dynamiques

Une étude cinétique détaillée de l'adsorption des phages sur du PEHD "abiotique", ou colonisé par un biofilm de 60 jours a été réalisée. Afin d'obtenir quelques points de comparaison, une étude cinétique plus sommaire de la sorption phagique sur inox 316L a également été effectuée.

## 2.1. Cinétiques d'adhésion sur des surfaces en PEHD colonisées ou non par un biofilm de 60 jours

L'adsorption des phages sur des surfaces en PEHD soit " abiotiques " soit colonisées par un biofilm de 60 jours a été suivie durant 27 heures. Deux expérimentations ont été menées de 2 à 12 heures et deux autres de 12 à 27 heures. La synthèse de tous les résultats est représentée sur la **figure 40**. Comme précédemment, les concentrations virales ont été suivies dans l'eau juste après l'inoculation et à chaque temps de l'analyse phagique, celles-ci sont stables durant les 27 heures d'expérimentation.

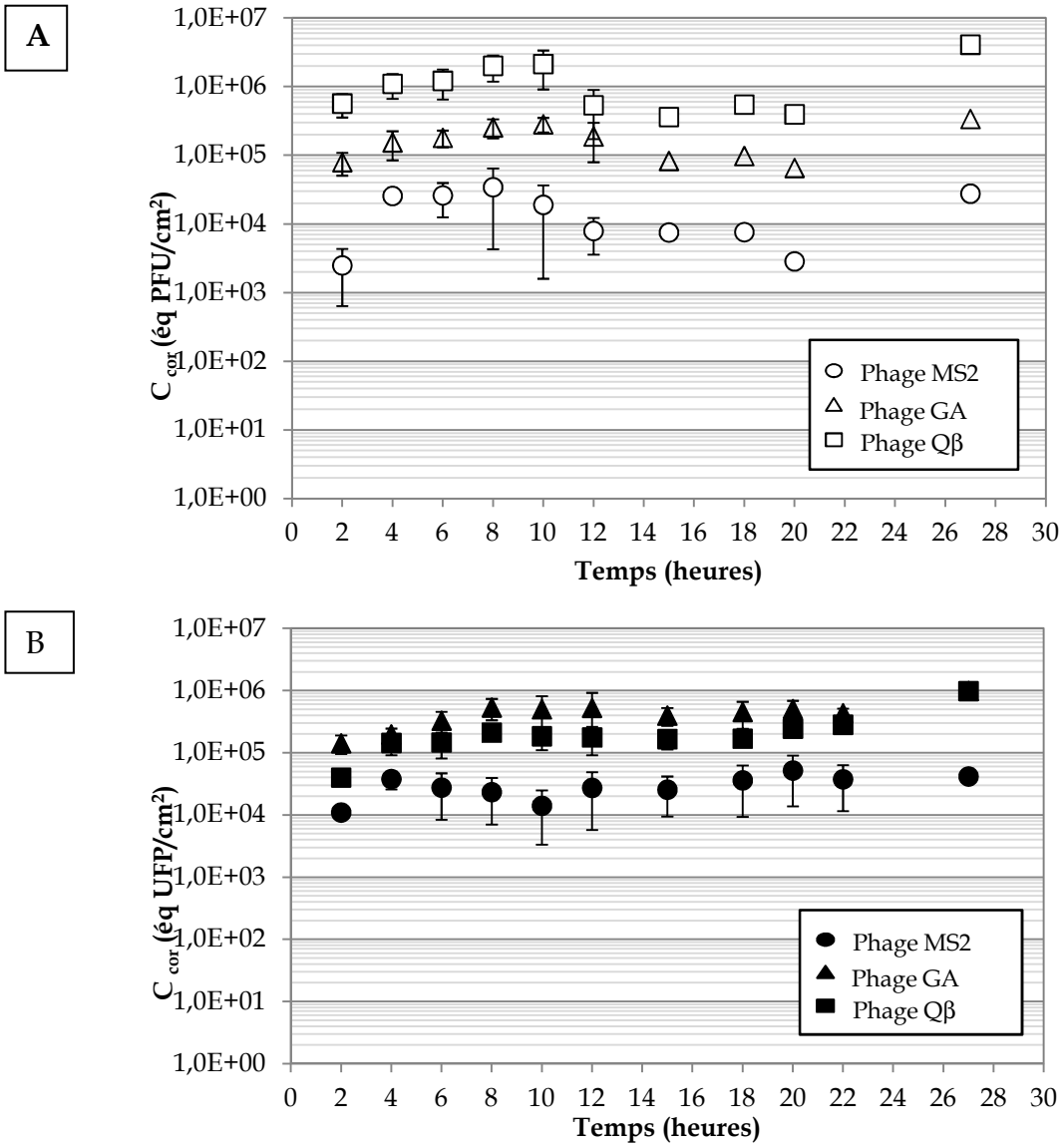



**Figure 40. Cinétiques d'adsorption phagique en conditions laminaires durant 27 heures sur des surfaces en PEHD " abiotiques " (A) ou colonisées par un biofilm de 60 jours (B). $C_{cor}$ : concentrations phagiques mesurées sur les surfaces et corrigées par l'équation 8 (éq UFP/cm²).**

Sur PEHD "abiotique", l'adsorption des phages est un phénomène rapide durant les 8 premières heures, elle est suivie par un pseudo-équilibre d'adhésion après 10 heures de contact. Les niveaux de concentrations mesurés au pseudo-plateau, c'est à dire entre 10 et 27 heures, sont de $1{,}2.10^4 \pm 9{,}3.10^3$, $1{,}8.10^5 \pm 1{,}1.10^5$ et $1{,}4.10^6 \pm 1{,}3.10^6$ éq UFP/cm² pour les bactériophages MS2, GA et Qβ, respectivement. Les concentrations surfaciques mesurées diffèrent entre les trois bactériophages ($P<0{,}0001$, Mann et Whitney, $\alpha=0{,}05$) et la séquence d'adhésion est de type MS2 < GA < Qβ, confirmant les observations effectuées en conditions hydrostatiques.

Par contre, les conditions hydrodynamiques conduisent à une augmentation de la quantité de bactériophages adsorbés sur la surface par rapport aux conditions hydrostatiques. Cette différence est significative et correspond à une augmentation de 0,1 $\log_{10}$ pour le phage GA et de 0,6 $\log_{10}$ pour le phage Qβ ($p<0{,}0001$, Mann et Whitney, $\alpha=0{,}05$). Aucune influence significative n'a été observée pour le phage MS2, cependant ce phage est celui qui présente la plus faible affinité pour les surfaces de PEHD " abiotique ". Les concentrations phagiques mesurées sur les surfaces après deux heures d'expérimentation, en conditions hydrodynamiques, sont du même ordre de grandeur que les concentrations mesurées durant le pseudo-équilibre d'adhésion observé en conditions hydrostatiques entre 30 minutes et dix heures.

Lorsque la surface est colonisée par un biofilm de 60 jours, l'adsorption est également très rapide et l'influence de l'hydrodynamique conduit à une augmentation significative de la concentration phagique de 1,1 $\log_{10}$ pour le phage MS2, 0,8 $\log_{10}$ pour le phage GA et 0,8 $\log_{10}$ pour le phage Qβ ($p<0{,}0001$, Mann et Whitney, $\alpha=0{,}05$). Comme observé en conditions hydrostatiques, la présence d'un biofilm modifie l'adsorption phagique sur les surfaces et conduit à une nouvelle séquence d'adsorption de type MS2 < Qβ < GA. Ce qui correspond à une augmentation de la concentration mesurée significative pour le phage GA de 0,3 $\log_{10}$ une diminution significative pour le phage Qβ ($p<0{,}0001$, Mann et Whitney, $\alpha=0{,}05$). Le phage MS2 est toujours le moins adhérent quelles que soient les conditions expérimentales.

## 2.2. Cinétiques d'adhésion sur des surfaces en inox 316L colonisées ou non par un biofilm de 60 jours

L'accumulation phagique sur des surfaces en inox 316L " abiotiques " et colonisées par un biofilm de 60 jours a été suivie durant 10 heures. Deux expérimentations ont été

menées, la première avec une vitesse de rotation du disque fixée à 21 rpm et la seconde à 75 rpm. La synthèse de tous ces résultats est représentée sur la **figure 41**.

Comme précédemment, la concentration virale a été suivie dans l'eau juste après l'inoculation et à chaque temps de l'analyse phagique, elle est stable durant les 10 heures d'expérimentation.

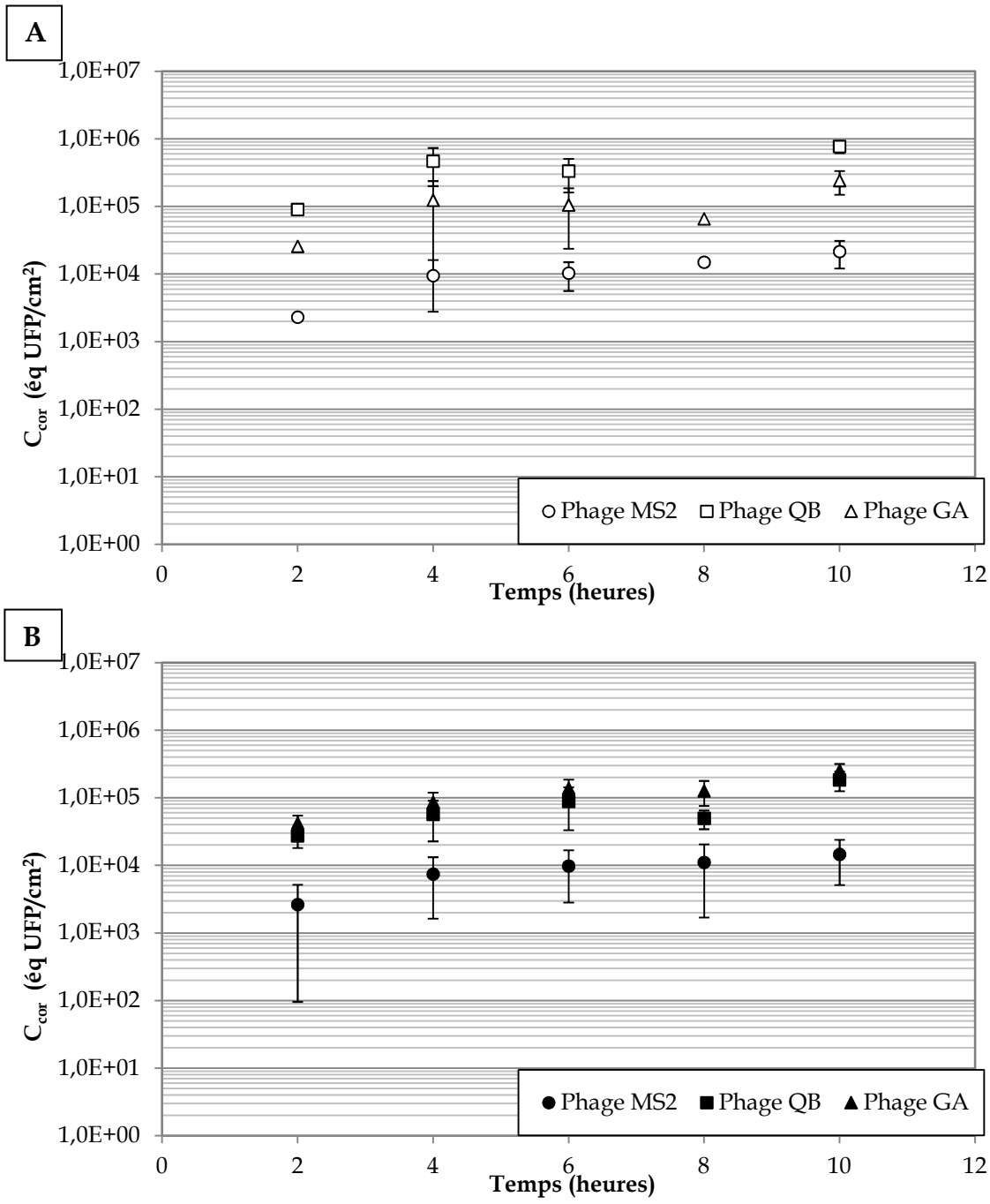



**Figure 41. Cinétiques d'adsorption phagique en conditions laminaires durant 10 heures sur des surfaces en inox 316L " abiotiques " (A) ou colonisées par un biofilm de 60 jours (B). $C_{cor}$ : concentration phagique mesurées sur les surfaces corrigées par l'équation 8 (éq UFP/cm²).**

Comme observé sur des surfaces en PEHD, la présence d'un flux d'eau à la surface du disque conduit à une augmentation de la quantité de bactériophages adsorbés sur la surface d'environ 1 $log_{10}$ éq UFP/$cm^2$ pour les trois phages, par rapport aux conditions hydrostatiques ($p<0,0001$ pour le phage MS2, $p=0,0174$ pour le phage GA et $p=0$ pour le phage Qβ, Mann et Whitney, $\alpha=0,05$). La quantité de phage mesurée après deux heures est de $2,3.10^3$, $2,6.10^4$ et $9,0.10^4$ éq UFP/$cm^2$ respectivement pour les phages MS2, GA et Qβ sur inox abiotique. L'accumulation phagique augmente durant les 10 heures d'analyse sur des surfaces en inox 316L qu'elles soient "abiotiques" ou colonisées par un biofilm de 60 jours. Les concentrations mesurées après 10 heures sont respectivement de $2,1.10^4$, $2,4.10^5$ et $7,7.10^5$ éq UFP/$cm^2$ pour les phages MS2, GA et Qβ sur inox "abiotique" et de $1,5.10^4$, $1,9.10^5$ et $2,6.10^5$ éq UFP/$cm^2$ sur des surfaces colonisées par un biofilm. Le niveau d'accumulation phagique entre les trois bactériophages est significativement différent ($p<0,003$, Mann et Whitney, $\alpha=0,05$). La séquence d'adhésion est de type MS2 < GA < Qβ sur des surfaces dépourvues de biofilm et devient MS2 < Qβ < GA lorsque la surface est colonisée par un biofilm de 60 jours. Ces observations confirment les résultats obtenus en conditions hydrostatiques. Ainsi, la présence d'un biofilm conduit à une diminution significative du nombre de phage Qβ adsorbé sur les surfaces ($p<0.0001$, Mann et Whitney, $\alpha=0,05$) et n'a pas d'influence significative sur l'adsorption des phages MS2 et GA ($p=0,1$ et $0,7$ respectivement pour MS2 et GA, Mann et Whitney, $\alpha=0,05$).

Le nombre de particules de phage MS2 n'est pas influencé par la nature de la surface, PEHD ou inox 316L, " abiotique " ($p=0,78$, Mann et Whitney, $\alpha = 0,05$). Par contre, l'adsorption phagique est significativement diminuée sur inox 316L par rapport au PEHD pour les phages GA et Qβ ($p=0,04$ et $0,001$ respectivement pour GA et Qβ, Mann et Whitney, $\alpha=0,05$). En présence d'un biofilm, l'adsorption phagique est significativement diminuée sur inox 316L par rapport au PEHD et ceci pour les trois phages étudiés ($p<0,0001$, Mann et Whitney, $\alpha=0,05$).

*En résumé, le nombre de bactéries mesuré sur les surfaces n'est pas significativement différent pour des gradients pariétaux de vitesse compris entre 65 et 1640 $s^{-1}$ que ce soit pour des surfaces en inox 316L ou en PEHD. La densité bactérienne mesurée sur des surfaces en inox 316L est inférieure de moins d'1 $log_{10}$ à celle mesurée sur du PEHD. Ceci peut être expliqué par les différences de propriété des surfaces de ces deux matériaux. Globalement, les bactéries présentant une membrane intègre représentent plus de 95% des bactéries détectées et moins de 0,1% des bactéries sont cultivables après 15 jours à 20°C.*

*En conditions hydrostatiques, les concentrations mesurées sur les surfaces pour les trois phages augmentent de façon log-linéaire avec les concentrations initialement présentes dans l'eau. Cela permet de corriger les résultats d'adhésion des phages en fonction de la concentration dans l'eau et de s'affranchir des différences d'inoculum lors de la comparaison des concentrations en phages adsorbés pour les trois génogroupes ds phages. L'adsorption phagique sur des surfaces " abiotiques " n'est pas significativement différente de celle observée sur des surfaces ayant séjourné 48 heures dans l'eau avant l'inoculation des phages. Ceci est vrai pour les trois phages sur des surfaces en PEHD et pour les phages MS2 et GA sur des surfaces en inox 316L. L'adsorption phagique est un phénomène rapide puisqu'après quelques minutes d'expérimentation, les trois phages peuvent être quantifiés sur les surfaces. Sur PEHD " abiotique " il est possible d'observer un pseudo-équilibre d'adsorption en échelle logarithmique dès 30 minutes alors que l'apparition de ce pseudo-équilibre est retardée en présence d'un biofilm et n'apparait qu'après trois heures de contact.*

*En conditions hydrodynamiques l'étude de gradients pariétaux de vitesse compris entre 120 et 1640 $s^{-1}$ ne conduit pas à une modification significative de l'adsorption phagique et ceci pour les trois phages étudiés. Pour la suite de ce travail, la moyenne des données obtenues pour les différents gradients à chaque temps d'analyse a donc pu être utilisée pour la représentation et l'interprétation des résultats. L'application d'un flux d'eau sur les parois conduit à une augmentation de l'adsorption phagique par rapport aux conditions hydrostatiques surtout en présence de biofilm, quels que soient le phage ou les surfaces analysés. Ainsi, les concentrations en phages mesurées sur les surfaces en conditions hydrodynamiques après deux heures d'expérimentations sont identiques aux concentrations mesurées en conditions hydrostatiques lors du pseudo-plateau d'adhésion, entre trois et dix heures. Enfin, en conditions hydrodynamiques, l'adsorption est rapide et augmente durant les dix premières heures de contact puis se stabilise. Comme observé en conditions hydrostatiques, il semblerait que la présence d'un biofilm retarde l'apparition du pseudo-plateau d'équilibre de l'adhésion phagique.*

*La séquence d'adhésion sur les surfaces PEHD et inox " abiotiques " ou ayant séjourné 48 heures dans l'eau est de type MS2 < GA < Qβ. Cette séquence est significativement modifiée sur PEHD et inox 316L colonisés par un biofilm d'eau potable de 60 jours et devient MS2 < Qβ < GA.*

**PARTIE III. Evaluation de l'efficacité de protocoles de nettoyage sur le biofilm ainsi que sur les phages adsorbés aux surfaces ou en suspension dans l'eau**

Différents protocoles de nettoyage de surfaces colonisées par des biofilms d'eau de distribution de 60 jours et contaminées par des bactériophages ont été évalués.

Tout d'abord, à l'aide des réacteurs à disque rotatif, nous avons voulu évaluer l'efficacité d'un nettoyage par augmentation des contraintes hydrodynamiques afin de quantifier l'arrachage éventuel des particules virales sans ajout d'oxydant. Dans un second temps, une évaluation de l'efficacité d'un protocole de désinfection par chloration de l'eau à l'aide d'hypochlorite de sodium à forte dose (5 mg/L), a été effectuée en réacteur Propella™, équipé de coupons en polyéthylène haute densité (PEHD) bande bleue colonisés par des biofilms de trois et cinq mois. Enfin, nous avons évalué l'effet d'une désinfection à l'aide d'hypochlorite de sodium à 4 mg/L combiné avec une augmentation des contraintes hydrodynamiques, (réacteur à disque tournant) sur des surfaces en PEHD colonisées par un biofilm de deux mois.

La quantification des phages infectieux sans distinction du génogroupe, a été effectuée par la méthode normalisée des plages de lyse (ISO 10705-1, 1995). Une étape d'élution-concentration selon le protocole mis au point par Helmi *et al.* (2010) a, au préalable, été nécessaire afin de récupérer les particules phagiques des surfaces. La quantification du génome des phages a été effectuée par RT-PCR temps réel sur le concentrat obtenu après l'étape d'élution-concentration. Les valeurs obtenues pour les phages MS2, GA et Qβ ont été additionnées afin de pouvoir comparer les concentrations en génome phagique et en phage infectieux.

L'abattement (A) en bactéries du biofilm ou en bactériophages en suspension dans l'eau ou adsorbés sur les surfaces a été calculé avec **l'équation 9**.

$$\mathbf{A = \log_{10} (C_{après}/C_{avant})} \qquad \textbf{Equation 9}$$

$C_{avant}$ représente la concentration (bactéries ou éq UFP/mL ou $cm^2$) avant l'application du protocole de nettoyage et $C_{après}$ représente la concentration mesurée après l'application du protocole de nettoyage (bactéries ou éq UFP/mL ou $cm^2$).

# I. Evaluation d'un protocole de nettoyage par augmentation du gradient pariétal de vitesse

Avant d'évaluer l'effet d'un stress hydrodynamique sur les phages adsorbés aux surfaces, il est apparu nécessaire de vérifier si les bactériophages adsorbés avaient la capacité à se désorber des surfaces selon les simples principes de l'équilibre.

## 1. Etude de la désorption des bactériophages adsorbés sur le biofilm

Deux expérimentations ont été effectuées afin d'évaluer la désorption des phages. Pour cela, le disque tournant colonisé par un biofilm de 60 jours est mis en contact, avec une vitesse de rotation de 75 rpm pendant trois heures, avec de l'eau contenant les trois bactériophages. Après ces trois heures une partie des phages a adhéré sur les surfaces. Le disque est alors transféré sur un réacteur, dont l'eau ne contient pas de bactériophages ARN F-spécifiques, puis mis en rotation à 75 rpm durant 3 heures. La quantité de phages présents sur les biofilms est mesurée immédiatement avant le transfert du disque dans la nouvelle cuve et à l'issue des trois heures dans la nouvelle cuve.

Des résultats similaires ayant été obtenus lors des deux essais, la moyenne des analyses a été effectuée et les résultats sont présentés sur la **figure 42**.

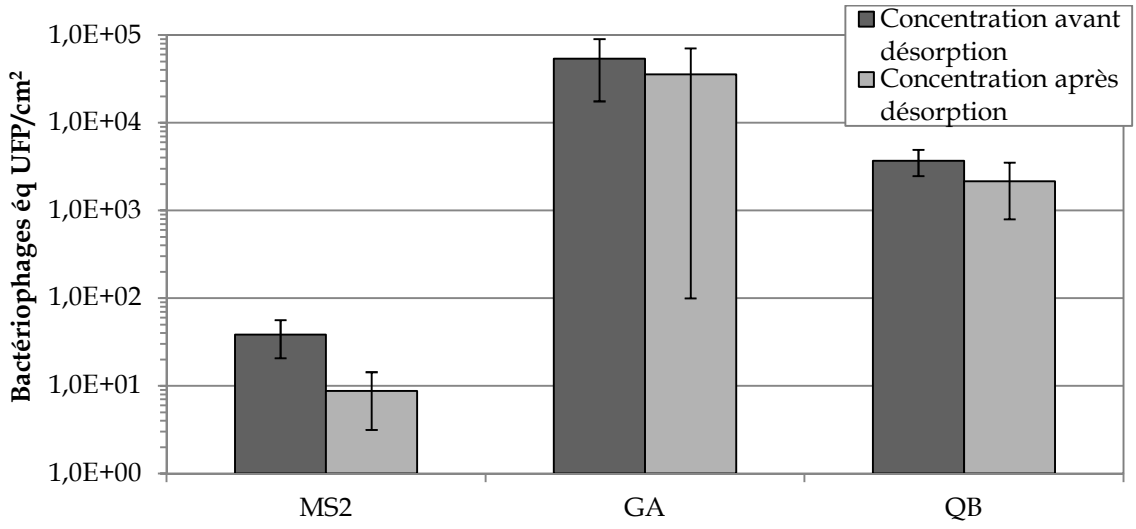



**Figure 42. Analyse de la désorption (75 rpm) des phages MS2, GA et Qβ des surfaces colonisées par un biofilm après trois heures de contact avec une eau dépourvue de phages (N=2 et n=6).**

Les concentrations phagiques initialement mesurées après trois heures de contact avec une eau dopée en phages sont respectivement de $3{,}8.10^{1} \pm 1{,}7.10^{1}$, $5{,}4.10^{4} \pm 3{,}6.10^{4}$ et $3{,}7.10^{3} \pm 1{,}2.10^{3}$ éq UFP/cm² pour les phages MS2, GA et Qβ. La séquence d'adhésion confirme celle observée lors de l'étude de l'adsorption phagique (MS2 < Qβ < GA). Après transfert du disque sur une eau dépourvue de phages et un temps de contact de 3 heures à 75 rpm, une diminution des concentrations en phages sur les surfaces est observée. L'abattement obtenu dans ces conditions est de 0,6 $\log_{10}$ UFP/cm² pour le phage MS2 et de 0,2 $\log_{10}$ UFP/cm² pour les phages GA et Qβ. Il apparait ainsi que le phage MS2 qui adsorbe en moins grande quantité sur le biofilm et est également celui qui est relargué en plus grande quantité. Pour des contraintes hydrodynamiques stables, une partie des phages adsorbés est capable de se décrocher des surfaces et de retourner dans l'eau selon le principe de l'équilibre.

## 2. Evaluation d'un protocole de nettoyage des surfaces par augmentation des contraintes hydrodynamiques

### 2.1. Impact d'une augmentation des contraintes hydrodynamiques sur les bactéries constituant le biofilm

Après formation d'un biofilm à 75 rpm durant 60 jours, un protocole de nettoyage des surfaces est appliqué. Il consiste en une augmentation de la vitesse de l'eau sur les surfaces afin d'évaluer l'arrachement des bactéries du biofilm. Pour cela la vitesse de rotation du disque est augmentée de 75 à 340 rpm durant 90 minutes ce qui correspond à une augmentation de gradient pariétal de 4 300 à 15 700 $s^{-1}$. La **figure 43** présente une photographie des disques tournants avant et après application du protocole de nettoyage hydrodynamique.

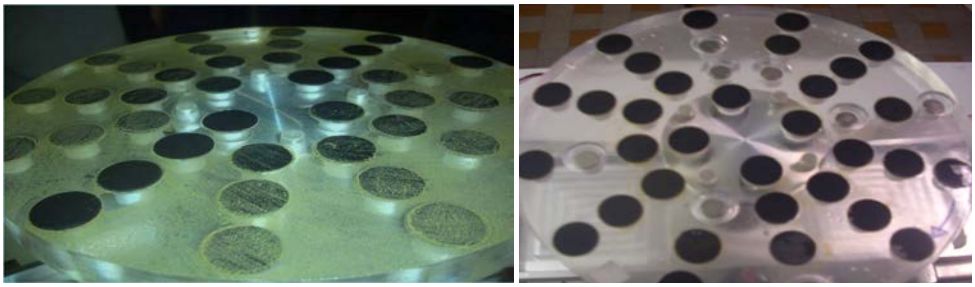


**Figure 43. Vue macroscopique des disques tournant avant (A) et après (B) application d'une augmentation des contraintes hydrodynamiques (de 75 à 340 rpm) sur un biofilm d'eau potable de 60 jours.**

Après application du protocole de nettoyage hydrodynamique, le biofilm parait éliminé de la surface d'un point de vue macroscopique. Des mesures de densité bactérienne ont été effectuées afin d'évaluer l'efficacité de ce nettoyage d'un point de vue microscopique **(Figure 44)**.

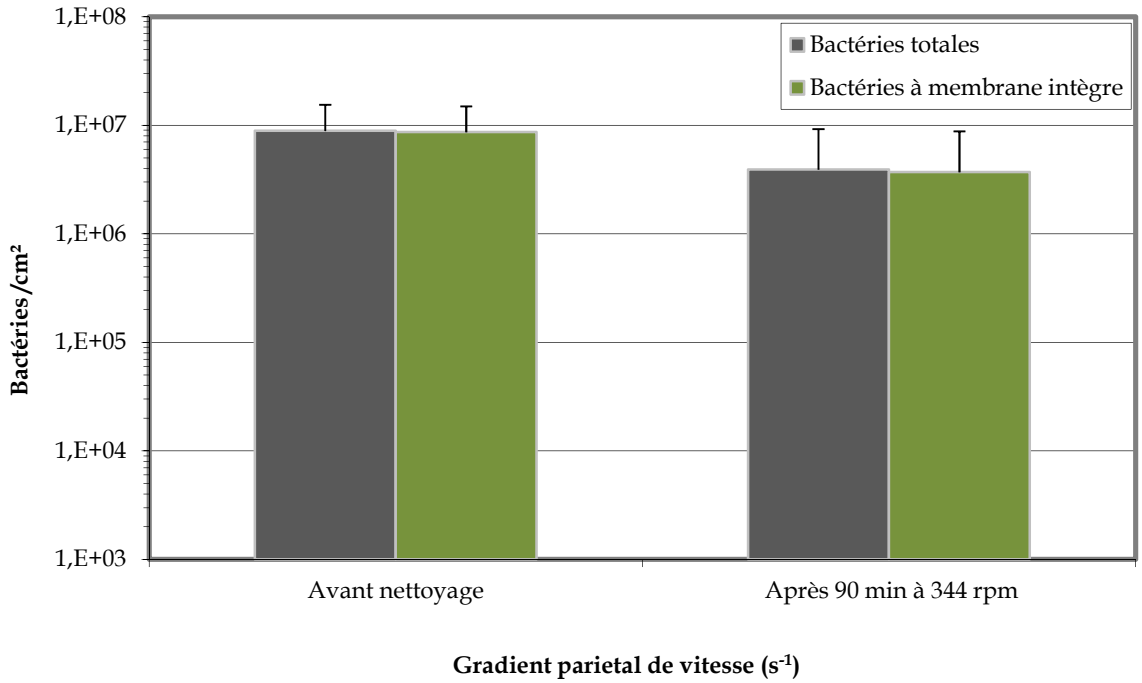



**Figure 44. Concentrations en bactéries totales et en bactéries présentant une membrane intègre dans des biofilms de 60 jours formés à 75 rpm avant et après 90 minutes de nettoyage hydrodynamique (augmentation de la vitesse de rotation du disque à 340 rpm correspondant à des gradients de 4 300 à 15 700 $s^{-1}$) (n=12).**

La densité bactérienne des biofilms de 60 jours formés à une vitesse de rotation du disque de 75 rpm est de 8,9 $10^6$ ± 6,6.$10^6$ bactéries/$cm^2$ pour les bactéries totales et elle est de 8,6.$10^6$ ± 6,3.$10^6$ bactéries/$cm^2$ pour les bactéries à membrane intègre. Plus de 96% des bactéries présentent donc une membrane intègre. Après augmentation de la vitesse de rotation du disque à 340 rpm durant 90 minutes la densité bactérienne mesurée est respectivement de 3,9.$10^6$ ± 3,5.$10^6$ et 3,7.$10^6$ ± 5,1.$10^6$ bactéries/$cm^2$ pour les bactéries totales et les bactéries ayant une membrane intègre, ce qui correspond à un abattement bactérien de 0,5 ± 0,3 $log_{10}$. La proportion de bactéries cultivables reste similaire, de l'ordre de 0,1% des bactéries totales, ce nettoyage hydrodynamique ne générerait pas de dommages cellulaires pouvant altérer la cultivabilité bactérienne.

Ainsi, le nettoyage hydrodynamique généré par augmentation rapide de la force pariétale de 450-1640 $s^{-1}$ à 4300-15700 $s^{-1}$ n'entraîne qu'un arrachage limité du biofilm.

### 2.2. Impact sur les bactériophages adsorbés sur les surfaces

Après une phase d'adsorption phagique sur les surfaces de 3 heures à 75 rpm et une phase de désorption de 3 heures à 75 rpm, la vitesse de rotation du disque est augmentée à 340 rpm durant 90 minutes. Des coupons sont prélevés après 5 et 90 minutes afin d'évaluer l'effet d'un stress hydrodynamique sur les bactériophages adsorbés. L'abattement phagique (A) est mesuré selon **l'équation 9.** L'expérimentation a été répétée deux fois et des résultats similaires ont été obtenus. Les résultats présentés sur la **figure 45** présentent la moyenne des concentrations en phages mesurées sur les surfaces pour deux essais indépendants.

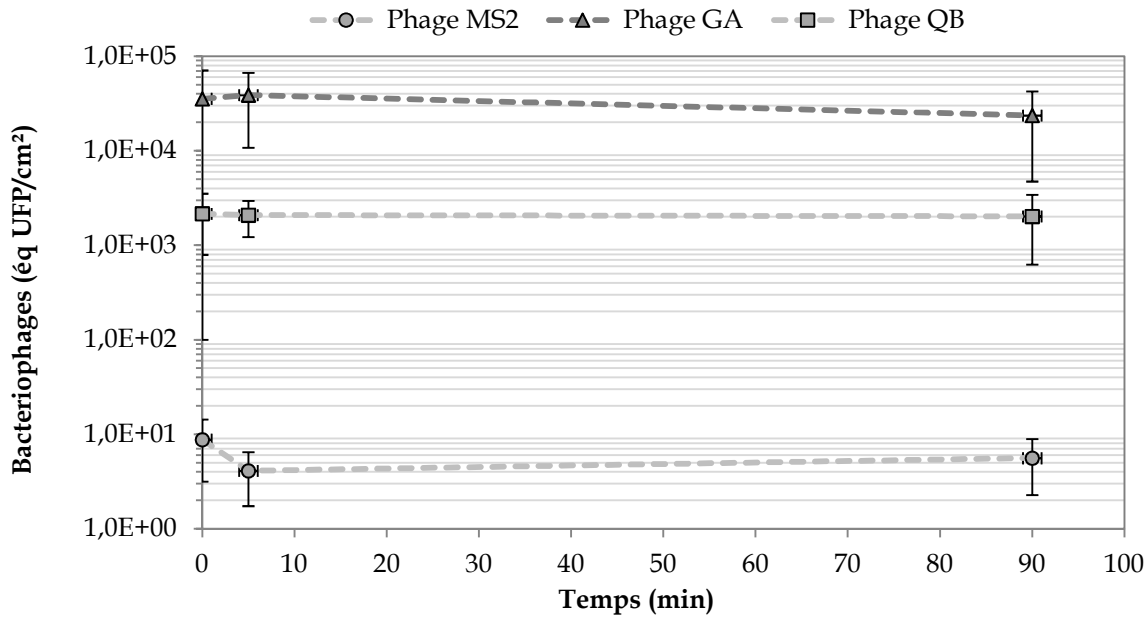



**Figure 45. Effet d'une augmentation de la vitesse de rotation du disque de 75 à 340 rpm durant 90 minutes sur les bactériophages adsorbés au biofilm (N=2 et n=6).**

La concentration phagique mesurée pour le phage MS2 est de 8,7 ± 5,6 éq UFP/$cm^2$ avant l'augmentation de la vitesse de rotation du disque et passe à 5,6 ± 3,3 éq UFP/$cm^2$ après 90 minutes de stress hydrodynamique. Ce qui correspond à une diminution de 0,2 $log_{10}$ éq UFP. Pour le phage GA, la concentration mesurée sur les surfaces passe de $3{,}6.10^4$ ± $3{,}5.10^4$ éq UFP/$cm^2$ à $2{,}4.10^4$ ± $1{,}9.10^4$ éq UFP/$cm^2$ correspondant à un abattement de 0,2 $log_{10}$ éq UFP. Enfin, pour le phage Qβ, la quantité initialement mesurée est de $2{,}1.10^3$ ± $1{,}3.10^3$ et atteint $2{,}0.10^3$ ± $1{,}4.10^3$ éq UFP/$cm^2$ correspondant à un abattement de 0,03 $log_{10}$ éq UFP.

L'impact d'un stress hydrodynamique sur les bactériophages adsorbés au biofilm est donc plutôt limité et du même ordre de grandeur que celui observé lors d'une simple désorption phagique selon les principes d'équilibre.

## II. Impact de la chloration sur l'infectiosité et la détection génomique des phages

### 1. Définition des conditions de chloration

#### 1.1. Etablissement d'une droite étalon pour le dosage du chlore

Lors de ces expérimentations, la concentration en chlore libre est dosée au cours du temps par la méthode à la N,N-DiéthylPhénylène-1,4 Diamine (DPD). Ceci permet d'estimer la consommation en chlore par le réacteur au cours de chaque expérimentation.

La concentration en chlore est estimée à partir d'une droite étalon (**Figure 46**) qui permet de relier la concentration en chlore (mg/L) à la densité optique (λ=515 nm) mesurée après traitement de l'eau à la DPD.

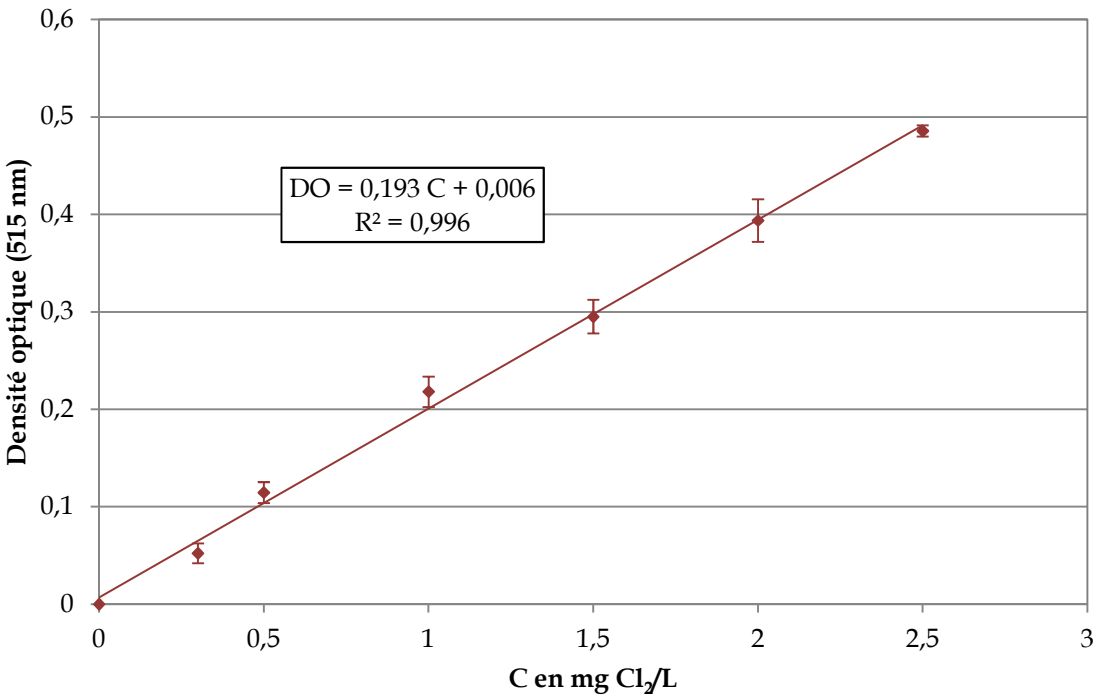



**Figure 46. Droite étalon utilisée pour le dosage du chlore libre à la DPD (N,N-DiéthylPhénylène-1,4 Diamine) (n=3).**

Une relation linéaire entre la valeur de densité optique à 515 nm et la concentration en chlore est obtenue pour des concentrations inférieures ou égales à 2,5 mg de chlore libre/L sur 6 mesures effectuées en triplicat. La concentration initiale en chlore appliquée

dans l'eau des réacteurs étant de 4 à 5 mg de chlore libre /L, les prélèvements d'eau ont été dilués au 1/2 afin de se situer dans la zone de linéarité de la droite étalon.

### 1.2. Suivi de la concentration en chlore dans les réacteurs

Après ajout de chlore dans l'eau des réacteurs, celui-ci réagit avec la biomasse présente dans le système et notamment avec le biofilm. De ce fait, une diminution de la concentration en chlore au cours de l'expérimentation est attendue.

#### 1.2.1. Suivi de la consommation en chlore pour une chloration à 5 mg/L en réacteur Propella™

Un dosage du chlore libre présent dans l'eau est effectué tout au long des trente minutes d'expérimentation. Les concentrations mesurées dans l'eau des réacteurs Propella™ sont présentées sur la **figure 47**. Pour chaque temps d'analyse, le dosage du chlore est réalisé en duplicat.

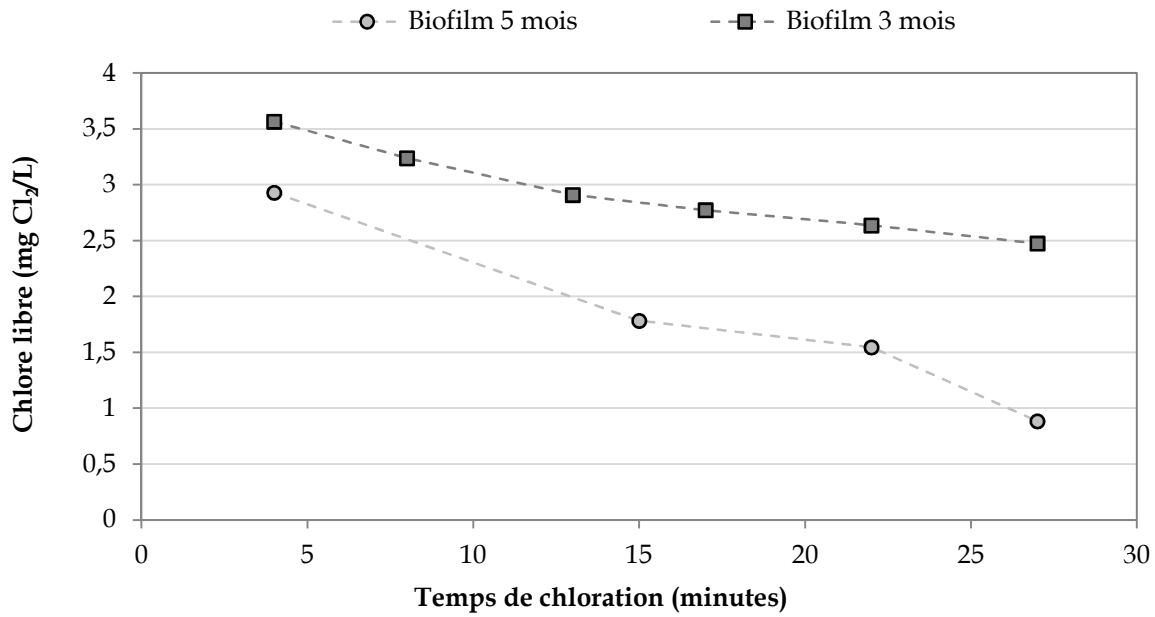



**Figure 47. Suivi de la concentration en chlore libre (mg/L) dans l'eau des réacteurs Propella™ colonisés par des biofilms de 3 et 5 mois (n=2) pour une dose initiale de chlore de 5 mg/L.**

Pour un biofilm de 3 mois, la concentration en chlore mesurée dans l'eau du réacteur après 4 minutes est de 3,6 mg/L. Cette concentration diminue de façon régulière pour atteindre 2,5 mg/L après 27 minutes. Ainsi, la concentration en chlore libre a diminué de 1,1 mg/L en 23 minutes.

Pour un biofilm de 5 mois, la concentration en chlore dans l'eau est de 2,9 mg/L après 4 minutes. Après 27 minutes, elle est de 0,9 mg/L. La concentration en chlore libre a diminué de 2,1 mg/L en 23 minutes.

D'après ces résultats, on observe que la consommation en chlore, correspondant à la diminution de la concentration en chlore libre, augmente avec l'âge du biofilm. Il est possible de faire l'hypothèse que la consommation est due à la quantité de matière organique qui est plus importante dans le réacteur colonisé par un biofilm de 5 mois. Cependant, en raison du nombre limité de coupons il n'a pas été possible d'effectuer des mesures de densité bactérienne sur ces deux biofilms. Il est à noter que dans le réacteur colonisé par un biofilm de trois mois la concentration en chlore n'a diminué que de moitié après 23 minutes et que les phages sont encore en contact avec 2,5 mg/L de chlore.

### 1.2.2. Suivi de la consommation en chlore pour une chloration à 4 mg/L en réacteur à disque rotatif

Des prélèvements d'eau ont été effectués durant le déroulement des expérimentations afin d'évaluer la consommation en chlore. Les résultats sont présentés sur la **figure 48**.

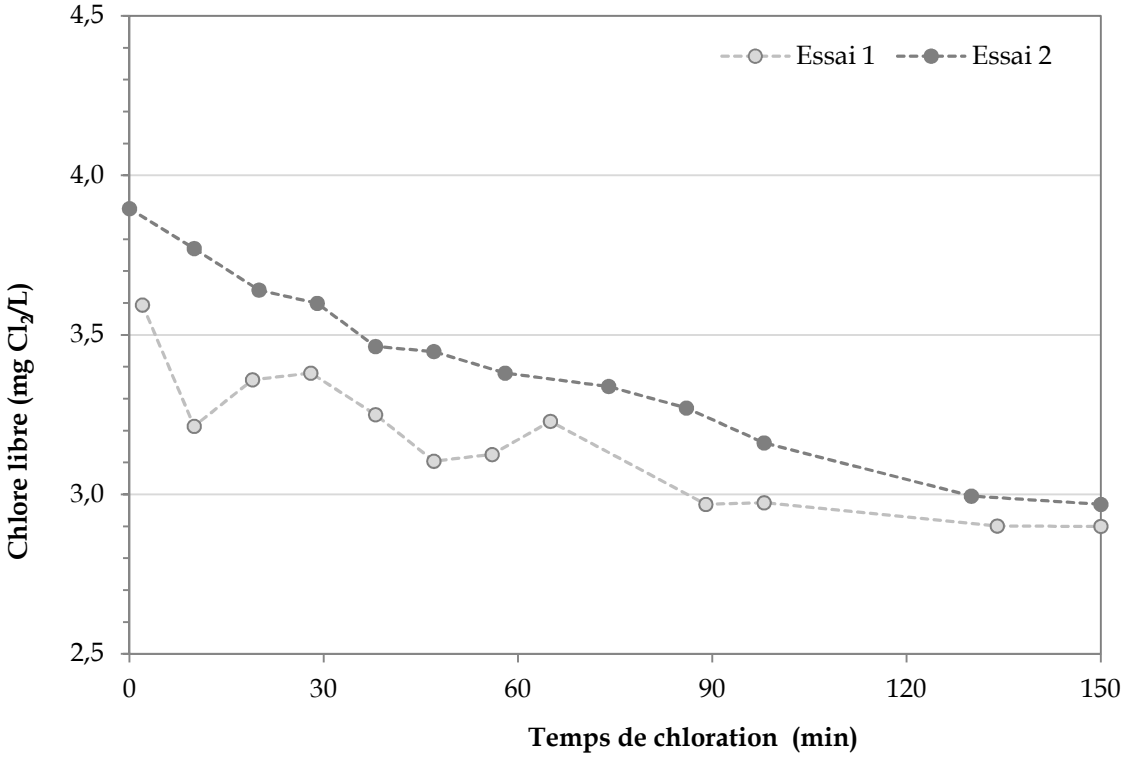



**Figure 48. Suivi de la concentration en chlore libre dans l'eau en fonction du temps (n=2 pour chaque essai) pour une chloration à 4 mg/L en réacteur à disque rotatif.**

Après deux minutes la concentration en chlore libre est de 3,6 et 3,9 mg $Cl_2$/L respectivement pour les essais 1 et 2. Le chlore est consommé de façon régulière pour atteindre une concentration résiduelle de 2,9 mg $Cl_2$/L pour les deux essais après 150 minutes, correspondant à une consommation en chlore de l'ordre de $5.10^{-3}$ mg $Cl_2$/L.min.

## 2. Effet de la chloration sur les bactériophages en suspension dans l'eau

Les phages présents dans l'eau des réacteurs vont rapidement subir les effets de la chloration. Les bactériophages infectieux sont détectés par la méthode des plages de lyse sans distinction des génogroupes. Les concentrations en phages infectieux sont comparées à la somme des concentrations en génome phagique obtenues par RT-PCR temps réel, pour les phages MS2, GA et Qβ.

Le chlore libre a été systématiquement neutralisé par ajout de thiosulfate de sodium avant chaque analyse par culture ou par RT-PCR temps réel. Il a été au préalable vérifié que la présence de thiosulfate de sodium n'interférait pas avec la RT-PCR en temps réel. A titre d'exemple, un Ct de 23,8 est obtenu sur une suspension témoin de phage Qβ sans chlore ni thiosulfate et un Ct de 23,7 est obtenu sur une suspension chlorée à 5 mg/L puis neutralisée

au thiosulfate de sodium et dans laquelle les phages ont été ajoutés. Des résultats similaires sont obtenus pour les phages MS2 et GA.

### 2.1. Effet d'une chloration à 5 mg/L en réacteur Propella™

La quantification des bactériophages dans l'eau est réalisée immédiatement et quatre heures après inoculation. Le chlore est ensuite ajouté pour atteindre une concentration de 5 mg/L. Les bactériophages présents dans l'eau sont quantifiés après 5 et 30 minutes de chloration. Les résultats obtenus sont présentés sur le **tableau 21**.

**Tableau 21. Quantification des bactériophages infectieux et du génome viral dans l'eau des réacteurs Propella™ avant et pendant la chloration à 5 mg/L (n=2).**

| | | En présence d'un biofilm de 3 mois | | En présence d'un biofilm de 5 mois | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | Génome ( éq UFP/mL) | Infectiosité (UFP/mL) | Génome (éq UFP/mL) | Infectiosité (UFP/mL) |
| **Avant chloration** | | $1,5.10^6$ | $2,4.10^6$ | $1,1.10^6$ | $2,6.10^5$ |
| **Après chloration** | 5 min | $7,0.10^1$ | ND | ND | ND |
| | 30 min | ND | ND | ND | ND |

ND : Non détecté= absence de plage de lyse ou d'émission de fluorescence.

La concentration en génome viral mesurée dans l'eau immédiatement après inoculation est de $1,5.10^6$ éq UFP/mL et celle en phage infectieux est de $2,4.10^6$ UFP/mL lors de l'essai avec un biofilm de 3 mois. Les concentrations mesurées sont respectivement de $1,1.10^6$ éq UFP/mL et $2,6.10^5$ UFP/mL lors de l'essai avec un biofilm de 5 mois. Ces valeurs sont en accord avec les quantités de phages théoriquement inoculés (de l'ordre de $10^6$ UFP/mL) dans les réacteurs. Dès 5 minutes de chloration on observe une diminution importante de la concentration en génome viral et en phage infectieux dans l'eau. En effet, seul du génome correspondant au bactériophage Qβ est détecté par RT-PCR en temps réel ($7,0.10^1$ éq UFP/mL) et uniquement pour l'expérimentation sur un biofilm de 3 mois. Après 30 minutes de chloration, l'ensemble des prélèvements sont négatifs en termes de bactériophages infectieux et de génome phagique. L'abattement en phage infectieux dans l'eau suite à une chloration de 5 mg/L est donc supérieur à 6,4 $\log_{10}$ après cinq minutes de contact.

## 2.2. Effet d'une chloration à 4 mg/L en réacteur à disque rotatif

Les expérimentations en réacteur à disque rotatif ont été réalisées en présence d'un biofilm de 60 jours. Les bactériophages en suspension dans l'eau sont analysés juste après inoculation puis après 5, 30, 60 et 150 minutes de contact avec le chlore. Les résultats obtenus en termes de phage infectieux et de copies de génome sont présentés dans le **tableau 22**.

**Tableau 22. Quantification des bactériophages infectieux et du génome phagique dans l'eau des réacteurs à disque rotatif avant et pendant la chloration à 4 mg $Cl_2$/L (n=2).**

| | | Essai n°1 | | Essai n°2 | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | Génome ( éq UFP/mL) | Infectiosité (UFP/mL) | Génome (éq UFP/mL) | Infectiosité (UFP/mL) |
| **Avant chloration** | | $7{,}8.10^6$ | $8{,}3.10^5$ | $6{,}1.10^6$ | $7{,}3.10^5$ |
| **Après chloration** | 5 min | $5{,}3.10^4$ | ND | ND | ND |
| | 30 min | ND | ND | ND | ND |
| | 60 min | ND | ND | ND | ND |
| | 150 min | ND | ND | ND | ND |

ND : Non détecté= absence de plage de lyse ou d'émission de fluorescence.

Les concentrations phagiques mesurées après inoculation dans l'eau sont respectivement de $7{,}8.10^6$ et $6{,}1.10^6$ éq UFP/mL pour le génome phagique et $8{,}3.10^5$ et $7{,}3.10^5$ pour les phages infectieux pour les essais 1 et 2. Comme attendu, la quantité de phage infectieux est plus faible que le nombre de copie de génome et les deux valeurs de concentrations correspondent à la quantité phagique théoriquement inoculée (de l'ordre de $10^6$ UFP/mL). Après 5 minutes de chloration aucun phage infectieux n'a pu être détecté et uniquement du génome phagique a été mesuré à hauteur de $5{,}3.10^4$ éq UFP/mL lors de l'essai n°1 pour le phage Qβ. Après 30 minutes de chloration aucun génome de bactériophage n'est plus détecté et ceci jusqu'à la fin de l'essai (t= 150 min). L'élimination des phages infectieux dans l'eau par 4 mg/L d'hypochlorite de sodium est un phénomène rapide qui se produit en moins de 5 minutes. L'abattement en phage infectieux pour une chloration de l'eau à 4 mg/L est donc supérieur à 5,9 $\log_{10}$ en cinq minutes, confirmant les observations effectuées en réacteur Propella™.

## 3. Impact d'un nettoyage par chloration sur les phages adsorbés sur les surfaces en réacteur Propella™

Des coupons ont été analysés 4 heures après inoculation des phages dans l'eau des réacteurs afin d'obtenir une concentration surfacique initiale, puis après 30 minutes de chloration à 5 mg/L. Les concentrations surfaciques en phages infectieux et en génome phagique ont été mesurées pour ces deux temps d'analyse. Lors de chaque prélèvement de coupon la concentration en phages infectieux ainsi qu'en copies de génome est mesurée après une étape d'élution-concentration.

Le suivi des concentrations surfaciques en génome viral et en bactériophages infectieux sont présentés sur la **figure 49**. Les concentrations en génome ont été additionnées pour MS2, GA et Qβ afin de pouvoir comparer ces valeurs à l'infectiosité, comme dans le cas des analyses de l'eau.

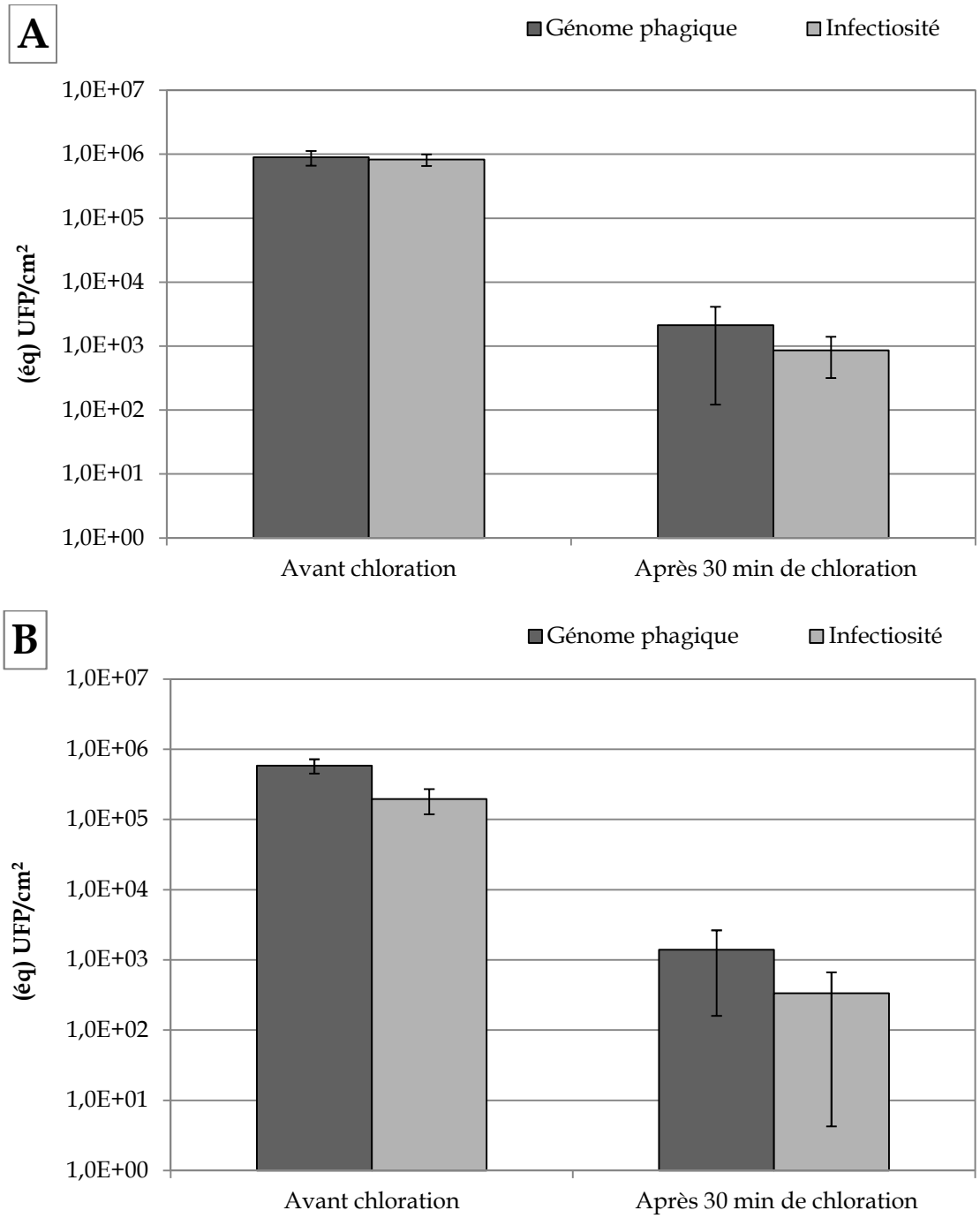



**Figure 49. Concentrations en phages infectieux et en copies de génome sur les coupons de PEHD colonisés par un biofilm de trois (A) et cinq (B) mois avant et après 30 minutes de chloration à 5 mg $Cl_2$/L en réacteur Propella™.**

Après 30 minutes de chloration, les concentrations génomiques mesurées à la surface des coupons sont de $2{,}1.10^3 \pm 2{,}0.10^3$ et $1{,}4.10^3 \pm 1{,}2.10^3$ éq UFP/cm² respectivement sur biofilm de 3 et 5 mois. Ceci correspond à des abattements en génome de 2,8 ± 0,5 et 2,6 ± 0,4 $\log_{10}$ éq UFP/cm². Pour l'infectiosité, les valeurs obtenues sont de $8{,}6.10^2 \pm 5{,}4.10^2$ et $3{,}3.10^2 \pm 3{,}3.10^2$ UFP/cm², correspondant à des abattements de 3,1 ± 0,4 et 2,8 ± 0,6 $\log_{10}$ UFP/cm². Ces

abattements correspondent à une élimination phagique comprise entre 99,8 et 99,9 %, avec une concentration résiduelle en chlore libre dans l'eau comprise entre 0,9 et 2,5 mg $Cl_2$/L.

Ces résultats mettent en évidence un effet protecteur du biofilm pour les phages adsorbés sur les surfaces, par comparaison aux bactériophages en suspension dans l'eau. L'élimination des phages adsorbés sur les surfaces par chloration n'est pas significativement différente pour un biofilm de 3 et 5 mois ($p=0,343$, Mann et Whitney, $\alpha=0,05$). Les deux mois supplémentaires de formation de biofilm d'eau potable n'augmentent pas l'effet protecteur vis-à-vis du chlore. Il est simplement possible d'observer que la présence d'un biofilm sur les surfaces a un effet protecteur sur l'élimination des phages puisque des phages infectieux persistent à la surface malgré une concentration résiduelle en chlore dans l'eau non négligeable.

## 4. Impact d'un nettoyage par chloration associé à une augmentation des contraintes hydrodynamiques en réacteur à disque rotatif

L'objectif visait à répondre à la question d'une possible amélioration du nettoyage hydrodynamique par une fragilisation préliminaire du biofilm par application préalable d'un choc oxydant (hypochlorite de sodium). Une chloration à 4 mg $Cl_2$/L a été réalisée. Après une heure de chloration, une augmentation de la vitesse de rotation du disque de 75 à 340 rpm a été effectuée durant 90 minutes, toujours en présence de chlore. Ainsi, la concentration en chlore libre était comprise entre 3 et 3,2 mg $Cl_2$/L après 60 minutes de chloration et atteignant 2,9 mg $Cl_2$/L après 90 minutes d'augmentation des contraintes hydrodynamiques (t=150 minutes).

### 4.1. Influence sur les bactéries du biofilm

Des mesures de densité bactérienne du biofilm de 60 jours formé à 75 rpm ont été effectuées avant la chloration, après 30 et 60 minutes de chloration et enfin après 150 minutes de chloration associée avec une augmentation de la vitesse de rotation du disque à 340 rpm durant 90 minutes. Les résultats présentés ci-dessous correspondent au bilan de 2 essais indépendants. La **figure 50** présente tous gradients de vitesse confondus, les concentrations moyennes en bactéries du biofilm avant, après chloration et après application d'une augmentation des contraintes hydrodynamiques.

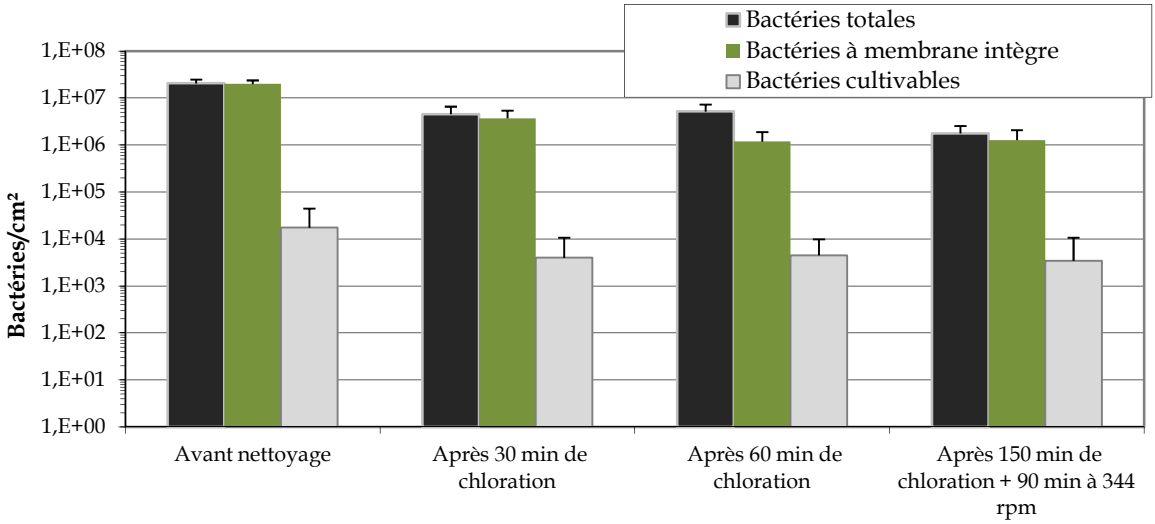



**Figure 50. Concentrations en bactéries totales, en bactéries avec membrane intègre et en bactéries cultivables des biofilms de 60 jours formés à 75 rpm avant chloration, après 30 et 60 minutes de chloration, puis après 150 minutes de chloration associée avec 90 minutes de nettoyage hydrodynamique à 340 rpm (n=12).**

Après 30 minutes de chloration, le nombre total de bactéries du biofilm diminue de 0,7 $\log_{10}$ en moyenne, tout comme le nombre de bactéries présentant une membrane intègre. Le nombre de bactéries cultivables diminue de 0,5 $\log_{10}$. Après 60 minutes de chloration, le nombre total de cellules bactériennes ne varie pas mais la chloration entraîne une fragilisation des membranes bactériennes : en moyenne 77 % de la population bactérienne a une membrane endommagée, contre 3 % avant chloration. Le nombre de bactéries cultivables n'est pas modifié par rapport à ce qui est observé après 30 minutes de chloration et représente moins de 0,1% des bactéries totales.

L'augmentation de la vitesse de rotation du disque en présence de chlore contribue à l'arrachage d'une partie de la biomasse (-0,5 $\log_{10}$) comme déjà observé par nettoyage hydrodynamique seul. L'absence de variation du nombre de cellules à membrane intègre et la faible augmentation de la concentration en bactéries cultivables (0,3%) suggère que cette force de cisaillement arrache la biomasse située en surface du biofilm, biomasse déjà altérée par l'oxydant (**Figure 50**).

Le biofilm ayant subi une chloration et un nettoyage hydrodynamique est caractérisé par une biomasse bactérienne dont 68% ont une membrane intègre et dont 0,3 % sont cultivables en 15 jours à 20°C (contre 0,1% avant chloration).

## 4.2. Influence du protocole de nettoyage sur les phages infectieux et le génome phagique

De la même facon que pour l'étude des bactéries constituant le biofilm, des coupons sont prélevés avant la chloration afin d'apprécier la concentration phagique initiale. Des prélèvements sont également effectués après 30 et 60 minutes de chloration ainsi qu'après 150 minutes de chloration comprenant 90 minutes de stress hydrodynamique. Les résultats sont présentés sur la **figure 51**. Lors de chaque prélèvement de coupon la concentration en phages infectieux ainsi qu'en copie de génome est mesurée après élution-concentration.

Les résultats de quantification du génome phagique correspondent à la somme des trois bactériophages MS2, GA et Qβ.

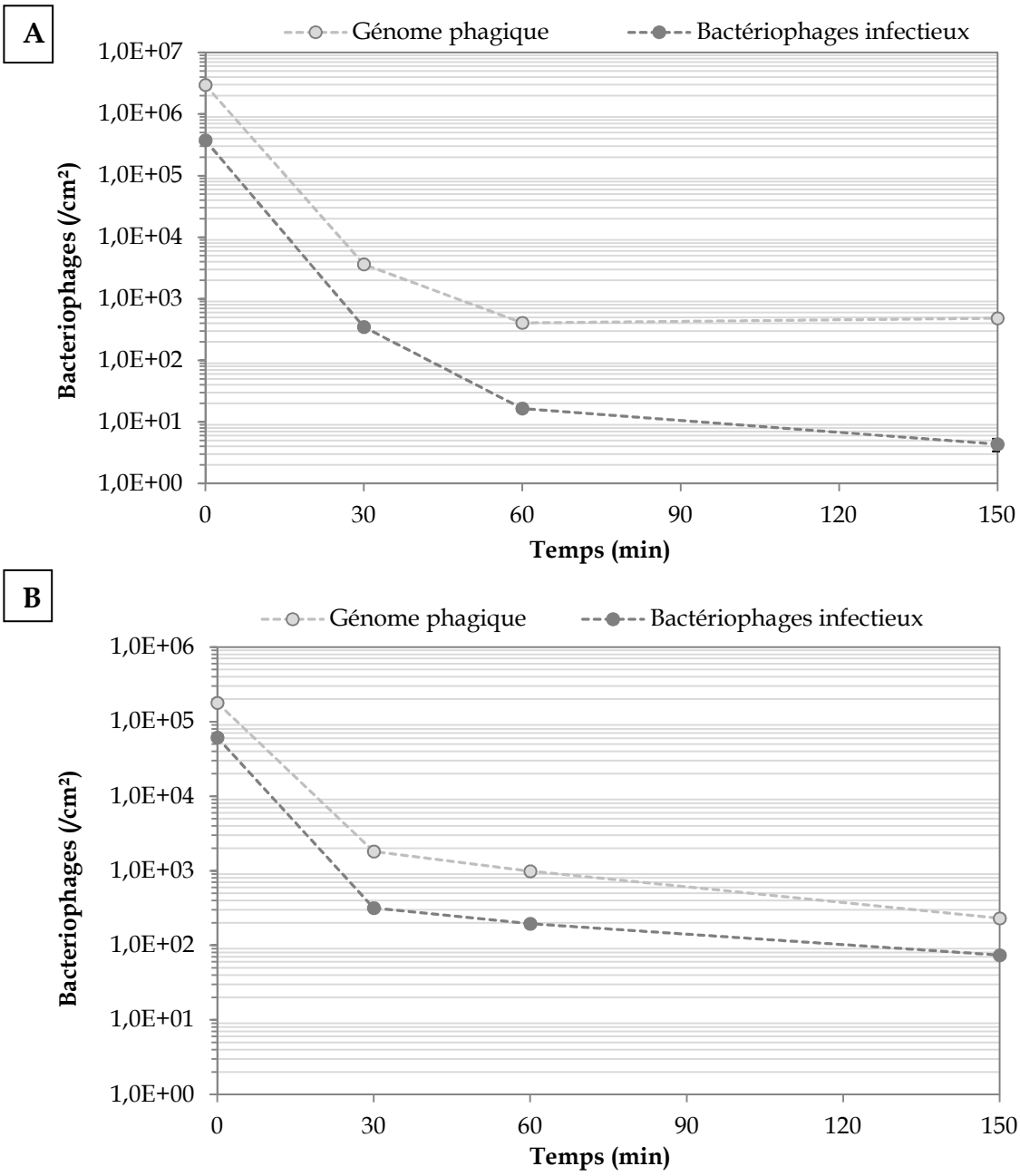



**Figure 51. Concentrations en phages infectieux et en copie de génome sur les coupons de PEHD colonisés par un biofilm de 60 jours au cours de la chloration et de l'augmentation des contraintes hydrodynamiques. A : essai n°1 et B : essai n°2 (n<3).**

La concentration surfacique en bactériophages initialement mesurée est de $3{,}8.10^5$ UFP/cm² et $2{,}9.10^6$ éq UFP/cm² respectivement pour les phages infectieux et la détection du génome lors de l'essai n°1. Les concentrations mesurées lors de l'essai n°2 sont de $6{,}4.10^4$ UFP/cm² et $1{,}8.10^5$ éq UFP/cm². Le nombre de phage ayant initialement adhéré au biofilm est inférieur lors du deuxième essai, sans raison particulière, les deux expérimentations ayant été effectuées durant la même période à une semaine d'intervalle. Après 30 minutes de chloration des abattements en bactériophages infectieux de 3,0 et

2,3 $log_{10}$ sont obtenus respectivement pour les essais 1 et 2. Les abattements en génome sont de 2,9 et 1,9 $log_{10}$. Après 60 minutes de chloration, les abattements en génome et en phages infectieux atteignent respectivement 3,9 $log_{10}$ et 4,4 $log_{10}$ lors du premier essai et 2,3 $log_{10}$ et 2,5 $log_{10}$ lors du second essai. L'abattement en phage infectieux et en génome le plus important est observé lors des trente premières minutes de chloration.

Une augmentation des contraintes hydrodynamiques en présence de chlore durant 90 minutes entraine un abattement supplémentaire de 0,6 $log_{10}$ et 0,07 $log_{10}$ pour les phages infectieux et le génome phagique pour l'essai 1 et de 0,4 et 0,6 $log_{10}$ respectivement pour l'essai 2. Comme constaté lors d'un nettoyage hydrodynamique seul, la contribution d'un stress hydrodynamique sur l'élimination des particules virales adsorbées reste très limitée. Les abattements mesurés pour les particules infectieuses et le génome phagique sont du même ordre de grandeur dans tous les cas de figure. L'impact de la chloration sur l'élimination des phages est plus important que celui de l'hydrodynamique. De plus, 4,3 et $7{,}4.10^{1}$ UFP/$cm^2$ particules phagiques infectieuses sont toujours mesurées sur les surfaces à la fin des essais 1 et 2 respectivement, malgré un résiduel de chlore dans l'eau de 2,9 mg $Cl_2$/L, confirmant l'effet protecteur du biofilm face à la chloration.

### 4.3. Influence de la chloration en fonction du génogroupe phagique

La technique des plages de lyse permet de déterminer les concentrations en phages infectieux mais ne fait pas de distinction entre les différents génogroupes. La technique de RT-PCR en temps réel permet par contre de quantifier le génome de chaque génogroupe de façon spécifique. Les abattements obtenus pour chacun des trois phages étudiés sont présentés sur les **figures 52 et 53**. Les concentrations phagiques mesurées sur les surfaces à la fin des expérimentaions sont comparées aux concentrations phagiques initialement mesurées afin de pouvoir estimer l'abattement (A) selon **l'équation 9**.

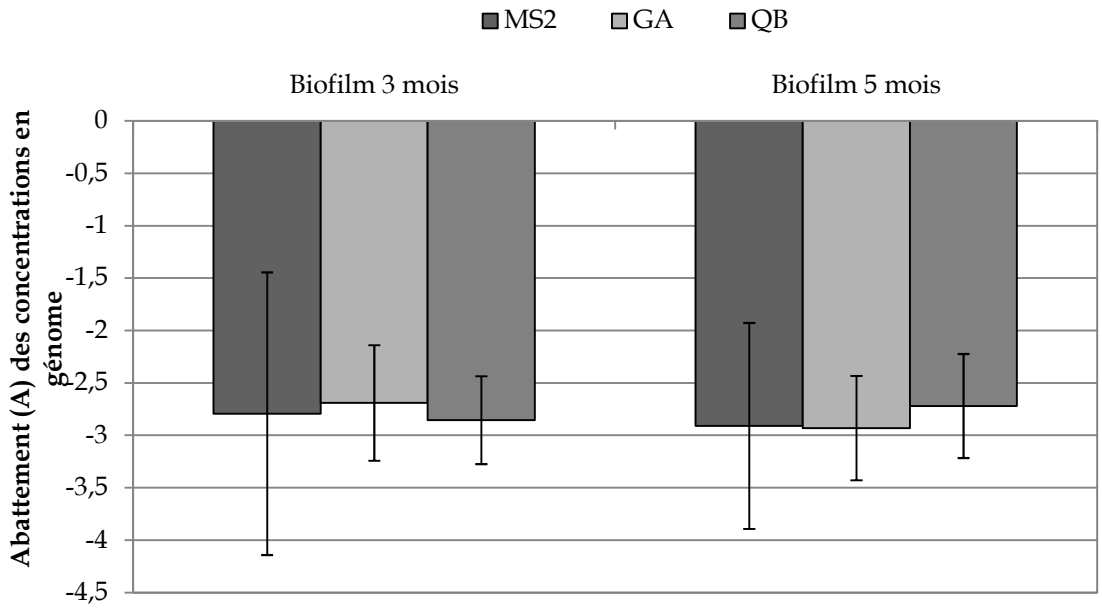



**Figure 52. Abattement des concentrations en génome des bactériophages MS2, GA et Qβ en réacteurs Propella™ sur les coupons de PEHD après 30 minutes de chloration, sur des biofilms de trois et cinq mois (n=5).**

Les concentrations en phages mesurées sur les surfaces avant chloration sont comprises entre $2{,}2.10^4 \pm 6{,}9.10^3$ et $8{,}1.10^4 \pm 2{,}9.10^4$ éq UFP/cm² pour le phage MS2 et entre $8{,}3.10^5 \pm 2{,}2.10^5$ et $1{,}1.10^5 \pm 2{,}6.10^3$ éq UFP/cm² pour le phage GA. Après 30 minutes, un abattement de $2{,}8 \pm 0{,}9$ et $2{,}9 \pm 1{,}3$ $\log_{10}$ est observé pour le génome de MS2 pour des biofilms de 3 et 5 mois. Les valeurs d'abattement en génome sont de $2{,}9 \pm 0{,}5$ et $2{,}7 \pm 0{,}6$ $\log_{10}$ pour phage GA et de $2{,}9 \pm 0{,}5$ et $2{,}8 \pm 0{,}4$ $\log_{10}$ pour le phage Qβ. La comparaison de la dégradation du génome de ces trois phages ne montre pas de différence significative (biofilm de 3 mois : $p > 0{,}9$ et biofilm de 5 mois : $p > 1{,}0$, Mann et Whitney, $\alpha = 0{,}05$).

Le suivi de la dégradation du génome phagique en réacteur à disque rotatif, pour chaque phage est présenté sur les **figures 53**.

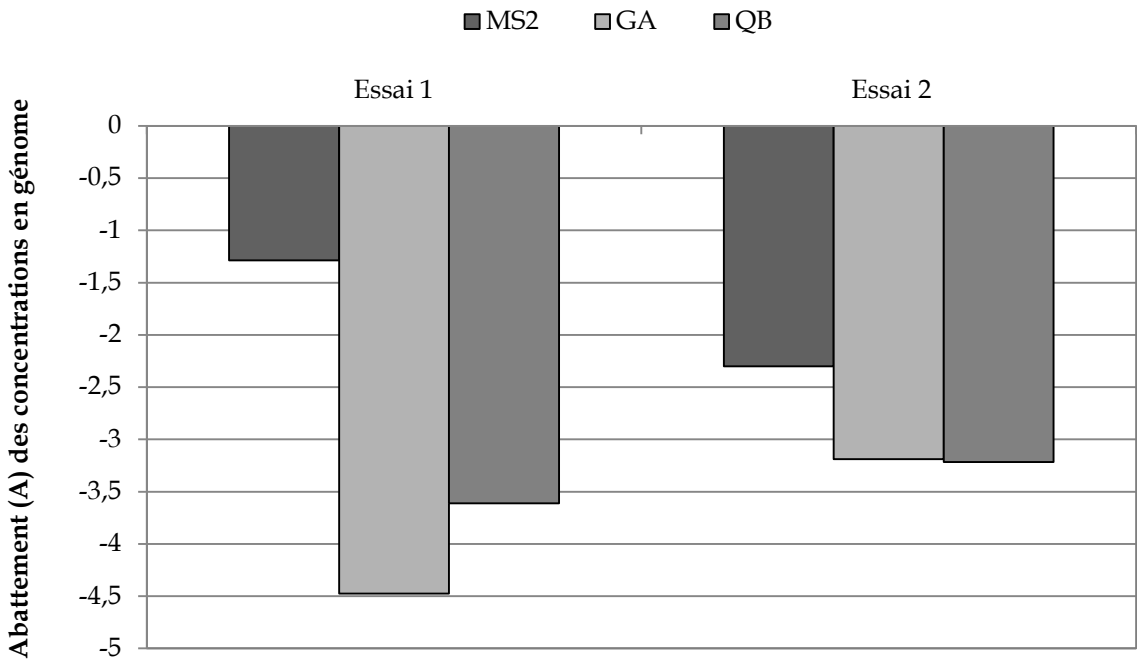



**Figure 53. Abattement des concentrations en génome des phages MS2, GA et Qβ en réacteurs à disque rotatif sur les coupons de PEHD colonisés par un biofilm de deux mois au cours de la chloration et de l'augmentation des contraintes hydrodynamiques (n<3).**

Globalement les abattements sont compris entre 1,3 $log_{10}$ (phage MS2 essai n°1) et 4,5 $log_{10}$ (phage Qβ essai n°1) après 150 minutes de chloration dont 90 minutes de stress hydrodynamique. Le bactériophage MS2 semble être le moins sensible à ce protocole de nettoyage lors des deux essais avec des abattements de 1,3 et 2,3 $log_{10}$ éq UFP/$cm^2$ pour les essais 1 et 2 respectivement.

*En résumé, lorsque les bactériophages adsorbés sur les biofilms sont mis en contact avec une eau dépourvue de phages, ces derniers ont la capacité à se décrocher et à retourner dans l'eau selon les simples principes d'équilibre. Le phage MS2 est celui qui adsorbe en moins grande quantité sur les surfaces, il est également celui qui est relargué en plus grande quantité.*

*L'effet d'un nettoyage par augmentation des contraintes hydrodynamiques sur la surface permet un abattement limité, de l'ordre de 0,5 $log_{10}$ sur les bactéries composant le biofilm et, de l'ordre de 0,2 à 0,6 $log_{10}$ sur les phages adsorbés sur les surfaces. L'abattement obtenu par augmentation des contraintes hydrodynamiques sur les bactériophages peut être comparé à celui observé lors d'une simple désorption.*

*L'introduction d'une forte concentration (entre 4 et 5 mg/L) d'hypochlorite de sodium dans l'eau est globalement efficace puisqu'elle conduit à l'élimination de la totalité des phages infectieux en suspension dans l'eau en moins de 5 minutes, soit un abattement supérieur à 6 $log_{10}$ dans nos conditions expérimentales. L'abattement génomique est plus faible, mais tout de même supérieur à 6 $log_{10}$ en 30 minutes de contact.*

*Sur les surfaces, l'effet du chlore semble se produire essentiellement durant les trente premières minutes de contact que ce soit pour les bactéries composant le biofilm ou les phages adsorbés. L'abattement en bactéries totales est de l'ordre de 0,7 $log_{10}$ après 30 minutes et n'augmente pas après 60 minutes. Cependant, le nombre de bactéries présentant une membrane endommagée qui est de 3% avant chloration et atteint 77% après 60 minutes de chloration. L'abattement en bactériophages infectieux et en génome phagique est compris entre 2 et 3 $log_{10}$. Un effet protecteur du biofilm face à la chloration est ainsi observé puisque des phages infectieux sont toujours détectés sur les surfaces malgré une concentration en chlore dans l'eau non négligeable.*

*L'application d'un choc oxydant avant l'augmentation des contraintes hydrodynamiques ne permet pas d'améliorer l'efficacité de l'arrachage des bactéries du biofilm ni des bactériophages adsorbés. La chloration a un effet nettement supérieur à l'augmentation des contraintes hydrodynamiques. Enfin, dans certaines conditions, il semble que le génome du phage MS2 pourrait être moins sensible que celui des phages GA et Qβ à l'hypochlorite de sodium.*

# *Discussion*

# *Conclusion et perspectives*

# *Discussion*

Afin de modéliser le comportement des virus entériques pathogènes accidentellement introduits dans un réseau de distribution d'eau, il est nécessaire d'obtenir des informations concernant la durée de survie des virus dans un tel environnement, leur taux ainsi que leur cinétique d'adsorption sur les surfaces ou encore leur capacité à être relargués de la surface vers l'eau. De telles informations sont nécessaires afin d'optimiser les protocoles de nettoyage mis en œuvre suite à ce type de contamination. Les virus entériques pathogènes susceptibles d'être accidentellement introduits dans un réseau de distribution d'eau sont essentiellement des virus nus - dépourvus d'enveloppe - mesurant entre 20 et 100 nm de diamètre. Si le nombre d'études concernant le devenir des virus dans des réseaux de distribution reste encore limité, celles-ci tendent à montrer une possible adsorption des particules virales sur les surfaces. Le phénomène d'adsorption dépend de nombreux paramètres tels que les propriétés de surface des virus, les conditions hydrodynamiques, les propriétés du milieu et des surfaces ainsi que la présence de biofilms sur les surfaces (Quignon *et al.*, 1997; Langmark *et al.*, 2005; Helmi *et al.*, 2008). Le biofilm constituerait une surface adsorbante pour les particules virales et favoriserait leur persistance en les protégeant des opérations de désinfection (Quignon *et al.*, 1997; Storey et Ashbolt, 2003). L'étude de l'interaction de microorganismes d'un intérêt sanitaire avec les biofilms présents à la surface des canalisations d'eau potable est un point clé préalable à l'amélioration des protocoles de nettoyage applicables en cas de pollution fécale d'un réseau. Les méthodes de désinfection empiriquement utilisées font appel à l'utilisation d'oxydants chlorés, qui ont fait les preuves de leur efficacité. Cependant, cette méthode présente plusieurs inconvénients. Ainsi, l'oxydant peut être consommé rapidement par la biomasse présente dans l'eau et sur les parois, et peut également conduire à la formation de sous-produits de dégradation organo-chlorés. Dans un objectif d'amélioration de la qualité de l'eau et d'une meilleure prise en charge en cas d'accident sur un système de distribution, une méthode alternative consiste à augmenter les contraintes hydrodynamiques, ce qui pourrait permettre de limiter l'utilisation d'agents chimiques.

L'objectif de ce travail était d'apporter de nouvelles données visant d'une part à approfondir, les connaissances sur les interactions entre les virus et les biofilms dans le contexte d'un réseau d'eau potable et d'autre part à évaluer des protocoles de nettoyage sur des virus adsorbés sur des biofilms. Les données disponibles sur les propriétés de surface

des virus entériques étant souvent limitées à leurs points isoélectriques (Michen et Graule, 2010), elles ne permettent pas de prédire de façon précise leur adhésion sur un support, et donc *a fortiori* sur une structure aussi complexe qu'un biofilm. Nous avons choisi de mener cette étude en utilisant des virus modèles, les bactériophages ARN-F spécifiques. Trois d'entre eux - MS2, GA et Qβ - qui présentent des propriétés de surface différentes (Langlet *et al.*, 2008) et qui sont fréquemment proposés comme modèles des virus entériques pathogènes ont été utilisés dans cette étude. Les phages ARN F-spécifiques constituent des modèles de choix pour l'étude des virus pathogènes de par leurs similitudes physiques et biologiques avec les virus entériques pathogènes. Leur manipulation ainsi que leur multiplication en laboratoire sont relativement faciles (Norme ISO, 1995) et ils sont détectables de façon spécifique par biologie moléculaire (RT-PCR temps réel) (Ogorzaly et Gantzer, 2006).

Les études *in situ* étant difficiles à mettre en œuvre, les expérimentations ont été effectuées dans des réacteurs. Le réacteur à disque rotatif a été mis au point spécifiquement pour cette étude et permet de travailler dans des conditions maîtrisées de flux d'eau laminaire. Le réacteur Propella™ a déjà été utilisé pour étudier les biofilms (Grandjean *et al.*, 2005; Lethola *et al.*, 2007). Ces réacteurs étaient reliés au réseau de distribution d'eau de la Communauté Urbaine du Grand Nancy (CUGN) pour se placer dans des conditions proches de celles retrouvées *in situ* dans un système de distribution d'eau potable.

Nos travaux se sont alors orientés selon deux principaux axes de recherche :
Le premier axe a porté sur l'étude de l'adsorption phagique sur des surfaces afin d'évaluer l'importance relative de différents paramètres. En effet, nous avons choisi d'explorer l'influence des propriétés de surface des phages sur leur adsorption aux surfaces par l'utilisation de trois bactériophages présentant des différences notamment en termes d'hydrophobicité (Langlet *et al.*, 2008; Dika *et al.*, 2013). L'influence de la colonisation des surfaces par des biofilms d'eau potable sur la sorption phagique a également été étudiée par comparaison de la sorption phagique entre des surfaces dites "abiotiques" et colonisées par des biofilms de 60 jours. Enfin, l'influence des conditions l'hydrodynamiques a également été analysée.

Le second axe impliquait l'évaluation de l'efficacité de protocoles de nettoyage sur les phages adsorbés sur les surfaces ainsi que sur les bactéries constituant le biofilm. L'utilisation de réacteurs Propella™ a tout d'abord permis de comparer l'effet de la chloration sur les phages en suspension dans l'eau mais également sur ceux adsorbés sur les biofilms. L'originalité de cette étude a été d'utiliser lors de ce second axe, le réacteur à disque rotatif

afin d'appliquer un nettoyage hydrodynamique, c'est-à-dire, d'augmenter les contraintes hydrodynamiques sur la paroi du réacteur. Ce nettoyage hydrodynamique pouvant ou non être combiné à une chloration de l'eau.

## I. Etude de l'adsorption phagique sur les surfaces

Pour se répliquer, les phages ARN F-spécifiques doivent être en contact avec une concentration suffisante de leurs bactéries hôtes (*E. coli, Salmonella*…) et ces dernières doivent exprimer à leur surface un pili sexuel. La probabilité de rencontre entre les phages et de telles bactéries dans l'eau potable est faible. De plus, notre système est maintenu à 20 ± 1°C et l'expression du pili sexuel n'a été observée que pour des températures supérieures à 25°C (Jofre, 2007). Dans ces conditions, nous pouvons considérer que la multiplication des phages inoculés dans l'eau des réacteurs est peu probable dans nos conditions expérimentales. Les phages détectés sur les surfaces correspondent donc à des phages initialement inoculés dans l'eau et ayant adhéré sur les surfaces. Enfin, pour s'assurer que les phages détectés sont bien adsorbés sur les surfaces, chaque coupon prélevé est rincé dans de l'eau du réseau dépourvue de phages avant analyse. De par leur taille, qui est inférieure à 100 nm pour la majorité des virus entériques, et l'absence de multiplication dans nos conditions de travail, ces particules peuvent être considérées comme des biocolloïdes inertes dans l'eau (Michen et Graule, 2010).

### 1. Analyse des biofilms d'eau potable de 60 jours

La capacité des bactéries à former des biofilms sur des surfaces va dépendre des propriétés de surface des microorganismes et des matériaux, notamment en termes d'hydrophobicité, de rugosité et de charge de surface. Dans nos travaux, deux matériaux ont été utilisés, le PEHD et l'inox 316L. La densité cellulaire mesurée sur PEHD est supérieure d'environ une unité logarithmique par rapport à celle mesurée sur l'inox 316L. Le caractère hydrophobe du PEHD est plus marqué que celui de l'inox 316L, par contre l'inox 316L exprime une charge négative plus importante que le PEHD (Faille *et al.,* 2002). Nos résultats sont en accord avec les travaux de Faille *et al.* (2002) qui ont montré qu'*E. coli* adhère en plus grande quantité sur des surfaces en PEHD par comparaison avec l'inox 316 L. Teixeira and Oliveira, (1999) ont étudié l'adsorption de bactéries sur quatre matériaux, le polypropylène, le polychlorure de vinyle, le polyéthylène haute densité et le polyméthacrylate de méthyle, du plus hydrophobe au moins hydrophobe. Les auteurs observent une corrélation positive

entre le nombre d'*Alcaligenes denitrificans* adhérées sur ces matériaux et l'hydrophobicité de ceux-ci. Ces résultats suggèrent une plus forte capacité des bactéries à adhérer et à se multiplier sur les surfaces les plus hydrophobes. Les densités bactériennes mesurées sur les surfaces en PEHD et en inox lors de nos expérimentations sont respectivement de $2{,}5.10^7 \pm 1{,}9.10^7$ et $3{,}5.10^6 \pm 1{,}5.10^6$ bactéries/cm$^2$, plus de 95% des bactéries présentent une membrane intègre et environ 0,1% sont cultivables. Ces résultats sont en accord avec les observations effectuées sur des biofilms d'eau potable décrites dans la littérature (Manuel *et al.*, 2007 ; Mathieu *et al.*, 2009). Aucune différence significative de densité bactérienne sur les surfaces n'a été observée entre les différents gradients pariétaux de vitesse étudiés (de 65 à 1640 $s^{-1}$). Ceci peut être expliqué par le fait que les mesures de densité ont été effectuées pour des biofilms de 60 jours. En effet, Paris *et al.* (2007) ont montré que le gradient pariétal de vitesse (35 à 194 $s^{-1}$), influence à la fois l'architecture et la densité cellulaire dans les premiers jours de formation du biofilm. Les différences observées en fonction du gradient pariétal tendraient à diminuer avec le temps puisque les auteurs ont mesuré une densité bactérienne à la surface plus homogène entre les différents gradients pariétaux de vitesse après 600 heures d'expérimentation. L'âge des biofilms formés pour notre étude est de 60 jours (1440 heures), correspondant à une phase de croissance lente pour laquelle Paris *et al*. (2007) n'observent plus de différence de densité bactérienne entre les différents gradients pariétaux étudiés.

## 2. Influence des propriétés physico-chimiques des surfaces et des phages

### (i) Influence de l'état de surface sur l'adsorpion phagique

Des expérimentations ont été effectuées, en petits volumes (20 mL), afin de comparer l'adsorption phagique sur des surfaces en PEHD « abiotiques» ou colonisées par des biofilms de 60 jours, en fonction de la concentration en phage dans l'eau à 20 ± 1°C. Les concentrations en phages mesurées sur les deux types de surfaces augmentent de façon log-linéaire avec les concentrations en phages dans l'eau pour des concentrations comprises entre $2{,}1.10^3$ et $3{,}2.10^7$ éq UFP/mL. Syngouna et Chrysikopoulos (2010) ont observé des résultats similaires, à 25°C, concernant l'adsorption du phage MS2 en fonction de sa concentration dans le milieu, sur deux types d'argiles, connues pour exprimer des propriétés de surface différentes. Les auteurs ont calculé d'après leurs résultats, les paramètres correspondant à des isothermes de Freundlich. Ils ont trouvé des valeurs de k, correspondant à l'ordonnée à l'origine de la droite, de 0,041 et 0,084 pour la kaolinite et la bentonite

respectivement. Ils en ont déduit que l'affinité du phage MS2 pour la bentonite est supérieure à celle pour la kaolinite. Dans notre cas, les valeurs de k des phages MS2 et Qβ sont plus élevées en présence de PEHD "abiotique" (0,003 et 0,12, respectivement) par comparaison au PEHD colonisé par un biofilm de 60 jours (0,001 et 0,05 respectivement). Par contre, le bactériophage GA ne semble pas montrer de différence d'affinité entre des surfaces en PEHD "abiotiques" ou colonisées par un biofilm. La présence d'un biofilm de 60 jours modifierait donc suffisamment les propriétés physico-chimiques du PEHD pour modifier l'affinité des phages MS2 et Qβ pour les surfaces. Afin de confirmer ces observations, des cinétiques d'adsorption phagiques sur des surfaces de PEHD "abiotiques" ou colonisées par des biofilms de 60 jours ont été effectuées au sein des réacteurs à disque rotatif pour lesquels aucune vitesse de rotation n'était appliquée. Comme observé précédemment, les concentrations en phages MS2 et Qβ sont significativement diminuées lorsque le PEHD est colonisé par un biofilm de 60 jours. Par contre, la concentration en phage GA est augmentée en présence de biofilm. Les travaux d'Helmi *et al.*, (2008) montrent que la composition et l'architecture des biofilms influencent l'adsorption virale. Ces auteurs ont comparé les concentrations de poliovirus infectieux adsorbés, après une heure de contact, sur des surfaces colonisées par un biofilm d'eau potable de sept mois et un biofilm d'eau usée de deux semaines. La concentration virale mesurée sur les biofilm d'eau usée (2,6 ± 0,1 log particules infectieuses/cm$^2$) était significativement supérieure à celle mesurée sur les biofilms d'eau potable (1,5 ± 0,2 log particules infectieuses/cm$^2$).

**(ii) Influence des propriétés interfaciales des virus sur l'adsorpion phagique**

Sur des surfaces en inox 316L ou en PEHD "abiotiques" la séquence d'adhésion observée est de type MS2 < GA < Qβ, Qβ étant le phage détecté en plus grande quantité sur les surfaces. Lorsque les surfaces sont colonisées par un biofilm de 60 jours la séquence d'adsorption est modifiée et devient MS2 < Qβ < GA. Langlet *et al.* (2008) ont évalué l'hydrophobicité des phages MS2, GA et Qβ à partir de mesures d'agrégation à forte force ionique (100 mM) et ont conclu que le bactériophage MS2 serait le moins hydrophobe et que la séquence d'hydrophobicité serait de type MS2 < Qβ < GA. Certaines études ont montré que les biofilms seraient composés de domaines hydrophobes pouvant influencer l'adsorption des particules colloïdales en suspension (Zita et Hermansson, 1997). Suivant cette hypothèse, nos travaux montrent que le bactériophage GA, le plus hydrophobe, adsorbe sur les biofilms en plus grande quantité et que le moins hydrophobe, le phage MS2, s'adsorbe en moins grande quantité. En dehors de l'hydrophobicité, la charge de la capside

virale est également un paramètre influençant l'adhésion. Le point isoélectrique (*pI*) est un paramètre couramment utilisé pour définir le signe de la charge exprimée par une particule virale (Dowd *et al.*, 1998; Michen et Graule, 2010). Le p*I* peut être déterminé par des mesures de mobilité électrophorétique et correspond à la valeur de pH pour laquelle celle-ci est nulle. Nos expérimentations ont été réalisées à un pH de 8,1 ± 0,2 et le point isoélectrique des phages étudiés est bas, compris entre 3,9 pour le phage MS2 et 1,9 pour le phage Qβ (Langlet *et al.* 2008). Ces phages se comporteraient donc comme des particules colloïdales chargées négativement lors des expérimentations. Dans l'étude de Langlet *et al.* (2008), l'analyse des courbes de mobilité électrophorétique des bactériophages MS2, GA et Qβ permet de faire l'hypothèse qu'à pH 7, dans du $NaNO_3$, ces trois phages expriment une charge négative à peu près équivalente à leur surface. Ces données ont été confirmées récemment par les travaux de Dika *et al.* (2013). Helmi *et al.* (2008) ont étudié l'adsorption des phages MS2 et ϕX174 ainsi que du poliovirus, présentant des points isoélectriques différents, sur des surfaces colonisées par des biofilms d'eau potable de sept mois. La concentration en phage MS2 mesurée sur les surfaces ($2{,}0 \pm 0{,}2$ log particules infectieuses/$cm^2$) était significativement supérieure aux concentrations en phage ϕX174 et en poliovirus, considérées comme équivalentes (respectivement 1,8 ± 0,1 et $1{,}5 \pm 0{,}2$ log particules infectieuse/$cm^2$). Bien qu'il soit à présent connu que le point isoélectrique ne décrit en rien une densité de charge de surface, les auteurs avaient noté que la séquence d'adsorption observée pour les différents virus pouvaient être reliée à leur point isoélectrique, respectivement de 3,9, 6,8 et 6,6 pour les phages MS2 et ϕX174 et le poliovirus. Dans nos travaux, quelles que soient les conditions, le bactériophage MS2 est systématiquement le phage mesuré en plus faible quantité sur les surfaces. Des études ont souligné les faibles propriétés adhésives du phage MS2. Ce phage est par conséquent utilisé pour l'évaluation, d'un point de vue virologique, de procédés de traitement de l'eau basés sur l'adsorption, tels que la filtration membranaire (Schijven et Hassanizadeh, 2000; van Voorthuiezn *et al.*, 2001; Charles *et al.*, 2008; Shirasaki *et al.*, 2009). En dehors des propriétés de surface des phages, la capacité des particules à s'agréger peut également avoir des conséquences sur l'adsorption aux surfaces. Ainsi, les différences de densité surfacique entre les phages MS2, GA et Qβ observées dans notre étude pourraient être la résultante d'une agrégation virale ayant pour conséquence une limitation de la diffusion des agrégats vers la surface par rapport aux particules isolées. Certains auteurs ont analysés la taille des bactériophages ARN F-spécifiques MS2, GA et Qβ et certains ont montré la capacité notament du phage GA a être agrégé dès sa production (Langlet *et al.*, 2008) tandis que d'autres ont montré qu'il serait sous

forme isolée (Dika *et al.*, 2013). Pour cette raison, la taille des phages a été analysée pour des suspensions phagiques ne contenant qu'un seul génogroupe ou un mélange des trois phages dans de l'eau du réseau. Les mesures effectuées indiquent que les bactériophages MS2, GA et Qβ se trouvent majoritairement sous forme de particules isolées dans nos conditions expérimentales. La taille ne peut donc pas expliquer les différences d'adsorption observées entre les trois phages, il semble plus évident que ces différences soient dues aux différences de propriétés de surface des particules.

## 3. **Influence des conditions hydrodynamiques appliquées dans le réacteur**

Lors de cette étude, des expérimentations ont été effectuées en conditions hydrostatiques, c'est-à-dire sans aucun flux d'eau sur la paroi, ainsi qu'en conditions hydrodynamiques où différentes vitesses de circulation d'eau ont été appliquées. Que ce soit en conditions hydrostatiques ou hydrodynamiques, le suivi des concentrations en phages sur les surfaces montre une augmentation rapide du nombre de particules virales détectées suivie d'une stabilisation. L'application d'un flux d'eau sur les surfaces a pour conséquence d'augmenter d'environ une unité logarithmique, la densité surfacique en phage par rapport à des conditions hydrostatiques. Il est à noter également que la concentration moyenne en phages mesurée sur les surfaces en conditions hydrostatiques correspond à la concentration mesurée en conditions hydrodynamiques après deux heures de contact. Les phages pouvent être considérés comme des colloïdes, à ce titre, ils ne sont pas soumis aux forces exercées par la gravité. Le transport des colloïdes en milieu aqueux implique donc le mouvement Brownien en conditions hydrostatiques, auquel s'ajoute le transfert convectif lorsque l'eau est en mouvement (Bird *et al.*, 2007). Nos résultats confirment cette hypothèse. Ainsi, le mouvement Brownien serait prépondérant en conditions hydrostatiques. L'implication du transfert convectif en conditions hydrodynamiques aurait pour conséquence une augmentation du transport les particules phagiques vers la surface et l'augmentation du nombre de phages adhérés sur les surfaces. Ce phénomène a déjà été observé dans certaines études pour des bactéries (Manuel *et al.*, 2007) et pour des virus (Syngouna et Chrysikopoulos, 2010). Syngouna et Chrysikopoulos (2010) ont observé des concentrations en phage MS2, adhérés sur de l'argile, plus de deux fois supérieures en conditions hydrodynamiques par rapport aux conditions hydrostatiques.

Six gradients pariétaux de vitesses compris entre 120 et 1640 $s^{-1}$, correspondant à différentes vitesses d'eau sur les parois ont été appliquées en conditions hydrodynamiques.

Lors de nos travaux, aucune différence d'adhésion significative n'a été observée pour les différents gradients étudiés. Si l'on prend en considération le coefficient de diffusion des phages, les gradients pariétaux de vitesse appliqués, la viscosité de l'eau ainsi que l'erreur sur la mesure, la différence entre 120 et 1640 $s^{-1}$ ne devaient pas permettre de conduire à des différences significatives dans les niveaux d'adsorption phagique.

*En conclusion, dans l'environnement hydrique, les virus entériques peuvent être considérés comme des biocolloïdes inertes présentant une charge globale de surface négative (Michen et Graule, 2010). Selon la littérature, le ratio entre le nombre de particules virales adsorbées (/cm²) et le nombre de virus en suspension dans l'eau (/mL) montre de fortes variations en fonction des conditions expérimentales. A titre d'exemple, ce ratio est compris entre 0,0001% (Langmark et al., 2005) pour le phage 28B sur un biofilm de 8 semaines et 70% (Quignon et al., 1997) pour du poliovirus sur un biofilm de quatre semaines, après 24 heures de contact. Dans notre étude, le taux d'adhésion n'a pas pu être calculé avec précision du fait que l'adhésion phagique était différente sur biofilm et surfaces « abiotiques » et que les deux types de coupons étaient présents simultanément dans le réacteur. Cependant, elle a pu être estimée à environ 1% des phages initialement inoculés dans l'eau des réacteurs. Peu d'études ont été publiées sur l'accumulation de virus entériques sur les réseaux de distribution d'eau (Quignon et al., 1997; Storey et Ashbolt, 2001 et 2003; Helmi et al., 2008; Langmark et al., 2005). Il apparaît tout de même que l'adsorption de particules virales est un phénomène rapide qui fait intervenir les interactions électrostatiques et hydrophobes entre les surfaces et les particules. Le phénomène d'adhésion est gouverné par plusieurs paramètres tels que la taille des particules, les conditions hydrodynamiques du milieu ainsi que les caractéristiques physico-chimiques du milieu, des surfaces et des particules (Van Voorthuitzen et al., 2001; Faille et al., 2002; Schaldach et al., 2006; Shani et al., 2008; Attini et al., 2010). D'après les résultats de nos travaux, la présence d'un biofilm sur les surfaces, ne modifierait pas ou augmenterait l'affinité du phage GA et diminuerait l'affinité des phages Qβ et MS2 pour le PEHD. Le bactériophage MS2 est le phage le moins hydrophobe, il est également celui qui est mesuré en moins grande quantité sur les surfaces quelles que soient les conditions appliquées. Enfin, la mise en mouvement de l'eau dans les réacteurs (conditions hydrodynamiques) a pour conséquence l'augmentation de l'adsorption des trois bactériophages sur les surfaces en inox 316L et PEHD colonisées ou non par des biofilms.*

## II. Evaluation de protocoles de nettoyage sur les biofilms et les phages

Lors de l'évaluation de l'efficacité de protocoles de nettoyage impliquant des oxydants, il est préférable, lorsque cela est possible, de prendre comme référentiel

l'infectiosité virale. La détection des virus infectieux adsorbés sur les biofilms, nécessite une méthode de récupération des virus préservant leur intégrité. Pour ces travaux nous avons utilisé le protocole d'élution-concentration mis au point et optimisé par Helmi *et al.* (2010). Les bactériophages utilisés lors de ces travaux permettent l'utilisation de méthodes de quantification de leur génome, mais également des phages infectieux. La comparaison des valeurs d'abattements en génome et en infectiosité virale montrent que ces deux paramètres présentent une sensibilité identique à l'hypochlorite de sodium dans nos conditions de travail. Nuanualsuwan et Cliver (2003) ont montré que la dégradation du génome et la perte d'infectiosité d'un poliovirus 1 sous l'action d'hypochlorite de sodium, n'est pas significativement différente. L'action du chlore permettrait l'élimination des virus infectieux et dégraderait presque simultanément le génome viral. Ceci est loin d'être généralisable car très souvent des différences sont observées entre le génome phagique et les particules infectieuses en fonction de différents oxydants (Simonet et Gantzer, 2006), mais surtout en l'absence d'oxydants. En effet, des études de persistance réalisées sans utilisation d'agents oxydants ont montré que l'inactivation virale est plus rapide que la dégradation du génome. Ainsi, Helmi *et al.* (2008) ont constaté qu'au sein d'un biofilm, l'inactivation des particules virales était plus rapide que la dégradation de leur génome, suggérant que les techniques de biologie moléculaire pouvaient surestimer le risque de présence de virus infectieux. Lors de la comparaison de l'inactivation et de la dégradation du génome de virus entériques (poliovirus, calicivirus félin) dans de l'eau minérale, Gassilloud *et al.* (2003) ont également observé une persistance plus importante du génome. En effet, en l'absence d'oxydants, la capside virale subirait une dégradation importante et très rapide, tandis que le génome viral pourrait persister et être détecté plus longtemps.

Avant d'analyser l'efficacité de protocoles de nettoyage par augmentation des contraintes hydrodynamiques sur la paroi, nous avons voulu vérifier si les bactériophages adhérés aux surfaces avaient la capacité à retourner dans la phase eau, sans aucune modification hydrodynamique. Pour cela un disque rotatif colonisé par un biofilm de 60 jours, sur lequel des phages ont été adsorbés, est mis en contact avec de l'eau dépourvue de phages. Après trois heures, nous avons observé une diminution des concentrations phagiques sur les surfaces et détecté des bactériophages dans l'eau. Ces résultats sont en accord avec les observations de Helmi *et al.* (2008). En effet ces auteurs ont mis en contact des biofilms d'eau potable de sept mois enrichis en poliovirus et en phage ϕX174 avec une eau dépourvue de virus, en conditions laminaires, sans stress hydrodynamique. Après trois

jours, une diminution de la concentration particules infectieuses au sein du biofilm est observée pour les deux virus et ceux-ci sont à nouveau mesurés dans l'eau à des concentrations de 2,0 et 3,0 log particules infectieuses/mL. Les particules virales peuvent donc être transférées des surfaces vers la phase eau selon les simples principes d'équilibre. Dans notre cas, cela correspond à un abattement compris entre 0,2 et 0,6 $log_{10}$ éq UFP/$cm^2$.

## 1. Etude de l'efficacité d'un nettoyage hydrodynamique

L'étude de l'efficacité d'un nettoyage hydrodynamique a été effectuée en disque rotatif sur des biofilms de 60 jours contaminés par les bactériophages MS2, GA et Qβ. Le principe a consisté à augmenter la vitesse de rotation du disque en conditions de flux d'eau laminaire et à mesurer l'arrachage des bactéries composant le biofilm, ainsi que des bactériophages adsorbés. L'application d'un nettoyage hydrodynamique conduit à un abattement en bactéries composant le biofilm de 0,5 $log_{10}$ cellules/$cm^2$ et un abattement en phage compris entre 0,03 et 0,6 $log_{10}$ éq UFP/$cm^2$ ce qui représente 60% des bactéries du biofilm et 30% des phages adsorbés. A notre connaissance aucune autre étude ne fait une telle analyse concernant l'évaluation d'un nettoyage hydrodynamique en conditions laminaires sur des virus adsorbés à un biofilm. Toutefois, Helmi *et al.* (2008) ont effectué un nettoyage hydrodynamique en passant de conditions de flux d'eau laminaire à turbulent et ont observé un relargage des virus initialement adsorbés sur le biofilm dans l'eau pour le poliovirus. En effet, avant l'application du stress hydrodynamique aucun poliovirus n'était détecté dans l'eau alors qu'après application d'un flux d'eau turbulent, 3,6 $log_{10}$ copies de génome/mL ont été mesurées dans l'eau du réacteur. Ces auteurs ont également essayé d'analyser si le poliovirus était encore adsorbé aux fragments de biofilm relargués dans l'eau. Pour cela, après l'application du nettoyage hydrodynamique, ils ont centrifugé des échantillons d'eau à une vitesse permettant la formation d'un culot bactérien mais pas des virus. Les auteurs ont mesuré 68 fois plus de poliovirus dans le culot que dans le surnageant. Ils en ont déduit que la majorité des virus relargués dans l'eau étaient des particules virales adsorbées à des portions de biofilm. Abe *et al.* (2011 et 2012) ont analysé par microscopie à force atomique (AFM), un biofilm d'eau potable formé sur du verre et évalué l'efficacité d'un nettoyage hydrodynamique en conditions de flux d'eau laminaire sur les bactéries du biofilm. Les forces de cohésion de biofilms d'eau potable de quatre à douze semaines formés sur du verre ont été mesurées par AFM à l'aide d'une sonde balayant la surface. Ils ont montré que le biofilm serait constitué d'amas stratifiés avec un cœur très cohésif (Abe *et al.*,

2011 et 2012). Ces auteurs ont fait des tentatives de nettoyage par augmentation des contraintes hydrodynamiques pour des gradients pariétaux de vitesse compris entre 1800 et 27000 $s^{-1}$. Ils ont montré que la biomasse se décrochant représentait la partie superficielle, la moins cohésive, des amas bactériens et que le nettoyage hydrodynamique provoquait une modification de l'architecture du biofilm avec des phénomènes d'étalement. Un nettoyage à l'aide de la sonde d'AFM a également été effectué et les forces appliquées par la sonde pour détacher l'intégralité des amas étaient de l'ordre de 25 kPa alors que les forces de cisaillement pouvant être appliquées en réseau de distribution sont de l'ordre de 5 à 10 Pa. Ces éléments expliquent pourquoi l'abattement bactérien obtenu par un nettoyage hydrodynamique reste limité et par voie de conséquence l'abattement des phages également.

## 2. Etude de l'efficacité d'un nettoyage par chloration

La désinfection de l'eau de distribution par des oxydants, notamment le chlore est l'une des principales techniques utilisées à l'heure actuelle. La chloration a été réalisée par ajout d'hypochlorite de sodium dans l'eau des réacteurs à des concentrations initiales de 4 à 5 mg/L. De telles doses peuvent être appliquées dans des réseaux de distribution dans un objectif de nettoyage ponctuel. La dose résiduelle de chlore habituellement retrouvée dans un réseau, afin de maintenir la qualité microbiologique de l'eau, est plutôt de l'ordre de 0,1 mg/L de chlore. Il est difficile de prédire l'efficacité d'un traitement de chloration vis-à-vis des microorganismes étant donné le grand nombre de paramètres pouvant influencer l'efficacité du traitement tels que la température, la présence de matière organique en suspension ou le pH de l'eau. Il en ressort tout de même que deux paramètres sont importants lors de la chloration, il s'agit du temps de contact et de la concentration en chlore initialement inoculée dans l'eau. Ces deux paramètres sont couramment combinés pour donner une valeur appelée C.t exprimée en mg.min/L. C'est à partir de ce paramètre et en analysant les résultats d'études effectuées dans des conditions de température, de pH et de type d'eau similaires qu'il est possible de comparer l'efficacité de désinfectants. Ainsi, selon la littérature, les bactériophages ARN F-spécifiques, et plus particulièrement le bactériophage MS2, présentent une résistance à la chloration inférieure au Coxackievirus B5 mais supérieure aux *Caliciviridae* (norovirus murins et félins) en termes d'inactivation. La sensibilité des phages ARN F-spécifiques au chlore est comparable à celle du poliovirus ou des échovirus, ils peuvent ainsi constituer des modèles d'étude de virus entériques pathogènes dans le cadre de la désinfection en milieu hydrique.

L'agrégation des particules virales peut influencer la diffusion des virus mais également jouer un rôle protecteur face aux traitements de désinfection, notamment par chloration. Ainsi, Thurston-Enriquez *et al.* (2003) ont montré que le temps nécessaire pour obtenir un abattement viral de 2 $log_{10}$ était 31 fois plus élevé pour des particules de calicivirus félin (FCV) agrégées et 2,8 fois plus élevé pour des poliovirus-1 agrégés en comparaison avec des suspensions de virus isolés. Les mesures de taille effectuées en amont de ces expérimentations ont permi de vérifier que nos résultats seraient obtenus pour des particules phagiques isolées, aucun effet protecteur vis-à-vis de la chloration n'est attendu à ce niveau.

**(i) Effet de la chloration sur les virus présents dans l'eau.**

Les bactériophages sont introduits dans l'eau des réacteurs (Propella™ et à disque rotatif) à une concentration initiale théorique de $10^6$ UFP/mL. L'introduction de 4 à 5 mg/L d'hypochlorite de sodium entraîne une inactivation totale des phages et une diminution importante de la concentration en génome viral dans les deux types de réacteurs après 5 minutes de contact. Après 30 minutes de chloration plus aucun phage infectieux, ni aucune copie de génome ne sont détectés dans l'eau. La valeur de C.t lors de ces expérimentations est de 20 à 25 mg.min/L. Ainsi, ce traitement par chloration engendre un abattement d'au moins 6,5 $log_{10}$ pour les phages infectieux et 4,9 $log_{10}$ pour le génome viral. La comparaison avec les données de la littérature est délicate du fait des différences de conditions expérimentales (température, pH, concentrations virales initiales, concentrations en oxydant, durée). Toutefois, nos résultats sont en accord avec les valeurs obtenues par Schaper *et al.* (2002) qui observent un abattement de 5,9 $log_{10}$ en bactériophages ARN F-spécifiques infectieux pour un C.t de 12 mg.min/L. Shin et Sobsey (2008) obtiennent un abattement du génome viral de MS2 de 4 $log_{10}$ pour un C.t de 3,3 mg.min/L. Les valeurs de C.t appliquées dans nos expérimentations correspondent à un traitement de chloration destiné à lutter contre une contamination accidentelle du réseau. Elles entraînent rapidement une dégradation totale des phages infectieux ainsi que du génome viral pour les phages en suspension dans l'eau.

**(ii) Effet de la chloration sur les virus adsorbés sur les surfaces.**

L'action de l'hypochlorite de sodium a également été évaluée pour les bactériophages adhérés au PEHD colonisé par un biofilm. Pour des C.t de 100 à 150 mg.min/L, l'abattement atteint alors 3,1 $log_{10}$ pour le génome et 2,8 $log_{10}$ pour l'infectiosité en réacteur Propella™. Les

abattements obtenus au sein des réacteurs à disque tournant sont de 2,3 à 3,0 $log_{10}$ pour les phages infectieux et de 1,9 à 2,9 $log_{10}$ pour le génome phagique. Ces résultats montrent que l'abattement obtenu sur des phages adhérés sur une surface colonisée par un biofilm d'eau potable est moins important que celui obtenu sur des phages en suspension dans l'eau. Quignon *et al.* (1997) montrent une diminution des poliovirus 1 infectieux plus importante dans l'eau que dans un biofilm d'eau potable de sept mois.

Nous avons également voulu évaluer si la fragilisation préalable du biofilm par un choc oxydant à l'aide d'hypochlorite de sodium, permettait d'augmenter l'efficacité du nettoyage hydrodynamique. L'application d'un stress hydrodynamique au biofilm, en présence de chlore, conduit à des abattements de 0,5 $log_{10}$ pour les bactéries et jusqu'à 0,6 $log_{10}$ pour les phages infectieux ainsi que pour le génome. Les abattements sont comparables à ceux observés lors d'un simple nettoyage hydrodynamique, le chlore n'améliore donc pas l'efficacité d'un nettoyage hydrodynamique. Globalement, les protocoles de nettoyage impliquant la chloration sont plus efficaces, sur les phages adsorbés sur les biofilm, que les protocoles impliquant l'hydrodynamique.

Enfin, la détection des bactériophages par biologie moléculaire permet de différencier les trois bactériophages MS2, GA et Qβ, il a ainsi été possible de suivre individuellement chaque bactériophage lors de la chloration. Nos résultats montrent que les abattements après 30 minutes de chloration à 5 mg/L (C.t = 150 mg.min/L) ne diffèrent pas entre MS2 et Qβ. En effet, l'abattement est compris entre 2,8 et 2,9 $log_{10}$ pour ces deux phages. Schaper *et al.* (2002) avaient quand à eux montré une résistance du phage MS2 plus importante que celle du phage Qβ face à un traitement à base d'hypochlorite de sodium.

*Le nettoyage hydrodynamique, c'est-à-dire par augmentation de la vitesse du flux d'eau sur les parois, de surfaces colonisées par des biofilms a une efficacité limitée à la fois sur les bactéries constituant le biofilm mais également sur les éventuels virus adsorbés au sein de cette biomasse. En présence d'une forte concentration en chlore dans l'eau (4 à 5 mg $Cl_2$/L) les phages infectieux en suspension ($10^6$ UFP/mL) sont totalement éliminés en moins de cinq minutes et le génome phagique en moins de trente minutes. Par contre, sur les surfaces, après 90 minutes de chloration et malgré un résiduel de chlore de l'ordre de 1,9 mg $Cl_2$/L, environ $10^6$ bactéries/$cm^2$ sont toujours présentes et plus de $10^2$ bactériophages infectieux/$cm^2$ sont toujours détectés sur les surfaces. Si l'on considère l'information donnée par la détection du génome, les bactériophages en suspension dans l'eau sont altérés au minimum 30 fois plus rapidement que ceux adsorbés sur le biofilm lors d'un traitement par chloration. Ceci démontre l'effet protecteur que constitue cette biomasse pour des microorganismes*

*d'intérêt sanitaire tels que les virus, face aux protocoles de nettoyage mis en œuvre. Les particules virales adsorbées sur les biofilms pourraient survivre au sein de cette biomasse, être protégées des opérations de décontamination et ainsi être relarguées dans l'eau, en dehors d'épisodes de contamination, suite à des décrochements de portions de biofilm, ou par les simples principes d'équilibre.*

# *Conclusion et Perspectives*

Les données épidémiologiques soulignent l'implication des virus entériques dans les maladies d'origine hydrique. Or les paramètres microbiologiques du contrôle sanitaire sont exclusivement de nature bactérienne et le comportement des particules virales dans le milieu hydrique reste largement méconnu. Cette étude visait à apporter des informations concernant l'adhésion de particules virales sur des surfaces, puis à comparer l'efficacité de traitements par chloration combinés ou non à un stress hydrodynamique, sur les virus adhérés aux surfaces et en suspension dans l'eau. Les expérimentations ont été conduites à l'aide de réacteurs alimentés par de l'eau de distribution (Communauté Urbaine du Grand Nancy). L'utilisation de ces réacteurs a permis de maîtriser quelques paramètres tels la température, les matériaux, l'âge du biofilm, la concentration virale inoculée et surtout les conditions hydrodynamiques appliquées. Des bactériophages ARN F-spécifiques (MS2, GA et Qβ) ont été utilisés comme modèles des virus entériques pathogènes, ils présentent de nombreuses similitudes structurales avec ces derniers et leurs propriétés de surface ont fait l'objet de plusieurs études.

Nos résultats ont montré que la présence d'un biofilm d'eau potable de 60 jours entraîne une modification de l'affinité des phages pour les surfaces. Ceci peut être expliqué par la modification des propriétés de surface des matériaux suite à la formation du biofilm à la surface des réacteurs. L'affinité des phages MS2 et Qβ est diminuée lorsque les surfaces sont colonisées par un biofilm, alors que l'affinité du phage GA est inchangée ou augmentée. Les bactériophages utilisés dans ces expérimentations sont des virus nus de taille identique, mais ils présentent des propriétés de surface différentes avec notamment une séquence d'hydrophobicité de type MS2 < Qβ < GA, MS2 étant le phage le moins hydrophobe. Le classement de ces phages en fonction de leurs concentrations mesurées sur les surfaces colonisées par des biofilm de 60 jours est identique, le phage GA étant mesuré en plus grande concentration et le phage MS2 en plus faible concentration. Ceci souligne l'importance des propriétés de surface des particules virales dans leur adhésion aux surfaces et suggère une adsorption des particules phagiques sur les domaines hydrophobes du biofilm. L'utilisation de réacteurs permettant la maîtrise des conditions hydrodynamiques a également permis d'observer une concentration phagique augmentée en conditions hydrodynamiques par rapport aux conditions hydrostatiques soulignant ainsi l'implication de deux types de transports des phages dans l'eau. Le mouvement Brownien serait impliqué en conditions hydrostatiques, auquel s'ajouterait le transfert convectif en conditions

hydrodynamiques, ce qui peut expliquer le plus grand nombre de phages détectés sur les surfaces en présence d'un flux d'eau. Ainsi, un transfert des virus vers les surfaces colonisées ou non par des biofilms est possible selon un coefficient de partage qui reste à déterminer et qui dépend entre autre des propriétés de surface des virus, des matériaux ainsi que des conditions hydrodynamiques.

Un nettoyage par application d'un stress hydrodynamique sur des surfaces colonisées par des biofilms de 60 jours sur lesquelles des bactériophages étaient adsorbés, conduit à une faible élimination à la fois des bactéries et des phages, de l'ordre de 0,5 $\log_{10}$. Les conséquences d'un traitement de désinfection de l'eau des réacteurs par chloration ont été étudiées pour les bactériophages en suspension dans l'eau et ceux adhérés aux surfaces. L'infectiosité des bactériophages et la présence de leur génome ont été suivies avant et après chloration. La quantité de chlore introduite dans le système (4 à 5 mg/L) a conduit à une inactivation complète des bactériophages infectieux présents dans l'eau dès 5 minutes de contact. Le génome viral n'était plus détecté après 30 minutes. Parallèlement, les bactériophages adhérés sur les biofilms ont bénéficié d'un effet protecteur puisque des phages infectieux ont été retrouvés après 90 minutes de chloration alors que la quantité résiduelle de chlore dans l'eau était d'au moins 1,9 mg/L. Si l'on considère l'information donnée par la détection du génome, les bactériophages en suspension dans l'eau sont altérés au minimum 30 fois plus rapidement que ceux adsorbés sur le biofilm lors d'un traitement par chloration. La persistance des particules virales au sein des biofilms est possible et semble protéger les virus, ce qui peut poser problème en cas de relargage des virus. Il apparaît que la persistance des virus dans les biofilms, ainsi que leur relargage dans l'eau restent largement méconnus. En effet, les biofilms d'eau potable sont soumis à l'accumulation de particules à la surface et la multiplication cellulaire tendant à l'augmentation de la biomasse, mais aussi à l'érosion, l'arrachage et la prédation du biofilm par des protozoaires tendant à faire diminuer la biomasse. Il découle de cette dynamique que la biomasse composant le biofilm est susceptible d'accumuler les particules venant de la masse d'eau, puis de relarguer ces particules dans l'eau du réseau. Ainsi, en cas d'accumulation de microorganismes pathogènes, les traitements de désinfection ou d'élimination mis en place peuvent se montrer inefficaces avec un risque microbiologique maintenu en cas de relargage de microorganismes infectieux. Globalement, les protocoles de nettoyage par chloration montrent une efficacité plus importante que les protocoles impliquant une augmentation des contraintes hydrodynamiques et une chloration préalable au nettoyage hydrodynamique ne permet pas d'améliorer l'efficacité de celui-ci.

L'utilisation de pilotes simulant de mieux en mieux les conditions rencontrées par les virus dans les réseaux devrait permettre d'améliorer les connaissances sur ces différents points. Les progrès dans les techniques de détection et de quantification pourraient permettre l'utilisation de virus entériques pathogènes afin d'évaluer leur capacité d'adsorption ainsi que l'efficacité de protocoles de nettoyages. Enfin, l'étude de biofilms d'eau de distribution plus âgés pourrait apporter des informations quand à leur effet protecteur sur les virus adsorbés face aux méthodes de désinfection appliquées en réseau de distribution d'eau. L'étude de l'interaction de microorganismes présentant un intérêt sanitaire avec les biofilms présents à la surface des canalisations d'eau potable est un point clé préalable à l'amélioration des protocoles de nettoyage applicables en cas de pollution fécale d'un réseau.

# *Références Bibliographiques*

**Abad, F.X., Pinto, R.M., Diez, J.M. and Bosch, A.** (1994) Disinfection of human enteric viruses in water by copper and silver in combination with low levels of chlorine. Applied and Environmental Microbiology 60(7), 2377-2383.

**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.

**Abe, Y., Polyakov, P., Skali-Lami, S. and Francius, G.** (2011) Elasticity and physico-chemical properties during drinking water biofilm formation. Biofouling 27(7), 739-750.

**Abe, Y., Skali-Lami, S., Block, J.C. and Francius G.** (2012) Cohesiveness and hydrodynamic properties of young drinking water biofilms. Water Research 46(4), 1155-1166.

**Ackermann, H.W.** (2007) 5500 Phages examined in the electron microscope. Archives of Virology 152(2), 227-243.

**AFNOR T 90-038** (1987) Dosage du chlore libre et du chlore total par la méthode colorimétrique à la N,N′-diéthylphénylène-1,4 diamine. Page 313.

**AFNOR NF EN ISO 6222** (1999) Qualité de l'eau - Dénombrement des micro-organismes revivifiables - Comptage des colonies par ensemencement dans un milieu de culture nutritif gélosé.

**Ahimou, F., Paquot, M., Jacques, P., Thonart P. and Rouxhet, P.G.** (2001) Influence of electrical properties on the evaluation of the surface hydrophobicity of Bacillus subtilis. Journal of Microbiological Methods 45(2), 119-126.

**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 drinkingwater treatment plant. Environmental Science and Technology 40 (23), 7416-7422.

**Albinana-Gimenez, N., Miagostovich, M.P., Calgua, B., Huguet, J.M., Matia, L. and Girones, R.** (2009) Analysis of adenoviruses and polyomaviruses quantified by qPCR as indicators of water quality in source and drinking-water treatment plants. Water Research 43(7), 2011–2019.

**Allen, M. J. and Geldreich, E.E.** (1977) Distribution line sediments and bacterial regrowth. Water quality technical conference, Kansas City, MO, American Water Works Association, Denver.

**Allwood, P.B., Malik, Y.S., Maherchandani, S., Hedberg, C.W. and Goyal, S.M.** (2005) Effect of temperature on the survival of F-specific RNA coliphage, feline calicivirus, and *Escherichia coli* in chlorinated water. International Journal of Environmental Research and Public Health 2, 442–446.

**Anderson, E.J. and Weber, S.G. (2004)** Rotavirus infectionin adults**.** The Lancet Infectious Diseases 4, 91-99.

**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 fur 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.

**Attinti, R., Wei, J., Kniel, K., Thomas Sims, J. and Jin, Y.** (2010) Virus' (MS2, PhiX174, and Aichi) attachment on sand measured by atomic force microscopy and their transport through sand columns. Environmental Science and Technology 44(7), 2426-2432.

**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.

**Bales, R.C., Hinkle, S.R. Kroeger, T.W. Stocking K. and Gerba, C.P.** (1991) Bacteriophage adsorption during transport through porous media: chemical perturbations and reversibility. Environmental Science and Technology 25(12), 2088-2095.

**Bales, R.C., Li, S., Maguire, K.M., Yahya, M.T. and Gerba, C.P.** (1993) MS-2 and poliovirus transport in porous media : hydrophobic effects and chemical perturbations. Water Resources Research 29(4), 957-963.

**Barbeau, B., Desjardins, R., Mysore, C. and Prévost, M.** (2005) Impacts of water quality on chlorine and chlorine dioxide efficacy in natural waters. Water Research 39, 2024–2033.

**Batté, M., Appenzeller B.M.R., Grandjean D., Fass S., Gauthier V., Jorand F., Mathieu L., Boualam M., Saby S. and Block J.C.** (2003) Biofilms in drinking water distribution systems. Reviews in Environmental Science and Biotechnology 2(2), 147-168.

**Beaudeau, P., Payment, P., Bourderont, D., Mansotte, F., Boudhabay, O., Laubiès, B. and Verdière, J.** (1999) A time series study of anti-diarrheal drug sales and tap-water quality. International Journal of Environmental Health Research 9, 293-311.

**Berry, D., Xi, C. and Raskin, L.** (2006) Microbial ecology of drinking water distribution systems. Current opinion in biotechnology. Environmental Biotechnology/Energy Biotechnology 17(3), 292-302.

**Bertrand, I., Schijven, J.F., Sánchez, G., Wyn-Jones, P., Ottoson, J., Morin, T., Muscillo, M., Verani, M., Nasser, A., de Roda Husman, A.M., Myrmel, M., Sellwood, J., Cook, N. and Gantzer, C.** (2012) The impact of temperature on the inactivation of enteric viruses in food and water: a review. Journal of Applied Microbiology 112(6), 1059-1074.

**Blackburn, B.G., Craun, G.F., Yoder, J.S., Hill, V., Calderon, R.L., Chen, N., Lee, S.H., Levy, D.A. and Beach, M.J.** (2004) Surveillance for waterborne-disease outbreaks associated with drinking water--United States, 2001-2002. Morbidity and Mortality Weekly Report, Surveillance Summaries 53(8), 23-45.

**Bird, R.B., Stewart, W.E. and Lightfoot, E.N.** (2007) Transport Phenomena (Revised Second Edition ed.). John Wiley and Sons.

**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.

**Block, J.C., Haudidier, K., Paquin, J.L., Miazga, J. et Levi, Y.** (1993) Biofilm accumulation in drinking water distribution systems. Biofouling 6(4), 333-343.

**Block J.C. and Appenzeller, B.M.R.** (2001) Biofilms et distribution d'eau potable. Bulletin de la société Française de Microbiologie 16(1), 7-12.

**Boe-Hansen, R., Albrechtsen, H.J., Arvin E. and Jorgensen C.** (2002) Bulk water phase and biofilm growth in drinking water at low nutrient conditions. Water Research 36(18), 4477-4486.

**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.

**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.

**Boring, J.R., Martin, W.T. and Elliott, L.M.** (1971) Isolation of Salmonella typhimurium from municipal water, Riverside, California, 1965. American Journal of Epidemioloy, 93(1), 49-54.

**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.

**Boulos, L., Prévost, M., barbeau, B., Coallier, J., Desjardins, R.** (1999) LIVE/DEAD BacLight : application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water. Journal of Microbiological Methods 37(1), 77-86.

**Briandet, R., Lacroix-Gueu, P., Renault, M., Lecart, S., Meylheuc, T., Bidnenko, E.., Steenkeste, K., Bellon-Fontaine, M.N. and Fontaine-Aupart, M.P.** (2008) Fluorescence

correlation spectroscopy to study diffusion and reaction of bacteriophages inside biofilms. Applied and Environmental Microbiology 74(7), 2135-2143.

**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.

**Busscher, H.J. and Weerkamp A.H.** (1987) Specific and nonspecific adhesion to solid substrata. FEMS Microbiology Reviews 46, 165-173.

**Busscher, H.J., van de Belt-Gritter B. and van der Mei, H.C.** (1995) Implications of microbial adhesion to hydrocarbons for evaluating cell surface hydrophobicity 1. Zeta potentials of hydrocarbon droplets. Colloids and Surfaces B-Biointerfaces 5(3-4), 111-116.

**Candy, D.C.** (2007) Rotavirus Infection: A Systemic Illness? Plos Medicine 4(4), 117.

**Carter, M.J.** (2005) Enterically infecting viruses: pathogenicity, transmission and significance for food and waterborne infection. Journal of Applied Microbiology 98(6), 1354-1380.

**Charles, K.J., Souter, F.C., Baker, D.L., Davies, C.M., Schijven, J.F., Roser, D.J., Deere, D.A., Priscott, P.K. and Ashbolt, N. J. (**2008) Fate and transport of viruses during sewage treatment in a mound system. Water Research 42, 3047-3056.

**Chen, F., Lu, J.R., Binder, B.J., Liu, Y.C. and Hodson, R.E**. (2001) Application of digital image analysis and flow cytometry to enumerate marine viruses stained with SYBR gold. Applied and Environmental Microbiology 67(2), 539-545.

**Chikhi-Brachet, R., Bon, F., Toubiana, L., Pothier, P., Nicolas, J.C., Flahault, A. and Kohli, E. (2002)** Virus diversity in a winter epidemic of acute diarrhea in France. Journal of Clinical Microbiology 40(11):4266-4272.

**Chin, J.** (2000) Control of communicable diseases manual. 17e éd. American Public Health Association, Washington, DC.

**Choubey, A., Denes. M. and Sprague, A.** (2009) Human aortic endothelial cell response to 316L stainless steel material microstructure. Journal of Materials science 2009, 20(10), 2105-2116.

**Clark, R.M., Sivaganesan, M., Rice, E.W. and Chen, J.** (2003) Development of a Ct equation for the inactivation of Cryptosporidium oocysts with chlorine dioxide. Water Research 37(11), 2773-2783.

**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.

**Collins, K.E., Cronin, A.A., Rueedi, J., Pedley, S., Joyce, E., Humble, P.J. and Tellam, J.H.** (2006) Fate and transport of bacteriophage in UK aquifers as surrogates for pathogenic viruses. Engineering Geology 85(1-2), 33-38.

**Colson, P., Borentain, P., Queyriaux, B., Kaba, M., Moal, V., Gallian, P., Heyries, L., Raoult, D. and Gerolami, R.** (2010) Pig liver sausage as a source of hepatitis E virus transmission to humans. Journal of Infectious Diseases 202(6), 825–834.

**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.

**Cook, N., Bridger, J., Kendall, K., Gomara, M.I., Le-Attar, L. and Gray, J**. (2004) The zoonotic potential of rotavirus. Journal of Infection 48(4), 289-302.

**Cromeans, T.L., Kahler, A.M. and Hill, V.R.** (2010) Inactivation of adenoviruses, enteroviruses, and murine norovirus in water by free chlorine and monochloramine. Applied and Environmental Microbiology 76(4), 1028-1033.

**Curriero, F.C., Patz, J.A., Rose, J.B. and Lele, S.** (2001) The association between extreme precipitation and waterborne disease outbreaks in the United States, 1948-1994. American Journal of Public Health 91(8), 1194-1199.

**Davison, A.J., Benko, M. and Harrach, B.** (2003) Genetic content and evolution of adenoviruses. Journal of General Virology 84(11), 2895-2908.

**de Serres, G., Cromeans, T.L., Levesque, B., Brassard, N., Barthe, C., Dionne, M., Prud'homme, H., Paradis, D., Shapiro, C.N., Nainan, O.V. and Margolis, H.S.** (1999) Molecular confirmation of hepatitis A virus from well water: epidemiology and public health implications. Journal of Infectious Diseases 179(1), 37-43.

**DeBorde, D.C., Woessner, W.W., Kiley, Q.T. and Ball, P.** (1999) Rapid transport of viruses in a floodplain aquifer. Water Research 33(10), 2229-2238.

**Décret n°2001-1220** du 20 décembre 2001 relatif aux eaux destinées à la consommation humaine, à l'exclusion des eaux minérales naturelles.

**Deshayes, F. and Schmitt, M.** (2001) Pollution du réseau d'eau potable à Strasbourg et survenue concomitante de gastro-entérites, mai 2000. Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire, 5-7.

**Dika, C., Duval, J.F., Ly-Chatain, H.M., Merlin, C. and Gantzer, C.** (2011) Impact of internal RNA on aggregation and electrokinetics of viruses: comparison between MS2 phage and corresponding virus-like particles. Applied and Environmental Microbiology (14), 4939-4948.

**Dika, C., Ly-Chatain, M.H., Francius, G., Duval, J.F.L. and Gantzer C.** (2013) Non-DLVO adhesion of F-specific RNA bacteriophages to abiotic surfaces: Importance of surface

roughness, hydrophobic and electrostatic interactions. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects.

**Doggett, S.** (2000) Characterization of fungal biofilms within a municipal water distribution system. Applied and Environmental Microbiology 66(3), 1249-1251.

**Donlan, R.M. and Pipes, W.O.** (1988) Selected drinking water characteristics and attached microbial population. Journal of American Water Works Association 80, 70-76.

**Dorner, S.M., Anderson, W.B., Gaulin, T., Candon, H.L., Slawson, R.M., Payment, P. and Huck, P.M.** (2007) Pathogen and indicator variability in a heavily impacted watershed. Journal of Water and Health 5(2), 241-257.

**Dowd, S.E., Pillai, S.D., Wang, S., Corapcioglu, M.Y.** (1998) Delineating the specific influence of virus isoelectric point and size on virus adsorption and transport through sandy soils. Applied and Environmental Microbiology 64(2), 405-410.

**Dutka, B.J., El Shaarawi, A., Martins, M.T. and Sanchez, P.S.** (1987) North and south american studies on the potential of coliphage as a water quality indicator. Water Research 21(9), 1127-1134.

**Eden, K.V., Rosenburg, M.L., Stoopler, M., Wood, B.T., Highsmith, A.K., Skaliy, P., Wells, J.G. and Feeley, J.C.** (1977) Waterborne gastrointestinal illness at a ski resort. Public Health Report 92(3): 245-250.

**Engelbrecht, R.S., Weber, M.J., Salter, B.L. and Schmidt, C.A.** (1980) Comparative inactivation of viruses by chlorine. Applied and Environmental Microbiology 40(2), 249-256.

**Enriquez, C.E., Abbaszadegan, M., Pepper, I.L., Richardson, K.J. and Gerba, C.P.** (1993) Poliovirus detection in water by cell culture and nucleic acid hybridization. Water Research 27, 1113–1118.

**Enriquez, C.E., Hurst, C. 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.

**Faille , C., Jullien, C., Fontaine, F., Bellon-Fontaine, M., Slomianny, C. and Benezech, T.** (2002) Adhesion of Bacillus spores and Escherichia coli cells to inert surfaces: role of surface hydrophobicity. Canadian Journal of Microbiology 48(8), 728-738.

**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.

**Flemming, H.C., Percival, S.L. and Walker, J.T.** (2002) Contamination potential of biofilms in water distribution systems. Water Supply 2(1), 271-280.

**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.

**Gabbay, Y.B., Borges, A.A., Oliveira, D.S., Linhares, A.C., Mascarenhas, J.D.P., Barardi, C.R.M., Simões, C.M.O., Wang, Y., Glass R.I. et Jiang. B.** (2008) Evidence for zoonotic transmission of Group C rotaviruses among children in Belém, Brazil. Journal of Medical Virology 80(9), 1666-1674.

**Gassilloud, B., Duval, M., Schwartzbrod, L. and Gantzer, C.** (2003) Recovery of feline calicivirus infectious particles and genome from water: comparison of two concentration techniques. Water Science and Technology 47(3), 97-101.

**Gauthier, Y. and Isoard, P.** (1989) L'adhésion des bactéries sur les surfaces. Industries Alimentaires et Agricoles, 106(1-2), 31-33.

**Gerba, C.P., Farrah, S.R., Goyal, S.M. Wallis, C. and Melnick, J.L.** (1978) Concentration of enteroviruses from large volumes of tap water, treated sewage, and seawater. Applied and Environmental Microbiology 35(3), 540-548.

**Gerba, C. P.** (1984) Applied and theoretical aspects of virus adsorption to surfaces. Advances in Applied Microbiology 30, 133-168.

**Gofti-Laroche, L., Gratacap-Cavalier, B., Demanse, D., Genoulaz, O., Seigneurin, J.M. and Zmirou, D.** (2003) Are waterborne astrovirus implicated in acute digestive morbidity (EMIRA study). Journal of Clinical Virology 27(1), 74-82.

**Gonçalves, A.B., Santos, I.M., Russel, R., Paterson M. and Lima N.** (2006) FISH and Calcofluor staining technique to detect in situ filamentous fungal biofilms in water. Revista Iberoamericana de Micologia 23, 194-198.

**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.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.

**Grabow, W.** (2001) Bacteriophages: update on application as models for viruses in water. Water SA 27(2), 251-268.

**Grandjean, D., Fass, S., Tozza, D., Cavard, J., Lahoussine, V., Saby, S., Guilloteau, H. and Block, J.C.** (2005) Coliform culturability in over- versus undersaturated drinking water. Water Research 39(9), 1878-1886.

**Haas, C.N., Rose, J.B. et Gerba, C.P.** (1999) Quantitative microbial risk assessment. John Wiley, New York, NY.

**Harris, J.P., Lopman, B.A. and O'Brien S.J.** (2010) Infection control measures for norovirus: a systematic review of outbreaks in semi-enclosed settings. Journal of Hospital Infection 74(1), 1-9.

**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 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.

**Helmi, K., Skraber, S., Gantzer, C., Willame, R., Hoffmann, L. and 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.

**Helmi, K., Menard-Szczebara, F., Lénès, D., Jacob, P., Jossent, J., Barbot, C., Delabre, K. and Arnal, C.** (2010) Adenovirus, MS2 and PhiX174 interactions with drinking water biofilms developed on PVC, cement and cast iron. Water Science and Technology 61 (12), 3198-207.

**Herath, G., Yamamoto K. and Urase, T.** (1999) Removal of viruses by microfiltration membranes at different solution environments. Water Science and Technology 40(4-5), 331-338.

**Hewitt, J., Rivera-Aban, M. and Greening, G.E**. (2009) Evaluation of murine norovirus as a surrogate for human norovirus and hepatitis A virus in heat inactivation studies. Journal of Applied Microbiology107, 65–71.

**Hock, C. and Botzenhart, K.** (2002) Detection of enteric viruses in biofilms of the drinking water system. Poster presented at the 3rd IWA World Water Congress, Melbourne.

**Hollinger, F.B. and Emerson, S.U.** (2007) Hepatitis A virus. Fields virology, vol. 1. 5e éd. Philadelphie, PA.

**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.

**Hrudey, S.E., Payment, P., Huck, P.M., Gillham, R.W. and Hrudey, E.J.** (2003) A fatal waterborne disease epidemic in Walkerton, Ontario: comparison with other waterborne outbreaks in the developed world. Water Science and Technology 47(3), 7-14.

**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. The Journal of Biochemistry 99(4), 1169-1180.

**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(13), 6205-6221.

**Institut National de Veille Sanitaire** (InVS). Site internet.

**Jiang, S.C.** (2006) Human adenoviruses in water: occurrence and health implications: a critical review. Environmental and Science Technology 40(23), 7132-7140.

**Jofre, J.** (2007) Indicators of waterborne enteric viruses in Perspectives in Medical Virology. Bosch, A., Elsevier. 17, 227-249.

**Kahler, A.M., Cromeans, T.L., Roberts, J.M. and Hill, V.R**. (2010) Effects of source water quality on chlorine inactivation of adenovirus, coxsackievirus, echovirus, and murine norovirus. Applied and Environmental Microbiology 76(15), 5159-5164.

**Karim, M., Abbaszadegan, M. and LeChevalier M.W.** (2003) Potential for pathogen intrusion during pressure transients. Journal ofAmerican Water Works Association 95(5), 134-146.

**Kirmeyer, G.J., Friedman, M., Martel, K., Howie, D., LeChevalier, M., Abbaszadegan, M., Karim, M., Funk, J., Harbour, J.** (2001) Pathogen intrusion into the Distribution System. AWWA Research Foundation and the American Water Works Association, Denver, CO.

**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(6), 1523-1533.

**Koopmans, M., von Bonsdorff, C.H., Vinje, J., de Medici, D. and Monroe, S.** (2002) Foodborne viruses. FEMS Microbiological Reviews 26(2), 187-205.

**Koopmans, M. and Duizer, E.** (2004) Foodborne viruses: an emerging problem. International Journal of Food Microbiology 90(1), 23-41.

**Kott, Y., Roze, N., Sperber, S. and Betzer, N.** (1974) Bacteriophages as viral pollution indicators. Water Research 8(3), 165-171.

**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.

**Langlet, J.** (2008) Propriétés interfaciales des bactériophages ARN-F spécifiques : Implications lors des processus d'adhésion-agrégation. Thèse Nancy Université, 166 pages.

**Langlet, J., Gaboriaud, F., Duval, J.F. and Gantzer, C.** (2008) Aggregation and surface properties of F-specific RNA phages: Implication for membrane filtration processes. Water Research 42(10-11), 2769-2777.

**Långmark, J., Storey, M.V., Ashbolt, N.J. and Stenström, T.A.** (2005) Accumulation and fate of microorganisms and microspheres in biofilms formed in a pilot-scale water distribution system. Applied and Environmental Microbiology 71(2), 706-712.

**Laverick, M.A., Wyn-Jones, A.P. and Carter, M.J.** (2004) Quantitative RT-PCR for the enumeration of noroviruses (Norwalk-like viruses) in water and sewage. Letter in Applied Microbiology 39(2),127-136.

**Leclerc, H., Schwartzbrod, L. and Dei-Cas, E.** (2002) Microbial agents associated with waterborne diseases. Critical Reviews in Microbiology 28(4), 371-409.

**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-multiplexnested PCR procedure. Journal of Applied Microbiology 98(5), 1020-1029.

**Lehtola, M.J., Miettinen, I.T., Keinänen, M.M., Kekki, T.K., Laine, O., Hirvonen, A., Vartiainen, T. and Martikainen, P.J. (2004)** Microbiology, chemistry and biofilm development in a pilot drinking water distribution system with copper and plastic pipes. Water Research 38(17), 3769-3779.

**Lehtola, M.J., Laxander, M., Miettinen, I.T., Hirvonen, A., Vartiainen, T. and Martikainen, P.J.** (2006) The effects of changing water flow velocity on the formation of biofilms and water quality in pilot distribution system consisting of copper or polyethylene pipes. Water Research 40, 2151-2160.

**Lehtola, M.J., Torvinen, E., Kusnetsov, J., Pitkänen, T., Maunula, L., von Bonsdorff, C.H., Martikainen, P.J., Wilks, S.A., Keevil, C.W. and Miettinen, I.T.** (2007) Survival of Mycobacterium avium, Legionella pneumophila, Escherichia coli, and caliciviruses in drinking water-associated biofilms grown under high-shear turbulent flow. Applied and Environmental Microbiology 73(9), 2854-2859.

**Lim, M.Y., Kim, J.M. and Ko, G.** (2010) Disinfection kinetics of murine norovirus using chlorine and chlorine dioxide. Water Research 44: 3243-3251.

**Lipson, S.M. and Stotzky, G.** (1983) Adsorption of reovirus to clay minerals: effects of cation-exchange capacity, cation saturation, and surface area. Applied and Environmental Microbiology 46(3), 673-682.

**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.

**Lönnrot, M., Korpela, K., Knip, M., Ilonen, J., Simell, O., Korhonen, S., Savola, K., Muona, P., Simell, T., Koskela, P. and Hyöty, H.** (2000) Enterovirus infection as a risk factor for beta-cell autoimmunity in a prospectively observed birth cohort: the Finnish Diabetes Prediction and Prevention Study. Diabetes 49(8), 1314-1318.

**Lopman, B., Vennema, H., Kohli, E., Pothier, P., Sanchez, A., Negredo, A., Buesa, J., Schreier, E., Reacher, M., Brown, D., Gray, J., Iturriza, M., Gallimore, C., Bottiger, B., Hedlund, K.O., Torvén, M., von Bonsdorff, C.H., Maunula, L., Poljsak-Prijatelj, M., Zimsek, J., Reuter, G., Szücs, G., Melegh, B., Svennson, L., van Duijnhoven, Y. and Koopmans, M.** (2004) Increase in viral gastroenteritis outbreaks in Europe and epidemic spread of new norovirus variant. The Lancet 363(9410), 682-688.

**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.

**Lukasik, J., Cheng, Y-F., Lu, F., Tamplin, M. and Farrah, S.R. (1999)** Removal of microorganisms from water by columns containing sand coated with ferric and aluminum hydroxides. Water Research 33(3), 769–777.

**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.

**Mac Kenzie, W.R., Hoxie, N.J., Proctor, M.E., Gradus, M.S., Blair, K.A., Peterson, D.E., Kazmierczak, J.J., Addiss, D.G., Fox, K.R., Rose, J.B. and Davis J.P.** (1994) Massive outbreak in Milwaukee of cryptosporidium infection transmitted through the public water supply. New England Journal of Medicine 331, 161-167.

**Mansotte, F. and Beaudeau, P.** (1999) Impact sanitaire d'une coupure d'eau accidentelle au Havre et d'une panne de désinfection à Fécamp (Seine-Maritime). Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire, institut de veille sanitaire, 167-169.

**Manuel, C., Nunes, O. and Melo, L. (**2007) Dynamics of drinking water biofilm in flow/non-flow conditions. Water Research 41(3), 551-562.

**Martiny, A.C., Jørgensen, T.M., Albrechtsen, H.J., Arvin, E. and Molin, S.** (2003) Long-term succession of structure and diversity of a biofilm formed in a model drinking water distribution system. Applied and Environmental Microbiology 69(11), 6899-6907.

**Martiny, A.C., Albrechtsen, H.J., Arvin, E. and Molin, S.** (2005) Identification of bacteria in biofilm and bulk water samples from a nonchlorinated model drinking water distribution system: detection of a large nitrate-oxidizing population associated with Nitrospira spp. Applied and Environmental Microbiololy 71(12), 8611-8617.

**Mathieu, L., Bouteleux, C., Fass, S., Angel, E. and Block, J.C.** (2009) Reversible shift in the alpha-, beta- and gamma-proteobacteria populations of drinking water biofilms during discontinuous chlorination. Water Research 43(14), 3375-3386.

**Mattison, K., Shukla, A., Cook, A., Pollari, F., Friendship, R., Kelton, D., Bidawid, S. and Farber J.M.** (2007) Human noroviruses in swine and cattle. Emerging Infectious Diseases 13(8), 1184-1188.

**Maunula, L., Miettinen, I.T. and von Bonsdorff, C.H.** (2005) Norovirus outbreaks from drinking water. Emerging Infectious Diseases 11(11), 1716-1721.

**Mentzing, L.O.** (1981) Waterborne outbreaks of Campylobacter enteritis in central Swenden. The Lancet 318, 352-354.

**Michen, B. and Graule, T.** (2010) Isoelectric points of viruses. Journal of Applied Microbiology 109(2), 388-397.

**Moore, R.S., Taylor, D.H., Sturman, L.S., Reddy M.M. and Fuhs, G.W.** (1981) Poliovirus adsorption by 34 minerals and soils. Applied and Environmental Microbiology 42(6), 963-975.

**Mounts, A.W., Ando, T., Koopmans, M., Bresee, J.S., Noel, J. and Glass, R.I.** (2000) Cold weather seasonality of gastroenteritis associated with Norwalk- like viruses. Journal of Infectious Diseases 181 (2), S284-S287.

**Nairn, C., Galbraith, D.N., Taylor, K.W. and Clements, G.B.** (1999) Enterovirus variants in the serum of children at the onset of Type 1 diabetes mellitus. Diabetic Medecine 16(6), 509-513.

**Nedellec, V., Jouan, M., Ledrans, M. and Tricard, D.** (1996) Pollutions accidentelles des eaux d'alimentation en France. Rapport du Réseau national de santé publique et du ministère du Travail et des Affaires sociales. 1(46).

**Niewstad, T.J., Havelaar, A.H. and Van Olphen, M.** (1991) Hydraulic and microbiological characterization of retor for ultraviolet disinfection of secondary wasterwater effluent. Water Resaerch 25(7), 775-783.

**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.

**Norme 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.

**Nuanualsuwan, S. and Cliver, D.O. (2003)** Infectivity of RNA from Inactivated Poliovirus. Applied and Environmental Microbiology 69(3): 1629–1632.

**Nygard, K., Torven, M., Ancker, C., Knauth, S.B., Hedlund, K.O., Giesecke, J., Andersson, Y. and Svensson, L.** (2003) Emerging genotype (GGIIb) of norovirus in drinking water, Sweden. Emerging Infectious Diseases 9(12), 1548-1552.

**Nwachuku, N. and Gerba, C.P.** (2006) Health risk of enteric viral infections in children. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology 186, 1-56.

**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.** (2009) Intérêt du génotypage des phages ARN F-spécifiques pour estimer la pollution fécale et virale des eaux. Thèse, nancy université, 205 pages.

**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 Original Research Article. Water Research 43(5), 1257-1264.

**Ogorzaly, L., Bertrand, I., Paris, M., Maul, A. and Gantzer, C.** (2010) Occurrence, survival, and persistence of human adenoviruses and F-specific RNA phages in raw groundwater. Applied and Environmental Microbiology 76(24), 8019-8025.

**Ollos, P.J., Huck P.M. and Slawson R.M.** (2003) Factors affecting biofilm accumulation in model distribution systems. Journal of American Water Works Association 95(1), 87-97.

**Osawa, S., Furuse, K. and Watanabe, I.** (1981) Distribution of ribonucleic acid coliphages in animals. Applied and Environmental Microbiology 41(1), 164-168.

**Overby, L.R., Barlow, G.H., Doi, R.H., Jacob, M. and Spiegelman, S.** (1966) Comparison of two serologically distinct ribonucleic acid bacteriophages. I. Properties of the viral particles. Journal of Bacteriology 91(1), 442-448.

**Pallansch, M.A. and Roos, R.P.** (2007) Enteroviruses: Polioviruses, Coxsackieviruses, Echoviruses, and Newer Enteroviruses. In Fields Virology, 5th edn, 839-892. Edited by D.M. Knipe, P.M. Howley, D.E. Griffin, R.A. Lamb, M.A. Martin, B. Roizman and S.E. Straus: Lippincott Williams Wilkins.

**Panda, S.K., Thakral, D. and Rehman, S.** (2007) Hepatitis E virus. Reviews in Medical Virology 17(3), 151-180.

**Paris, T., Skali-Lami, S. and Block, J.C.** (2007) Effect of wall shear rate on biofilm deposition and grazing in drinking water flow chambers. Biotechnology and Bioengineering 97(6), 1550-1561.

**Paris, T., Skali-Lami, S. and Block, J.C.** (2009) Probing young drinking water biofilms with hard and soft particles. Water Research 43(1), 117-126.

**Pavio, N., Meng, X-J., Renou, C.** (2010) Zoonotic hepatitis E: animal reservoirs and emerging risks. Vetenary Research 41(6), 46.

**Payment, P., Richardson, L., Siemiatycki, J., Dewar, R., Edwardes, M. and Franco, E.** (1991) Randomized trial to evaluate the risk of gastrointestinal disease due to consumption of drinking water meeting microbiological standards. American Journal of Public health 81(6), 703-708.

**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., Berube, A., Perreault, D., Armon, R. and Trudel, M.** (1989) Concentration of *Giardia lamblia* cysts, *Legionella pneumophila*, *Clostridium perfringens*, human enteric viruses, and coliphages from large volumes of drinking water, using a single filtration. Canadian Journal of Microbiology 35(10), 932-925.

**Pedersen, K.** (1990) Biofilm development on stainless steel and PVC surfaces in drinking water. Water Research 24(2), 239-243.

**Pelleïeux, S.** (2012) Les phages : un outil d'aide à l'évaluation du comportement des virus entériques pathogènes en réseau d'eau potable. Thèse pour le diplôme d'état de Docteru en Pharmacie, Université de Lorraine, 117 pages.

**Penrod, S.L., Olson, T.M. and Grant, S.B**. (1995) Whole Particle Microelectrophoresis for Small Viruses. Journal of Colloid and Interface Science 173(2), 521-523.

**Percival, S.L., Knapp, J.S. Wales, D.S. and Edyvean, R.G.J.** (1999) The effect of turbulent flow and surface roughness on biofilm formation in drinking water. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 22(3), 152-159.

**Percival, S., Chalmers, R., Embrey, M., Hunter, P., Sellwood, J. and Wyn-Jones, P.** (2004) Hepatitis E virus (HEV). Microbiology of Waterborne Diseases 31, 427-431

**Pham, M., Mintz, E.A. and Nguyen T.H.** (2009) Deposition kinetics of bacteriophage MS2 to natural organic matter : role of divalent cations. Journal of Colloidal and Interface Science 338, 1-9.

**Pinto, R.M. and Saiz, J.C.** (2007) Perspectives in Medical Virology. Bosch, A. (ed), pp. 39-67, Elsevier.

**Poitelon, J.B., Joyeux, M., Welté, B., Duguet, J.P., Scott DuBow, M.** (2011) Le réseau de distribution d'eau potable : un écosystème complexe lié à des enjeux de santé publique. Journal of Water Science 24(4), 383-418.

**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.

**Purcell, R.H. and Emerson, S.U.** (2010) Hidden danger: the raw facts about hepatitis E virus. Journal of Infectious Diseases 202(6), 819–821.

**Qaqish, A., Guastella, D.E., Dillingham, J.H. and Chase, D.V.** (1995) Control of hydraulic transient in large water transmission mains, p 507-526, AWWA, Annual Conference Proceedings – Engineering and Operations, Anaheim, CA, American Water Works Association, Denver, CO.

**Quignon, F., Kiene, L., Levi, Y., Sardin, M. and Schwartzbrod, L.** (1997a) Virus behaviour within a distribution system. Water Science and Technolology 35(11-12), 311-318.

**Quignon, F., Sardin, M., Keine, L., Schwartzbrod, L.** (1997b) Poliovirus-1 inactivation and interaction with biofilm: a pilot-scale study. Applied and Environmental Microbiology 63(3), 978-982.

**Quignon, F., Thomas, F., Gantzer, C., Huyard, A. and Schwartzbrod, L.** (1998) Virus adsorption in a complex system: an experimentally designed study. Water Research 32(4), 1222-1230.

**Rafikova, E.R., Kurganov, B.I., Arutyunyan, A.M., Kust, S.V., Drachev ,V.A. and Dobrov, E.N.** (2003) A mechanism of macroscopic (amorphous) aggregation of the tobacco mosaic virus coat protein. International Journal of Biochemistry and Cell Biology 35(10), 1452-1460.

**Ragazzo, P.** (2002). Biofilm formation in surface distribution systems. HPC, bacteria in drinking water, public health implications? Geneva, Switzerland, Center of public health education NSF International.

**Rapport Agence Française de Sécurité Sanitaire et des Aliments** (2007) Bilan des connaissances relatives aux virus transmissibles à l'homme par voie orale.

**Redman, J.A., Grant, S.B., Olson, T.M., Hardy, M.E. and Estes, M.K.** (1997) Filtration of recombinant norwalk virus particles and bacteriophage MS2 in quartz sand: importance of electrostatic interactions. Environmental Science and Technology 31(12), 3378-3383.

**Ridgway, H.F. and Olson, B.H.** (1981) Scanning microscope evidence for bacterial colonization of a drinking water distribution system. Applied and Environmental Microbiology 41,274-287.

**Rodriguez-Manzano, J., Miagostovich M., Hundesa, A., Clemente-Casares, P., Carratala, A., Buti, M., Jardi, R., Girones, R., Hundesa, A., Carratala, A. and Clemente-Casares, P.** (2010) Analysis of the evolution in the circulation of HAV and HEV in Eastern Spain by testing urban sewage samples. Journal of Water and Health 8(2), 346–354.

**Rogers, J., Dausett, A.B. Demis, P.J., Lee, J.V. and Keevil, C.W.** (1994) Influence of plumbing material of biofilm formation and growth of Legionella pneumophila in potable water systems. Applied and Environmental Microbiology 60(6), 1842-1851.

**Sano, E., Carlson, S., Wegley, L. and Rohwer, F.** (2004) Movement of viruses between biomes. Applied and Environmental Microbiology 70(10), 5842-5846.

**Scarpino, P.V., Lucas, M., Dahling, D.R., Berg, G. and Chang, S.L. (**1974) Effectiveness of hypochlorous acid and hypochlorite ion in destruction of viruses and bacteria. Chemistry of Water supply, Treatment, and Distribution 15, 359-368.

**Schaldach, C.M., Bourcier, W.L., Shaw, H.F., Viani, B.E. and Wilson, W.D. (**2006) The influence of ionic strength on the interaction of viruses with charged surfaces under environmental conditions. Journal of Colloid and Interface Science 294, 1-10.

**Schaper, M., Duran, A.E. and 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. and Hassanizadeh, S.M. (**2000) Removal of viruses by soil passage: Overview of modeling, processes, and parameters. Critical Reviews in Environmental Science and Technology 30(1), 49-127.

**Schijven, J.F. and Simunek, J.** (2002) Kinetic modeling of virus transport at the field scale. Journal of Contaminant Hydrology 55(1-2), 113-135.

**Schlichting, H.** (1955) Boundary-layer theory. New York: McGraw-Hill, 535 pages.

**Schneider, R.P.** (1997) Bacterial adhesion to solid substrata coated with conditioning films derived from chemical fractions of natural waters. Journal of Adhesion Science and Technology 11, 979–994.

**Schwab, K** (2007) Waterborne gastroenteritis viruses in Perspectives en Medical Virology. Bosch, A, Elsevier 17, 27-38.

**Sedmak, G., Bina, D., Macdonald, J. and Couillard, L.** (2005) Nine-year study of the occurrence of culturable viruses in source water for two drinking water treatment plants and the influent and effluent of a Wastewater Treatment Plant in Milwaukee, Wisconsin (August 1994 through July 2003). Applied and Environmental Microbiology 71(2), 1042-1050.

**Servais, P., Laurent, P. and Randon, G.** (1995) Comparison of the bacterial dynamics in various french distribution systems. Aqua - Journal of Water Supply: Research and Technology 44(1), 10-17.

**Shani, C., Weisbrod, N. and Yakirevich, A. (**2008) Colloid transport through saturated sand columns: Influence of physical and chemical surface properties on deposition. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects 316(1-3), 142-150.

**Shields, P.A. and Farrah, S.R.** (2002) Characterization of Virus Adsorption by Using DEAE-Sepharose and Octyl- Sepharosedagger. Applied and Environmental Microbiology 68(8), 3965-3968.

**Shirasaki, N., Matsushita, T., Matsui, Y., Urasaki., T. and Ohno, K. (**2009) Comparison of behavior of two surrogates for pathogenic waterborne viruses, bacteriophages Qβ and MS2, during the aluminium coagulation process. Water Research 43, 605-612.

**Sibille, I., Mathieu, L., Paauin, J.L., Gatel, D. and Block, J.C.** (1997) Microbial characteristics of a distribution system fed with nanofiltered drinking water. Water Research 31(9), 2318-2326.

**Sibille, I., Sime-Ngando, T., Mathieu, L. and Block, J.C.** (1998) Protozoan bacterivory and *Escherichia coli* survival in drinking water distribution systems. Applied and Environmental Microbiology 64(1), 197-201.

**Sigg, L., Behra, P. and Stumm, W.** (2006) Chimie des milieux aquatiques – Chimie des eaux naturelles et des interfaces dans l'environnement, 4e edn, Sciences Supérieures.

**Sinclair, R.G., Romero-Gomez, P., Choi, C.Y. and Gerba, C.P.** (2009) Assessment of MS-2 phage and salt tracers to characterize axial dispersion in water distribution systems. Journal of Environmental Science and Health 44(10), 963-971.

**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., 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.

**Siqueira, V.M., Oliveira, H.M.B., Santos, C., Russell, R., Paterson, M., Gusmão, N.B. and Lima N.** (2011) Filamentous Fungi in Drinking Water, Particularly in Relation to Biofilm FormationInt. Journal of Environmental Research Public Health 2011, 8(2), 456-469.

**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.

**Skraber, S., Schijven, J., Gantzer, C. and de Roda Husman, A.M.** (2005) Pathogenic viruses in drinking-water biofilms: a public health risk? Biofilms 2(02), 105-117.

**Skraber, S., Helmi, K., Willame, R., Ferreol, M., Gantzer, C., Hoffmann, L. and 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., Ogorzaly, L., Helmi, K., Maul, A., Hoffmann, L., Cauchie, H.M. and Gantzer, C.** (2009) Occurrence and persistence of enteroviruses, noroviruses and F-specific RNA phages in natural wastewater biofilms. Water Research 43(19), 4780-4789.

**Smith, H.J., Reporter, R., Rood, M.P., Linscott, A.J., Mascola, L.M., Hogrefe, W. and Purcell, R.H.** (2002) Prevalence study of antibody to ratborne pathogens and other agents among patients using a free clinic in downtown Los Angeles. Journal of Infectious Diseases 186, 1673-1676.

**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), 1457-63.

**Sobsey, M.D., Fuji, T. and Shields, P.A.** (1988) Inactivation of hepatitis A virus and model viruses in water by free chlorine and monochloramine. Water Science and Technology 20(11-12), 385-391.

**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.

**Steyer, A., Poljšak-Prijatelj, M., Barlic-Maganja, D. and Marin, J.** (2008) Human, porcine, and bovine rotavirus in Slovenia: Evidence of interspecies transmission and gene reassortment. Journal of General Virology 89(7), 1690-1698.

**Storey, M.V. and Ashbolt, N.J.** (2001) Persistence of two model enteric viruses (B40-8 and MS-2 bacteriophages) in water distribution pipe biofilms. Water Science and Technology 43(12), 133-138.

**Storey, M.V. and Ashbolt, N.J.** (2003) Enteric virions and microbial biofilms--a secondary source of public health concern ? Water Science and Technology 48(3), 97-104.

**Syngouna, V.I. and Chrysikopoulos, C.V.** (2010) Interaction between viruses and clays in static and dynamic batch systems. Environmental Science and Technology 44(12), 4539-4544.

**Tartera, C. and Jofre, J.** (1987) Bacteriophages active against *Bacteroides fragilis* in sewage-polluted waters. Applied and Environmental Microbiolology 53(7), 1632-1637.

**Taylor, R.H., Falkinham, J.O., Norton, C.D. and leChevallier, M.W.** (2000) Chlorine, chloramine, chlorine dioxide, and ozone susceptibility of Mycobacterium avium. Applied and Environmental Microbiology 66(4), 1702-1705.

**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.

**Teixeira, P. and Oliveira, R.** (1999) Bacterial adhesion to food contating surfaces. Journal of Adhesion Science and Technology 13, 1287.

**Temmam, S., Besnard, L., Andriamandimby, S.F., Foray, C., Rasamoelina-Andriamanivo, H., Héraud, J-M., Cardinale, E., Dellagi, K., Pavio, N., Pascalis, H. and Porphyre, V.** (2012) High Prevalence of Hepatitis E in Humans and Pigs and Evidence of Genotype-3 Virus in Swine, Madagascar. American Society of Tropical Medicine and Hygiene 88(3), 329-338.

**Thurston-Enriquez, J.A., Haas, C.N., Jacangelo, J. and Gerba, C.P.** (2003) Chlorine inactivation of adenovirus type 40 and feline calicivirus. Applied and Environmental Microbiology 69(7), 3979-3985.

**Tillaut, H., Encrenaz, N., Checlair, E., Alexandre-Bird, A., Gomes Do Esperito Santo, E. and Beaudeau, P.** (2002) Epidémie de gastro-entérite, Isère, novembre 2002. Bulletin épidémiologique hebdomadaire n°12, 3-4.

**Tromans, W.J. and Horne, R.W.** (1961) The structure of bacteriophage ØX 174. Virology, 15(1), 1-7.

**Tu, E.T.-V., Nguyen, T., Lee, P., Bull, R.A., Musto, J., Hansman, G., White, P.A., Rawlinson, W.D. and McIver, C.J.** (2007). Norovirus GII.4 strains and outbreaks, Australia. Emerging Infectious Diseases 13, 1128–1129.

**Vivancos, R., Keenan, A., Sopwith, W., Smith, K., Quigley, C., Mutton, K., Dardamissis, E., Nichols, G., Harris, J., Gallimore, C., Verhoef, L., Syed, Q. and Reid, J.** (2010) Norovirus outbreak in a cruise ship sailing around the British Isles: Investigation and multi-agency management of an international outbreak. Journal of Infection 60(6), 478-485.

**Van Nevel, S., Hennebel, T., De Beuf, K., Gijs Du Laing, G., Verstraete, W. and Boon, N**. (2012) Transparent exopolymer particle removal in different drinking water production centers. Water Research 46(11), 3603-3611.

**van Oss, C.J.** (2003) Long-range and short-range mechanisms of hydrophobic attraction and hydrophilic repulsion in specific and aspecific interactions. Journal of Molecular Recognition 16, 177-190.

**van Voorthuizen, E.M., Ashbolt, N.J. and Schafer, A.I.** (2001) Role of hydrophobic and electrostatic interactions for initial enteric virus retention by MF membranes. Journal of Membrane Science 194(1), 69-79.

**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.

**Vanden Bossche, G.** (1994) Alteration of viral infectious behavior by surface active agents. Microbiological Research 149(2), 105-114.

**Walski, T.M. and Lutes, T.L.** (1994) Hydraulic transient cause low-pressure problems. Journal of American Water Works Association 86(12), 24-32.

**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.

**Wu, J.C., Chen, C.M., Chiang, T.Y., Sheen, I.J., Chen, J.Y., Tsai, W.H., Huang Y.H. and Lee, S.D.** (2000) Clinical and epidemiological implications of swine hepatitis E virus infection. Journal of Medical Virology 60(2), 166-171.

**Wyn-Jones, A.P. and Sellwood, J.** (2001) Enteric viruses in the aquatic environment. Journal of Applied Microbiology 91(6), 945-962.

**Yates, M.V. and Gerba, C.P.** (1985) Factors controlling the survival of viruses in groundwater. Water Science and Technology 17(4-5), 681-687.

**Yayli, G., Kilic, S. and Ormeci, A.R.** (2002) Hepatitis agents with enteric transmission-an epidemiological analysis. Infection 30, 334-337.

**Zerda, K.S.** (1982) Adsorption of viruses to charge-modified silica. Baylor College of Medicine, Ph.D.

**Zita, A. and Hermansson, M.** (1997) Effects of bacterial cell surface structures and hydrophobicity on attachment to activated sludge flocs. Applied and Environmental Microbiology 63(3), 1168-1170.

# *Annexes*

# I- Annexe 1 : Milieux nécessaires à la production et au titrage des phages ARN F-spécifiques

## 1. TYGB: Bouillon tryptone-extrait de levure-glucose

- **Milieu de base**

| | |
|---|---|
| **Bacto tryptone** | 10 g |
| **Extrait de levure** | 1 g |
| **Chlorure de sodium (NaCl)** | 8 g |
| **Eau distillée** | 1 000 ml |

Dissoudre les composants dans l'eau chaude. Ajuster le pH de sorte qu'après la stérilisation il soit de 7,2 ± 0,1 à 25°C. Répartir le milieu dans les fioles par volumes de 50 ml et stériliser à l'autoclave à 121 ± 1°C pendant 15 min. Stockage : 4 ± 2°C à l'obscurité (6 mois maximum).

- **Solution calcium-glucose**

| | |
|---|---|
| **Chlorure de calcium ($CaCl_2$, $H_2O$)** | 3 g |
| **Glucose** | 10 g |
| **Eau distillée** | 100 ml |

Dissoudre les composants dans l'eau tout en chauffant doucement. Refroidir à température ambiante et stériliser en filtrant sur une membrane de porosité 0,22 µm. Stockage : 4°C ± 2°C à l'obscurité (6 mois maximum).

- **Milieu complet**

| | |
|---|---|
| **Milieu de base** | 50 mL |
| **Solution Glucose-Calcium** | 0,5 mL |

Stockage : 4 ± 2°C à l'obscurité (6 mois maximum).

### 2. TYGA: Gélose tryptone-extrait de levure-glucose

- **Milieu de base**

| | |
|---|---|
| **Bacto tryptone** | 10 g |
| **Extrait de levure** | 1 g |
| **Chlorure de sodium (NaCl)** | 8 g |
| **Agar** | 16 g |
| **Eau distillée** | 1 000 ml |

Dissoudre les composants dans l'eau. Ajuster le pH de sorte qu'après la stérilisation il soit de 7,2 ± 0,1 à 25°C. Répartir le milieu dans les flacons par volumes de 500 ml et stériliser à l'autoclave à 12 ± 1°C pendant 15 min. Stockage : 4 ± 2°C à l'obscurité (6 mois maximum).

- **Milieu complet**

| | |
|---|---|
| **Milieu de base** | 500 mL |
| **Solution Glucose-Calcium** | 5 mL |

Le milieu complet est coulé dans des boîtes de Pétri (20 ml par boite pour des boîtes de 90 mm de diamètre). Laisser se solidifier et conserver dans l'obscurité à 4 ± 2°C pendant 6 mois maximum s'il est bien protégé contre la dessication.

### 3. ssTYGA: Gélose semi-solide tryptone-extrait de levure-glucose

Préparer un milieu de base conformément au TYGA, en utilisant seulement la moitié de la masse d'agar (8 g). Répartir dans des flacons par volumes de 50 ml et stériliser à l'autoclave pendant 15 minutes à 121°C ± 1°C. Stockage : 4 ± 2°C à l'obscurité (6 mois maximum).

## II- Annexe 2 : Réactifs nécessaires au dosage du chlore

| *Solution* | *Réactifs nécessaires* | *Protocole de préparation* | *Conservation* |
|---|---|---|---|
| $H_2SO_4$ 2N | Acide sulfurique concentré | Déposer 5,61 mL d'acide sulfurique concentré dans un bécher contenant 80 mL d'eau ultra-pure, dans la glace car la réaction est exothermique. Compléter à 100 mL dans une fiole jaugée. | 4°C. |
| NaOH 2N | Pastilles de soude solides (SDS, réf. 1040527) | Dissoudre 8 g de soude dans un bécher contenant 80 mL d'eau ultra-pure, dans la glace car la réaction est exothermique. Compléter à 100 mL dans une fiole jaugée. | 4°C. |
| EDTA sodique à 0,8% | EDTA liquide à 0,5 M (Sigma-Aldrich, réf. E7889/070M8702) | Diluer l'EDTA dans de l'eau ultra-pure à raison de 1,1 mL d'EDTA pour 18,9 mL d'eau. | Préparation extemporanée. |
| DPD à 0,1% | Sulfate de DPD anhydre (Sigma-Aldrich, réf. 16.834-3), Acide sulfurique dilué au tiers | Déposer 2 mL d'acide sulfurique dilué au tiers et 6,25 mL d'EDTA sodique à 0,8% dans 75 mL d'eau ultra-pure. Dissoudre dans ce mélange 0,275 g de sulfate de DPD et compléter à 250 mL dans une fiole jaugée. | 1 mois maximum à 4°C et à l'abri de la lumière. |
| Solution tampon | $KH_2PO_4$ (Acros, réf. 271080025) ; $Na_2HPO_4$, $2H_2O$ (Prolabo, réf. 28029.235) | Mélanger dans une fiole jaugée contenant de l'eau ultra-pure 11,5 g de $KH_2PO_4$ ; 7,52 g de $Na_2HPO_4$, $2H_2O$ et 25 mL d'EDTA sodique à 0,8%. Compléter à 250 mL. | 4°C. |
| Iodate de potassium à 1,006 g/L | $KIO_3$ (Prolabo, réf. 26840.235) | Dans une fiole jaugée, dissoudre 0,503 g de $KIO_3$ dans 500 mL d'eau ultra-pure. | Préparation extemporanée, à protéger de la lumière. |
| Iodate de potassium ioduré à 10,06 mg/L | KI (Sigma-Aldrich, réf. 30315) | Dans une fiole jaugée, dissoudre 0,5 g de KI dans 450 mL d'eau ultra-pure. Ajouter 5 mL d'iodate de potassium à 1,006 g/L et compléter à 500 mL. | Préparation extemporanée, à protéger de la lumière. |
| | | | |

**Liste des publications**

**1- Sandra Pelleïeux,** Isabelle Bertrand, Salaheddine Skali-Lami, Laurence Mathieu, Grégory Francius, Christophe Gantzer (2012):

Accumulation of MS2, GA, and Qβ phages on high density polyethylene (HDPE) and drinking water biofilms under flow/non-flow conditions. *Water Research* 46(19), 6574-6584. Impact factor (2012): 5,1.

**Communications orales**

**2-** Présentations industrielles : Veolia, Syndicat des Eaux d'Ile de France, Agence des Eaux Seine Normandie.

**S. Pelleïeux,** L. Mathieu, I. Bertrand, S. Skali-Lami, N. Steyer, E. Angel, C. Gantzer. Efficacité d'un nettoyage hydrodynamique ± chlore vis-à-vis des bactériophages adsorbés sur un biofilm d'eau potable. Juin 2011 (Nancy, France).

**S. Pelleïeux**, I. Bertrand, S. Skali-Lami, L. Mathieu, E. Angel, Y. Abe, G., Francius, C. Gantzer. Accumulation de virus modèles sur des biofilms d'eau potable. Décembre 2010 (Nancy, France).

**S. Pelleïeux,** N. Steyer, L. Mathieu, I. Bertrand, C. Gantzer. Adhésion virale sur supports PEHD et inox 316L nus ou colonisés par des biofilms. Juin 2010 (Nancy, France)

**S.Pelleïeux,** C. Le Cossec, I. Bertrand, C. Gantzer. Adhésion des bactériophages ARN F-spécifiques sur inox 316L en conditions dynamiques dans l'eau. Décembre 2009 (Nancy, France).

**S.Pelleïeux**, I. Bertrand, C. Gantzer. Adhésion des bactériophages ARN F-spécifiques sur inox 316L. Juin 2009 (Nancy, France).

**3- S. Pelleïeux,** I. Bertrand, C. Le Cossec, L. Mathieu, S. Skali-Lami, G. Francius, C. Gantzer.
Adhésion du bactériophage Qβ sur des surfaces inox colonisées par des « biofilms » d'eau potable. Colloque « Biofilm et Santé », janvier 2010 (Poitiers, France).

**4-** L. Mathieu, **S. Pelleïeux,** G. Francius, S. Skali-Lami, I. Bertrand, C. Gantzer.
Nettoyage hydrodynamique des biofilms d'eau potable. Colloque « Journée Information Eau », Septembre 2012 (Poitiers, France).

**5- S. Pelleïeux**, I. Bertrand, S. Skali-Lami, L. Mathieu and C. Gantzer.
Bacteriophage accumulation on, and removal from, HDPE material colonised with drinking water biofilms. Food and Environmental Virology Congress », Octobre 2012. (Lisbonne, Portugal).

**6- S. Pelleïeux,** I. Bertrand, S. Skali-Lami, C. Gantzer.
Interactions of F-specific bacteriophages with drinking water biofilms : An issue to understand pathogenic viruses behavior in water distribution systems. SarLorLux, Novembre 2012 (Nancy, France).

**Communications affichées**

**7- S. Pelleïeux**, C. Gantzer et I. Bertrand. Adhésion des bactériophages MS2 et Qβ sur des surfaces en polyéthylène haute densité. Congrès Bioadh, octobre 2011 (Nice, France).

**8- S. Pelleïeux.** Biofilms d'eaux potables et virus entériques Doctoriales de Lorraine, mai 2011(Ventron, France)

**9- S. Pelleieux**, L. Mathieu, C. Gantzer, I. Bertrand. Accumulation of phages in drinking water biofilms: a way to elude chlorine? Biofilm 5, decembre 2012 (Paris, France).

## *Résumé*

Bien que les microorganismes pathogènes soient rarement détectés au sein de réseaux de distribution d'eau potable, ils peuvent constituer un danger pour la santé humaine en cas de contamination accidentelle. Le devenir des virus entériques au sein d'un système de distribution d'eau est largement méconnu, alors que de telles informations sont nécessaires pour améliorer les procédures de prise en charge en cas d'incidents. Dans ce contexte, trois bactériophages ARN F-spécifiques, MS2, GA et Qβ, ont été utilisés comme modèles des virus entériques pathogènes, dans des conditions expérimentales mimant un système de distribution d'eau. Ce travail visait d'une part à comparer l'accumulation des phages sur des surfaces en polyéthylène haute densité (PEHD) colonisées ou non par des biofilms d'eau potable et d'autre part à évaluer, sur les bactériophages adhérés, l'efficacité de protocoles de nettoyage basés sur une chloration ainsi qu'une augmentation des contraintes hydrodynamiques.

En résumé, les différentes vitesses d'eau étudiées n'ont pas conduit à des différences significatives dans l'accumulation des bactéries et des phages sur les surfaces, mais ont toutefois abouti à des concentrations surfaciques en phages significativement supérieures à celles observées en conditions hydrostatiques. Quelles que soient les conditions expérimentales (vitesses d'eau à la surface, présence ou absence d'un biofilm), le bactériophage MS2 présente systématiquement les plus faibles concentrations sur les surfaces. La séquence d'adhésion des trois bactériophages sur biofilms est en accord avec leur séquence d'hydrophobicité. Le protocole de chloration (4 à 5 mg $Cl_2.L^{-1}$) évalué dans cette étude peut être ponctuellement appliqué en cas de contamination de l'eau. Après 60 minutes de chloration, l'abattement est de 0,7 $\log_{10}$ pour les bactéries et il est compris entre 2 et 3 $\log_{10}$ pour les phages adsorbés sur les surfaces, alors qu'aucun phage infectieux n'est plus détecté dans l'eau dès 5 minutes de chloration. Ces résultats soulignent l'effet protecteur du biofilm, même jeune. Enfin, la chloration apparaît être plus efficace que l'augmentation des contraintes hydrodynamiques pour éliminer les bactériophages adhérés aux surfaces.



**Mots clés: bactériophages, biofilm, hydrodynamique, adhésion, désinfection.**



## *Abstract*

Although pathogens remain widely uncommon in water distribution networks, they may constitute a real threat for human health when accidentally introduced in the system. There is a lack of knowledge about virus behaviour into water distribution systems whereas such information is critical for a better viral risk management. In this context, three F-specific RNA bacteriophages -MS2, GA and Qβ- were used as models, in experimental conditions mimicking water distribution systems. The purpose of the present work was at first to compare the viral accumulation of bacteriophages on high-density polyethylene (HDPE) colonised or not with drinking water biofilms. The second objective was to evaluate, on phages adsorbed in the biofilm, the efficiency of a cleaning protocol, based on chlorination and increase in the hydrodynamic strengths.

To sum up, the water velocities tested in this work had little influence on both the bacterial and virus accumulation on surfaces, but applying a water flow led to an increase in the number of adsorbed phages in comparison with hydrostatic conditions. Whatever the conditions (water velocity, colonisation or not with a biofilm) MS2 phage was found to be the less adherent one. On HDPE colonised with a two-month old biofilm, the adhesion sequence was consistent with the sequence of hydrophobicity of the phages. The chlorination protocol tested in our study (4 to 5 mg $CL_2$/L) can be applied punctually in distribution networks. After 60 minutes of chlorination the log-reduction was about 0.7 $\log_{10}$ for bacteria and between 2 and 3 $\log_{10}$ for bacteriophages, while no more infectious phages were detected in water after 5 minutes. Those results highlight that even two-month-old biofilms provide to viruses a protection against disinfection protocol. At last, the chlorination appears to be more efficient to inactivate viruses adsorbed on surfaces than an increase in the water flow velocity.



**Keywords : bacteriophages, biofilm, hydrodynamic, adhesion, disinfection.**