



**HAL**  
open science

# Propriétés interfaciales des bactériophages ARN F-spécifiques : Implications lors des processus d'adhésion - agrégation

Jérémie Langlet

## ► To cite this version:

Jérémie Langlet. Propriétés interfaciales des bactériophages ARN F-spécifiques : Implications lors des processus d'adhésion - agrégation. *Ecologie, Environnement*. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 2008. Français. NNT : 2008NAN10131 . tel-01777267

**HAL Id: tel-01777267**

**<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01777267v1>**

Submitted on 24 Apr 2018

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

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



## AVERTISSEMENT

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

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

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

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

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

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

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

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

---

ECOLE DOCTORALE "BIOLOGIE SANTE ENVIRONNEMENT"

# THESE

Présentée et soutenue publiquement

Le 11 juillet 2008

pour obtenir le titre de

## DOCTEUR DE L'UNIVERSITE HENRI POINCARÉ - NANCY I

Mention Environnement et Santé

par

**Jérémie LANGLET**

Né le 31 janvier 1980

Titulaire du Diplôme d'Etudes Approfondies  
Mention Environnement et Santé

### Sujet :

*Propriétés interfaciales des bactériophages  
ARN F-spécifiques :  
Implications lors des processus d'adhésion - agrégation*

### MEMBRES DU JURY

**Président :** Dr DUVAL J. F. L. (LEM, UMR 7569 CNRS-INPL, Vandoeuvre-lès-Nancy)  
**Rapporteurs :** Pr LUCENA F. (Faculté de Biologie, Université de Barcelone, Espagne)  
Pr ROUXHET P. (CIFA, UCL, Belgique)  
**Examineurs :** Pr GANTZER C. (Faculté de Pharmacie, LCPME, UHP-Nancy)  
Dr GABORIAUD F. (LCPME, UMR 7564 CNRS-UHP-Villers-lès-Nancy)  
Dr SCHROTTER J.C. (Veolia-Anjou Recherche, Maisons Laffitte)

---



---

*A mes parents.*

---

---

## Remerciements

Le doctorat est un parcours semé d'embûches qui ne peut être réalisé seul. Pendant cette aventure, je fus entouré de personnes qui m'ont aidé, soutenu et conseillé. A travers ces quelques lignes, je souhaite les remercier.

Je tiens tout particulièrement à adresser mes sincères remerciements à Christophe Gantzer pour avoir encadré mes travaux de recherche depuis mon DEA. J'ai énormément appris à ses côtés, tant du point de vue scientifique qu'humain. Grâce à son sens de l'humour et à son enthousiasme, nos discussions étaient toujours d'une grande rigueur scientifique mais aussi très détendues. Merci aussi de m'avoir fait confiance pour présenter mes résultats auprès de la communauté internationale, notamment lors du congrès de Tokyo qui reste pour moi un moment inoubliable.

Fabien Gaboriaud a été mon co-encadrant de thèse et a su, avec beaucoup de patience et de pédagogie, m'expliquer les subtilités de la physico-chimie des interfaces. J'ai énormément apprécié son dynamisme, sa soif de comprendre et son sens critique. Nos discussions pour arriver à concilier les concepts de physico-chimie et les notions de virologie ont souvent amené à un mal de tête mutuel mais furent extrêmement enrichissantes. Qu'il trouve dans ces quelques lignes l'expression de ma profonde reconnaissance.

Je remercie Jérôme Duval, pour avoir présidé le jury de ma thèse mais surtout pour l'énorme élan qu'il a apporté à ce travail. Ses connaissances théoriques pointues et ses interprétations sur les données expérimentales ont amené à des avancées pertinentes sur les propriétés des interfaces virales. Nos réunions ont toujours été ponctuées par son franc-parler et ses expressions sans pareil. Qu'il trouve ici le témoignage de mes plus sincères remerciements.

Paul Rouxhet a accepté d'être le rapporteur de ma thèse. Sa présence dans mon jury a été un honneur pour moi. Sa capacité de synthèse entre le monde de la microbiologie et celui de la physico-chimie des interfaces nous a amené à une discussion pertinente pendant la soutenance. Qu'il trouve ici le témoignage de ma plus grande gratitude.

Merci à Francisco Lucena, en tant que spécialiste de virologie environnementale, pour avoir accepté d'évaluer cette thèse et de la rapporter. Je lui suis très reconnaissant d'avoir partagé ses connaissances et son expérience pendant les discussions qui ont suivi l'exposé oral.

Jean-Christophe Schrotter m'a initié aux problématiques rencontrées par les industriels du traitement des eaux. Sa collaboration m'a permis de faire le lien entre des résultats fondamentaux et le domaine appliqué. Je le remercie pour ses encouragements et la façon amicale avec laquelle il a suivi mon travail depuis mon DEA. Qu'il trouve ici l'expression de ma gratitude et de mes sincères remerciements.

Je remercie Janine Schwartzbrod, ma responsable d'équipe, pour sa bonne humeur et pour m'avoir appris à être (très) patient lors de mes démarches administratives avec l'université. Je tiens également à remercier son mari, Louis Schwartzbrod, pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire pour mon année de DEA.

Merci à Florence Menard-Szczebara et Claire Machinal pour leurs encouragements. A travers vous, je remercie l'entreprise Veolia Environnement.

---

---

Je remercie Annick Moreau et Myriam Paris, pour leurs cadeaux amicaux. A travers vous, je remercie l'entreprise Danone.

Bernard Vitoux a suivi mon parcours universitaire depuis ma 2<sup>e</sup> année de DEUG où déjà il me fit confiance pour encadrer les étudiants de 1<sup>ère</sup> année. Il m'a toujours soutenu lors de mon cursus et m'a toujours donné des conseils pertinents et très humains lorsque je doutais du chemin à suivre. C'est désormais au sein de l'Association Bernard Grégory que les doctorants et les jeunes docteurs ont la chance de recevoir ses conseils. Qu'il trouve dans ces quelques lignes, l'expression de ma sincère reconnaissance.

Je tiens à remercier toute l'équipe de mon laboratoire d'accueil et toutes les personnes avec qui j'ai collaboré ou qui m'ont aidé dans mon travail.

Merci à Sandrine L., Catherine, Sandrine B., Laurent, René, David, Leslie, Ju pour tous les services rendus, pour la bonne humeur et les fous rires. Spéciale dédicace à David, fervent supporteur de l'ASNL, qui m'a permis de partager quelques grands matchs du club. Allez Nancy !

A Jean-Claude Block et aux équipes du LCPME du Pôle de l'Eau et de Villers-Lès-Nancy pour leur accueil, leur bonne humeur et pour m'avoir permis d'utiliser leur appareillage.

A Fabien Thomas du Laboratoire Environnement et Minéralurgie (LEM) et à toute l'équipe pour m'avoir accueilli dans leur laboratoire lors de mes mesures d'électrocinétique. Un merci tout particulier à Allan, Yves et Céline.

Sans oublier les anciens, Ben, Thierry, Melinda et Sylvain. J'ai même la chance de retrouver Sylvain comme nouveau collègue au Luxembourg. Comme quoi, nos chemins se séparent peut-être à un moment donné mais le monde de la virologie nous rattrape toujours.

Aux stagiaires, Alice, Bénédicte, Lucie et Fatima que j'ai eu le plaisir d'encadrer. Bonne continuation à vous.

Cette thèse m'a également permis de rencontrer des collègues qui sont devenus mes amis, qui ont compté, comptent et compteront pour moi, malgré la distance qui nous sépare.

Ju et Paulo, tout le temps passé ensemble, entre les journées au labo, les repas, le sport, les soirées (ou devrais-je dire les nuits !) peu communes, nous a même fait envisager le PACS. Mais pour éviter tous conflits avec nos conjointes (et pour que je puisse continuer à savourer les spécialités gastronomiques de Mireille et Vanessa), nous avons opté pour une relation plus consensuelle.

Merci à Leslie, pour son travail sur la filtration des virus, sa bonne humeur et les moments passés avec les adeptes « les Ringards ».

Steph, merci pour ces soirées pleines de complicité, pour les 3<sup>e</sup> mi-temps après les entraînements, pour m'avoir initié à la dégustation des vins grâce au club oenologie. Après un détour par la chimie-microbiologie de l'eau, tu retrouves à présent tes premiers amours viticoles dans le Sud-ouest, je te souhaite de t'éclater dans tes recherches et ta vie personnelle  
Ma Cystéine Préférée.

---

---

Je tiens également à remercier toute l'équipe de Microbiologie du Laboratoire National de Santé du Luxembourg pour m'avoir fait confiance, soutenu et encouragé pendant les dernières semaines qui ont précédé ma soutenance. Je souhaite remercier particulièrement Cathy, Joel, Jos, Laurence et Nadine.

Aurélie, Manu et Philippe, avec qui j'ai partagé de sacrées soirées étudiantes. Nico et François pour leurs récits sur la nature et sur la pêche à la mouche lors de nos apéros express. AnneSo pour nos déjeuners au RU qui vont me manquer. Je vous souhaite, à tous, plein de réussite.

Un grand merci à mes amis de la Tribu qui ont toujours été présents pour moi. Merci pour votre soutien et votre compréhension lorsque j'écourtais nos soirées pour me replonger dans ma thèse.

Marie-Cécile, ma complice éternelle depuis les bancs de la fac, qui ne se débarrassera pas de moi aussi facilement en partant en Suisse.

Laetitia, tu as réussi à supporter le ronchon de fin de thèse, à me canaliser et à me tempérer quand j'en avais besoin. Ta patience et ton soutien m'ont été indispensables, pour ces raisons et bien d'autres encore, un énorme merci.

Pour finir, je remercie infiniment mes parents pour leur soutien indéfectible depuis toujours. Je suis conscient des sacrifices que vous avez faits pour que je puisse m'épanouir et réussir. Vous avez été et vous resterez ma source d'énergie et ma motivation essentielle pour dépasser les difficultés. Je vous dédie ce travail avec tout mon amour et ma reconnaissance éternelle.

---





# ***Table des Matières***

---

<b>Introduction .....</b>	<b>1</b>
<b>Objectifs .....</b>	<b>5</b>
<b><u>Partie 1 : Etude bibliographique .....</u></b>	<b>9</b>
<b>I. LES VIRUS ET LE MILIEU HYDRIQUE.....</b>	<b>10</b>
I. 1. LES VIRUS ENTÉRIQUES PATHOGÈNES.....	10
I. 2. LES BACTÉRIOPHAGES .....	13
<b>II. LES BACTÉRIOPHAGES ARN F-SPÉCIFIQUES .....</b>	<b>18</b>
II. 1 STRUCTURE .....	20
II. 1. 1. Propriétés physiques.....	20
II. 1. 2. Organisation du génome viral et réplication .....	20
II. 1. 2. a) Organisation du génome viral .....	20
II. 1. 2. b) Réplication .....	22
II. 1. 3. La capside.....	23
II. 1. 3. a) Symétrie icosaédrique .....	24
II. 1. 3. b) Capside du phage MS2.....	26
II. 1. 3. c) Organisation structurale de la capside .....	28
II. 1. 3. d) Interactions génome-capside .....	30
II. 2. PHYLOGÉNIE .....	34
II. 3. COMPARAISON DES QUATRE GÉNOGROUPES .....	35
<b>III. LES PROPRIÉTÉS INTERFACIALES DES VIRUS.....</b>	<b>37</b>
III. 1. CHARGE DES VIRUS .....	37
III. 2. DÉTERMINATION DU CARACTÈRE HYDROPHOBE.....	44
<b>IV. LES MECANISMES D'ADHÉSION-AGRÉGATION DES VIRUS.....</b>	<b>47</b>
IV. 1. LES FORCES D'INTERACTIONS COLLOÏDALES .....	47
IV. 2. ASPECTS THÉORIQUES DES MÉCANISMES D'ADHÉSION-AGRÉGATION .....	48
IV. 2. 1. Le mouvement brownien .....	48
IV. 2. 2. La théorie DLVO et ses limites.....	49
IV. 2. 3. Mécanisme d'agrégation .....	51
IV. 3. LES FACTEURS PHYSICO-CHIMIQUES DU MILIEU INFLUENÇANT L'ADHÉSION- AGRÉGATION DES VIRUS .....	52
IV. 2. 1. Le pH.....	53
IV. 2. 2. La composition ionique.....	55
IV. 2. 3. Autres facteurs influençant l'état des particules .....	59

---

**Partie 2 : Etude des propriétés interfaciales des bactériophages ARN F-spécifiques ..... 63**

**I. IMPACT DE LA NATURE DE L'INTERFACE DU BACTÉRIOPHAGE MS2 SUR LES MESURES DE MOBILITÉS ÉLECTROPHORÉTIQUES..... 65**

**II. ETUDE DES PROPRIÉTÉS INTERFACIALES DES BACTÉRIOPHAGES ARN F-SPÉCIFIQUES MS2, GA, QB ET SP ..... 87**

**Partie 3 : Impact des propriétés interfaciales sur le comportement des bactériophages en phase aqueuse ..... 101**

**I. IMPACT DES PROPRIÉTÉS INTERFACIALES DES BACTÉRIOPHAGES SUR LEUR ÉLIMINATION PAR FILTRATION MEMBRANAIRE ..... 102**

**II. IMPACT DE L'AGRÉGATION SUR LA DIMINUTION DES UNITÉS INFECTIEUSES DU PHAGE MS2..... 126**

**III. DISCRIMINATION DE L'AGRÉGATION ET DE L'INACTIVATION..... 135**

III. 1. PRÉPARATION DES SUSPENSIONS VIRALES ..... 135

III. 2. PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL ..... 136

III. 3. RÉSULTATS ET DISCUSSION ..... 139

**Partie 4 : Discussion générale – Conclusion ..... 143**

**Références bibliographiques ..... 153**

*NB* : les références bibliographiques rassemblées à la fin de ce mémoire regroupent la littérature citée dans l'introduction, l'étude bibliographique et la discussion générale. La bibliographie relative aux articles scientifiques se trouve à la fin de chacun d'eux, formatée selon les recommandations de chaque éditeur.

---



# ***Introduction***

La pollution fécale du milieu hydrique peut être à l'origine de la présence de virus pathogènes pour l'homme (virus de gastro-entérites, virus d'hépatites...). Des indicateurs de pollution fécale sont alors utilisés pour estimer la pollution virale. Les indicateurs bactériens sont utilisés depuis des décennies, mais les bactériophages (coliphages somatiques, phages ARN F-spécifiques, phages de *Bacteroides fragilis*) sont considérés comme étant plus représentatifs du comportement des virus (Kott *et al.*, 1974; Dutka *et al.*, 1987; Tartera et Jofre, 1987; Havelaar et Pot-Hogeboom, 1988; Tartera *et al.*, 1988; Borrego *et al.*, 1990; Havelaar *et al.*, 1990; Cornax *et al.*, 1991; Havelaar *et al.*, 1991; IAWPRC-Study-Group-on-Health-Related-Water-Microbiology, 1991; Havelaar *et al.*, 1993). La gestion du risque de contamination virale lié à l'eau demande aussi une parfaite connaissance des capacités de survie des virus et de leur résistance aux traitements des eaux. Ces paramètres sont souvent estimés en laboratoire à l'aide de virus modèles comme par exemple les phages ARN F-spécifiques. Ces bactériophages ont l'avantage d'être détectables par des techniques simples, rapides et peu onéreuses. Ils ont également une taille (~ 25 nm) et une structure voisines de celles des virus entériques pathogènes pour l'homme (*Norovirus*, *virus de l'hépatite A*, *Enterovirus*...). Ainsi, les phages ARN F-spécifiques, en particulier le phage MS2, sont souvent cités comme étant capables de modéliser le comportement des virus pathogènes dans le milieu hydrique.

Hors de leur cellule hôte, les particules virales peuvent être considérées comme des particules biologiques inertes. Leur comportement, en termes d'adhésion à un support (matières en suspensions, fruits de mer, membrane...) ou d'agrégation, est directement lié à leur structure et aux caractéristiques physico-chimiques de leur interface (Gerba, 1984; Schijven et Hassanizadeh, 2000). La notion d'interface est ici définie, non pas comme une limite nette entre le virus et son environnement, souvent assimilée à la surface virale, mais plutôt comme l'espace (de plusieurs nanomètres d'épaisseur) incluant l'ensemble des structures virales qui peuvent interagir avec le milieu environnant.

Depuis plusieurs années, la détermination des caractéristiques physico-chimiques des virus a fait l'objet d'investigations. Ces études ont cherché à caractériser la charge ou le potentiel de surface des virus par des mesures de points isoélectriques ou de potentiel zêta (Overby *et al.*, 1966; Gerba, 1984; Zerda et Gerba, 1984; Yang et Yang, 1996; Kenndler et Blaas, 2001; Hughes *et al.*, 2002; Jin et Flury, 2002; Schaldach *et al.*, 2006) ainsi qu'à définir l'hydrophobie des virus par des techniques de sorption sur des supports dont le caractère hydrophobe est plus ou moins bien connu (Farrah *et al.*, 1981; Farrah, 1982; Shields et Farrah,

1987; Bales *et al.*, 1993; Busscher *et al.*, 1995; Ahimou *et al.*, 2001; van Voorthuizen *et al.*, 2001; Jin et Flury, 2002; Shields et Farrah, 2002). Certaines de ces caractérisations sont pourtant sujettes à des approximations en raison des techniques ou des concepts utilisés. En effet, les méthodes de radiomarquage des virus, souvent utilisées pour la détermination du point isoélectrique ( $pI$ ), peuvent modifier les propriétés des particules virales. Les valeurs de  $pI$  sont d'ailleurs utilisées pour expliquer les différents comportements observés entre virus, en termes d'adhésion-agrégation, en estimant la charge relative des virus à pH neutre. A pH neutre, plus le  $pI$  est faible, plus le virus est considéré comme ayant une charge négative importante (Gerba, 1984; Schijven et Hassanizadeh, 2000; van Voorthuizen *et al.*, 2001). Enfin, dans l'utilisation du potentiel zêta, ce sont les aspects hydrodynamiques des particules biologiques qui sont complètement négligés (Duval et Ohshima, 2006; Duval, 2007).

A l'heure actuelle, les connaissances concernant les propriétés interfaciales des virus sont largement insuffisantes ou trop imprécises pour appréhender leur impact sur les processus d'adhésion-agrégation des virus dans un milieu donné. Ces phénomènes, qui peuvent avoir une importance capitale dans de nombreux cas de figures, sont souvent occultés ou négligés. Par exemple, dans le cadre du traitement des eaux par filtration membranaire, c'est la taille des particules virales et leurs propriétés interfaciales qui définiront l'élimination virale. En effet, la présence d'agrégats viraux ou l'adhésion des virus auront pour effet de surestimer l'efficacité de la membrane à éliminer les virus. Le phage MS2 est d'ailleurs couramment utilisé dans ce contexte mais il n'a jamais été clairement établi si ce modèle représentait le pire cas de figure ou si ce modèle pouvait sous-estimer l'abattement pour certains virus.

De même, l'estimation de la survie des virus en mesurant la décroissance du nombre d'unité infectieuse (UFP pour Unité Formant Plaque) dans un milieu pourrait être très largement influencée par des processus d'adhésion-agrégation, d'autant que la survie est souvent estimée en laboratoire en utilisant de forte concentration en virus modèles. Ainsi, une diminution des unités infectieuses peut être liée à une perte d'infectivité tout comme à une adhésion sur la paroi du support ou encore à une agrégation virale. Par ailleurs, la résistance d'un agrégat viral est différente par rapport à celle de particules isolées.

Que ce soit l'agrégation virale, l'adhésion de virus sur un support ou encore l'élimination de virus par un procédé de filtration membranaire, ce sont les propriétés interfaciales des virus qui gouvernent ces phénomènes.



# ***Objectifs***

L'objectif de ce travail vise, dans un premier temps, à améliorer les connaissances sur les propriétés de l'interface des bactériophages ARN F-spécifiques, souvent utilisés comme modèles des virus entériques pathogènes. Cette interface sera définie avec des techniques respectant l'intégrité des virus et en élaborant des modélisations prenant en compte l'anisotropie structurale et chimique du virus étudié. Les propriétés interfaciales des virus, en termes de charge et d'hydrophobie, seront déterminées au travers de mesures de mobilités électrophorétiques combinées à des mesures de taille dans différentes conditions physico-chimiques. Les conditions pour lesquelles les virus sont à l'état agrégé ou isolé y seront définies.

Dans un deuxième temps, l'objectif est de déterminer l'impact de ces propriétés interfaciales sur le comportement des virus en phase aqueuse. Deux aspects seront abordés : l'élimination des virus par des procédés de filtration membranaire et l'impact de l'agrégation sur l'estimation du nombre d'unités infectieuses. Il serait effectivement intéressant de vérifier si des virus ayant des propriétés interfaciales différentes peuvent présenter des comportements macroscopiques différents vis-à-vis de membranes de filtration ou si l'agrégation peut induire une diminution du nombre d'unités infectieuses.

Ce mémoire s'articule ainsi en quatre grandes parties. Tout d'abord, une première partie est dédiée à l'étude bibliographique des bactériophages ARN F-spécifiques, en particulier du bactériophage MS2. Puis, les deux parties suivantes traitent des différents résultats obtenus, exposés sous forme d'articles scientifiques en anglais. Ces deux parties sont consacrées respectivement à l'étude des propriétés interfaciales des phages ARN F-spécifiques, puis de leur impact sur le comportement des virus en phase aqueuse. Avant chaque publication, un résumé en français synthétise l'essentiel de la problématique, de la démarche scientifique, des résultats et de leur interprétation. Enfin, l'ensemble des résultats sera discuté dans une dernière partie.





***Partie 1 :***

***Etude bibliographique***

## I. LES VIRUS ET LE MILIEU HYDRIQUE

La présence de microorganismes pathogènes dans les eaux reste un problème majeur en termes de santé publique en raison des risques de contamination pour l'homme. Malgré les importants progrès réalisés dans le domaine de la gestion du milieu hydrique, du traitement des eaux usées ou encore de la potabilisation de l'eau, les épidémies d'origine microbiologique transmises via le milieu hydrique affectent chaque année environ 250 millions de personnes dans le monde et provoquent la mort de 10 à 25 millions d'entre elles (World Water and Environmental Engineering, 1996). Ces épidémies surviennent majoritairement dans les pays en voie de développement où les conditions sanitaires sont médiocres. Cependant, un certain nombre de ces épidémies persiste dans les pays industrialisés où le traitement de l'eau est pourtant optimisé.

Les microorganismes pathogènes classiquement retrouvés dans l'eau regroupent les virus entériques, les protozoaires (*Giardia intestinalis*, *Cryptosporidium parvum*...), les bactéries (*Campylobacter jejuni*, *Vibrio cholerae*...), les helminthes (*Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*...). D'après Koopmans *et al.*, 2002, les virus entériques sont les principaux microorganismes responsables des épidémies d'origine hydrique. En effet, les risques de contamination virale sont importants en raison de la forte densité virale dans les eaux usées, de leur importante résistance aux traitements d'épuration (traitements physiques et physico-chimiques) et dans l'environnement, mais aussi en raison de leur très faible dose minimale infectieuse (DMI de l'ordre de 1 à 10 particules infectieuses pour les *Enterovirus*) (Schwartzbrod et Schwartzbrod, 1999; Toze, 1999).

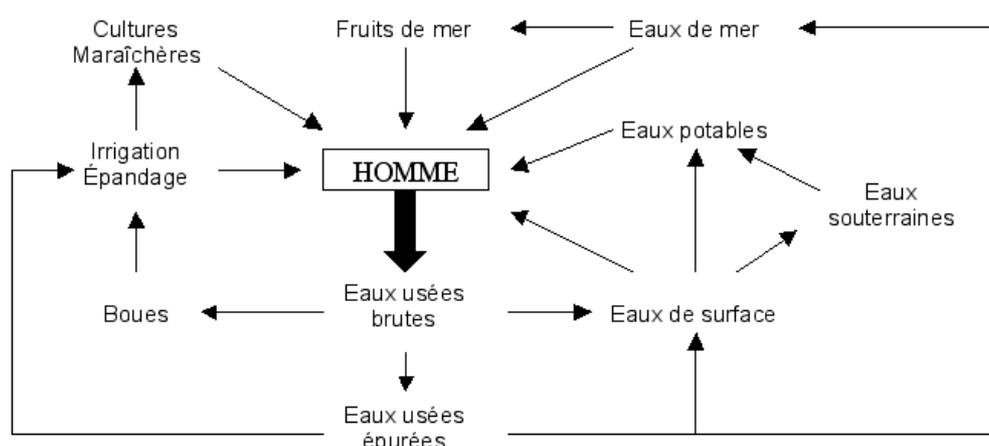
Parmi les virus susceptibles d'être véhiculés par le milieu hydrique, nous citerons les virus entériques pathogènes pour l'homme et nous évoquerons plus particulièrement les bactériophages qui ont été au centre de notre étude.

### I. 1. Les virus entériques pathogènes

Les virus entériques pathogènes pour l'homme sont transmis par voie orale. Ils se multiplient au niveau des cellules du tractus gastro-intestinal et sont rejetés en très grande quantité dans les matières fécales (jusqu'à  $10^{11}$  particules virales/g de selles ; Schwartzbrod, 1991). Cette multiplication peut, soit engendrer des troubles plus ou moins importants chez l'hôte, soit rester asymptomatique. Éliminés avec les selles des individus infectés, les virus

entériques sont rejetés dans les eaux usées avant de contaminer le milieu naturel. Ainsi, selon le cycle de contamination virale classiquement admis (Figure 1), le traitement des eaux usées ou des eaux potables constitue un maillon essentiel pour enrayer la transmission des virus entériques *via* l'environnement.

Ces virus sont incapables de se multiplier dans l'environnement (eaux, boues, coquillages...) car leur multiplication nécessite la présence de cellules hôtes métaboliquement actives. Une particule virale peut donc être considérée dans l'environnement comme une particule inerte. Sa capacité à infecter l'homme via l'environnement dépendra de ses caractéristiques physico-chimiques (propriétés interfaciales, taille...) et de sa capacité à résister aux stress environnementaux.



**Figure 1 : Cycle de contamination virale du milieu hydrique (Schwartzbrod, 1991).**

Les virus ne font partie d'aucun règne mais peuvent être classifiés en fonction de la nature de l'hôte, de la présence ou non d'enveloppe, de la nature de l'acide nucléique ou du type de symétrie de la capsid. Il existe différents niveaux taxinomiques et l'ICTV (Comité International sur la Taxinomie des Virus) et sa session plénière à San Francisco en 2006 (Mayo et Ball, 2006) approuvent 3 ordres (*Mononegavirales*, *Caudovirales* et *Nidovirales*), 73 familles, 9 sous-familles, 287 genres et plus de 6000 virus appartenant à plus de 1950 espèces, incluant les virus satellites, viroïdes et les agents des encéphalopathies spongiformes (prions) d'humains et de plusieurs animaux.

Ainsi les virus entériques pathogènes pour l'homme appartiennent à six familles distinctes (Tableau 1). L'ensemble de ces virus sont « nus » (capsid sans enveloppe) et sont excrétés par l'individu infecté via son système digestif.

**Tableau 1: Principaux virus entériques pathogènes pour l'homme retrouvés dans le milieu hydrique (adapté de la banque de données de l'ICTV et Mayo et Ball, 2006).**

Famille	Genre	Espèces	Taille (nm)	Génome (taille)
<i>Picornaviridae</i>	<i>Enterovirus</i>	<i>Poliovirus</i>	27-30	ARN sb (7,4-7,7 kb)
		<i>Enterovirus Humains A</i>		
		<i>Enterovirus Humains B</i>		
		<i>Enterovirus Humains C</i>		
		<i>Enterovirus Humains D</i>		
	<i>Hepatovirus</i>	<i>Virus de l'hépatite A</i>		
	<i>Parechovirus</i>	<i>Parechovirus humains</i>		
<i>Reoviridae</i>	<i>Orthoreovirus</i>	<i>Reovirus de mammifères</i>	80-85	ARN db segmenté (23,7 kpb)
	<i>Rotavirus</i>	<i>Rotavirus A</i>		ARN db segmenté (16-21 kpb)
		<i>Rotavirus B</i>		
		<i>Rotavirus C</i>		
<i>Caliciviridae</i>	<i>Norovirus</i>	<i>Virus de Norwalk</i>	35-39	ARN sb (7,3-7,7 kb)
	<i>Sapovirus</i>	<i>Sapporo virus</i>		
<i>Hepeviridae</i>	<i>Hepevirus</i>	<i>Virus de l'hépatite E</i>	27-34	ARN sb (7-7,3 kb)
<i>Adenoviridae</i>	<i>Mastadenovirus</i>	<i>Adenovirus humains</i>	70-90	ADN db (30-36 kpb)
<i>Astroviridae</i>	<i>Mamastrovirus</i>	<i>Astrovirus humains</i>	27-30	ARN sb (6,8-7,9 kb)

sb : simple brin ; db : double brin ; kb : kilobases ; kpb : kilopaires de bases.

A noter que la majorité des virus entériques pathogènes, à l'exception des *Reoviridae* et des *Adenoviridae*, sont des virus nus de 27 à 39 nm de diamètre et constitués d'un ARN entre 6,8 et 7,9 kb. Leur capsid est généralement constituée de une à quatre protéines.

D'un point de vue épidémiologique, les *Norovirus* et les *virus de l'hépatite A* (VHA) posent un réel problème de santé publique en raison de leur forte probabilité à contaminer l'eau ou un aliment et par le nombre important d'épidémies rapportées dans la littérature (Koopmans *et al.*, 2000).

## I. 2. Les bactériophages

Parallèlement aux virus entériques pathogènes pour l'homme, d'autres virus appelés bactériophages (ou phages) peuvent également être retrouvés dans le milieu hydrique. Comme tout virus, le bactériophage nécessite un hôte spécifique, en l'occurrence une bactérie.

A l'heure actuelle, 5568 phages ont été répertoriés et observés par microscopie électronique (Ackermann, 2007) depuis la création de la coloration négative en 1959. Selon l'ICTV, un seul ordre est reconnu pour les bactériophages : les *Caudovirales* ou phages à queue. En effet, d'un point de vue morphologique, la grande majorité des phages répertoriés (5360 soit plus de 96 %) possèdent une queue. Ils appartiennent aux 3 familles, *Myoviridae*, *Podoviridae*, *Siphoviridae* représentant respectivement environ 24 %, 14 % et 59 % des phages.

Les autres bactériophages, regroupés sous l'appellation PFP en raison de leur morphologie (**P**olyèdre, **F**ilamenteux, **P**léomorphe), 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, 2007, Ackermann, 2007).

Les noms de 5000 phages sont disponibles sur Internet (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/index.htm> et <http://www.mansfield.ohio-state.edu/~sabedon/names.htm>).

La classification des bactériophages, adaptée de l'ICTV et d'Ackermann (2007), est présentée dans le tableau 2. La morphologie caractéristique des différentes familles de phages est illustrée sur la figure 2. Il en ressort que les bactériophages sont majoritairement des virus nus à ADN double brin (> 96%). Les seuls bactériophages qui présentent une structure voisine de celle des virus entériques pathogènes pour l'homme sont les *Leviviridae* (capside polyédrique et génome à ARN simple brin).

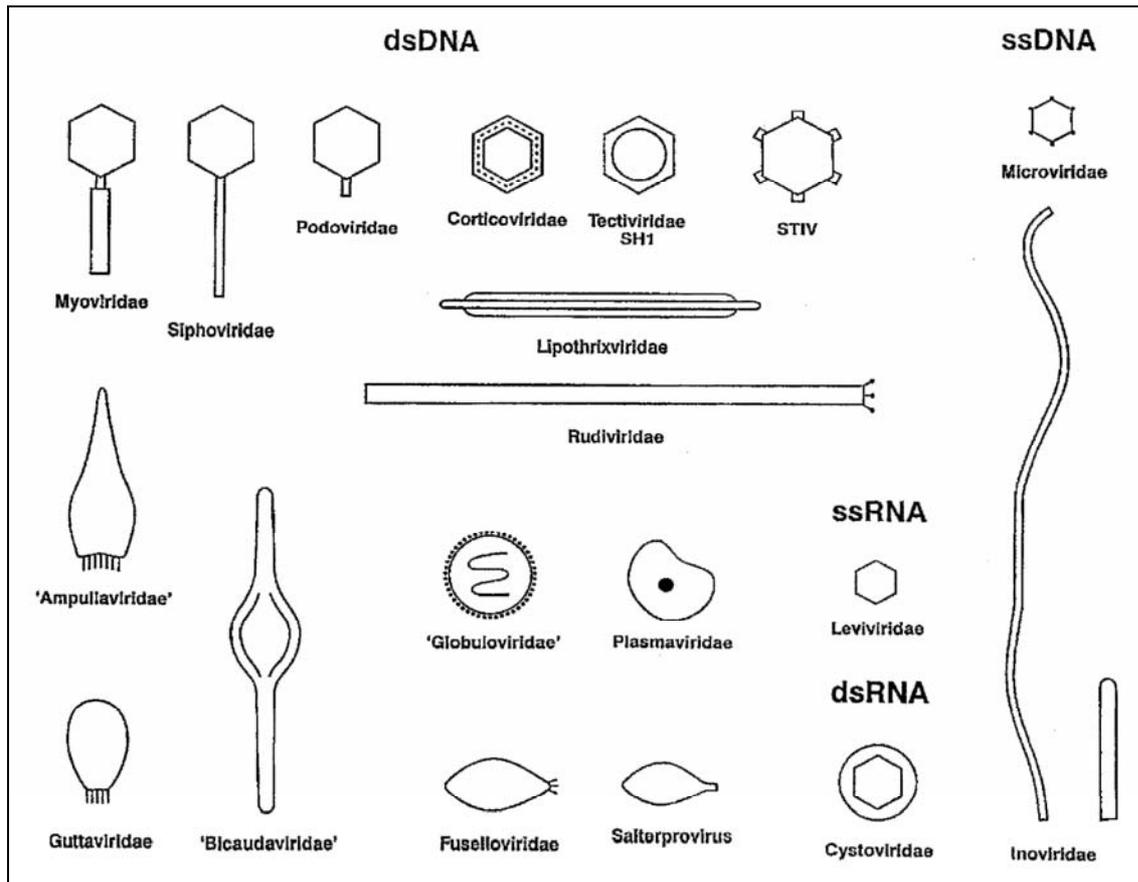


Figure 2: Représentation schématique des principaux groupes de bactériophages (Ackermann, 2007). Légende : dsDNA = ADN double brin ; ssDNA = ADN simple brin ; ssRNA = ARN simple brin ; dsRNA = ARN double brin.

**Tableau 2 : Classification des bactériophages observés par microscopie (adaptée de la banque de données de l'ICTV et d'Ackermann, 2007).**

Famille	Genre	Membres	Morphologie	Enveloppe lipidique ou présence de lipides	Taille (nm)	Génome (taille)	Exemples	
<i>Myoviridae</i>	<i>virus T4-like</i>	1320	Queue contractile	Non	65*95	ADN db L (39-169 kpb)	Phages T4, T2, P1, Mu	
	<i>virus P1-like</i>							
	<i>virus P2-like</i>							
	<i>virus Mu-like</i>							
<i>Podoviridae</i>	<i>phages SP01-like</i>	771	Queue courte		47	ADN db L (19-44 kpb)	Phages T7, φ29, P22, N4	
	<i>virus T7-like</i>							
	<i>virus φ29-like</i>							
	<i>virus P22-like</i>							
<i>Siphoviridae</i>	<i>virus N4-like</i>	3269	Queue longue non contractile		54*105	ADN db L (22-121 kpb)	Phages λ, T1, T5, N15	
	<i>virus φC13-like</i>							
	<i>virus λ-like</i>							
	<i>virus T1-like</i>							
	<i>virus T5-like</i>							
	<i>virus L5-like</i>							
<i>Corticoviridae</i>	<i>Corticovirus</i>	1	Polyédrique	Oui	60	ADN db C et S (22-121 kpb)	Phage PM2	
	<i>Cystovirus</i>	3			86	ARN db L et Seg (22-121 kpb)	Phage φ6	
<i>Inoviridae</i>	<i>Inovirus</i>	66	Filamenteux	Non	760-1950*7	ADN sb C (7-9 kb)	Phages fd, ML-V1	
	<i>Plectovirus</i>							
<i>Leviviridae</i>	<i>Levivirus</i>	38	Polyédrique		22-30	ARN sb L (3-4 kb)	Phages MS2, GA, QB, SP	
	<i>Allolevivirus</i>							
<i>Microviridae</i>	<i>Microvirus</i>	38	Polyédrique		27	ADN sb C (4-6 kpb)	Phage φX174, MAC-1, 4	
	<i>Spiromicrovirus</i>							
	<i>Bdellomicrovirus</i>							
	<i>Chlamydiamicrovirus</i>							
<i>Plasmaviridae</i>	<i>Plasmavirus</i>	5	Pléomorphique		Oui	50-125	ADN db C et S (22-121 kpb)	Phage L2
<i>Tectiviridae</i>	<i>Tectivirus</i>	19	Polyédrique			63	ADN db L (22-121 kpb)	Phage PRD1
<i>Fuselloviridae</i>	<i>Fusellovirus</i>	10	Pléomorphique		Non	60*100	ADN db C et S (22-121 kpb)	Phage SSV1
<i>Lipothrixviridae</i>	<i>Alphalipothrixvirus</i>	7	Filamenteux		Oui	24-38*410-1950	ADN db L (22-121 kpb)	Phages TTV-1, SIFV, AFV-1
	<i>Betalipothrixvirus</i>							
	<i>Gammalipothrixvirus</i>							
<i>Rudiviridae</i>	<i>Rudivirus</i>	3		Non	/	ADN db L (22-121 kpb)	Phage SIRV-1	
<i>Guttaviridae</i>	<i>Guttavirus</i>	1	Pléomorphique	Oui	70-95*110-185	ADN db C (20 kpb)	Phage SNDV	
<i>Ampullaviridae</i> <sup>◇</sup>	/	1	Pléomorphique	Oui	230*75	ADN db L (23,8 kpb)	Phage ABV	
<i>Bicaudaviridae</i> <sup>◇</sup>	/	2	Pléomorphique	Non	300*120	ADN db C (62,7 kpb)	Phage ATV	
<i>Globuloviridae</i> <sup>◇</sup>	/	2	Pléomorphique	Oui	100	ADN db L (28,3 kpb)	Phage PSV	
/	<i>Salterprovirus</i>	1	Pléomorphique	Non	44*74 (+ queue de 7 nm)	ADN db C et S (14,5 kpb)	Phage His1	
Groupe SH1*	SH1	1	Polyédrique	Oui	70	ADN db L (31 kb)	Phage SH1	
Groupe STV1	STV1	1	Polyédrique	Membrane interne	74	ADN db C (17,6 kpb)	Phage STV1	
/	/	9	Polyédrique	/	/	/	/	

sb: simple brin ; db: double brin ; C : circulaire ; L : linéaire ; S : superhélice ; Seg : segmenté ; kb: kilobases ; kpb : kilopaires de bases ; / : non communiqué ; <sup>◇</sup> classification en attente.

Parmi ces phages, certains infectent spécifiquement les entérobactéries : ce sont les entérobactériophages. Ces phages se multiplient aux dépens de bactéries du tractus digestif. Ils sont ensuite excrétés en très grande quantité dans les matières fécales. Enfin, ils sont disséminés dans l'environnement comme les virus entériques pathogènes. On peut ainsi les appeler des bactériophages fécaux. Actuellement, environ 1000 phages d'entérobactéries ont été répertoriés (906 phages à queue et 76 phages PFP). Trois catégories de bactériophages fécaux ont été proposées en tant qu'**indicateur alternatif de pollution fécale** d'origine virale dans le milieu hydrique : les coliphages somatiques, les bactériophages ARN F-spécifiques et les phages de *Bacteroides fragilis* (Kott *et al.*, 1974; Dutka *et al.*, 1987; Tartera et Jofre, 1987; Havelaar et Pot-Hogeboom, 1988; Tartera *et al.*, 1988; Borrego *et al.*, 1990; Cornax *et al.*, 1991; IAWPRC-Study-Group-on-Health-Related-Water-Microbiology, 1991).

Les coliphages somatiques représentent un groupe très hétérogène de phages à ADN issus de 4 familles différentes, à savoir les *Myoviridae*, les *Siphoviridae*, les *Podoviridae* et les *Microviridae*. Ils infectent *E. coli* par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques localisés au niveau de la paroi bactérienne (= *soma*). Or *E. coli* fait partie de la flore intestinale des hommes et des animaux.

Les phages de *Bacteroides fragilis* constituent, à l'inverse des coliphages somatiques, un groupe homogène puisqu'ils appartiennent tous à la famille des *Siphoviridae*. L'infection de la bactérie hôte, *Bacteroides fragilis*, s'effectue de la même manière que pour les coliphages somatiques, c'est-à-dire à partir d'un récepteur situé au niveau de la paroi. C'est une bactérie qui fait partie de la flore anaérobie dominante du tractus intestinal de l'homme et des animaux.

Enfin, les bactériophages ARN F-spécifiques et ADN F-spécifiques regroupent quant à eux des phages provenant respectivement de la famille des *Leviviridae* et des *Inoviridae*. Ces phages à ARN et à ADN infectent spécifiquement les bactéries possédant des pili sexuels ou F-pili dont *E. coli*.

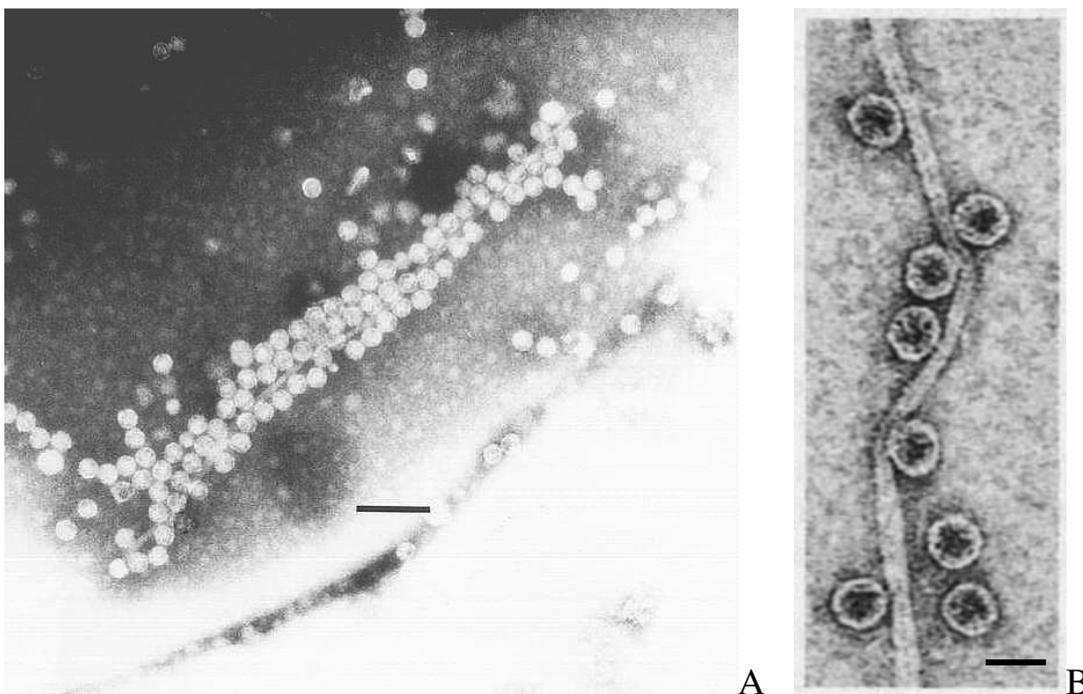
Dans une étude récente, Savichtcheva et Okabe, 2006, font le point sur les limites des indicateurs bactériens de pollution fécale conventionnels. Historiquement, les coliformes fécaux et totaux et les entérocoques sont utilisés pour tester la qualité microbiologique de l'eau et pour prédire la présence de bactéries, protozoaires et virus pathogènes pour l'homme. Cependant, ces indicateurs présentent de nombreuses limites : ils sont capables de se multiplier dans la colonne d'eau (Solo-Gabriele *et al.*, 2000; Desmarais *et al.*, 2002), ils sont très sensibles aux procédés de désinfection (Hurst *et al.*, 2002), ils sont incapables de

discriminer l'origine humaine ou animale de la pollution fécale (Field *et al.*, 2003), ils présentent une faible corrélation avec la présence de pathogènes et une faible sensibilité des méthodes de détection a été relatée (Winfield et Groisman, 2003; Horman *et al.*, 2004). Ainsi, aucun des indicateurs bactériens couramment utilisés ne présente tous les critères idéaux pour établir la qualité d'une eau et notamment la présence de virus pathogènes. Pour palier à ces limites, des **indicateurs alternatifs** ont été proposés, dont des bactériophages. Un des avantages majeurs des phages, comparés aux virus pathogènes, est qu'ils sont détectables par des techniques simples, rapides et peu onéreuses. La quantité de phages est dix fois supérieure à celle des virus entériques dans des échantillons environnementaux (Tartera *et al.*, 1988; Chung et Sobsey, 1993). Ils sont au moins aussi résistants que les virus entériques pathogènes au stress environnemental et aux procédés de désinfection et présentent une survie supérieure à celle des indicateurs bactériens (Grabow *et al.*, 2001). Ils peuvent également discriminer l'origine animale et humaine de la pollution fécale par le génotypage des bactériophages ARN F-spécifiques (Ogorzaly et Gantzer, 2006).

## II. LES BACTERIOPHAGES ARN F-SPECIFIQUES

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

Ils infectent les bactéries possédant des pili sexuels ou F-pili (Figure 3). Ils sont capables d'infecter non seulement les entérobactéries, telles que *Escherichia coli*, mais également les espèces du genre *Caulobacter*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter* et probablement beaucoup d'autres bactéries Gram négatif exprimant le pili approprié à leur surface. Les bactériophages ARN F-spécifiques, ayant une structure voisine des virus entériques pathogènes pour l'homme (*Norovirus*, *virus de l'hépatite A*, *Enterovirus...*), sont souvent utilisés comme modèle d'étude du devenir des virus dans le milieu hydrique (inactivation, adhésion, transport...) (Bales *et al.*, 1993).



**Figure 3 : *Escherichia coli* avec des bactériophages MS2 attachés aux F-pili.**

**A.** Echantillons contrastés avec de l'acide phosphotungstique (PTA) à 2 %. Le trait représente 100 nm. Les microphotographies sont prises avec un microscope électronique Philips EM 300 à 60 kV (Ackermann et Dubow, 1987)

**B.** Echantillons contrastés (coloration négative) avec de l'acétate d'uranyle à 0.2 %. Le trait représente 25 nm. Les microphotographies sont prises avec un microscope électronique JEOL-100C (Date, 1979).

La famille des *Leviviridae* contient deux genres : les *Levivirus* et les *Allolevivirus*. Par exemple, les phages MS2 et GA appartiennent au genre *Levivirus* alors que Q $\beta$  et SP font partie du genre *Allolevivirus* (Tableau 3).

**Tableau 3 : Classification des *Leviviridae* (adaptée du 8<sup>e</sup> rapport du Comité International de Taxinomie des Virus et de la section de taxinomie du “National Center for Biotechnology Information”).**

Famille	Genre	Génogroupe	Espèce type	Souches
<i>Leviviridae</i>	<i>Levivirus</i>	Génogroupe I	<i>Enterobacteria phage MS2 sensu lato</i> <sup>a</sup>	Enterobacteria phage f2 Enterobacteria phage fr Enterobacteria phage JP501 Enterobacteria phage M12 Enterobacteria phage R17 Enterobacteria phage ZR Enterobacteria phage MS2
		Génogroupe II	<i>Enterobacteria phage BZ13 sensu lato</i>	Enterobacteria phage GA Enterobacteria phage JP34 Enterobacteria phage KU1 Enterobacteria phage TH1 Enterobacteria phage BO1 Enterobacteria phage BZ13 Enterobacteria phage JP500 Enterobacteria phage SD Enterobacteria phage TL2
		“Espèces provisoires”		Acinetobacter phage AP205 Pseudomonas phage PP7
	<i>Allolevivirus</i>	Génogroupe III	<i>Enterobacteria phage Q<math>\beta</math> sensu lato</i>	Enterobacteria phage M11 Enterobacteria phage MX1 Enterobacteria phage ST Enterobacteria phage TW18 Enterobacteria phage VK Enterobacteria phage Q $\beta$
		Génogroupe IV	<i>Enterobacteria phage F1 sensu lato</i>	Enterobacteria phage ID2 Enterobacteria phage NL95 Enterobacteria phage SP Enterobacteria phage TW28 Enterobacteria phage TW19 Enterobacteria phage F1
	33 phages infectant <i>Caulobacter</i> , <i>Enterobacteria</i> et <i>Pseudomonas</i> non classés			

<sup>a</sup> *sensu lato* : dans le sens large.

## II. 1 Structure

### II. 1. 1. Propriétés physiques

Des expériences de sédimentation et de diffusion (de lumière ou de neutrons aux petits angles) ont permis de déterminer la masse moléculaire des phages MS2 et Q $\beta$ . Leur masse moléculaire totale est de l'ordre de 3,6-5,3 10<sup>6</sup> Da. Des expériences récentes (Kuzmanovic *et al.*, 2003) ont montré que la masse moléculaire du génome (ARN) du phage MS2 représentait plus de 40 % de la masse moléculaire totale du phage. L'ensemble des informations concernant les masses moléculaires de MS2 et Q $\beta$  est résumé dans le tableau 4.

**Tableau 4 : Résumé des masses moléculaires de MS2 et Q $\beta$ .**

**MM : Masse moléculaire ; Da : Dalton (1 Da = 1 g/mol) ; s<sub>20,w</sub> : coefficient de sédimentation en conditions standard.**

Bactériophage	Expériences de sédimentation analytique		Expériences de diffusion		
	MM <sub>TOTAL</sub> (x 10 <sup>6</sup> Da)	s <sub>20,w</sub>	MM <sub>TOTAL</sub> (x 10 <sup>6</sup> Da)	MM <sub>PROTEINES</sub> (x 10 <sup>6</sup> Da)	MM <sub>ARN</sub> (x 10 <sup>6</sup> Da)
	5,3 ± 0,6 <sup>a</sup>	81,5 <sup>a</sup>	3,7 ± 0,2 <sup>e</sup>	2,1 ± 0,1 <sup>e</sup>	1,6 ± 0,1 <sup>e</sup>
MS2	3,8 <sup>c</sup> 3,87 <sup>d</sup>		3,6 <sup>c,d</sup>	2,2 <sup>c</sup>	
Q $\beta$	4,55 <sup>b</sup>	88,4 <sup>b</sup>	4,2 <sup>d</sup>		

<sup>a</sup> Möller, 1964 ; <sup>b</sup> Camerini-Otero *et al.*, 1974 ; <sup>c</sup> Strauss et Sinsheimer, 1963 ; <sup>d</sup> Overby *et al.*, 1966 ; <sup>e</sup> Kuzmanovic *et al.*, 2003

### II. 1. 2. Organisation du génome viral et réplication

#### II. 1. 2. a) Organisation du génome viral

Le génome des bactériophages ARN F-spécifiques est constitué d'un ARN simple brin non segmenté de polarité positive et il présente quatre gènes (Figure 4). Trois gènes sont communs à la famille des *Leviviridae* alors que le quatrième est dépendant du genre auquel appartient le phage. Les gènes communs sont ceux codant pour :

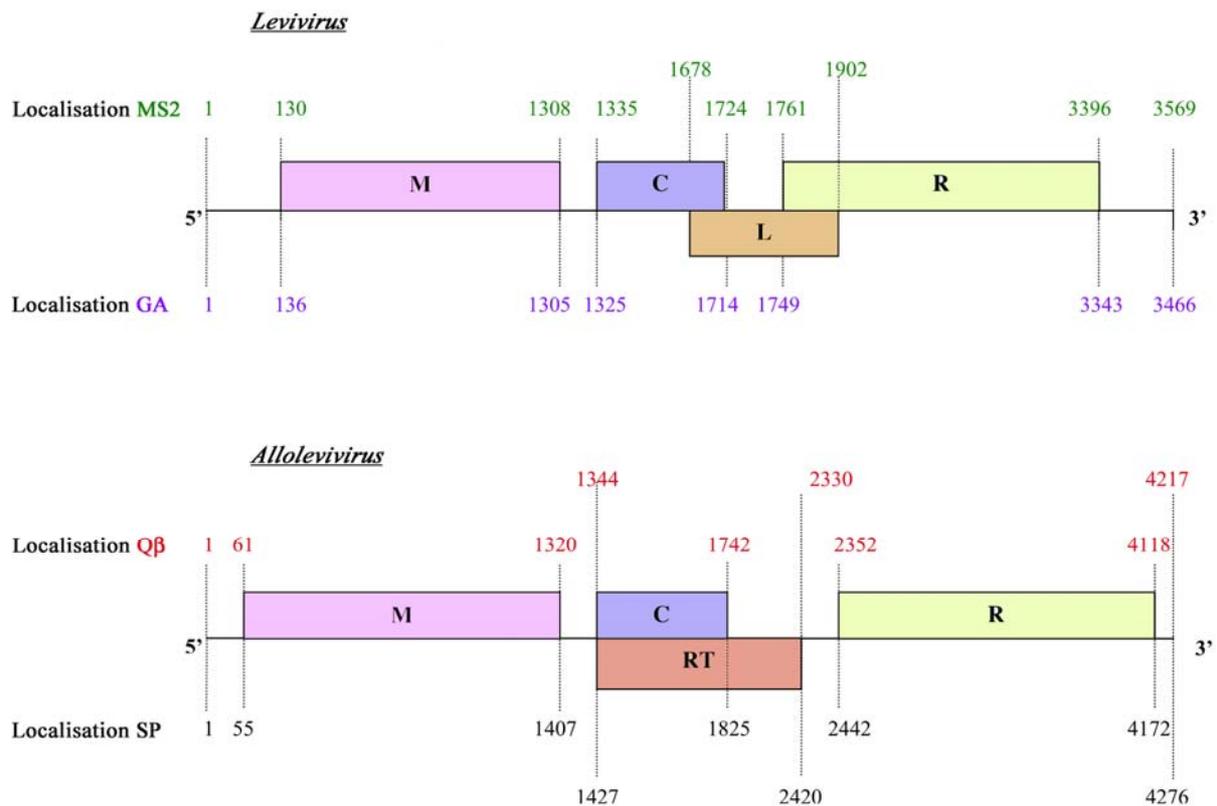
- la protéine de maturation, nécessaire à la reconnaissance du site de fixation au niveau du pili sexuel de la bactérie hôte ;

- la protéine de capsid, unité constitutive de base de la capsid ;

- la réplicase, nécessaire à la multiplication du génome viral au sein de la cellule hôte.

Celle-ci est une ARN polymérase ARN dépendante.

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



**Figure 4: Organisation génétique de l'ARN des bactériophages MS2, GA, Qβ et SP (Inokuchi *et al.*, 1986; Inokuchi *et al.*, 1988; Priano *et al.*, 1995; Bollback et Huelsenbeck, 2001).**

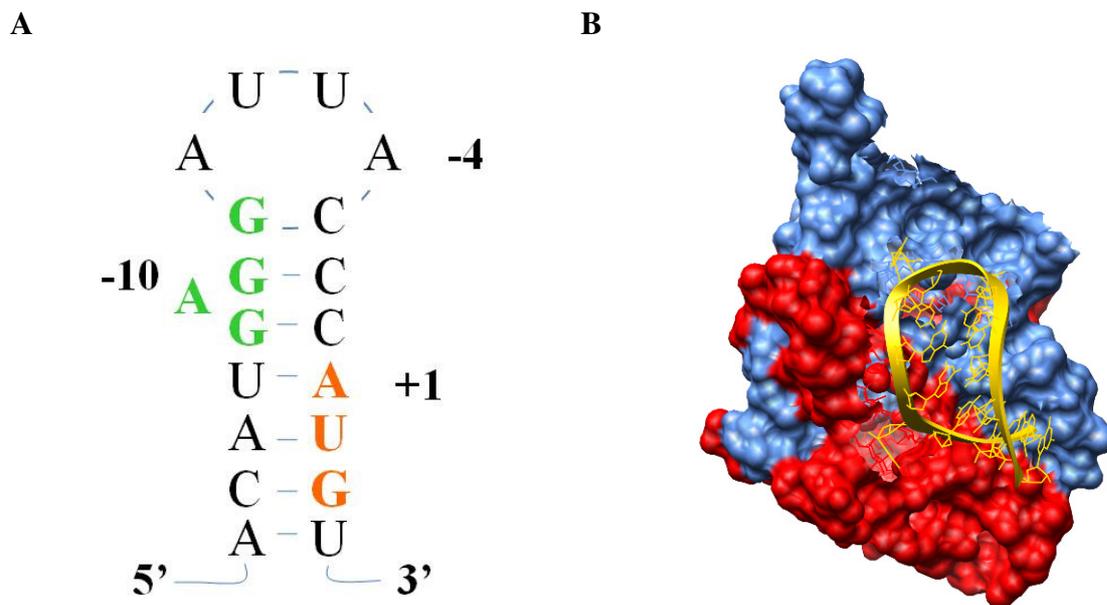
**M : gène de la protéine de maturation, C : gène de la protéine de capsid, R : gène de la réplicase, L : gène de la protéine de lyse, RT : gène de la protéine « readthrough ».**

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

De nombreuses structures secondaires du génome ont été décrites pour ces phages notamment pour les phages MS2 et Qβ (Min Jou *et al.*, 1972; Ball, 1973; Fiers *et al.*, 1976; Jacobson, 1976; Edlind et Bassel, 1977; Hasegawa *et al.*, 1979; Iserentant et Fiers, 1979; Adhin *et al.*,

1990; Skripkin *et al.*, 1990; Guisez *et al.*, 1993; Beekwilder *et al.*, 1995; Groeneveld *et al.*, 1995; Beekwilder *et al.*, 1996; Jacobson *et al.*, 1998). Ces structures secondaires ont des rôles importants. Par exemple, la figure 5A présente la structure secondaire en « tige-boucle » d'une partie du gène codant pour la réplicase. Cette structure joue un rôle majeur dans la régulation de la traduction.

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



**Figure 5 : A.** Structure secondaire « tige-boucle » de l'opérateur ARN de 19 nucléotides au début du gène codant pour la réplicase. En vert, la séquence Shine-Dalgarno qui est le site de fixation du ribosome sur l'ARN pour la traduction. En orange, le codon d'initiation START correspondant au début de la séquence codante du gène.

**B.** Complexe entre un dimère de protéines de capside (les protéines sont en bleu et en rouge) et la structure secondaire de l'opérateur ARN (en jaune) du gène de la réplicase (Valegård *et al.*, 1997; van den Worm *et al.*, 1998; Helgstrand *et al.*, 2002). Fichier PDB 2IZ8 visualisé avec le logiciel UCSF Chimera.

### II. 1. 2. b) Réplication

Les membres de la famille des *Leviviridae*, qui se multiplient dans *E. coli*, s'adsorbent sur le F-pili (pili sexuel ou de Fertilité). Les « non-coliphages » tels que Pseudomonas phage PP7 et Acinetobacter phage AP205 se lient à d'autres pili (fimbriae). La reconnaissance spécifique entre la capside virale et le récepteur bactérien, situé au niveau des pili sexuels, permet à l'ARN viral de pénétrer dans le cytoplasme bactérien. Les régions codantes de

l'ARN sont ensuite traduites en protéines par les ribosomes bactériens. L'ARN viral encode une réplicase, laquelle s'assemble avec trois protéines de l'hôte (la protéine ribosomale S1 et les facteurs d'élongation de la traduction EF-Tu et EF-Ts) pour former l'ARN polymérase active. Une quatrième protéine, Facteur Hôte, qui n'est pas associée au complexe de la polymérase mais agit directement sur l'ARN, est nécessaire pour la synthèse du brin négatif. Les membres des deux genres utilisent différents Facteurs Hôtes (Wagner et Hewlett, 2004). La synthèse du brin positif nécessite, sans compter le gène viral codant pour la réplicase, uniquement EF-Tu et EF-Ts comme cofacteurs. Plus tard dans l'infection, les dimères de protéines de capsid agissent comme répresseurs traductionnels de la réplicase en se liant sur une structure de type « tige-boucle » ou « épingle à cheveux » de l'ARN, l'opérateur, qui contient le site d'initiation de la traduction de ce gène (Figure 5). Le complexe ARN-protéine est considéré comme étant également le site de nucléation pour l'encapsidation (Figure 5B). Les virions s'assemblent dans le cytoplasme autour de l'ARN viral. L'infection entraîne une lyse bactérienne relarguant des milliers de phages par cellule. La protéine de lyse permet d'activer d'une manière ou d'une autre les autolysines bactériennes entraînant la dégradation du réseau de peptidoglycanes.

### **II. 1. 3. La capsid**

La capsid est une « coque » qui entoure et protège l'acide nucléique viral. Pour les virus nus, elle intervient également dans l'attachement du virus à la cellule hôte. Elle est constituée par l'assemblage d'unités structurales protéiques qui se répètent et qui peuvent se regrouper en unités morphologiques : les capsomères.

La structure de la capsid définit la forme du virus, ce qui permet de distinguer deux groupes principaux de virus : les virus à symétrie cubique et les virus à symétrie hélicoïdale.

Les virus entériques et les bactériophages ARN F-spécifiques sont à symétrie cubique et ont une forme quasi-sphérique, dite « icosaédrique ». Caspar et Klug, 1962 ont montré que la symétrie icosaédrique était la mieux adaptée pour l'assemblage de capsides sphériques à partir de sous-unités protéiques. Le terme icosaédrique ne s'applique cependant pas à la forme du virus, puisque les virus ont le plus souvent à leur surface des protubérances (protomères), mais à la symétrie de la structure de la capsid du virus. Les protéines de la capsid s'auto-assemblent spontanément.

Les autres virus ayant une symétrie hélicoïdale, les protéines de la capsid ne s'auto-assemblent pas spontanément, mais elles s'assemblent autour de l'acide nucléique qui sert

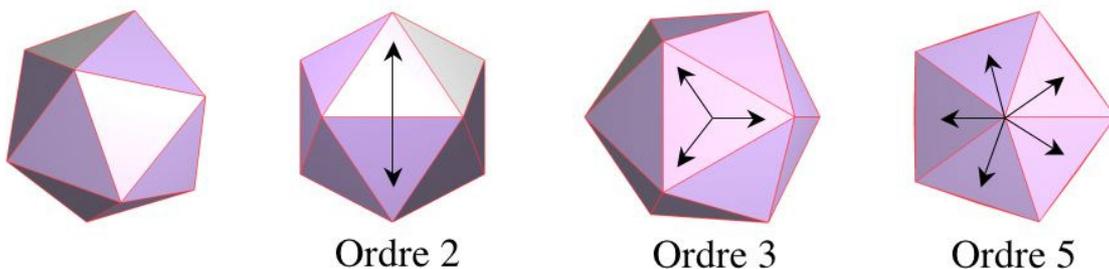
d' « échafaudage ». Parmi ce type de virus, les plus connus sont les *Rhabdoviridae* (virus de la rage), les *Orthomyxoviridae* (virus grippaux) et surtout les *Virus de la Mosaïque du Tabac* (VMT), qui furent les premiers virus observés par microscopie électronique vers la fin des années 1930.

Seuls les virus icosaédriques sont abordés ici.

### II. 1. 3. a) Symétrie icosaédrique

Un icosaèdre se compose de 20 faces, 12 sommets et 30 arêtes. Il présente trois ordres de rotation (Figure 6) :

- la rotation d'ordre 2, avec 15 axes passant par les milieux de 2 arêtes opposées,
- la rotation d'ordre 3, avec 10 axes passant par les centres de 2 faces opposées,
- la rotation d'ordre 5, avec 6 axes passant par 2 sommets opposés.

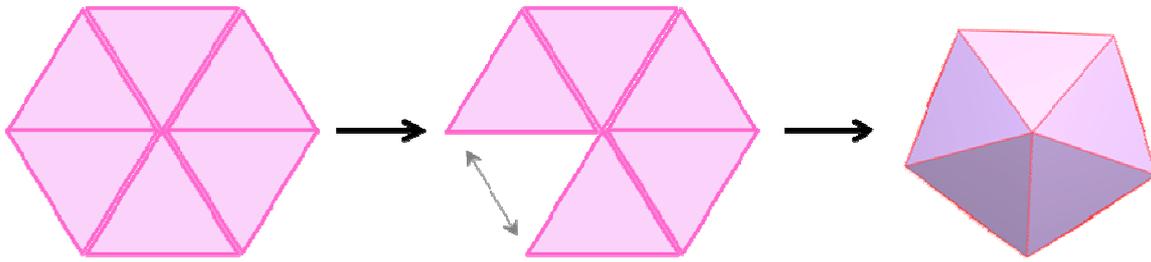


**Figure 6 : Symétrie d'un icosaèdre comprenant des axes de rotation d'ordre 2, 3 et 5.**

Les protéines de la capsid ne sont pas des objets symétriques, aucun axe de symétrie ne peut passer par elles. Il doit donc y avoir plus d'une protéine par face triangulaire. Une face triangulaire ayant une symétrie d'ordre 3, il est facile d'en déduire que chaque face peut être divisée en trois « unités asymétriques », chacune contenant une protéine ou « sous-unité asymétrique », et reliées entre elles par un axe d'ordre 3. Les plus petits virus sphériques ont une capsid composée de 60 protéines. Ces virus sont plutôt rares et, en fait, la majorité des virus possède un génome trop grand pour être empaqueté dans un assemblage de 60 protéines seulement. Pour les autres virus, Caspar et Klug ont montré, bien avant que la première structure atomique de virus ne soit résolue, que seuls certains multiples de 60 permettent la formation de capsides icosaédriques.

Le virus le plus simple comprend donc 60 unités asymétriques. Un icosaèdre de 60 unités est donc constitué de 12 pentamères. Pour obtenir un pentamère, il suffit de supprimer l'un des six triangles équilatéraux constitutifs d'un hexagone isolé. Or, si l'on supprime l'un

de ces triangles pour créer un pentamère, il faut induire une courbure pour relier les deux côtés laissés libres (Figure 7).



**Figure 7 : Formation d'un pentamère à partir d'un hexagone dépourvu d'un de ses triangles équilatéraux.**

Lorsque la courbure est répétée 12 fois sur les 12 pentamères, on obtient alors un icosaèdre. Si l'hexagone n'est pas isolé, mais fait partie d'un réseau, le réseau entier subira une courbure pour la construction du pentamère. Si les hexagones choisis ne sont pas adjacents, on obtiendra une structure plus grosse.

Chaque unité asymétrique peut être constituée de plusieurs protéines différentes ou identiques en séquence d'acides aminés. Le nombre de protéines constituant une unité est appelé **nombre de triangulation T** et obéit à une formule mathématique. On peut définir le nombre de triangulation T qui est le carré de la distance d entre deux axes d'ordre 5 adjacents :

$$T = d^2 = h^2 + k^2 + 2hk\cos 60^\circ$$

ce qui revient à :

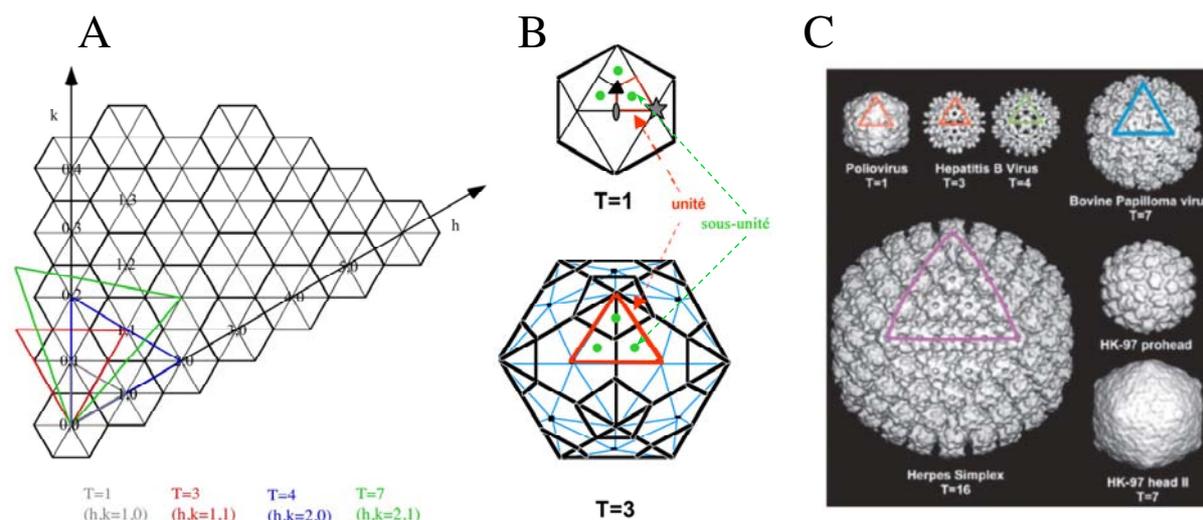
$$T = h^2 + hk + k^2$$

où h et k sont deux axes portés par les côtés d'un triangle équilatéral, en prenant pour origine un axe 5 dans le plan (Figure 8A).

La position des autres axes d'ordre 5 des pentamères dans le plan pourra être indexée selon un nombre de pas pris le long de h et k, reliés entre eux par un angle de  $60^\circ$ .

Dans ce modèle, les capsides seront composées de  $60T$  protéines, ou autrement dit de 12 pentamères plus  $10(T-1)$  hexamères.

On dit que les protéines s'assemblent de façon « quasi-équivalente » dans le cas où des protéines identiques forment la capsid, ou « pseudo-équivalente » si la capsid est constituée de protéines différentes. La capsid des *Leviviridae* est organisée selon une symétrie cubique  $T=3$ , où chacune des 60 unités asymétriques est composée de trois protéines (Figure 8).



**Figure 8 : A. Construction d'icosaèdres quasi-équivalents avec un réseau d'hexamères et d'axes  $(h, k)$  (Caspar et Klug, 1962; Johnson et Speir, 1997).**

**B. Icosaèdre  $T=1$  où chacune des 60 unités contient une seule protéine et un icosaèdre  $T=3$ , où  $h=k=1$  et chaque unité contient trois protéines.**

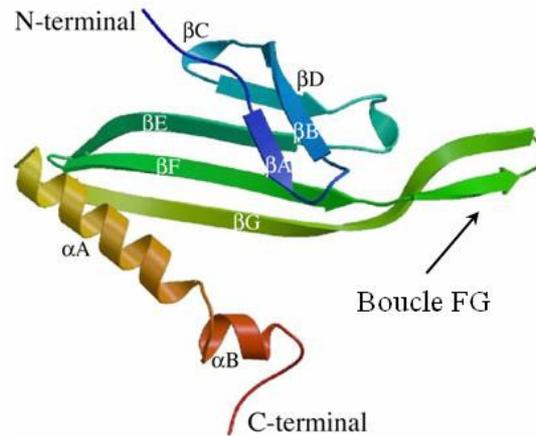
**C. Exemples de symétrie virale.**

### II. 1. 3. b) Capside du phage MS2

Les bactériophages ARN F-spécifiques présentent des caractères structuraux similaires au niveau de la capsid. Ainsi, seul le bactériophage MS2 sera pris comme « modèle » pour expliquer la structure et l'organisation de la capsid.

Le phage MS2 infectieux est composé d'une protéine de capsid (ou protéine majeure) de 13700 Da, d'une protéine de maturation (ou protéine A ou encore protéine mineure) de 44000 Da et d'une molécule d'ARN simple brin. La protéine de capsid est la protéine constitutive majoritaire du bactériophage, présente en 180 copies, alors que la protéine A n'est présente qu'en un seul exemplaire. Les particularités de la protéine de maturation seront discutées dans le paragraphe « Interactions capsid-génome ».

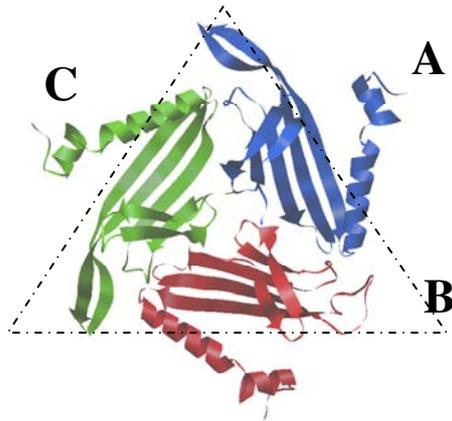
La protéine de capsid de MS2 possède une structure tertiaire et une topologie atypiques ne ressemblant pas aux autres virus icosaédriques, qui eux possèdent une structure  $\beta$ -sandwich (les feuillets  $\beta$  sont disposés de manière à former un « sandwich »). La chaîne principale de la protéine de capsid se replie en 7 feuillets  $\beta$ , nommés de  $\beta A$  à  $\beta G$ , et en 2 hélices  $\alpha A$  et  $\alpha B$  (Figure 9).



**Figure 9 : Structures tertiaires de la protéine de capsid du bactériophage MS2 comprenant 7 feuillets  $\beta$  ( $\beta$ A à  $\beta$ G) et 2 hélices  $\alpha$ A et  $\alpha$ B (Référence PDB : 2MS2).**

De plus, la protéine de capsid est présente sous trois conformations différentes : A, B et C. Le repliement de ces trois conformations est identique sauf au niveau de la boucle FG. En effet, dans les conformations A et C, les 2 feuillets  $\beta$ F et  $\beta$ G sont prolongés et il existe cinq ponts hydrogène supplémentaires entre les feuillets alors que, dans la conformation B, la longue boucle a une conformation différente.

La capsid du bactériophage MS2 est constituée de 60 unités asymétriques identiques. Une unité asymétrique, encore appelée capsomère, est composée des trois protéines de capsid A, B et C (Figure 10). Les 60 capsomères constitutifs de la capsid de MS2 ont une forme triangulaire avec une base d'environ 60 Å et une hauteur de 20 Å. Malgré sa forme triangulaire, le capsomère ne doit pas être confondu avec une face de l'icosaèdre. En effet, il faut l'équivalent de neuf protéines pour former une face complète de l'icosaèdre (Figure 11).

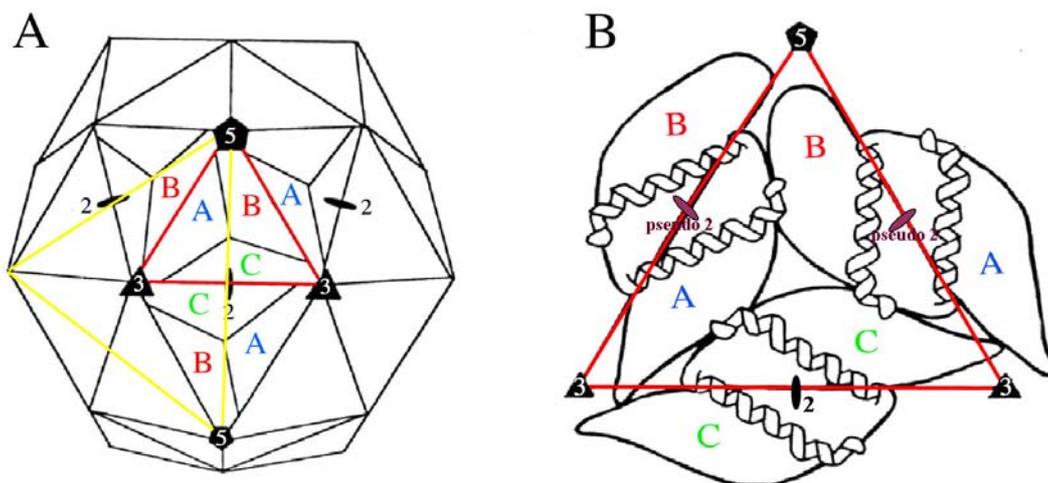


**Figure 10 :** Unité asymétrique (capsomère) du bactériophage MS2 constituée des trois protéines de capsid sous les trois conformations A, B et C. Fichier PDB 2MS2 visualisé avec le logiciel UCSF Chimera.

### II. 1 .3. c) Organisation structurale de la capsid

#### ➤ L'unité de base : les dimères de protéines

Dans l'assemblage de la capsid protéique icosaédrique du MS2, deux types de dimères sont formés : des dimères C/C sur l'axe d'ordre 2 et des dimères A/B sur le pseudo-axe d'ordre 2, c'est-à-dire un axe d'ordre 2 entre capsomère et non pas entre les faces de l'icosaèdre (Figure 11).



**Figure 11 :** A. Représentation de l'assemblage des dimères C/C sur l'axe d'ordre 2 et des dimères A/B sur le pseudo-axe d'ordre 2 de la capsid du bactériophage MS2.

B. Représentation des dimères centrée sur un capsomère (adapté de Valegård *et al.*, 1990). Les triangles jaunes et rouges représentent respectivement une face de l'icosaèdre et un capsomère.

A noter que les forces de contact dans le dimère de MS2 sont inhabituellement élevées. D'abord, les longs feuillets  $\beta$ G entre deux sous-unités interagissent (entre les protéines de conformations différentes) et forment huit liaisons hydrogène. Ensuite parce que l'hélice  $\alpha$  C-terminale d'une sous-unité est localisée entre l'épingle à cheveux  $\beta$ A/ $\beta$ B et l'hélice  $\alpha$  d'une autre sous-unité. Ainsi, l'extrémité N-terminale d'une sous-unité interagit avec l'extrémité C-terminale de l'autre sous-unité dans le dimère. L'interaction entre dimères est fortement hydrophobe, provenant du caractère hydrophobe des hélices.

Ainsi, grâce aux fortes interactions hydrophobes et à la similarité entre les dimères structurellement indépendants, le dimère est compact et relativement rigide, à l'exception des 15 résidus de la boucle FG.

### ➤ Les boucles FG et formation des pores

Les boucles des feuillets  $\beta$ F et  $\beta$ G (boucles FG) sont responsables de l'interaction au niveau des axes d'ordre 3 et 5. Au niveau des axes d'ordre 3, les boucles des sous-unités A et C forment schématiquement un contact d'ordre 6, laissant un pore d'environ 17 Å de diamètre. Au niveau de l'axe d'ordre 5, la boucle FG de la sous-unité B est courbée vers les autres sous-unités, formant un canal cylindrique d'environ 14 Å de long et 16 Å de diamètre. Ainsi sur l'ensemble de la capsidie protéique de 20 Å d'épaisseur, 32 pores sont uniformément répartis au niveau des axes d'ordre 3 et 5 (Figure 12) (Valegård *et al.*, 1990; Golmohammadi *et al.*, 1993; Hooker *et al.*, 2004).

A l'inverse des contacts avec les dimères, la majorité des interactions entre les dimères et les boucles FG sont hydrophiles.

La structure quaternaire de la capsidie de MS2 donne au virus une forme quasi sphérique, la surface étant constituée des hélices  $\alpha$ A/ $\alpha$ B et des épines à cheveux  $\beta$ A/ $\beta$ B. La capsidie protéique est relativement poreuse, avec de larges canaux au niveau des axes d'ordre 5 et 3. L'intérieur de la capsidie protéique est hydrophile et expose plusieurs groupements chargés positivement (Arg 38, Lys 43, Arg 49, Lys 57, Lys 61 et Arg 83 au niveau des 3 sous-unités indépendantes). Les chaînes latérales de certains de ces résidus sont probablement impliquées dans des interactions avec l'ARN.

Enfin, à partir d'alignements de séquences de plusieurs phages à ARN des 4 génogroupes et 2 bactériophages de *Pseudomonas*, la plus importante similarité est au niveau des feuillets  $\beta$ E,  $\beta$ F et  $\beta$ G : le résidu proline Pro 78 dans la boucle FG est conservé dans

toutes les séquences, ainsi que Thr 45 et Ser 47 dans le feuillet  $\beta$ E. Pro 78 a une propriété inhabituelle car elle est précédée d'une liaison peptidique *cis* dans la sous-unité B alors que dans les sous-unités A et C, la liaison est *trans* (Golmohammadi *et al.*, 1993). Cette proline serait conservée à cause de la facilité de ce résidu à pouvoir passer d'une conformation (*cis* $\leftrightarrow$ *trans*) à l'autre. La densité électronique trouvée près de la Thr 45 indique que ce résidu pourrait être impliqué dans des interactions avec l'ARN.

Pour expliquer le rôle des boucles FG, Stonehouse *et al.*, 1996, ont défini la structure cristalline de deux capsides de MS2 avec des mutations dans cette boucle, au niveau des positions P78N et E76D. Ces mutants forment des particules de la même taille que la souche sauvage mais sont moins stables face à des modifications de température.

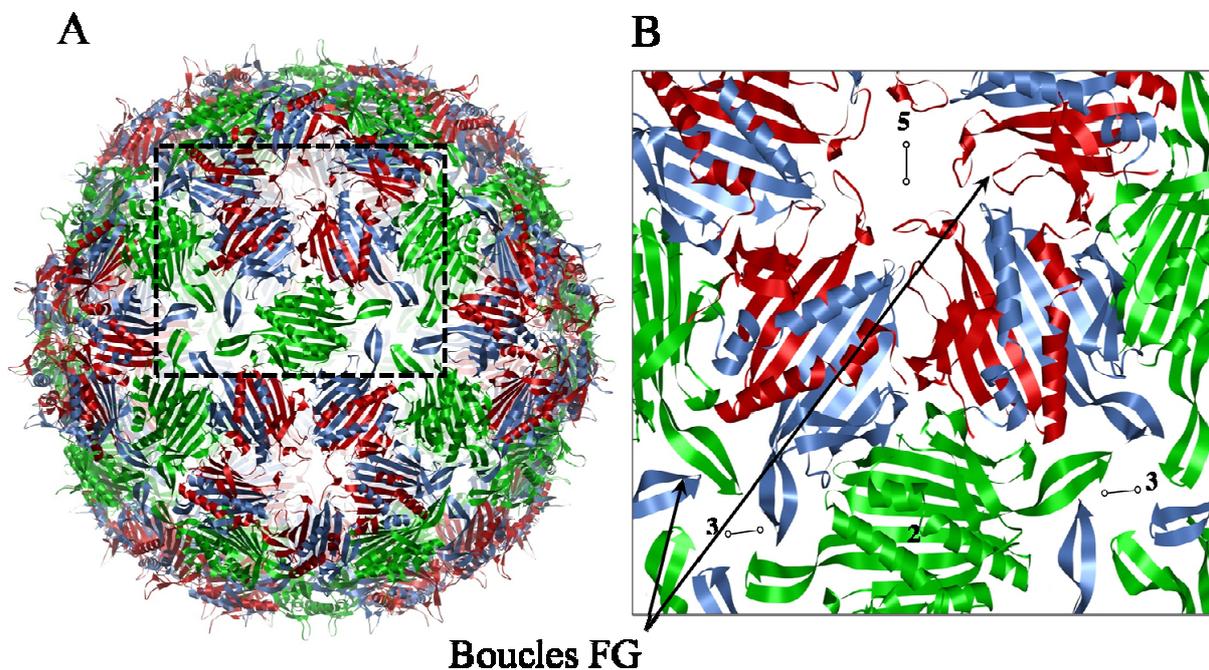


Figure 12 : A. Schéma des sous-unités de la protéine de capside.

B. Pores au niveau des axes d'ordre 3 et 5 constitués des boucles FG (adapté de Golmohammadi *et al.*, 1993 et fichier PDB 2MS2 visualisé avec le logiciel UCSF Chimera).

Glutamate 76 est quant à lui impliqué dans une seule interaction dans la sous-unité B, formant des liaisons hydrogène avec la glutamine 41 et la thréonine 71 (Golmohammadi *et al.*, 1993).

### II. 1. 3. d) Interactions génome-capside

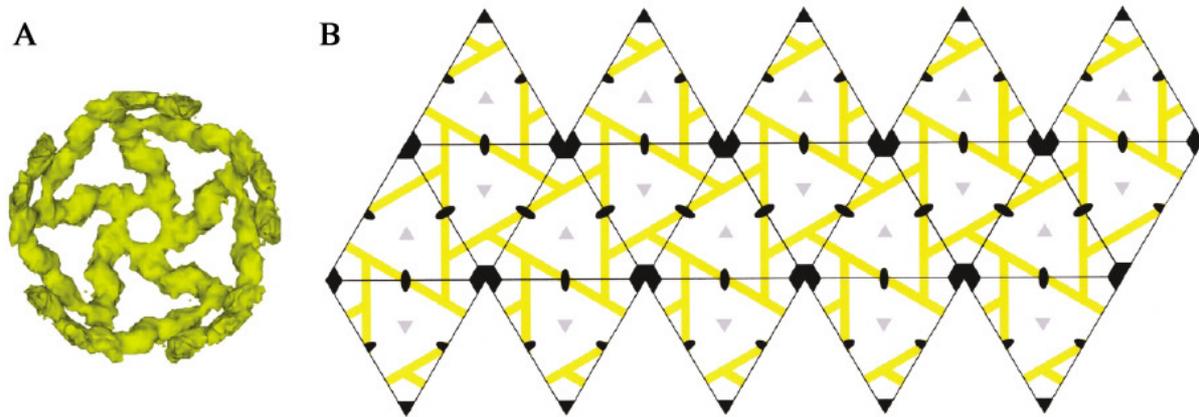
Le phage MS2 infectieux est composé d'une protéine de capside (ou protéine majeure) présente en 180 copies, d'une protéine de maturation (ou protéine A ou encore protéine mineure) présente en un seul exemplaire et d'une molécule d'ARN simple brin.

L'adhésion du phage sur le récepteur bactérien au niveau des pili mène au clivage de la protéine de maturation et entraîne l'ARN du virus vers la bactérie. En effet, la protéine de maturation est connue pour être nécessaire à la reconnaissance des pili F de la cellule hôte (Kozak et Nathans, 1971; Krahn *et al.*, 1972) mais sa localisation n'a pas pu être définie par des analyses cristallographiques du bactériophage MS2 (Valegård *et al.*, 1990; Valegård *et al.*, 1991; Golmohammadi *et al.*, 1993). Cependant des expériences de marquages chimiques et par anticorps suggèrent que la protéine de maturation serait au moins partiellement exposée à la surface de la capsidie et qu'elle se trouverait à l'un des sommets de la capsidie icosaédrique (O'Callaghan *et al.*, 1973; Curtiss et Krueger, 1974).

De plus, différentes expériences montrent que cette protéine serait en interaction avec l'ARN de MS2. Premièrement, des expériences de sédimentation indiquaient que la protéine de maturation et l'ARN radiomarqués cosédimentaient (Kozak et Nathans, 1971; Shiba et Miyake, 1975). L'interaction entre la protéine A et son hôte *Escherichia coli* mène au clivage de la protéine A en deux fragments pendant l'étape d'absorption de l'infection. Ces fragments (qui sont attachés à l'ARN génomique du virus) se dissocient de la capsidie protéique du virus et sont alors injectés dans la cellule hôte avec l'ARN (Krahn *et al.* 1972). Après infection, la capsidie protéique de MS2 reste intacte mais il manque l'ARN et la protéine A (Silverman et Valentine, 1969; Kozak et Nathans, 1971). Ainsi, la capsidie contient la protéine de maturation à l'étape de pré-infection alors qu'elle est absente en post-infection.

Ensuite, des travaux de protection vis-à-vis de RNase et de compétition de liaison indiquent que l'ARN de MS2 est lié à la protéine de maturation au niveau de ses extrémités 5' et 3' (Shiba et Suzuki, 1981). Cette étroite association entre le génome de MS2 et la protéine de maturation est importante pour l'empaquetage *in vivo* de l'ARN. Des virus mutants dépourvus de la protéine de maturation ont un ARN mal empaqueté qui dépasse de la capsidie et qui est dégradé par les nucléases (Argetsinger et Gussin, 1966; Heisenberg, 1966).

De récentes analyses par cryo-électromicroscopie de MS2 révèlent que l'ARN est lié à la surface interne de la capsidie. L'ARN forme également un icosaèdre avec des pores au niveau des axes d'ordre 5 et 3 (Figure 13 et Figure 14). Cet ARN ordonné, sensé représenter seulement une partie de l'ARN génomique, est vraisemblablement attaché à des dimères de protéines de capsidie via les motifs tiges-boucles de l'ARN (Koning *et al.*, 2003).

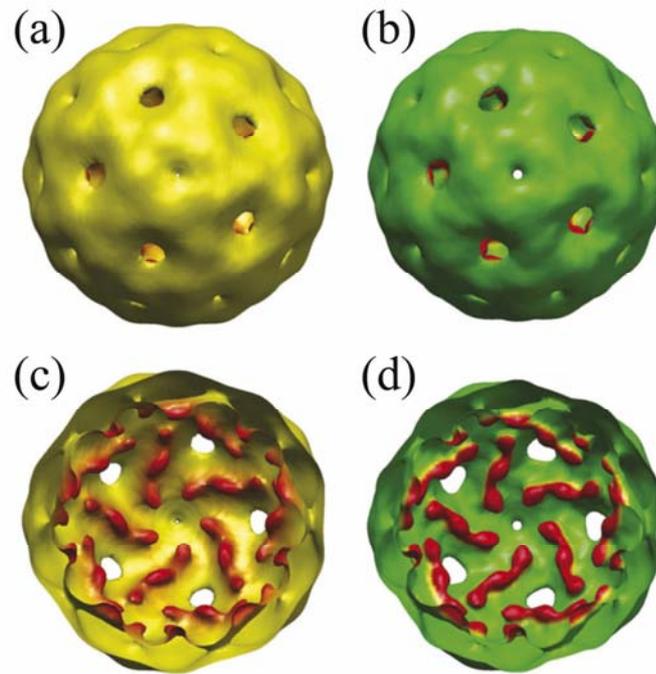


**Figure 13 : A. Densité d'ARN formant des triangles, autour des axes d'ordre 3, et des cercles, autour des axes d'ordre 5.**

**B. Représentation de l'ARN projeté sur un icosaèdre plat, montrant l'empaquetage de l'ARN sur la surface interne de la capsid de MS2. Adaptée de Koning *et al.*, 2003.**

Kuzmanovic *et al.*, 2006 ont publié leurs travaux sur la structure de la capsid de MS2 qui s'assemble spontanément en présence ou en absence de la protéine de maturation par diffusion de neutrons aux petits angles (DNPA ou SANS en anglais). Ils montrent d'abord que des particules virales, avec ou sans ARN, possèdent la même structure, suggérant que le génome n'a pas d'influence sur la capsid. Puis, en mesurant l'épaisseur de capsides possédant ou non la protéine de maturation, ils montrent que les capsides avec la protéine A sont moins épaisses (entre 21 Å et 25 Å) que celles qui en sont dépourvues (entre 31 Å et 37 Å). Pourtant, cette augmentation de l'épaisseur de la capsid n'est pas accompagnée d'une augmentation du diamètre total de la particule virale, seul le rayon interne diminue. Ainsi, la protéine de maturation semble être nécessaire à l'organisation globale de la capsid de MS2.

A l'heure actuelle on ne sait pas à quel moment la protéine de maturation s'assemble dans le virion mais on suppose que ceci se fait précocement puisque la protéine de maturation ne peut pas être incorporée dans des virions déjà préformés sans cette protéine. Lors de l'assemblage de la capsid protéique, la protéine A pourrait servir « d'échafaudage collant » ou de « nucléateur » qui aide les sous-unités de la capsid à choisir une conformation particulière et qui maintient la capsid sous tension. Cette tension peut être stockée dans la capsid pour être utilisée pendant l'étape d'infection. A un moment donné, pendant ou après le clivage de la protéine A, la capsid du virus peut passer d'une conformation mince (pré-infection) à une conformation plus épaisse (post-infection sans la protéine A). Le résultat de ce changement de conformation serait une diminution du rayon interne de la capsid du virus probablement due au remplacement des boucles de la protéine de capsid qui forcerait l'ARN et la protéine A qui lui est attachée, à s'injecter dans la cellule hôte (Moody, 1999).



**Figure 14 : Extérieur des bactériophages MS2 (a) et Q $\beta$  (b) et intérieur des bactériophages MS2 (c) et Q $\beta$  (d) déterminés par cryo-électromicroscopie. Les pores situés aux axes d'ordre 3 de la capside sont clairement visibles. Les fragments d'ARN (en rouge) à l'intérieur de la capside sont situés à toutes les interfaces de dimères capside-capside pour MS2 et Q $\beta$  (van den Worm *et al.*, 2006).**

Enfin, l'assemblage *in vivo* de MS2 semble être initié par l'interaction entre un dimère de la protéine de capside et une séquence spécifique de l'ARN viral (Hohn, 1969 ; Beckett et Uhlenbeck, 1988; Beckett *et al.*, 1988). Dans ce complexe, la protéine de capside agit également comme un répresseur traductionnel du gène de la réplicase (Sugiyama et Nakada, 1968). En 1969, Hohn précise que la formation des particules virales est également stimulée par un ARN non spécifique ou des substances poly-anioniques, révélant ainsi que l'acide nucléique stimule en partie l'assemblage en neutralisant les charges positives de la face interne de la capside protéique. L'ARN spécifique serait plus efficace en raison de sa plus forte capacité de liaison à la protéine de capside.

D'un point de vue structural, l'organisation générale des protéines de la capside des phages MS2, Q $\beta$ , GA et fr est très proche, seuls quelques détails au niveau des interactions diffèrent (Tars *et al.*, 1997). En effet, les phages à ARN F-spécifiques possèdent tous une capside protéique de type icosaédrique et mesurent tous entre 21 et 30 nm de diamètre (Figure 14 et Tableau 5).

Au niveau de la capsid protéique, les pores au niveau de l'axe d'ordre 3 sont 3-4 Å plus larges chez Q $\beta$  que chez MS2 et GA. Les boucles FG de Q $\beta$  présentent une conformation proche des boucles FG de MS2 mais sont deux résidus plus courts. Le diamètre des pores au niveau de l'axe d'ordre 5 de Q $\beta$  n'est que de 7 Å, ce qui est considérablement inférieur aux pores de 16 Å de MS2 et de GA (Golmohammadi *et al.*, 1996). De plus, des ponts disulfures permettent des liaisons covalentes entre les sous-unités de Q $\beta$ . La présence de ces liaisons covalentes, non décrites chez les autres phages à ARN, suggère une stabilité élevée du phage Q $\beta$  par rapport aux autres phages (Golmohammadi *et al.*, 1996). Par contre, aucune étude portant sur la structure des phages du génogroupe IV n'est reportée dans la littérature.

La densité de génome à l'intérieur des phages MS2, Q $\beta$ , AP205 et PP7 est connue (van den Worm *et al.*, 2006). Ils présentent tous une partie de leur génome à la surface interne de la capsid protéique. Par contre, cette densité d'ARN accolé à l'intérieur de la capsid n'est pas constante pour tous ces phages. Par exemple, la densité d'ARN est plus importante pour les phages Q $\beta$  et AP205 que pour MS2 et PP7.

## II. 2. Phylogénie

Au-delà de la distinction en deux genres, les phages appartenant à la famille des *Leviviridae* sont aussi répartis en quatre (géo)groupes (groupe I, II, III et IV). Cette répartition a été établie à partir de tests sérologiques (Schaper et Jofre, 2000; Vinje *et al.*, 2004), de l'analyse de l'activité de la répliqueuse (Miyake *et al.*, 1971) ou encore d'analyses phylogénétiques (Bollback et Huelsenbeck, 2001). Le groupe I et le groupe II appartiennent au genre *Levivirus* (*levi* vient du latin « léger ») et les groupes III et IV appartiennent au genre *Allolevivirus* (*allo* vient du grec « autre ») (Tableau 3).

Selon l'analyse phylogénétique de Bollback et Huelsenbeck, 2001, l'ancêtre commun serait plus proche du genre actuel *Levivirus*. Il y aurait eu, par la suite, une expansion de gènes (par mutations) aboutissant au genre *Allolevivirus* et par conséquent à la séparation en deux groupes (Figure 15).

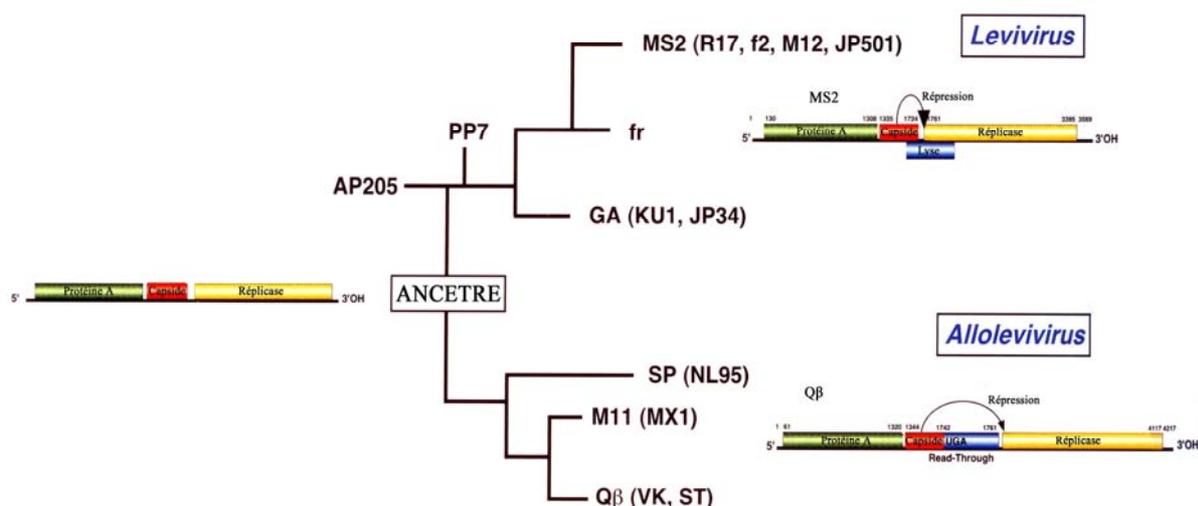


Figure 15 : Arbre phylogénétique des *Leviviridae* établi à partir de l'analyse de la séquence complète du gène de la protéine de capsid (adapté de Bollback et Huelsenbeck, 2001).

### II. 3. Comparaison des quatre génogroupes

Le tableau 5 résume les principales caractéristiques des phages des quatre génogroupes de la famille des *Leviviridae*.

Tableau 5 : Caractéristiques des bactériophages ARN F-spécifiques MS2, GA, Qβ et SP.

Bactériophages	Génogroupes et genres	Génome (nucléotides)	Numéro d'accès à Genbank	Taille de la capsid (nm)
MS2	I <i>Levivirus</i>	3569	NC_001417	22,4-28,8 <sup>a</sup>
GA	II <i>Levivirus</i>	3466	NC_001426	22,7-28,9 <sup>b</sup>
Qβ	III <i>Allolevivirus</i>	4217	AY099114	21,3-29,4 <sup>c</sup>
SP	IV <i>Allolevivirus</i>	4276	X07489	ND

<sup>a</sup> Valegård *et al.*, 1990; Valegård *et al.*, 1991; Golmohammadi *et al.*, 1993

<sup>b</sup> Tars *et al.*, 1997

<sup>c</sup> Valegård *et al.*, 1994; Golmohammadi *et al.*, 1996

A partir d'alignements et de comparaison de séquences, l'identité et la similarité des séquences au sein d'une famille peuvent être déterminées. Pour rappel, l'identité (exprimée en %) est définie comme étant une ressemblance parfaite entre deux séquences. Pour des séquences protéiques, la similarité (exprimée en %) correspond au pourcentage d'identité plus le pourcentage de substitutions conservatives qui préservent les propriétés physico-chimiques du résidu d'acide aminé. Les deux séquences sont comparées en utilisant un algorithme

d'alignement global ou local. Le tableau 6 montre bien que les pourcentages d'identité et de similarité sont maximaux lorsque les séquences sont issues du même genre (entre MS2 et GA et entre Q $\beta$  et SP). D'autre part, les pourcentages de similarité sont toujours supérieurs à 30%, ce qui laisse supposer que ces séquences sont issues d'une séquence ancêtre commune comme illustré dans la figure 15. Par contre, les séquences protéiques issues du même genre présentent des identités supérieures à 38 % signifiant qu'elles sont probablement homologues. Lorsque les séquences présentent moins de 25 % d'identité, on peut difficilement conclure quant à leur homologie.

**Tableau 6 : Calculs d'identité et de similarité (exprimées en %) des génomes (A), des protéines de capsid (B) et de maturation (C) des quatre phages MS2, GA, Q $\beta$  et SP. Les matrices EBLOSUM62 et EDNAFULL ont été utilisées respectivement pour comparer les séquences protéiques et les séquences nucléotidiques des quatre phages.**

(<http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/stretcher.html>)

#### A. Génome entier

Identité (%)	GA	Q $\beta$	SP
MS2	57	47,1	47,3
GA	-	46,6	46,9
Q $\beta$	-	-	58,9

#### B. Protéine de la capsid (protéine majeure)

Identité/Similarité (%)	GA	Q $\beta$	SP
MS2	60,3/74,8	23,7/40	25,2/42,2
GA	-	24,8/43,1	24,1/44,5
Q $\beta$	-	-	79,7/88,7

#### C. Protéine de maturation (protéine mineure)

Identité/Similarité (%)	GA	Q $\beta$	SP
MS2	38,9/55,5	20,1/35,1	22,1/34,8
GA	-	23,1/36,9	21,6/35,8
Q $\beta$	-	-	45,7/60,7

### III. LES PROPRIETES INTERFACIALES DES VIRUS

Pour les structures biologiques, la notion d'interface est un concept relativement récent et qui mérite d'être défini. Une interface nécessite l'existence de deux systèmes : d'une part la particule biologique, en l'occurrence un virus, et d'autre part, son environnement. Cette interface ne peut pas être « géographiquement » définie comme étant une surface ou une aire qui marque nettement la séparation entre la particule et le milieu environnant. Par exemple, Dague *et al.*, 2006, ont montré que la notion de propriétés de surface pour des bactéries ne s'avérait pas pertinente car ceci suggérerait l'existence d'une surface clairement délimitée. En effet, dans le cas de cellules bactériennes recouvertes de LipoPolySaccharides (LPS) chargés, il n'existe pas de surface chargée sur le plan bidimensionnel mais plutôt une localisation de ces charges dans un volume interfacial. Dans la communauté virologue, cette notion d'interface pour des particules virales est rarement prise en compte et les propriétés physico-chimiques d'un virus sont classiquement définies par rapport à la surface du virus. Ceci s'explique par le manque de données concernant les caractéristiques de cette « zone » de quelques nanomètres qui englobe les structures du virus (capside protéique, génome) qui vont interagir avec le milieu environnant. De plus, les interfaces de particules biologiques présentent une souplesse d'un point de vue mécanique et surtout une perméabilité hydrodynamique plus ou moins prononcées selon le système étudié. Cette souplesse et cette perméabilité peuvent faire jouer un rôle non négligeable aux structures plus internes du virus. Ainsi, dans ce mémoire, le terme de propriétés interfaciales des virus sera privilégié par rapport au terme de propriétés de surface. Enfin, l'interface des virus, enveloppés ou non, contient des régions hydrophiles, hydrophobes et ionisables (Mix, 1974) qui sont à l'origine de leur caractère hydrophile-hydrophobe et de leur charge.

#### III. 1. Charge des virus

La distribution des charges est hétérogène car elle dépend de la localisation des groupements ionisables. Ces groupements sont définis par des constantes d'ionisation : les *pKa*. A un pH donné, ces groupements peuvent être neutres ou bien présenter une charge (négative ou positive).

Un virus est constitué d'abord d'un génome ARN ou ADN. Le deuxième constituant obligatoire d'un virus est sa capsid. Elle est uniquement de nature protéique. Les protéines constitutives de la capsid sont composées d'acides aminés pouvant exprimer une charge au

niveau de leur chaîne latérale et aux extrémités de la protéine (groupements carboxyles et amines). Il existe essentiellement 20 acides aminés composant les protéines et ils se distinguent au niveau des groupements spécifiques appelés chaîne latérale (ou radicale). Au niveau de la chaîne latérale des acides aminés, les groupements (NH<sub>2</sub>, COOH, SH...) définis par leur *pKa* peuvent s'ioniser en fonction des valeurs de pH du milieu, donnant ainsi une certaine charge globale à la protéine. L'ionisation des groupements peut également se faire au niveau des extrémités NH<sub>2</sub> et COOH de la protéine dans la mesure où ces fonctions ne sont pas impliquées dans les liaisons peptidiques.

Les acides aminés peuvent être classés selon la fonction chimique du groupement latéral, selon leur charge ou encore en fonction de leur caractère hydrophile/hydrophobe. Les caractéristiques des différents acides aminés sont rappelées dans le tableau 7.

**Tableau 7 : Description et principales propriétés des 20 acides aminés pouvant être retrouvés dans les protéines de capsid virale (Kyte et Doolittle, 1982). L'indice d'hydrophobicité correspond à l'hydrophobicité relative de chaque acide aminé. Plus la valeur est positive, plus l'hydrophobicité est élevée. Les acides aminés hydrophiles ont des indices négatifs.**

Acides aminés	Code	Famille et groupement caractéristique de la chaîne latérale	<i>pK<sub>r</sub></i> <sup>b</sup>	Indice d'hydrophobicité	Charge de la chaîne latérale en fonction du pH
Glycine	Gly (G)		-	-0,4	
Alanine	Ala (A)		-	1,8	
Leucine	Leu (L)	Aliphatique ; X <sup>a</sup>	-	3,8	
Isoleucine	Ile (I)		-	4,5	
Valine	Val		-	4,2	0 7 14
Sérine	Ser (V)	Hydroxylé ; -	-	-0,8	Neutre
Thréonine	Thr (T)	OH	-	-0,7	
Méthionine	Met (M)		-	1,9	
Cystéine	Cys (C)	Soufré ; - SX	8,4	2,5	0 8,4 14 Neutre Négatif
Acide aspartique	Asp (D)	Dicarboxylique	3,9	-3,5	0 4 14 Neutre Négatif
Acide glutamique	Glu (E)	- COOH	4,1	-3,5	
Asparagine	Asn (N)	Amidé ; -	-	-3,5	0 7 14
Glutamine	Gln (Q)	CONH <sub>2</sub>	-	-3,5	Neutre
Arginine	Arg (R)		12,5	-4,5	0 12,5 14 Positif Neutre
Histidine	His (H)	Diaminé ; - NH <sub>2</sub>	6,0	-3,2	0 6 14 Positif Neutre
Lysine	Lys (K)		10,5	-3,9	0 10,5 14 Positif Neutre

Tableau 7 (suite)

Acides aminés	Code	Famille et groupement caractéristique de la chaîne latérale	$pK_r^b$	Indice d'hydrophobicité	Charge de la chaîne latérale en fonction du pH
Phénylalanine	Phe (F)	Aromatique ;	-	2,8	0 7 14
Tryptophane	Try (W)	Cycle	-	-0,9	Neutre
Tyrosine	Tyr (Y)	aromatique	10,5	-1,3	0 10,5 14 Neutre Négatif
Proline	Pro (P)	Imidazole ; Cycle imidazole	-	-1,6	0 7 14 Neutre
	Extrémité -COOH libre		~ 2-3	-	0 2-3 14 Neutre Négatif
	Extrémité -NH <sub>2</sub> libre		~ 9-10	-	0 9-10 14 Positif Neutre

<sup>a</sup> X = H ou CH<sub>3</sub> ou (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub> ; <sup>b</sup>  $pK_a$  de la chaîne latérale

Tout comme les acides aminés, les acides nucléiques (ADN et ARN) possèdent des fonctions ionisables caractérisées par leur  $pK_a$  (Figure 16 et Tableau 8).

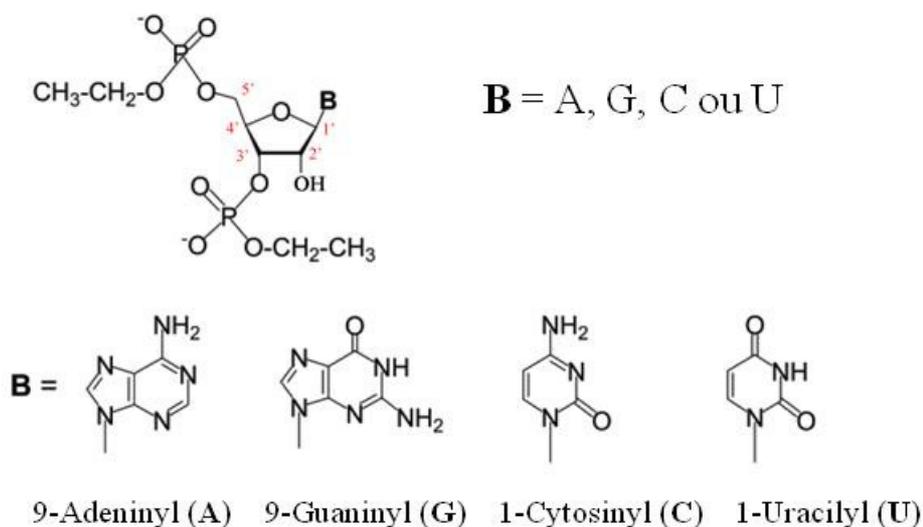


Figure 16 : Nucléotides constitutifs de l'ARN et leurs bases azotées (A, G, C et U) (adaptée de Acharya *et al.*, 2004).

**Tableau 8 :  $pKa$  des liaisons nucléotidiques formant un acide ribonucléique (ARN). Avec Et = éthyl (en position 3' et 5' du ribose) ; r = ribose ; p = phosphate ; A = adéninyl ; C = cytosinyl ; U = uracilyl ; G = guaninyl**

Groupements	$pKa$
Phosphodiester	1,5 <sup>a</sup>
Etp(rA)pEt	3,72 <sup>b</sup>
Etp(rC)pEt	4,24 <sup>b</sup>
Etp(rU)pEt	9,26 <sup>b</sup>
Etp(rG)pEt	9,29 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>Kumler et Eiler, 1943 ; <sup>b</sup>Acharya *et al.*, 2004

A partir de la valeur des  $pKa$  d'acides aminés, une approche simpliste permet de calculer le **point isoélectrique** théorique d'une protéine donnée. Le point isoélectrique ( $pI$ ) correspond à la valeur de pH pour laquelle la charge globale de la protéine de capsid est nulle. Le tableau 9 donne quelques exemples de calculs de  $pI$  de protéines de capsid de phages ARN F-spécifiques. Le calcul théorique du  $pI$  se base sur la séquence primaire en acides aminés de la protéine et sur les  $pKa$  de la chaîne latérale de chaque acide aminé ( $pK_r$ ) répertoriés dans le tableau 7. Cependant, ces valeurs de  $pKa$  ont été déterminées sur des acides aminés individuels non impliqués dans des liaisons peptidiques. Or, les acides aminés au sein d'une protéine peuvent présenter des  $pKa$  différents de ceux d'acides aminés isolés. Effectivement, le  $pKa$  de la chaîne latérale d'un acide aminé constituant une protéine sera influencé par le repliement 3D de la protéine et par les acides aminés avoisinants (Li, 2005). Il en est de même pour les  $pKa$  des nucléotides : seuls les  $pKa$  de nucléotides individuels sont connus, mais leurs  $pKa$  exacts au sein d'un acide nucléique de plusieurs milliers de nucléotides sont inconnus.

**Tableau 9 : Calcul des  $pI$  théoriques de la protéine de capsid de quatre phages ARN F-spécifiques (<http://mobyly.pasteur.fr/cgi-bin/MobylyPortal/portal.py?form=iep>).**

Bactériophages	$pI$ théoriques
MS2 (génogroupe I)	8,2
GA (génogroupe II)	9,7
Q $\beta$ (génogroupe III)	9,5
SP (génogroupe IV)	9,7

Afin d'avoir des valeurs expérimentales des  $pI$  des virus, des mesures basées sur des techniques de Focalisation IsoElectrique (IEF) et d'électrophorèse ont été réalisées.

La **focalisation isoélectrique** consiste en une migration, induite par un courant électrique, des virus dans un gradient de pH jusqu'à ce qu'ils atteignent un pH équivalent à leur  $pI$ , moment auquel ils cessent de migrer, puisque leur charge nette est nulle. Pour déterminer la zone de pH où les virus ont cessé de migrer, soit un marquage radioactif du virus au préalable est nécessaire pour sa visualisation, soit différentes zones du gel sont analysées pour déterminer celle qui contient le plus de virus infectieux.

L'**électrophorèse**, quant à elle, consiste à mesurer la vitesse de migration de la particule virale soumise à un champ électrique. Cette vitesse de migration rapportée au champ électrique donne accès à la mobilité électrophorétique ( $\mu$ ). Le  $pI$  correspond au pH pour laquelle  $\mu = 0$ . La visualisation des virus nécessitait un marquage radioactif avant les années 1990 jusqu'à ce que des techniques de nano-électrophorèse ne soient adaptées aux particules nanométriques non marquées.

Pour déterminer le  $pI$  des virus, ces techniques sont utilisées sur des virus complets ou bien sur des VLP (Virus Like Particles) pour les virus à symétrie cubique. Ces VLP, dépourvues de génome, sont le résultat de l'auto-assemblage spontané de la protéine de capsid (produite et isolée *in vitro*). Pour des virus à symétrie hélicoïdale, l'assemblage des protéines de capsid nécessite la présence d'un acide nucléique. Sans acide nucléique, les protéines s'agrègent de manière désordonnée. Il n'est donc pas possible de synthétiser des VLP pour les virus à symétrie hélicoïdale.

Le tableau 10 donne les valeurs expérimentales de  $pI$  de plusieurs virus. Ces mesures expérimentales illustrent la différence importante entre les  $pI$  mesurés (Tableau 10) et théoriques (Tableau 9). Par exemple, les  $pI$  expérimentaux des phages MS2 et Q $\beta$  sont respectivement de 3,9 et 5,3 alors que les  $pI$  calculés sont de 8,2 et 9,5.

**Tableau 10 : Points isoélectriques (*pI*) de certains virus pathogènes pour l'homme (A) et de bactériophages (B) (adapté de Gerba, 1984; Jin et Flury, 2002).****A) Points isoélectriques de virus pathogènes pour l'homme**

Famille	Genre	Virus	<i>pI</i>	Références
<i>Picornaviridae</i>	<i>Enterovirus</i>	Poliovirus 1 (Brunhilde)	4,5 ; 7,0	Mandel, 1971
		Poliovirus 1 (Chat)	7,5 ; 4,5	Ward, 1978
		Poliovirus 1 (Mahoney)	8,2	Floyd et Sharp, 1978a
		Poliovirus 1 (Sabin LSc)	6,6	Zerda, 1982
		Poliovirus 2 (Sabin T2)	6,5, 4,5	Murray et Parks 1980
		Poliovirus 2 (P712-Ch-2ab)	4,5 ; 7,5	Taylor <i>et al.</i> , 1981
		Coxsackievirus A21	6,1 ; 4,8	Murray et Parks, 1980
		Echovirus 1 (4CH-1)	5,5	Zerda, 1982
		Echovirus 1 (R115)	6,2	
		Echovirus 1 (V212)	6,4	
		Echovirus 1 (V239)	5,3	
		Echovirus 1 (V248)	5,0	
	Echovirus 1 (Farouk)	5,1	Murray et Parks 1980	
	<i>Hepatitisvirus</i>	VHA	5,8 <sup>a</sup>	Kukavica-Ibrulj <i>et al.</i> , 2004
<i>Rhinovirus</i>	Rhinovirus	6,4	Korant <i>et al.</i> , 1975	
<i>Reoviridae</i>	<i>Orthoreovirus</i>	Reovirus 3 (Dearing)	3,9	Floyd et Sharp, 1978a
<i>Caliciviridae</i>	<i>Norovirus</i>	rNorwalk virus (VLP)	5	Redman <i>et al.</i> , 1997
		Funabashi (VLP)	5,9	Goodridge <i>et al.</i> , 2004
		Norwalk (VLP)	5,9	
		Seto (VLP)	6,0	
		Hawaii (VLP)	6,0	
		Kashiwa (VLP)	5,5	
		Narita (VLP)	6,9	
<i>Parvoviridae</i>	<i>Parvovirus</i>	Parvovirus AA4. x 14	2,6	Salo et Mayor, 1978
<i>Poxviridae</i>	<i>Orthopoxvirus</i>	Virus Vaccinia (Lister)	5,1 ; 3,8	Mouillot et Netter, 1977
		Variola virus (Smallpox Harvey)	5,9 ; 3,3	Douglas <i>et al.</i> , 1969
<i>Orthomyxoviridae</i>	<i>Influenzavirus A</i>	Virus Influenza A	6,5-7	Patolsky <i>et al.</i> , 2004

<sup>a</sup> Calcul théorique ; VLP : Virus Like Particles

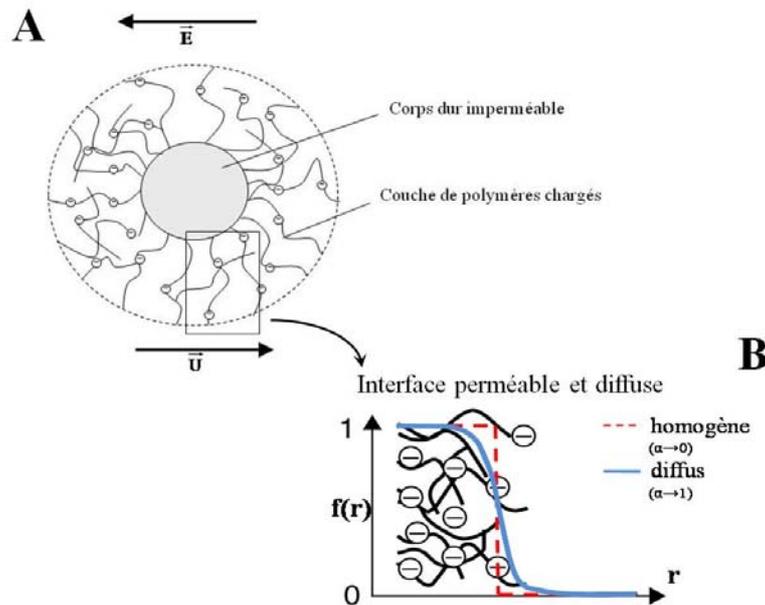
## B) Points isoélectriques de certains bactériophages

Famille	Genre	Virus	<i>pI</i>	Références
<i>Leviviridae</i>	<i>Levivirus</i>	MS2	3,5 ; 3,9	Overby <i>et al.</i> , 1966 ; Zerda, 1982 ; Penrod <i>et al.</i> , 1995
		R17	3,9	Ackermann et Dubow, 1987
	<i>Allolevivirus</i>	Q $\beta$	5,3	Overby <i>et al.</i> , 1966
<i>Myoviridae</i>	<i>T4-like virus</i>	T4	4-5	Childs et Birnboim, 1975
		T2	4,2	Sharp <i>et al.</i> , 1946
<i>Microviridae</i>	<i>Microvirus</i>	$\phi$ X174	6,6	Ackermann et Dubow, 1987
<i>Tectiviridae</i>	<i>Tectivirus</i>	PRD-1	3-4	Loveland <i>et al.</i> , 1996
<i>Corticoviridae</i>	<i>Corticovirus</i>	PM2	7,3	Ackermann et Dubow, 1987

En connaissant le *pI* du virus, on peut simplement différencier les domaines de pH pour lesquels le virus est chargé négativement ( $\text{pH} > pI$ ) ou positivement ( $\text{pH} < pI$ ) (Gerba, 1984).

Dans le cadre des mesures par microélectrophorèse, il faut souligner que la mobilité électrophorétique ( $\mu$ ) d'une particule colloïdale en mouvement dans un liquide sous l'effet d'un champ électrique est une donnée quantitative qui peut fournir des informations sur les propriétés électriques et hydrodynamiques de la particule étudiée. Toute la difficulté se situe dans l'interprétation des valeurs de  $\mu$  en fonction du système colloïdal étudié. En effet, dans le cas des particules dures, c'est-à-dire où la particule est imperméable au flux hydrodynamique, la signification de la mobilité électrophorétique est à l'heure actuelle bien connue. La charge de surface y est généralement symbolisée par le potentiel zêta ( $\zeta$ ). A partir de la mesure  $\mu$ , le potentiel zêta (ou potentiel au plan de cisaillement) peut être calculé à l'aide des équations de von Smoluchowski, de Hückel ou de Henry. Cependant, ces équations ont été développées pour des particules dures et leur transposition à des bioparticules, présentant une certaine souplesse et une perméabilité à leur interface, n'est pas du tout envisageable en raison des approximations importantes qu'elles entraînent (Duval et Ohshima, 2006). Le potentiel zêta calculé pour des virus à partir de ces équations, en les assimilant à des particules dures, ne permet pas d'obtenir des valeurs quantitatives pertinentes sur les caractéristiques électrostatiques car les contributions hydrodynamiques (perméabilité) des virus sont inconnues mais probablement très importantes. En effet, pour les bioparticules, les notions de souplesse et de perméabilité hydrodynamique sont à prendre en compte dans le cadre de l'interprétation des mesures de mobilité électrophorétique. De tels systèmes colloïdaux sont composés de couches hydrodynamiquement perméables. La formulation théorique de Duval

et Ohshima, 2006, a permis de prendre en compte la nature de cette interface homogène *versus* diffus. Le paramètre ajustable  $\alpha$  traduit le caractère plus ou moins diffus de l'interface. Quand  $\alpha$  tend vers 0, l'interface est homogène et quand  $\alpha$  tend vers 1, l'interface est plus diffuse. Ainsi, de nombreux systèmes biologiques (bactéries, levures, acides humiques...) ont été assimilés à des particules avec une interface molle et diffuse présentant ou non un cœur dur, imperméable au flux (Figure 17). En l'absence d'un centre dur dans la particule, la particule molle devient entièrement perméable.



**Figure 17 : A. Représentation schématique d'une particule « molle » diffuse, composée d'un corps « dur » rigide et d'une couche de polymères chargés, en mouvement avec une vitesse  $\bar{U}$  et sous l'effet d'un champ électrique  $\bar{E}$ . B. Fonction de distribution radiale  $f(r)$  d'une interface perméable et diffuse (—) versus homogène (---) (adapté de Duval, 2007).**

### III. 2. Détermination du caractère hydrophobe.

L'effet hydrophobe signifie littéralement « la peur de l'eau » et correspond à l'ensemble des facteurs qui permettent aux substances non polaires de minimiser leurs contacts avec l'eau. 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.

Une capsidie protéique virale présente à la fois des domaines hydrophobes et des domaines hydrophiles, dus à la nature même des acides aminés constitutifs (Tableau 7) et aux

structures secondaires et tertiaires des protéines. Dans ce cas, il est préférable de parler de balance « hydrophile-hydrophobe ».

Cette balance « hydrophile-hydrophobe » est souvent considérée comme un élément essentiel pour prédire la capacité d'adhésion du virus à des surfaces (Gerba, 1984). Malgré l'importance que semble avoir le caractère hydrophile-hydrophobe d'un virus vis-à-vis de sa réactivité, sa détermination demeure difficile et l'interprétation des résultats délicate. En effet, plusieurs approches sont utilisées pour estimer le caractère hydrophile-hydrophobe telles que la chromatographie d'interaction hydrophobe, la mesure de l'adhésion à une surface plus ou moins hydrophobe, la mesure de l'angle de contact d'une suspension virale et l'utilisation de concentrations salines croissantes du milieu de suspension pour provoquer l'agrégation des micro-organismes.

L'interprétation des résultats obtenus s'avère difficile car il faut déjà connaître précisément le caractère hydrophile-hydrophobe de ces sorbants et de pouvoir négliger les charges exprimées par ces mêmes sorbants. En effet, Busscher *et al.*, 1995 et Ahimou *et al.*, 2001 ont montré que la majorité des sorbants, utilisés dans les tests MATS (Microbial Adhesion Test to Solvents), MATH (Test d'Adhésion Microbienne aux Hydrocarbures) ou chromatographie d'interaction hydrophobe (CIH) souvent utilisés pour déterminer le caractère hydrophile-hydrophobe de bactéries, présentent une charge et sont donc capables d'interactions électrostatiques. Ceci disqualifie ces méthodes comme mesure absolue de l'hydrophobie. La seule détermination indirecte et relative du caractère hydrophobe des virus se fait *via* des expériences d'adhésion-élution de virus sur un support plus ou moins hydrophobe.

Ainsi, pour plusieurs auteurs, les effets hydrophobes sont importants dans l'adhésion de MS2 à des surfaces (Lytle et Routson, 1995; van Voorthuizen *et al.*, 2001; Shields et Farrah, 2002). Par exemple, Shields et Farrah, 2002, montrent que de nombreux virus s'adsorbent massivement sur une membrane hydrophobe (Octyl Sépharose) en écrantant les charges nettes avec 4 M de NaCl à pH 7. Bales *et al.*, 1993, montrent qu'en greffant des groupes hydrophobes à des billes de silice, la rétention de MS2 sur celles-ci augmentait. Bales *et al.*, 1991, montraient déjà que la sorption de MS2 sur de la silice était dominée par des facteurs hydrophobes et qu'elle augmentait avec la température. Le caractère hydrophile-hydrophobe varie d'un virus à l'autre. Par exemple, la part des interactions hydrophobes est considérée comme négligeable lors de l'étude de l'adhésion du bactériophage PRD1 sur des supports minéraux (Loveland *et al.*, 1996).

*Jusqu'à présent les propriétés électriques des virus sont étudiées sans prendre en compte la notion d'interface. La charge du virus est déterminée à travers la mesure du pI ou du potentiel zêta. Cette détermination se fait via des techniques qui dénaturent les propriétés natives de la particule (radiomarquage) et en considérant la particule comme dure, sans envisager le caractère perméable des particules.*

*Les différentes expériences visant à caractériser la charge du virus ou son caractère hydrophobe montrent une grande variabilité des résultats en fonction du virus considéré, suggérant des propriétés interfaciales différentes d'un virus à l'autre.*

*L'étude des propriétés interfaciales des virus, en considérant leur perméabilité et en utilisant des techniques respectant l'intégrité de la particule, est essentielle. La connaissance de l'interface virale est indispensable pour appréhender les comportements macroscopiques du virus tels que l'agrégation et l'adhésion sur un support.*

#### IV. LES MECANISMES D'ADHESION-AGREGATION DES VIRUS

En fonction de leurs caractéristiques électro-hydrodynamiques, les virus dans l'environnement sont soit à l'état isolé, soit agrégés à des particules ou encore immobilisés sur une surface.

Les virus étant de petite taille et inertes tant qu'ils n'infectent pas leur cellule hôte, ils sont considérés comme des **colloïdes** dans un milieu aqueux. Les concepts utilisés pour étudier l'agrégation et la filtration des colloïdes durs furent donc appliqués aux virus pour décrire leur rétention et leur transport (Murray et Parks 1980; Gerba, 1984; Loveland *et al.*, 1996). Les colloïdes possèdent une proportion surface-volume très élevée et leur stabilité en solution dépend principalement de l'agitation thermique et de l'équilibre entre les interactions attractives et les interactions répulsives qui s'exercent entre les particules ou entre les particules et le support. Ces interactions dépendent des caractéristiques intrinsèques des virus (cités précédemment) et des paramètres physico-chimiques de leur milieu environnant tels que le pH et les électrolytes dissous (force ionique) et enfin des propriétés de surface du support.

##### IV. 1. Les forces d'interactions colloïdales

L'agrégation virale et l'adhésion des virus sur un support sont régies principalement par les interactions électrostatiques, les interactions de van der Waals et les interactions hydrophobes.

**Les interactions électrostatiques** ou Coulombiennes résultent de la protonation-déprotonation de groupements ionisables ( $-\text{COO}^-$ ,  $-\text{NH}_3^+$ , groupements phosphates...). Cette charge résultante est écrantée par la présence des contre-ions du solvant. Des modèles de type « double couche ionique » ont été établis avec une couche liée de contre-ions et une couche diffuse neutralisant la charge du colloïde. Lorsque deux colloïdes ont des charges de même signe, l'énergie d'interaction est positive et les interactions sont répulsives. Lorsque les colloïdes sont de charges opposées, les interactions sont attractives. L'énergie d'interaction coulombienne est inversement proportionnelle à la distance qui sépare les deux colloïdes.

Dans le cas d'une solution monodisperse de macromolécules biologiques, l'énergie potentielle sera donc répulsive, car ces macromolécules ont toutes la même charge moyenne effective, répartie uniformément à leur surface. Ce type d'interaction a été largement décrit pour les particules virales au travers de nombreuses études (Keswick et Gerba, 1980; Sobsey *et al.*, 1980; Moore *et al.*, 1981; Shields et Farrah, 1983; Gerba, 1984; Shields et Farrah, 1987;

Redman *et al.*, 1997; van Voorthuizen *et al.*, 2001; Suci *et al.*, 2005; van der Schoot et Bruinsma, 2005). Par exemple, pour Redman *et al.*, 1997, la filtration de VLP de Norovirus sur du quartz est hautement dépendante de la nature et de la magnitude des interactions électrostatiques développées entre le virus et le quartz.

**Les interactions de van der Waals** proviennent de l'interaction entre les électrons d'une molécule et les charges (électrons et noyaux) d'une autre. Elles sont d'origine dipolaire et toujours présentes dans le système dispersé. Ces forces, d'intensité faible, sont cependant d'une importance considérable pour expliquer la plupart des comportements des atomes ou des molécules en raison de leur nombre très important. Elles possèdent des énergies d'interaction d'environ 10 à 40 kJ.mol<sup>-1</sup>, qui sont faibles par rapport aux interactions électrostatiques ou aux liaisons covalentes (>> 10 kJ.mol<sup>-1</sup>) (Sigg *et al.*, 2006). Elles sont de nature le plus souvent attractives à courte distance (0,3-0,8 nm) et varient en 1/r<sup>6</sup>. Cependant à très courtes distances (< 0,3 nm), ces interactions deviennent répulsives par interpénétration des nuages électroniques. Par contre, aucune description ou quantification de ces forces n'est à ce jour connue pour des particules virales.

Enfin, van Oss, 1996, montre que l'on ne peut négliger les **interactions hydrophobes** entre des colloïdes en solution puisqu'elles peuvent être jusqu'à 100 fois supérieures aux interactions de van der Waals et aux interactions électrostatiques. Ces interactions ont déjà été décrites pour plusieurs virus et notamment pour leur adhésion sur des surfaces (Farrah *et al.*, 1981; Bales *et al.*, 1991; Bales *et al.*, 1993; Lytle et Routson, 1995; Schijven et Hassanizadeh, 2000; Chattopadhyay *et al.*, 2002). D'ailleurs, pour certains virus, elles deviennent majoritaires lorsque la force ionique de la solution augmente (Farrah, 1982; Lukasik *et al.*, 2000; van Voorthuizen *et al.*, 2001; Shields et Farrah, 2002).

## IV. 2. Aspects théoriques des mécanismes d'adhésion-agrégation

### IV. 2. 1. Le mouvement brownien

Dans une solution au repos, les particules sont soumises à l'**agitation thermique**. Les particules fines en solution ne sont jamais immobiles et s'entrechoquent régulièrement. Les nombreux chocs que les particules reçoivent du milieu environnant provoquent des changements de direction continus. Ce mouvement de particules et leurs collisions stochastiques ont été décrits par le botaniste écossais Robert Brown en 1827. Il observa que des grains de pollens en suspension dans l'eau suivaient un mouvement rapide et désordonné. Cette agitation thermique peut déstabiliser une solution colloïdale en augmentant la

probabilité que les colloïdes se rencontrent et ainsi passer d'une solution monodispersée, où toutes les particules ont la même taille, à une solution polydispersée contenant des agrégats de plusieurs tailles.

En solution, les petites particules soumises au mouvement brownien bougent rapidement alors que les plus grosses se déplacent lentement. A partir de ce principe, et en mesurant la vitesse de ce déplacement, il est alors possible de déterminer la taille d'une particule *via* l'équation de Stokes-Einstein.

#### IV. 2. 2. La théorie DLVO et ses limites

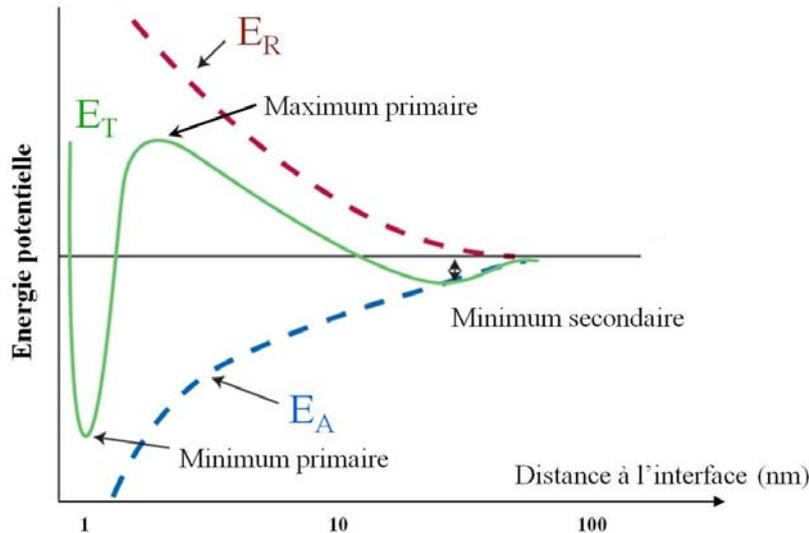
Selon les caractéristiques chimiques et physiques des virus, du support et des conditions physico-chimiques du milieu, certaines interactions prédomineront par rapport à d'autres. Une théorie a été élaborée pour décrire les forces d'interaction liées à l'adhésion-agrégation : la **DLVO**. Dans la théorie DLVO, qui sont les initiales des auteurs de deux articles : Derjaguin et Landau, 1941; Verwey et Overbeek, 1948, seules des interactions électrostatiques et de type London-van der Waals sont prises en compte.

La théorie DLVO permet de calculer les diagrammes énergétiques des interactions répulsives existant entre les charges portées par les particules colloïdales de même nature et les interactions attractives résultant des forces de van der Waals. Le potentiel énergétique résultant de ces deux interactions peut être calculé et utilisé pour prédire la stabilité des colloïdes. L'allure générale des courbes (Figure 18) représente l'énergie totale ( $E_T$ ) en fonction de la distance entre deux particules et est souvent caractérisée par :

- un minimum secondaire correspondant à une énergie attractive résiduelle de faible amplitude, développée à une plus grande distance de la surface de la particule,
- un maximum primaire qui correspond à la barrière énergétique à franchir pour permettre l'attachement ou le détachement particulaire,
- un minimum primaire correspondant à une énergie attractive très forte et irréversible, développée à proximité de la surface virale.

Ainsi, les colloïdes sont soumis aux forces d'attraction de van der Waals ( $E_A$ ) et aux forces de répulsion électrostatique ( $E_R$ ). L'énergie totale ( $E_T$ ) des colloïdes vaut alors :

$$E_T = E_A + E_R$$



**Figure 18 : Profil énergétique  $E_T$  résultant des différentes forces entrant dans la théorie de la DLVO (adaptée de Malescio, 2003).  $E_A$  correspond aux forces d'attraction (van der Waals),  $E_R$  aux forces de répulsion (électrostatique) et  $E_T$  l'énergie totale.**

En ce qui concerne l'agrégation par exemple, si la barrière énergétique est franchie (maximum primaire) et que le système est dans le minimum primaire, alors une agrégation irréversible entre particules est obtenue : c'est la coagulation. Au contraire, si le système est dans le minimum secondaire de la courbe décrite, l'agrégation peut alors être réversible par simple agitation : c'est la floculation.

Le modèle DLVO a montré son efficacité pour modéliser et prédire les interactions à longue distance de nombreux systèmes. Cependant, ce modèle présente des limites et il est difficilement transposable à beaucoup de systèmes. De nombreux exemples d'écarts entre les résultats expérimentaux et les prédictions issues du modèle DLVO sont apparus. Ces écarts sont habituellement attribués à des forces à courte distance distinctes des forces électrostatiques ou de van der Waals. En effet, le modèle DLVO omet totalement la troisième composante énergétique qui peut jouer un rôle non négligeable dans un solvant polaire : les interactions polaires ou acide-base de Lewis. En intégrant cette troisième composante, van Oss, 1996; Hermansson, 1999, ont proposé une évolution de la DLVO : la **xDLVO** (ou "extra-DLVO" ou "extended-DLVO") pour prédire ce qui est généralement englobé sous le terme d'interactions hydrophobes.

Mais même cette évolution de la DLVO néglige certains facteurs pouvant avoir un effet significatif. Pour Bostrom *et al.*, 2001, ces théories ne sont applicables que pour des milieux de faible force ionique ( $< 0,1$  M) et ne prennent pas en compte la nature des contre-ions (monovalent, divalent ...) qui constituent notamment des zones très polarisables aux

interfaces. De plus, de par la nature même des ions, ceux-ci peuvent favoriser la répulsion entre deux interfaces par des effets stériques et favoriser ou déstabiliser les interactions hydrophobes.

Ces différents exemples illustrent les difficultés que rencontrent les théoriciens actuels pour accorder la théorie DLVO aux observations expérimentales. De plus, le nombre de forces non-DLVO devenu très important a donné naissance à de nombreuses théories qui modifient le modèle DLVO pour chaque interaction particulière (Ninham, 1999). La simplicité initiale du modèle est maintenant noyée dans la prolifération de paramètres nouveaux créés pour chaque système.

#### IV. 2. 3. Mécanisme d'agrégation

En fonction de l'existence d'une barrière répulsive ou non entre les particules, on constate que (Weitz et Oliveria, 1984; Cametti *et al.*, 1989; Lin *et al.*, 1989; Asnaghi *et al.*, 1992) :

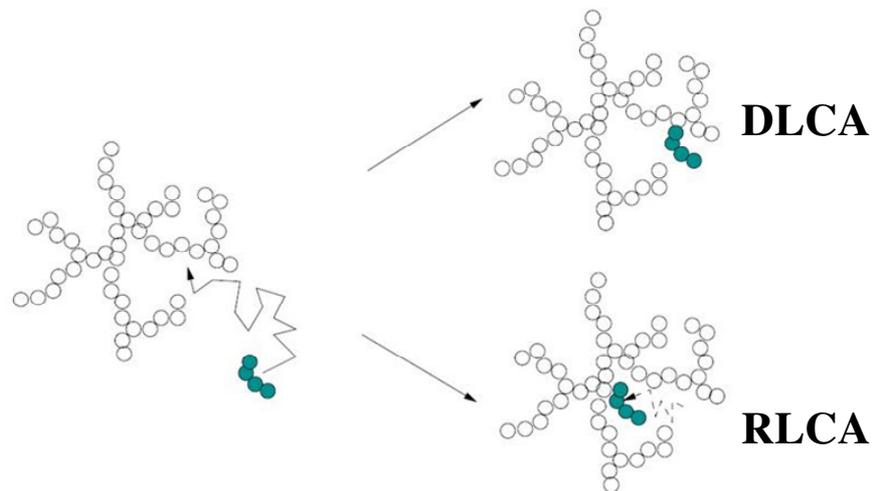
- les agrégats ne se forment pas à la même vitesse,
- les agrégats s'organisent selon des structures différentes.

Si aucune barrière d'énergie répulsive n'existe entre les particules et donc que chaque collision conduit à la formation d'une liaison irréversible entre les deux particules, alors les agrégats présentent une structure lâche. Par contre, si la probabilité d'adhésion entre les particules est très faible, alors les agrégats sont plus compacts. Ces deux comportements différents sont observés quelle que soit la nature des particules (Lin *et al.*, 1989). Cette indépendance des structures vis-à-vis de la nature du système des particules a conduit les auteurs à définir une notion d'universalité des mécanismes d'agrégation. Deux grands types de mécanismes ont ainsi été définis où le nombre de particules est considéré constant et distribué au hasard dans l'espace :

- **DLCA** (Diffusion Limited Cluster Aggregation) : Il n'existe aucune répulsion entre les particules et la probabilité de collage est donc forte,
- **RLCA** (Reaction Limited Cluster Aggregation) : Une barrière de répulsion existe et la probabilité de collage est proche de 0.

La figure 19 montre la différence de structure d'agrégat obtenue en fonction de la probabilité d'adhésion. Pour qu'une structure agrégée soit compacte, cela nécessite que la porosité qu'elle développe pendant sa croissance soit faible. Il faut donc que les grands vides créés lors

des chocs soient comblés par de nouvelles particules. Lorsque la probabilité d'adhésion est forte, il y a de grandes chances pour que les particules qui pourraient combler les vides s'adhèrent avant d'avoir pu les atteindre (mécanisme DLCA). A l'inverse, lorsque la probabilité d'adhésion est faible, les particules peuvent explorer de nombreux sites avant de s'adhérer définitivement. Elles ont donc plus de chance de combler la porosité (mécanisme RLCA).



**Figure 19 : Impact de la probabilité de collision sur la structure des agrégats suivant le mécanisme DLCA ou RLCA (adapté de Thill, 1999).**

#### **IV. 3. Les facteurs physico-chimiques du milieu influençant l'adhésion-agrégation des virus**

Les caractéristiques structurales et chimiques des particules virales leur confèrent des propriétés interfaciales spécifiques qui évoluent en fonction des paramètres physico-chimiques du milieu. La modification du milieu engendre un changement au niveau de l'interface des virus qui peut entraîner différents comportements dont le rapprochement particule-particule (agrégation) ou particule-support (adhésion).

Parmi les principaux facteurs environnementaux susceptibles d'influencer l'adhésion ou l'agrégation des particules virales dans un milieu hydrique, on peut distinguer le pH et la force ionique.

Pour étudier le phénomène d'**agrégation** des virus, plusieurs auteurs se sont basés sur l'observation des protéines isolées de capsid virale, de la capsid dépourvue de génome (VLP pour Virus Like Particle) ou du virus complet. Différentes techniques ont été utilisées pour mettre en évidence et étudier ce phénomène d'agrégation : la microscopie électronique (Floyd et Sharp, 1977; Floyd et Sharp, 1978b), la diffusion des rayons X aux petits angles

(Casselyn, 2002), la diffusion de la lumière (Sagrera *et al.*, 1998; Tang *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2006; Langlet *et al.*, 2007; Langlet *et al.*, 2008), la cytométrie en flux (Jorio *et al.*, 2006), l'immunoélectrophorèse ou encore la spectroscopie acoustique et électroacoustique (Dukhin et Goetz, 2001; Dukhin *et al.*, 2007).

Le phénomène d'**adhésion** des virus sur un support (stockage, membrane...) est étudié en comparant les quantités de virus avant et après contact avec le support. La quantification des virus peut se faire soit par des méthodes basées sur leur infectiosité (NPPUC, UFP), soit par des méthodes de biologie moléculaire (PCR, RT-PCR classique ou temps réel).

#### IV. 2. 1. Le pH

Le pH du milieu entraîne la protonation ou la déprotonation des groupements ionisables du virus conférant ainsi une charge nette à la particule virale. A partir du  $pI$  d'un virus donné (tableau 10), on peut déterminer les domaines de pH pour lesquels le virus est chargé négativement ( $pH > pI$ ) ou positivement ( $pH < pI$ ) (Gerba, 1984).

De nombreux travaux ont été réalisés sur différents modèles : protéine virale de capsid, capsid vide dépourvue de génome, particules virales entières, mélanges de suspensions virales.

Lorsque le pH du milieu est égal au  $pI$  des virus, ce sont alors les interactions hydrophobes et de van der Waals qui deviennent prédominantes par rapport aux interactions électrostatiques, ce qui a pour effet d'augmenter l'attraction entre les particules virales et donc l'**agrégation**. Par exemple, pour Herath *et al.*, 1999, l'agrégation des coliphages T4, Q $\beta$ , MS2 et fr est maximale pour des pH voisins de leur  $pI$ . Floyd, 1979 a montré la possibilité d'agréger des particules virales de poliovirus 1 (souche Mahoney ;  $pI = 8,2$ ) et de reovirus 3 (souche Dearing ;  $pI=3,9$ ) séparément ou conjointement lors du passage du pH de 7 à 3 pour une même concentration saline dans le milieu. Chiti *et al.*, 2002 ont montré l'existence d'une corrélation inverse entre le taux d'agrégation et la charge nette d'enzyme musculaire humaine. Ainsi, plus le pH est proche du  $pI$ , plus la particule virale est propice à l'agrégation. Ce phénomène d'agrégation, pour des valeurs de pH inférieures ou égales aux  $pI$ , est également relaté pour d'autres études sur le Poliovirus 1 (souche Mahoney) (Floyd et Sharp, 1978b; Floyd, 1979; Floyd et Sharp, 1979), sur le Reovirus 3 (Floyd et Sharp, 1977; Floyd et Sharp, 1978b; Floyd, 1979; Floyd et Sharp, 1979), sur l'Adenovirus de type 2 (Galdiero, 1979), sur l'AAV (Johnson et Bodily, 1975) ou encore sur les bactériophages MS2 et Q $\beta$  (Herath *et al.*,

1999). Dans l'eau ou à un pH proche de la neutralité, aucun agrégat de Poliovirus 1 et de Reovirus 3 n'est observé (Floyd, 1979).

Pour des domaines de pH éloignés du  $pI$  du virus, une agrégation peut être observée malgré la charge des particules virales. Cette agrégation est relatée principalement pour des virus à symétrie hélicoïdale (qui ne s'auto-assemblent pas spontanément) et pour des pH basiques qui dénaturent la capsidie protéique. Par exemple, en étudiant des protéines de capsidie de virus à symétrie hélicoïdale (qui ne s'auto-assemblent pas spontanément) comme le Virus de la Mosaïque du Tabac (VMT), Butler, 1984; Rafikova *et al.*, 2003, montrent que le mécanisme d'agrégation est différent en fonction du pH considéré. A pH 5,6, l'agrégation est « spécifique » et les protéines de capsidie du VMT s'agrègent de façon à former une hélice proche de la symétrie hélicoïdale du virus natif. Pour des pH basiques, des petits agrégats « non spécifiques » de quelques protéines apparaissent, provoqués par une dénaturation partielle des protéines.

Au contraire, dans un travail réalisé sur des capsides vides de virus de Norwalk (Norwalk Virus Like Particle ou nVLP), Ausar *et al.*, 2006, observent, à pH basiques, une diminution de la taille des particules due à la dénaturation de la capsidie.

En ce qui concerne l'**adhésion** de virus sur un support (membrane, surface minérale), plusieurs situations peuvent être rencontrées suivant les caractéristiques plus ou moins communes des deux systèmes en interactions, support et virus. Dans des conditions où le support et le virus présentent une charge similaire, les répulsions électrostatiques limitent l'adhésion. Par exemple, Redman *et al.*, 1997, observent que, lors du passage de particules recombinantes de *Norovirus* (nVLP) sur du quartz à pH 5 ( $pI$  de ces particules), plus de 99,99% des particules s'adsorbent. A l'inverse, lorsque ces mêmes particules sont placées dans une solution de pH 7, l'adhésion passe à 17%. Cette diminution serait due au changement de charge de la particule. A pH 5, elle posséderait une charge neutre permettant la fixation sur le quartz ( $pI$  2 à 3,2) alors qu'avec l'augmentation du pH, elle se chargerait négativement entraînant des répulsions électrostatiques avec le quartz chargé également négativement. Lorsque le virus et le support sont de même charge, l'adhésion peut être possible *via* des interactions hydrophobes et l'éluion possible par des agents chaotropes qui déstabilisent ces interactions. En effet, pour Farrah *et al.*, 1981, lorsque le Poliovirus 1 (Souche LSc ;  $pI$  = 6,6) et la membrane sont chargés négativement à pH 9,5, l'ajout d'agents chaotropes favorise l'éluion virale.

En revanche, lorsque le virus et le support sont de charges opposées, le rôle des interactions hydrophobes semble devenir négligeable dans l'adhésion et ce sont les interactions électrostatiques qui deviennent majoritaires. Par exemple, Farrah *et al.*, 1981, montrent qu'à pH 4, le fait de déstabiliser ou non les interactions hydrophobes n'influence pas l'éluion du Poliovirus 1 alors chargé positivement sur une membrane électronégative.

La connaissance des domaines de pH pour lesquelles les virus sont chargés positivement ou négativement s'est surtout avéré utile et efficace pour les techniques de concentration de virus par adhésion-éluion sur des supports chargés. En milieu acide, le virus chargé positivement adhère à une membrane électronégative (Sobsey *et al.*, 1973; Farrah *et al.*, 1976; Gerba *et al.*, 1978; Morris et Waite, 1980; Sobsey *et al.*, 1985; Payment *et al.*, 1989) et inversement à pH neutre ou basique où la majorité des virus est chargé négativement (Sobsey et Jones, 1979; Logan *et al.*, 1980; Sobsey et Glass, 1980; Chang *et al.*, 1981; Raphael *et al.*, 1985; Shields *et al.*, 1986; Lukasik *et al.*, 2000).

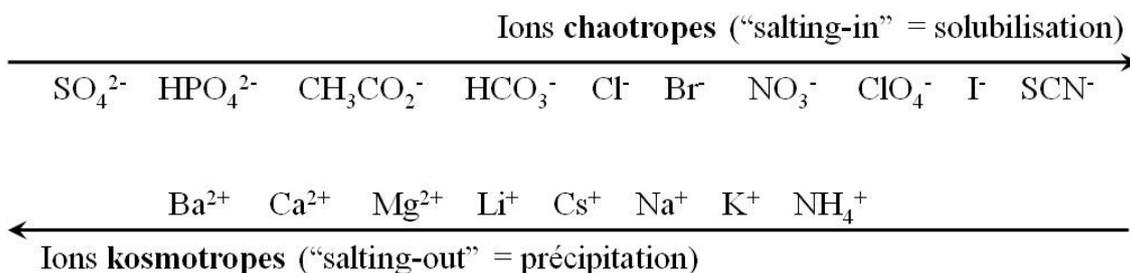
L'étude de la **réversibilité** des phénomènes d'agrégation due au pH a également été l'objet de travaux où, dans certains cas, une inversion de pH fut capable de dissocier partiellement les agrégats. Après acidification pour agréger les particules virales, la dissociation des agrégats de Poliovirus 1 et de Reovirus 3 peut être obtenue en ajoutant une base (Tris-hydrochloride, pH 10) pour neutraliser la suspension (Floyd, 1979). Néanmoins, ce phénomène ne semble pas total car des agrégats sont toujours présents. De même, pour Simonet, 2007, l'augmentation du pH avec un tampon glycine (pH 9) permet une redissociation partielle des agrégats de phages MS2.

#### IV. 2. 2. La composition ionique

L'influence des sels sur l'état particulière des virus dans le milieu hydrique a été abondamment relatée au travers de nombreuses études, aussi bien pour les processus d'agrégation que pour les processus d'adhésion. L'étude de l'influence des ions sur le comportement du virus est complexe car elle dépend de la nature des ions et des contre-ions impliqués dans les phénomènes de double couche électrique, de la valence et de la concentration. De plus les co-ions peuvent jouer un rôle non négligeable sur ces interactions.

La **nature de l'ion** influence les forces d'interactions. Hofmeister, 1888 a classé les ions en fonction de leur capacité à précipiter de petites protéines : les euglobulines. La **série de**

**Hofmeister** décrit l'effet relatif de quelques anions et cations à précipiter de petites protéines par agrégation. La figure 20 présente l'ordre non-exhaustif de la série de Hofmeister.



**Figure 20 : Série de Hofmeister.**

Les ions **kosmotropes**, favorisant la précipitation (« salting-out ») des protéines, se distinguent des ions **chaotropes** solubilisants (« salting-in »). Les ions kosmotropes ou anti-chaotropes, également nommés en anglais « structure-maker », possèdent une forte affinité pour l'eau. Ils augmentent la tension de surface de l'eau et engendrent ainsi une exclusion des groupements hydrophobes, ce qui favorise leur regroupement. Ils s'opposent aux ions chaotropes ou « structure-breaker » qui sont peu hydratés. Ceux-ci diminuent la tension de surface de l'eau en déstabilisant sa structure moléculaire. Ceci a pour effet de diminuer le rapprochement des groupements hydrophobes.

Il a été observé que les effets de Hofmeister, sur des protéines, sont différents selon le pH (Ries-Kautt et Ducruix, 1989; Carbonnaux *et al.*, 1995; Finet *et al.*, 2004). Si le pH est inférieur au *pI* de la protéine, c'est un effet de Hofmeister « inverse » qui se produit. Dans ce cas ce sont les ions les plus chaotropes qui provoquent la précipitation de la protéine :  $\text{SCN}^- > \text{I}^- > \text{Cl}^-$ . Par contre, si le pH est supérieur au *pI* de la protéine, c'est l'ordre direct de la série qui est observé. Lorsque le pH est voisin du *pI*, l'effet des sels s'amointrit et disparaît parfois. Ceci est confirmé par Floyd et Sharp, 1978a, qui observent que, lorsque le pH est inférieur au *pI*, l'agrégation du poliovirus 1 (souche Mahoney) et du reovirus 3 (souche Dearing) est plus marquée avec des cations univalents ( $\text{Na}^+$ ) qu'avec des cations bivalents ( $\text{Mg}^{2+}$ ). Ils observent peu de différences d'agrégation du reovirus 3 entre des anions bivalents ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) et monovalents ( $\text{Cl}^-$ ). Par contre, lorsque le pH est supérieur au *pI* du reovirus 3, ils observent toujours la même influence de ces ions. Ceci montre que les effets des ions sur des structures protéiques complexes ne correspondent pas toujours à la série de Hofmeister.

Il est important de souligner que l'effet Hofmeister semble être lié à la taille des protéines en solution. Casselyn, 2002, a étudié le Virus de la Mosaïque du Brome (BMV) par diffusion des rayons X aux petits angles et montre qu'avec différents anions, l'effet

Hofmeister est toujours présent avec le BMV. Mais cet effet est insuffisant pour obtenir une agrégation, ce qui avait déjà été mis en évidence avec des macromolécules moins grosses que le BMV (Budayova *et al.*, 1999; Vivares et Bonnete, 2002).

D'une manière générale, les virus ont des caractéristiques (taille, assemblage complexe de la capsid, présence de génome...) qui ne permettent pas de généraliser quant aux effets de la série de Hofmeister sur l'agrégation virale.

Parmi les agents chaotropes, on peut également citer le Tween 80, le Triton et l'urée. L'EDTA et le citrate sont quant à eux des agents kosmotropes. Pour Gerba, 1984, les agents kosmotropes améliorent l'adhésion de MS2 sur des filtres hydrophobes. Chattopadhyay *et al.*, 2002, montrent que les surfactants ioniques (SDBS anionique : Sodium Dodecyl Benzene Sulfonate, HDTMA cationique (HexaDecyl TrimethylAmmonium bromide) ou non (Triton X-100) se fixent également sur les sites libres des particules sorbantes et entraînent une diminution de l'adhésion des phages sur celles-ci. McCreedy *et al.*, 1990, montrent que le phénomène d'agrégation ne peut être inversé sans la présence de Triton X-100.

Un des aspects particulièrement étudiés concernant le processus d'agrégation est la concentration en sels présents dans le milieu (Floyd et Sharp, 1978a; Galdiero, 1979; Sagrera *et al.*, 1998; Orlov *et al.*, 2001; Overman *et al.*, 2004; Shi *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2006).

La **force ionique** ( $\text{mol.L}^{-1}$ ) est d'exprimer cette concentration en sel dans la solution en tenant compte aussi de la valence des ions selon la formule suivante :

$$I = \frac{1}{2} \sum (c_i z_i^2)$$

avec  $z_i$  : la valence de l'espèce  $i$  et  $c_i$  sa concentration molaire.

Lorsque la force ionique de la solution augmente, la double couche entourant le colloïde est alors compressée, de telle sorte que la densité de charge effective des particules diminue, favorisant leur rapprochement (Floyd et Sharp, 1979 ; Farrah *et al.*, 1981 ; Shields et Farrah, 1983, Gerba 1984). Ce sont essentiellement les forces électrostatiques qui sont amoindries par l'écrantage des charges par les contre-ions de la couche diffuse. Ceci permet alors de distinguer les interactions de van der Waals et hydrophobes, jusque là minoritaires, par rapport aux interactions électrostatiques. La résultante est l'augmentation de l'attraction entre particules similaires (Azeredo *et al.*, 1999; Hermansson, 1999).

De nombreuses études ont d'ailleurs observé que l'agrégation augmentait avec la **valence de l'ion** : les cations multivalents favorisent plus l'agrégation que les cations monovalents. Ce principe est couramment employé dans le cadre du traitement de l'eau où des sels d' $\text{Al}^{3+}$  sont utilisés dans les stations d'épuration pour induire la coagulation et la décantation des agrégats. Les ions portant plusieurs charges sont plus susceptibles de compresser la double couche de la particule qu'un ion portant une seule charge, et donc de masquer de manière plus importante les charges.

Les travaux portant sur l'impact de la force ionique en sels sur des virus révèlent une hétérogénéité au niveau des effets engendrés. Il a été observé que l'agrégation des virus ou des protéines de capsid virale isolée pouvait être induite avec une force ionique faible en électrolyte indifférent ( $\text{NaCl} < 150 \text{ mM}$ ) (Floyd et Sharp, 1977; Floyd et Sharp, 1978a; Galdiero, 1979; Gaudin *et al.*, 1995; Sagraera *et al.*, 1998; Overman *et al.*, 2004; Shi *et al.*, 2005). Par contre, pour des électrolytes avec une valence supérieure à un, plusieurs auteurs ont montré que l'agrégation était liée à une augmentation de la concentration saline. Par exemple, Orlov *et al.*, 2001, ont montré que les protéines de capsid du Virus de la Mosaïque du Tabac (VMT) s'agrègent de manière significative avec l'augmentation de la concentration en PBS. Lee *et al.*, 2006, observent également l'apparition de particules agrégées exclusivement pour des concentrations en  $\text{CuCl}_2$  supérieures à 0,5 mM. Nedoluzhko et Douglas, 2001, ont observé une augmentation de l'agrégation du VMT avec l'augmentation de l'ion considéré ( $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  et  $\text{Ni}^{2+}$ ) mais qu'une concentration critique spécifique à l'ion était nécessaire pour observer ce phénomène. Paradoxalement, ils ne constatent aucun effet des ions  $\text{Mg}^{2+}$  ou  $\text{Ca}^{2+}$  sur le VMT quelle que soit leur concentration. Tang *et al.*, 2002, montrent aussi que l'agrégation des phages fd et M13 dépend du cation divalent utilisé et de sa concentration. Par exemple, l'agrégation du phage fd est induite par les cations  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$  et  $\text{Sr}^{2+}$  mais pour des concentrations différentes (entre 40 et 120 mM). En revanche, l'agrégation du phage M13 n'est provoquée que par  $\text{Ca}^{2+}$  à 50 mM, les autres cations n'ayant aucun effet, quelle que soit leur concentration.

Ainsi, l'agrégation du virus dépend non seulement du type de virus considéré mais également de la force ionique et de la nature du contre ion.

Concernant le phénomène d'**adhésion** des virus, Shields et Farrah, 2002, observent que l'augmentation de la force ionique à pH 7 tend à faire diminuer l'adhésion du bactériophage MS2 (chargé alors négativement) sur une membrane hydrophile chargée

positivement (DEAE Sépharose) en diminuant les attractions électrostatiques. De plus, cette même augmentation de force ionique favorise l'adhésion de MS2 sur une membrane hydrophobe, en favorisant les interactions hydrophobes. Farrah *et al.*, 1981, sous-entendent l'existence de plusieurs phénomènes pour expliquer l'adhésion de virus sur une membrane. Selon eux, la présence de cations bivalents réduit non seulement la double couche qui entoure la particule mais favoriserait aussi l'existence d'interactions cationiques pontantes, ou ponts salins, entre la particule et le support et augmenterait la charge positive du filtre.

D'une manière générale, plusieurs auteurs ont montré que l'adhésion de virus à un support augmentait lorsque la valence de l'ion, et notamment du cation, augmentait (Lipson et Stotzky, 1983 ; Bales *et al.*, 1991 ; Nasser *et al.*, 1992 ; Quignon *et al.*, 1998 ; Lukasik *et al.*, 2000).

Ainsi, la valence de l'ion semble être l'un des paramètres clé pour favoriser l'adhésion de virus sur un support chargé. La force ionique conditionne l'adhésion-élution du virus sur un support en favorisant ou non les interactions électrostatiques et hydrophobes.

Plusieurs études se sont intéressées au phénomène de **réversibilité** de l'adhésion-agrégation par modification de la force ionique. Certains auteurs observent que la réversibilité du processus d'agrégation est engendrée par l'excès des contre-ions augmentant ainsi la densité de charge des virus (Galdiero, 1979; McCreedy *et al.*, 1990; Gaudin *et al.*, 1995; Sagrera *et al.*, 1998; Shi *et al.*, 2005). Tang *et al.*, 2002, après avoir induit l'agrégation des phages fd et M13 en présence de  $\text{Ca}^{2+}$  à 50 mM, parviennent à dissocier les agrégats avec des concentrations de  $\text{Ca}^{2+}$  de l'ordre de 300-430 mM pour fd et 200-290 mM pour M13. D'autres, au contraire, ont clairement montré que la réduction de la force ionique de 0,5M à 0,005 M permet une élution des phages MS2, préalablement adsorbés sur de la silice (Bales *et al.*, 1993).

#### **IV. 2. 3. Autres facteurs influençant l'état des particules**

Enfin, il faut signaler qu'il existe dans le milieu hydrique de nombreux autres facteurs susceptibles d'influencer le comportement des virus. Nous décrivons ci-dessous et de manière non exhaustive, quelques uns de ces facteurs.

✓ les matières organiques

Les acides humiques et fulviques ont montré leur capacité à diminuer les interactions des particules virales avec des surfaces adsorbantes (Rose *et al.*, 1984; Guttman-Bass et Catalano-Sherman, 1985; Sobsey et Hickey, 1985; Guttman-Bass et Catalano-Sherman, 1986). La présence de matière organique dans les sols aboutit généralement à une moins bonne adhésion virale sur de l'argile purifiée (Quignon *et al.*, 1997). De même, Moore *et al.*, 1981, ont observé une corrélation négative significative ( $p \leq 0,001$ ) entre le contenu en matière organique de 34 minéraux et sols différents et l'adhésion du Poliovirus 1. De même, Bixby et O'Brien, 1979, notent que la présence d'acide humique ou fulvique réduit fortement l'adhésion des bactériophages sur les sols. Cependant, étant donnée la grande complexité chimique de ces composés, il est difficile d'indiquer avec précision comment ces molécules agissent. Globalement pour Moore *et al.*, 1981, l'action de la matière organique est principalement due à sa forte capacité d'adhésion, non seulement vis-à-vis des particules virales, mais aussi vis-à-vis des surfaces adsorbantes.

✓ la concentration virale

En théorie, la quantité de particules présentes initialement dans la solution peut influencer l'agrégation dans la mesure où plus il y a de particules, plus grande est la probabilité de rencontre entre elles. Les différentes expériences à ce sujet sont cependant contradictoires. Ainsi, Floyd et Sharp, 1977, observent sur une dilution au 1/10 la formation d'agrégats de Poliovirus 1 dans de l'eau distillée. Par contre, pour des dilutions supérieures au 1/100, les particules restent dispersées. Rafikova *et al.*, 2003, ont également mis en évidence une relation entre la concentration en protéine de capsid du TMV et l'agrégation, celle-ci augmentant avec la concentration. Galdiero, 1979, montre que l'agrégation d'Adenovirus de type 2 diminue si la suspension virale est plus diluée.

Paradoxalement, pour le Reovirus 3, Floyd et Sharp, 1977, obtiennent une agrégation quel que soit le facteur de dilution. Pour des pH inférieurs à 5, et quel que soit le tampon utilisé, Floyd, 1979, obtient de larges agrégats de Poliovirus 1 et de Reovirus 3, phénomène encore plus marqué après dilution au 1/20. Shi *et al.*, 2005, en diluant une suspension de VLP de Papillomavirus humain, constatent une augmentation de l'agrégation. Nedoluzhko et Douglas, 2001, n'ont observé aucune dépendance de la concentration virale sur l'agrégation du TMV.

✓ la température

En théorie, l'augmentation de la température du milieu augmente l'agitation thermique et favorise le nombre de collisions entre particules. Elle serait donc favorable à une augmentation du phénomène d'agrégation. Différentes études montrent en effet que la baisse de la température du système diminue le taux d'agrégation voire inhibe le processus (Galdiero, 1979 ; Shi *et al.*, 2005). Rafikova *et al.*, 2003, observent, pour des températures supérieures à 40°C, une augmentation du phénomène d'agrégation des protéines de capsid du TMV. A noter que les protéines de capsid ou les virus entiers sont dénaturés lorsque la température devient élevée.

*En conclusion, les interactions entre particules virales sont un phénomène complexe dépendant de nombreux paramètres tels que les propriétés physico-chimiques des virus et du milieu considéré. Parmi les caractéristiques du milieu, le pH et la composition ionique jouent un rôle prépondérant sur la réactivité des virus puisqu'ils conditionnent les charges du virus. De nombreux travaux ont tenté de déterminer les mécanismes responsables des phénomènes d'agrégation, suggérant l'influence des forces électrostatiques, de van der Waals, la formation de ponts salins ou encore des interactions polaires. Cependant, ces forces ne peuvent être prises en compte indépendamment pour expliquer le rapprochement inter-particulaire mais plutôt comme une synergie de l'ensemble de ces forces évoluant selon le système. L'étude de l'agrégation d'une particule virale se révèle par conséquent spécifique des conditions de travail utilisées et du virus considéré.*



## **Partie 2 :**

***Etude des propriétés interfaciales des  
bactériophages ARN F-spécifiques***

L'objectif de cette première partie est de déterminer la charge et la balance hydrophile-hydrophobe relative des bactériophages ARN F-spécifiques. Le marquage des virus (radioactivité, fluorescence) et l'utilisation de "Virus Like Particles" (VLP) peuvent modifier les propriétés physico-chimiques d'une particule virale. C'est pourquoi nous avons utilisé uniquement des particules virales complètes non marquées. Par ailleurs, la mesure des propriétés interfaciales a été effectuée en milieu aqueux dans des conditions physico-chimiques contrôlées (pH, force ionique, nature des ions). Toutes les suspensions virales ont été purifiées (clarification, filtration sur 0,22  $\mu\text{m}$ , dialyse). Dans un milieu hydrique, les propriétés interfaciales des virus influencent directement l'adhésion des virus sur un support ou leur agrégation.

Dans la littérature, les propriétés électriques des particules virales sont évaluées au travers du point isoélectrique et des valeurs de potentiel zêta obtenues en fonction de la force ionique et/ou du pH. Cette description comporte au moins deux inconvénients : d'une part, un point isoélectrique ne permet pas d'estimer une charge électrique à pH neutre et d'autre part, la notion de potentiel zêta est applicable à des particules dures et non à des particules molles et perméables (Ohshima, 1995; Dague, 2006). Cette mollesse et cette perméabilité ont déjà été mises en évidence pour d'autres particules biologiques (bactéries et érythrocytes humains). A priori, les virus peuvent présenter, comme ces particules, de telles caractéristiques. Nous avons donc choisi de procéder en deux étapes. Il s'agissait d'abord de développer un modèle théorique permettant de quantifier les caractéristiques électro-hydrodynamiques des bactériophages ARN F-spécifiques en fonction de l'anisotropie chimique et structurale. Dans un second temps, les mobilités électrophorétiques et la taille des particules en suspension ont été définies. Les mobilités électrophorétiques ont été préférées aux valeurs de potentiel zêta en raison de l'approximation importante de cette notion pour des particules biologiques molles. Elles permettent, pour des particules ayant une taille équivalente et une perméabilité identique, de déterminer la charge relative des bactériophages.

Les profils d'agrégation des phages en fonction de la force ionique du milieu ont permis de déterminer indirectement la balance hydrophile-hydrophobe.

L'utilisation de l'appareil Zetasizer série NanoZS (Malvern Instruments) a permis de mesurer la taille des particules (agrégation) et leur mobilité électrophorétique par des techniques de diffusion de la lumière (DLS) et d'électrophorèse (par PALS). La sensibilité de cet appareil a nécessité des concentrations virales élevées de l'ordre de  $10^{11}$  UFP.ml<sup>-1</sup>.

## I. Impact de la nature de l'interface du bactériophage MS2 sur les mesures de mobilités électrophorétiques

Nous avons étudié les caractéristiques électro-hydrodynamiques des bactériophages ARN F-spécifiques en fonction de l'anisotropie chimique et structurale en prenant comme modèle le phage MS2 car sa structure est bien définie et il est le phage ARN F-spécifique le plus couramment utilisé et étudié. Ce phage est constitué de plusieurs couches molles. Une capsidite protéique d'environ 2 nm d'épaisseur protège et entoure un génome ARN dont une partie est accolée à la surface interne de la capsidite (Figure 21A). L'étude de van den Worm *et al.*, 2006, a permis de déterminer la fonction de distribution radiale de densité protéique et génomique du phage MS2 (Figure 21B).

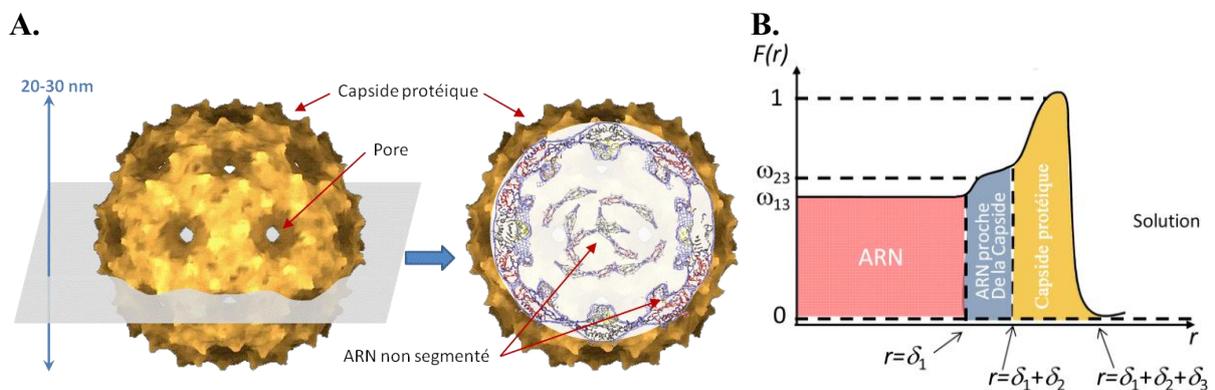


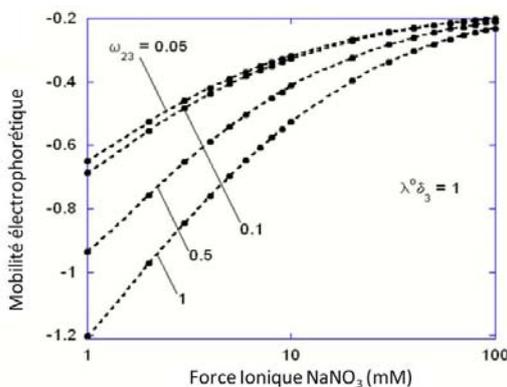
Figure 21 : A. Schéma de la structure du bactériophage MS2.

B. Profil radial  $F(r)$  de la distribution de densité calculé sur la base de mesures réalisées avec MS2 obtenus en cryo-électromicroscopie. Avec  $\omega_{13}$  : densité ARN ;  $\omega_{23}$  : densité ARN proche capsidite ;  $\delta_1$  : épaisseur ARN ;  $\delta_2$  : épaisseur ARN proche capsidite ;  $\delta_3$  : épaisseur capsidite.

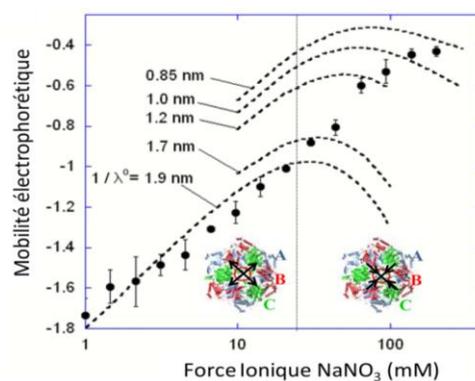
Dans un premier temps, une étude purement théorique a cherché à appréhender les comportements électrocinétiques de MS2 en fonction de différents paramètres tels que la perméabilité hydrodynamique, la force ionique et l'épaisseur des couches constitutives du phage MS2. Pour cela nous nous sommes basés sur la distribution radiale de densité du phage (Figure 21B) ainsi que sur la densité de charge de la capsidite protéique et du génome. Les densités de charge ont été déterminées à partir des constantes d'affinité protonique des différents groupements ionisables ( $pKa$  des acides aminés, des liaisons phosphodiester et des nucléotides). Connaissant la structure tridimensionnelle de la protéine de capsidite déterminée par cristallographie (PDB 2MS2), les  $pKa$  moyens des différents acides aminés ont pu être calculés en prenant en compte les effets stériques dus à l'assemblage de la capsidite, au

repliement 3D des acides aminés et aux acides aminés avoisinants, pouvant modifier leur  $pK_a$  (programme PROPKA 2.0). Pour des valeurs de pH neutres, la densité de charge volumique de la capsid a été calculé à + 74 mM et - 480 mM pour l'ARN. La capsid protéique est donc globalement chargée positivement alors que l'ARN est chargé négativement. D'un point de vue théorique, il a été montré que la mobilité électrophorétique était significativement modifiée lorsque la proportion d'acide nucléique proche de la capsid ( $\omega_{23}$ ) variait. Ceci démontre l'importance des effets hydrodynamiques (Figure 22).

Dans un deuxième temps, la perméabilité hydrodynamique de MS2 a pu être déterminée à partir des mobilités ( $\mu$ ) expérimentales (Figure 23). Il a été observé que pour des faibles forces ioniques (< 20 mM), une perméabilité importante (1,9 nm) explique les profils de mobilités expérimentales négatives. La charge négative est liée à l'ARN accolé à la capsid. Cette perméabilité peut s'expliquer notamment par la présence des 32 pores (~ 17 Å de diamètre) de la capsid. Ainsi, jusqu'à une force ionique de 20 mM, la mobilité augmente avec la force ionique en accord avec le modèle prenant en compte une perméabilité de 1,9 nm. A partir de 20 mM, les données expérimentales s'écartent de ce modèle. Ceci ne peut s'expliquer que par une modification de la perméabilité ( $1/\lambda_0$ ). Lorsque la force ionique augmente (> 20 mM), la perméabilité diminue ce qui a pour conséquence d'être moins sensible à la charge négative de l'ARN proche de la capsid. A forte force ionique, une modification de la conformation des pores par un rapprochement des boucles FG lié à une diminution des interactions électrostatiques entre les protéines, peut expliquer la diminution de cette perméabilité.



**Figure 22 : Impact de la quantité d'acide nucléique (ARN) à proximité de la capsid ( $\omega_{23}$  cf Figure 1B) dans des conditions où la perméabilité du flux,  $\lambda_0^{-1}$ , est de l'ordre de grandeur de l'épaisseur de la capsid  $\delta_3$ .**



**Figure 23 : Comparaison des mobilités électrophorétiques théoriques obtenues pour différentes valeurs de perméabilité hydrodynamique (---) et les mobilités expérimentales de MS2 (●).**

## Impact of Chemical and Structural Anisotropy on the Electrophoretic Mobility of Spherical Soft Multilayer Particles: The Case of Bacteriophage MS2

Jérémie Langlet,<sup>\*†</sup> Fabien Gaboriaud,<sup>\*</sup> Christophe Gantzer,<sup>\*†</sup> and Jérôme F. L. Duval<sup>‡</sup>

<sup>\*</sup>Laboratory of Physical Chemistry and Microbiology for the Environment, Nancy-University, CNRS, and <sup>†</sup>Virology, Pharmaceutical Faculty, 54000 Nancy, France; and <sup>‡</sup>Laboratory Environment and Mineral Processing, Nancy-University, CNRS, 54501 Vandoeuvre-lès-Nancy cedex, France

**ABSTRACT** We report a theoretical investigation of the electrohydrodynamic properties of spherical soft particles composed of permeable concentric layers that differ in thickness, soft material density, chemical composition, and flow penetration degree. Starting from a recent numerical scheme developed for the computation of the direct-current electrophoretic mobility ( $\mu$ ) of diffuse soft bioparticles, the dependence of  $\mu$  on the electrolyte concentration and solution pH is evaluated taking the known three-layered structure of bacteriophage MS2 as a supporting model system (bulk RNA, RNA-protein bound layer, and coat protein). The electrokinetic results are discussed for various layer thicknesses, hydrodynamic flow penetration degrees, and chemical compositions, and are discussed on the basis of the equilibrium electrostatic potential and hydrodynamic flow field profiles that develop within and around the structured particle. This study allows for identifying the cases where the electrophoretic mobility is a function of the inner structural and chemical specificity of the particle and not only of its outer surface properties. Along these lines, we demonstrate the general inapplicability of the notions of zeta potential ( $\zeta$ ) and surface charge for quantitatively interpreting electrokinetic data collected for such systems. We further shed some light on the physical meaning of the isoelectric point. In particular, numerical and analytical simulations performed on structured soft layers in indifferent electrolytic solution demonstrate that the isoelectric point is a complex ionic strength-dependent signature of the flow permeation properties and of the chemical and structural details of the particle. Finally, the electrophoretic mobilities of the MS2 virus measured at various ionic strength levels and pH values are interpreted on the basis of the theoretical formalism aforementioned. It is shown that the electrokinetic features of MS2 are to a large extent determined not only by the external proteic capsid but also by the chemical composition and hydrodynamic flow permeation of/within the inner RNA-protein bound layer and bulk RNA part of the bacteriophage. The impact of virus aggregation, as revealed by decreasing diffusion coefficients for decreasing pH values, is also discussed.

### INTRODUCTION

Over the years, growing attention has been devoted to the fundamental understanding of electrokinetic phenomena and their applications in various fields of science such as microfluidics (1,2), environmental science (3), advanced oil recovery issues (4), and modern ceramic materials preparation (5), to mention only a few. Understanding the concept, definition, measurement, and interpretation of electrokinetic potentials, and the role played by surface conduction (6) in accounting for electrokinetic data on hard, rigid particles, has seen substantial progress (7–15). For the sake of illustration, we mention the “dynamic Stern layer model” now frequently used to reconcile zeta potentials as obtained from independent electrokinetic techniques, e.g., electrophoresis and dielectric spectroscopy. We may state that for “simple” surfaces the slip process, and for that matter, the physical notion of zeta potential, are now well established even though molecular interpretation is still the subject of ongoing research (16). The theoretical problems are now shifting toward the interpretation of the electrokinetics of “complex”

soft colloidal systems such as bacterial particles (17–23), humic acids (24), or polysaccharides (25,26).

Contrary to their hard counterparts, soft particles are generally characterized by a hard core covered by a (charged) polyelectrolyte type of layer of given hydrodynamic permeability (27,28). The electrokinetic properties of such particles have been the subject of recent extensive theoretical developments. In a pioneering work by Ohshima (27,29), the flow permeability within the soft layer was considered by assuming a discontinuous description of the interface, i.e., the density of the polymer chains was found constant in the soft surface layer and dropped sharply to zero at the very interface formed with the electrolyte side. This interfacial description is thus based on a step-function-like or homogeneous profile for the soft material density throughout the permeable part of the particle. Analytical solutions of the governing transport and electrostatic equations were so provided, mainly by Ohshima (27,29), for a variety of soft colloids under the conditions that polarization and relaxation of the electrical double layer are absent. More advanced (numerical) analyses integrate polarization/relaxation of electric double layer under the action of applied field (30–35) and allow for the evaluation of the electrophoretic mobility over a wide range of electrolyte concentrations, coating

Submitted June 21, 2007, and accepted for publication November 8, 2007.

Address reprint requests to Dr. Jérôme F. L. Duval, Tel.: 33-3-8359-6255; E-mail: jerome.duval@ensg.inpl-nancy.fr.

Editor: David P. Millar.

© 2008 by the Biophysical Society  
0006-3495/08/04/3293/20 \$2.00

doi: 10.1529/biophysj.107.115477

thicknesses, and polyelectrolyte charges. Recently, Hill et al. (30,31,34) introduced arbitrary segment and charge density distributions in their electrokinetic model for soft particles. Later, Duval and Ohshima (35) systematically investigated the impact of such a continuous polymer material density profile within the soft layer on the electrophoretic mobility. Based on a diffuse representation of the soft interface, they quantified the important discrepancies between mobilities as evaluated from a discontinuous modeling of the interface and a diffuse, continuous interface where the density of polymer segments gradually decays from bulk values within the heart of the soft layer to zero in the electrolytic solution. Use of this theory is particularly relevant for interpreting electrokinetic data collected for colloidal systems such as microgel particles (36,37), humic acids (24), or polysaccharides (25,26), which undergo deformation via swelling/shrinking processes (36–39) or aggregation under the effect of electrolyte concentration, variations in solvent quality, or temperature.

Despite the advances brought about by this formalism, it applies to particles for which the chemical composition (nature of ionogenic sites) of the soft layer remains constant in space, thus focusing only on the spatial anisotropy in polyelectrolyte chains distribution. Basically, this comes to state that the local charge distribution within the soft layer follows that dictated by the spatial profile for the polyelectrolyte chains density. Successful application of the model (35) is reported in (21) for the examination of the electrokinetic properties of Gram-positive bacteria of the oral type *Streptococcus salivarius* covered by pili of length 60–200 nm. The typical hydrodynamic penetration length (of magnitude  $\sim 1$  nm) within the pili is too small for the electroosmotic flow to probe the different chemical compositions of the outer pili layer and of the inner peptidoglycan layer; therefore, the electrokinetics is determined by the chemical and hydrodynamic permeation properties of the outer pili layer only.

For a number of bioparticles, viruses being the paradigms (10–50 nm in radius), the spatial anisotropy in polymer segment distribution is strongly accompanied by position-dependent chemical heterogeneities (40–42), the length scales of those being of the same order of magnitude than typical flow penetration lengths reported for soft bioparticles. In such cases, the assumption of similar spatial functionalities for the distribution of the volume charge density and polymer segment density within the soft layer is clearly inadequate and needs to be revisited, which is essentially the purpose of this study.

For MS2 bacteriophage (40–42), one may clearly distinguish three concentric soft layers that differ in composition: a bulk RNA region (center part of the virus, radius  $\sim 8$  nm), an RNA protein-bound layer (thickness  $\sim 3$  nm), and a proteic capsid that forms the outer shell of the virus (thickness  $\sim 2$  nm). To our knowledge, the understanding of the electrokinetic properties of such type of permeable particles has received only marginal attention despite the fundamental foundations laid down by the recent theories for the electro-

kinetics of soft particles (27–35). In Schaldach et al. (43), the analysis of the electrokinetic features of various bacteriophages relies on the application of the Helmholtz-Smoluchowski equation and on the notion of zeta potential,  $\zeta$ , which is assimilated to the “average surface potential” (43) of a spherical, hard particle within the Debye-Hückel approximation. That average surface potential is evaluated by summing over the surface the corresponding local surface potentials as obtained from the interaction potentials between the considered surface position and all charges located within the particle. The analysis disregards the flow permeation properties of the bacteriophage, which is a priori inconsistent with the subsurface viral structure that exhibits pores (41,44), the size of which exceeds tens of angstroms. For such soft particles, the very notion of  $\zeta$ -potential has no physical meaning, since the gradual decay of the flow field within the particle makes the location of any slip plane irrelevant (45). Only for particles with moderate hydrodynamic permeability, one may use the  $\zeta$ -potential concept for interpreting electrokinetic data, providing, however, that tangential surface conduction processes are taken into account in the electrokinetic model. This was shown in a recent study by Dukhin et al. (46), who reconciled the soft particle approach first proposed by Ohshima and the surface conduction phenomena that typically take place at the interface between hard particles and aqueous solution. None of those elements are considered in the electrokinetic analysis reported in Schaldach et al. (43).

In view of the preceding elements, the objectives of our work are essentially twofold:

- i. Extend the formalism reported in Duval and Ohshima (35) to the case of particles where spatial structural and chemical anisotropy concomitantly govern their electrokinetic response. For that purpose, we shall reason on the basis of a three concentric layers composition for the particle, taking the example of MS2 bacteriophage as a supporting model. Rigorous numerical solutions of the key electrohydrodynamic equations will be provided for a number of situations that underline the complex interplay among the respective layer thicknesses, the overall flow permeability, the local polymer segment densities within the particle layers, and their chemical properties.
- ii. Analyze specifically the electrokinetic peculiarities of MS2 bacteriophage. To do this, the reported chemical composition (GenBank accession numbers NP 040648 for MS2 coat protein and NC 001417 for MS2 complete genome) of the layers that constitute the virus will be taken into account in the model developed in (i), and so will be the soft material (RNA bulk, RNA protein-bound, and coat protein) density profile from the center of the virus to its outer periphery, as recently measured by cryoelectron microscopy (cryoEM) (41,42) and small-angle x-ray scattering (40). The analysis will allow for the determination of the contribution of the bulk RNA and RNA protein-bound layer to the overall electrophoretic mobility.

The information derived from the study reported here forms the basis for a quantitative description of the electrostatic and hydrodynamic features of isolated MS2 bacteriophage. Knowledge of these interfacial characteristics is of utmost relevance for understanding on a fundamental level the interfacial phenomena of practical importance that MS2 are involved in, such as transport through groundwater (47–52), virus filtration through membranes (53–55), bioadhesion (53,56–62), and virus aggregation (63,64).

## MATERIALS AND METHODS

### Preparation of viruses suspension

MS2 phages (ATCC 15597-B1) were replicated according to standard procedure (ISO 10705-1, 1997) without a  $\text{CHCl}_3$  lysis step and using *Escherichia coli* Hfr K12 (ATCC 23631) as bacterial host. After replication, the viral suspension was centrifuged (Beckman (Fullerton, CA), model J2-22,  $27,000 \times g$ , 60 min,  $4^\circ\text{C}$ ) and the supernatant filtered through a  $0.22 \mu\text{m}$  membrane (Millipore (Billerica, MA), SLGP033RS). All suspensions were dialyzed (100 kDa molecular weight cutoff, Spectrum (Gardena, CA), 131420) against deionized water ( $0.1 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) for 14 h and dialyzed for a second time against  $\text{NaNO}_3$  1 mM, pH 6.7, ( $150 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) for 14 h. Suspensions were then filtered again ( $0.22 \mu\text{m}$ ). The viral suspensions were observed by electron microscopy to make sure that suspensions contained no aggregates. The final viral concentrations were  $10^{11}$  plaque-forming units  $\text{ml}^{-1}$  and were stored as stock suspension at  $4^\circ\text{C}$  before any measurements.

### Light scattering and electrokinetic measurements

Diffusion coefficients and electrophoretic mobilities were measured at  $23 \pm 0.1^\circ\text{C}$  using the Zetasizer Nano ZS instrument (He-Ne red laser (633 nm, Malvern Instruments, Malvern, UK). The apparatus is equipped with an automatic laser attenuator and an avalanche photodiode detector. The position of the latter is located  $173^\circ$  relative to the laser source so that back-scattering detection is ensured. Experiments were driven by the Dispersion Technology Software provided by Malvern Instruments. The distribution of the diffusion coefficient was evaluated by fitting the measured correlation curves according to available fitting algorithms. Electrophoretic mobilities were measured by laser Doppler electrophoresis also known as phase analysis light scattering. The rate of change of the phase shift between the scattered light and a reference beam is correlated to the particle velocity and thus allows for evaluating the particular electrophoretic mobility.

## THEORY

### Modeling the polymer segment density and chemical composition profiles for soft multilayer particles

#### Spatial anisotropy for the density of polymer segments

We consider the geometrical situation of a permeable bio-particle composed of three concentric soft layers as depicted in Fig. 1 A. The spherical coordinates  $(r, \theta, \varphi)$  are adopted with the position  $r = 0$  marking the center of the particle. This soft particle structure is selected in view of the application of the theoretical formalism for interpreting electrokinetic data on MS2 bacteriophage (see below). Without loss

of generality, the theoretical modeling could be developed for an  $n$ -layer particular composition with  $n > 3$ . The thicknesses of the layers numbered 1, 2, and 3 are denoted in the following as  $\delta_1$ ,  $\delta_2$ , and  $\delta_3$ , respectively, where the subscripts 1, 2, and 3 pertain to the inner, intermediate, and outer layer of the particle. The spatial distribution of the polymer segment density within the soft layer  $i$  ( $= 1, 2, 3$ ), denoted as  $n_{s,i}$ , is chosen to be dependent on the radial position  $r$  only, and is written for the sake of generality as

$$n_{s,i}(r)/n_{s,i}^0 = f_i(r), \quad (1)$$

where  $n_{s,i}^0$  is the nominal segment density of the layer  $i$ , that is with homogeneously distributed chains. Within the framework of the Debye-Bueche theory (65), polymer segments constituting layer  $i$  may be assimilated to resistance centers of radius  $a_{s,i}$  that exert frictional forces on the fluid flowing through layer  $i$ . The  $r$ -dependence of the hydrodynamic volume fraction  $\phi_i$  of polymer segments within layer  $i$ , is simply

$$\phi_i(r)/\phi_i^0 = f_i(r) \quad (2)$$

with  $\phi_i^0 = 4n_{s,i}^0\pi a_{s,i}^3/3$ . To obtain the spatial distribution of the friction coefficient  $k_i(r)$  within the layer  $i$ , we reason on the basis of the Brinkman equation (66) that relates  $k_i$  to  $\phi_i$  by considering the flux of fluid across the group of spheres of radius  $a_{s,i}$ . For sufficiently large water content within the various soft layers of interest, one may show that the result simply reads as (35)

$$k_i(r)/k_i^0 = f_i(r) \quad (3)$$

with  $k_i^0 = 9\eta\phi_i^0/2a_{s,i}^2$ ,  $\eta$  denoting the dynamic viscosity of water. Stochastic calculations further demonstrate that Eq. 3 is valid for  $\phi_i^0 < 0.3$  (67). To go further, explicit expressions are required for the functions  $f_{i=1,2,3}(r)$  that characterize the spatial profiles of polymer segments densities within the layer of thickness  $\delta_i$ . These expressions may be empirical, may derive from computational thermodynamics or be inferred from spectroscopic, imaging, or electronic measurements (35). Following the route detailed in Duval and Ohshima (35), we shall adopt here the spatial functionalities as expressed by

$$f_i(r) = \frac{1}{2} \left\{ 1 - \tanh \left[ \left( r - \sum_{j=1}^3 \delta_j \right) / \alpha_i \right] \right\}, \quad (4)$$

where the  $\alpha_i$  denote the typical length over which the polymer segment density distribution within the layer  $i$  deviates from the step function-like profile. The local hydrodynamic volume fraction of polymer segments within the soft particle, denoted as  $\phi(r)$ , may be written in the form

$$\phi(r)/\phi_3^0 = F(r), \quad (5)$$

where we have arbitrarily chosen to normalize  $\phi(r)$  with respect to  $\phi_3^0$ . One may easily show that  $F(r)$  is given by

$$F(r) = \chi \{ (\omega_{13} - \omega_{23}) f_1(r) + (\omega_{23} - 1) f_2(r) + \omega_{33} f_3(r) \}, \quad (6)$$

where the  $\omega_{i3}$  are defined by  $\omega_{i3} = \phi_1^0/\phi_3^0$  and the scalar  $\chi$  ensures the constancy of the total number of polymer segments within the particle upon variation of the heterogeneity of the various layers, that is when varying the ratios  $\alpha_i/\delta_i$ . As such,  $\chi$  satisfies the relationship

$$\chi = \sum_{j=1}^3 \omega_{j3} \left\{ \left( \sum_{i=1}^j \delta_i \right)^3 - \left( \sum_{i=1}^{j-1} \delta_i \right)^3 \right\} / \int_0^\infty r^2 F(r) dr. \quad (7)$$

Function  $F$  essentially refers to the radial polymer segment density distribution throughout the soft particle. In Fig. 1, B and C, we show the dependence of function  $F$  (Eqs. 6 and 7) on the radial position  $r$  for homogeneous distribution of polymer segments ( $\alpha_i/\delta_i \rightarrow 0$ , panel B) and diffuse segment density distribution ( $\alpha_i/\delta_i \neq 0$ , panel C) in the inner, intermediate, and outer soft layers of the particle. Fig. 1 C corresponds to the spatial profile of the polymer segment density measured by cryoEM (41,42) for the bacteriophage MS2 (see discussion below).

Based on the same arguments that allowed the derivation of Eq. 3 from Eq. 2, the local friction coefficient  $k(r)$  within the particle is written

$$k(r)/k_3^0 = F(r). \quad (8)$$

In the following, we shall introduce the local softness parameter of the particle, the spatial distribution of which is given by

$$\lambda(r) = (k(r)/\eta)^{1/2}. \quad (9)$$

The quantity  $1/\lambda(r)$  has the dimension of a length and denotes the local flow penetration degree within the particle. Combining Eqs. 8 and 9, we have

$$\frac{\lambda(r)}{\lambda^0} = \{F(r)\}^{1/2}, \quad (10)$$

where  $1/\lambda^0$  represents the nominal hydrodynamic penetration length within the particle for homogeneous polymer chains distribution, that is  $\alpha_{i=1,2,3} \rightarrow 0$ .

*Spatial anisotropy for the volume charge density within the soft particle*

Under the assumption that the density of ionogenic sites within the particle is directly proportional to the polymer segment density  $n_{s,i}$ , the spatial distribution of the volume density of fixed charges, denoted as  $\rho_{\text{fix}}$ , is simply given by

$$\rho_{\text{fix}}(r)/\rho_3^0 = F(r), \quad (11)$$

where  $\rho_3^0$  is the nominal charge density within the polymeric layer 3 and the function  $F$  is given by Eq. 6. Relaxing this assumption is required for analyzing the electrohydrodynamic properties of the particles of interest here where chemical heterogeneity compounds the structural anisotropy evoked in the preceding section. For those cases that come closer to practical situations, adopting the scheme of the previous section, the local volume charge density may be written

$$\rho_{\text{fix}}(r)/\rho_3^0 = G(r) \quad (12)$$

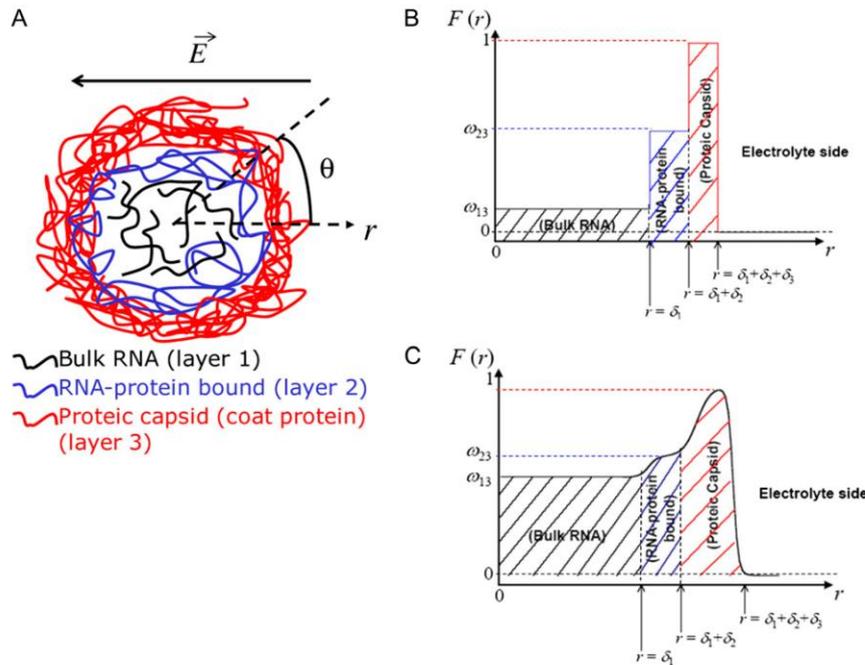


FIGURE 1 (A) Simplified representation of a MS2 viral particle placed in an external electric field  $\vec{E}$ . For the sake of readability, the charges that stem from the ionogenic sites distributed throughout the virus are not indicated, nor are the ions located within and around the particle. Based on the work reported in (40–42),  $\delta_1 = 8.5$  nm,  $\delta_2 = 2.8$  nm, and  $\delta_3 = 2.1$  nm. The scheme is not to scale. (B) Radial profile  $F(r)$  (Eq. 6) for the volume density of polymer segments with  $\alpha_{i=1,2,3} = 0$  (see Eqs. 4–6). The interfaces between layer  $i$  and  $i + 1$  ( $i = 1, 2$ ) and that between layer 3 and the electrolytic solution are step-function like. (C) Typical example of polymer segments density distribution with  $\alpha_{i=1,2,3} \neq 0$  ( $\alpha_1 = 0.5$  nm,  $\alpha_2 = 0.8$  nm,  $\alpha_3 = 0.3$  nm). The interfaces between layer  $i$  and  $i + 1$  ( $i = 1, 2$ ) and that between layer 3 and the electrolytic solution are diffuse (35).

$$\text{with } G(r) = \chi\{(c_{13} - c_{23})f_1(r) + (c_{23} - 1)f_2(r) + c_{33}f_3(r)\}, \quad (13)$$

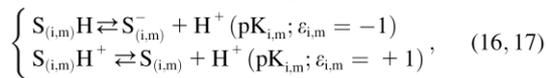
where the scalars  $c_{i3}$  are defined by the relationships  $c_{i3} = \rho_i^o/\rho_3^o$ . Function  $G$  denotes the chemical composition profile throughout the soft particle. Equation 11 is recovered from Eq. 13 under the condition  $c_{i3} = \omega_{i3}$ . Equations 12 and 13 are strictly valid within the condition of complete dissociation of the ionogenic groups located at position  $r$ . As such, the quantity  $\rho_i^o$  can be viewed as the overall net charge that arises from the complete dissociation of  $M_i$  types of ionizable sites within the soft polymeric layer  $i$ . In the more general case, the degree of dissociation of these groups depends on the nature of the site considered and varies with the solution pH and the local equilibrium potential, denoted as  $\psi^{(0)}(r)$  (35). Recognizing for the necessity of introducing these elements, the coefficients  $c_{i3}$  become pH and position dependent according to

$$c_{i3}(\text{pH}, r) = \sum_{m=1}^{M_i} \rho_{i,m}^o g_{i,m}(\text{pH}, \psi^{(0)}(r)) / \rho_3^o, \quad (14)$$

where the function  $g_{i,m}$  is the isotherm describing the protolytic properties of the site of type  $m$  within the polyelectrolyte layer  $i$  and the quantity  $\rho_{i,m}^o$  represents the maximal charge density as reached upon complete dissociation of the sites of type  $m$  present in layer  $i$ . For the case of MS2 bacteriophage (see below), the function  $g_{i,m}$  takes the form

$$g_{i,m}(\text{pH}, \psi^{(0)}(r)) = \frac{1}{1 + 10^{\varepsilon_{i,m}(\text{pK}_{i,m} - \text{pH})} \exp[-\varepsilon_{i,m}y(r)]}, \quad (15)$$

where  $y(r)$  is the dimensionless electrostatic potential  $y(r) = F\psi^{(0)}(r)/RT$ , with  $F$  the Faraday number,  $R$  the gas constant, and  $T$  the absolute temperature, and  $\varepsilon_{i,m}$  takes the values  $+1$  or  $-1$  depending on the sign of the charge carried by the site considered. Equation 15 stands for the Langmuir isotherm derived for the following equilibria:



where the subscript  $(i, m)$  denotes the layer and type of site  $S$  considered. It is stressed here that the developments above neglect the local positioning of the  $M_i$  charged sites within a given layer  $i$ . The formalism adopted here is thus ‘‘smeared-out’’ in the sense that it regards the very distribution of all ionizable sites within the layer  $i$  as homogeneous for a given  $r$ -position. Such approximation is legitimate for typical separation distances between adjacent charges that do not exceed the characteristic spatial extension of the electrical double layer, which will be basically the case for the bacteriophage MS2 analyzed in this study. Abandoning this approximation requires the use of ab initio formalisms where interaction potential between neighboring sites are accounted for. Retaining such a detailed picture of the electrostatics imposes tackling the flow permeation properties of the particle at a detailed molecular scale.

### Segment density and chemical composition profiles for bacteriophage MS2

MS2 bacteriophage is an RNA virus with an icosahedral capsid measuring 22–29 nm in diameter (68–70). The genome encodes four proteins: a major coat protein, which builds up the capsid of the virus; a maturation protein (or A-protein), which is a minor constituent of the virion involved in pilus recognition; a replicase (a RNA polymerase necessary for genome multiplication); and a lysis protein. Recent detailed small-angle x-ray scattering and cryoEM analyses (40–42) revealed two spheres of RNA density below the shell of capsid density, as schematically depicted in Fig. 1 A. From (40,70,71), the bulk RNA virion is  $\sim 8.5$  nm in radius, and the RNA protein-bound layer and the proteic capsid 2.8 nm and 2.1 nm thick, respectively. The radial distribution of the virus, obtained from the cryoEM analysis reported in van den Worm et al. (42), is represented in Fig. 2 A. It could be satisfactorily

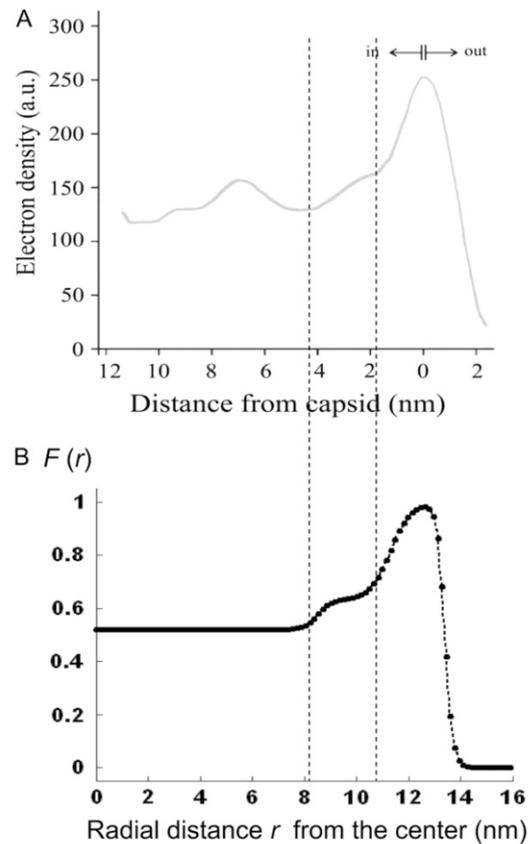


FIGURE 2 Reconstruction (panel B) of the radial density distribution as derived from cryoEM data (panel A, adapted from Fig. 3 in van den Worm (42)) on the basis of Eqs. 4, 6, and 7. The data are normalized with respect to the largest proteic capsid density (outer shell of the virus). See text for further detail. The dashed lines mark the spatial transitions among the inner RNA, RNA protein-bound layer, and proteic capsid.

reconstructed using Eqs. 4, 6, and 7 with  $\alpha_1 = 0.5$  nm,  $\alpha_2 \approx 0.8$  nm,  $\alpha_3 = 0.3$  nm,  $\omega_{13} = 0.52$ , and  $\omega_{23} = 0.63$  ( $\chi \approx 1$ ), as shown in Fig. 2B. We stress that the uniqueness of this set of parameters in reconstructing the cryoEM data in van den Worm et al. (42) from Eqs. 4, 6, and 7 is ensured by the fact that i),  $\omega_{13}$  and  $\omega_{23}$  pertain to the bulk values of the normalized density distributions within layer 1 (bulk RNA) and layer 2 (RNA protein-bound layer), respectively, and ii), the variables  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ , and  $\alpha_3$  allow a refined description of the segment density distributions at the interfaces layer 1/layer 2, layer 2/layer 3, and layer 3/electrolyte solution, respectively. As such, the determination of each of the parameters involved in the expression for the segment density distribution (Eqs. 4–6) may be done independently. Also, the local details (oscillations) of the density distribution within the heart of the virus ( $0 < r < 6$  with  $r$  in nm, see Fig. 2B) have been omitted because they refer to the spatial region where the electroosmotic flow within the virus is the most attenuated (as verified from the calculated flow profiles, not shown). As such, this part of the viral particle is the least determinant in governing the electrophoretic mobility of the virus, and an account of small local details therein does not affect our results. The percentage of solvent in the RNA inner region and in the proteic capsid are  $\sim 75\%$  and  $98\%$ , respectively (40,71), which justifies the use of Eq. 3 that identifies the soft material density distribution (Fig. 2) to that for the friction coefficient  $k$  (Eqs. 5 and 8).

To picture the chemical composition of the virus, we started from the three dimensional viral representation as given in ((69,70,72); Protein Data Bank entry 2MS2). We then inventory the various types of amino-acids in the free-RNA proteic capsid (layer 3) (protein ID in GenBank: NP\_040648) with lateral ionizable chains and their apparition frequency, and subsequently assign to each indexed site a pK value as provided by the computer simulation program PROPKA (73). The latter evaluates the dissociation constants of a given site taking into account its chemical environment. The reader is referred to Li et al. (73) for further details. Comparison with tabulated pK data (74) that ignore the dependence of the dissociation constants on the detailed molecular environment reveals small to significant (1 pH unit) variations, depending on the type of site considered. Regarding the RNA part of the virus (layers 1 and 2), we considered the integrality of the MS2 genomic sequence and listed all ionogenic sites of which the dissociation generates a charge, and we associated a pK value for the corresponding acido-basic equilibria (75). Contrary to the proteic capsid, the tabulated pK values for the nucleobases do not take into account their specific environment within the virus. To our knowledge, no computation program is available for that purpose. As done in Schaldach et al. (43), we modeled the virus as a spherical particle. From the geometrical details of the virus illustrated in Fig. 1 and from the apparition frequencies of the sites, the nominal charge densities  $\rho_{i=1,2,3}^0$  could be easily evaluated. We specify here that the count of the RNA ionizable sites could not be performed by discriminating the bulk RNA from the RNA

protein-bound layer, which comes to set  $\rho_1^0 \approx \rho_2^0$ . The underlying approximation is, however, acceptable in view of  $\omega_{13} \approx \omega_{23}$ . All results pertaining to  $\rho_{i=1,2,3}^0$ ,  $\text{pK}_{i,m}$  and  $\epsilon_{i,m}$  (see Eqs. 14–17) are collected in Tables 1 and 2. The remaining parameter required for the theoretical analysis of the electrokinetic data (numerical theory, Eqs. 1–10 and Eqs. 12–34 given below) is the nominal hydrodynamic permeability  $1/\lambda^0$  of the virus, which serves as an adjustable parameter.

### Governing electrohydrodynamic equations of soft multilayer particles

The particle described above is placed in a uniform direct current electric field  $\vec{E}$  and thereby moves with a velocity  $\vec{U}$  in an electrolyte of dielectric permittivity  $\epsilon_0 \epsilon_r$ , composed of  $N$  types of ionic, mobile species with valences  $z_j$ , bulk concentrations  $c_j^\infty$ , and limiting ionic conductivities  $S_j^0$  ( $j = 1, \dots, N$ ). The origin of the spherical coordinate system  $(r, \theta, \varphi)$  is placed at the center of the particle and the polar axis ( $\theta = 0$ ) is set parallel to  $\vec{E}$ . The set of governing electrokinetic equations for a core-diffuse (mono)shell particle (i.e., for  $i = 1$ ) has been extensively discussed in recent studies (35). We present here the basic steps in the derivation of the fundamental equations for a diffuse soft particle composed of three concentric soft layers.

The Navier-Stokes equation that determines the flow velocity,  $\vec{u}(\vec{r})$ , at the position  $\vec{r}$  relative to the particle, is written in its general form (27)

$$\eta \nabla \times \nabla \times \vec{u}(\vec{r}) + \nabla p(\vec{r}) + \rho_{el}(\vec{r}) \nabla \psi(\vec{r}) + k(r) \vec{u}(\vec{r}) = \vec{0}, \quad (18)$$

where  $p(\vec{r})$  is the pressure,  $\rho_{el}(\vec{r})$  and  $\psi(\vec{r})$  are the space charge density (resulting from the mobile ionic species) and the electrostatic potential in the presence of the applied electric field, respectively.  $k(r)$  is the position-dependent friction coefficient as given by Eq. 8. The quantity  $\rho_{el}(\vec{r})$  is related to the local ionic concentrations, denoted as  $c_j(\vec{r})$ , by

$$\rho_{el}(\vec{r}) = F \sum_{j=1}^N z_j c_j(\vec{r}). \quad (19)$$

**TABLE 1** Chemical composition of the outer proteic capsid of MS2 bacteriophage and corresponding parameters  $\rho_{i=3,m}^0$ ,  $\text{pK}_{i=3,m}$ , and  $\epsilon_{i=3,m}$  as involved in Eqs. 15–17; see text for further detail

Amino acids	$\text{pK}_{3,m}$	$\epsilon_{3,m}$	$\rho_{3,m}^0 F_{3,m}/\text{mM}$
Glutamic acid (–COOH)	2.79	–1	–370
Tyrosine (–COOH)	2.95	–1	–74
Aspartic acid (–COOH)	3.30	–1	–296
Alanine (–NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> )	7.93	+1	+74
Cysteine (–SH)	9.35	–1	–148
Tyrosine (–OH)	10.00	–1	–296
Lysine (–NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> )	10.89	+1	+444
Arginine (–NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> )	12.22	+1	+296

**TABLE 2** Chemical composition of the inner RNA part of MS2 bacteriophage and corresponding parameters  $\rho_{i,m}^0$ ,  $pK_{i,m}$ , and  $\varepsilon_{i,m}$  as involved in Eqs. 15–17; see text for further detail

Nucleobases	$pK_{i,m}$	$\varepsilon_{i,m}$	$\rho_i^0 F_{i,m}/mM$
Phosphodiester	1.5	-1	-976
Adenine ( $-\text{NH}_3^+$ )	3.725	+1	+225
Cytosine ( $-\text{NH}_3^+$ )	4.24 5	+1	+255
Uracile ( $-\text{NH}_2^+$ )	9.26	+1	+240
Guanine ( $-\text{NH}_3^+$ )	9.29	+1	+255

( $i=1,2$ )

The continuity equation for a steady incompressible flow further imposes that

$$\nabla \cdot \vec{u}(\vec{r}) = 0. \quad (20)$$

The local velocity,  $\vec{v}_j(\vec{r})$ , of an ion  $j$  is determined by that of the liquid flow,  $\vec{u}(\vec{r})$  (convection), and by the gradient in electrochemical potential, denoted as  $\mu_j(\vec{r})$  (diffusion), so that

$$j = 1, \dots, N : \vec{v}_j(\vec{r}) = \vec{u}(\vec{r}) - \frac{1}{\bar{\lambda}_j} \nabla \mu_j(\vec{r}) \quad (21)$$

with  $\bar{\lambda}_j$  the drag coefficient of ion  $j$ .  $\bar{\lambda}_j$  is related to the limiting conductivity  $s_j^0$  by the simple expression  $\bar{\lambda}_j = |z_j| e F / s_j^0$ . The continuity equation written for an ion  $j$  leads to

$$j = 1, \dots, N : \nabla \cdot (c_j(\vec{r}) \vec{v}_j(\vec{r})) = 0. \quad (22)$$

For sufficiently weak electric fields  $E$ , as commonly considered within the framework of electrokinetic phenomena of the first kind, we may expand  $\rho_{el}(\vec{r})$ ,  $\psi(\vec{r})$ ,  $c_j(\vec{r})$  and  $\mu_j(\vec{r})$  as follows:

$$\rho_{el}(\vec{r}) = \rho_{el}^{(0)}(r) + \delta \rho_{el}(\vec{r}) \quad (23)$$

$$\psi(\vec{r}) = \psi^{(0)}(r) + \delta \psi(\vec{r}) \quad (24)$$

$$j = 1, \dots, N : c_j(\vec{r}) = c_j^{(0)}(r) + \delta c_j(\vec{r}) \quad (25)$$

$$j = 1, \dots, N : \mu_j(\vec{r}) = \mu_j^{(0)}(r) + \delta \mu_j(\vec{r}). \quad (26)$$

In Eqs. 23–26, the quantities indicated by the superscript (0) refer to those at equilibrium (i.e., in the absence of the applied electric field) and the variables  $\delta \rho_{el}(\vec{r})$ ,  $\delta \psi(\vec{r})$ ,  $\delta c_j(\vec{r})$ , and  $\delta \mu_j(\vec{r})$  indicate small perturbations of the corresponding equilibrium values due to the presence of the applied field  $E$ .  $\rho_{el}^{(0)}(r)$  and  $\psi^{(0)}(r)$  are given by the Poisson-Boltzmann equations

$$\nabla^2 \psi^{(0)}(r) = -\frac{1}{\varepsilon_0 \varepsilon_r} \left\{ \rho_{el}^{(0)}(r) + \rho_3^0 G(r, \psi^{(0)}(r)) \right\}, \quad (27)$$

where the function  $G$ , which depends on  $\psi^{(0)}(r)$ , is defined by Eqs. 13–14, and

$$\rho_{el}^{(0)}(r) = F \sum_{j=1}^N z_j c_j^\infty \exp\left\{ -z_j e \psi^{(0)}(r) / k_B T \right\}, \quad (28)$$

where  $k_B$  is the Boltzmann constant. The electrochemical potential of ion  $j$ ,  $\mu_j^{(0)}(r)$ , is related to  $c_j^{(0)}(r)$  via the relationship

$$j = 1, \dots, N : \mu_j^{(0)}(r) = \mu_j^\infty + z_j e \psi^{(0)}(r) + k_B T \ln\left\{ c_j^{(0)}(r) \right\}, \quad (29)$$

where  $\mu_j^\infty$  is the electrochemical potential of ion  $j$  at some reference state. Using Eqs. 23–26, one may linearize the governing electrokinetic Eqs. 18–22 with respect to the electric field  $E$ . The method is essentially the same as that adopted in (27,34,35). The results read as

$$L_r L_r h(r) - (\lambda^0)^2 \left\{ F(r) L_r h(r) + \frac{dF(r)}{dr} \left( \frac{h(r)}{r} + \frac{dh(r)}{dr} \right) \right\} = -\frac{F}{\eta r} \frac{dy(r)}{dr} \sum_{j=1}^N z_j^2 c_j^\infty \varphi_j(r) \exp(-z_j y(r)) \quad (30)$$

$$j = 1, \dots, N : L_r \varphi_j(r) = \frac{dy}{dr} \left\{ z_j \frac{d\varphi_j(r)}{dr} - 2 \frac{\bar{\lambda}_j}{e} \frac{h(r)}{r} \right\} \quad (31)$$

with  $L_r$  the differential operator defined by  $L_r \equiv (d^2/dr^2) + (2/r)(d/dr) - (2/r^2)$ . The radial functions  $h$  and  $\varphi_j$  depend on  $\vec{u}(\vec{r})$  and  $\delta \mu_j(\vec{r})$  according to (27,35):

$$\vec{u}(\vec{r}) = \left( -\frac{2}{r} h(r) E \cos \theta, \frac{1}{r} \frac{d\{rh(r)\}}{dr} E \sin \theta, 0 \right) \quad (32)$$

and

$$\varphi_j(r) = -\delta \mu_j(r) / z_j e E \cos \theta. \quad (33)$$

Boundaries pertaining to the functions  $h$ ,  $\varphi_j$ , and  $\psi^{(0)}(r)$  are derived and extensively discussed in Duval and Ohshima (35). In particular we have

$$h(r \rightarrow \infty) \rightarrow \frac{\mu}{2} + O\left(\frac{1}{r}\right), \quad (34)$$

where  $\mu$  is the searched electrophoretic mobility.

The complexity of the problem requires a numerical solution for the computation of functions  $h$ ,  $\varphi_j$ , and  $\psi^{(0)}(r)$  and the evaluation of  $\mu$ . The reader is referred to Duval and Ohshima (35) for the details of the numerical scheme.

### Isoelectric point of multilayer soft particles: an analytical development

The developments detailed above allow for the estimation of  $\mu$  for any values of the electrolyte concentration, pH solution, and physicochemical (protolytic, electrostatic, and hydrodynamic) determinants of the particle investigated which consists of three concentric soft layers. A parameter of special interest—particularly for the virologists community—(76,77) is the so-called isoelectric point (iep) defined by the pH value where  $\mu = 0$ . Experimental determination of the iep is rather easy and provides a rough prediction of the pH range where, e.g., i), a given bacteriophage will be active in

infecting a target bacterium of known charge (in sign and magnitude), ii), virus trapping by a charged membrane will be effective (78–90), iii), viral surface colonization will take place, or iv), virus aggregation will interfere with biological activity measurements (91). Unfortunately, there are no available analytical or semianalytical expressions for the electrophoretic mobility and isoelectric point of complex three-layer soft polyelectrolytic type of particles such as MS2.

Instead, the only integral equation for the electrophoretic mobility where chemical composition and segment density profiles may be included is that given by Ohshima (27) for a soft particle with a hard core, under the assumption that the radius of that rigid component of the particle well exceeds the Debye layer thickness. For the sake of simplicity, we choose to include in the integral equation by Ohshima (see Eq. 45) a two-layer structure for the soft component of this core-shell particle and subsequently derive analytically the expression of the isoelectric point as a function of the relevant electrohydrodynamic parameters of the particle. Within this section, we thus tackle the case of a core-shell particle of core radius  $a$  where the soft component is composed of two concentric layers (thickness  $\delta_1$ ,  $\delta_2$ ) with step functions  $f_{1,2}(r)$  (homogeneous distribution of polymer segments density). The particle is further characterized here by a hydrodynamic penetration length distribution that satisfies  $1/\lambda(r) = 1/\lambda^\circ$ . We shall see that the simple analytical model developed below for the isoelectric point of such a particle illustrates the complex ionic strength and flow permeation dependences of the iep value for the soft particle as a whole, dependences that have been largely overlooked in the literature so far. For the sake of simplicity, the

$$g_i(\text{pH}, y(r)) = \frac{10^{\text{pK}_i^a - \text{pH}} \exp[-y(r)] - 10^{-\text{pK}_i^b + \text{pH}} \exp[y(r)]}{1 + 10^{\text{pK}_i^a - \text{pH}} \exp[-y(r)] + 10^{-\text{pK}_i^b + \text{pH}} \exp[y(r)]} \quad (37)$$

After straightforward arrangements (92), Eq. 37 may be rewritten in the form

$$g_i(\text{pH}, y(r)) = \frac{2\gamma_i \sinh[y_i^N - y(r)]}{1 + 2\gamma_i \cosh[y_i^N - y(r)]} \quad (38)$$

$$\text{with } \gamma_i = 10^{\frac{1}{2}(\text{pK}_i^a - \text{pK}_i^b)}, \quad (39)$$

$$y_i^N = -2.303(\text{pH} - \text{pH}_i^*), \quad (40)$$

$$\text{and } \text{pH}_i^* = \frac{1}{2}(\text{pK}_i^a + \text{pK}_i^b). \quad (41)$$

In the limit of low potentials  $y(r)$  (Debye-Hückel approximation), a first-order Taylor expansion of Eq. 38 provides

$$g_i(\text{pH}, y(r)) \approx \sigma_i - v_i y(r) \quad (42)$$

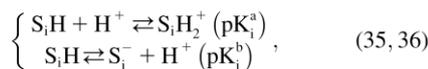
$$\text{with } \sigma_i = \frac{2\gamma_i \sinh y_i^N}{1 + 2\gamma_i \cosh y_i^N} \quad (43)$$

$$\text{and } v_i = \frac{2\gamma_i (\cosh y_i^N + 2\gamma_i)}{(1 + 2\gamma_i \cosh y_i^N)^2}. \quad (44)$$

For a core-shell particle with  $\kappa a \gg 1$  (where  $\kappa$  is the classical reciprocal screening Debye length) and a flow permeation degree  $1/\lambda^\circ$  that fulfills the condition  $\lambda^\circ(\delta_1 + \delta_2) \gg 1$ , the mobility expression by Ohshima (27) is rewritten for the particle of interest here

$$\mu = \frac{RT\varepsilon_0\varepsilon_r}{\eta F} \int_0^{\tilde{\delta}_1 + \tilde{\delta}_2} \exp[\tilde{\lambda}^\circ(x - \tilde{\delta}_1 - \tilde{\delta}_2)] \left\{ \tilde{\lambda}^\circ y(x) + \frac{\beta}{\tilde{\lambda}^\circ} \{ [c_{12}g_1(\text{pH}, y(x)) - g_2(\text{pH}, y(x))] f_1(x) + g_2(\text{pH}, y(x)) f_2(x) \} \right\} dx \quad (45)$$

derivations are done in the case where the layers  $i = 1$  and  $i = 2$  contain amphoteric sites  $\text{S}_i\text{H}$  that may accept or give protons according to the following equilibria:



where  $\text{K}_i^a$  and  $\text{K}_i^b$  are the thermodynamic equilibrium constants associated with Eqs. 35 and 36, respectively. The corresponding Langmuir isotherms are expressed as

with the dimensionless variables  $x = \kappa(r - a)$ ,  $\tilde{\delta}_i = \kappa\delta_i$ ,  $\tilde{\lambda}^\circ = \kappa^{-1}\lambda^\circ$ ,  $\beta = \rho_2^\circ/Fc^\infty$ ,  $c_{12} = \rho_1^\circ/\rho_2^\circ$ , and  $c^\infty$  pertaining to the 1:1 bulk electrolyte concentration. Solving for the Poisson-Boltzmann equation (Eqs. 27 and 28) with appropriate boundaries (see the Appendix for details), we show that the pH value satisfying the condition  $\mu = 0$  is the solution of the transcendental equation

where the quantities  $\xi_i$ ,  $Y_i$ ,  $\sigma_i$ ,  $A$ ,  $B$ ,  $C$ , and  $D$  are pH-dependent variables defined by Eqs. A7–A19 in the Appendix.

$$\begin{aligned} & \frac{\beta}{(\tilde{\lambda}^\circ)^2} \{ c_{12}\sigma_1 \exp(-\tilde{\lambda}^\circ\tilde{\delta}_2) + \sigma_2 [1 - \exp(-\tilde{\lambda}^\circ\tilde{\delta}_2)] \} + \left( \tilde{\lambda}^\circ - \frac{\beta}{\tilde{\lambda}^\circ} c_{12}\nu_1 \right) \exp(-\tilde{\lambda}^\circ\tilde{\delta}_2) \times \left\{ \frac{Y_1}{\tilde{\lambda}^\circ} + \frac{A}{\tilde{\lambda}^\circ - \xi_1} \exp(-\xi_1\tilde{\delta}_1) \right. \\ & + \frac{B}{\tilde{\lambda}^\circ + \xi_1} \exp(\xi_1\tilde{\delta}_1) \left. \right\} + \left( \tilde{\lambda}^\circ - \frac{\beta}{\tilde{\lambda}^\circ} \nu_2 \right) \times \left\{ \frac{Y_2}{\tilde{\lambda}^\circ} [1 - \exp(-\tilde{\lambda}^\circ\tilde{\delta}_2)] + \frac{C}{\tilde{\lambda}^\circ - \xi_2} \exp(-\xi_2\tilde{\delta}_1) [\exp(-\xi_2\tilde{\delta}_2) - \exp(-\tilde{\lambda}^\circ\tilde{\delta}_2)] \right. \\ & \left. + \frac{D}{\tilde{\lambda}^\circ + \xi_2} \exp(\xi_2\tilde{\delta}_1) [\exp(\xi_2\tilde{\delta}_2) - \exp(-\tilde{\lambda}^\circ\tilde{\delta}_2)] \right\} = 0, \end{aligned} \quad (46)$$

**ELECTROKINETICS OF MULTILAYER SOFT PARTICLES: THEORETICAL ILLUSTRATIONS**

**Impact of the polymer segment density and chemical composition profiles on the electrophoretic mobility  $\mu$  (numerical theory, three-layer particle structure)**

To unravel the necessarily coupled dependences of the electrophoretic mobility  $\mu$  of the soft particle depicted in Fig. 1, on the polymer segment density distribution  $F(r)$ , and the chemical composition profile  $G(r)$ , we first report results obtained for completely dissociated ionogenic sites (the coefficients  $c_{13}$  and Eq. 14 are thus pH and position independent) under the condition that  $c_{13} = \omega_{13}$  so that  $F(r) \equiv G(r)$ .

In Fig. 3, the dimensionless mobility  $\bar{\mu} = \mu e \eta / \epsilon_0 \epsilon_r k_B T$  is examined as a function of NaNO<sub>3</sub> electrolyte concentration (denoted as  $c^\infty$ ) for various values of the ratio  $\omega_{23}$  and thickness  $\delta_3$  of the outer shell layer of the particle, the other parameters kept constant. In all cases analyzed, the decrease (in magnitude) of  $\bar{\mu}$  upon increasing  $c^\infty$  is according to expectation and has been discussed in previous communications (35). It is related to the screening of the fixed charges within the soft particle by the mobile ions. The mobility asymptotically tends for  $c^\infty \rightarrow \infty$  to a nonzero constant value, which is characteristic of the presence of permeable soft layer that carries a given volume charge density (27). For  $\lambda^0 \delta_3 \gg 1$  (Fig. 3 A), the flow penetration within the particle is too small for  $\bar{\mu}$  to depend on the details of the polymer segment density distribution within the inner layers 1 and 2.

As a result,  $\bar{\mu}$  remains independent of  $\omega_{23}$  over the entire range of electrolyte concentrations considered. This limiting situation is actually that explicitly examined in Duval and Ohshima (35), the electrokinetic features of the particle as a whole being determined by the electrohydrodynamic properties of the outer layer only (classical core/shell particle). The situation changes drastically upon decrease of  $\lambda^0 \delta_3$  (panels B and C), i.e., when the Darcy number that pertains to layer 3,  $Da = (\lambda^0 \delta_3)^{-2}$ , becomes of order 1. In those cases,  $\bar{\mu}$  increases (in magnitude) with  $\omega_{23}$  at fixed  $c^\infty$  and this dependence of  $\bar{\mu}$  on  $\omega_{23}$  gradually vanishes when increasing  $c^\infty$ . Let us comment on this. In the low electrolyte concentration regime where  $\bar{\mu}$  is significantly influenced by the presence of the inner layer 2, the double layer encompasses the whole particle and develops within the particle well beyond layer 3 ( $\kappa(\delta_2 + \delta_3) \sim 1$ ). As a result, the electroosmotic flow i), probes the local potential distribution within layer 2, and ii), experiences the local friction forces exerted by the polymer segments distributed according to the profile  $f_2(r)$ . Features (i) and (ii) are both  $\omega_{23}$ -dependent (see Eqs. 3, 8, and 11). Increasing  $\omega_{23}$  is expected to increase (in magnitude) the local potential within layer 2 and thereby increase  $\bar{\mu}$ , which is indeed observed (increase of the driving electrostatic force). On the other hand, increasing  $\omega_{23}$  should lead to an increase of the drag force and thus a slowing down of the particle (decreasing  $\bar{\mu}$ ). In Fig. 3, B and C, the electrostatic effect aforementioned overwhelms the hydrodynamic effect essentially because the flow field has significantly decreased in magnitude when passing from layer 3 to layer 2, whereas the

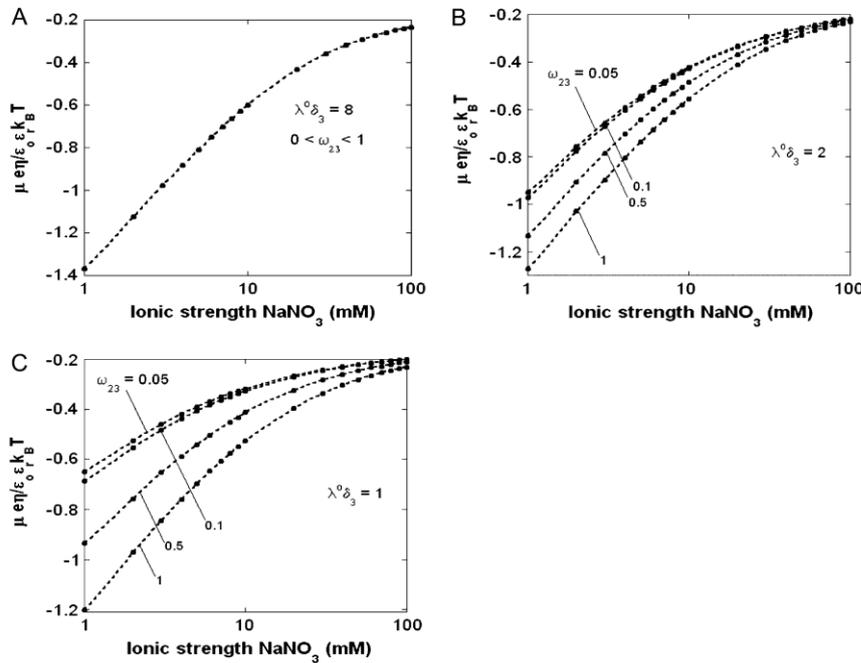


FIGURE 3 Dimensionless electrophoretic mobility  $\mu e \eta / \epsilon_0 \epsilon_r k_B T$  as a function of NaNO<sub>3</sub> electrolyte concentration, ratio  $\omega_{23}$ , and dimensionless number  $\lambda^0 \delta_3$ . Equations 1–10, 12, 13, and 18–34 are used with  $\rho_3^0 / F = -30$  mM,  $\delta_1 = 8.5$  nm,  $\delta_2 = 2.8$  nm,  $1 / \lambda^0 = 1$  nm,  $c_{13} = \omega_{13}$ ,  $\omega_{13} = 0.05$ , and  $\alpha_{13} \rightarrow 0$ .

potential distribution, on the contrary, increases (in magnitude) drastically in layer 2, especially at low ionic strengths. Those elements are illustrated in Fig. 4, where the potential distributions are reported under the conditions of Fig. 3. Also, in Fig. 5, *A–D*, we give the typical flow streamlines within and around the soft particle for  $\lambda^0\delta_3 = 1$ ,  $\omega_{23} = 0.05$ , and  $\omega_{23} = 1$  at two electrolyte concentrations  $c^\infty = 1$  mM (panels *A* and *B*) and  $c^\infty = 50$  mM (panels *C* and *D*). From Fig. 5, *A* and *B*, it is clear that the deflection of the streamlines in the inner region of the particle becomes more important upon increase of the friction exerted by layer 2 on the flow, i.e., when increasing  $\omega_{23}$ . When increasing  $c^\infty$  (Fig. 5, *C* and *D*), the parameter  $\kappa(\delta_2 + \delta_3)$  increases, the fixed charges within the particle are screened, the potential distribution therein decreases in magnitude, and the electroosmotic flow hardly depends on  $\omega_{23}$ . As a result, the electrophoretic mobility becomes determined to a lesser extent by the details of the polymer segment density profile within the inner layers of the soft particle. For sufficiently large  $c^\infty$ ,  $\bar{\mu}$  thus becomes independent on  $\omega_{23}$  and reaches the plateau value given by reference (27),

$$\bar{\mu} \rightarrow \rho_3^0(1 - \operatorname{sech}[\lambda^0\delta]) / [2F\bar{c}(\kappa^{-1}\lambda^0)^2], \quad (47)$$

( $\approx -0.17$  in the conditions of Fig. 3), with  $\delta = \sum_i \delta_i$ . Equation 47 is in line with the prediction made in Duval and Ohshima (35) on the mobility plateau value reached at high ionic strengths for a diffuse interface between a core/(mono)shell particle and an electrolyte solution under the assumption that the charge density distribution matches that of the polymer segment density distribution.

Fig. 6 illustrates the dependence of  $\bar{\mu}$  on  $c^\infty$  for various values of  $\omega_{13}$  and  $1/\lambda^0$  at fixed  $\delta_i$ . Consistent with the results shown previously,  $\bar{\mu}$  hardly depends on  $\omega_{13}$  at large electrolyte concentrations and/or reduced flow permeation within the particle (large  $\lambda^0\delta_3$ ). The values reached at  $c^\infty \rightarrow \infty$  are all consistent with Eq. 47. Whereas  $\bar{\mu}$  increases in magnitude with decreasing ionic strengths for  $\lambda^0\delta_3 \gg 1$  (see corresponding streamline distribution in panel *B*), Fig. 6 reveals that for sufficiently low  $\lambda^0\delta_3$  or equivalently large hydrodynamic permeability (panel *C*), the trend is reversed. This feature is due to the polarization of the electric double layer that becomes increasingly important upon decreasing  $c^\infty$ , that is when increasing (in magnitude) the local potentials throughout the particle. Polarization of the double layer leads to a dissymmetry in the ionic cloud distribution within and around the particle and is accompanied by a polarization field

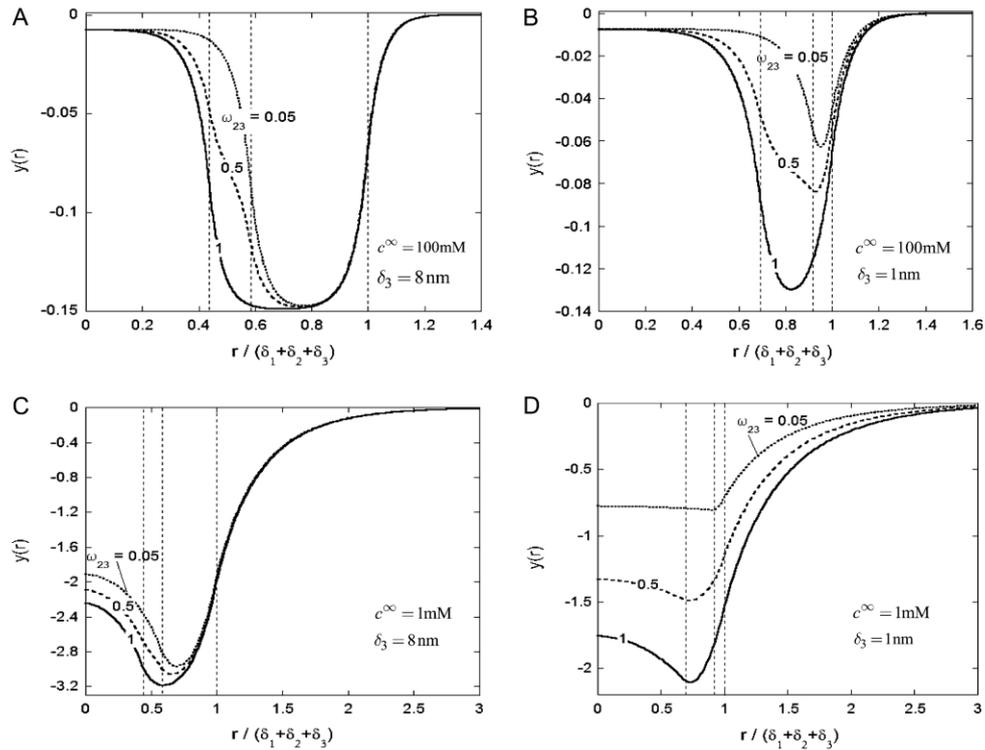


FIGURE 4 Dimensionless equilibrium potential distribution within and around the soft particle depicted in Fig. 1 *A* at  $c^\infty = 100$  mM (panels *A* and *B*) and  $c^\infty = 1$  mM (panels *C* and *D*) for various values of  $\omega_{23}$  (indicated) and  $\delta_3 = 8$  nm (panels *A* and *C*) and  $\delta_3 = 1$  nm (panels *B* and *D*). Other model parameters as in Fig. 3. The dashed lines indicate the positioning of the interfaces between layers 1 and 2, 2 and 3, and between layer 3 and the electrolyte solution.

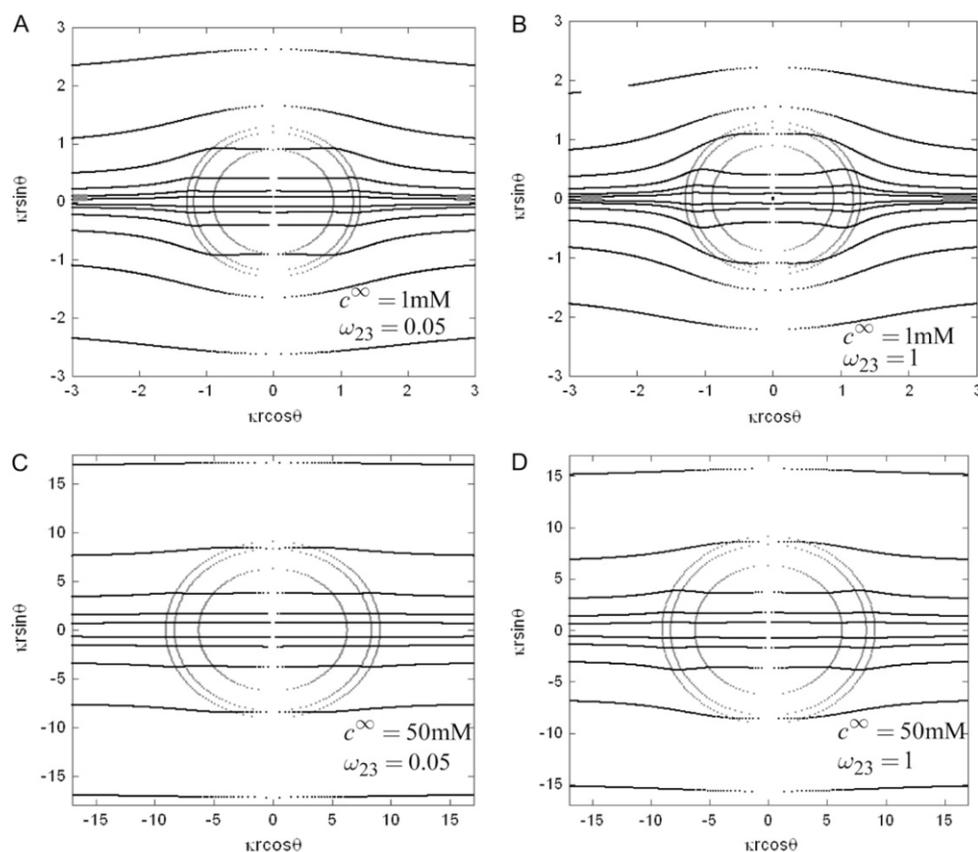


FIGURE 5 Flow streamlines within and around the soft particle depicted in Fig. 1 for  $\lambda^0 \delta_3 = 1$  ( $\delta_3 = 1$  nm),  $c^\infty = 1$  mM (panels A and B), 50 mM (panels C and D), and  $\omega_{23} = 0.05, 1$  (indicated). Other model parameters as in Fig. 3. The flow streamlines are obtained from the numerical solution  $(r, \theta)$  of the implicit equation  $-rh(r)E \sin^2(\theta) = \text{constant}$  (24). The concentric layers represent the various components of the soft particle.

that retards the particle motion (decreasing magnitude of  $\bar{\mu}$ ). The lower  $\lambda^0 \delta_3$ , i.e., the more free-draining is the particle, the more the electroosmotic flow probes the variations of the large potentials in the inner part of the particle and the more significant is the polarization process evoked before. Along this line, the polarization of the electric double layer is enhanced when increasing  $\omega_{13}$  since it leads to increasing (in magnitude) the local potentials within layer 3.

In Fig. 7, we briefly discuss the impact of the diffuseness of the interface between layers 2 and 3, that is the dependence of  $\bar{\mu}$  on  $\alpha_2$ , set to zero in all previous cases. In the set of results collected in Fig. 7, layer 1 is uncharged ( $\rho_1^0/F = 0$  mM) and layer 2 carries a pH-independent nominal charge density  $\rho_2^0/F = -100$  mM, whereas  $\rho_3^0/F$  is positive ( $\rho_3^0/F = 10$  mM) so that  $c_{13} \neq \omega_{13}$  (see details in caption). The situation now tackled is thus that of a particle with soft layers that contain completely dissociated ionogenic sites of opposite signs (Eq. 13). The variation of  $\bar{\mu}$  with  $\alpha_3$ —which pertains to the spatial anisotropy of the polymer segment density distribution at the interface layer 3/electrolyte solution—has

already been examined in detail in Duval and Ohshima (35) within the framework of the analysis of the electrokinetics of classical core/diffuse shell particles. Instead, we focus here on the effect of the variation of the inner soft material density distribution of the particle on its overall electrohydrodynamic features. From Fig. 7, the mobility increases in magnitude upon increase of  $\alpha_2$ . This trend is easily interpreted from the charge density profiles depicted in Fig. 7 B: increasing  $\alpha_2$  results in increasing  $|\rho_{\text{fix}}(r)|$  in layer 3 such that the local charge density therein eventually changes sign. In the meantime, the friction coefficient decreases significantly (Eq. 8) so that the resulting picture is an increase in magnitude of the electrophoretic mobility when increasing  $\alpha_2$ . It is noted that those concomitant changes in the electrostatic and hydrodynamic features of layer 3—as a result of increasing diffuseness for the interface layer 2/layer 3—impact more significantly on the mobility  $\bar{\mu}$  as compared to the electrohydrodynamic changes observed for layer 2. This is so because in the example of Fig. 7, we have in layer 2 an increase of  $k(r)$  with  $\alpha_2$  (Eq. 8), which accounts for the fact that the

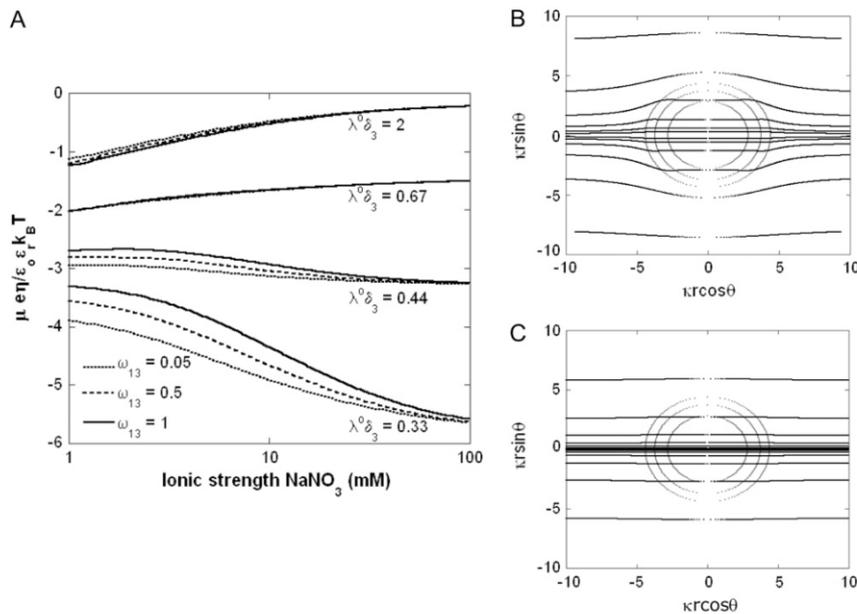


FIGURE 6 (A) Dimensionless electrophoretic mobility  $\mu \epsilon \eta / \epsilon_0 \epsilon_r k_B T$  as a function of NaNO<sub>3</sub> electrolyte concentration, ratio  $\omega_{13}$ , and dimensionless number  $\lambda^0 \delta_3$ . Equations 1–10, 12, 13, and 18–34 are used with  $\rho_3^0 / F = -30$  mM,  $\delta_1 = 8.5$  nm,  $\delta_2 = 2.8$  nm,  $\delta_3 = 2$  nm,  $c_{13} = \omega_{13}$ ,  $\omega_{23} = 0.5$ , and  $\alpha_{i3} \rightarrow 0$ . (B and C) Flow streamlines within and around the soft particle under the conditions of panel A for  $c^\infty = 10$  mM,  $\omega_{13} = 0.5$ ,  $\lambda^0 \delta_3 = 2$  (B), and  $\lambda^0 \delta_3 = 0.33$  (C).

electroosmotic flow probes to a lesser extent the electrohydrodynamic details within layer 2. Similar situations arise when varying  $\alpha_1$ , though with very limited impact on  $|\mu|$  since spatial anisotropy (in charge and friction) now concerns the most internal region of the particle thus made less accessible by the hydrodynamic flow. As a final remark, we note that Eq. 47 is clearly inadequate for particles with different spatial distributions for  $\rho_{\text{fix}}(r)$  and  $k(r)$ , in line with the expectations laid out in Duval and Ohshima (35).

#### Physical meaning of the isoelectric point of a multilayer soft particle (the results are obtained from Eq. 46 if not explicitly specified)

In Fig. 8, we report the variation of the iep of a chemically anisotropic, two-layer soft particle as a function of its hydrodynamic flow permeation properties, chemical composition, ratio  $\delta_1 / \delta_2$ , and electrolyte concentration. The results are derived from the semianalytical formalism detailed in the section ‘‘Isoelectric point . . . development’’ (Eq. 46). As a general comment, the situation is more complex than for a hard particle in the presence of indifferent electrolyte, the iep of the latter being simply the pH value where the surface potential, or the zeta potential, equates zero. This limiting situation corresponds to the case  $(\lambda^0)^{-1} \rightarrow 0$  in panels A and B of Fig. 8. For such a hard particle in the absence of any specific ion adsorption, the iep does not depend on the ionic strength (93), which is obviously not the case for a multilayer soft particle with chemical heterogeneities and significant hydrodynamic permeability (panels A and B,  $(\lambda^0)^{-1} > 0$ ). Let

us discuss those distinguishing characteristics in some more detail. In the absence of charge for the layer 1 ( $c_{12} = 0$ , where  $c_{12}$  is the nominal charge density ratio for the two layers) or dissymmetry in chemical composition between layers 1 and 2, the expected results  $\text{iep} = \text{pH}_2^*$  and  $\text{iep} = \text{pH}_1^* = \text{pH}_2^*$  (93), respectively, are recovered by the model. In other cases, the iep decreases significantly upon increasing the hydrodynamic permeability and verifies the inequality  $\text{pH}_1^* < \text{iep} < \text{pH}_2^*$ . The electroosmotic flow then probes the inner layer of the particle, which is, in the situations examined, more acidic than layer 2 ( $\text{pH}_1^* < \text{pH}_2^*$ ). The larger  $c_{12}$  (Fig. 8 A) and/or  $\Delta \text{pK} = \text{pK}_2^a - \text{pK}_1^a$  (Fig. 8 B), the lower is the iep for a given permeability. In panel C, the variation of the iep with the electrolyte concentration may be explained as follows. In the high ionic strength regime where  $\kappa(\delta_1 + \delta_2) \gg 1$ , the local electrostatic potentials approach zero throughout the particle, and the asymptotic value of the electrophoretic mobility is determined by the electrohydrodynamic and chemical features of the most external parts of the particle, i.e., by the quantity  $\lambda^0 \delta_2$  and the ratio  $c_{12}$ . Upon decrease of the ionic strength, the electrophoretic mobility becomes more sensitive to the details of the inner particle (see Figs. 3 and 4), in particular to the ratio  $\delta_1 / \delta_2$ . Increasing the latter at constant  $\delta_2$  leads to diminishing the curvature effects on the potential distribution and thus to increasing the magnitude of the electrostatic potential in layer 1 (see analogies with Fig. 4, C and D). The double layer spans significantly over the region 1, which becomes more acidic with, as a result, a lowering of the iep of the particle at a given ionic strength. Of course, this feature is possible because the permeability set in the calculations is

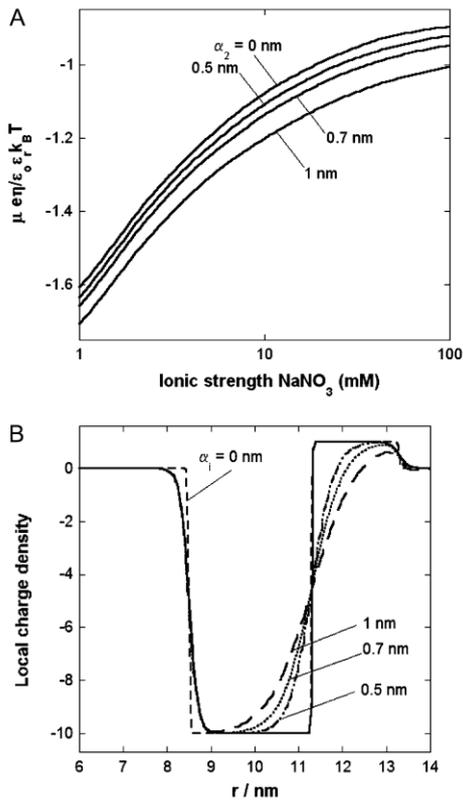


FIGURE 7 (A) Dimensionless electrophoretic mobility  $\mu \epsilon \eta / \epsilon_0 \epsilon_r k_B T$  as a function of  $\text{NaNO}_3$  electrolyte concentration and parameter  $\alpha_2$ . Equations 1–10, 12, 13, and 18–34 are used with  $\rho_s^0/F = +10$  mM,  $\delta_1 = 8.5$  nm,  $\delta_2 = 2.8$  nm,  $\delta_3 = 2$  nm,  $\omega_{13} = 0.05$ ,  $\omega_{23} = 0.5$ ,  $c_{13} = 0$ ,  $c_{23} = -10$ ,  $\alpha_1 = \alpha_3 = 0.2$  nm, and  $(\lambda^0)^{-1} = 2$  nm. (B) Profiles of the local charge density  $G(r) = \rho_{\text{fix}}(r)/\rho_s^0$  (Eq. 13) under the conditions of panel A.

large enough for the electroosmotic flow to probe the subtle variations of the potential distribution within the particle as induced by changes in electrolyte concentrations.

The basic trends discussed above on the impacts of ionic strength and flow permeability on the iep value for a two-layer particle structure (use of the semianalytical expression given by Eq. 46) are essentially the same as those computed for a three-layer soft particle by means of the numerical theory previously discussed (Eqs. 18–34). This is shown in Fig. 9 for a three-layer particle characterized by different chemical compositions for layers 2 and 3 (Eqs. 1–10, 12–14, and 18–37 with  $\omega_{13} = c_{13}$ , ionic exchange equilibria given by Eqs. 35–36 as detailed in the legend). Upon increase of the electrolyte concentration and/or flow penetration degree within the soft particle, the isoelectric point (indicated by arrows in Fig. 9) decreases because the electroosmotic flow extends significantly within layer 2, which is more acidic than layer 3.

We devote the next section to the explicit analysis of the electrohydrodynamic features of MS2 bacteriophage on the basis of the numerical formalism detailed above.

## APPLICATION TO THE BACTERIOPHAGE MS2

### Impact of the ionic strength on the electrokinetic features of MS2 bacteriophage

We measured the electrophoretic mobility of MS2 bacteriophage as a function of ionic strength over a wide range of salt concentrations. As shown in Fig. 10, the magnitude of measured  $\bar{\mu}$  decreased monotonically with increasing electrolyte concentration at pH 7. At that pH and over the whole range of electrolyte concentrations examined, the mobility  $\bar{\mu}$  is negative, which deserves some comments. On the basis of the data collected in Tables 1 and 2, one easily shows that the overall (nominal) charge density carried by the layer  $i$  at pH 7 may legitimately be approximately by  $\sum_{m=1}^{M_i} \rho_{i,m}^0$ , essentially because the conditions  $|\text{pH} - \text{p}K_{i,m}| \geq 1$  are valid for all sites present (Eqs. 14 and 15). This yields net nominal charge densities of +74 mM and –480 mM for the proteic capsid and for the RNA part, respectively. The inner RNA constituent of the virus impacts significantly on the MS2 electrophoretic mobility. This is confirmed by the modeling of the experimental data on the basis of Eqs. 1–10 and 12–34 with the spatial distributions of charge and soft material densities as discussed in preceding sections (Eqs. 4 and 12–17). Excellent agreement between theoretical and experimental data is achieved with  $1/\lambda^0 = 1.9 \pm 10\%$  nm over the ionic strength range 1–20 mM. This value denotes an important flow penetration within the capsid shell of thickness 2.1 nm. Such a characteristic is, for a large part, due to the presence at the virus surface of cylindrical pores that perforate the entire outer shell of the virus (41,69,70,72) thus connecting the inner RNA part of the virus to the outer medium. Bacterial infection by the MS2 bacteriophage takes place with the injection of its RNA into the genomic material of the bacterium. The transport could occur via the channel structure of the aforementioned pores. In the high ionic strength regime, good agreement between experiment and theory is obtained upon decreasing  $1/\lambda^0$  from 1.7 nm at 20 mM to  $\sim 1$  nm at 100 mM. As demonstrated in previous analysis dealing with the relationship between electrohydrodynamic features and structural organization of core/shell particles (26), the observed variation of the hydrodynamic permeability must necessarily be related to the modulation of the viral structure as induced by changing the electrolyte concentration.

A first possible hypothesis is that the shrinking/swelling of the virus is a result of the decreased/increased intramolecular interactions among neighboring charged sites. Said differently, upon lowering the ionic strength, the increase in size (electrostatic swelling) is accompanied by an increase in the radius of the resistance centers (Eq. 3) and thus a decrease of the friction coefficient, or equivalently an increase of  $1/\lambda^0$ .

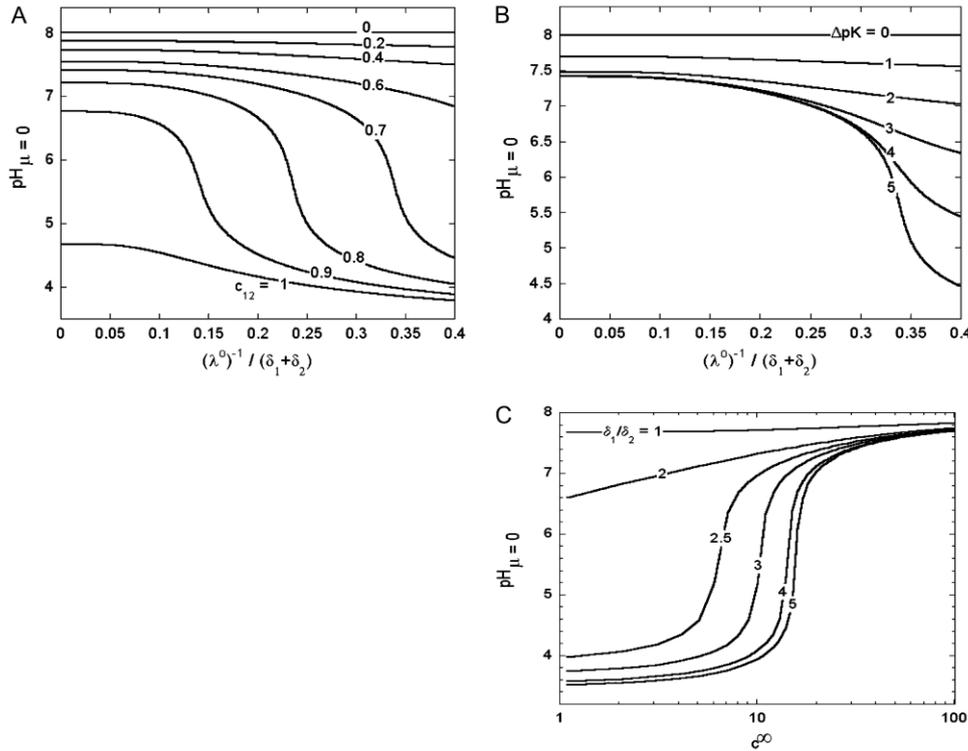


FIGURE 8 Variation of the isoelectric point as a function of the flow penetration degree, for various values of the nominal charge density ratio  $c_{12}$  for layers 1 and 2 (panel A) and different values of  $\Delta pK = pK_2^a - pK_1^a$  (panel B). Model parameters, panel A:  $\delta_1 = 7$  nm,  $\delta_2 = 2$  nm,  $pK_1^a = pK_1^b = 3$ ,  $pK_2^a = pK_2^b = 8$ ,  $c^\infty = 10$  mM, and  $\rho_2^0/F = 50$  mM. Model parameters, panel B: the same as in A with  $c_{12} = 0.7$  and variable  $pK_1^a = pK_1^b$ . (C) Variation of the isoelectric point as a function of the electrolyte concentration and the ratio  $\delta_1/\delta_2$ . Model parameters, panel C: as in A with  $\delta_2 = 2$  nm,  $c_{12} = 0.5$ ,  $(\lambda^0)^{-1} = 1$  nm. In all these calculations, Eqs. 35–46 are used (particle composed of two concentric soft layers, Eq. 46).

This mechanism is, however, not realistic for MS2 viruses because i), no significant size variations were measured upon lowering the ionic strength at pH 7 (94) and ii), important changes in  $1/\lambda^0$  should be observed in the low ionic strength regime where the interfacial osmotic pressure is the most significant (26).

Those elements lead us to formulate another explanation for the electrokinetic features depicted in Fig. 10. Recall the spatial organization of the proteins that constitute the proteic capsid of the MS2 virus. It consists of 60 similar morphological units, each of which is composed of three capsid proteins (commonly denoted as A, B, and C in view of their different conformations) that form a triangle (base = 6 nm, height 2 nm) (70). The most significant difference among the three subunits A, B, and C in MS2 is found in a long loop, called the FG loop, that connects the F and G strands of the  $\beta$ -sheet. The FG loops of the A and C subunits are very similar and have an extended conformation, whereas that in the B subunit is folded back and has a closer contact with the rest of the protein (68). The result of this arrangement is the formation of a channel into the core of the particle with a diameter of  $\sim 17$  Å and a length of  $\sim 14$  Å; one of these channels may be a

site of RNA extrusion during infection (68,95,96). Mutation and deletions in the FG loop have shown to reduce the efficiency of the capsid assembly (97,98). The propensity of those FG loops to adopt distinct conformations is due to a conserved Pro-78, which is preceded by a peptide that can easily switch between a *trans* and *cis* conformation (95). The pore size is basically modulated by the respective separation distances between those flexible loops.

One hypothesis is that at equilibrium, these separation distances are determined by the balance among the various interactions forces among the (charged) loops, e.g., electrostatic, van der Waals, hydrophobic, entropic, and elastic forces. At low ionic strengths, the electrostatic interactions are very important and it is expected that the loops significantly repel each other: the pore size is then large and so is  $1/\lambda^0$ . The fact that  $1/\lambda^0$  does not vary from 1 mM to 20 mM indicates that the flexible loops belonging to the proteins A, B, and C are stuck to the most rigid part of the protein, thus rendering impossible any further extension of the pore cavity. For sufficiently large ionic strengths, the situation can be reversed: the loops can approach each other and gradually obstruct the channel with the decrease of  $1/\lambda^0$  as a result.

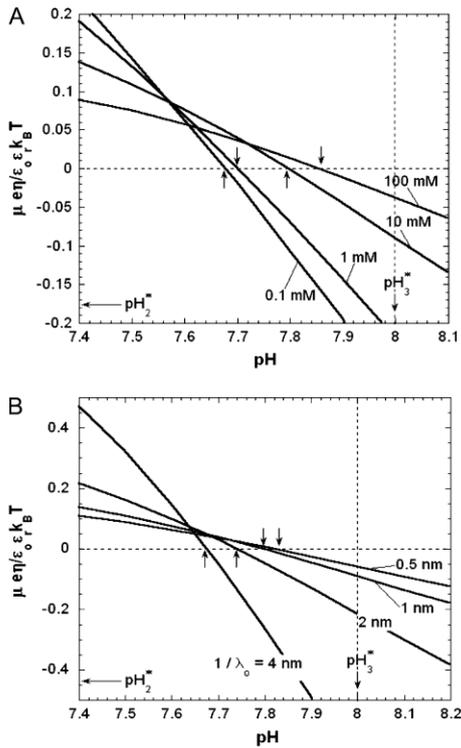


FIGURE 9 (A) Dimensionless electrophoretic mobility  $\mu \epsilon \eta / \epsilon_0 \epsilon_r k_B T$  as a function of pH solution and ionic strength NaNO<sub>3</sub> (indicated). Equations 1–10, 12–14, and 18–37 are used with  $\rho_3^0/F = 30$  mM,  $\delta_1 = 8.5$  nm,  $\delta_2 = 2.8$  nm,  $\delta_3 = 2$  nm,  $\omega_{13} = c_{13} = 0.05$ ,  $\omega_{23} = c_{23} = 0.5$ ,  $\alpha_1 = 0$  nm,  $(\lambda^0)^{-1} = 1$  nm,  $pK_2^a = pK_2^b = 4$  ( $pH_2^a = 4$ ), and  $pK_3^a = pK_3^b = 8$  ( $pH_3^a = 8$ ). (B) Dimensionless electrophoretic mobility  $\mu \epsilon \eta / \epsilon_0 \epsilon_r k_B T$  as a function of pH solution for various values of  $1/\lambda^0$  (indicated) at  $c^\infty = 10$  mM. Other model parameters as in panel A. It is emphasized that the ionic exchange equilibria as given by Eqs. 35–36 are considered for the calculations set in this figure. The arrows indicate the location of the isoelectric point.

The theoretical computations of the electrophoretic mobility of MS2 bacteriophage as a function of electrolyte concentration exhibit a maximum that is more or less pronounced depending on the value of  $1/\lambda^0$ . This may be explained as follows. For a given  $1/\lambda^0$ , the decrease in magnitude of the mobility upon increase of the electrolyte concentrations up to 20 mM is the result of screening of the fixed charges carried by the ionogenic sites within and at the surface of the virus. Roughly speaking, at infinitely large ionic strengths and at fixed  $1/\lambda^0$ , the mobility tends to a nonzero asymptotic value, which is the specific signature of flow permeation within charged soft particles (27,46). For MS2 particles, this value of the dimensionless mobility is  $\sim -3.5$  at  $1/\lambda^0 = 1.9$  nm and is reached for electrolyte concentrations well above 100 mM because of the large contribution in charge brought about by the inner viral part (see Tables 1 and 2 and the discussion above on the net charges

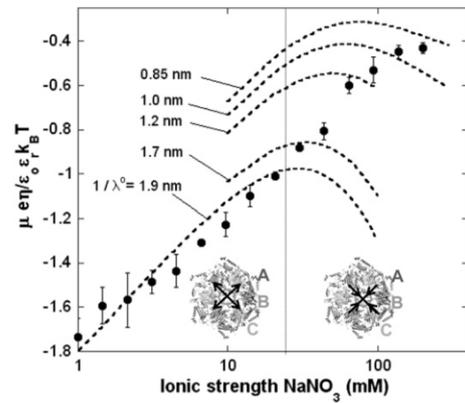


FIGURE 10 Measured electrophoretic mobility  $\mu \epsilon \eta / \epsilon_0 \epsilon_r k_B T$  for bacteriophage MS2 as a function of NaNO<sub>3</sub> electrolyte concentration at pH = 7 (solid circles) and theoretical predictions for various values of  $1/\lambda^0$  (dashed lines). See text for further detail. In inset, the morphological unit composed of three proteins A, B, and C with the arrows that indicate the modulations of the pore size as governed by the electrolyte concentration level. For the modeling, Eqs. 1–10 and 12–34 are used with the  $\rho_i^0$ ,  $pK_{i,m}$  and  $\epsilon_{i,m}$  ( $i = 1, 2, 3$ ) as reported in Tables 1 and 2.

carried by the proteic capsid and the RNA part at pH 7). This charge makes the electrostatics still operative at ionic strengths around 100 mM. As a result of the electrokinetic behavior at low and infinite electrolyte concentrations, a maximum in theoretical mobility is observed at intermediate ionic strengths. The nonmonotonous variation of the electrophoretic mobility of soft particles with large charge density is discussed in more details in Duval and Ohshima (35) (see Supporting Information therein). The lower  $1/\lambda^0$ , the lesser the contribution of the inner viral part to the mobility of the particle, the lesser the charge probed by the electroosmotic flow within the particle, and the lower the magnitude of  $\bar{\mu}$  at  $c^\infty \rightarrow \infty$  with a maximum that becomes less marked.

### Impact of solution pH

The dependence of the electrophoretic mobility on pH is given in Fig. 11 for NaNO<sub>3</sub> ionic strengths of 1, 10, and 100 mM. Unsurprisingly, the mobility becomes more negative when increasing pH because of the deprotonation of the various sites listed in Tables 1 and 2. The results reveal a slight decrease of the iep upon decrease of the electrolyte concentration (iep  $\approx 3.9$  for  $c^\infty = 100$  mM and iep  $\approx 3.4$  for  $c^\infty = 1, 10$  mM). From the values of  $1/\lambda^0$  obtained in the analysis of  $\bar{\mu}$  as a function of ionic strength, the theoretical variations of  $\bar{\mu}$  with pH were computed and are collected in Fig. 11. It is emphasized that no further adjustable parameters are required for these computations. Reasonable (1 mM) to excellent agreement (10 mM, 100 mM) is met for all three concentrations in the pH range pH  $\geq 5$ . The theoretical values of the iep are somewhat larger than those determined experimentally but do not vary significantly with ionic strength

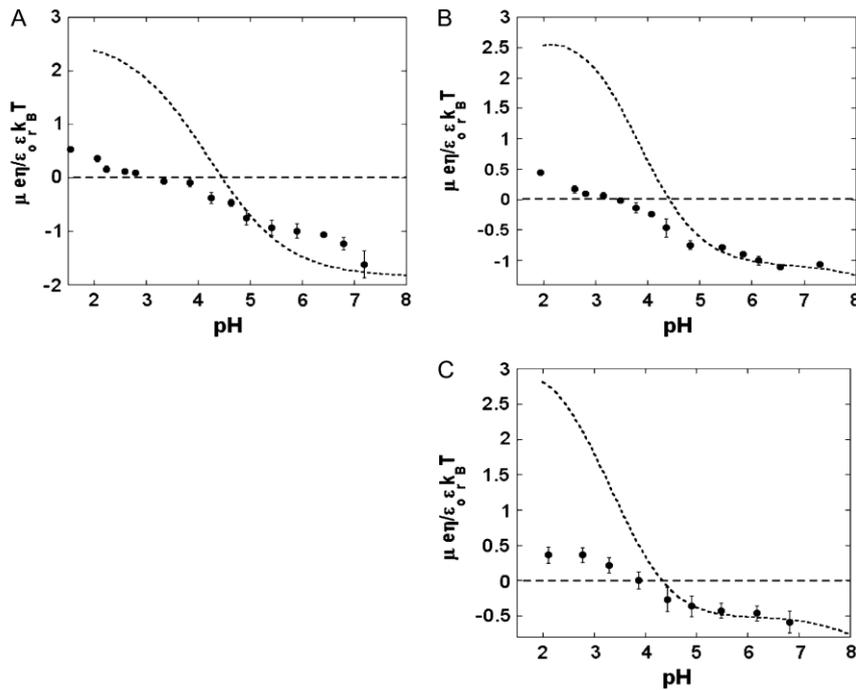


FIGURE 11 Measured electrophoretic mobility  $\mu_{\text{eff}}/\epsilon_0 \epsilon_r k_B T$  (solid circles) for bacteriophage MS2 as a function of pH for NaNO<sub>3</sub> electrolyte concentration 1 mM (panel A), 10 mM (panel B), and 100 mM (panel C) and theoretical predictions (dashed lines) with the values of  $1/\lambda^0$  as derived from Fig. 10 ( $1/\lambda^0 = 1.9 \pm 10\%$  nm for  $c^\infty = 1$  mM and 10 mM and  $1/\lambda^0 \approx 1.1$  nm for  $c^\infty = 100$  mM). See text for further detail.

( $\text{iep} \approx 4.3$ ). For  $\text{pH} < 5$ , the model systematically overestimates the electrophoretic mobility. To clarify this, we performed size measurements at various pH values and  $c^\infty = 1$  mM and 100 mM NaNO<sub>3</sub> electrolyte concentrations (94). Those results clearly indicate the occurrence of a significant aggregation of viral particles at  $\text{pH} \leq 5$ , which is exactly in the pH range where the theoretical predictions—obtained for a strictly isolated and noninteracting virus—deviate from the experimental data. By “significant aggregation”, we mean the pH range below which the number of isolated viruses becomes less predominant as compared to the various aggregate populations appearing due to diminished electrostatic (repulsive) interactions at lower pH. The determination of the mobility for viral aggregates is an extremely complex matter because the structure of the aggregate intimately influences the hydrodynamic flow field profiles within and around the pool of aggregated particles as well as the electrostatic potential distribution therein. On the basis of the studies reported in Duval et al. (24), one may expect for an aggregate an increase of the overall hydrodynamic permeability as compared to that for an isolated virus. Such an increase in permeability would thus contribute in probing more efficiently the RNA distributed within the viral particles that constitute the aggregate, and doing so, lead to a decrease in the iep value, which is indeed observed ( $\text{iep}_{\text{theory}} > \text{iep}_{\text{experiment}}$ ). However, aggregation may also result in strong denaturation of the capsid proteins at the outer surface of the viruses and therefore induce significant modulation (reduction) of the

pore size. It is noted that for the set of pK values reported in Tables 1 and 2, the point of zero charge at infinite electrolyte concentration ( $y(r) \rightarrow 0$ ) is for the RNA part and for the proteic capsid, if considered separately, 2.9 and about 9, respectively (values obtained from the solutions of the implicit equations  $c_{13}(\text{pH}) = c_{23}(\text{pH}) = 0$  and  $c_{33}(\text{pH}) = 0$  with the  $c_{13}$  defined by Eq. 14). In the light of the discussion laid out in the section “Physical meaning of the isoelectric point of a multilayer soft particle”, the measured and theoretical values for the iep of the virus as a whole—which are closer to that of the RNA constituent than that of the proteic capsid—confirm that flow permeation within MS2 bacteriophage is so high that the electroosmotic flow significantly probes the inner RNA part. The fact that the iep of the isolated viruses does not depend much on ionic strength is basically due to the combination of  $\delta_1 + \delta_2 \gg \delta_3$  and large  $1/\lambda^0$  (see analogies with the trends in Fig. 8 C).

## CONCLUSIONS

An original theoretical formalism is proposed for understanding on a quantitative level the electrokinetic properties of soft particles built up by concentric layers that differ in thickness, soft material density distribution, chemical composition, and flow penetration degree. The analysis is illustrated with numerical simulations of the electrophoretic mobility under various conditions. Those clearly show the

complex interplay between the coupled electrostatic and hydrodynamic properties of the whole particle as governed by the physicochemical characteristics of its constituting layers. In particular, it is unambiguously demonstrated that the concept of zeta potential is inappropriate for such type of particles whose electromigration in an external field is influenced by the structural and chemical details of the inner layers. Also, the notion of isoelectric point is revisited and we prove that it is generally a function of the ionic strength, flow permeation degree, and extent of dissymmetry in the chemical compositions of the various soft layers.

On the basis of this formalism, strictly valid for sufficiently diluted suspensions of multi layer soft particles (absence of interparticular interactions), we interpret the dependence of measured electrophoretic mobility on pH and ionic strength for bacteriophage MS2 composed of inner RNA encapsulated by an outer proteic shell. The results indicate a strong flow permeation within the virus with a large impact of the RNA constituents of MS2 on its overall electrohydrodynamic properties. At pH 7, where viruses are isolated, two ionic strength regimes may be distinguished: a low electrolyte concentration range where the typical flow penetration length within MS2 remains constant, and a large ionic strength range where the viral permeability gradually decays. Those trends are qualitatively in line with the dynamics of pore size as conditioned by the intermolecular repulsion among flexible loops of proteins within the shell capsid. The theoretical predictions are further in excellent agreement with size measurements of MS2 viruses that picture the occurrence of aggregation at sufficiently low pH values (pH < 5).

From the conclusions laid out in this study, one may expect the propensity of infecting bacteria by MS2 viruses to be a strong function of the physicochemical conditions of their close environment (pH and ionic strength). For this reason, understanding the biological activity of viruses as well as their interactions with other mineral or organic components—as occurring in filtration processes and transport through groundwater—necessarily require reasoning beyond the too simplistic concept of zeta or surface potential (as involved in the Helmholtz-Smoluchowski equation). This concept is strictly valid for homogeneous and impermeable (hard) particles. Scrupulous analysis of the electrohydrodynamic properties of the (soft) virus is instead the first mandatory prerequisite to achieve such degree of understanding.

## APPENDIX

### Details of the derivation of the semianalytical expression for the isoelectric point of a soft particle composed of two concentric step-like soft layers (Eq. 46)

After arrangements, the linearized form of the Poisson-Boltzmann equation (Eqs. 27–28) is written for a soft particle that satisfies the condition  $\kappa a \gg 1$  :

$$0 < x < \tilde{\delta}_1 : \frac{d^2 y(x)}{dx^2} - (1 + \beta c_{12} \nu_1) y(x) + \beta c_{12} \sigma_1 = 0 \quad (\text{A1})$$

$$\tilde{\delta}_1 < x < \tilde{\delta}_1 + \tilde{\delta}_2 : \frac{d^2 y(x)}{dx^2} - (1 + \beta \nu_2) y(x) + \beta \sigma_2 = 0 \quad (\text{A2})$$

$$x > \tilde{\delta}_1 + \tilde{\delta}_2 : \frac{d^2 y(x)}{dx^2} - y(x) = 0. \quad (\text{A3})$$

The boundaries associated to Eqs. A1–A3 express the zero charge at the surface of the particle core ( $x = 0$ ), the zero potential as a reference at  $x \rightarrow \infty$ , and the continuity of the electrostatic potential and electric field at  $x = \tilde{\delta}_1$  and  $x = \tilde{\delta}_1 + \tilde{\delta}_2$ . After calculations, the solution is given by

$$0 < x < \tilde{\delta}_1 : y(x) = Y_1 + A \exp(-\xi_1 x) + B \exp(\xi_1 x) \quad (\text{A4})$$

$$\tilde{\delta}_1 < x < \tilde{\delta}_1 + \tilde{\delta}_2 : y(x) = Y_2 + C \exp(-\xi_2 x) + D \exp(\xi_2 x) \quad (\text{A5})$$

$$x > \tilde{\delta}_1 + \tilde{\delta}_2 : y(x) = E \exp(-x) \quad (\text{A6})$$

$$\text{with } \xi_1 = (1 + \beta c_{12} \nu_1)^{1/2}, \quad (\text{A7})$$

$$\xi_2 = (1 + \beta \nu_2)^{1/2}, \quad (\text{A8})$$

$$Y_1 = \beta c_{12} \sigma_1 / (\xi_1)^2, \quad (\text{A9})$$

$$\text{and } Y_2 = \beta \sigma_2 / (\xi_2)^2. \quad (\text{A10})$$

The constants  $A$ ,  $B$ ,  $C$ ,  $D$ , and  $E$  are determined from the boundaries and are yielded by the algebraic equations

$$A = B = \frac{Y_2 - Y_1 + C \exp(-\xi_2 \tilde{\delta}_1) + D \exp(\xi_2 \tilde{\delta}_1)}{2 \cosh(\xi_1 \tilde{\delta}_1)} \quad (\text{A11})$$

$$C = -\frac{Y_2 \mathbb{Z}_1 + \mathbb{Z}_2}{\mathbb{Z}_3} \quad (\text{A12})$$

$$D = \frac{Y_2 \mathbb{Z}_4 + \mathbb{Z}_5}{\mathbb{Z}_3} \quad (\text{A13})$$

$$E = \xi_2 \{ C \exp[(\tilde{\delta}_1 + \tilde{\delta}_2)(1 - \xi_2)] - D \exp[(\tilde{\delta}_1 + \tilde{\delta}_2)(1 + \xi_2)] \}, \quad (\text{A14})$$

where  $\mathbb{Z}_{1,2,3,4,5}$  are defined by the expressions

$$\mathbb{Z}_1 = \exp(\xi_2 \tilde{\delta}_1) [\xi_1 \sinh(\xi_1 \tilde{\delta}_1) - \xi_2 \cosh(\xi_1 \tilde{\delta}_1)], \quad (\text{A15})$$

$$\mathbb{Z}_2 = (Y_1 - Y_2) \xi_1 (1 + \xi_2) \exp[\xi_2 (\tilde{\delta}_1 + \tilde{\delta}_2)] \sinh(\xi_1 \tilde{\delta}_1), \quad (\text{A16})$$

$$\mathbb{Z}_3 = (1 - \xi_2) \exp(-\xi_2 \tilde{\delta}_2) [\xi_1 \sinh(\xi_1 \tilde{\delta}_1) - \xi_2 \cosh(\xi_1 \tilde{\delta}_1)] - (1 + \xi_2) \exp(\xi_2 \tilde{\delta}_2) [\xi_1 \sinh(\xi_1 \tilde{\delta}_1) + \xi_2 \cosh(\xi_1 \tilde{\delta}_1)], \quad (\text{A17})$$

$$\mathbb{Z}_4 = \exp(-\xi_2 \tilde{\delta}_1) [\xi_1 \sinh(\xi_1 \tilde{\delta}_1) + \xi_2 \cosh(\xi_1 \tilde{\delta}_1)], \quad (\text{A18})$$

$$\text{and } \mathbb{Z}_5 = (Y_1 - Y_2) \xi_1 (1 - \xi_2) \exp[-\xi_2 (\tilde{\delta}_1 + \tilde{\delta}_2)] \sinh(\xi_1 \tilde{\delta}_1). \quad (\text{A19})$$

Substituting in Eq. 45 the expressions for the potential distribution derived above and computing the integral leads to the result given in Eq. 46 in the main text.

## REFERENCES

- Stone, H. A., and S. Kim. 2001. Microfluidics: basic issues, applications, and challenges. *AIChE J.* 47:1250–1254.
- Beebe, D. J., G. A. Mensing, and G. M. Walker. 2002. Physics and applications of microfluidics in biology. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 4:261–286.
- Cox, C. D., M. A. Shoesmith, and M. M. Ghosh. 1996. Electrokinetic remediation of mercury contaminated soils using iodine/iodide lixiviant. *Environ. Sci. Technol.* 30:1933–1938.
- Sharma, M. M., and Y. C. Yortsos. 1987. Transport of particulate suspensions in porous media: model formulation. *AIChE J.* 33:1636–1643.
- De Beer, E., J. F. L. Duval, and E. Meulenkaamp. 2000. Electrophoretic deposition: a quantitative model for particle deposition and binder formation from alcohol-based suspensions. *J. Colloid Interface Sci.* 222:117–124.
- Lyklema, J. 2001. Surface conduction. *J. Phys. Condens. Matter.* 13:5027–5034.
- Overbeek, J. Th. G. 1943. Theorie der elektrophorese. *Kolloid-Beih.* 54:287–364.
- Booth, F. 1950. The cataphoresis of spherical, solid non-conducting particles in a symmetrical electrolyte. *Proc. Roy. Soc. Lond.* 203:533–551.
- Wiersema, P. H., A. L. Loeb, and J. Th. G. Overbeek. 1966. Calculation of the electrophoretic mobility of a spherical colloid particle. *J. Colloid Interface Sci.* 22:78–99.
- Dukhin, S. S., and N. M. Semikhin. 1970. Theory of double layer polarization and its effect on the electrokinetic and electrooptical phenomena and the dielectric permeability of dispersed systems. *Kolloid Zh.* 32:360–368.
- O'Brien, R. W., and L. R. White. 1978. Electrophoretic mobility of a spherical colloidal particle. *J. Chem. Soc. Faraday Trans. II.* 74:1607–1626.
- DeLacey, E. H. B., and L. R. White. 1981. Dielectric response and conductivity of dilute suspensions of colloidal particles. *J. Chem. Soc. Faraday Trans. II.* 77:2007–2039.
- O'Brien, R. W., and R. J. Hunter. 1981. The electrophoretic mobility of large colloidal particles. *Can. J. Chem.* 59:1878–1887.
- Dukhin, S. S. 1993. Non-equilibrium electric surface phenomena. *Adv. Colloid Interface Sci.* 44:1–134.
- Lyklema, J. 1995. Electrokinetics and related phenomena. In *Fundamentals of Interface and Colloid Science: Solid-Liquid Interfaces*, Vol. 2. Academic Press, London. Chapter 4.
- Lyklema, J., S. Rovillard, and J. L. De Conninck. 1998. Electrokinetics: The properties of the stagnant layer unraveled. *Langmuir.* 14:5659–5663.
- Van der Wal, A. 1996. Electrochemical characterization of the bacterial cell surface. PhD thesis. Wageningen Universiteit, Wageningen, The Netherlands.
- Poortinga, A. T. 2001. Electric double layer interactions in bacterial adhesion and detachment. PhD thesis. Rijksuniversiteit Groningen, Groningen, The Netherlands.
- Bos, R., H. C. van der Mei, and H. J. Busscher. 1998. 'Soft-particle' analysis of the electrophoretic mobility of a fibrillated and non-fibrillated oral streptococcal strain: *Streptococcus salivarius*. *Biophys. Chem.* 74:251–255.
- de Kerchove, A. J., and M. Elimelech. 2005. Relevance of electrokinetic theory for "soft" particles to bacterial cells: Implications for bacterial adhesion. *Langmuir.* 21:6462–6472.
- Duval, J. F. L., H. J. Busscher, B. van de Belt-Gritter, H. C. van der Mei, and W. Norde. 2005. Analysis of the interfacial properties of fibrillated and non-fibrillated oral streptococcal strain from electrophoretic mobility and titration measurements: evidence for the shortcomings of the "classical soft particle approach". *Langmuir.* 21:11268–11282.
- Gaboriaud, F., E. Dague, S. Bailet, F. Jorand, J. F. L. Duval, and F. Thomas. 2006. Multi-scale dynamics of the cell envelope of *Shewanella putrefaciens* as a response to pH change. *Colloids Surf. B Biointerfaces.* 52:108–116.
- Dague, E., J. F. L. Duval, F. Jorand, F. Thomas, and F. Gaboriaud. 2006. Probing surface structures of *Shewanella spp.* by microelectrophoresis. *Biophys. J.* 90:2612–2621.
- Duval, J. F. L., K. J. Wilkinson, H. P. van Leeuwen, and J. Buffle. 2005. Humic substances are soft and permeable: evidence from their electrophoretic mobilities. *Environ. Sci. Technol.* 39:6435–6445.
- Duval, J. F. L., V. I. Slaveykova, M. Hosse, J. Buffle, and K. J. Wilkinson. 2006. Electrohydrodynamic properties of functionalized carboxymethyl dextran macromolecules. *Biomacromolecules.* 7:2818–2826.
- Rotureau, E., F. Thomas, and J. F. L. Duval. 2007. Relationship between swelling and electrohydrodynamic properties of functionalized carboxymethyl dextran macromolecules. *Langmuir.* 23:8460–8473.
- Ohshima, H. 1995. Electrophoresis of soft particles. *Adv. Colloid Interface Sci.* 62:189–235.
- Saville, D. A. 2000. Electrokinetic properties of fuzzy colloidal particles. *J. Colloid Interface Sci.* 222:137–145.
- Ohshima, H. 1994. Electrophoretic mobility of soft particles. *J. Colloid Interface Sci.* 163:474–483.
- Hill, R. J., and D. A. Saville. 2005. 'Exact solutions of the full electrokinetic model for soft spherical colloids: electrophoretic mobility. *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Aspects.* 267:31–49.
- Hill, R. J., D. A. Saville, and W. B. Russel. 2003. Electrophoresis of spherical polymer-coated particles. *J. Colloid Interface Sci.* 258:56–74.
- Lopez-Garcia, J. J., C. Grosse, and J. J. Horno. 2003. Numerical study of colloidal suspensions of soft spherical particles using the network method: 1. DC electrophoretic mobility. *J. Colloid Interface Sci.* 265:327–340.
- Lopez-Garcia, J. J., C. Grosse, and J. J. Horno. 2003. Numerical study of colloidal suspensions of soft spherical particles using the network method: 2. AC electrokinetic and dielectric properties. *J. Colloid Interface Sci.* 265:341–350.
- Hill, R. J. 2004. Hydrodynamics and electrokinetics of spherical liposomes with coatings of terminally anchored poly(ethylene glycol): numerically exact electrokinetics with self-consistent mean-field polymer. *Phys. Rev. E.* 70:051406.
- Duval, J. F. L., and H. Ohshima. 2006. Electrophoresis of diffuse soft particles. *Langmuir.* 22:3533–3546.
- Mason, T. G., and M. Y. Lin. 2005. Density profiles of temperature sensitive microgel particles. *Phys. Rev. E.* 71:040801.
- Fernandez-Nieves, A., F. J. de las Nieves, and A. Fernandez-Barbero. 2004. Static light scattering from microgel particles: model of variable dielectric permittivity. *J. Chem. Phys.* 120:374–378.
- Gao, C., S. Leporatti, S. Moya, E. Donath, and H. Mohwald. 2003. Swelling and shrinking of polyelectrolyte microcapsules in response to changes in temperature and ionic strength. *Chem. Eur. J.* 9:915–920.
- Garcia-Salinas, M. J., M. S. Romero-Cano, and F. J. de Las Nieves. 2001. Electrokinetic characterization of poly(*N*-isopropylacrylamide) microgel particles: effect of electrolyte concentration and temperature. *J. Colloid Interface Sci.* 241:280–285.
- Kuzmanovic, D. A., I. Elashvili, C. Wick, C. O'Connell, and S. Krueger. 2006. Quantification of RNA in bacteriophage MS2-like viruses in solution by small-angle X-ray scattering. *Radiat. Phys. Chem.* 75:359–368.
- Koning, R., S. van den Worm, J. R. Plaisier, J. van Duin, J. P. Abrahams, and H. Koerten. 2003. Visualization by cryo-electron microscopy of genomic RNA that binds to the protein capsid inside bacteriophage MS2. *J. Mol. Biol.* 332:415–422.
- Van den Worm, S. H. E., R. I. Koning, H. J. Warmenhoven, H. K. Koerten, and J. van Duin. 2006. Cryo electron microscopy reconstructions of the *Leviviridae* unveil the densest icosahedral RNA packing possible. *J. Mol. Biol.* 363:858–865.
- Schaldach, C. M., W. L. Bourcier, H. F. Shaw, B. E. Viani, and W. D. Wilson. 2006. The influence of ionic strength on the interaction of vi-

- rures with charged surfaces under environmental conditions. *J. Colloid Interface Sci.* 294:1–10.
44. Valegård, K., J. Murraray, N. J. Stonehouse, S. van den Worm, P. G. Stockely, and L. Liljas. 1997. Three-dimensional structures of two complexes between recombinant MS2 capsids and RNA operator fragments reveal sequence-specific protein–RNA interactions. *J. Mol. Biol.* 270:724–738.
  45. Duval, J. F. L. 2007. Electrophoresis of soft colloids: basic principles and applications, Chapter 7. In *Environmental Colloids and Particles: Behaviour, Separation and Characterization*. K. J. Wilkinson and J. Lead, editors. Vol. 10 IUPAC Series on Analytical and Physical Chemistry of Environmental Systems. J. Buffle and H. P. van Leeuwen, Senior Editors. John Wiley & Sons, Chichester, England.
  46. Dukhin, S. S., R. Zimmermann, and C. Werner. 2006. Electrokinetic fingerprinting of grafted polyelectrolyte layers—a theoretical approach. *Adv. Colloid Interface Sci.* 122:93–105.
  47. Berger, P. 1994. In *Ground Water Contamination and Control*. U. Zoller, editor. Dekker, New York.
  48. Redman, J. A., S. B. Grant, T. M. Olson, and M. K. Estes. 2001. Pathogen filtration, heterogeneity, and the potable reuse of wastewater. *Environ. Sci. Technol.* 35:1798–1805.
  49. Yoshino, K., and T. Morishima. 1971. Filtration of viruses through Millipore membranes coated with polyvinylpyrrolidone. *Arch. Virol.* 35:399–401.
  50. Yahya, M. T., L. Galsomies, C. P. Gerba, and R. C. Bales. 1993. Survival of bacteriophages MS-2 and PRD-1 in ground water. *Water Sci. Technol.* 27:409–412.
  51. Schulze-Makuch, D., H. Guan, and S. D. Pillai. 2003. Effects of pH and geological medium on bacteriophage MS2 transport in a model aquifer. *Geomicrobiol. J.* 20:73–84.
  52. Guan, H., D. Schulze-Makuch, S. Schaffer, and S. D. Pillai. 2003. The effect of critical pH on virus fate and transport in saturated porous medium. *Ground Water.* 41:701–708.
  53. Farrah, S. R. 1982. Chemical factors influencing adsorption of bacteriophage MS2 to membrane filters. *Appl. Environ. Microbiol.* 43:659–663.
  54. Hu, J. Y., S. L. Ong, L. F. Song, Y. Y. Feng, W. T. Liu, T. W. Tan, L. Y. Lee, and W. J. Ng. 2003. Removal of MS2 bacteriophage using membrane technologies. *Water Sci. Technol.* 47:163–168.
  55. Jacangelo, J. G., R. Rhodes Trussell, and M. Watson. 1997. Role of membrane technology in drinking water treatment in the United States. *Desalination.* 113:119–127.
  56. You, Y., G. F. Vance, D. L. Sparks, J. Zhuang, and Y. Jin. 2003. Sorption of MS2 bacteriophage to layered double hydroxides: effects of reaction time, pH, and competing anions. *J. Environ. Qual.* 32:2046–2053.
  57. Chattopadhyay, S., and R. W. Puls. 1999. Adsorption of bacteriophages on clay minerals. *Environ. Sci. Technol.* 33:3609–3614.
  58. Dowd, S. E., S. D. Pillai, S. Wnag, and M. Y. Corapcioglu. 1998. Delineating the specific influence of virus isoelectric point and size on virus adsorption and transport through sandy soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:405–410.
  59. Dizer, H., A. Nasser, and J. M. Lopez. 1984. Penetration of different human pathogenic viruses into sand columns percolated with distilled water, groundwater, or wastewater. *Appl. Environ. Microbiol.* 47:409–415.
  60. Lytle, C. D., and L. B. Routson. 1995. Minimized virus binding for tests of barrier materials. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:643–649.
  61. Meschke, J. S., and M. D. Sobsey. 1998. Comparative adsorption of Norwalk virus, poliovirus 1 and F+ RNA coliphage MS2 to soils suspended in treated wastewater. *Water Sci. Technol.* 38:187–189.
  62. Shields, P. A., and S. R. Farrah. 2002. Characterization of virus adsorption by using DEAE-sepharose and octyl-sepharosedagger. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:3965–3968.
  63. Herath, G., K. Yamamoto, and T. Uruse. 1999. Removal of viruses by microfiltration membranes at different solution environments. *Water Sci. Technol.* 40:331–338.
  64. Langlet, J., F. Gaboriaud, and C. Gantzer. 2007. Effects of pH on plaque forming unit counts and aggregation of MS2 bacteriophage. *J. Appl. Microbiol.* n press.
  65. Debye, P., and A. J. Bueche. 1948. Intrinsic viscosity, diffusion and sedimentation rate of polymers in solution. *J. Chem. Phys.* 16:573–579.
  66. Brinkman, H. C. 1949. Problems of fluid through swarms of particles and through macromolecules in solution. *Research.* 2:190–194.
  67. Sangani, S. A., and C. Yao. 1988. Transport processes in random arrays of cylinders. II. Viscous flow. *Phys. Fluids.* 31:2435–2444.
  68. Valegård, K., L. Liljas, K. Fridborg, and T. Unge. 1991. Structure determination of the bacteriophage MS2. *Acta Crystallogr. B.* 47:949–960.
  69. Golmohammadi, R., K. Valegård, K. Fridborg, and L. Liljas. 1993. The refined structure of bacteriophage MS2 at 2.8 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 234:620–639.
  70. Valegård, K., L. Liljas, K. Fridborg, and T. Unge. 1990. The three-dimensional structure of the bacterial virus MS2. *Nature.* 345:36–41.
  71. Kuzmanovic, D. A., I. Elashvili, C. Wick, C. O'Connell, and S. Krueger. 2003. Bacteriophage MS2: molecular weight and spatial distribution of the protein and RNA components by small-angle neutron scattering and virus counting. *Structure.* 11:1339–1348.
  72. Valegård, K., L. Liljas, K. Fridborg, and T. Unge. 1991. Structure determination of the bacteriophage MS2. *Acta Crystallogr. Sect. B-Struct. Sci.* 47:949–960.
  73. Li, H., A. D. Robertson, and J. H. Jensen. 2005. Very fast empirical prediction and rationalization of protein pKa values. *Proteins.* 61:704–721.
  74. Kyte, J., and R. Doolittle. 1982. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* 157:105–132.
  75. Acharya, P., P. Cheruku, S. Chatterjee, S. Acharya, and J. Chattopadhyaya. 2004. Measurement of nucleobase pKa values in model mononucleotides shows RNA–RNA duplexes to be more stable than DNA–DNA duplexes. *J. Am. Chem. Soc.* 126:2862–2869.
  76. Gerba, C. P. 1984. Applied and theoretical aspects of virus adsorption to surfaces. *Adv. Appl. Microbiol.* 30:133–168.
  77. Jin, Y., and M. Flury. 2002. Fate and transport of viruses in porous media. *Adv. Agron.* 77:39–102.
  78. Sobsey, M. D., and B. L. Jones. 1979. Concentration of poliovirus from tap water using positively charged microporous filters. *Appl. Environ. Microbiol.* 37:588–595.
  79. Logan, K. B., G. E. Rees, N. D. Seeley, and S. B. Primrose. 1980. Rapid concentration of bacteriophages from large volumes of freshwater: evaluation of positively charged, microporous filters. *J. Virol. Methods.* 1:87–97.
  80. Sobsey, M. D., and J. S. Glass. 1980. Poliovirus concentration from tap water with electropositive adsorbent filters. *Appl. Environ. Microbiol.* 40:201–210.
  81. Chang, L. T., S. R. Farrah, and G. Bitton. 1981. Positively charged filters for virus recovery from wastewater treatment plant effluents. *Appl. Environ. Microbiol.* 42:921–924.
  82. Raphael, R. A., S. A. Sattar, and V. S. Springthorpe. 1985. Rotavirus concentration from raw water using positively charged filters. *J. Virol. Methods.* 11:131–140.
  83. Shields, P. A., T. F. Ling, V. Tjatha, D. O. Shah, and S. R. Farrah. 1986. Comparison of positively charged membrane filters and their use in concentrating bacteriophages in water. *Water Res.* 20:145–151.
  84. Lukasik, J., T. M. Scott, D. Andryshak, and S. R. Farrah. 2000. Influence of salts on virus adsorption to microporous filters. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:2914–2920.
  85. Farrah, S. R., C. P. Gerba, C. Wallis, and J. L. Melnick. 1976. Concentration of viruses from large volumes of tap water using pleated membrane filters. *Appl. Environ. Microbiol.* 31:221–226.
  86. Sobsey, M. D., C. Wallis, M. Henderson, and J. L. Melnick. 1973. Concentration of enteroviruses from large volumes of water. *Appl. Microbiol.* 26:529–534.

87. Gerba, C. P., S. R. Farrah, S. M. Goyal, C. Wallis, and J. L. Melnick. 1978. Concentration of enteroviruses from large volumes of tap water, treated sewage, and seawater. *Appl. Environ. Microbiol.* 35:540–548.
88. Morris, R., and W. M. Waite. 1980. Evaluation of procedures for recovery of viruses from water. I. Concentration systems. *Water Res.* 14:791–793.
89. Sobsey, M. D., S. E. Oglesbee, and D. A. Wait. 1985. Evaluation of methods for concentrating hepatitis A virus from drinking water. *Appl. Environ. Microbiol.* 50:1457–1463.
90. Payment, P., A. Berube, D. Perreault, R. Armon, and M. Trudel. 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. *Can. J. Microbiol.* 35:932–935.
91. Gassilloud, B., and C. Gantzer. 2005. Adhesion-aggregation and inactivation of poliovirus 1 in groundwater stored in a hydrophobic container. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:912–920.
92. Lyklema, J., and J. F. L. Duval. 2005. Heterointeraction between Gouy-Stern double layers. Charge and potential regulation. *Adv. Colloid Interface Sci.* 114-115:27–45.
93. Lyklema, J. 1995. Electric double layers. In *Fundamentals of Interface and Colloid Science: solid-liquid interfaces*, Vol. 2. Academic Press, London. Chapter 3.
94. Langlet, J., F. Gaboriaud, J. F. L. Duval, and C. Gantzer. 2008. Electrophoresis and aggregation of F-specific bacteriophages: dependence on pH and ionic strength conditions. *Water Res.* In press.
95. Stonehouse, N. J., K. Valegård, R. Golmohammadi, S. van den Worm, C. Walton, P. G. Stockley, and L. Liljas. 1996. Crystal structures of MS2 capsids with mutations in the subunit FG loop. *J. Mol. Biol.* 256:330–339.
96. Reference deleted in proof.
97. Peabody, D. S., and K. R. Ely. 1992. Control of translational repression by protein-protein interactions. *Nucleic Acids Res.* 20:1649–1655.
98. Stockley, P. G., N. J. Stonehouse, and K. Valegård. 1994. Molecular mechanism of RNA phage morphogenesis. *Int. J. Biochem.* 26:1249–1260.

## **II. Etude des propriétés interfaciales des bactériophages ARN F-spécifiques MS2, GA, Q $\beta$ et SP**

Ayant démontré que le génome a un impact sur les propriétés interfaciales du phage MS2 à faible force ionique, il est intéressant de déterminer et de comparer les mobilités électrophorétiques de quatre phages ARN F-spécifiques. Ces phages ont une structure et un diamètre comparables mais ils ont des tailles de génome différentes ( $\sim 3500$  nucléotides pour les phages MS2 et GA ;  $\sim 4200$  nucléotides pour les phages Q $\beta$  et SP) et des séquences primaires en acides aminés différentes. La comparaison des mobilités permet de définir la charge relative des différents phages lorsque les tailles des virus et leurs perméabilités hydrodynamiques sont semblables. La balance hydrophile-hydrophobe relative des quatre phages peut être définie par leur propension à s'agréger en fonction de la force ionique. Ainsi, dans cet article, des mesures de taille combinées à des mesures de mobilités électrophorétiques ont été réalisées sur quatre phages ARN F-spécifiques. Les mesures ont été faites sur une gamme de valeurs de pH de 1,5 à 7,5 et pour deux forces ioniques de NaNO<sub>3</sub>, 1 et 100 mM.

La figure 24 montre que pour des pH de 6-7 à 100 mM, les mobilités des phages ne diffèrent pas. Cette observation confirme les précédents résultats qui montraient que la contribution de la charge négative du génome devenait négligeable à forte force ionique. Par contre, à 1 mM, les mobilités de Q $\beta$  sont plus négatives que celles de MS2. A faible force ionique, nous avons montré que le génome contribuait significativement à la charge du phage et cette différence de mobilité entre MS2 et Q $\beta$  peut s'expliquer par le génome de Q $\beta$  plus long que celui de MS2. Par contre, ceci ne s'applique pas aux phages GA et SP qui semblent avoir un comportement différent. En fait, il sera démontré par la suite que GA et SP sont sous forme agrégée contrairement à MS2 et Q $\beta$ . Dans ces conditions, les mobilités ( $\mu$ ) ne peuvent pas être comparées.

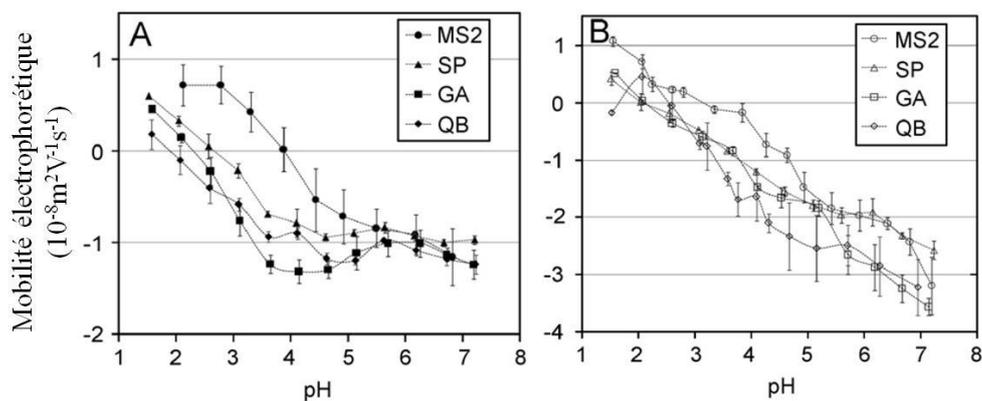
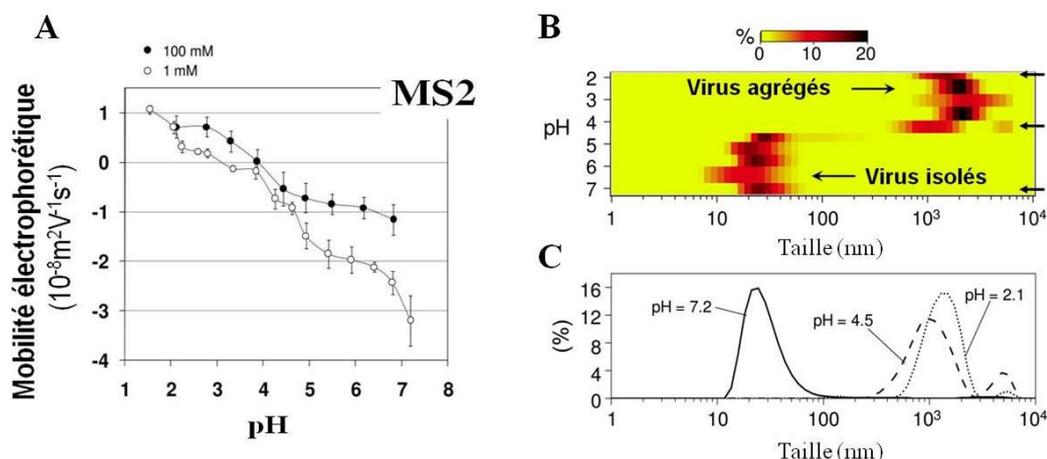


Figure 24 : Comparaison des mobilités électrophorétiques des phages MS2, GA, QB et SP en fonction du pH à deux forces ioniques de  $\text{NaNO}_3$ , 100 mM (A) et 1 mM (B).

Les mesures de mobilités en fonction du pH aux deux forces ioniques ont également permis de déterminer les  $pI$  (pH pour  $\mu = 0$ ) pour les quatre phages. Les  $pI$  mesurés varient en fonction de la force ionique et du phage considéré, suggérant des propriétés chimiques et électrostatiques différentes pour chaque phage. Nos résultats confirment les valeurs de  $pI$  relatés dans la littérature pour le phage MS2 (3,9) mais infirment celui de QB (1,9 *versus* 5,3). Pour les phages GA et SP, nous rapportons pour la première fois la valeur de leur  $pI$  (2,3 pour GA et 2,6 pour SP à 100 mM). Néanmoins, il faut souligner que pour ces deux phages, seuls des agrégats sont mesurés dans la suspension virale.

De même, en mettant en parallèle les profils électrocinétiques de MS2 et l'état d'agrégation de MS2 (figure 25) en fonction du pH, on voit clairement que les mobilités mesurées à des  $\text{pH} < pI$  correspondent aux virus agrégés et non à des virus isolés. Ceci a pour conséquence un comportement non idéal de  $\mu$  dans cette gamme de pH. En effet, les  $pI$  varient en fonction de la force ionique et les  $\mu$  mesurées à 100 mM sont supérieures aux  $\mu$  à 1 mM.

Ce comportement non idéal est très probablement dû aux propriétés hydrodynamiques qui diffèrent entre un virus isolé et un agrégat. Cette différence de perméabilité influence directement la valeur des  $\mu$  mesurées.



**Figure 25 : A. Evolution des mobilités électrophorétiques en fonction du pH pour deux forces ioniques ( $\text{NaNO}_3$  1 mM ou 100 mM) dans le cas du bacteriophage MS2.**

**B. Distribution en taille (pourcentage en volume) des phages MS2 en fonction du pH pour une force ionique  $\text{NaNO}_3$  1 mM.**

**C. Trois profils de distribution qui correspondent aux flèches indiquées dans le panel B sont représentés.**

Nos mesures ont pu montrer des profils d'agrégation différents en fonction du phage et des conditions physicochimiques. Le phage MS2 reste isolé pour des  $\text{pH} > 4,5$  que ce soit à faible ou forte force ionique. Par contre, lorsque le milieu devient plus acide, des agrégats micrométriques sont observés. Le phage Q $\beta$  quant à lui, présente un comportement similaire à celui de MS2 pour une faible force ionique en s'agrégeant à  $\text{pH}$  acide. A l'inverse de MS2, Q $\beta$  s'agrége à forte force ionique dès que le  $\text{pH}$  est inférieur à 6. Enfin, GA et SP sont agrégés quelles que soient les conditions de  $\text{pH}$  et de force ionique. Dans ces conditions, la comparaison de leurs mobilités n'est pas possible. Cette différence de comportement suggère une balance hydrophile-hydrophobe différente pour chaque phage avec une séquence d'hydrophobicité du type : GA~SP > Q $\beta$  > MS2.

En conclusion, ces résultats soulignent des propriétés interfaciales différentes entre le phage MS2 et le phage Q $\beta$ . Ce dernier est plus hydrophobe et plus chargé que le premier. SP et GA sont toujours sous forme agrégée traduisant des forces attractives importantes entre les particules virales. La connaissance de l'état d'agrégation des virus et de leurs propriétés électrostatiques et hydrophobes est essentielle pour appréhender leur élimination par une membrane de filtration, souvent hydrophile et chargée négativement, utilisée dans le cadre du traitement des eaux. En effet, pour évaluer l'élimination virale par filtration membranaire, il faut déterminer des conditions les plus défavorables pour éviter une sous-estimation de l'abattement viral. Ceci correspond à des conditions où l'agrégation est minimale et la charge négative maximale. Nos résultats montrent que l'utilisation des phages MS2 et Q $\beta$  à faible force ionique et à  $\text{pH}$  neutre remplit ces conditions.



ELSEVIER

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



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



## Aggregation and surface properties of F-specific RNA phages: Implication for membrane filtration processes

Jérémie Langlet<sup>a,b</sup>, Fabien Gaboriaud<sup>a,c</sup>, Jérôme F.L. Duval<sup>d</sup>, Christophe Gantzer<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup>Laboratory of Physical Chemistry and Microbiology for the Environment, Nancy University, CNRS

<sup>b</sup>Faculty of Pharmacy, 5 rue Albert Lebrun, 54000 Nancy, France

<sup>c</sup>405 rue de Vandoeuvre, F-54600 Villers-lès-Nancy, France

<sup>d</sup>Laboratory of Environment and Mineral Processing, Nancy University, CNRS, 15 avenue du Charmois, B.P. 40, 54501 Vandoeuvre-lès-Nancy Cedex, France

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 23 November 2007

Received in revised form

5 February 2008

Accepted 6 February 2008

Available online 17 February 2008

#### Keywords:

Isoelectric point

Aggregation

Surface properties

Bacteriophages

Membrane

### ABSTRACT

We report an experimental investigation of the electrokinetic properties and size variations of four F-specific bacteriophages of the types MS2, GA, Q $\beta$  and SP (21–30 nm in diameter) over a broad range of pH values (1.5–7.5) and NaNO<sub>3</sub> electrolyte concentrations (1–100 mM). The results obtained by dynamic light scattering show that the aggregation of SP and GA particles takes place over the whole range of pH and ionic strength conditions examined. For MS2 phages, the aggregation of MS2 particles is not observed for pH higher than the isoelectric point (pI) and large ionic strengths for which interparticular repulsive electrostatic interactions are however expected to be sufficiently screened. Aggregation of the MS2 phages, dispersed in 1 and 100 mM electrolyte concentration, occurs at pH 4, which basically corresponds to the pI as determined by electrophoresis measurements. The Q $\beta$  particles suspended in solutions of low electrolyte concentrations aggregate at low pH values (pI $\sim$ 3) and, unlike MS2, at large ionic strengths over the whole range of pH conditions considered in this study. These elements allow the determination of the hydrophobic sequence for the four phages SP $\sim$ GA $\sim$ Q $\beta$  $\sim$ MS2. Close inspection of the electrokinetic results reveals small to significant variations of the pI values—depending on the phage considered—with respect to the concentration of indifferent NaNO<sub>3</sub> electrolyte. This indicates that features other than chemical and electrostatic in nature play a key role in determining the pI and more generally the electrophoretic mobility  $\mu$  of viral particles. A qualitative interpretation is given and is based on the consideration of inner electro-osmotic flow within the isolated or aggregated particles. The impact of the flow properties within the particles is further in agreement with recent theoretical formalism developed for the electrokinetics of soft multiplayer particles, the phages analyzed here being some illustrative examples. The determination and qualitative interpretation of the surface properties of the viral particles as reported in the current study are commented within the context of water treatment especially concerning viral removal by membrane filtration processes.

© 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

\*Corresponding author at: Laboratory of Physical Chemistry and Microbiology for the Environment, Nancy University, CNRS.

Tel.: +33 3 83 68 22 91; fax: +33 3 83 68 23 01.

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

Abbreviations: PFU, plaque forming unit; pI, isoelectric point;  $\mu$ , electrophoretic mobility; D, diffusion coefficient; DLS, dynamic light scattering.

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

doi:10.1016/j.watres.2008.02.007

## 1. Introduction

F-specific RNA bacteriophages belong to the *Leviviridae* family. Four genogroups are defined according to their serological cross-reactivity (Vinje et al., 2004), replicase template activity (Miyake et al., 1971) and are further distinguished on the basis of phylogenetic analysis (Bollback and Huelsenbeck, 2001). The genus *Levivirus* contains the MS2-like (genogroup I) and GA-like (genogroup II) phage, whereas the genus *Allolevivirus* encompasses the Q $\beta$ -like (genogroup III) and SP-like (genogroup IV) phages. All of them are naked RNA viruses surrounded by a proteic capsid of similar size (21–30 nm) as described previously (Valegård et al., 1990, 1991, 1994; Golmohammadi et al., 1993, 1996; Tars et al., 1997), but with different length of genome as summarized in Table 1. Such phages, especially MS2 phages, are widely used as surrogates to evaluate the efficiency of various barrier materials that include membranes used in water treatment processes (Jacangelo et al., 1997; Herath et al., 1999; Hu et al., 2003). This choice is mainly motivated by the small size of the viral particles and their structure which is comparable to that of human pathogenic viruses. Such simplistic procedure to estimate the retention quality of a given membrane has proven to be useful but shortcomings should be underlined (Lytle et al., 1991; Lytle and Routson, 1995). When using a viral suspension of high concentration in batch conditions, aggregation may take place for given sets of physico-chemical compositions of the aqueous medium (Floyd and Sharp, 1977, 1978a, b, 1979; Floyd, 1979; Herath et al., 1999; Zoueva et al., 2002; Rafikova et al., 2003; Gassilloud and Gantzer, 2005; Langlet et al., 2007, 2008). The increase in size largely improves viral elimination and leads therefore to an overestimation of the viral retention capacity of the barrier material. Decreasing the pH of the solution is known to favor aggregation of viral suspension (Floyd and Sharp, 1978a, b, 1979; Zoueva et al., 2002; Langlet et al., 2007, 2008) but accurate measurements in terms of size are not available. Commonly, the absence of aggregation is taken for granted in media with pH well above the pI (Gerba, 1984) but generalization to all types of viruses has never been demonstrated and should necessarily be questioned in view of the discrepancies in the spectrum of surface properties exhibited by viral particles.

Another shortcoming in the classical evaluation of the retention quality of barrier materials (evaluation essentially based on steric or size considerations) is the difficulty to characterize the adhesion capacity of the barrier material considered, which may be more rate-limiting in certain cases than the pore size. The surface properties of the different partners involved in the filtration process (virus and membrane or barrier material) play a crucial role in the immobilization of the virus particles. Indeed, the ability of viral particles to adhere onto the membrane is for a large part determined by their physico-chemical properties, e.g., their electrostatic surface charge and their degree of hydrophobicity. In some studies, the surface properties of viral particles were indirectly inferred from the qualitative analysis of adhesion experiments onto well-defined surfaces (Sobsey et al., 1973; Farrah et al., 1976; Gerba et al., 1978; Sobsey and Jones, 1979; Logan et al., 1980; Morris and Waite, 1980; Sobsey and Glass, 1980; Chang et al., 1981; Shields et al., 1986; Payment et al., 1989; Lytle and Routson, 1995; van Voorthuizen et al., 2001; Shields and Farrah, 2002). The knowledge of the electric properties related to the viral surfaces is also obtained from the basic measurement of the isoelectric point (pI) by electrokinetics, that is the pH value at which the electrophoretic mobility of the particle equates zero. It is usually admitted that viruses are negatively charged above their pI. In contrast to bacterial systems, very few studies have been carried out to quantify the electrokinetic features of bacteriophages at different pH values and ionic strength levels. In some analyses the pI of MS2 was estimated in the range 3.5–3.9 (Overby et al., 1966; Zerdá and Gerba, 1984; Penrod et al., 1995) and that of Q $\beta$  around 5.3 (Overby et al., 1966). The accuracy of the pI value of Q $\beta$  may be questionable in view of the low number of experimental measurements reported by the authors (the pI is extrapolated from the mobility–pH curves that contain only a few points and for only one ionic strength) and the use of radiolabeling agents that may in the end alter the virus surface as compared to its native state. Besides, electrokinetic measurements (and pI values) may be influenced by the aggregation state of the viral suspension that possibly comes into play when changing the pH and ionic strength conditions. Despite all those uncertainties, the pI values reported for MS2 and Q $\beta$  bacteriophages remain largely quoted in the literature to predict qualitatively the conditions

**Table 1 – Classification and some properties (number of nucleotides and size) of the F-specific RNA bacteriophages MS2, GA, Q $\beta$  and SP**

Bacteriophages	Genus (genogroup)	Genome (nt)	Genbank accession number	Size (nm)
MS2	<i>Levivirus</i> (I)	3569	NC_001417	22.4–28.8 <sup>a</sup>
GA	<i>Levivirus</i> (II)	3466	NC_001426	22.7–28.9 <sup>b</sup>
Q $\beta$	<i>Allolevivirus</i> (III)	4217	AY099114	21.3–29.4 <sup>c</sup>
SP	<i>Allolevivirus</i> (IV)	4276	X07489	ND

ND: not determined.

<sup>a</sup> From the data of Valegård et al. (1986, 1990, 1991) and Golmohammadi et al. (1993).

<sup>b</sup> From the data of Ni et al. (1996).

<sup>c</sup> From the data of Valegård et al. (1994) and Golmohammadi et al. (1996).

under which phages adhesion and aggregation processes take place (Herath et al., 1999; Sakoda et al., 1997).

Scrupulous measuring and understanding of the surface properties of viruses are the mandatory prerequisites for tackling quantitatively the effect of nonspecific surface interactions (electrostatic, van der Waals, hydrophobic) between bacteriophage and membranes. Moreover, recent studies indicate the precautions to be taken in the interpretation of electrokinetic measurements for bioparticles. Duval and Ohshima (2006) underline that electrophoretic mobilities of bioparticles are not only influenced by the charge density but also by the particular hydrodynamic permeability (or equivalent Darcy number), particles aggregation and/or structural anisotropy. In relation to this, the quantitative interpretation of the electrophoretic mobilities of bioparticles requires beforehand a careful evaluation of the dispersion state or stability of the dispersion of bioparticles to ensure that the measured electrokinetic properties pertain to isolated particles and not aggregates.

In view of the preceding elements, we report in the current manuscript the surface properties of MS2, GA, Q $\beta$  and SP phages as evaluated by electrophoretic mobility measurements and dynamic light scattering (DLS) over a large range of ionic strengths (1 and 100 mM NaNO<sub>3</sub>) and pH conditions (range pH 1.5–7.5). A qualitative analysis of the electrokinetic and size data allows a clear and unambiguous identification of the physico-chemical conditions where viral aggregation processes occur. As such, a critical discussion of the physical meaning of the  $\mu$  is given and some consequences for virus removal by filtration processes are further commented.

## 2. Materials and methods

### 2.1. F-specific RNA bacteriophages

Four representative F-specific RNA bacteriophage strains, MS2, GA, Q $\beta$  and SP, belonging to the genogroup I (GI), GII, GIII and GIV respectively, were selected. Some of their properties (size as determined by crystallographic analyses and number of nucleotides in the genome) are summarized in Table 1. MS2 phages were obtained from culture collection (ATCC 15597-B1). The bacteriophages GA and Q $\beta$  were kindly provided by J. Jofre (Barcelona University, Spain) and SP by Y. Inokuchi (Tokyo University, Japan).

The bacteriophage strains MS2, GA, Q $\beta$  and SP were replicated according to standard procedure (ISO 10705-1, 1995) without the CHCl<sub>3</sub> lysis step and using *E. coli* Hfr K12 (ATCC 23631) as bacterial host. After replication, the viral suspensions were centrifuged (Beckman, model J2-22, 27,000g, 60 min, 4 °C) and the supernatant filtered through a 0.22  $\mu$ m membrane (Millipore, SLGP033RS). All suspensions were first dialyzed (100 kDa MWCO, Spectrum, 131420) against deionized water (0.1  $\mu$ S cm<sup>-1</sup>) for 14 h, and then dialyzed for a second time against NaNO<sub>3</sub>, 1 mM (150  $\mu$ S cm<sup>-1</sup>), pH 6.7, for 14 h. Finally, the resulting suspensions were filtered (0.22  $\mu$ m). The final viral concentrations were about 10<sup>11</sup> plaque forming units (PFU)/ml and the suspensions were stored as stock suspension at 4 °C prior to any experiment.

### 2.2. Size and electrophoretic mobility measurements

Electrophoretic mobilities were measured at 23 ± 0.1 °C using the Zetasizer Nano ZS instrument (He–Ne red laser (633 nm)-Malvern Instruments). The apparatus is equipped with an automatic laser attenuator and an avalanche photodiode detector. The position of the latter is located 173° relative to the laser source so that backscattering detection is ensured. Experiments were driven by the Dispersion Technology Software provided by Malvern Instruments. Electrophoretic mobilities were determined by laser Doppler electrophoresis also known as phase analysis light scattering. The rate of change of the phase shift between the scattered light and a reference beam is correlated to the particle velocity and thus allows for evaluating the particular electrophoretic mobility. To avoid electro-osmosis and denaturation of the protein constituting the viral capsid by the applied electric field, fast field reversal was used.

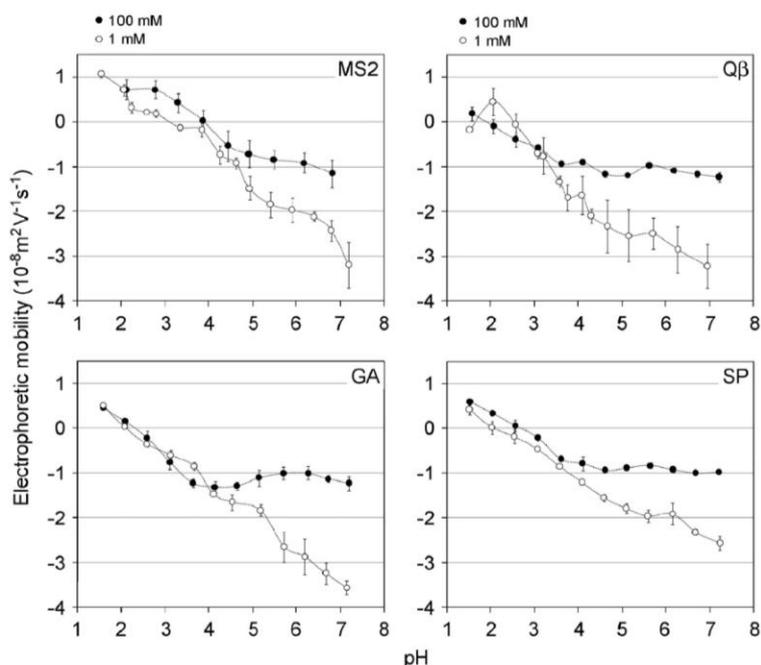
The size distribution of the viral suspensions under investigation was determined using DLS also incorporated in the ZetaSizer instrument mentioned above. DLS allows the measurement of the Brownian motion of the particles, that is, the time dependence of the intensity fluctuations. The respective diffusion coefficients (*D*) of the different population within a polydisperse sample can be extracted from appropriate fitting (convolution of exponential decays) of the autocorrelation function. As a first approximation, the diffusion coefficient can be converted to the size of the particle using the Stokes–Einstein equation.

The sensitivity of the apparatus requires high viral suspension concentrations (up to 10<sup>9</sup> PFU/ml). To reach these, 8 ml of the initial viral suspensions in NaNO<sub>3</sub> (10<sup>11</sup> PFU/ml) were filtered (0.22  $\mu$ m) prior to size and electrophoretic mobility measurements and then poured in a polypropylene tube (Sarstedt, 60.9922.241) directly screwed into a PC monitored titrator connected to the Zetasizer NanoZS instrument. The 100 mM NaNO<sub>3</sub> viral suspensions were obtained by adding aliquots of NaNO<sub>3</sub> 3 M in the initially filtered (0.22  $\mu$ m) 1 mM viral suspensions. The investigation of the effect of pH on the size and on the electrophoretic mobility of the viruses was allowed using the Autotitrator MPT-2 (Malvern, UK). This titrator enables electrophoretic mobilities and size measurements for various volume increments of HCl 0.1 M and NaOH 0.1 M (filtered through 0.22  $\mu$ m) added to the sample. For each condition, size and electrophoretic measurements are realized three or four times.

## 3. Results

### 3.1. Electrophoretic mobility measurements

Electrophoretic mobilities of MS2 phages are reported in Fig. 1 for two NaNO<sub>3</sub> ionic strengths (1 and 100 mM NaNO<sub>3</sub>) as a function of pH. For pH values larger than about 4, all measured electrophoretic mobilities (denoted as  $\mu$ ) are negative. At pH ~ 7 and for 1 mM ionic strength, the mean value for  $\mu$  is about  $-3.2 \times 10^{-8} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$  and decreases (in magnitude) to  $-1.16 \times 10^{-8} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$  for 100 mM ionic strength. The difference in  $\mu$  as observed for the two ionic



**Fig. 1** – Electrophoretic mobilities of the various F-specific RNA bacteriophages investigated in this study as a function of pH for two  $\text{NaNO}_3$  electrolyte concentrations, 1 mM ( $\circ$ ) and 100 mM ( $\bullet$ ). The dotted lines are only eye guides. Measurements were done in triplicate.

strengths considered here decreases upon decrease of the pH value. The pH for which the electrophoretic mobility reaches the zero value corresponds to the  $pI$ . For pH below  $pI$ , electrophoretic mobility values measured at 100 mM are larger in magnitude than those obtained at 1 mM and a significant change in  $pI$  is further observed upon varying the electrolyte concentration in solution. For the MS2 phage, the  $pI$  value increases from  $3.1 \pm 0.1$  at 1 mM to  $3.9 \pm 0.3$  at 100 mM. The aforementioned dependences of  $\mu$  on the solution pH and ionic strength are essentially similar to those determined for the others phages GA, Q $\beta$  and SP (Fig. 1). The  $pI$  values for each bacteriophage are presented in Table 2 for 1 and 100 mM  $\text{NaNO}_3$ . For all viral strains examined except Q $\beta$ , the  $pI$  values at 100 mM are systematically larger than those determined at low ionic strength with a difference which is more or less pronounced depending on the type of bacteriophage considered.

For the sake of comparison, we report in Fig. 2A the mobility data at 100 mM for the four phages as a function of pH. For pH values between 5 and 7, all strains exhibit very similar electrokinetic features with a mobility which is quasi independent of the solution pH (plateau value  $-1.16 \times 10^{-8} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ). For lower pH, significant differences may be observed in particular with respect to the  $pI$  location whereas the differential variation of  $\mu$  with pH (that is the slope  $d\mu/dpH$ ) remains practically identical within experimental error. At 1 mM (Fig. 2B) and large pH values, the electrophoretic mobilities of MS2 and SP are essentially similar and somewhat lower in magnitude than those for GA and Q $\beta$ . Upon decreasing the pH, the decrease of  $\mu$  (in magnitude) for MS2 is

**Table 2** – Isoelectric point ( $pI$ ) of F-specific RNA bacteriophages as obtained by electrokinetic measurements at  $\text{NaNO}_3$  1 and 100 mM

Genogroups	$pI$ for 1 mM ionic strength	$pI$ for 100 mM ionic strength
MS2 (genogroup I)	$3.1 \pm 0.1$	$3.9 \pm 0.3$
GA (genogroup II)	$2.1 \pm 0.1$	$2.3 \pm 0.1$
Q $\beta$ (genogroup III)	$2.7 \pm 0.1$	$1.9 \pm 0.3$
SP (genogroup IV)	$2.1 \pm 0.3$	$2.6 \pm 0.1$

the most pronounced as compared to that for the three other viral strains.

### 3.2. Size analysis

Fig. 3 displays the diffusion coefficients, denoted as  $D$ , for the four phages under the same pH and ionic strength conditions as in the electrokinetic experiments. On the basis of the Stokes–Einstein equation, decreasing values of  $D$  at fixed ionic strength upon decreasing the pH solution reflects an increase in size of the particles investigated. As a general comment, results show that aggregation for the viral particles MS2, Q $\beta$ , GA and SP occurs when decreasing the pH solution and the pH range where such aggregation takes place is different for the four strains. For MS2 phage (Fig. 3), the aggregation does not depend much on the ionic strength but seems to be rather determined by the pH solution only. At neutral pH, mean  $D$

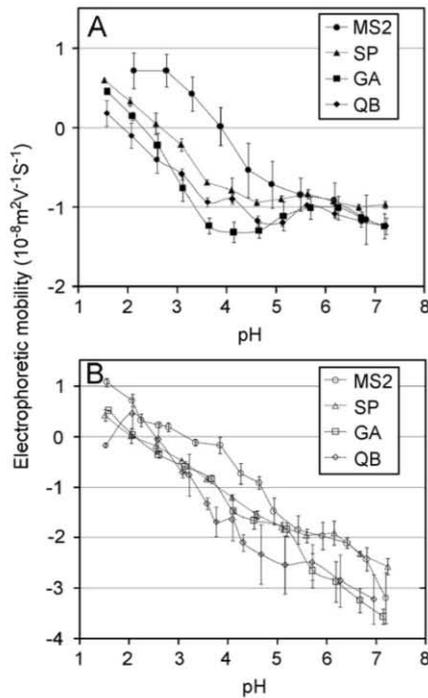


Fig. 2 – Comparison of the electrophoretic mobility–pH curves for the various F-specific bacteriophages at (A) 100 mM and (B) 1 mM NaNO<sub>3</sub> electrolyte concentrations. The experimental points correspond to the same data as in Fig. 1. The dotted lines are only eye guides.

value is around  $9\mu\text{m}^2/\text{s}$  for 1 mM and for 100 mM mean  $D$  value is about  $5.4\mu\text{m}^2/\text{s}$  meaning that the majority of viral population is under an isolated form. This justifies the preparation procedure of the viral suspensions at such pH values by filtration processes to avoid the presence of aggregates (see Section 2.1). For pH values lower than  $pI$ , mean  $D$  value is  $\sim 0.3\mu\text{m}^2/\text{s}$  corresponding to aggregates of which the diameter lies in the micrometer range.

Unlike the MS2 phages, the Q $\beta$  phages have the propensity to aggregate either by decreasing the pH or increasing the ionic strength. At 100 mM, particles are aggregated over the whole range of pH examined (Fig. 3) while at 1 mM the Q $\beta$  phages may be considered as nonaggregated at neutral pH with a gradual decay of the mean value of  $D$  by lowering the pH. For  $\text{pH} < 3$ , the aggregation state for the Q $\beta$  phage is maximal. For the GA and SP phages, the mean  $D$  value indicates that at ionic strength levels of 1 and 100 mM, aggregation takes place over the whole range of pH values (micrometer-sized particles) (Fig. 3).

To go further, the size distribution generated by DLS that is expressed in terms of the distribution of scattered intensity can be converted into a volume distribution (assuming a spherical model for the virus) using Mie theory and size distribution can thus be plotted. We did so for the case of MS2 phages (Fig. 4) and GA, Q $\beta$  and SP phages (data not shown). Fig. 4 explicitly shows the abrupt variation of the MS2 phage size when decreasing the solution pH. Basically, the viral particles may be considered as isolated (not aggregated) in the pH range  $4.5 < \text{pH} < 7$ , whereas viral aggregates are

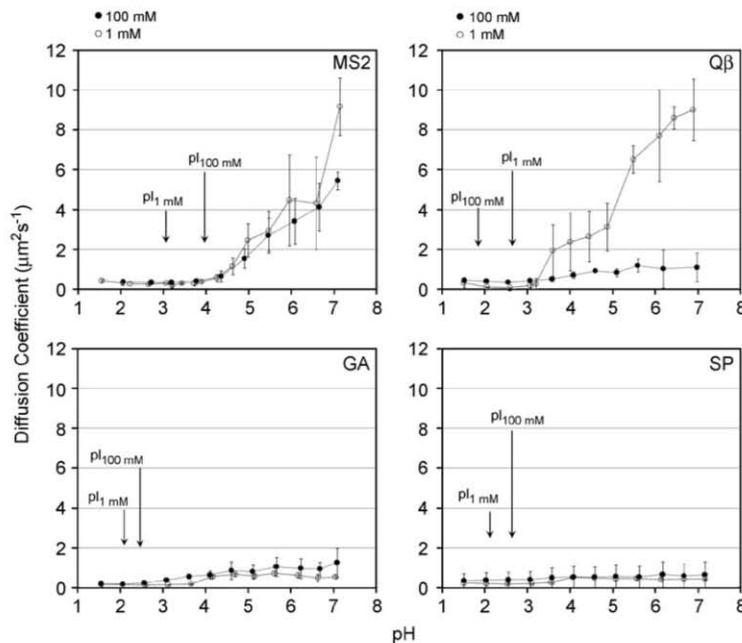
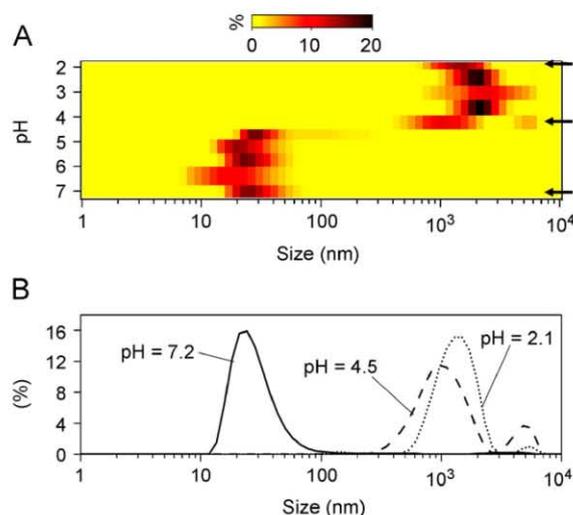


Fig. 3 – Mean diffusion coefficient values ( $D$ ) of the various F-specific RNA bacteriophages as a function of pH for two NaNO<sub>3</sub> electrolyte concentrations, 1 mM (○) and 100 mM (●). The isoelectric points determined by electrokinetic measurements (Fig. 1, Table 2) are indicated. The dotted lines are only eye guides.



**Fig. 4 – Size (x-axis) distributions as a function of pH for the MS2 bacteriophage at 1 mM NaNO<sub>3</sub> electrolyte concentration. Percentage given in (A) and (B) corresponds to volume distribution. (A) Map of the distribution, (B) typical profiles corresponding to the arrows indicated in (A).**

predominant for  $\text{pH} \leq 4.5$ . For GA and SP phages, the same type of size representation shows that aggregation occurs whatever the pH and ionic strength conditions. For Q $\beta$  phages, the volume distribution indicates a heterogeneous population for pH values between 3.5 and 6.5—whatever the ionic strength—where aggregates and individual viral particles are concomitantly present. For pH above 6.5 only individual particles were measured at 1 mM ionic strength. For pH below 4 only aggregates were detected at 1 and 100 mM electrolyte concentrations, in agreement with results depicted in Fig. 3.

#### 4. Discussion

The behavior of viral particles in aqueous media in terms of interactions with barrier material or aggregation is for a large part governed by their surface properties. Nevertheless, aggregation under natural conditions (surface waters, groundwater) where viruses are present in very low densities, may have limited importance—as compared to virus adsorption to the membranes—since the probability of encounter of viral particles is likely to be small. A careful measuring of the electrophoretic mobility and size of some F-specific RNA bacteriophages surface was therefore undertaken in this study. To our knowledge, the only physico-chemical parameter used in the literature so far by the virology community to estimate the charge—or at least its sign—carried by viral particles is the so-called  $pI$ . This value is essentially determined by electrophoretic mobility ( $\mu$ ) measurements making the approximation that such mobilities only depend on the surface charge of the viral particle of interest. It is then considered that for  $\text{pH} > pI$ , viruses express a negative charge

and for  $\text{pH} < pI$  the sign of this charge is reversed (Gerba, 1984). Such knowledge is commonly used to concentrate suspension of viruses from water by adhesion–elution methods. Viral adhesion onto positively charged support is obtained at neutral pH (Sobsey and Jones, 1979; Logan et al., 1980; Sobsey and Glass, 1980; Chang et al., 1981; Raphael et al., 1985; Shields et al., 1986; Lukasik et al., 2000) whereas the use of viral particles suspended in acid solutions leads to adsorption onto negatively charged support (Sobsey et al., 1973, 1985; Farrah et al., 1976; Gerba et al., 1978; Morris and Waite, 1980; Payment et al., 1989). On the basis of such reasoning, the MS2 phage is currently proposed by the community as a viral model for evaluating virus removal by filtration on membrane (usually negatively charged) during water treatment processes. Because of its small size (22–29 nm) and low  $pI$  (3.5–3.9), it represents the worst case for elimination in filtration membrane processes. At neutral pH such viral particles express a highly negative charge, which makes adhesion onto the membrane low and minimizes the likelihood of aggregation as a result of significant repulsive electrostatic interactions (Gerba, 1984).

Concerning the electrokinetic measurements, our results as obtained over a large range of pH and ionic strength conditions, confirm the  $pI$  knowledge so far acquired on MS2 phage. MS2 phage is in isolated form at neutral pH over the range of ionic strength conditions examined. Its  $pI$  is about 3.9 at 100 mM NaNO<sub>3</sub> ionic strength. For such pH value, it expresses a negative electrophoretic mobility which decreases in magnitude when decreasing pH or increasing the ionic strength. Sign changes around  $\text{pH} = pI$ . Regarding the impact of the pH on the mobility, it is in line with the protonation of negatively charged ionizable sites located at the viral particle surface. Also, the effect of ionic strength on the mobility for  $\text{pH} > pI$  corresponds to classical double layer theory expectations: the ions present in solution screen the charges carried by the viral particle, with as a result a decrease in magnitude of the local interfacial potential distribution and thus of the electrophoretic mobility. This relation between charge expression of the viruses or membrane and the ionic strength of the solution is generally used to control adhesion–elution process. In this way, Zhuang and Jin (2003) observed that adhesion of viral particles onto aluminum-oxide-coated sand (positively charged) decreased with increasing salt from 0.002 to 0.16 M. This is the direct consequence of the screening of the electrostatic interactions between the sand surface and the viral particles. Shields and Farrah (2002) and Lukasik et al. (2000) described similar results for the adhesion of MS2 phage onto positively charged membranes. On the contrary, the respective positioning of the mobility versus pH curves at the two ionic strengths 1 and 100 mM for pH below  $pI$  (see Fig. 1) does not follow the predictions from classical double layer theory for isolated particles. This mismatching can be the result of the presence of aggregated viral particles. We shall come back to that point later.

The results reported in this study provide new knowledge on other types of phages, especially on the GA and SP virus strains for which the  $pI$  values (2.3 and 2.6 at 100 mM, respectively) have, to the best of our knowledge, never been reported so far. With respect to Q $\beta$ , a  $pI$  of 5.3 is given in the

experimental work by Overby et al. (1966). The value obtained in the current study is significantly lower ( $pI = 1.9$  for 100 mM ionic strength). The discrepancies between this value and the ones previously reported may be explained as follows. Overby et al. (1966) have determined the  $pI$  of radiolabeled  $Q\beta$  phages on the basis of electrophoretic mobilities measured for two pH values only, with as a result a significant inaccuracy in the extrapolated pH value where the condition  $\mu = 0$  holds. In determining the surface properties of phages from raw electrokinetic data, Schaldach et al. (2006) compute the  $pI$  of  $Q\beta$  phage being at 5.0. Their analysis however disregards entirely the flow permeation properties of the viral particles which exhibit pores (Golmohammadi et al., 1996) or the possibility of surface conduction, both aspects being however critical in accounting at the right level of correctness of the electrokinetic features of soft particles such as those of the phages under interest (Ohshima, 1995; Hill, 2004; Lopez-Garcia et al., 2003; Dague et al., 2006; Dukhin et al., 2006). In addition, the analysis by Schaldach et al. (2006) completely overlooks the occurrence of aggregation processes and thus disregards the effect of size growth and aggregate structure on the electrokinetic properties of the viruses examined.

According to classical double layer models, the  $pI$  of isolated particles is expected to depend on the electrolyte concentration only if specific ion adsorption takes place (Lyklema, 1995). In the current study, the  $pI$  is actually defined not for an isolated virus but for aggregates as shown by the size measurements. If the surface chemistry of aggregated particles remains basically the same as that for isolated viruses, then in the absence of specific ion adsorption (as is the case for the  $NaNO_3$  electrolyte known to be indifferent) no shift of the  $pI$  with electrolyte concentration should be observed. This indicates that features other than chemical and electrostatic in nature play a key role in determining the  $pI$  and more generally the mobility  $\mu$ . The missing element is the consideration of the hydrodynamics. The propensity of hydrodynamic flow to penetrate into a viral particle while the latter migrates, determines the type of charge (inner RNA part and/or coat protein) that is effectively probed by electrophoresis (Langlet et al., 2008). Doing so, it controls for a part the pH condition where the mobility is zero. Because of the variations in particle structure and organization (increase of the number of aggregated particles) with decreasing the solution pH and increasing the ionic strength (modulation of the interparticular repulsive forces), the flow field patterns around and within the particles to be investigated significantly change with a possible variation of the  $pI$  value as compared to that expected for isolated particles.

Concerning size measurements, our results show that pH far from  $pI$  is not a sufficient condition to consider a homogenous isolated viral suspension. In fact, MS2 phage aggregation occurs only by decreasing pH whatever the ionic strength is.  $Q\beta$  aggregation occurs when pH decreases but also by increasing ionic strength. Finally, SP and GA phages are aggregated over the whole range of pH–ionic strength conditions investigated here. The colloidal stability of suspensions depends at least on three parameters: nature of the virus, pH and ionic strength. In addition, the mobility  $\mu$  at pH 7 for aggregated SP and GA phages cannot be adequately compared to that measured in the same condition for isolated

MS2 or  $Q\beta$  phages in terms of differences in charge density. At 1 mM and around pH 7, MS2 and  $Q\beta$  strains may be considered as isolated (absence of aggregation). Under these conditions, the  $|\mu|$  for  $Q\beta$  is somewhat larger than that for MS2. This is probably explained by a larger volume charge density carried by  $Q\beta$  (it is recalled that MS2 and  $Q\beta$  have similar sizes under the conditions discussed here), which is in agreement with the larger number of RNA nucleotides (4217 nucleotides) as compared to that for the MS2 phage (3569 nucleotides) (see Table 1). Some studies have already suggested that the presence of the negatively charged nucleic acid (RNA) for MS2 and  $Q\beta$  influences surface charge of the phages (Schaldach et al., 2006) and thus their electrophoretic mobilities due to the flow penetration. Because of the larger volume charge density (in magnitude) of  $Q\beta$  as compared to that of MS2, it is likely that the repulsive interparticular electrostatic forces are more important for  $Q\beta$  than for MS2. However, an increase of the ionic strength from 1 to 100 mM at pH 7 is sufficient to provoke aggregation for  $Q\beta$  whereas MS2 particles do not aggregate at 100 mM. This could possibly indicate that the degree of hydrophobicity for the  $Q\beta$  phage is larger than that for MS2, thus resulting in stronger attractive forces between particles at a given ionic strength level. By the same token, SP and GA seem to express the highest degree of hydrophobicity in comparison with the  $Q\beta$  and MS2 phages in view of their aggregated state for all pH and ionic strength conditions examined here. These elements allow the determination of the hydrophobic sequence for the four phages  $SP \sim GA > Q\beta > MS2$ . As pointed out in previous works (Lytle and Routson, 1995; van Voorthuizen et al., 2001), hydrophobic interactions play an important role in governing the adhesion of MS2 phages on porous filtration media. The adhesion to membranes via hydrophobic bindings was observed at sufficiently large ionic strengths (4M NaCl), that is under physico-chemical conditions where electrostatic repulsion forces virus/membrane are practically nil (Shields and Farrah, 2002). Our data show that such attractive interactions must necessarily be cautiously considered in evaluating the colloidal stability of viral particles even when suspended in low electrolyte concentration solution, that is, when the repulsive energy barrier is expected to be significant.

The mechanism of removal by filtration processes depends on the physico-chemical features of the microorganism being filtered, the characteristics of the membrane (pore size, charge) and the chemistry of the solution where the microorganisms are present (Jacangelo et al., 1995; Madaeni et al., 1995). To evaluate the removal of microorganisms by a variety of microfiltration and ultrafiltration membranes and to understand at a molecular scale the mechanisms of removal, worst-case conditions are used where virus penetration through the membrane is promoted (Jacangelo et al., 1995). This implies a low viral aggregation state so as to minimize the removal by simple size exclusion (Herath et al., 1999) which would, if present significantly, lead to overestimating the efficiency of virus filtration. Van Voorthuizen et al. (2001) supposed that high MS2 phages retention on 0.22  $\mu m$  membranes at pH 3.9 could be due to aggregation. Our results confirm this observation since micrometric aggregates were observed in similar conditions. Because of this and in light of the results discussed above, GA and SP phages should not be

used as viral surrogates to test the quality of microorganism filtration by membranes. Moreover, electrostatic interactions between viruses and membrane play a role in the adhesion and as such may also interfere with the estimation of microorganisms removal by filtration. Consequently, conditions where electrostatic repulsions are favored are necessary to limit the adhesion of viruses onto currently used negative membranes. This implies an accurate knowledge of the net charge carried by the viruses at a given pH. Our study shows that suspensions of MS2 and Q $\beta$  phages at neutral pH and low ionic strength meet the right criteria for the viruses to express negative charge. Nevertheless, Q $\beta$  phages express a higher negative charge as compared to that of MS2 phages in our conditions. As a result, Q $\beta$  phages should be removed less than MS2 phages by using negative and hydrophilic membranes which are currently used in water treatment.

## 5. Conclusions

By the concomitant use of electrokinetic and diffusion light scattering techniques, we have defined some surface characteristics of F-specific RNA phages (MS2, GA, Q $\beta$  and SP) in terms of aggregation propensity (colloidal stability) and pI's. From a qualitative analysis of the data, it appears that the SP and GA viruses are more hydrophobic than MS2 and Q $\beta$  because aggregation of these viral particles is observed over the entire pH range (pH 1.5–7.5) and ionic strength conditions (1–100 mM NaNO<sub>3</sub>) examined. As a result, SP and GA are not useful model systems for understanding membrane filtration processes because the particles may be easily eliminated by size exclusion simply by appropriate choice of the membrane pore size. Unlike SP and GA, the phages Q $\beta$  and MS2 exhibit significantly different electrokinetic and aggregation features with respect to pH and ionic strength conditions. Q $\beta$  is characterized by a somewhat larger charge (in magnitude) than MS2 as well as a higher degree of hydrophobicity. We expect significant differences in the efficiency for eliminating these two viral strains by filtration as a function of the surface properties of the membrane.

## Acknowledgment

This study was performed with the financial support of ACTIA.

## REFERENCES

- Bollback, J.P., Huelsenbeck, J.P., 2001. Phylogeny, genome evolution, and host specificity of single-stranded RNA bacteriophage (family Leviviridae). *J. Mol. Evol.* 52 (2), 117–128.
- Chang, L.T., Farrah, S.R., Bitton, G., 1981. Positively charged filters for virus recovery from wastewater treatment plant effluents. *Appl. Environ. Microbiol.* 42 (5), 921–924.
- Dague, E., Duval, J.F.L., Jorand, F., Thomas, F., Gaboriaud, F., 2006. Probing surface structures of *Shewanella* spp. by microelectrophoresis. *Biophys. J.* 90, 2612–2621.
- Dukhin, S.S., Zimmermann, R., Werner, C., 2006. Electrokinetic fingerprinting of grafted polyelectrolyte layers—a theoretical approach. *Adv. Colloid Interface Sci.* 122, 93–105.
- Duval, J.F.L., Ohshima, H., 2006. Electrophoresis of diffuse soft particles. *Langmuir* 22, 3533–3546.
- Farrah, S.R., Gerba, C.P., Wallis, C., Melnick, J.L., 1976. Concentration of viruses from large volumes of tap water using pleated membrane filters. *Appl. Environ. Microbiol.* 31 (2), 221–226.
- Floyd, R., 1979. Viral aggregation: mixed suspensions of poliovirus and reovirus. *Appl. Environ. Microbiol.* 38 (5), 980–986.
- Floyd, R., Sharp, D.G., 1977. Aggregation of poliovirus and reovirus by dilution in water. *Appl. Environ. Microbiol.* 33 (1), 159–167.
- Floyd, R., Sharp, D.G., 1978a. Viral aggregation: quantitation and kinetics of the aggregation of poliovirus and reovirus. *Appl. Environ. Microbiol.* 35 (6), 1079–1083.
- Floyd, R., Sharp, D.G., 1978b. Viral aggregation: effects of salts on the aggregation of poliovirus and reovirus at low pH. *Appl. Environ. Microbiol.* 35 (6), 1084–1094.
- Floyd, R., Sharp, D.G., 1979. Viral aggregation: buffer effects in the aggregation of poliovirus and reovirus at low and high pH. *Appl. Environ. Microbiol.* 38 (3), 395–401.
- Gassilloud, B., Gantzer, C., 2005. Adhesion–aggregation and inactivation of poliovirus 1 in groundwater stored in a hydrophobic container. *Appl. Environ. Microbiol.* 71 (2), 912–920.
- Gerba, C.P., 1984. Applied and theoretical aspects of virus adsorption to surfaces. *Adv. Appl. Microbiol.* 30, 133–168.
- Gerba, C.P., Farrah, S.R., Goyal, S.M., Wallis, C., Melnick, J.L., 1978. Concentration of enteroviruses from large volumes of tap water, treated sewage, and seawater. *Appl. Environ. Microbiol.* 35 (3), 540–548.
- Golmohammadi, R., Valegård, K., Fridborg, K., Liljas, L., 1993. The refined structure of bacteriophage MS2 at 2.8 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 234 (3), 620–639.
- Golmohammadi, R., Fridborg, K., Bundule, M., Valegård, K., Liljas, L., 1996. The crystal structure of bacteriophage Q beta at 3.5 Å resolution. *Structure* 4 (5), 543–554.
- Herath, G., Yamamoto, K., Urase, T., 1999. Removal of viruses by microfiltration membranes at different solution environments. *Water Sci. Technol.* 40 (4–5), 331–338.
- Hill, R.J., 2004. Hydrodynamics and electrokinetics of spherical liposomes with coatings of terminally anchored poly(ethylene glycol): numerically exact electrokinetics with self-consistent mean-field polymer. *Phys. Rev. E* (70), (051406, 1–16).
- Hu, J.Y., Ong, S.L., Song, L.F., Feng, Y.Y., Liu, W.T., Tan, T.W., Lee, L.Y., Ng, W.J., 2003. Removal of MS2 bacteriophage using membrane technologies. *Water Sci. Technol.* 47 (12), 163–168.
- ISO, 1995. ISO 10705-1: Water Quality. Detection and Enumeration of Bacteriophages -Part 1: Enumeration of F-Specific RNA Bacteriophages. International Organisation for Standardisation, Geneva.
- Jacangelo, J.G., Adham, J.G., Laine, J.M., 1995. Mechanism of Cryptosporidium, Giardia, and MS2 virus removal by MF and UF. *J. Am. Water Works Assoc.* 87, 107–121.
- Jacangelo, J.G., Trussell, R.R., Watson, M., 1997. Role of membrane technology in drinking water treatment in the United States. *Desalination* 113 (2–3), 119–127.
- Langlet, J., Gaboriaud, F., Gantzer, C., 2007. Effects of pH on plaque forming unit counts and aggregation of MS2 bacteriophage. *J. Appl. Microbiol.* 103 (5), 1632–1638.
- Langlet, J., Gaboriaud, F., Gantzer, C., Duval, J.F.L., 2008. Impact of chemical and structural anisotropy on the electrophoretic mobility of spherical soft-multilayer particles: the case of bacteriophage MS2. *Biophys. J.* 94, 1–20.
- Logan, K.B., Rees, G.E., Seeley, N.D., Primrose, S.B., 1980. Rapid concentration of bacteriophages from large volumes of fresh-water: evaluation of positively charged, microporous filters. *J. Virol. Methods* 1 (2), 87–97.
- Lopez-Garcia, J.J., Grosse, C., Horno, J.J., 2003. Numerical study of colloidal suspensions of soft spherical particles using the network method: 2. AC electrokinetic and dielectric properties. *J. Colloid Interface Sci.* 265, 341–350.

- Lukasik, J., Scott, T.M., Andryshak, D., Farrah, S.R., 2000. Influence of salts on virus adsorption to microporous filters. *Appl. Environ. Microbiol.* 66 (7), 2914–2920.
- Lyklema, J., 1995. *Fundamentals of Interface and Colloid Science: Solid-Liquid Interfaces*, vol. II. Academic Press, London (Chapter 3, 3.107).
- Lytle, C.D., Routson, L.B., 1995. Minimized virus binding for tests of barrier materials. *Appl. Environ. Microbiol.* 61 (2), 643–649.
- Lytle, C.D., Truscott, W., Budacz, A.P., Venegas, L., Routson, L.B., Cyr, W.H., 1991. Important factors for testing barrier materials with surrogate viruses. *Appl. Environ. Microbiol.* 57 (9), 2549–2554.
- Madaeni, S.S., Fane, A.G., Grohmann, G.S., 1995. Virus removal from water and wastewater using membranes. *J. Membr. Sci.* 102, 65–75.
- Miyake, T., Haruna, I., Shiba, T., Ito, Y.H., Yamane, K., 1971. Grouping of RNA phages based on the template specificity of their RNA replicases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 68 (9), 2022–2024.
- Morris, R., Waite, W.M., 1980. Evaluation of procedures for recovery of viruses from water. I. Concentration systems. *Water Res.* 14 (7), 791–793.
- Ni, C.Z., White, C.A., Mitchell, R.S., Wickersham, J., Kodandapani, R., Peabody, D.S., Ely, K.R., 1996. Crystal structure of the coat protein from the GA bacteriophage: model of the unassembled dimer. *Protein Sci.* 5 (12), 2485–2493.
- Ohshima, H., 1995. Electrophoresis of soft particles. *Adv. Colloid Interfac.* 62, 189–235.
- Overby, L.R., Barlow, G.H., Doi, R.H., Jacob, M., Spiegelman, S., 1966. Comparison of two serologically distinct ribonucleic acid bacteriophages. II. Properties of the nucleic acids and coat proteins. *J. Bacteriol.* 92 (3), 739–745.
- Payment, P., Berube, A., Perreault, D., Armon, R., 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. *Can. J. Microbiol.* 35, 932–935.
- Penrod, S.L., Olson, T.M., Grant, S.B., 1995. Whole particle microelectrophoresis for small viruses. *J. Colloid Interface Sci.* 173 (2), 521–523.
- Rafikova, E.R., Kurganov, B.I., Arutyunyan, A.M., Kust, S.V., Drachev, V.A., Dobrov, E.N., 2003. A mechanism of macroscopic (amorphous) aggregation of the tobacco mosaic virus coat protein. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 35 (10), 1452–1460.
- Raphael, R.A., Sattar, S.A., Springthorpe, V.S., 1985. Rotavirus concentration from raw water using positively charged filters. *J. Virol. Methods* 11 (2), 131–140.
- Sakoda, A., Sakai, Y., Hayakawa, K., Suzuki, M., 1997. Adsorption of viruses in water environment onto solid surfaces. *Water Sci. Technol.* 35 (7), 107–114.
- Schaldach, C.M., Bourcier, W.L., Shaw, H.F., Viani, B.E., Wilson, W.D., 2006. The influence of ionic strength on the interaction of viruses with charged surfaces under environmental conditions. *J. Colloid Interface Sci.* 294 (1), 1–10.
- Shields, P.A., Farrah, S.R., 2002. Characterization of virus adsorption by using DEAE-sepharose and octyl-sepharose. *Appl. Environ. Microbiol.* 68 (8), 3965–3968.
- Shields, P.A., Ling, T.F., Tjatha, V., Shah, D.O., Farrah, S.R., 1986. Comparison of positively charged membrane filters and their use in concentrating bacteriophages in water. *Water Res.* 20 (2), 145–151.
- Sobsey, M.D., Glass, J.S., 1980. Poliovirus concentration from tap water with electropositive adsorbent filters. *Appl. Environ. Microbiol.* 40 (2), 201–210.
- Sobsey, M.D., Jones, B.L., 1979. Concentration of poliovirus from tap water using positively charged microporous filters. *Appl. Environ. Microbiol.* 37, 588–595.
- Sobsey, M.D., Wallis, C., Henderson, M., Melnick, J.L., 1973. Concentration of enteroviruses from large volumes of water. *Appl. Microbiol.* 26 (4), 529–534.
- Sobsey, M.D., Oglesbee, S.E., Wait, D.A., 1985. Evaluation of methods for concentrating hepatitis A virus from drinking water. *Appl. Environ. Microbiol.* 50 (6), 1457–1463.
- Tars, K., Bundule, M., Fridborg, K., Liljas, L., 1997. The crystal structure of bacteriophage GA and a comparison of bacteriophages belonging to the major groups of *Escherichia coli* leviviruses. *J. Mol. Biol.* 271 (5), 759–773.
- Valegård, K., Unge, T., Montelius, I., Strandberg, B., Fiers, W., 1986. Purification, crystallization and preliminary X-ray data of the bacteriophage MS2. *J. Mol. Biol.* 190 (4), 587–591.
- Valegård, K., Liljas, L., Fridborg, K., Unge, T., 1990. The three-dimensional structure of the bacterial virus MS2. *Nature* 345 (6270), 36–41.
- Valegård, K., Liljas, L., Fridborg, K., Unge, T., 1991. Structure determination of the bacteriophage MS2. *Acta Crystallogr. B—Struct. Sci.* 47 (6), 949–960.
- Valegård, K., Fridborg, K., Liljas, L., 1994. Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of the bacteriophage Qbeta. *Acta Crystallogr. D—Biol. Crystallogr.* 50 (1), 105–109.
- van Voorthuizen, E.M., Ashbolt, N.J., Schafer, A.I., 2001. Role of hydrophobic and electrostatic interactions for initial enteric virus retention by MF membranes. *J. Membr. Sci.* 194, 69–79.
- Vinje, J., Oudejans, S.J., Stewart, J.R., Sobsey, M.D., Long, S.C., 2004. Molecular detection and genotyping of male-specific coliphages by reverse transcription-PCR and reverse line blot hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* 70 (10), 5996–6004.
- Zerda, K.S., Gerba, C.P., 1984. Agarose isoelectrofocusing of intact virions. *J. Virol. Methods* 9 (1), 1–6.
- Zhuang, J., Jin, Y., 2003. Virus retention and transport through Al-oxide coated sand columns: effects of ionic strength and composition. *J. Contam. Hydrol.* 60 (3–4), 193–209.
- Zoueva, O.P., Bailly, J.E., Nicholls, R., Brown, E.G., 2002. Aggregation of influenza virus ribonucleocapsids at low pH. *Virus Res.* 85 (2), 141–149.





## **Partie 3 :**

***Impact des propriétés interfaciales sur le  
comportement des bactériophages en  
phase aqueuse***

Les bactériophages ARN F-spécifiques, en particulier le phage MS2, sont de plus en plus utilisés comme « modèles » de virus entériques pathogènes pour étudier leur survie (Nasser *et al.*, 1993; Springthorpe *et al.*, 1993; Callahan *et al.*, 1995; Skraber *et al.*, 2004), leur élimination par filtration membranaire (Jacangelo *et al.*, 1995; Herath *et al.*, 1999; Fiksdal et Leiknes, 2006), leur désinfection (Battigelli *et al.*, 1993; Hall et Sobsey, 1993; Nuanualsuwan *et al.*, 2002; Duran *et al.*, 2003; Huertas *et al.*, 2003; Simonet, 2007), puisqu'ils ont une taille et une structure similaires (sphérique, d'environ 30 nm de diamètre). La concentration de bactériophages infectieux est classiquement mesurée par la méthode standardisée ISO 10705-1, 1995 qui est fondée sur la technique des plages de lyse (UFP). Or, une UFP peut être due aussi bien à une particule virale isolée qu'à un agrégat de plusieurs virus. Ceci peut entraîner un biais dans la mesure où la concentration virale peut être sous-estimée en présence d'agrégat.

Dans cette partie, nos objectifs ont été de vérifier d'une part, si les propriétés interfaciales des bactériophages ARN F-spécifiques avaient un impact sur leur élimination par filtration membranaire, d'autre part, si les phénomènes d'agrégation avaient un impact sur la mesure des UFP.

## **I. Impact des propriétés interfaciales des bactériophages sur leur élimination par filtration membranaire**

Dans le cadre du traitement des eaux, l'élimination des microorganismes pathogènes fait l'objet de nombreuses recherches. La filtration membranaire est devenue une alternative aux traitements chimiques qui peuvent présenter un effet nocif pour la santé et diminuer les qualités organoleptiques de l'eau. Parmi les microorganismes à éliminer, les virus entériques constituent le « pire cas » en raison de leur petite taille (20-30 nm).

L'élimination des virus par filtration membranaire se fait principalement par arrêt physique (exclusion de taille) lorsque le seuil de coupure de la membrane (MWCO en anglais pour Molecular Weight Cut-Off) est inférieur à la taille du virus et par adhésion sur la membrane quand le seuil de coupure est supérieur à la taille des virus. Pour évaluer l'efficacité d'une membrane à éliminer des virus, il faut se placer dans les pires conditions de manière à ne pas surestimer l'efficacité de cette membrane. Classiquement, il s'agit de conditions où l'agrégation est négligeable (pour minimiser l'élimination par exclusion de taille) et où l'adhésion du virus à la membrane est faible. Les membranes classiquement utilisées pour le traitement de l'eau sont hydrophiles et chargées négativement à pH neutre.

Dans les études visant à estimer l'élimination virale par filtration membranaire, c'est le phage MS2 qui est couramment utilisé. Cette estimation se fait par quantification du nombre d'unités formant plages (UFP) avant et après filtration, par la méthode de référence (norme ISO 10705-1, 1995). Or, nos études sur les propriétés interfaciales des virus démontrent, qu'au moins à faible force ionique, le phage Q $\beta$  est plus hydrophobe que MS2 et exprime une charge négative supérieure à celle du phage MS2. Selon les caractéristiques des membranes utilisées dans le cadre du traitement des eaux, le phage Q $\beta$  semble donc constituer un meilleur modèle pour estimer l'abattement viral d'une membrane.

Ainsi, l'objectif de nos travaux était double. Nous avons d'une part voulu estimer l'intérêt d'une autre méthode de détection pour définir l'abattement viral : la RT-PCR en temps réel. Par rapport à la technique des plages de lyse, cette approche est plus rapide, plus spécifique (il est possible de détecter spécifiquement chaque génotype) et elle n'est pas soumise au biais de l'agrégation virale. D'autre part, nous voulions vérifier si des virus avec des propriétés interfaciales différentes (Q $\beta$  *versus* MS2) pouvaient être éliminés différemment par des membranes. Ainsi, dans des conditions où le phage Q $\beta$  exprime une charge négative supérieure à celle de MS2 (force ionique 0,2 mM) et où les deux phages sont isolés (mesure de taille) des abattements viraux sont déterminés pour différentes membranes avec la méthode des plages de lyses et par RT-PCR en temps réel.

Les résultats de cette étude montrent tout d'abord que la détermination de l'abattement viral par filtration peut se faire aussi bien par la méthode des UFP que par RT-PCR en temps réel puisqu'une linéarité est observée entre les résultats des deux techniques (Figure 26).

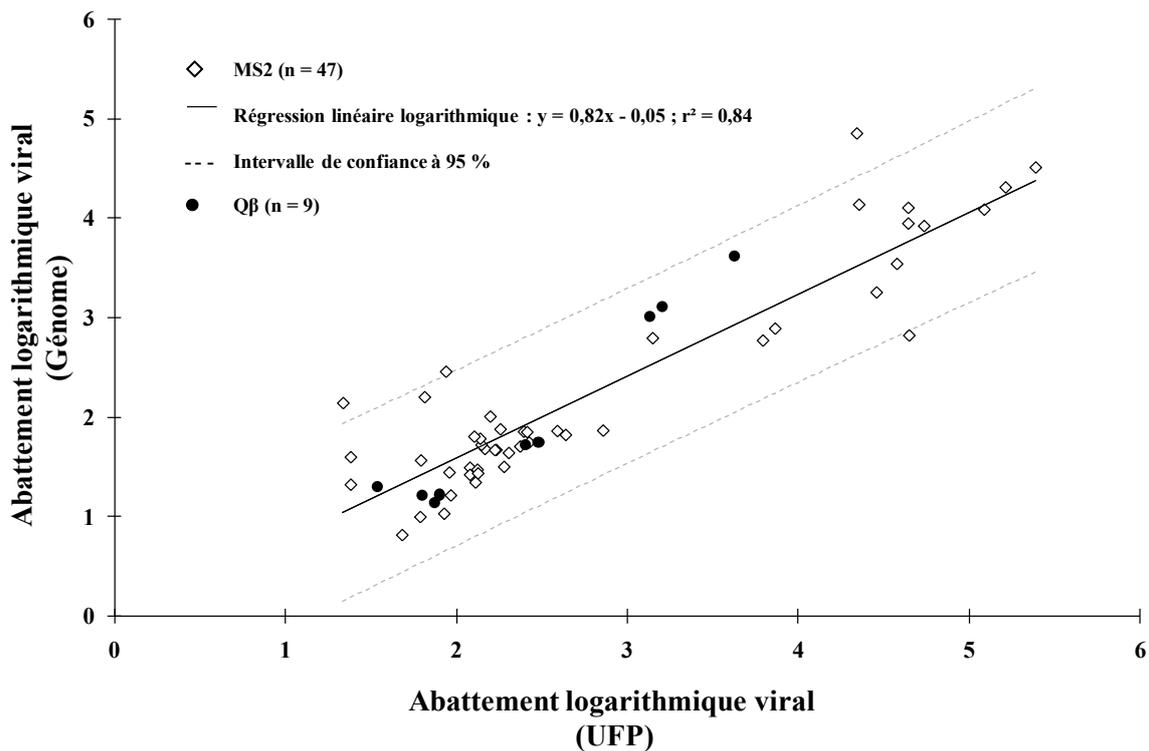


Figure 26 : Abattements logarithmiques des phages MS2 (◇) and Qβ (●) par microfiltration et ultrafiltration. Les abattements obtenus par la méthode des UFP et par RT-PCR en temps réel correspondent respectivement aux axes  $x$  et  $y$ .

De plus, comme attendus, les résultats indiquent bien que le phage Qβ est toujours moins bien éliminé que le phage MS2, quelles que soient les membranes utilisées. Ces résultats s'expliquent par des propriétés interfaciales différentes entre les deux phages : Qβ présente une répulsion plus forte vis-à-vis de la membrane électronégative que MS2. Cette plus forte répulsion virus-membrane est probablement due au génome plus grand de Qβ qui contribue de manière significative à la charge globale négative de la particule virale.

Article accepté dans *JOURNAL OF MEMBRANE SCIENCE*

## **Efficiency of MS2 phage and Q $\beta$ phage removal by membrane filtration in water treatment: applicability of real-time RT-PCR method**

Jérémy Langlet<sup>a</sup>✉, Leslie Ogorzaly<sup>a</sup>✉, Jean-Christophe Schrotter<sup>b</sup>, Claire Machinal<sup>b</sup>, Fabien Gaboriaud<sup>c</sup>, Jérôme F. L. Duval<sup>d</sup> and Christophe Gantzer<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratoire de Chimie Physique et Microbiologie pour l'Environnement (LCPME), Nancy Université, CNRS, 5 rue Albert Lebrun, 54000 Nancy, France

<sup>b</sup> Water Research Center, Veolia Environnement - Chemin de la Digue, 78603 Maisons-Laffitte, France

<sup>c</sup> Laboratoire de Chimie Physique et Microbiologie pour l'Environnement (LCPME), Nancy Université, CNRS, 405 rue de Vandoeuvre, F-54600 Villers-lès-Nancy, France

<sup>d</sup> Laboratoire Environnement et Minéralurgie (LEM), CNRS, 15 avenue du Charmois, B.P. 40, 54501 Vandoeuvre-lès-Nancy cedex, France

\*Corresponding author: [Christophe.Gantzer@pharma.uhp-nancy.fr](mailto:Christophe.Gantzer@pharma.uhp-nancy.fr),

Phone: +33(0)3 83 68 22 91. Fax: +33(0)3 83 68 23 01

✉ These authors contributed equally to this work.

### **Abstract**

MS2 phage is currently used as a surrogate to evaluate pathogenic virus removal efficiency by filtration membrane during water treatment. Phage removal is commonly defined upon comparing the number of infectious units in permeate with that in feed solution by PFU method. This method may lead to overestimation of the virus removal because of possible occurrence of viruses aggregation.

In this study, we report the removal efficiencies of various conventional membranes used in water treatment technology, with respect to suspensions of MS2 and Q $\beta$  bacteriophages. These phages - known to exhibit distinct interfacial characteristics in terms of electrostatic charge and degree of hydrophobicity - were used in conditions where viral particle aggregation is negligible. Under such conditions, the feasibility of fast, easy to handle, molecular biology method, *i.e.* real-time RT-PCR, for measuring virus removal rates is clearly addressed. Comparison of the results provided by this method with those obtained *via* the more traditional is given. On the basis of the filtration results, it is shown that Q $\beta$  phages are eliminated to a lower extent than MS2 phages, this being the case for all membranes considered here. Accordingly, the analysis questions the choice of MS2 phage as the best surrogate classically used for characterizing membrane virus removal propensity in worst possible conditions.

**Keywords:** MS2 phage, Q $\beta$  phage, filtration, virus removal, real-time RT-PCR.

## **1. Introduction**

Membrane filtration processes constitute an alternative to traditional disinfection treatments for eliminating pathogenic microorganisms from water. Among those pathogens, enteric viruses (*e.g. Norovirus, Hepatitis A virus, Enterovirus*) are recognized as the most difficult microorganisms to be removed essentially because of their small size, typically in the range 20 to 30 nm diameter. The estimation of Molecular Weight Cut-Off (MWCO) or mean pore size of filtration membranes is commonly carried out by analysis of filtration experiments that involve model molecules like dextran [1]. Though useful, this procedure - which aims at addressing the performance of filtration membranes employed in water treatment processes- is inadequate to estimate the efficiency of a membrane with respect to another for removing viral particles. This is so because viruses and dextran macromolecules exhibit significantly different properties in terms of charge, structure or hydrodynamic permeability, all of them playing a key-role in defining the interactions membrane-particles and thereby the ability of a membrane to capture or not a given colloidal entity [2,3]. For these reasons, the MS2 viral particle has been proposed as a surrogate to evaluate pathogenic virus removals by membrane filtration [4-7]. This choice is commonly motivated by the peculiar physico-chemical characteristics of MS2 phage which make it the worst-case scenario [8,9] in terms of virus removal by membrane filtration. These characteristics of MS2 phage may be summarized as follows: (i) a small size (~25 nm diameter) that critically limits the removal by simple size exclusion (ii) a low isoelectric point ( $pI = 3.5-3.9$ ) [10-12] which indicates a significant negative charge carried by the virus at neutral pH conditions [3] and thus inoperative adsorption of MS2 particles onto negatively charged membranes as classically used in water treatment processes and (iii) a degree of hydrophobicity [13] which excludes the possibility of significant adsorption onto hydrophilic membranes classically encountered in water treatment technology.

To concretely determine virus removal by a given membrane, MS2 phages are classically poured at high concentration (up to  $10^6$  PFU/mL) in Phosphate Buffer Saline (PBS) solution and subsequently filtered through the membrane of interest [4,5]. Phage removal is then defined upon comparing the number of infectious units in permeate with that in feed solution by means of PFU (Plaque Forming Units) method [14]. The above standard procedure may be critically discussed on at least three points that we now detail.

The first point concerns the technique employed for the detection of the phages. The PFU method allows the counting of the only infectious MS2 particles, *i.e.* those able to infect

bacteria. Said differently, it comes that one PFU unit may be defined either as the count of an isolated infectious viral particle or as an aggregate made of several infectious viruses. Use of PFU technique leads to entirely disregarding the stability of the suspension of infectious particles (aggregated or not) in permeate and thereby may provide overestimation of the virus removal capacity of the membrane investigated. This has been recently demonstrated by Langlet and co-workers [15] who quantitatively showed that viral particles aggregation strongly decreases MS2 PFU counts. It is relevant to recall here that the occurrence of aggregation after filtration is strongly favoured by the confinement of the particles which have crossed the membrane pores under the action of hydrodynamic convection, which ultimately leads to suppression of the long-range inter-particle electrostatic repulsion at the benefit of short-range specific inter-particle binding. Despite this limitation of PFU method, it is widely adopted by the community and further considered as the reference technique to be adopted in virus elimination processes. In addition, PFU method is very time-consuming since it generally takes about 24 hours to carry out a complete detection of infectious units in a permeate sample. Promising alternative methods for counting viruses in permeate solution are those classically employed in molecular biology, *e.g.* real-time RT-PCR, and rely on the detection of viral genome [16]. Unlike PFU method, the latter techniques are very rapid to handle, routinely customized and do not suffer from limitations inherent to the occurrence of aggregation. Actually, prior to detection by real-time RT-PCR, extraction of genome is necessarily required, which treatment ensures the dissociation of any aggregates present in solution. The main drawback of RT-PCR remains its ability to detect viral genome stemming from infectious as well as non-infectious viruses (included naked genome), the ratio between these two types of particles possibly varying from one viral suspension to the other [17]. In view of these elements, virus removal estimation from real-time RT-PCR is relevant providing a linear correlation is demonstrated with that derived from the PFU reference method. Till now, the evaluation of virus removal by filtration with real-time RT-PCR has never been validated.

The second aspect is related to the impact of particle aggregation not on the detection of infectious viruses in permeate by PFU method as extensively commented above, but on the very removal of organisms present in the feed solution. On the basis of simple size exclusion consideration, large aggregates of viral particles are likely to be more easily removed as compared to their small unitary entity taken separately [6,9,18]. As a result, the occurrence of particle aggregation -which intrinsically depends on the physico-chemical conditions of the medium (pH, ionic strength, temperature, nature of ions present in solution) and on the

interfacial properties of the viruses, may result in significant overestimation of the propensity of membranes to remove viruses. Despite this, the stability of the viral population against aggregation in the feed solution is rarely discussed in filtration studies.

Finally, the third aspect pertains to the use of MS2 phage as the “worst-case” scenario (for the reasons previously given, *i.e.* high negative charge, relative hydrophobicity and small size) for microorganisms elimination by membrane filtration. For membranes of which the pore size largely exceeds that of the viral particles, virus adhesion onto the membrane is the major process that results in virus removal by filtration. Adhesion of viral particles onto charged membranes strongly depends on the charge carried by the virus and its hydrophobicity [8,9,13]. Given that the membranes used in water treatment processes are generally negatively charged and hydrophilic, the worst case in terms of virus removal efficiency is therefore met when considering the removal of highly negatively charged viruses so that electrostatic repulsion between viruses and membrane is largely sustained. MS2 phage, namely because of its low isoelectric point (3.9), expresses a significant negative charge over a wide range of pH and ionic strength conditions. Notwithstanding this peculiar property that has justified in the past decade MS2 phage as the ideal candidate for testing the removal capability of a given membrane, force is to recognize that the comparison of MS2 charge level with that of other viruses has never been performed so far. In a recent analysis, Langlet *et al.* [3] shed some light on the physical meaning of the isoelectric point and interfacial properties of multi-layered soft particles, bacteriophage MS2 being an illustrative representative. In particular, they showed that the conventional picture of “surface charge” for permeable particles like viruses is physically erroneous and that the nucleic acids distributed within the MS2 phage significantly -if not predominantly- determine the electrostatic properties of the virus as a whole and thereby its interaction with the close environment. Q $\beta$  phage, another F-specific RNA phage, has a similar structure and a comparable size than MS2 phage albeit with a longer genome (4160 nucleotides for Q $\beta$  as compared to 3569 for MS2). Following the theoretical and experimental analyses carried out in [3], Q $\beta$  phage is expected to express a larger overall negative charge than MS2 phage. In addition, systematic size measurements in various pH and ionic strength conditions [19] suggests that Q $\beta$  phage exhibits a larger relative hydrophobicity than MS2 phage. These elements lead us to propose Q $\beta$  phage as a potential better candidate than MS2 phage to perform virus challenge test in worst case scenario for membranes characterization. The hydrophobic character of Q $\beta$  phage goes in the sense of less favourable elimination because the membranes commonly used in

water treatment are very hydrophilic thus minimizing the eventual occurrence of significant attractive hydrophobic interactions with the virus.

Following the above discussion, the objective of this study is (i) to compare the removal efficiencies of initially stable (non-aggregated) colloidal feed suspensions of MS2 and Q $\beta$  viruses by various conventional hydrophilic and negatively charged microfiltration and ultrafiltration membranes used in water treatment technology (isoelectric point goes from 2 to 3.5 and hydrophobicity given by the contact angles which go from 0° to 40°) (ii) to address the feasibility of the quick real-time RT-PCR method for effectively measuring virus removal rates, keeping in mind that the outcome of this method, unlike that by PFU, is not biased by the occurrence of aggregation processes.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Preparations of MS2 and Q $\beta$ bacteriophage suspensions

MS2 phages (ATCC 15597-B1) and Q $\beta$  phages (provided by Pr Jofre, Barcelone) were replicated according to the procedure extensively discussed in [15]. Briefly, the bacteriophage strains MS2 and Q $\beta$  were replicated according to standard procedure [14] without the CHCl<sub>3</sub> lysis step and using *E. coli* Hfr K12 (ATCC 23631) as bacterial host. After replication, the viral suspensions were centrifuged (Beckman, model J2-22, 27,000 x g, 60 min, 4°C) and the supernatant filtered through a 0.22  $\mu$ m membrane (Millipore, SLGP033RS). The viral suspension was stored as stock suspension at 4°C and filtered (0.22  $\mu$ m) prior to filtration experiments with membranes.

Size measurements (see 2.4 section) of the viral particles require the bacteriophage suspension to be dialyzed (100 kDa MWCO, Spectrum, 235071) first against deionised water (0.1  $\mu$ S/cm) for 14 hours and then against a PBS solution (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> / KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2 mM, pH=6.7) for 14 hours and subsequently filtered (0.22  $\mu$ m). The dialyzed viral suspension was stored at 4°C and filtered (0.22  $\mu$ m) before use.

The double agar layer procedure [14] was followed to quantify the number of infectious units in 1-mL volume of suspension. The final viral concentration for the different viral stock suspensions was about 10<sup>11</sup> PFU/mL.

### 2.2. Quantification of viral genome.

**(i) Viral RNA extraction.** Viral RNA was extracted from 140  $\mu$ L using the QIAamp® viral RNA mini kit (QIAGEN, 52906) according to the manufacturer's instructions. Extracted RNA was eluted in 60  $\mu$ L of elution buffer and stored at - 80°C.

**(ii) Real-time RT-PCR.** Quantification of MS2 and Q $\beta$  genome was performed using the method developed by Ogorzaly and Gantzer (2006) [16] and optimised *via* several modifications of the reverse transcriptase (RT) procedure. During the first step of the RT, 5  $\mu$ L of extracted RNA were mixed with 1  $\mu$ L of 20  $\mu$ M reverse primer at 65°C for 5 min and immediately incubated on ice at least for one minute. The reaction mixture consisted of 4  $\mu$ L of 5X reverse transcription buffer, 1  $\mu$ L (40 U/ $\mu$ L) of RNase Inhibitor (Promega, N2115), 2  $\mu$ L of 10 mM dNTPs (Applied Biosystems, N8080260), 1  $\mu$ L (10 U/ $\mu$ L) of AMV reverse transcriptase (Promega, M5108) and 6  $\mu$ L of DNase-RNase-free water (Sigma, W4502).

Reverse transcription was performed at 42°C for 60 min, followed by 5 min at 95°C to inactivate the reaction. The resulting cDNA was then quantified by TaqMan real-time PCR using primers and probes designed for the genogroups I (MS2) and III (Q $\beta$ ) as previously described by Ogorzaly and Gantzer (2006) [16].

### *2.3. Membranes*

Four membranes were selected for estimating their virus removal efficiencies in bench-scale experiments: one microfiltration membrane denoted in the following as MF1 and three ultrafiltration membranes (UF1, UF2 and UF3), all of them being hollow fibres assembled in bench-scale modules. The respective characteristics of MF1 and UF1, 2, 3 (mean pore size, MWCO ...etc) and those of the bench-scale modules of filtration are presented in Table 1. It is important to note that no correlation between mean pore size and MWCO could be observed for UF membranes. Mean pore size will be the variable of interest in this paper. It is also important to emphasize that all membranes studied (PVDF, PES and cellulose based materials) were chemically treated by the membrane manufacturer in order to provide a highly hydrophilic membrane material (the contact angles go from 0° to 40°). Each bench-scale module is tested prior to experiment in order to check its integrity: the membrane is then pressurized (1 bar) in closed loop during one minute and the loss of pressure is evaluated (data not shown). A bench-scale module is considered intact when no loss of pressure is detected. An evaluation of the permeability of the bench-scale module to phosphates solution (0.2 mM in concentration) was also carried out (Table 1).

### *2.4. Size measurements*

Particle size was measured at  $23 \pm 0.1^\circ\text{C}$  using the Zetasizer Nano ZS instrument (He-Ne red laser (633 nm)-Malvern Instruments). Experiments were driven by the Dispersion Technology Software provided by Malvern Instruments. The particle size distribution in the viral suspensions under investigation was determined by size analysis using dynamic light scattering (DLS also known as PCS - Photon Correlation Spectroscopy). The sensitivity of the apparatus requires high viral suspension concentrations (up to  $10^9$  PFU/mL). To reach those, the dialyzed viral suspensions in PBS ( $10^{11}$  PFU/mL) was filtered (0.22  $\mu\text{m}$ ) prior to size measurements and then poured in 600  $\mu\text{L}$  disposable cells (Malvern, UK).

## 2.5. *Experimental design of filtration equipment*

Bacteriophage removal by the filtration membranes described in 2.3 was monitored on a bench-scale apparatus schematically depicted in Figure 1. 5-L volume of viral suspension (MS2 or Q $\beta$ ) with known initial viral concentrations ( $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$  or  $10^3$  PFU/mL) were prepared in 0.2 mM PBS solution at pH 6.7. The suspensions were subjected to agitation in an inox container connected to the bench-scale apparatus of filtration and submitted to pressure gradient by means of a compressed air-flux. Three bench-scale modules (identical or not) are placed in parallel in the filtration apparatus as illustrated in Figure 1. Filtrations are carried out under pressure (0.2 bars) in frontal mode, at ambient temperature ( $22^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ ) and for a variable time depending on the permeability of the tested membranes. 400 mL of viral suspension were filtered. We verified that this quantity was large enough to reach equilibrium as indicated by time-independent virus removal data (not shown). Samples of viral solutions were taken before (feed solution) and after filtration (permeate), and were subsequently frozen prior to analysis by molecular biology (real-time RT-PCR) and PFU methods. After each filtration experiment, a new test of permeability is carried out in order to verify the integrity of the membranes contained in the filtration module.

Statistic analyses were realized with XLSTAT 2007 software (Addinsoft, France) for comparing the results of filtration obtained with the different phages and different membranes and for the regression analysis.

### **3. Results and Discussion**

#### *3.1. Size of viral particles*

The size of viral particles suspended in PBS solution was determined in  $10^{11}$  PFU/mL viral stock suspensions. In agreement with previous analysis carried out in  $\text{NaNO}_3$  electrolyte solutions [19], diameters of the nearly spherical MS2 and Q $\beta$  phages are found to be  $23 \pm 1$  nm and  $27 \pm 2$  nm in 0.2 mM PBS solution, respectively. These measurements denote the absence of any aggregation of the particles, despite the fairly high viral concentration used ( $10^{11}$  PFU/mL). Working with Q $\beta$  and MS2 phage requires precautions because previous study observed that aggregation can occur for low pH or high ionic strength [19]. Accordingly, working at lower viral concentration levels in 0.2 mM PBS solution -as within the framework of filtration experiments (maximum  $10^6$  PFU/mL)- ensures obtaining MS2 and Q $\beta$  particle removal results which are not biased by the presence of any aggregates. Previous study has reported large removal rates of Q $\beta$  and MS2 phages by microfiltration due to the occurrence of aggregation especially by adding HCl [6]. These authors also observed a propensity for Q $\beta$  phages to be removed by MF membranes at pH values upper than for MS2 phages. This result may be explained by the recent analysis [19] where the strong and minor impacts of increasing ionic strength at neutral pH on Q $\beta$  and MS2 phages aggregation are detailed, respectively. As such, it highlights the mandatory prerequisite for avoiding particles aggregation -by appropriate medium preparation- to allow comparison of membrane removal rates of different viruses under isolated state, thus preventing from any possible overestimation of the membrane removal capacity due to particle aggregation, as discussed in the introduction. Our results guaranty that 0.2 mM PBS suspensions of MS2 and Q $\beta$  viral particles submitted to filtration experiments satisfy this requirement.

#### *3.2. Real-time RT-PCR as a method to estimate virus removal*

For the four selected microfiltration and ultrafiltration membranes and the two phages (MS2 and Q $\beta$ ) of interest here, virus removals were evaluated according to two different methods: PFU method and specific real-time RT-PCR. Figure 2 shows the relationship between virus removal rates as obtained *via* the aforementioned methods. Figure 2 collects removal rates determined for the two different phages (MS2 and Q $\beta$ ) initially present in the feed solution at various concentrations ( $10^3$  to  $10^6$  PFU/mL) and the four selected membranes

(microfiltration and ultrafiltration). As far as removal rates of MS2 phages are concerned, a linear relationship is satisfactorily obtained -within experimental error- between virus removal rates evaluated by PFU method and that estimated by real-time RT-PCR method. Although the number of Q $\beta$  filtration experiments is lower (n=9) than the one for MS2, similar conclusion is reached for Q $\beta$  removal. More in details, the statistical trends of the data reported in Figure 2 clearly indicate that phage removal rates obtained with PFU method are 1-log<sub>10</sub> higher than those determined with real-time RT-PCR procedure. Two hypotheses may be given to explain this observation:

- Aggregation during the filtration step may decrease PFU counts. During filtration viral particle may be forced to go through the pores of the membrane *via e.g.* hydrodynamic convergent fluxes close to the pore. This allows viral particles to go close to each other despite of the repulsive inter particular electrostatic interactions and low viral concentrations in the bulk medium. This may enhance the probability of virus encounter and thereby provoke aggregation during the time course of filtration even if no aggregation is detected in the feed solution.

- Non-infectious particles are eliminated less efficiently than the infectious ones. To the best of our knowledge, no actual technology is available for verifying the validity of these hypotheses. Regardless the origin of these discrepancies, this being beyond the scope of the current analysis, Figure 2 illustrates that both approaches are relevant for quantifying removal rates of viruses by different filtration membranes. Real-time RT-PCR is faster and allows analysing a higher number of samples within a given time delay. It further allows an investigation of the filtration efficiency of membranes with respect to mixture of both phages essentially because the underlying measuring method is designed to specifically detect the desired organism [16]. Such investigation is not possible with PFU method. Under the conditions of interest here, real-time RT-PCR method is clearly feasible and advantageous for estimating virus removal by membrane filtration. To go further and validate this method for larger scales filtration experiments, it is anticipated that precautions should be taken, especially in the standardisation of the viral stock preparation, in order to have a constant ratio between concentrations of infectious and non-infectious particles.

### 3.3. *Virus removals by MF and UF membranes*

Taking into consideration the previous results, real-time RT-PCR method seems as effective as PFU method for determining and thus comparing MS2 and Q $\beta$  phage removal

rates by micro and ultrafiltration membranes. For this reason, only real-time RT-PCR results will be commented in the following.

Estimation of the efficiency of the four selected membranes to eliminate MS2 and Q $\beta$  phages was carried out. For the bench scale study, membranes with different physicochemical characteristics and mean pore sizes were selected. All of these membranes are electronegative at neutral pH and hydrophilic. Table 2 gathers the results obtained with the different selected membranes and the two phages MS2 and Q $\beta$ . The microfiltration membrane (MF1) has mean pore size four times higher than the diameter of the phage. In this case, adhesion process should play a predominant role in virus elimination. Three ultrafiltration membranes with different mean pore size (provided by the membrane supplier) were also used in our study. The first one (UF1) corresponds to a mean pore size of around 10 nm *i.e.* lower than the size of phages, thus favouring physical retention as the main process for particle elimination. Two other membranes (UF2 and UF3) of identical composition (PES) were investigated: one (UF3) with a mean pore size equal to the typical diameter of the phages of interest (25 nm) and another (UF2) which corresponds to a mean pore size twice larger than the size of the virus. Based on the data of Table 2, MS2 phage removal increase significantly (Student t-test,  $p < 0.05$ ) when mean pore size decreases (from 1.8 PCR log<sub>10</sub> with MF1 to  $> 6$  PCR log<sub>10</sub> with UF1 for MS2 phages), as intuitively expected. Similarly, a significant increase of Q $\beta$  phages removal is observed for decreasing mean pore size (from 1.25 PCR log<sub>10</sub> with MF1 to  $> 6$  PCR log<sub>10</sub> with UF1).

The results commented above and obtained with the microfiltration membranes are in agreement with those reported in the literature. According to Jacangelo *et al.* (1995) [5], MS2 removal by microfiltration range from 0.5 to 1 log<sub>10</sub>. Other authors [20,21] have reported large removal rates of F-specific phages (up to 3.8 log<sub>10</sub>). However, in these studies, microfiltration is used to remove phages present in secondary wastewater treatment effluent and influent. Phages retention could be thus significantly favoured by the presence of organic components and/or membrane fouling. On the other hand, no MS2 removal by hydrophilic 0.22  $\mu$ m membrane was detected [18] with viruses suspended in a representative Norwegian raw water source.

Results obtained with ultrafiltration membranes lead to the following comments: as Jacangelo *et al.* (1995) [5] pointed out, MS2 removal rates strongly depend on the membrane characteristics in particular the mean pore size and building component (1.5 to more than 7 log<sub>10</sub>). Madaeni *et al.* (1995) [22] have also reported important removal rates in ultrafiltration, *e.g.* more than 4 log<sub>10</sub> for the poliovirus. As expected, there is a significant difference between

removal rates obtained with MF1 membrane and the one obtained with all ultrafiltration membranes (Student t-test,  $p < 0.05$ ) except for Q $\beta$  removal with MF1 and UF2 (Student t-test,  $p > 0.05$ ). Among the four membranes, UF1 is the most efficient in view of the large removal rates obtained with this membrane.

With regard to the comparison of the removal rates of MS2 and Q $\beta$  bacteriophages in controlled conditions, it is noted that Q $\beta$  phages are systematically eliminated to a lesser extent than MS2 phages (Student t-test,  $p < 0.05$ ) in bench-scale experiments, whatever the detection method and membranes used. Moreover, the percentage of positive permeates, *i.e.* permeates where genome is detected (see Table 2) for the membrane UF2 of mean pore size equal to the diameter of phages - differs for MS2 and Q $\beta$  phages. 33 % of permeates are positive for MS2 phages whereas 100 % of permeates are positive for Q $\beta$  phages. This suggests that Q $\beta$  phage constitutes a “worse-case” scenario than MS2 for microorganisms elimination. These results are consistent with the expectations of a significant contribution of the inner nucleic acids (bound to the proteic capsid as demonstrated for MS2 in [3]) to the overall negative charge of the particles. Indeed, Q $\beta$  phage presents a longer genome than MS2 phage (4160 *versus* 3569 nucleotides, respectively) that may lead to a larger effective repulsion for the particle-particle or particle-membrane interactions as both are negatively charged. However, this study points out the intricate relationships between membrane virus removal efficiency and interfacial properties of such multi-layered soft particles. Therefore, to fully understand the mechanisms involved in membrane filtration of virus, systematic and extensive studies of virus presenting different interfacial properties need to be performed in combination with the advanced experimental and theoretical analyses as recently done in [3].

#### **4. Conclusions**

The results reported in this study show that knowledge of the membrane characteristics and interfacial properties of viral particles is important for interpreting virus removal rate obtained by membrane filtration. Comparison of removal rates by membrane filtration for two different viral particles in terms of physico-chemical properties (MS2 and Q $\beta$ ) shows the importance of electrostatic interactions in adhesion of these viruses onto conventional hydrophilic and negatively charged membranes used in water treatment. In medium where viral aggregation is absent or insignificant, removal rate of Q $\beta$  phages is always lower than MS2 phages regardless the nature of the membrane. Therefore according to these results, we suggest that Q $\beta$  phage is a better candidate than MS2 phage for characterizing membrane virus removal rate in worst-case conditions.

This work also shows the feasibility of real-time RT-PCR method to quantify virus removal by membrane filtration. Although this counting method is demonstrated to be particularly powerful within the framework of the experimental conditions investigated here, it should undoubtedly be validated for large scale experimentation and in particular, special care should be devoted to standardize the stock solution that contains the viruses to be eliminated.

**Tables**

**Table 1:** Membranes and bench-scale modules characteristics. The MWCO, pore size and fibre diameter were provided by the manufacturer. The permeability of the bench-scale modules was measured. Mean pore size is an estimation. Consequently, one has to keep in mind the true distributions for the pore (and virus) size(s). On the basis of such *e.g.* Gaussian like distributions, it is easy to realize that viral particles smaller than those of mean size value can go through pores of size larger than that indicated by the mean pore size value.

Membrane characteristics				Bench-scale module characteristics				
Material	MWCO (kDa)	Mean pore size ( $\mu\text{m}$ )	Internal diameter of the fibre (mm)	External diameter of the fibre (mm)	Configuration	Number of fibres	Permeability ( $\text{L/h.m}^2\text{bar, } 20^\circ\text{C}$ )	
<b>MF1</b>	PVDF <sup>a</sup>	ND	0.1	0.5	0.8	External-Internal	21	$266.6 \pm 55.8$
<b>UF2</b>	PES <sup>b</sup>	100	0.05	0.8	1.3	Internal-External	21	$646.9 \pm 66.4$
<b>UF3</b>	PES <sup>b</sup>	150	0.025	0.8	1.2	Internal-External	21	$354.0 \pm 53.6$
<b>UF1</b>	Cellulose	100	0.01	0.93	1.2	Internal-External	18	$163.2 \pm 13.6$

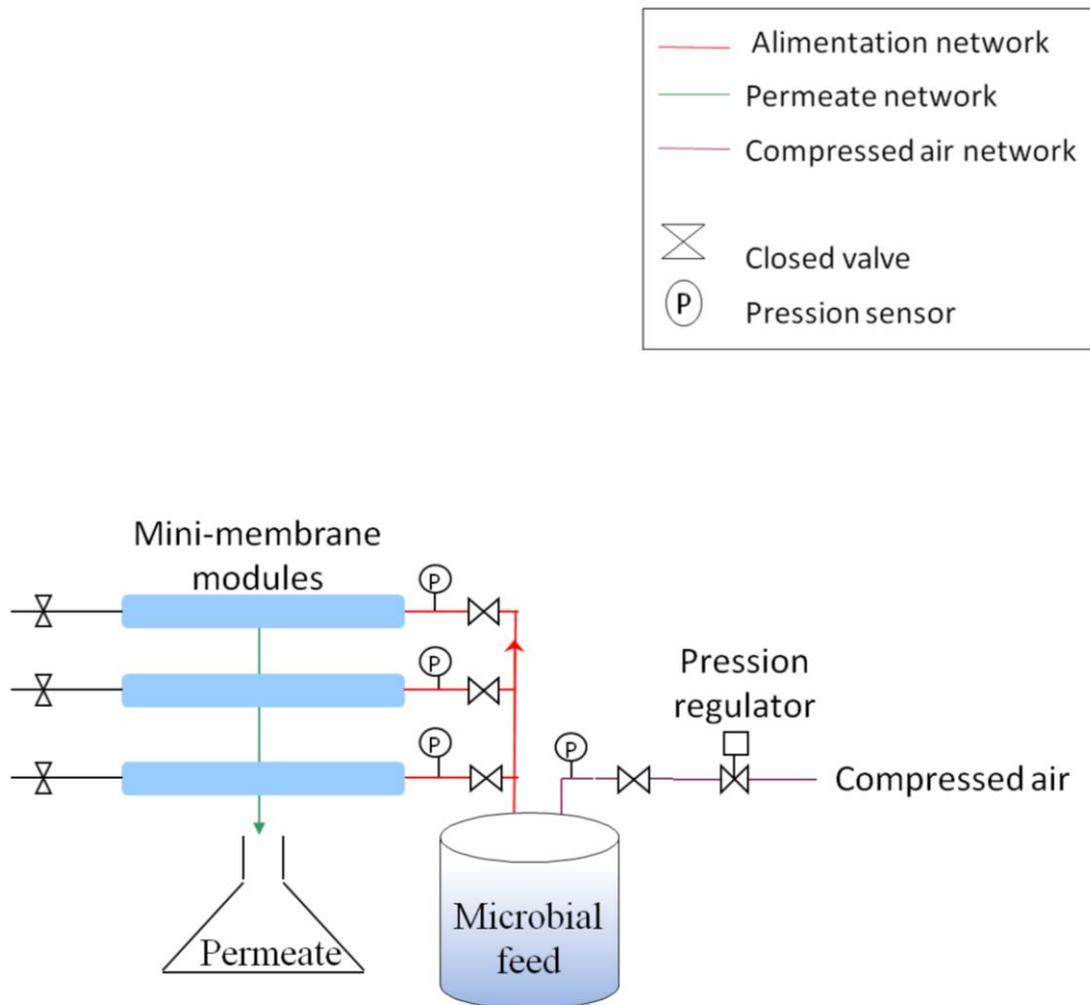
<sup>a</sup> PolyVinylidene Fluoride, <sup>b</sup> PolyEtherSulfone

**Table 2:** Virus removal rates of MS2 and Q $\beta$  phages obtained by microfiltration (MF1) and ultrafiltration membranes (UF1, 2, 3). Permeates were analyzed by means of real-time RT-PCR. Permeate is considered as positive when genome is detected.

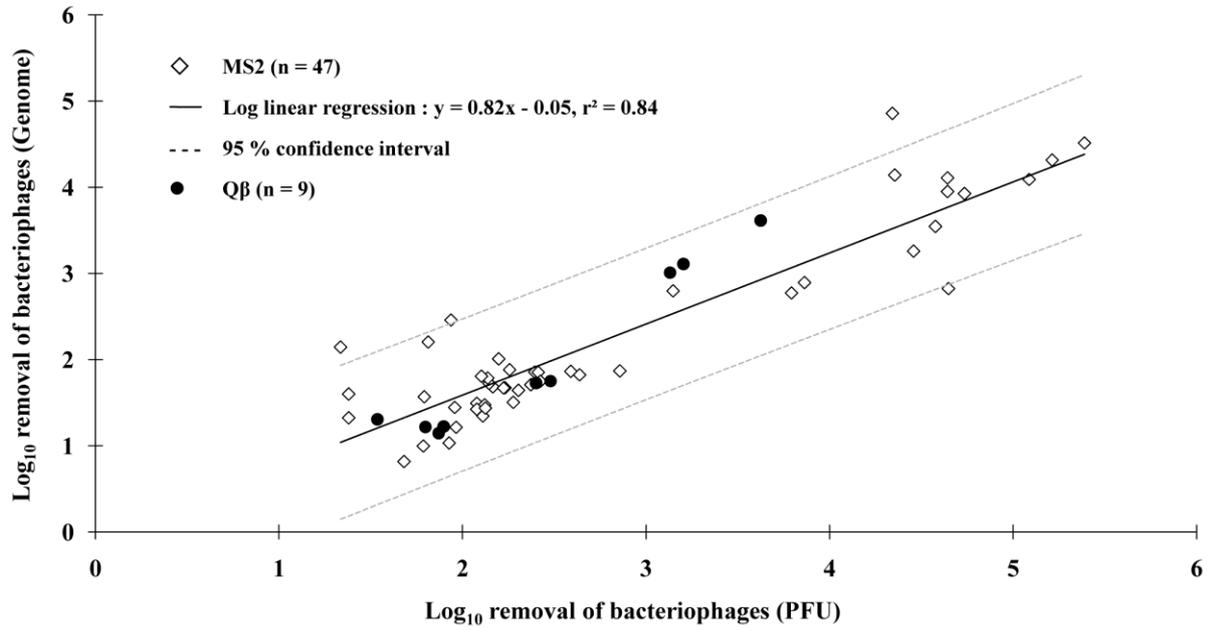
Membranes	MS2				Q $\beta$			
	Mean pore size ( $\mu\text{m}$ )	Positive permeates	Virus removal rate ( $\log_{10}$ )	Virus removal rate ( $\log_{10}$ )	Positive permeates	Virus removal rate ( $\log_{10}$ )	Virus removal rate ( $\log_{10}$ )	Virus removal rate ( $\log_{10}$ )
<b>MF1</b>	0.1	100 % (n=3)	1.79 $\pm$ 0.09	1.25 $\pm$ 0.05	100 % (n=3)	1.79 $\pm$ 0.09	1.25 $\pm$ 0.05	1.25 $\pm$ 0.05
<b>UF2</b>	0.05	100 % (n=3)	3.54 $\pm$ 0.56	1.54 $\pm$ 0.32	100 % (n=3)	3.54 $\pm$ 0.56	1.54 $\pm$ 0.32	1.54 $\pm$ 0.32
<b>UF3</b>	0.025	33 % (n=3)	> 4.89	3.25 $\pm$ 0.32	100 % (n=3)	> 4.89	3.25 $\pm$ 0.32	3.25 $\pm$ 0.32
<b>UF1</b>	0.01	0 % (n=3)	> 6	> 6	0 % (n=3)	> 6	> 6	> 6

**Figure Captions:**

**Figure 1:** Schematic representation of the bench-scale filtration apparatus.



**Figure 2:** MS2 (◇) and Qβ (●) phage removal rates by bench-scale membrane filtration in 0.2 mM PBS solution at neutral pH with microfiltration and ultrafiltration membranes. Phage removal rates obtained by PFU method (x-axis) and real-time RT-PCR method (y-axis) are expressed in log<sub>10</sub>. Lines are only guides to the eye.



**Nomenclature:**

MWCO	Molecular Weight Cut-Off (kDa)
<i>pI</i>	Isoelectric point
PFU	Plaque Forming Unit
PBS	Phosphate Buffer Saline
RT	Retro Transcription
PCR	Polymerase Chain Reaction
RNA	RiboNucleic Acid
dNTPs	deoxyriboNucleotide TriPhosphate
cDNA	complementary DeoxyriboNucleic Acid
MF	MicroFiltration
UF	UltraFiltration
PVDF	PolyVinyliDene Fluoride
PES	PolyEthylSulfone
AMV	Avian Myeloblastosis Virus

## **References**

- [1] R. van Reis and A. L. Zydney, Bioprocess membrane technology, *J. Membr. Sci.* 297 (2007) 16-50.
- [2] E. Rotureau, F. Thomas and J. F. L. Duval, Relationship between swelling and electrohydrodynamic properties of functionalized carboxymethyl-dextran macromolecules, *Langmuir*. 23 (2007) 8460-8473.
- [3] J. Langlet, F. Gaboriaud, C. Gantzer and J. F. L. Duval, Impact of chemical and structural anisotropy on the electrophoretic mobility of spherical soft-multilayer particles: the case of bacteriophage MS2, *Biophys. J.* 94 (2008) 3293-3312.
- [4] J. G. Jacangelo, R. Rhodes Trussell and M. Watson, Role of membrane technology in drinking water treatment in the United States, *Desalination*. 113 (1997) 119-127.
- [5] J. G. Jacangelo, S. S. Adham and L. J.M., Mechanism of cryptosporidium, giardia, and MS2 virus removal by MF and UF, *J. Am. Water Work Assoc.* (1995) 107-121.
- [6] G. Herath, K. Yamamoto and T. Urase, Removal of viruses by microfiltration membranes at different solution environments, *Water Sci. Technol.* 40 (1999) 331-338.
- [7] J. Y. Hu, S. L. Ong, L. F. Song, Y. Y. Feng, W. T. Liu, T. W. Tan, L. L.Y. and W. J. Ng, Removal of MS2 bacteriophage using membrane technologies, *Water Sci. Technol.* 47 (2003) 163-168.
- [8] J. F. Schijven and M. Hassanizadeh, Removal of Viruses by Soil Passage: Overview of Modeling, Processes, and Parameters, *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 30 (2000) 49-127.
- [9] E. M. van Voorthuizen, N. J. Ashbolt and A. I. Schafer, Role of hydrophobic and electrostatic interactions for initial enteric virus retention by MF membranes, *J. Membr. Sci.* 194 (2001) 69-79.

- [10] S. L. Penrod, T. M. Olson and S. B. Grant, Whole Particle Microelectrophoresis for Small Viruses, *J. Colloid Interface Sci.* 173 (1995) 521-523.
- [11] L. R. Overby, G. H. Barlow, R. H. Doi, M. Jacob and S. Spiegelman, Comparison of two serologically distinct ribonucleic acid bacteriophages. I. Properties of the viral particles, *J. Bacteriol.* 91 (1966) 442-448.
- [12] K. S. Zerda and C. P. Gerba, Agarose isoelectrofocusing of intact virions, *J. Virol. Methods.* 9 (1984) 1-6.
- [13] P. A. Shields and S. R. Farrah. (1987). Determination of the electrostatic and hydrophobic character of enteroviruses and bacteriophages. In *87th Annual Meeting. American Society of Microbiology*, Washington.
- [14] International Organisation for Standardisation. Water quality: Detection and enumeration of bacteriophages. Part 1: Enumeration of F-specific RNA bacteriophages. (1995) ISO 10705-1.
- [15] J. Langlet, F. Gaboriaud and C. Gantzer, Effects of pH on plaque forming unit counts and aggregation of MS2 bacteriophage, *J. Appl. Microbiol.* 103 (2007) 1632-1638.
- [16] L. Ogorzaly and C. Gantzer, Development of real-time RT-PCR methods for specific detection of F-specific RNA bacteriophage genogroups: application to urban raw wastewater, *J. Virol. Methods.* 138 (2006) 131-139.
- [17] B. Gassilloud, L. Schwartzbrod and C. Gantzer, Presence of viral genomes in mineral water: a sufficient condition to assume infectious risk? *Appl. Environ. Microbiol.* 69 (2003) 3965-3969.
- [18] L. Fiksdal and T. O. Leiknes, The effect of coagulation with MF/UF membrane filtration for the removal of virus in drinking water, *J. Membr. Sci.* 279 (2006) 364-371.

- [19] J. Langlet, F. Gaboriaud, J. F. L. Duval and C. Gantzer., Aggregation and surface properties of F-specific RNA phages: implication for membrane filtration processes, *Water Res.* 42 (2008) 2769-2777.
- [20] K. Farahbakhsh and D. W. Smith, Removal of coliphages in secondary effluent by microfiltration-mechanisms of removal and impact of operating parameters, *Water Res.* 38 (2004) 585-592.
- [21] L. Moce-Llivina, J. Jofre and M. Muniesa, Comparison of polyvinylidene fluoride and polyether sulfone membranes in filtering viral suspensions, *J. Virol. Methods.* 109 (2003) 99-101.
- [22] S. S. Madaeni, A. G. Fane and G. S. Grohmann, Virus removal from water and wastewater using membranes, *J. Membr. Sci.* 102 (1995) 65-75.

## **II. Impact de l'agrégation sur la diminution des unités infectieuses du phage MS2**

En phase aqueuse, la diminution des unités infectieuses peut être due à trois phénomènes : l'inactivation (perte d'infectiosité due à la dégradation ou à la modification de la capsid virale et/ou du génome), l'adhésion du virus au support de stockage et l'agrégation. Ces deux derniers phénomènes peuvent être réversibles mais, dans la littérature, ils sont rarement pris en compte pour expliquer une diminution des unités infectieuses. En effet, la diminution des UFP est souvent interprétée comme étant uniquement de l'inactivation. La méthode de référence (Norme ISO 10705-1, 1995) pour détecter et quantifier des bactériophages infectieux peut être sensible à l'agrégation. En effet, une UFP révélée par cette technique peut être due aussi bien à une particule virale isolée qu'à un agrégat de plusieurs virus. A notre connaissance, aucune étude ne relate le lien entre la taille des agrégats viraux et la diminution des UFP.

L'objectif de cet article est de déterminer si le phénomène d'agrégation des phages pouvait entraîner une diminution du nombre d'unités infectieuses. Pour cela, le bactériophage MS2 a été pris comme modèle.

Premièrement, des conditions pour lesquelles l'adhésion de MS2 sur le support de stockage était nulle furent choisies. Pour vérifier que l'adhésion était nulle, la quantification du génome viral par RT-PCR en temps réel au cours du temps et à plusieurs pH fut entreprise. La quantification du génome n'est pas affectée par les phénomènes d'agrégation car une étape d'extraction de l'ARN, dissociant les éventuels agrégats viraux, précède la mesure. Ainsi, une diminution de la quantité de génome ne peut être due qu'à de l'adhésion du virus au support ou à la dégradation même du génome. Pour un temps  $t = 4$  heures, aucune modification de la quantité de génome ne fut observée dans une solution de KCl 0,4 M contenant  $10^6$  UFPml<sup>-1</sup>, quel que soit le pH. Ainsi, l'adhésion du virus au support et la dégradation du génome peuvent être considérées comme nulles. Par contre, la quantité de virus infectieux diminue lorsque le pH diminue. A pH neutre, la diminution des UFP est négligeable alors que celle-ci est d'environ  $1 \log_{10}$  à pH 3,9 et jusque  $3 \log_{10}$  à pH 2,5. En parallèle, des mesures de taille furent réalisées avec deux appareils de résolution différente. Le premier appareil (Zetasizer ZS, Malvern) mesure la taille des particules de 0,6 nm à 6  $\mu\text{m}$  par diffusion de la lumière. Le deuxième (FPIA-3000, Sysmex) mesure des agrégats de 0,8 à 20  $\mu\text{m}$  par imagerie optique via une caméra CCD et un éclairage stroboscopique. Par contre, la sensibilité de ces appareils requiert des concentrations virales supérieures à  $10^9$  UFPml<sup>-1</sup>. Les mesures de taille réalisées

avec une concentration virale de  $10^{11}$  UFP.ml<sup>-1</sup> montrent clairement que la proportion d'agrégats micrométriques augmente quand le pH diminue. Pour des  $\text{pH} \leq pI$ , la majorité des particules virales (> 96%) sont sous forme agrégée. A forte force ionique (0,4 M) et pour des pH voisins du  $pI$ , les répulsions électrostatiques sont moins importantes que les interactions attractives et l'attraction entre particules est favorisée.

Malgré l'utilisation de deux concentrations ( $10^{11}$  versus  $10^6$  UFP.ml<sup>-1</sup> respectivement pour la détermination de la taille et de la diminution des UFP), nous donnons une estimation du taux d'agrégation maximum qui peut être obtenue avec des concentrations virales plus faibles. Par exemple, à pH 3,9 avec une suspension de  $10^{11}$  UFP.ml<sup>-1</sup>, les agrégats détectés mesurent de 600 nm à 4,5 µm. Si on suppose un modèle sphérique simple d'agrégat, de telles tailles suggèrent des agrégats formés de 8000 à  $3 \cdot 10^6$  particules virales de 30 nm de diamètre. Ceci entraînerait une diminution théorique des UFP de 3,9 à 6,5 log<sub>10</sub>. L'agrégation des virus peut largement expliquer une diminution de 1 log<sub>10</sub> des UFP à pH 3,9.

Ces résultats laissent donc supposer que l'agrégation des virus peut faire diminuer les UFP et ainsi provoquer un biais dans l'estimation de la concentration en virus *sensu stricto*.

ORIGINAL ARTICLE

## Effects of pH on plaque forming unit counts and aggregation of MS2 bacteriophage

J. Langlet<sup>1</sup>, F. Gaboriaud<sup>2</sup> and C. Gantzer<sup>1</sup>

1 Laboratoire de Chimie Physique et Microbiologie pour l'Environnement (LCPME), UMR 7564, CNRS-Nancy University, Faculté de Pharmacie, Nancy Cedex, France

2 Laboratoire de Chimie Physique et Microbiologie pour l'Environnement (LCPME), UMR 7564, CNRS-Nancy University, Faculté de Pharmacie, Villers-lès-Nancy, France

### Keywords

aggregation, isoelectric point, MS2 bacteriophages, plaque forming unit counts, pH.

### Correspondence

Christophe Gantzer, Laboratoire de Chimie Physique et Microbiologie pour l'Environnement (LCPME), UMR 7564, CNRS-Nancy University, Equipe Microbiologie et Physique, Faculté de Pharmacie, 5 rue Albert Lebrun B.P. 80403, F-54001 Nancy Cedex, France. E-mail: christophe.gantzer@pharma.uhp-nancy.fr

2006/1088: received 27 July 2006, revised 6 March 2007 and accepted 7 March 2007

doi:10.1111/j.1365-2672.2007.03396.x

### Abstract

**Aim:** The aim of this study was to determine whether aggregation processes in aqueous phase may explain the decrease in plaque forming unit (PFU) counts for pH close to the isoelectric point (pI) of viral particles (MS2 phages).

**Methods and Results:** Loss in PFU was observed for  $\text{pH} \leq \text{pI}$  ( $\text{pI}_{\text{MS2}} = 3.9$ ): for example, at pH 2.5, loss was approx.  $3 \log_{10}$  PFU. Particle size analysis combining results of dynamic light scattering and flow particle image analysis was then applied to determine the aggregate state of viral suspensions by recording size distributions. The size of major population significantly changed to 30 nm at neutral pH to more than several micrometres when passing below the isoelectric point.

**Conclusions:** Our study shows that MS2 phages exhibit significant aggregation processes for  $\text{pH} \leq \text{pI}$  leading to aggregate with sizes of few micrometres. This aggregation process can largely explain the decline in PFU counts.

**Significance and Impact of the Study:** It is clear that viral aggregation can be a source of significant bias for PFU assays because in the presence of an aggregate the PFU count can be less than the sum of its constituent particles. Therefore, cautions should be taken in terms of conditions of storage (pH far from pI) to avoid such aggregation artefact.

### Introduction

MS2 bacteriophage is a nonenveloped RNA virus with an icosahedral capsid measuring 22–29 nm in diameter (Golmohammadi *et al.* 1993; Blanch *et al.* 2002) with an isoelectric point of 3.9 (Overby *et al.* 1966). This RNA phage specifically infects bacterial strains, such as *Escherichia coli*, exhibiting F-pili structures in their cell wall. Because its structure is similar to that of many pathogenic enteric viruses, the MS2 phage is used as a model to estimate viral survival in water (Sobsey *et al.* 1995; Grabow 2001; Dawson *et al.* 2005) or to quantify virus elimination by membrane filtration processes (Jacangelo *et al.* 1995; Lytle and Routson 1995; Herath *et al.* 1999; Hu *et al.* 2003).

To understand pathogenic virus behaviour in the environment or their resistance to treatment better, the systems classically used in the laboratories are constituted by viral suspensions stored in different kinds of containers (glass, polystyrene, etc.). Viruses are usually quantified by counting infectious units (plaque forming units or PFU) (Jacangelo *et al.* 1995; Feng *et al.* 2003; Olson *et al.* 2004; Dawson *et al.* 2005). One unit can be constituted either by one individual viral particle or by a single aggregate (containing several individual viral particles).

In such laboratory systems, high viral concentrations are needed to follow the decrease over several logarithmic units (up to  $10^6$  viral particles per millilitre) (Allwood *et al.* 2003; Feng *et al.* 2003). Such high viral titres are much higher than would be found in nature but are used

to study viral survival during treatment. Decline in the number of infectious units in the aqueous phase can be due to inactivation (loss of infectivity), adhesion to support (Gassilloud and Gantzer 2005) or aggregation (Floyd and Sharp 1979). The latter two phenomena are known to be reversible (Gassilloud and Gantzer 2005) but are very rarely taken into account despite the fact that they could be a source of significant bias. For example, adhesion or aggregation could be interpreted as inactivation. Moreover, in the presence of aggregates, the 'apparent' resistance to applied treatments, for example, UV or chlorine dioxide during water disinfection can be higher than observed with individual particles. These aggregates can also be more easily eliminated than individual particles during membrane filtration by size exclusion and not only by electrostatic attraction with the membrane. Therefore, membrane efficiency might be overestimated.

Aggregation is a well-known phenomenon described in colloid science. It depends on a large number of environmental parameters such as pH, ionic strength and temperature and is also related to colloidal surface properties. Few studies have been specifically devoted to viral aggregation, systematically examining the relationship between the aggregation state of viral particles and infectious units. Floyd and Sharp (1979) used electron microscopy and single particle approximation to study *Poliovirus* and *Reovirus* aggregation. Unfortunately, no data are available concerning the relationship between loss of infectious units and size of viral aggregates.

Using MS2 phage ( $pI = 3.9$ , Overby *et al.* 1966) as a model, the aim of this study was to estimate the impact of pH on PFU counts on one hand and on viral aggregate size on the other, to our knowledge areas totally unexplored to date. We first selected conditions in which adhesion to supportive walls was zero. This enabled us to determine whether or not aggregation processes could explain the decrease in PFU counts observed for pH close to  $pI$ .

## Materials and methods

### MS2 bacteriophages and infectious units detection

MS2 phages (ATCC 15597-B1) were replicated according to standard procedure (ISO 10705-1 1997) without a  $CHCl_3$  lysis step and using *E. coli* Hfr K12 (ATCC 23631)

as the bacteria host. The sample was centrifuged ( $27\,000 \times g$ , 60 min,  $4^\circ C$ ; Beckman Coulter, Fullerton CA, USA, model J2-22) and the supernatant was filtered through a  $0.22\text{-}\mu m$  membrane (Millipore, Billerica, MA, USA, SLGP033RS). The viral suspension was then dialysed (100 kDa MWCO, Spectrum, Breda, the Netherlands, 235071) against a KCl solution ( $0.4\text{ mol l}^{-1}$ ,  $pH = 6.7$ ) for 14 h and subsequently filtered ( $0.22\text{ }\mu m$ ). The viral suspension was checked by electronic microscopy to be sure that the start suspension contained no aggregates. Finally, the viral suspension was stored as stock suspension at  $4^\circ C$ . The final viral concentration was  $10^{11}$  PFU  $ml^{-1}$ .

The double agar layer procedure (ISO 10705-1, 1997) was used to quantify infectious units in one millilitre.

### Viral genome quantification

#### Viral RNA extraction

Viral RNA was extracted from  $140\text{ }\mu l$  using the QIAmp viral RNA mini kit (QIAGEN, S.A., France, 52906). Extracted RNA was then eluted in  $60\text{ }\mu l$  of elution buffer.

#### Primers and probe

The primers and probe were designed with Primer Express software (1.0, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) applied to the MS2 genome sequence (Genbank NC001417). The resulting sequences are described in Table 1.

#### cDNA synthesis

Extracted RNA ( $5\text{ }\mu l$ ) was heated for 3 min at  $95^\circ C$  before mixing with the reverse primer (MS2-r) at a final concentration of  $1\text{ }\mu mol\text{ l}^{-1}$  in  $20\text{ }\mu l$  to initiate the cDNA synthesis. The reverse transcription (RT) mix also contained:  $4\text{ }\mu l$  of  $5 \times RT$  buffer [ $250\text{ mmol l}^{-1}$  Tris-HCl ( $pH\ 8.4$ ),  $50\text{ mmol l}^{-1}$   $MgCl_2$ ,  $350\text{ mmol l}^{-1}$  KCl,  $15\text{ mmol l}^{-1}$  dithiothreitol,  $2.5\text{ mmol l}^{-1}$  spermidine], 40 U of RNase inhibitor (Promega, Madison, WI, USA, N2111),  $0.25\text{ mmol l}^{-1}$  of each deoxynucleoside triphosphate (Applied Biosystems, N8080260), 10 U of AMV reverse transcriptase (Promega, M5108) and  $6\text{ }\mu l$  of DNase-RNase-free water (Sigma-Aldrich, Co., St Louis, MO, USA, W4502). RT was performed at  $42^\circ C$  for 60 min. RNA-DNA hybrids were then denatured, and reverse transcriptase was inactivated by heating at  $95^\circ C$  for 5 min. The resulting cDNA was then quantified by real-time PCR.

**Table 1** Primers and probe

Primer or probe	Sequence (5'-3')	Localization on MS2 genome
MS2-f	5'-ACCCGTACCTCGGGTTTCC-3'	3180-3198
MS2-r	5'-CACTGTCGTGCTTTTCGCTG-3'	3233-3252
MS2-p	5'-f-TGCTCGTATCGCTCGAGAACGCAAG-t-3'*	3203-3227

\*f, 6-carboxyfluorescein reporter dye; t, 6-carboxy-N'-tetramethylrhodamine quencher dye.

### Real-time polymerase chain reaction

Five microlitres of cDNA were mixed with 25  $\mu\text{l}$  of  $2 \times$  Taqman Universal Master Mix (Applied Biosystems, 4304437), 16.5  $\mu\text{l}$  of nuclease-free water, 1.25  $\mu\text{l}$  of forward (MS2-f) and 1.25  $\mu\text{l}$  reverse (MS2-r) primers to obtain a final concentration of 0.5  $\mu\text{mol l}^{-1}$ , and 1  $\mu\text{l}$  Taqman probe (MS2-p) giving a final concentration of 0.3  $\mu\text{mol l}^{-1}$ . Amplification and detection were performed with an ABI Prism 7700 sequence detection system (Perkin Elmer Co., Waltham, MA, USA). The amplification ramp was carried out as: (i) 2 min at 50°C to activate the uracil *N*-glycosylase and subsequently (ii) 10 min at 95°C to release the activity of the hot start DNA polymerase, and finally (iii) 50 cycles of 15 s at 95°C and 60 s at 60°C. Real-time fluorescence measurements were obtained and directly analysed using ABI prism 7700 sequence detection system software. The cycle threshold was calculated by determining the point at which fluorescence exceeded a threshold limit. This value is directly linked to viral genome quantity.

### Size analysis

The aggregate state of viral suspensions was determined by particle size analysis as defined by combining results of dynamic light scattering and flow particle image analysis (FPIA). Particle sizes of viral suspensions were first determined using Zetasizer ZS (Malvern Instruments, Malvern, UK). Six hundred microlitres of samples were analysed using disposable cells (Malvern, UK). Size distributions were measured from the photon correlation spectroscopy system over a wide range from 0.6 nm to 6  $\mu\text{m}$ . The same samples were also analysed using the FPIA-3000 system (Sysmex Co., Kobe, Japan). The samples were passed through a measurement cell where images of the aggregates were captured by stroboscopic illumination and a CCD camera. In this case, resolution was between 0.8 and 20  $\mu\text{m}$  with a high power field and a  $20 \times$  primary lens. The sensitivity of the two apparatus requires high viral titres (up to  $10^9$  PFU  $\text{ml}^{-1}$ ). In the two experimental set-ups, the initial viral suspensions in KCl ( $10^{11}$  PFU  $\text{ml}^{-1}$ ) were adjusted at different pH (2.5, 3.9 and 6.7) prior size analysis.

### Experimental design

For PFU experiments or genome quantification, KCl 0.4 mol  $\text{l}^{-1}$  was adjusted at different pH, respectively, 2.5, 3.9 and 6.7. All solutions were sterilized by autoclaving (121°C, 20 min). In a polystyrene container (Nalge Nunc International, Rochester, NY, USA 156502) containing 500 ml solution, MS2 phage stock suspension was added to obtain a final concentration of  $10^6$  PFU  $\text{ml}^{-1}$ . Suspensions were stirred at 20°C and samples were collected 4 h later. The samples were stored at  $-80^\circ\text{C}$  before analysis.

Decay rates in each system were determined by plotting the  $\log_{10}$  of the fractional decrease in MS2 PFU,  $\log_{10}(C/C_0)$ .  $C$  represents virus PFU counts at time  $t = 4$  h,  $C_0$  represents initial titre of MS2 inoculated in each system. MS2 genome was also quantified at  $t = 0$  and 4 h after stirring. The experimental data were plotted on a  $\log_{10}(N/N_0)$  scale, where  $N$  represents genome quantity at time  $t = 4$  h and  $N_0$  the initial quantity of MS2 genome poured into each system.

## Results

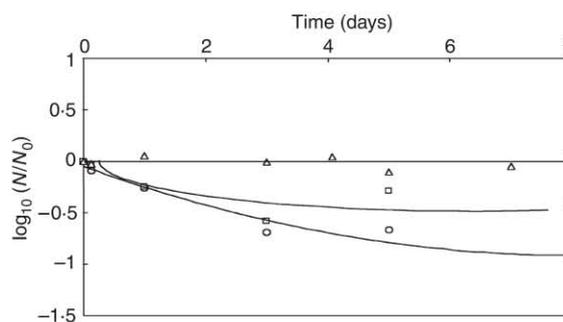
### Determination of conditions without adhesion of bacteriophages to container

The quantification of viral genome is not affected by aggregation processes as the procedure disrupts all the viral capsids corresponding independently to individual or aggregated viral structures. Therefore, changes in genome quantity in the aqueous phase are related in some part to the adhesion of virus on supportive surfaces or to the degradation of viral genome.

Genome quantity was followed in KCl 0.4 mol  $\text{l}^{-1}$  containing  $10^6$  PFU  $\text{ml}^{-1}$  MS2 phage as a function of time (between 0 and 8 days) for the three pH (6.7, 3.9 and 2.5). No significant decrease in genome quantity was noted at pH 6.7. Maximum decrease ( $N/N_0$ ) in genome quantity was about 0.5  $\log_{10}$  at pH 3.9 and up to 1  $\log_{10}$  at pH 2.5 after 8 days (Fig. 1). Irrespective of pH, no significant decrease could be observed for a timescale less than 4 h. Therefore, all subsequent experiments were performed within a timescale of 4 h or less. In such conditions, no significant adhesion to container can occur.

### Decrease in plaque forming unit for different pH

PFU decrease was monitored in KCl 0.4 mol  $\text{l}^{-1}$  containing  $10^6$  PFU  $\text{ml}^{-1}$  MS2 phages after 4 h at pH 6.7, 3.9



**Figure 1** Decrease of viral genome ( $\log N/N_0$ ) as a function of time at different pH values. ( $\Delta$ ) pH 6.7; ( $\square$ ) pH 3.9 and ( $\circ$ ) pH 2.5. The lines are guide for the eyes.

and 2.5. Results are given in Table 2. No decrease was observed at pH 6.7 while at pH 3.9 and 2.5, a 1.11 and 3.00  $\log_{10}$  decreases were observed, respectively. As the absence of significant adhesion was demonstrated previously for this timescale, this decrease was attributed to inactivation or aggregation.

### Size analysis of viral suspensions

#### Nanometric distributions

The Zetasizer instrument was used to measure the size distributions after 4 h in potassium chloride solution ( $0.4 \text{ mol l}^{-1}$ ) at pH values 6.7, 3.9 and 2.5 and an initial virus concentration of  $10^{11} \text{ PFU ml}^{-1}$ . The experimental data were plotted by considering three statistical groups of different sizes: (i) less than 30 nm corresponding to the individual viral particle, (ii) between 30 nm and  $2 \mu\text{m}$  and (iii) between 2 and  $6 \mu\text{m}$ . Obviously, the two latter groups correspond to aggregates. Notice that aggregates measuring greater than  $6 \mu\text{m}$  could not be measured with this instrument.

The intensity frequencies for these three groups as a function of pH are plotted in Fig. 2. Aggregation increased with decreasing pH (from 3.9 to 2.5): at pH 3.9 only 1.4% of individual viral particles (<30 nm) remained

and no individual particles could be detected at pH 2.5. This decline in the proportion of individual viral particles in acid media was related to both increased proportion in the two other size groups and increased aggregate size. Aggregates measuring between 30 nm and  $2 \mu\text{m}$  were more predominant at pH 3.9 (74.8%) compared with neutral pH (37%); a more acidic media (pH 2.5) accentuated this trend, increasing the proportion (83.5%) of aggregates in this size group.

At low pH (3.9 and 2.5), at least 96% of viral particles were aggregated. Nevertheless at pH 2.5, the proportion of the largest aggregates ( $2\text{--}6 \mu\text{m}$ ) was smaller than samples at pH 3.9 with a wide standard deviation. This size variability can be explained by the stochastic formation of aggregates, and because the large aggregates (around  $6 \mu\text{m}$ ) are close to the resolution of Zetasizer and could be not taken into account.

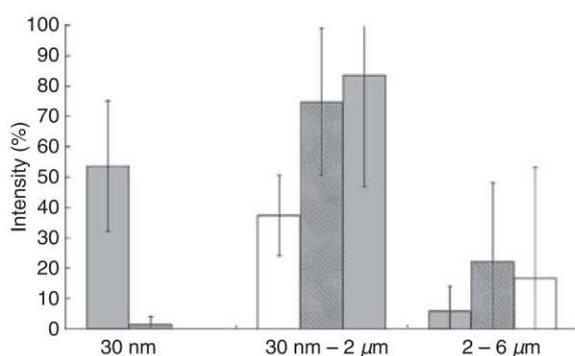
#### Micrometric distributions

To enlarge the size range, samples were analysed with FPIA-3000 which enables quantification of aggregate size from 0.8 to  $20 \mu\text{m}$  and the determination of aggregate circularity. The experimental data were recorded and the resulting circularities are plotted in Fig. 3 as a function of size. These results demonstrated an increase in the number of micrometric aggregates with decreasing pH, in line with the previous trend observed in the nanometric range (see 'Nanometric distributions' section). Moreover, circularity measurements showed that aggregation is probably a random phenomenon because of the wide range of shape and size. The measured circularity of viral aggregates displaying great variability from 1 (spherical shape) to 0 (rough shape). In addition, FPIA-3000 showed that from pH 3.9 to 2.5 aggregate size varied from 2 to  $20 \mu\text{m}$ , whereas Zetasizer ZS was unable to discriminate mean intensity between these two pH values.

**Table 2** Mean values of PFU decrease ( $\log C/C_0$ ) with SD ( $\pm$ ) for MS2 phage in KCl at pH 6.7, 3.9 and 2.5 after 4 h of stirring

pH 6.7	pH 3.9	pH 2.5
$0.23 \pm 0.15$ ( $n = 8$ )	$-1.11 \pm 0.39$ ( $n = 5$ )	$-3.00 \pm 0.99$ ( $n = 12$ )

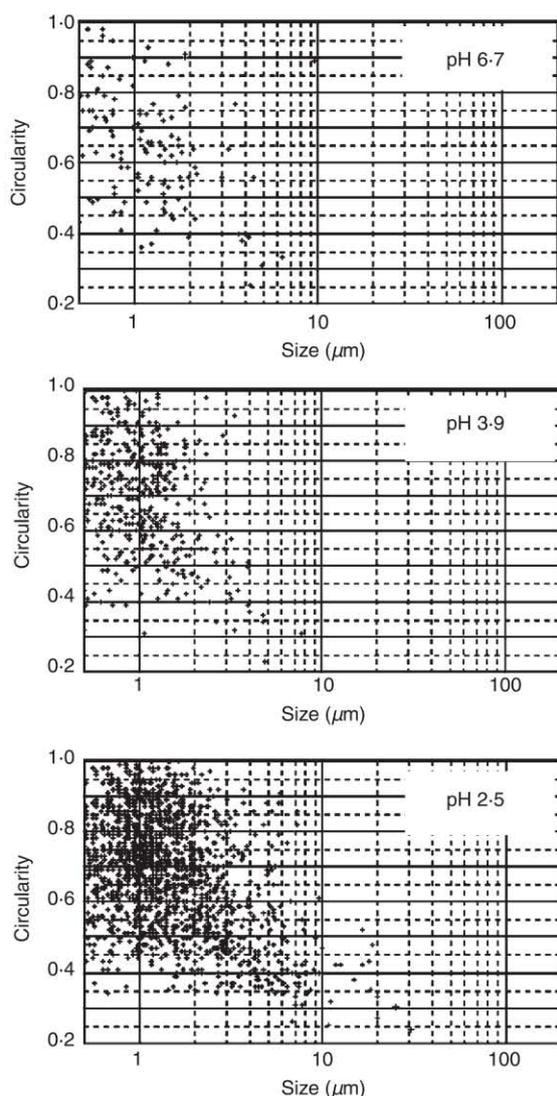
C represents virus PFU counts at time  $t = 4 \text{ h}$ ,  $C_0$  represents initial titre of MS2 inoculated in each system and  $n$  the number of replicates.



**Figure 2** Distribution of three groups of size of MS2 bacteriophage aggregates ( $30.8 \pm 9.4 \text{ nm}$ ; between 30 nm and  $2 \mu\text{m}$ ; between 2 and  $6 \mu\text{m}$ ) in function of intensity (%) at different pH (■, 6.7, ▒, 3.9 and □, 2.5).

### Discussion

The primary goal of this work was to determine whether aggregation processes might explain the decline in PFU counts observed when pH decreases. Assessment of aggregation and adhesion, which result from colloidal surface properties, is far from an easy task for soft particles whose colloid surfaces exhibit hydrophobic features and participate in electrostatic interactions. It is well established from electrostatic double-layer theory that long-range electrostatic interactions are enhanced with decreasing ionic strength and also with pH, farther and farther from the isoelectric point (pI is defined as the pH of zero potential). Such interactions are basically described from quantitative estimates of surface charge, as obtained from microelectrophoresis. Unfortunately, for



**Figure 3** Circularity in function of size of MS2 aggregates in KCl at pH 6-7, 3-9 and 2-5. Each point corresponds to one analysed aggregate with size in micrometre and shape circularity. The circularity corresponds to the circumference of circle of equivalent area divided by the actual perimeter of the aggregate. The more spherical the aggregate is, closer the circularity is to 1, the more elongated or rough-edged the aggregate is closer the circularity is to 0.

MS2 the only data available describe an estimated isoelectric point close to 3.9 measured at one ionic strength (Overby *et al.* 1966, Zerda and Gerba 1984).

In aqueous media with viruses, three phenomena can produce a decline in PFU counts: inactivation, aggregation or adhesion to the container. Thus, for adequate interpretation of PFU counts, it is crucial to study the

relationship between effective loss of infectivity and the aggregation and/or adhesion processes which might interfere with viral inactivation. This is very well illustrated by our results concerning the behaviour of infectious units. Our results show that for  $\text{pH} < \text{pI}$  ( $\text{pH} 2.5$ ), PFU counts fell about  $3 \log_{10}$ . This observation has been previously described in buffers or environmental waters for other viruses. Gassilloud and Gantzer (2005) demonstrated that for *Poliovirus 1*, the decrease is mainly due to adhesion to the hydrophobic support. Salo and Cliver (1976) observed a decrease of  $2 \log_{10}$  in 6 h for *Poliovirus 1* stored in  $1 \text{ mol l}^{-1}$  KCl at pH 3 and suggest as Olson *et al.* (2004) that low pH can cause damage to viral capsid proteins or exposed nucleic acid. Floyd and Sharp (1979) suggested that *Poliovirus 1* and *Reovirus* are aggregated in such conditions. Therefore, if no other information is available, decrease in PFU counts can be explained equally well by adhesion, inactivation or aggregation phenomena.

Adhesion to a hydrophobic container can be assumed to be due to hydrophobic interactions when electrostatic repulsion is minimized for pH equal to or below pI or for high ionic strength (Azeredo *et al.* 1999; Hermansson 1999). MS2 phage is known to be one of the most hydrophobic phages (Lytle and Routson 1995) and is therefore a good candidate for adhesion to hydrophobic containers. Several authors showed that hydrophobic interactions are more important than electrostatic interactions for the adhesion of MS2 bacteriophages to surfaces (Lytle and Routson 1995; van Voorthuizen *et al.* 2001; Shields and Farrah 2002). Like pH, ionic strength is also important to neutralize surface charge (Azeredo *et al.* 1999; Hermansson 1999). For example, Shields and Farrah (2002) showed that numerous viruses adhere to hydrophobic membranes with  $4 \text{ mol l}^{-1}$  NaCl (pH 7) neutralized charges. Gassilloud and Gantzer (2005) observed a decrease for *Poliovirus 1* in phosphate buffer stored in a hydrophobic polypropylene container. This decrease was explained by adhesion (near  $1.5 \log_{10}$  units) for pH below or equal to the isoelectric point of the *Poliovirus 1* (pI 6.6). Other studies have found little adhesion to hydrophobic supports for MS2 phages in wastewater in less than 1 day (Olson *et al.* 2004). In the present study, we demonstrated that for an ionic strength of  $0.4 \text{ mol l}^{-1}$ , adhesion to the container did not have a significant impact in our system irrespective of pH, at least for a short time ( $\leq 4$  h).

Size analysis of the viral suspension ( $10^{11}$  PFU  $\text{ml}^{-1}$ ) gave additional insight regarding the aggregation process. In neutral condition ( $\text{pH} = 6.7$ ), the predominant population had an average size close to 30 nm, in agreement with the expected dimensions (22–29 nm) for individual viral particles. By decreasing the pH, we demonstrated that pH has a significant effect on size distributions.

Indeed, at  $\text{pH} \leq \text{pI}$ , most of the viral particles (>96%) were aggregated with micrometric predominant populations. When pH of the media was near the isoelectric point of MS2 (pI 3.9), electrostatic repulsions were less important than van der Waals and hydrophobic interactions and these attractive interactions became significant. Neutralization of electrostatic interactions favoured contact between viruses and thus enhanced aggregation.

Looking at the overall results, it is very clear that pH enhances aggregation in viral suspension. It is also clear that this the aggregation process associated to the decrease of pH contributes to the decrease in PFU counts. Although the two types of experiments have not been performed with the same viral concentrations ( $10^{11}$  vs  $10^6$  PFU  $\text{ml}^{-1}$  for size analysis and PFU counts, respectively), general trend can be estimated by comparing these data. In a viral suspension of  $10^6$  PFU  $\text{ml}^{-1}$ , at pH 3.9, the loss in PFU was around  $1 \log_{10}$  after 4 h. In a viral suspension of  $10^{11}$  PFU  $\text{ml}^{-1}$ , the detected aggregates size was between 600 nm and  $4.5 \mu\text{m}$  in the same conditions. Under a spherical model such size implies aggregates including  $8000\text{--}3 \cdot 10^6$  viral particles. This means a theoretical decrease in PFU between 3.9 and  $6.5 \log_{10}$  units. Even if the spherical model overestimates these values (see FPIA results), aggregation may easily explain the loss of  $1 \log_{10}$  in PFU counts. At pH 2.5, the loss was more variable but close to  $3 \log_{10}$  in PFU. In  $10^{11}$  PFU  $\text{ml}^{-1}$  viral suspension the detected aggregates size was between 2 and  $6 \mu\text{m}$ . Under the same spherical model this implies a theoretical loss in PFU of  $5.5$  to  $6.9 \log_{10}$  units. Once again aggregation may explain the loss of  $3 \log_{10}$  in PFU counts.

Obviously, viral concentration will have an impact on aggregation processes. Nevertheless, because of the detection threshold, aggregate sizes cannot be estimated in  $10^6$  PFU  $\text{ml}^{-1}$  viral suspensions. Using a  $10^{11}$  PFU  $\text{ml}^{-1}$  viral suspension to define aggregates size gives a good estimation of the maximum value which can be achieved in lower viral suspensions. Therefore, aggregation could explain the entire loss of PFU in the  $10^6$  PFU  $\text{ml}^{-1}$  viral suspensions. Whatever the mechanism, aggregation seems to be an important phenomenon.

In conclusion, this study shows that MS2 phages exhibit significant aggregation processes for  $\text{pH} \leq \text{pI}$ . Aggregate sizes up to a few micrometres can be observed. Taking into account the fact that disinfection processes or membrane filtration efficiency are usually evaluated at high viral concentration, such phenomena could lead to an overestimation of virus removal. Considering our findings, the conditions of storage should be controlled to avoid aggregation and thus bias during PFU determination. pH near or below the isoelectric point must be avoided in order to prevent loss of infectious units due to

aggregation. For MS2 phage this means acid pH, while for other viruses pI is close to neutral pH (6.6 for *Poliovirus 1*, Zerda and Gerba 1984; 5.8 for HAV, Kukavica-Ibrulj *et al.* 2004).

### Acknowledgement

This study was performed with the financial support of ACTIA.

### References

- Allwood, P.B., Malik, Y.S., Hedberg, C.W. and Goyal, S.M. (2003) Survival of F-specific RNA coliphage, feline calicivirus, and *Escherichia coli* in water: a comparative study. *Appl Environ Microbiol* **69**, 5707–5710.
- Azeredo, J., Visser, J. and Oliveira, R. (1999) Exopolymers in bacterial adhesion: interpretation in terms of DLVO and xDLVO theories. *Colloids Surf B Biointerfaces* **14**, 141–148.
- Blanch, E.W., Hecht, L., Syme, C.D., Volpetti, V., Lomonossoff, G.P., Nielsen, K. and Barron, L.D. (2002) Molecular structures of viruses from Raman optical activity. *J Gen Virol* **83**, 2593–2600.
- Dawson, D.J., Paish, A., Staffell, L.M., Seymour, I.J. and Appleton, H. (2005) Survival of viruses on fresh produce, using MS2 as a surrogate for *Norovirus*. *J Appl Microbiol* **98**, 203–239.
- Feng, Y.Y., Ong, S.L., Hu, J.Y., Tan, X.L. and Ng, W.J. (2003) Effects of pH and temperature on the survival of coliphages MS2 and Qbeta. *J Ind Microbiol Biotechnol* **30**, 549–552.
- Floyd, R. and Sharp, D.G. (1979) Viral aggregation: buffer effects in the aggregation of *Poliovirus* and *Reovirus* at low and high pH. *Appl Environ Microbiol* **38**, 395–401.
- Gassilloud, B. and Gantzer, C. (2005) Adhesion-aggregation and inactivation of *Poliovirus 1* in groundwater stored in a hydrophobic container. *Appl Environ Microbiol* **71**, 912–920.
- Golmohammadi, R., Valegard, K., Fridborg, K. and Liljas, L. (1993) The refined structure of bacteriophage MS2 at 2.8 Å resolution. *J Mol Biol* **234**, 620–639.
- Grabow, W.O.K. (2001) Bacteriophages: update on application as models for viruses in water, ISSN 0378-4738. *Water SA* **27**, 251–268.
- Herath, G., Yamamoto, K. and Urase, T. (1999) Removal of viruses by microfiltration membranes at different solution environments. *Water Sci Technol* **40**, 331–338.
- Hermansson, M. (1999) The DLVO theory in microbial adhesion. *Colloids Surf B Biointerfaces* **14**, 105–119.
- Hu, J.Y., Ong, S.L., Song, L.F., Feng, Y.Y., Liu, W.T., Tan, T.W., Lee, L.Y. and Ng, W.J. (2003) Removal of MS2 bacteriophage using membrane technologies. *Water Sci Technol* **47**, 163–168.
- ISO 10705-1. (1997) Water quality-detection and enumeration of bacteriophages.

- Jacangelo, J.G., Adham, S.A. and Laine, J.M. (1995) Mechanism Cryptosporidium, Giardia, and MS2 virus removal by microfiltration and ultrafiltration. *J Am Water Works Assoc* **87**, 107–121.
- Kukavica-Ibrulj, I., Darveau, A., Jean, J. and Fliss, I. (2004) Hepatitis A virus attachment to agri-food surfaces using immunological, virological and thermodynamic assays. *J Appl Microbiol* **97**, 923–934.
- Lytle, C.D. and Routson, L.B. (1995) Minimized virus binding for tests of barrier materials. *Appl Environ Microbiol* **61**, 643–649.
- Olson, M.R., Axler, R.P. and Hicks, R.E. (2004) Effects of freezing and storage temperature on MS2 viability. *J Virol Methods* **122**, 147–152.
- 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. *J Bacteriol* **91**, 442–448.
- Salo, R.J. and Cliver, D.O. (1976) Effect of acid pH, salts, and temperature on the infectivity and physical integrity of enteroviruses. *Arch Virol* **52**, 269–282.
- Shields, P.A. and Farrah, S.R. (2002) Characterization of virus adsorption by using DEAE-Sepharose and Octyl-Sepharose. *Appl Environ Microbiol* **68**, 3965–3968.
- Sobsey, M.D., Hall, R.M. and Hazard, R.L. (1995) Comparative reductions of hepatitis A virus, enteroviruses and coliphage MS2 in miniature soil columns. *Water Sci and Technol* **31**, 203–209.
- van Voorthuizen, E.M., Ashbolt, N.J. and Schäfer, A.I. (2001) Role of hydrophobic and electrostatic interactions for initial enteric retention by MF membranes. *J Memb Sci* **194**, 69–79.
- Zerda, K.S. and Gerba, C.P. (1984) Agarose isoelectric focusing of intact virions. *J Virol Methods* **9**, 1–6.

### **III. Discrimination de l'agrégation et de l'inactivation**

L'agrégation pouvant avoir un effet significatif sur les UFP, il nous a paru intéressant de tenter de discriminer les effets liés à l'agrégation de ceux liés à l'inactivation. Pour cela nous avons procédé en deux étapes. Dans un premier temps, nous avons sélectionné les paramètres ayant un impact sur la baisse des UFP. Neuf paramètres ont ainsi été testés : la concentration en virus, le type de virus, le pH, la force ionique, le type de cations, le type d'anions, le niveau de purification du stock viral, la congélation et le temps. Dans un deuxième temps, la baisse des UFP et la taille des particules ont été mesurées simultanément uniquement sur les paramètres ayant un effet significatif.

L'application d'un plan factoriel fractionnaire de type  $2^{9-4}$  a permis de déterminer l'effet de chaque paramètre sur la diminution des UFP. Quatre paramètres ont été retenus puis un deuxième plan factoriel complet  $2^4$  a permis de déterminer l'effet de chaque paramètre sur la diminution des UFP de MS2 et sur la taille des particules mesurées. L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel MINITAB<sup>®</sup>. La préparation des stocks viraux ainsi que le protocole expérimental sont détaillés ci-dessous.

#### **III. 1. Préparation des suspensions virales**

Deux souches représentatives de bactériophages ARN F-spécifiques, MS2 et Q $\beta$ , appartenant respectivement aux génogroupes I (GI) et III (GIII), ont été sélectionnées. Les phages MS2 ont été obtenus à partir d'une culture de référence (ATCC 15597-B1). Le bactériophage Q $\beta$  a été fourni par J. Jofre (Université de Barcelone, Espagne).

Les bactériophages MS2 et Q $\beta$  ont été répliqués selon une procédure normalisée (ISO 10705-1, 1995) sans phase de lyse par CHCl<sub>3</sub> et en utilisant *E. coli* Hfr K12 (ATCC 23631) en tant que bactérie hôte. Après répllication, les suspensions virales ont été centrifugées (Beckman, modèle J2-22, 27 000 x g, 60 min, 4°C) et le surnageant a été filtré à travers une membrane de 0,22  $\mu$ m (Millipore, SLGP033RS). Cette suspension virale a été stockée à 4°C et considérée comme la suspension brute, non purifiée.

Afin d'obtenir une suspension virale purifiée, des dialyses sont nécessaires. Dans un premier temps, les suspensions ont donc été dialysées contre de l'eau ionisée (0,1  $\mu$ S.cm<sup>-1</sup>) pendant 14 heures, puis une deuxième fois contre les solutions suivantes : Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 100 mM ou 1 mM ; MgSO<sub>4</sub> 100 mM ou 1 mM ; Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 100 mM ou 1 mM ; NaNO<sub>3</sub> 100 mM ou 1 mM, à pH 7, pendant 14 heures. Les suspensions ont ensuite été filtrées (0,22  $\mu$ m). La concentration

finale en virus était d'environ  $10^{11}$  UFP.ml<sup>-1</sup> et les suspensions ont été stockées en tant que suspensions purifiées à 4°C avant chaque expérience. La méthode standardisée (ISO 10705-1, 1995) a été utilisée afin de quantifier les unités infectieuses.

### **III. 2. Protocole expérimental**

Les effets de neuf paramètres physico-chimiques sur les unités infectieuses des phages ont été testés à travers deux analyses. Les neuf paramètres testés sont : le type de virus (MS2 / Qβ), le pH (2,5 / 7), les cations (Na<sup>2+</sup> / Mg<sup>2+</sup>), les anions (NO<sub>3</sub><sup>-</sup> / SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>), la congélation (-80°C / 4°C), le temps d'expérimentation (3 heures / 3 jours), l'étape de purification (dialyse ou non), la concentration initiale de MS2 ( $10^8$  UFP.ml<sup>-1</sup> /  $10^6$  UFP.ml<sup>-1</sup>) et la force ionique (1 mM / 100 mM). Différents milieux ont servis à l'analyse des effets du pH, des cations, des anions et de la force ionique. Les milieux contenant Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>, Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> ou NaNO<sub>3</sub> ont été constitués avec deux forces ioniques (1 mM ou 100 mM) et avec deux valeurs de pH différentes (2,5 ou 7). Toutes les solutions ont été stérilisées par autoclavage (121°C, 20 min).

Dans un container en polystyrène (Nalgen Nunc International, 156502), la suspension de phages (brute ou dialysée) a été ajoutée à 500 ml de solution afin d'obtenir une concentration finale de  $10^6$  ou  $10^8$  UFP.ml<sup>-1</sup>. Les suspensions ont été agitées à 4°C et des échantillons ont été prélevés après 3 heures ou 3 jours. Les échantillons ont été stockés à -80°C avant les analyses ou ont été directement analysés sans étape de congélation. Durant la première analyse, seul le nombre de phages infectieux MS2 et Qβ a été mesuré d'après la méthode standard (ISO 10705-1, 1995). Dans chaque système, l'abatement viral est déterminé par le log<sub>10</sub> de C/C<sub>0</sub>. C représente la concentration virale en UFP.ml<sup>-1</sup> au temps t et C<sub>0</sub> représente la concentration virale initiale en UFP.ml<sup>-1</sup> de MS2 ou Qβ inoculée dans chaque système.

Pour la seconde analyse, seules les suspensions purifiées dialysées contre une solution de NaNO<sub>3</sub> 1 mM (pH 7) ont été utilisées. Pour les mesures de taille, la sensibilité de l'appareil (ZetaSizer, Malvern) nécessite des concentrations importantes de suspensions virales purifiées. Pour atteindre de telles concentrations, 15 ml d'une suspension de MS2 à  $10^{11}$  UFP.ml<sup>-1</sup> ont été filtrés (0,22 μm) et versés dans un tube en polypropylène (Sarstedt, 60.9922.241). Les suspensions virales de Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> à 100 mM et 1 mM ainsi que les suspensions virales de NaNO<sub>3</sub> de 100 mM ont été obtenues en ajoutant respectivement des aliquots de Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 2 M ou 20 mM et de NaNO<sub>3</sub> 1 M ou 10 mM dans les suspensions

virales de NaNO<sub>3</sub> à 1 mM filtrées initialement (0,22 µm). Le pH de chaque échantillon a finalement été ajusté à pH 7 ou 2,5. Les suspensions ont été agitées à 4°C et des échantillons ont été collectés après trois heures. Les échantillons ont été stockés à - 80°C avant les analyses ou ont été directement analysés sans étape de congélation. Les analyses de ces échantillons consistaient à mesurer la diminution des UFP et la taille. Les tableaux 1A et 1B résument les paramètres testés et les mesures effectuées.

**Tableau 11 : A. Neuf paramètres physico-chimiques testés sur la diminution des UFP lors du premier plan factoriel fractionnaire 2<sup>9.4</sup>.  
B. Quatre paramètres physico-chimiques testés sur la diminution des UFP et sur la taille du phage MS2 lors du deuxième plan factoriel complet 2<sup>4</sup>.**

Paramètres	Virus	pH	Cations	Anions	Congélation (- 80°C)			Concentration		
					Durée	Purification	virale initiale C <sub>0</sub>	(UFP.ml <sup>-1</sup> )	Force ionique (mM)	
<b>Abréviations des paramètres</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>D</b>	<b>E</b>	<b>F</b>	<b>G</b>	<b>H</b>	<b>I</b>	
	Qβ	2,5	Na <sup>+</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	non	3 jours	oui	10 <sup>8</sup>		100
	MS2	6,7	Mg <sup>2+</sup>	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	oui	3 heures	non	10 <sup>6</sup>		1
<b>Mesures</b>	La diminution des UFP dans chaque système est déterminée par le rapport log <sub>10</sub> (C/C <sub>0</sub> ).									
<b>B.</b>										
<b>Paramètres</b>	<b>pH</b>	<b>Cations</b>	<b>Congélation (- 80°C)</b>	<b>Force ionique (mM)</b>						
<b>Abréviations des paramètres</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>E</b>	<b>I</b>						
	2,5	Na <sup>+</sup>	non		100					
	6,7	Mg <sup>2+</sup>	oui		1					
<b>Mesures</b>	1. Diminution des UFP, log <sub>10</sub> (C/C <sub>0</sub> ).									
	2. Taille des particules									

C représente la concentration de virus infectieux au temps t, C<sub>0</sub> représente la concentration initiale de virus infectieux introduite dans chaque système.

### III. 3. Résultats et discussion

L'histogramme de la figure 27 donne l'effet (en valeur absolue) de chaque paramètre sur la diminution des UFP à partir de l'analyse statistique du plan factoriel fractionnaire  $2^{9-4}$ . Les résultats indiquent que trois paramètres ont un effet important sur cette diminution. Il s'agit du type de virus, du pH et de la congélation. Un pH de 2,5 et une congélation à  $-80^{\circ}\text{C}$  entraînent une chute des UFP plus importante. Le phage Q $\beta$  est également plus sensible à une baisse de ses unités infectieuses que le phage MS2. La purification du stock viral et la force ionique du milieu ont, pour leur part, une influence modérée. L'étape de purification ainsi que la force ionique de 100 mM semblent favoriser légèrement la diminution des UFP. Les autres paramètres n'auraient aucun d'effet.

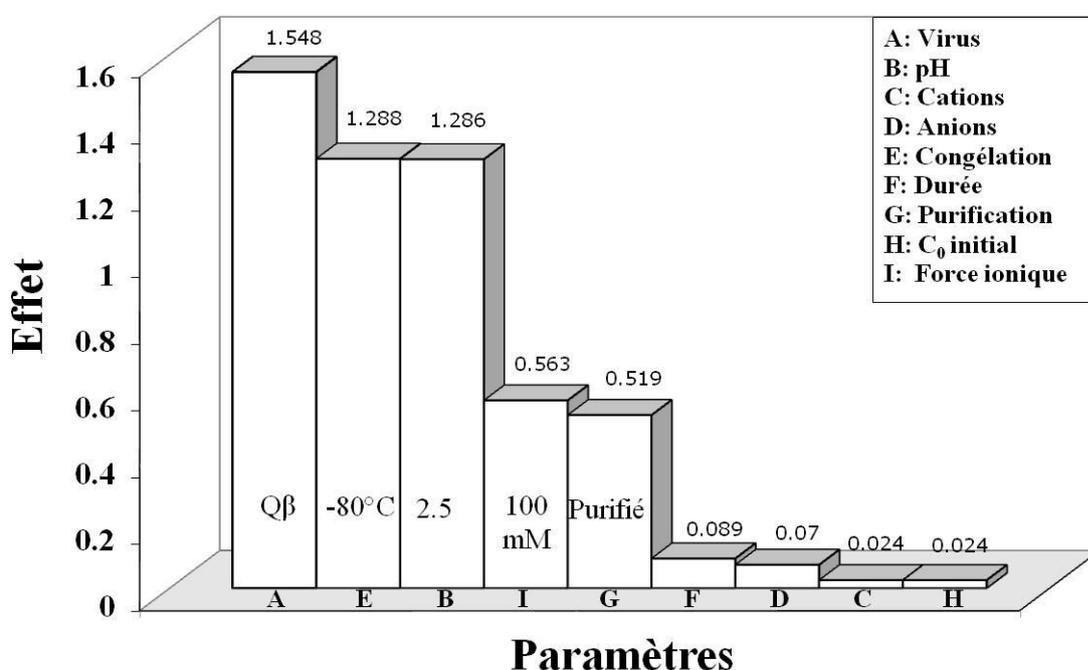
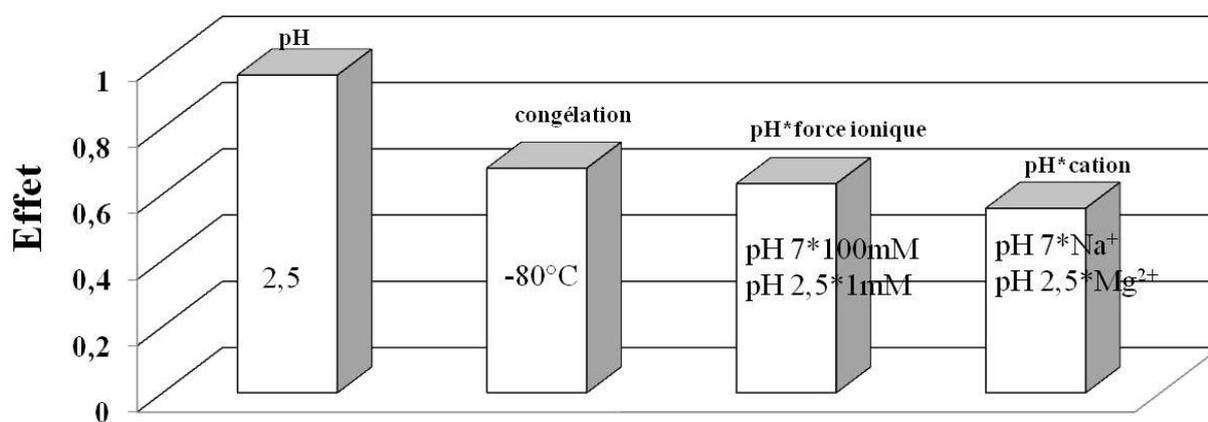


Figure 27 : Analyse du premier plan factoriel fractionnaire  $2^{9-4}$ , effet de neuf paramètres physico-chimiques sur la diminution des UFP ( $> 1$  Effet important ;  $0,3 < \text{Effet modéré} < 1$  ;  $< 0,1$  effet faible ou nul). Le paramètre dichotomique favorisant la diminution des UFP est indiqué dans chaque barre de l'histogramme.

Le  $\text{Mg}^{2+}$  doit être considéré à part car, dans ces expérimentations, le stock viral initial a été dialysé dans une solution contenant déjà du  $\text{Mg}^{2+}$ , et donc son effet entre  $t_0$  et  $t$  a pu être sous-estimé.

Dans le second plan factoriel complet  $2^4$ , l'influence de quatre paramètres sur l'agrégation de MS2 a été testée. Ces paramètres sont le pH (2,5 et 7), la congélation ( $4^\circ\text{C}$  et  $-80^\circ\text{C}$ ), la force ionique (100 mM et 1 mM) et le type de cations ( $\text{Mg}^{2+}$  et  $\text{Na}^+$ ). La sensibilité de l'appareil nécessitant des concentrations élevées de virus purifiés, les suspensions virales utilisées étaient donc dialysées avec une concentration de  $10^{11}$  UFP. $\text{ml}^{-1}$ . La durée de manipulation n'ayant pas d'impact, les échantillons étaient prélevés au bout de trois heures. Le nombre d'UFP de MS2 était à nouveau déterminé pour chaque expérience. Ceci afin de s'assurer que les effets sur les UFP dus aux paramètres testés lors du premier plan factoriel étaient bien retrouvés.

Les mesures d'UFP effectuées sur le phage MS2 donnent des résultats comparables à ceux du premier plan fractionnaire factoriel. Le pH acide (2,5) et la congélation ( $-80^\circ\text{C}$ ) tendent bien à faire diminuer le nombre d'UFP. De plus, la combinaison pH\*force ionique et pH\*cation peuvent également entraîner une perte d'UFP. En effet, un pH 7 associé à une force ionique de 100 mM ou au cation  $\text{Na}^+$  ainsi qu'un pH de 2,5 associé à une force ionique de 1 mM ou au cation  $\text{Mg}^{2+}$ , semblent avoir un effet sur la diminution des UFP de MS2 (Figure 28).



**Figure 28 : Analyse du deuxième plan fractionnaire  $2^4$ , effet de quatre paramètres sur la diminution des unités infectieuses du phage MS2.**

Concernant les mesures effectuées sur la taille des particules, le seul paramètre responsable d'une agrégation significative est le pH acide. Un pH de 2,5 entraîne une diminution importante du coefficient de diffusion mesuré, traduisant une augmentation de l'agrégation, avec des particules de l'ordre du micromètre.

Ces résultats confirment l'influence du pH sur l'agrégation du phage MS2. La congélation, quant à elle, ne favorise pas l'agrégation, mais entraîne une diminution des unités

infectieuses. Cette diminution des UFP est vraisemblablement due à de l'inactivation qui peut être liée à une dégradation du virus par la formation de cristaux de glace (Gould, 1999). D'ailleurs, Gould souligne que les cristaux de glace formés à - 20 °C sont plus grands qu'à - 80°C et peuvent causer une dégradation plus importante du virus. C'est pourquoi ils préconisent la congélation des virus à - 80°C plutôt que - 20°C. Pour Olson *et al.*, 2004, des échantillons d'eaux contenant le phage MS2 peuvent être stockés au moins une semaine à 4°C avant que la dégradation du virus n'égale la perte due à la congélation initiale à - 80°C. Par contre, après 40 jours, la concentration virale des suspensions stockées à 4°C sont sensiblement plus faibles que les échantillons congelés à - 80°C. Pour de courtes périodes, stocker des suspensions virales à 4°C est préférable alors que pour des périodes de stockage de longue durée, la congélation à - 80°C devient nécessaire. Mendez *et al.*, 2002, montrent que des cryoprotecteurs peuvent être utilisés pour conserver des suspensions de phages par congélation. Avec des suspensions de phages (MS2, B40-8 et  $\phi$ X174) préparés avec du glycérol 5-10 %, ils n'observent pas de diminution des UFP sur une période de 30 jours à - 70°C et - 20°C.

Dans notre étude, les ions divalents seuls ne semblent pas avoir d'influence sur la diminution des UFP et sur l'agrégation. Nedoluzhko et Douglas, 2001, n'ont également pas observé d'agrégation du Virus de la Mosaïque du Tabac quelle que soit la concentration de certains sels bivalents, comme le  $MgCl_2$  ou encore le  $CaCl_2$ . Tang *et al.*, 2002, montrent, quant à eux, que l'agrégation du phage fd est induite avec du  $Mg^{2+}$  à 80 mM. En revanche,  $Mg^{2+}$  n'a aucun impact sur l'agrégation du phage M13 quelle que soit sa concentration. Pour Simonet, 2007, l'agrégation du phage MS2, à pH 6 et avec des forces ioniques de  $MgCl_2$  de 120 et 360 mM est un phénomène minoritaire.

Concernant l'influence du pH sur l'agrégation des phages, nous confirmons nos études précédentes pour lesquelles des agrégats micrométriques de phages furent observés à pH 2,5.

Enfin, un pH de 7 associé à une force ionique de 100 mM semble avoir un impact sur la diminution des UFP. Ceci pourrait s'expliquer par les résultats de notre précédente étude dans laquelle l'augmentation de la force ionique entraînait une diminution de la perméabilité probablement liée à la modification de la conformation des pores de la capsid. Cette modification de la conformation des pores pour des forces ioniques élevées pourraient entraîner une diminution de l'infectiosité du phage. Comme hypothèse, on peut citer la reconnaissance défavorisée du virus par le récepteur bactérien dans ces conditions ou la difficulté du génome à s'échapper du virus par des pores plus petits.



## **Partie 4 :**

### ***Discussion générale – Conclusion***

La compréhension du comportement des virus dans l'environnement est un enjeu majeur de santé publique. Hors de son hôte, une particule virale peut être assimilée à un colloïde inerte. Ce sont donc les propriétés physico-chimiques des virus qui vont définir leur devenir ou plus précisément leur capacité d'adhésion-agrégation. L'importance de ces phénomènes est largement illustrée dans la littérature. Par exemple, l'adhésion des virus va permettre aussi bien leur concentration au niveau de fruits de mer que leur accumulation au niveau des sédiments fluviaux ou marins. De surcroît, un virus adhérent (sur des matières en suspension, sur des membranes de filtration...) est éliminé plus efficacement lors du traitement des eaux, notamment par des mécanismes de sédimentation-décantation et de filtration. L'élimination des virus va dépendre entièrement des phénomènes d'adhésion-agrégation. Ces phénomènes peuvent également constituer un biais lors de l'étude de la résistance des virus à un traitement, dans la mesure où des virus adhérents ou agrégés peuvent présenter une résistance accrue face à des facteurs inactivant de l'environnement ou à des désinfectants. Enfin, les méthodes courantes de concentration des virus à partir d'eaux sont basées sur des principes d'adhésion-élution. Malgré l'importance de ces phénomènes, les propriétés physico-chimiques des virus restent encore mal connues. Des mesures de point isoélectrique, souvent biaisées par des méthodes de radiomarquage, sont couramment utilisées pour définir les domaines de pH pour lesquels les virus sont globalement chargés positivement ou négativement. Au mieux, la charge est définie par le calcul du potentiel zêta ( $\zeta$ ) (Yang et Yang, 1996; Kenndler et Blaas, 2001; Hughes *et al.*, 2002; Schaldach *et al.*, 2006). Or, les concepts associés au potentiel zêta assimilent les virus à des particules dures pour lesquelles le plan de cisaillement et le potentiel de surface sont parfaitement définis, ce qui engendre des approximations importantes. Il est par conséquent très difficile, dans l'état actuel des connaissances, de comparer deux virus par rapport à leur charge ou à leur balance hydrophile-hydrophobe. De même, il est impossible de prévoir les capacités d'adhésion-agrégation d'un virus donné.

Le travail présenté dans ce mémoire se scinde en deux parties distinctes. Dans une première partie, nous avons voulu caractériser de façon innovante les propriétés interfaciales de bactériophages ARN F-spécifiques, souvent utilisés comme modèles des virus entériques pathogènes, d'une part avec des techniques respectant l'intégrité des virus, d'autre part en élaborant des modélisations prenant en compte l'anisotropie structurale et chimique du virus étudié. Les propriétés interfaciales des virus, en termes de charge et de balance hydrophile-hydrophobe, ont été déterminées au travers de mesures de mobilités électrophorétiques ( $\mu$ )

combinées à des mesures de taille. Ces mesures ont été réalisées dans un milieu aqueux avec différentes conditions physico-chimiques (pH, force ionique) contrôlées.

Dans une deuxième partie, nous avons défini l'impact de ces propriétés interfaciales sur le comportement des virus. Deux aspects ont particulièrement été abordés : l'élimination des virus par des procédés de filtration membranaire et l'impact de l'agrégation sur l'estimation du nombre d'unités infectieuses.

Tout d'abord, il était nécessaire de définir la nature et les caractéristiques de l'interface des bactériophages ARN F-spécifiques et son impact sur les mesures de mobilités. Ainsi, nous décrivons pour la première fois les profils électrocinétiques d'un virus (bactériophage MS2) en fonction de la force ionique et en prenant en compte le paramètre de perméabilité hydrodynamique ( $\lambda_0^{-1}$ ). Le phage MS2 est constitué uniquement d'acide nucléique et de protéines qui s'organisent en trois couches distinctes (capside, ARN lié à la capsid et ARN interne). A partir des données de cryomicroscopie (van den Worm *et al.*, 2006), l'épaisseur ( $\delta$ ), la densité ( $\omega$ ) de chaque couche ainsi que la fonction de distribution radiale  $F(r)$  ont pu être définies. De plus, le caractère diffus (ou hétérogène) de l'interface a été pris en compte *via* le paramètre d'hétérogénéité ( $\alpha$ ). Une modélisation a permis de définir et d'ajuster le paramètre de perméabilité hydrodynamique à partir des mobilités mesurées dans un milieu de force ionique croissante. Il en résulte des mobilités négatives dues à une perméabilité importante de 1,9 nm à faibles forces ioniques (< 20 mM) et à la large contribution de l'ARN négatif accolé à la capsid. Un changement de la conformation des pores de la capsid en fonction de la force ionique peut expliquer la diminution de la perméabilité au fur et à mesure que la force ionique augmente.

Dans les modèles assimilant les virus à des particules dures en utilisant la notion de potentiel zêta, la perméabilité hydrodynamique est complètement négligée alors que notre étude met bien en évidence l'existence d'une perméabilité élevée, d'un ordre de grandeur égal à l'épaisseur de la capsid protéique (~ 2 nm). Cette perméabilité permet au flux électro-osmotique de « sonder » la charge négative du génome du phage MS2 et montre que l'utilisation du potentiel zêta pour des virus n'est pas adéquate. Alors que dans la littérature, la charge d'un virus est déterminée à sa surface *via* les groupements ionisables des protéines, nous montrons ici que cette charge est non pas portée par les protéines mais essentiellement par le génome situé plus à l'intérieur du phage MS2. Ceci montre toute l'importance de cet espace interfacial de quelques nanomètres constitué de la capsid protéique et du génome accolé. Cette démonstration pose aussi la question de l'utilisation de VLPs (Virus Like

Particles) comme modèle de particule virale (Redman *et al.*, 1997; Goodridge *et al.*, 2004). En effet, ces particules ne possédant pas de génome, les propriétés interfaciales peuvent en être modifiées.

Ensuite, nous nous sommes intéressés, en plus du phage MS2, aux phages GA, Q $\beta$  et SP, faisant chacun partie d'un génogroupe différent au sein de la famille des *Leviviridae*. Ces virus présentent surtout l'avantage de posséder des tailles de génome différentes : ~ 3500 nucléotides pour les phages MS2 et GA, ~ 4200 nucléotides pour les phages Q $\beta$  et SP. Pour chaque phage, la mobilité électrophorétique ainsi que la taille des particules en solution furent mesurées pour différentes valeurs de pH (de 1,5 à 7,5) et de forces ioniques (NaNO<sub>3</sub>, 1 et 100 mM). Cette étude a permis de définir les conditions physico-chimiques pour lesquelles les phages étaient à l'état isolé ou agrégé. Les phages GA et SP sont à l'état agrégé quelles que soient les conditions de pH et de force ionique. Le phage MS2 est agrégé uniquement pour des valeurs de pH < 4,5. Il reste isolé pour des pH supérieurs quelle que soit la force ionique. Enfin, le phage Q $\beta$  présente un comportement d'agrégation différent en fonction de la force ionique. A faible force ionique, son comportement est similaire à celui de MS2, avec une agrégation de plus en plus importante lorsque la valeur du pH diminue. Pour une force ionique élevée (100 mM), les coefficients de diffusion ( $D$ ) sont inférieurs à 1,1 quel que soit le pH. Le coefficient de diffusion est mesuré à partir de l'intensité de la lumière diffusée. Or, les grosses particules diffusant plus que les petites, une grosse particule, même minoritaire, tendra à faire diminuer fortement  $D$ . En utilisant la théorie de Mie, la distribution de l'intensité diffusée peut être convertie en distribution en volume permettant d'obtenir une distribution en taille qui n'est pas influencée par la présence d'une grosse particule minoritaire. Ainsi, on observe que le phage Q $\beta$  est isolé à 100 mM mais uniquement pour des pH supérieurs à 6. En dessous de cette valeur de pH, il est sous forme agrégée. Ces différents profils d'agrégation en fonction de la force ionique ont permis de définir une séquence relative d'hydrophobie des quatre phages du type : GA ~ SP > Q $\beta$  > MS2.

En combinant les profils électrocinétiques aux mesures de taille, il apparaît clairement que les mobilités électrophorétiques mesurées pour des pH acides (< 4-5) correspondent à des mobilités de particules agrégées. Il en résulte un comportement non idéal, c'est-à-dire qui ne correspond pas aux prédictions de la théorie de la double couche. Ceci se traduit par des valeurs de mobilités mesurées à 100 mM supérieures à celles mesurées à 1 mM et des  $pI$  variant en fonction de la force ionique. En effet, dans les modèles classiques de la double couche, le  $pI$  de particules isolées dépend de la force ionique uniquement si une adsorption

spécifique de l'ion a lieu (Lyklema, 1995).  $\text{NaNO}_3$  étant un électrolyte connu pour être indifférent et la chimie de la surface d'un agrégat étant la même que celle d'une particule isolée, seule la perméabilité hydrodynamique permet d'expliquer un tel comportement. De plus, lorsque les particules virales sont isolées et pour une perméabilité identique, la mesure des mobilités des phages permet de déterminer leur charge relative. Or, seuls les phages MS2 et Q $\beta$  sont isolés à pH neutre pour une force ionique de 1 mM. Dans ces conditions, la charge de Q $\beta$  est plus négative que celle de MS2. Il résulte de cette étude que le phage Q $\beta$  est à la fois plus hydrophobe et plus chargé négativement que le phage MS2. Compte tenu de la faible force ionique, la différence de charge peut parfaitement s'expliquer par la différence de taille de génome entre le phage Q $\beta$  et le phage MS2 (4217 nucléotides *versus* 3569 nucléotides).

Après avoir mieux défini les propriétés de surface et les capacités d'agrégation des phages ARN F-spécifiques, il devenait intéressant de tenter de relier ces paramètres au comportement des particules virales au cours de traitements de filtration. Les membranes utilisées dans le cadre du traitement de potabilisation sont de porosités variables mais généralement chargées négativement et hydrophiles. Les bactériophages ARN F-spécifiques ont une structure comparable à celle des virus entériques pathogènes et ils font partie des plus petits virus connus (~25 nm). Ils sont donc potentiellement les microorganismes les plus difficiles à éliminer par filtration. Leur utilisation comme biotraceur est donc souvent préconisé. Nos résultats précédents montrent que, parmi les bactériophages ARN F-spécifiques, seuls les phages MS2 et Q $\beta$  peuvent être obtenus sous forme isolée à condition de travailler à pH neutre et à faible force ionique. En effet, les phages GA et SP sont toujours agrégés quelles que soient les conditions de pH et de force ionique. Ils ne présentent donc pas d'intérêt dans ce cas de figure.

Par ailleurs, l'estimation de l'abattement obtenu pour les phages Q $\beta$  et MS2 peut s'envisager, soit par la méthode de référence qui utilise une étape de culture (méthode des plages de lyse : UFP), soit par de nouvelles approches moléculaires plus rapides, plus sensibles et plus spécifiques telle que la RT-PCR en temps réel. Or, cette dernière approche doit encore être validée car elle ne cible que le génome des virus.

Nous avons alors quantifié l'élimination virale par des membranes d'ultrafiltration et de microfiltration par la méthode de référence mais également par RT-PCR en temps réel. Les résultats indiquent une relation linéaire entre les deux méthodes. Elles permettent donc d'aboutir aux mêmes conclusions quant à la capacité des membranes à éliminer les virus mais

avec les avantages cités précédemment pour la RT-PCR en temps réel. Les résultats montrent que le phage Q $\beta$  est toujours moins bien éliminé que MS2, quelle que soit la membrane. Compte tenu des propriétés physico-chimiques des membranes (négatives et hydrophiles), ces résultats semblent parfaitement cohérents avec les propriétés interfaciales de chacun des virus. Néanmoins, cela remet en question l'usage du bactériophage MS2 comme modèle des virus pathogènes pour l'homme puisqu'il ne semble pas constituer le « pire cas » d'étude en termes d'abattement minimum recherché.

Le faible point isoélectrique du phage MS2, parfois avancé comme argument en faveur de son usage, semble très largement insuffisant d'après nos résultats. Ces résultats nous ont permis de proposer le phage Q $\beta$  comme meilleur candidat que MS2 pour tester l'élimination virale par filtration membranaire dans des conditions de pH et de force ionique permettant de garantir des particules isolées (pH neutre, faible force ionique). Néanmoins, même si la structure des capsides des virus entériques pathogènes est différente de celle des phages ARN F-spécifiques et donc vraisemblablement leur perméabilité, il est intéressant de souligner que ces virus ont pour la plupart une taille de génome proche de 7500 bases (Entérovirus, Norovirus, virus de l'hépatite A). Ce génome constitue donc une source de charge négative plus importante que pour les phages ARN F-spécifiques qui pourra plus ou moins s'exprimer en fonction de la perméabilité de la capsid.

Un autre aspect où l'agrégation des phages peut jouer un rôle primordial est la quantification des unités infectieuses (UFP) par la méthode de plages de lyse. En effet, cette méthode de référence montre certaines limites dans la mesure où une unité peut être due à un virus infectieux ou à un agrégat de plusieurs virus. Ainsi, un composé favorisant l'agrégation virale pourrait être considéré, à tort, comme un produit virucide simplement parce que le nombre d'UFP diminue. Les données de la littérature permettant de dissocier la part réelle liée à l'inactivation virale de celle liée à l'adhésion-agrégation sont inexistantes. Or, l'adhésion-agrégation étant généralement réversible au moins en partie (Floyd, 1979; Tang *et al.*, 2002; Shi *et al.*, 2005; Simonet, 2007), il n'est pas rigoureux d'assimiler ces phénomènes à une inactivation virale. Nous avons ainsi mesuré simultanément la baisse des UFP pour le phage MS2 et la taille des particules en suspension. Le seul paramètre pour lequel la baisse des UFP pourrait être expliquée par une agrégation est le pH. Lorsque le pH diminue, nous avons montré que des agrégats micrométriques se forment. Ainsi à pH 3,9 ou 2,5, ces agrégats peuvent expliquer la baisse des UFP de 1 ou 3 log<sub>10</sub>. La congélation, si elle diminue les UFP, n'a aucun impact sur l'agrégation. Il s'agit donc, dans ces conditions, d'une réelle perte

d'infectivité qui avait d'ailleurs déjà été supposée par d'autres auteurs (Gould, 1999; Olson *et al.*, 2004). La formation de cristaux, endommageant les virus, serait à l'origine de ce phénomène. Enfin à pH neutre, une force ionique de 100 mM ou bien la présence de Na<sup>+</sup> semblent avoir un effet sur la perte d'infectivité mais aucun sur l'agrégation. Ces résultats démontrent donc qu'il est possible de préciser les mécanismes responsables de la baisse des UFP. L'application de ce type de démarche permettrait à l'avenir d'éviter toute surestimation de l'effet virucide d'un traitement. Dans un projet visant à étudier la thermo-inactivation de virus contaminants des matrices alimentaires acidifiées (projet ACTIA 05.7), nos résultats ont montré tout leur intérêt. En effet, des résultats préliminaires suggéraient un effet synergique entre le pH acide et la température pour inactiver les virus. Or, compte tenu de nos résultats, cette diminution d'infectivité pourrait s'expliquer uniquement par de l'agrégation virale liée au pH acide. Nos observations ont permis de proposer un protocole expérimental plus adéquat pour discriminer l'impact de la température et du pH sur l'inactivation d'une part et sur l'agrégation d'autre part.

Ainsi, notre étude apporte des avancées significatives à plusieurs niveaux. Nous démontrons que les limites méthodologiques pour mesurer les propriétés interfaciales des virus non marqués sont maintenant dépassées. Nous avons ainsi pu déterminer les propriétés interfaciales des phages ARN F-spécifiques en utilisant de surcroît des modélisations innovantes prenant en compte la perméabilité de la capsid. Ceci nous a permis de préciser la charge et l'hydrophobicité relative des virus ainsi que leur capacité à s'agréger. Ces nouvelles connaissances nous ont d'ores et déjà permis de mieux comprendre le comportement de ces virus au cours d'un traitement de filtration membranaire et les biais que peuvent apporter une simple mesure d'UFP. Néanmoins, de nombreux points peuvent encore être améliorés notamment dans la quantification de la charge et de l'hydrophobicité des virus. L'utilisation de nouvelles techniques en plein développement serait intéressante dans ce contexte. Par exemple, la microscopie à force atomique (AFM) est une technique d'analyse basée sur la mesure des forces d'interactions à très courte portée entre une pointe et la surface à analyser. La fonctionnalisation des pointes AFM avec des groupements plus ou moins hydrophobes permettrait d'appréhender la balance hydrophile-hydrophobe de plusieurs virus. La fonctionnalisation des pointes pourrait également se faire avec des virus eux-mêmes pour connaître les forces d'interactions virus-virus. Il conviendrait aussi d'inclure des virus pathogènes pour estimer la capacité des phages à servir de modèle.

La connaissance des propriétés interfaciales des virus a également une portée en biotechnologie. Par exemple, des chercheurs du Massachusetts Institute of Technology (MIT) ont utilisé le bactériophage M13 pour fabriquer de microscopiques électrodes, aptes à être insérées dans des batteries au lithium-ion ultraminces et souples (Nam *et al.*, 2006). Les virus ont permis de synthétiser et d'assembler des fils nanoscopiques d'oxyde de cobalt. Cet assemblage nécessite un contrôle de la taille des virus pour avoir une suspension monodisperse et un contrôle de la charge du virus qui conditionne l'interaction entre le virus et le cobalt.

Ainsi, les recherches fondamentales sur les propriétés interfaciales des virus, présentées dans cette thèse, ont abouti à une meilleure connaissance de l'interface des phages ARN F-spécifiques et ont mené à des avancées méthodologiques pour des applications industrielles.





# ***Références bibliographiques***

- Acharya, P., P. Cheruku, S. Chatterjee, S. Acharya and J. Chattopadhyaya, 2004. Measurement of nucleobase pKa values in model mononucleotides shows RNA-RNA duplexes to be more stable than DNA-DNA duplexes. *Journal of the American Chemical Society* 126(9): 2862-2869.
- Ackermann, H. W., 2007. 5500 Phages examined in the electron microscope. *Archives of Virology* 152(2): 227-243.
- Ackermann, H. W. and M. S. Dubow, 1987. *Viruses of prokaryotes*, CRC Press, Boca Raton. 480 pages.
- Adhin, M. R., J. Alblas and J. van Duin, 1990. Secondary structure at the 3' terminal region of RNA coliphages: comparison with tRNA. *Biochimica et Biophysica Acta* 1050(1-3): 110-118.
- Ahimou, F., M. Paquot, P. Jacques, P. Thonart and P. G. Rouxhet, 2001. Influence of electrical properties on the evaluation of the surface hydrophobicity of *Bacillus subtilis*. *Journal of Microbiological Methods* 45(2): 119-126.
- Anonymous, 1996. Waterborne pathogens kill 10M-20M people/year. *World Water and Environmental Engineering* 6.
- Argetsinger, J. E. and G. N. Gussin, 1966. Intact ribonucleic acid from defective particles of bacteriophage R17. *Journal of Molecular Biology* 21(3): 421-434.
- Asnaghi, D., M. Carpineti, M. Giglio and M. Sozzi, 1992. Coagulation kinetics and aggregate morphology in the intermediate regimes between diffusion-limited and reaction-limited cluster aggregation. *Physical Review A* 45(2): 1018-1023.
- Ausar, S. F., T. R. Foubert, M. H. Hudson, T. S. Vedvick and C. R. Middaugh, 2006. Conformational stability and disassembly of Norwalk virus-like particles. Effect of pH and temperature. *Journal of Biological Chemistry* 281(28): 19478-19488.
- Azeredo, J., J. Visser and R. Oliveira, 1999. Exopolymers in bacterial adhesion: interpretation in terms of DLVO and XDLVO theories. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 14(1-4): 141-148.
- Bales, R. C., S. R. Hinkle, T. W. Kroeger, K. Stocking and C. P. Gerba, 1991. Bacteriophage adsorption during transport through porous media: chemical perturbations and reversibility. *Environmental Science and Technology* 25(12): 2088-2095.
- Bales, R. C., S. Li, K. M. Maguire, M. T. Yahya and C. P. Gerba, 1993. MS-2 and poliovirus transport in porous media : hydrophobic effects and chemical perturbations. *Water Resources Research* 29(4): 957-963.
- Ball, L. A., 1973. Secondary structure and coding potential of the coat protein gene of bacteriophage MS2. *Nature: New biology* 242(115): 44-45.
- Battigelli, D. A., M. D. Sobsey and D. C. Lobe, 1993. The inactivation of hepatitis A virus and other model viruses by UV irradiation. *Water Science and Technology* 27(3-4): 339-342.
- Beckett, D. and O. C. Uhlenbeck, 1988. Ribonucleoprotein complexes of R17 coat protein and a translational operator analog. *Journal of Molecular Biology* 204(4): 927-938.
- Beckett, D., H. N. Wu and O. C. Uhlenbeck, 1988. Roles of operator and non-operator RNA sequences in bacteriophage R17 capsid assembly. *Journal of Molecular Biology* 204(4): 939-947.
- Beekwilder, J., R. Nieuwenhuizen, R. Poot and J. van Duin, 1996. Secondary structure model for the first three domains of Q beta RNA. Control of A-protein synthesis. *Journal of Molecular Biology* 256(1): 8-19.
- Beekwilder, M. J., R. Nieuwenhuizen and J. van Duin, 1995. Secondary structure model for the last two domains of single-stranded RNA phage Q beta. *Journal of Molecular Biology* 247(5): 903-917.

- Bixby, R. L. and D. J. O'Brien, 1979. Influence of fulvic acid on bacteriophage adsorption and complexation in soil. *Applied and Environmental Microbiology* 38(5): 840-845.
- Bollback, J. P. and J. P. Huelsenbeck, 2001. Phylogeny, genome evolution, and host specificity of single-stranded RNA bacteriophage (family *Leviviridae*). *Journal of Molecular Evolution* 52(2): 117-128.
- Borrego, J. J., R. Cornax, M. A. Morinigo, E. Martinez-Manzanares and P. Romero, 1990. Coliphages as an indicator of faecal pollution in water. their survival and productive infectivity in natural aquatic environments. *Water Research* 24(1): 111-116.
- Bostrom, M., D. R. Williams and B. W. Ninham, 2001. Specific ion effects: why DLVO theory fails for biology and colloid systems. *Physical Review Letters* 87(16): 168103.1-168103.4.
- Budayova, M., F. Bonnete, A. Tardieu and P. Vachette, 1999. Interactions in solution of a large oligomeric protein. *Journal of Crystal Growth* 196(2-4): 210-219.
- Busscher, H. J., B. van de Belt-Gritter and H. C. van der Mei, 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.
- Butler, P. J., 1984. The current picture of the structure and assembly of tobacco mosaic virus. *Journal of General Virology* 65 ( Pt 2): 253-279.
- Callahan, K. M., D. J. Taylor and M. D. Sobsey, 1995. Comparative survival of hepatitis A virus, poliovirus and indicator viruses in geographically diverse seawaters. *Water Science and Technology* 31(5-6): 189-193.
- Camerini-Otero, R. D., P. N. Pusey, D. E. Koppel, D. W. Schaefer and R. M. Franklin, 1974. Intensity fluctuation spectroscopy of laser light scattered by solutions of spherical viruses. R17, QB, BSV, PM2, and T7. II. Diffusion coefficients molecular weights, solvation, and particle dimensions. *Biochemistry* 13(5): 960-970.
- Cametti, C., P. Codastefano and P. Tartaglia, 1989. Aggregation kinetics in model colloidal systems: A light scattering study. *Journal of Colloid and Interface Science* 131(2): 409-422.
- Carbonnaux, C., M. Ries-Kautt and A. Ducruix, 1995. Relative effectiveness of various anions on the solubility of acidic *Hypoderma lineatum* collagenase at pH 7.2. *Protein Science* 4(10): 2123-2128.
- Caspar, D. L. and A. Klug, 1962. Physical principles in the construction of regular viruses. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 27: 1-24.
- Casselyn, M., 2002. Modifications structurales du virus de la mosaïque du brome et interactions entre particules virales en solution : application à la cristallisation. Paris 6, PhD. 147 pages.
- Chang, L. T., S. R. Farrah and G. Bitton, 1981. Positively charged filters for virus recovery from wastewater treatment plant effluents. *Applied and Environmental Microbiology* 42(5): 921-924.
- Chattopadhyay, D., S. Chattopadhyay, W. G. Lyon and J. T. Wilson, 2002. Effect of surfactants on the survival and sorption of viruses. *Environmental Science and Technology* 36(19): 4017-4024.
- Childs, J. D. and H. C. Birnboim, 1975. Polyacrylamide gel electrophoresis of intact bacteriophage T4D particles. *Journal of Virology* 16(3): 652-661.
- Chiti, F., M. Calamai, N. Taddei, M. Stefani, G. Ramponi and C. M. Dobson, 2002. Studies of the aggregation of mutant proteins in vitro provide insights into the genetics of amyloid diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99(90004): 16419-16426.
- Chung, H. and M. D. Sobsey, 1993. Comparative survival of indicator viruses and enteric viruses in seawater and sediment. *Water Science and Technology* 27(3-4): 425-428

- Cornax, R., M. A. Morinigo, M. C. Balebona, D. Castro and J. J. Borrego, 1991. Significance of several bacteriophage groups as indicators of sewage pollution in marine waters. *Water Research* 25(6): 673-678.
- Curtiss, L. K. and R. G. Krueger, 1974. Localization of coliphage MS2 A-protein. *Journal of Virology* 14(3): 503-508.
- Dague, E., 2006. Physico-chimie des interfaces bactérie - solution aqueuse. Nancy Université, PhD. 137 pages.
- Dague, E., J. Duval, F. Jorand, F. Thomas and F. Gaboriaud, 2006. Probing surface structures of *Shewanella spp.* by microelectrophoresis. *Biophysical Journal* 90(7): 2612-2621.
- Date, T., 1979. Kinetic studies of the interaction between MS2 phage and F pilus of *Escherichia coli*. *FEBS Journal* 96(1): 167-175.
- Derjaguin, B. V. and L. Landau, 1941. Theory of the stability of strongly charged lyophobic sols and of the adhesion of strongly charged particles in solutions of electrolytes. *Acta Physicochim URSS* 14: 633-662.
- Desmarais, T. R., H. M. Solo-Gabriele and C. J. Palmer, 2002. Influence of soil on fecal indicator organisms in a tidally influenced subtropical environment. *Applied and Environmental Microbiology* 68(3): 1165-1172.
- Douglas, H. W., B. L. Williams and C. J. M. Rondle, 1969. Micro-electrophoresis of Pox Viruses in Molar Sucrose. *Journal of General Virology* 5(3): 391-396.
- Dukhin, A. S., D. Fluck, P. J. Goetz, V. N. Shilov and S. S. Dukhin, 2007. Characterization of fractal particles using acoustics, electroacoustics, light scattering, image analysis, and conductivity. *Langmuir* 23(10): 5338-5351.
- Dukhin, A. S. and P. J. Goetz, 2001. Acoustic and electroacoustic spectroscopy for characterizing concentrated dispersions and emulsions. *Advances in Colloid and Interface Science* 92(1-3): 73-132.
- Duran, A. E., M. Muniesa, L. Moce-Llivina, C. Campos, J. Jofre and F. Lucena, 2003. Usefulness of different groups of bacteriophages as model micro-organisms for evaluating chlorination. *Journal of Applied Microbiology* 95(1): 29-37.
- Dutka, B. J., A. El Shaarawi, M. T. Martins and P. S. Sanchez, 1987. North and south american studies on the potential of coliphage as a water quality indicator. *Water Research* 21(9): 1127-1134.
- Duval, J. F. L., 2007. Electrophoresis of soft colloids: basic principles and applications,. In *Environmental Colloids and Particles: Behaviour, Separation and Characterization*. J. Lead. Eds. K.J. Wilkinson, Iupac Series on Analytical and Physical Chemistry of Environmental Systems, Senior Editors J. Buffle and H.P. Van Leeuwen. England. 315-344.
- Duval, J. F. L. and H. Ohshima, 2006. Electrophoresis of diffuse soft particles. *Langmuir* 22(8): 3533-3546.
- Edlind, T. D. and A. R. Bassel, 1977. Secondary structure of RNA from bacteriophages f2, QB, and PP7. *Journal of Virology* 24(1): 135-141.
- Farrah, S. R., 1982. Chemical factors influencing adsorption of bacteriophage MS2 to membrane filters. *Applied and Environmental Microbiology* 43(3): 659-663.
- Farrah, S. R., C. P. Gerba, C. Wallis and J. L. Melnick, 1976. Concentration of viruses from large volumes of tap water using pleated membrane filters. *Applied and Environmental Microbiology* 31(2): 221-226.
- Farrah, S. R., D. O. Shah and L. O. Ingram, 1981. Effects of chaotropic and antichaotropic agents on elution of poliovirus adsorbed on membrane filters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78(2): 1229-1232.

- Field, K. G., A. E. Bernhard and T. J. Brodeur, 2003. Molecular approaches to microbiological monitoring: fecal source detection. *Environmental Monitoring and Assessment* 81(1-3): 313-326.
- Fiers, W., R. Contreras, F. Duerinck, G. Haegeman, D. Iserentant, J. Merregaert, W. Min Jou, F. Molemans, A. Raeymaekers, A. Van den Berghe, G. Volckaert and M. Ysebaert, 1976. Complete nucleotide sequence of bacteriophage MS2 RNA: primary and secondary structure of the replicase gene. *Nature* 260(5551): 500-507.
- Fiksdal, L. and T. O. Leiknes, 2006. The effect of coagulation with MF/UF membrane filtration for the removal of virus in drinking water. *Journal of Membrane Science* 279(1-2): 364-371.
- Finet, S., F. Skouri-Panet, M. Casselyn, F. Bonnete and A. Tardieu, 2004. The Hofmeister effect as seen by SAXS in protein solutions. *Current Opinion in Colloid and Interface Science* 9(1-2): 112-116.
- Floyd, R., 1979. Viral aggregation: mixed suspensions of poliovirus and reovirus. *Applied and Environmental Microbiology* 38(5): 980-986.
- Floyd, R. and D. G. Sharp, 1977. Aggregation of poliovirus and reovirus by dilution in water. *Applied and Environmental Microbiology* 33(1): 159-167.
- Floyd, R. and D. G. Sharp, 1978a. Viral aggregation: effects of salts on the aggregation of poliovirus and reovirus at low pH. *Applied and Environmental Microbiology* 35(6): 1084-1094.
- Floyd, R. and D. G. Sharp, 1978b. Viral aggregation: quantitation and kinetics of the aggregation of poliovirus and reovirus. *Applied and Environmental Microbiology* 35(6): 1079-1083.
- Floyd, R. and D. G. Sharp, 1979. Viral aggregation: buffer effects in the aggregation of poliovirus and reovirus at low and high pH. *Applied and Environmental Microbiology* 38(3): 395-401.
- Galdiero, F., 1979. Adenovirus aggregation and preservation in extracellular environment. *Archives of Virology* 59(1-2): 99-105.
- Gaudin, Y., A. Barge, C. Ebel and R. W. Ruigrok, 1995. Aggregation of VSV M protein is reversible and mediated by nucleation sites: implications for viral assembly. *Virology* 206(1): 28-37.
- Gerba, C. P., 1984. Applied and theoretical aspects of virus adsorption to surfaces. *Advances in Applied Microbiology* 30: 133-168.
- Gerba, C. P., S. R. Farrah, S. M. Goyal, C. Wallis and J. L. Melnick, 1978. Concentration of enteroviruses from large volumes of tap water, treated sewage, and seawater. *Applied and Environmental Microbiology* 35(3): 540-548.
- Golmohammadi, R., K. Fridborg, M. Bundule, K. Valegård and L. Liljas, 1996. The crystal structure of bacteriophage Q beta at 3.5 Å resolution. *Structure* 4(5): 543-554.
- Golmohammadi, R., K. Valegård, K. Fridborg and L. Liljas, 1993. The refined structure of bacteriophage MS2 at 2.8 Å resolution. *Journal of Molecular Biology* 234(3): 620-639.
- Goodridge, L., C. Goodridge, J. Wu, M. Griffiths and J. Pawliszyn, 2004. Isoelectric point determination of norovirus virus-like particles by capillary isoelectric focusing with whole column imaging detection. *Analytical Chemistry* 76(1): 48-52.
- Gould, E. A., 1999. Methods for long-term virus preservation. *Molecular Biotechnology* 13(1): 57-66.
- Grabow, W. O., M. B. Taylor and J. C. de Villiers, 2001. New methods for the detection of viruses: call for review of drinking water quality guidelines. *Water Science and Technology* 43(12): 1-8.

- Groeneveld, H., K. Thimon and J. van Duin, 1995. Translational control of maturation-protein synthesis in phage MS2: a role for the kinetics of RNA folding? RNA-A Publication of the RNA Society 1(1): 79-88.
- Guisez, Y., J. Robbens, E. Remaut and W. Fiers, 1993. Folding of the MS2 coat protein in *Escherichia coli* is modulated by translational pauses resulting from mRNA secondary structure and codon usage: a hypothesis. Journal of theoretical biology 162(2): 243-252.
- Guttman-Bass, N. and J. Catalano-Sherman, 1985. Effects of humic materials on virus recovery from water. Applied and Environmental Microbiology 49(5): 1260-1264.
- Guttman-Bass, N. and J. Catalano-Sherman, 1986. Humic acid interference with virus recovery by electropositive microporous filters. Applied and Environmental Microbiology 52(3): 556-561.
- Hall, R. M. and M. D. Sobsey, 1993. Inactivation of Hepatitis A virus and MS2 by ozone and ozone-hydrogen peroxide in buffered water. 16. Bienn. IAWPRC Conf., Washington, DC (USA), 24-30 May 1992.
- Hasegawa, M., T. Yasunaga and T. Miyata, 1979. Secondary structure of MS2 phage RNA and bias in code word usage. Nucleic Acids Research 7(7): 2073-2079.
- Havelaar, A. H., T. Nieuwstad, C. C. E. Meulemans and M. van Olphen, 1991. F-specific RNA bacteriophages as model viruses in UV disinfection of wastewater. Water Science and Technology 24(2): 347-352.
- Havelaar, A. H. and W. M. Pot-Hogeboom, 1988. F-Specific RNA-bacteriophages as model viruses in water hygiene: ecological aspects. Water Science and Technology 20(11-12): 399-407.
- Havelaar, A. H., W. M. Pot-Hogeboom, K. Furuse, R. Pot and M. P. Hormann, 1990. F-specific RNA bacteriophages and sensitive host strains in faeces and wastewater of human and animal origin. Journal of Applied Bacteriology 69(1): 30-37.
- Havelaar, A. H., M. van Olphen and Y. C. Drost, 1993. F-specific RNA bacteriophages are adequate model organisms for enteric viruses in fresh water. Applied and Environmental Microbiology 59(9): 2956-2962.
- Heisenberg, M., 1966. Formation of defective bacteriophage particles by fr Amber mutants. Journal of Molecular Biology 17: 136-144.
- Helgstrand, C., E. Grahn, T. Moss, N. J. Stonehouse, K. Tars, P. G. Stockley and L. Liljas, 2002. Investigating the structural basis of purine specificity in the structures of MS2 coat protein RNA translational operator hairpins. Nucleic Acids Research 30(12): 2678-2685.
- Herath, G., K. Yamamoto and T. Uruse, 1999. Removal of viruses by microfiltration membranes at different solution environments. Water Science and Technology 40(4-5): 331-338.
- Hermansson, M., 1999. The DLVO theory in microbial adhesion. Colloid Surf B-Biointerfaces 14(1-4): 105-119.
- Hofmeister, F., 1888. Zur Lehre von der Wirkung der Salze - Zweite Mittheilung. Archiv fur Experimentelle Pathologie und Pharmakologie 24(4-5): 247-260.
- Hohn, T., 1969. Role of RNA in the assembly process of bacteriophage fr. Journal of Molecular Biology 43(1): 191-194.
- Hooker, J. M., E. W. Kovacs and M. B. Francis, 2004. Interior surface modification of bacteriophage MS2. Journal of the American Chemical Society 126(12): 3718-3719.
- Horman, A., R. Rimhanen-Finne, L. Maunula, C. H. von Bonsdorff, N. Torvela, A. Heikinheimo and M. L. Hanninen, 2004. *Campylobacter spp.*, *Giardia spp.*, *Cryptosporidium spp.*, noroviruses, and indicator organisms in surface water in

- southwestern Finland, 2000-2001. *Applied and Environmental Microbiology* 70(1): 87-95.
- Huertas, A., B. Barbeau, C. Desjardins, A. Galarza, M. A. Figueroa and G. A. Toranzos, 2003. Evaluation of *Bacillus subtilis* and coliphage MS2 as indicators of advanced water treatment efficiency. *Water Science and Technology* 47(3): 255-259.
- Hughes, M. P., H. Morgan and F. J. Rixon, 2002. Measuring the dielectric properties of herpes simplex virus type 1 virions with dielectrophoresis. *Biochimica et Biophysica Acta* 1571(1): 1-8.
- Hurst, C. J., G. R. Knudsen, M. J. McInerney and L. D. Stetzenbach, 2002. *Manual of Environmental Microbiology*. Washington, Asm Press. 1138 pages.
- IAWPRC-Study-Group-on-Health-Related-Water-Microbiology, 1991. Bacteriophages as model viruses in water quality control. *Water Research* 25(5): 529-545.
- Inokuchi, Y., A. B. Jacobson, T. Hirose, S. Inayama and A. Hirashima, 1988. Analysis of the complete nucleotide sequence of the group IV RNA coliphage SP. *Nucleic Acids Research* 16(11): 6205-6221.
- Inokuchi, Y., R. Takahashi, T. Hirose, S. Inayama, A. B. Jacobson and A. Hirashima, 1986. The complete nucleotide sequence of the group II RNA coliphage GA. *The Journal of Biochemistry (Tokyo)* 99(4): 1169-80.
- Iserentant, D. and W. Fiers, 1979. Secondary structure of the 5' end of bacteriophage MS2 RNA Methoxyamine and kethoxal modification. *European Journal of Biochemistry* 102(2): 595-604.
- Jacangelo, J. G., S. S. Adham and L. J.M., 1995. Mechanism of cryptosporidium, giardia, and MS2 virus removal by MF and UF. *Journal American Water Works Association*: 107-121.
- Jacobson, A. B., 1976. Studies on secondary structure of single-stranded RNA from bacteriophage MS2 by electron microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 73(2): 307-311.
- Jacobson, A. B., R. Arora, M. Zuker, C. Priano, C. H. Lin and D. R. Mills, 1998. Structural plasticity in RNA and its role in the regulation of protein translation in coliphage Q beta. *Journal of Molecular Biology* 275(4): 589-600.
- Jin, Y. and M. Flury, 2002. Fate and transport of viruses in porous media. *Advances in Agronomy* 77: 39-102.
- Johnson, F. B. and A. S. Bodily, 1975. Effect of environmental pH on adenovirus-associated virus. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 150(3): 585-90.
- Johnson, J. E. and J. A. Speir, 1997. Quasi-equivalent viruses: a paradigm for protein assemblies. *Journal of Molecular Biology* 269(5): 665-675.
- Jorio, H., R. Tran, J. Meghrou, L. Bourget and A. Kamen, 2006. Analysis of baculovirus aggregates using flow cytometry. *Journal of Virological Methods* 134(1-2): 8-14.
- Kenndler, E. and D. Blaas, 2001. Capillary electrophoresis of macromolecular biological assemblies: bacteria and viruses. *Trends in Analytical Chemistry:TRAC* 20(10): 543-551.
- Keswick, B. and C. Gerba, 1980. Viruses in groundwater. *Environmental Science and Technology* 14(11): 1290-1297.
- Klovins, J., G. P. Overbeek, S. H. van den Worm, H. W. Ackermann and J. van Duin, 2002. Nucleotide sequence of a ssRNA phage from *Acinetobacter*: kinship to coliphages. *Journal of General Virology* 83(Pt 6): 1523-1533.
- Koning, R., S. van den Worm, J. R. Plaisier, J. van Duin, J. Pieter Abrahams and H. Koerten, 2003. Visualization by cryo-electron microscopy of genomic RNA that binds to the

- protein capsid inside bacteriophage MS2. *Journal of Molecular Biology* 332(2): 415-422.
- Koopmans, M., J. Vinjé, M. de Wit, I. Leenen, W. van der Poel and Y. van Duynhoven, 2000. Molecular epidemiology of human enteric caliciviruses in The Netherlands. *Journal of Infectious Diseases* 181(2): S262-S269.
- Koopmans, M., C. H. von Bonsdorff, J. Vinjé, D. de Medici and S. Monroe, 2002. Foodborne viruses. *FEMS Microbiology Reviews* 26(2): 187-205.
- Korant, B. D., K. Lonberg-Holm, F. H. Yin and J. Noble-Harvey, 1975. Fractionation of biologically active and inactive populations of human rhinovirus type 2. *Virology* 63(2): 384-394.
- Kott, Y., N. Roze, S. Sperber and N. Betzer, 1974. Bacteriophages as viral pollution indicators. *Water Research* 8(3): 165-171.
- Kozak, M. and D. Nathans, 1971. Fate of maturation protein during infection by coliphage MS2. *Nature: New biology* 234(50): 209-211.
- Krahn, P. M., R. J. O'Callaghan and W. Paranchych, 1972. Stages in phage R17 infection. VI. Injection of A protein and RNA into the host cell. *Virology* 47(3): 628-637.
- Kukavica-Ibrulj, I., A. Darveau, J. Jean and I. Fliss, 2004. Hepatitis A virus attachment to agri-food surfaces using immunological, virological and thermodynamic assays. *Journal of Applied Microbiology* 97: 923-934.
- Kumler, W. D. and J. J. Eiler, 1943. The Acid Strength of Mono and Diesters of Phosphoric Acid. The n-Alkyl Esters from Methyl to Butyl, the Esters of Biological Importance, and the Natural Guanidine Phosphoric Acids. *Journal of the American Chemical Society* 65(12): 2355-2361.
- Kuzmanovic, D. A., I. Elashvili, C. Wick, C. O'Connell and S. Krueger, 2003. Bacteriophage MS2: Molecular Weight and Spatial Distribution of the Protein and RNA Components by Small-Angle Neutron Scattering and Virus Counting. *Structure* 11(11): 1339-1348.
- Kuzmanovic, D. A., I. Elashvili, C. Wick, C. O'Connell and S. Krueger, 2006. The MS2 coat protein shell is likely assembled under tension: a novel role for the MS2 bacteriophage A protein as revealed by small-angle neutron scattering. *Journal of Molecular Biology* 355(5): 1095-1111.
- Kyte, J. and R. Doolittle, 1982. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *Journal of Molecular Biology* 157(1): 105-132.
- Langlet, J., F. Gaboriaud, C. Gantzer and J. F. L. Duval, 2008. Impact of chemical and structural anisotropy on the electrophoretic mobility of spherical soft-multilayer particles: the case of bacteriophage MS2. *Biophysical Journal* 94: 3293-3312.
- Langlet, J., F. Gaboriaud, J. F. L. Duval and C. Gantzer., 2008. Aggregation and surface properties of F-specific RNA phages: implication for membrane filtration processes. *Water Research* 42(10-11): 2769-2777.
- Langlet, J., F. Gaboriaud and C. Gantzer, 2007. Effects of pH on plaque forming unit counts and aggregation of MS2 bacteriophage. *Journal of Applied Microbiology* 103(5): 1632-1638.
- Lee, S. Y., J. N. Culver and M. T. Harris, 2006. Effect of CuCl<sub>2</sub> concentration on the aggregation and mineralization of Tobacco mosaic virus biotemplate. *Journal of Colloid and Interface Science* 297(2): 554-560.
- Li, H., Robertson, AD, Jensen, J.H, 2005. Very fast empirical prediction and rationalization of protein pKa values. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 61(4): 704-721.
- Lin, M. Y., H. M. Lindsay, D. A. Weitz, R. C. Ball, R. Klein and P. Meakin, 1989. Universality in colloid aggregation. *Nature* 339(6223): 360-362.

- Lipson, S. M. and G. Stotzky, 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.
- Logan, K. B., G. E. Rees, N. D. Seeley and S. B. Primrose, 1980. Rapid concentration of bacteriophages from large volumes of freshwater: evaluation of positively charged, microporous filters. *Journal of Virological Methods* 1(2): 87-97.
- Loveland, J. P., J. N. Ryan, G. L. Amy and R. W. Harvey, 1996. The reversibility of virus attachment to mineral surfaces. *Colloids and Surfaces A- Physicochemical and Engineering Aspects* 107: 205-221.
- Lukasik, J., T. M. Scott, D. Andryshak and S. R. Farrah, 2000. Influence of salts on virus adsorption to microporous filters. *Applied and Environmental Microbiology* 66(7): 2914-2920.
- Lyklema, J., 1995. *Fundamentals of Interface and Colloid Science: solid-liquid interfaces*. London, Academic Press. 768 pages.
- Lytle, C. D. and L. B. Routson, 1995. Minimized virus binding for tests of barrier materials. *Applied and Environmental Microbiology* 61(2): 643-649.
- Malescio, G., 2003. Intermolecular potentials - past, present, future. *Nature Materials* 2(8): 501-503.
- Mandel, B., 1971. Characterization of type 1 poliovirus by electrophoretic analysis. *Virology* 44(3): 554-568.
- Mayo, M. A. and L. A. Ball, 2006. ICTV in San Francisco: a report from the Plenary Session. *Archives of Virology* 151(2): 413-422.
- McCreehy, B. J., Jr., K. P. McKinnon and D. S. Lyles, 1990. Solubility of vesicular stomatitis virus M protein in the cytosol of infected cells or isolated from virions. *Journal of Virology* 64(2): 902-906.
- Mendez, J., J. Jofre, F. Lucena, N. Contreras, K. Mooijman and R. Araujo, 2002. Conservation of phage reference materials and water samples containing bacteriophages of enteric bacteria. *Journal of Virological Methods* 106(2): 215-224.
- Min Jou, W., G. Haegeman, M. Ysebaert and W. Fiers, 1972. Nucleotide Sequence of the Gene Coding for the Bacteriophage MS2 Coat Protein. *Nature* 237(5350): 82-88.
- Mix, 1974. The physical chemistry of membrane-virus interaction. *Developments in industrial microbiology* 15: 136-142.
- Miyake, T., I. Haruna, T. Shiba, Y. H. Ito and K. Yamane, 1971. Grouping of RNA phages based on the template specificity of their RNA replicases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 68(9): 2022-2024.
- Möller, W. J., 1964. Determination diffusion coefficients molecular weights ribonucleic acids Vi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 51: 501-509.
- Moody, M. F., 1999. Geometry of phage head construction. *Journal of Molecular Biology* 293(2): 401-433.
- Moore, R. S., D. H. Taylor, L. S. Sturman, M. M. Reddy and G. W. Fuhs, 1981. Poliovirus adsorption by 34 minerals and soils. *Applied and Environmental Microbiology* 42(6): 963-975.
- Morris, R. and W. M. Waite, 1980. Evaluation of procedures for recovery of viruses from water-1 concentration systems. *Water Research* 14(7): 791-793.
- Mouillot, L. and R. Netter, 1977. Identification of Orthopox virus by isoelectrofocusing in a granulated gel. *Annales de Microbiologie* 128(3): 417-419.
- Murray, J. P. and G. A. Parks 1980. Poliovirus adsorption on oxide surfaces: correspondence with the DLVO-Lifshitz theory of colloid stability. Washington, M.C. Kavanaugh, Leckie, J.O., American Chemical Society. 97-133 pages.

- Nam, K. T., D. W. Kim, P. J. Yoo, C. Y. Chiang, N. Meethong, P. T. Hammond, Y. M. Chiang and A. M. Belcher, 2006. Virus-enabled synthesis and assembly of nanowires for lithium ion battery electrodes. *Science* 312(5775): 885-888.
- Nasser, A. M., A. Adin and B. Fattal, 1992. Adsorption of poliovirus 1 and F+bacteriophages onto sand. Jerusalem, Israel. ISEEQS Publication: 312-319.
- Nasser, A. M., Y. Tchorsh and B. Fattal, 1993. Comparative survival of *E. coli*, F+ bacteriophages, HAV and poliovirus 1 in wastewater and groundwater. *Water Science and Technology* 27(3-4): 401-407.
- Nedoluzhko, A. and T. Douglas, 2001. Ordered association of tobacco mosaic virus in the presence of divalent metal ions. *Journal of inorganic biochemistry* 84(3-4): 233-240.
- Ninham, B. W., 1999. On progress in forces since the DLVO theory. *Advances in Colloid and Interface Science* 83(1-3): 1-17.
- Norme ISO 10705-1, 1995. Water quality: Detection and enumeration of bacteriophages. Part 1: Enumeration of F-specific RNA bacteriophages. Geneva, Switzerland.
- Nuanalsuwan, S., T. Mariam, S. Himathongkham and D. O. Cliver, 2002. Ultraviolet inactivation of feline calicivirus, human enteric viruses and coliphages. *Photochemistry and Photobiology* 76(4): 406-10.
- O'Callaghan, R., R. Bradley and W. Paranchych, 1973. Controlled alterations in the physical and biological properties of R17 bacteriophage induced by guanidine hydrochloride. *Virology* 54(2): 476-94.
- Ogorzaly, L. and C. Gantzer, 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.
- Ohshima, H., 1995. Electrophoresis of soft particles. *Advances in Colloid and Interface Science* 62: 189-235.
- Olson, M. R., R. P. Axler and R. E. Hicks, 2004. Effects of freezing and storage temperature on MS2 viability. *Journal of Virological Methods* 122(2): 147-152.
- Orlov, V. N., A. M. Arutyunyan, S. V. Kust, E. A. Litmanovich, V. A. Drachev and E. N. Dobrov, 2001. Macroscopic aggregation of tobacco mosaic virus coat protein. *Biochemistry* 66(2): 154-162.
- Overby, L. R., G. H. Barlow, R. H. Doi, M. Jacob and S. Spiegelman, 1966. Comparison of two serologically distinct ribonucleic acid bacteriophages. I. Properties of the viral particles. *Journal of Bacteriology* 91(1): 442-448.
- Overman, S. A., D. M. Kristensen, P. Bondre, B. Hewitt and G. J. Thomas, Jr., 2004. Effects of virion and salt concentrations on the Raman signatures of filamentous phages fd, Pf1, Pf3, and PH75. *Biochemistry* 43(41): 13129-13136.
- Patolsky, F., G. Zheng, O. Hayden, M. Lakadamyali, X. Zhuang and C. M. Lieber, 2004. Electrical detection of single viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(39): 14017-14022.
- Payment, P., A. Berube, D. Perreault, R. Armon and M. Trudel, 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): 932-5.
- Penrod, S. L., T. M. Olson and S. B. Grant, 1995. Whole Particle Microelectrophoresis for Small Viruses. *Journal of Colloid and Interface Science* 173(2): 521-523.
- Priano, C., R. Arora, J. Butke and D. R. Mills, 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.

- Quignon, F., A. Huyard, L. Schwartzbrod and F. Thomas, 1997. Use of Doehlert matrices for study of poliovirus-1 adsorption. *Journal of Virological Methods* 68(1): 33-44.
- Quignon, F., F. Thomas, C. Gantzer, A. Huyard and L. Schwartzbrod, 1998. Virus adsorption in a complex system: an experimentally designed study. *Water Research* 32(4): 1222-1230.
- Rafikova, E. R., B. I. Kurganov, A. M. Arutyunyan, S. V. Kust, V. A. Drachev and E. N. Dobrov, 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.
- Raphael, R. A., S. A. Sattar and V. S. Springthorpe, 1985. Rotavirus concentration from raw water using positively charged filters. *Journal of Virological Methods* 11(2): 131-140.
- Redman, J. A., S. B. Grant, T. M. Olson, M. E. Hardy and M. K. Estes, 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.
- Ries-Kautt, M. M. and A. F. Ducruix, 1989. Relative effectiveness of various ions on the solubility and crystal growth of lysozyme. *Journal of Biological Chemistry* 264(2): 745-748.
- Rose, J. B., S. N. Singh, C. P. Gerba and L. M. Kelley, 1984. Comparison of microporous filters for concentration of viruses from wastewater. *Applied and Environmental Microbiology* 47(5): 989-992.
- Sagrera, A., C. Cobaleda, S. Berger, M. J. Marcos, V. Shnyrov and E. Villar, 1998. Study of the influence of salt concentration on Newcastle disease virus matrix protein aggregation. *Biochemistry and Molecular Biology International* 46(3): 429-435.
- Salo, R. J. and H. D. Mayor, 1978. Isoelectric focusing of parvoviruses. *Intervirology* 10(2): 87-93.
- Savichtcheva, O. and S. Okabe, 2006. Alternative indicators of fecal pollution: relations with pathogens and conventional indicators, current methodologies for direct pathogen monitoring and future application perspectives. *Water Research* 40(13): 2463-2476.
- Schaldach, C. M., W. L. Bourcier, H. F. Shaw, B. E. Viani and W. D. Wilson, 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): 1-10.
- Schaper, M. and J. Jofre, 2000. Comparison of methods for detecting genotypes of F-specific RNA bacteriophages and fingerprinting the origin of faecal pollution in water samples. *Journal of Virological Methods* 89(1-2): 1-10.
- Schijven, J. F. and M. Hassanizadeh, 2000. Removal of Viruses by Soil Passage: Overview of Modeling, Processes, and Parameters. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 30(1): 49-127.
- Schwartzbrod, J. and L. Schwartzbrod, 1999. Les agents biologiques d'intérêt sanitaire des boues d'épuration. Ademe. Paris, France. 71-76.
- Schwartzbrod, L., 1991. *Virologie des milieux hydriques*. Lavoisier. Paris. 320 pages.
- Sharp, D. G., A. E. Hook, A. R. Taylor, D. Beard and J. W. Beard, 1946. Sedimentation characters and pH stability of the T2 bacteriophage of *Escherichia coli* *Journal of Biological Chemistry* 165(1): 259-270.
- Shi, L., G. Sanyal, A. Ni, Z. Luo, S. Doshna, B. Wang, T. L. Graham, N. Wang and D. B. Volkin, 2005. Stabilization of human papillomavirus virus-like particles by non-ionic surfactants. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 94(7): 1538-1551.
- Shiba, T. and T. Miyake, 1975. New type of infectious complex of *E. coli* RNA phage. *Nature* 254(5496): 157-158.

- Shiba, T. and Y. Suzuki, 1981. Localization of A protein in the RNA-A protein complex of RNA phage MS2. *Biochimica et Biophysica Acta* 654(2): 249-55.
- Shields, P. A. and S. R. Farrah, 1983. Influence of salts on electrostatic interactions between poliovirus and membrane filters. *Applied and Environmental Microbiology* 45(2): 526-531.
- Shields, P. A. and S. R. Farrah, 1987. Determination of the electrostatic and hydrophobic character of enteroviruses and bacteriophages. 87<sup>th</sup> Annual Meeting. American Society of Microbiology. Washington.
- Shields, P. A. and S. R. Farrah, 2002. Characterization of Virus Adsorption by Using DEAE-Sepharose and Octyl-Sepharose. *Applied and Environmental Microbiology* 68(8): 3965-3968.
- Shields, P. A., T. F. Ling, V. Tjatha, D. O. Shah and S. R. Farrah, 1986. Comparison of positively charged membrane filters and their use in concentrating bacteriophages in water. *Water Research* 20(2): 145-151.
- Sigg, L., P. Behra and W. Stumm, 2006. *Chimie des milieux aquatiques - Chimie des eaux naturelles et des interfaces dans l'environnement*, Dunod, Sciences Sup. 564 pages.
- Silverman, P. M. and R. C. Valentine, 1969. The RNA injection step of bacteriophage f2 infection. *Journal of General Virology* 4(1): 111-124.
- Simonet, J., 2007. Inactivation et dégradation du génome des bactériophages ARN F-spécifiques et du poliovirus 1 par le rayonnement ultraviolet. Nancy Université, PhD. 197 pages.
- Skraber, S., B. Gassilloud, L. Schwartzbrod and C. Gantzer, 2004. Survival of infectious Poliovirus-1 in river water compared to the persistence of somatic coliphages, thermotolerant coliforms and Poliovirus-1 genome. *Water Research* 38(12): 2927-2933.
- Skripkin, E. A., M. R. Adhin, M. H. de Smit and J. van Duin, 1990. Secondary structure of the central region of bacteriophage MS2 RNA : Conservation and biological significance. *Journal of Molecular Biology* 211(2): 447-463.
- Sobsey, M. D., C. H. Dean, M. E. Knuckles and R. A. Wagner, 1980. Interactions and survival of enteric viruses in soil materials. *Applied and Environmental Microbiology* 40(1): 92-101.
- Sobsey, M. D. and J. S. Glass, 1980. Poliovirus concentration from tap water with electropositive adsorbent filters. *Applied and Environmental Microbiology* 40(2): 201-210.
- Sobsey, M. D. and A. R. Hickey, 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. and B. L. Jones, 1979. Concentration of poliovirus from tap water using positively charged microporous filters. *Applied and Environmental Microbiology* 37(3): 588-595.
- Sobsey, M. D., S. E. Oglesbee and D. A. Wait, 1985. Evaluation of methods for concentrating hepatitis A virus from drinking water. *Applied and Environmental Microbiology* 50(6): 1457-1463.
- Sobsey, M. D., C. Wallis, M. Henderson and J. L. Melnick, 1973. Concentration of Enteroviruses from Large Volumes of Water. *Applied Microbiology* 26(4): 529-534.
- Solo-Gabriele, H. M., M. A. Wolfert, T. R. Desmarais and C. J. Palmer, 2000. Sources of *Escherichia coli* in a coastal subtropical environment. *Applied and Environmental Microbiology* 66(1): 230-237.

- Springthorpe, V. S., C. L. Loh, W. J. Robertson and S. A. Sattar, 1993. In Situ Survival of Indicator Bacteria, MS-2 Phage and Human Pathogenic Viruses in River Water. *Water Science and Technology* 27(3-4): 413-420.
- Stonehouse, N. J., K. Valegård, R. Golmohammadi, S. van den Worm, C. Walton, P. G. Stockley and L. Liljas, 1996. Crystal structures of MS2 capsids with mutations in the subunit FG loop. *Journal of Molecular Biology* 256(2): 330-339.
- Strauss, J. H. and R. L. Sinsheimer, 1963. Purification and properties of bacteriophage MS2 and of its ribonucleic acid. *Journal of Molecular Biology* 7: 43-54.
- Suci, P. A., M. T. Klem, T. Douglas and M. Young, 2005. Influence of electrostatic interactions on the surface adsorption of a viral protein cage. *Langmuir* 21(19): 8686-8693.
- Sugiyama, T. and D. Nakada, 1968. Translational control of bacteriophage MS2 RNA cistrons by MS2 coat protein: Polyacrylamide gel electrophoretic analysis of proteins synthesized in vitro. *Journal of Molecular Biology* 31(3): 431-440.
- Tang, J. X., P. A. Janmey, A. Lyubartsev and L. Nordenskiöld, 2002. Metal ion-induced lateral aggregation of filamentous viruses fd and M13. *Biophysical Journal* 83(1): 566-581.
- Tars, K., M. Bundule, K. Fridborg and L. Liljas, 1997. The crystal structure of bacteriophage GA and a comparison of bacteriophages belonging to the major groups of *Escherichia coli* leviviruses. *Journal of Molecular Biology* 271(5): 759-773.
- Tartera, C. and J. Jofre, 1987. Bacteriophages active against *Bacteroides fragilis* in sewage-polluted waters. *Applied and Environmental Microbiology* 53(7): 1632-1637.
- Tartera, C., J. Jofre and F. Lucena, 1988. Relationship between numbers of enteroviruses and bacteriophages infecting *Bacteroides fragilis* in different environmental samples. *Environmental Technology Letters* 9: 407-410.
- Taylor, D. H., R. S. Moore and L. S. Sturman, 1981. Influence of pH and electrolyte composition on adsorption of poliovirus by soils and minerals. *Applied and Environmental Microbiology* 42(6): 976-984.
- Thill, A., 1999. Agrégation des particules : structure, dynamique et simulation. Application au cas d'un écoulement stratifié : l'estuaire du Rhône. Aix-Marseille 3, PhD. 399 pages.
- Toze, S., 1999. PCR and the detection of microbial pathogens in water and wastewater. *Water Research* 33(17): 3545-3556.
- Valegård, K., K. Fridborg and L. Liljas, 1994. Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of the bacteriophage Qbeta. *Acta Crystallographica Section D, Biological Crystallography* 50(Pt 1): 105-109.
- Valegård, K., L. Liljas, K. Fridborg and T. Unge, 1990. The three-dimensional structure of the bacterial virus MS2. *Nature* 345(6270): 36-41.
- Valegård, K., L. Liljas, K. Fridborg and T. Unge, 1991. Structure determination of the bacteriophage MS2. *Acta Crystallographica Section B-Structural Science* 47 ( Pt 6): 949-960.
- Valegård, K., J. B. Murray, N. J. Stonehouse, S. van den Worm, P. G. Stockley and L. Liljas, 1997. The three-dimensional structures of two complexes between recombinant MS2 capsids and RNA operator fragments reveal sequence-specific protein-RNA interactions. *Journal of Molecular Biology* 270(5): 724-738.
- van den Worm, S. H., N. J. Stonehouse, K. Valegård, J. B. Murray, C. Walton, K. Fridborg, P. G. Stockley and L. Liljas, 1998. Crystal structures of MS2 coat protein mutants in complex with wild-type RNA operator fragments. *Nucleic Acids Research* 26(5): 1345-51.
- van den Worm, S. H. E., R. I. Koning, H. J. Warmenhoven, H. K. Koerten and J. van Duin, 2006. Cryo Electron Microscopy Reconstructions of the *Leviviridae* Unveil the

- Densest Icosahedral RNA Packing Possible. *Journal of Molecular Biology* 363(4): 858-865.
- van der Schoot, P. and R. Bruinsma, 2005. Electrostatics and the assembly of an RNA virus. *Physical Review E* 71(6): 061928-12.
- van Oss, C. J., 1996. *Forces interfaciales en milieux aqueux*, Masson. 402 pages.
- van Voorthuizen, E. M., N. J. Ashbolt and A. I. Schafer, 2001. Role of hydrophobic and electrostatic interactions for initial enteric virus retention by MF membranes. *Journal of Membrane Science* 194: 69-79.
- Verwey, E. J. and J. T. G. Overbeek, 1948. *Theory of the stability of lyophobic colloids*, Dover Publications. 218 pages.
- Vinje, J., S. J. Oudejans, J. R. Stewart, M. D. Sobsey and S. C. Long, 2004. Molecular detection and genotyping of male-specific coliphages by reverse transcription-PCR and reverse line blot hybridization. *Applied and Environmental Microbiology* 70(10): 5996-6004.
- Vivares, D. and F. Bonnete, 2002. X-ray scattering studies of *Aspergillus flavus* urate oxidase: towards a better understanding of PEG effects on the crystallization of large proteins. *Acta Crystallographica Section D, Biological Crystallography* 58(Pt 3): 472-479.
- Wagner, E. K. and M. J. Hewlett, 2004. *Replication of positive-sense RNA viruses*. Basic Virology. Blackwell Publishing. 231-256.
- Ward, R. L., 1978. Mechanism of poliovirus inactivation by ammonia. *Journal of Virology* 26(2): 299-305.
- Weitz, D. A. and M. Oliveria, 1984. Fractal Structures Formed by Kinetic Aggregation of Aqueous Gold Colloids. *Physical Review Letters* 52(16): 1433.
- Winfield, M. D. and E. A. Groisman, 2003. Role of nonhost environments in the lifestyles of *Salmonella* and *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* 69(7): 3687-3694.
- Yang, Y.-W. and J.-C. Yang, 1996. Effect of polyionic compounds on the adsorption of polyoma virus. *Antiviral Research* 33(1): 33-39.
- Zerda, K. S., 1982. *Adsorption of viruses to charge-modified silica*. Baylor College of Medicine, PhD.
- Zerda, K. S. and C. P. Gerba, 1984. Agarose isoelectrofocusing of intact virions. *Journal of Virological Methods* 9(1): 1-6.





## PUBLICATIONS

« Impact of chemical and structural anisotropy on the electrophoretic mobility of spherical soft-multilayer particles: the case of bacteriophage MS2 ». *Biophysical Journal*, 2008, 94: 3293-3312.

**Jérémie Langlet, Fabien Gaboriaud, Christophe Gantzer et Jérôme F.L. Duval.**

« Aggregation and surface properties of F-specific RNA phages: implication for membrane filtration processes ». *Water Research*, 2008, 42(10-11): 2769-2777.

**Jérémie Langlet, Fabien Gaboriaud, Jérôme F.L. Duval et Christophe Gantzer.**

« Effects of pH on plaque forming unit counts and aggregation of MS2 bacteriophage ». *Journal of Applied Microbiology*, 2007, 103 (5): 1632-1638.

**Jérémie Langlet, Fabien Gaboriaud et Christophe Gantzer.**

« Efficiency of MS2 phage and Q $\beta$  phage removal by membrane filtration in water treatment: applicability of real-time RT-PCR method », *Journal of Membrane Science*, sous presse.

**Jérémie Langlet, Leslie Ogorzaly, Jean-Christophe Schrotter, Claire Machinal, Fabien Gaboriaud, Jérôme F. L. Duval et Christophe Gantzer.**

## COMMUNICATIONS (<sup>1</sup>Oral, <sup>2</sup>Poster)

<sup>1</sup>« Physico-chimie des interfaces microbiennes », Société Française de Chimie Grand-Est, Nancy, France, 30 Mai 2008.

**Jérémie Langlet, Anne Delille, Fabienne Quilès, François Humbert, Christophe Gantzer, Jérôme F.L. Duval, Fabien Gaboriaud.**

<sup>1</sup>« Electrophoresis of soft, multi-layered bacteriophage particles, application to microorganisms elimination by membrane filtration », 8<sup>th</sup> International Electrokinetics Conference, Santa Fe, USA, 18-23 Mai 2008.

**Jérémie Langlet, Fabien Gaboriaud, Christophe Gantzer et Jérôme F.L. Duval.**

<sup>1</sup>« Elimination of MS2 and Q $\beta$  bacteriophages by membrane filtration under conditions which favor individual particles and surface charge expression », 14<sup>th</sup> International Symposium on Health-Related Water Microbiology, Tokyo, Japon, 9-15 Septembre 2007.

**Jérémie Langlet, Leslie Ogorzaly, Jean-Christophe Schrotter, Claire Machinal et Christophe Gantzer.**

<sup>1</sup>« Agrégation des bactériophages ARN F-spécifiques : Implication pour l'estimation de l'effet virucide des traitements de l'industrie agro-alimentaire » VII<sup>e</sup> Congrès National de la Société Française de Microbiologie (SFM), Nantes, France, 30 mai-1 juin 2007.

**Jérémie Langlet et Christophe Gantzer.**

<sup>2</sup>« Étude des propriétés de surface de bactériophages ARN F-spécifiques », Doctoriales de Lorraine, La Bresse, France. 23-27 Octobre 2006.

**Jérémie Langlet.**

<sup>1</sup>« Etude des propriétés de surface des bactériophages ARN F-spécifiques » dans le cadre du projet ACTIA « Thermo-inactivation des virus contaminant les fruits rouges surgelés importés d'Europe centrale : effet synergique du pH », Institut National Agronomique Paris-Grignon, Paris, France, 27 septembre 2006.

**Jérémie Langlet et Christophe Gantzer.**

<sup>2</sup>« Aggregation of F-specific RNA bacteriophages in aqueous media » présenté à l'Ecole thématique-CNRS « Interfaces microorganisme-solution : Biofilms et réactivité aux interfaces » à Ramonchamp, 9-15 mai 2005 France, et au 13<sup>th</sup> International Symposium on Health-Related Water Microbiology, Swansea University, Pays de Galles, 4-9 Septembre 2005.

**Jérémie Langlet, Leslie Ogorzaly et Christophe Gantzer.**

<sup>1</sup>« Étude des propriétés de surface de bactériophages ARN F-spécifiques (MS2, Q $\beta$ , GA et SP) », Laboratoire de Minéralogie Cristallographie de Paris, France, 15 février 2005.

**Jérémie Langlet, Fabien Gaboriaud et Christophe Gantzer.**

<sup>1</sup>« Adhesion and aggregation of MS2 bacteriophage in aqueous media stored in hydrophobic or glass support », 8<sup>th</sup> Saar-Lor-Lux workshop on Virus Research, Homburg, Allemagne, 13 septembre 2004.

**Jérémie Langlet et Christophe Gantzer.**

---

# Le programme REACH

« Registration Evaluation Autorisation of Chemicals »

## 1/ Contexte

L'industrie chimique européenne représente 31% de la chimie mondiale. Elle joue un rôle économique important et est au cœur de la stratégie communautaire du développement durable. Au niveau social, il s'agit d'améliorer la santé et la sécurité des travailleurs et du grand public tout en maintenant un niveau d'exploitation élevé. En ce qui concerne l'environnement, il s'agit d'éviter la contamination chimique, de préserver la biodiversité et d'améliorer la maîtrise des substances persistantes, bioaccumulables et toxiques.

## 2/ Constat

Le système actuel fait une distinction entre les substances existantes déjà sur le marché en septembre 1981 et régit par le règlement européen n°1488/94 et les substances nouvelles mises sur le marché après et régit par la directive 67/548/CE (1981) pour les quantités supérieures à 10Kg/an.

En 1981, on a relevé 100 106 substances existantes et pour lesquelles on note un manque de connaissance concernant les propriétés et les utilisations. Actuellement, environ 30 000 sont commercialisées en quantité supérieure ou égale à 1T/an, 140 sont prioritaires et font l'objet d'une évaluation par les autorités des états membres.

En février 2001, la Commission a publié un livre blanc intitulé « Stratégie pour la future politique dans le domaine des substances chimiques » s'inspirant d'un tour d'horizon du système communautaire existant pour réglementer l'utilisation en toute sécurité des substances chimiques. La Commission a conclu que la réforme de la législation en vigueur était nécessaire et propose le projet de règlement REACH, le 29 octobre 2003. Ce règlement remplacera dans une large mesure plusieurs pans existants de la législation soit quelque 40 directives existantes, s'étendra à des secteurs qui n'avaient pas été traités jusqu'alors et entraînera l'application directe de la législation dans toute la communauté.

## 3/ Le Projet REACH

### 3.1 Objectif

- Protéger la santé humaine et l'environnement
- Renforcer la transparence
- Stimuler l'innovation et maintenir la position concurrentielle de l'industrie chimique
- Promouvoir des essais non réalisés sur les animaux

### 3.2 Objet

- Les principaux éléments du projet de règlement :
- **L'enregistrement** de toutes les substances produites ou importées à plus de 1T/an.
- **L'évaluation** qui s'exerce de 2 façons sur les dossiers ou sur les substances s'il y a un risque pour la santé humaine ou sur l'environnement.
- **L'autorisation** des substances CMR ( cancérigènes, mutagènes et reprotoxiques), des POPs (polluants organiques persistants), des PBT ( persistantes, bioaccumulables et toxiques) et des vPvB ( très persistantes et très bioaccumulables) et des substances préoccupantes comme les perturbateurs endocriniens.

- La création d'une **agence européenne** pour gérer les aspects techniques, scientifiques et administratifs du système.
- Des **dispositions similaires pour les substances nouvelles et les substances anciennes**. 30 000 substances sont concernées par le règlement REACH.
- Une **responsabilité accrue des industriels**, la charge de la preuve ne reposant plus sur les autorités compétentes.
- Ce système modifie la directive 1999/45/CE ( directive concernant la classification, l'emballage et l'étiquetage des préparations dangereuses) et le règlement CE sur les polluants organiques.

### 3.3 Champ d'application du règlement :

**Les substances** : *Un élément chimique* et ses composés à l'état naturel ou obtenus par un processus de fabrication, y compris tout additif nécessaire pour en préserver la stabilité et toute impureté résultant du processus mis en œuvre, mais à l'exclusion de tout solvant qui peut être séparé sans affecter la stabilité de la substance ou modifier sa composition.

**Les préparations** : un *mélange* ou une *solution* composé de deux substances ou plus.

**Les produits** : un *objet* composé d'une ou plusieurs substances ou d'une ou de plusieurs préparations, auquel sont donnés, au cours du processus de fabrication, une forme, une surface ou un dessin particuliers qui sont plus déterminants pour son utilisation finale que pour sa composition chimique.

Les substances utilisées, pour des **activités de recherche et de développement** axées sur les produits et les processus, sont exemptées pour une durée de 5 ans qui pourra être prolongée de 5 ans sur demande et justifiée par le programme de recherche. Les quantités inférieures à 1 tonne ne sont pas soumises à l'obligation d'enregistrement.

**Les polymères** sont exemptés, l'administration se réserve le droit d'en enregistrer certains de façon allégée.

**Les intermédiaires isolés** bénéficient d'un régime allégé.

**Les substances radioactives et les intermédiaires non isolés** ne sont pas concernés par le règlement REACH.

Sont **dispensés d'enregistrement** les substances utilisées, dans les médicaments à usage humain ou vétérinaire, comme additifs dans les denrées alimentaires, comme substances aromatisantes, comme additif dans l'alimentation des animaux et dans l'alimentation des animaux.

Sont **considérées comme enregistrées** les substances présentes dans des produits phytopharmaceutiques et biocides.

### 3.4 Les acteurs

#### • Les acteurs de la chaîne d'approvisionnement :

- **Le fabricant** : toute personne physique ou morale établie dans la Communauté qui fabrique une substance dans la Communauté.

- **L'importateur** : toute personne physique ou morale établie dans la Communauté qui est responsable de l'importation.
- **L'utilisateur en aval** : toute personne physique ou morale établie dans la Communauté, autre que le fabricant ou l'importateur, qui utilise une substance, telle quelle ou contenue dans une préparation, dans l'exercice de ses activités industrielles ou professionnelles. Un distributeur ou un consommateur n'est pas un utilisateur en aval.

• **Les autorités compétentes** : l'autorité ou les autorités ou organismes mis en place par les Etats membres en vue d'exécuter les obligations résultant du règlement du 29 octobre 2003.

• **L'Agence** gère le processus d'enregistrement, veille à la cohérence de l'évaluation, établit des critères destinés à guider les Etats membres dans leur sélection des substances qui devront être évaluées et prend des décisions nécessitant des informations supplémentaires sur les substances en cours d'évaluation. L'agence coordonne également le travail des États membres, étaye le processus décisionnel au moyen de données scientifiques et a un devoir de confidentialité des informations.

• **La Commission**

#### 4/ Fonctionnement de REACH

##### 4.1 Enregistrement

Il constitue l'élément fondamental de REACH. Les substances chimiques fabriqués ou importés dans des quantités de plus d'une tonne par an et par fabricant/importateur sont enregistrés dans une base de données centrale. L'enregistrement comprend les données relatives aux propriétés, aux utilisations et aux précautions d'emploi des substances chimiques. Les données requises sont proportionnées aux volumes de production et aux risques présentés par la substance. Les données de sécurité sont transmises par la chaîne d'approvisionnement, de sorte que ceux qui utilisent les produits chimiques dans leur propre processus de production - pour fabriquer d'autres produits - puissent le faire de manière sûre et responsable, sans mettre en danger la santé des travailleurs et des consommateurs et sans risque pour l'environnement.

##### 4.2 Evaluation

**Deux types d'évaluation** sont prévus : l'évaluation du dossier et l'évaluation de la substance.

**L'évaluation du dossier** est obligatoire pour toutes les propositions prévoyant des expériences animales. Elle doit essentiellement minimiser la nécessité du recours à ce type d'expériences. REACH a été conçu pour réduire au strict minimum les essais sur les animaux. Il exige le partage de données expérimentales et encourage le recours aux sources d'information alternatives comme les relations quantitatives, structure/activité. L'évaluation de dossier peut également être menée pour vérifier la conformité de l'enregistrement.

**L'évaluation des substances** : Les autorités compétentes peuvent évaluer toute substance s'ils ont des raisons valables de suspecter un risque pour la santé humaine ou l'environnement. Il s'agit d'un contrôle de qualité et de conformité. A partir des orientations de l'Agence qui fixe les priorités, les autorités compétentes des États membres proposent des plans mobiles pour les substances qu'ils souhaitent évaluer.

Les deux types d'évaluation peuvent se conclure par une demande de données complémentaires.

### 4.3 Autorisation

Les **substances extrêmement préoccupantes** sont soumises à autorisation en vue d'une utilisation particulière ou d'une mise sur le marché. Sont définies comme extrêmement préoccupantes, les substances cancérogènes, mutagènes et toxiques pour la reproduction (CMR), les substances persistantes, bioaccumulables et toxiques (PBT), les substances très persistantes et très bioaccumulables (vPvB) et les substances identifiées comme ayant des effets graves et irréversibles sur l'être humain et l'environnement. Si les risques, émanant de l'utilisation d'une telle substance peuvent être parfaitement maîtrisés, l'autorisation sera accordée. Dans le cas contraire, la Commission analysera le niveau de risque pour déterminer si l'utilisation de la substance présente un intérêt socioéconomique et si des substituts existent. Sur la base de ces facteurs, la Commission décide de l'autorisation de la substance. La Commission peut également introduire des restrictions au regard des substances devant être gérées au niveau de l'UE pour assurer que les risques qu'elles présentent soient acceptables.

#### 5/ Mise en place :

- **Période Intérimaire : 2004 à 2006**

REACH sera en cours de discussion et d'approbation par la Commission Européenne. La législation actuelle sera celle en vigueur.

- **Période transitoire : 2006 à 2008**

REACH entrera en vigueur, la législation actuelle sera abrogée. L'Agence ne sera pas encore opérationnelle.

- **Période opérationnelle à partir de 2008**

REACH et l'Agence seront en vigueur.

Pendant cette période de mise en place, plusieurs projets seront développés par la Commission européenne. Les RIP, REACH Implementation Project, au nombre de 7 (Description du Processus d'implémentation, Technologies de l'Information (IT)(IUCLID), **Guide et outils pour l'industrie « Comment faire », Guide et outils pour les autorités « Comment contrôler »**, Mise en place de la « pré-agence », Mise en place de l'agence, Commission - Travail de la Commission). Par ailleurs, un projet est mis en place par l'industrie chimique en concertation avec la Commission et les Etats membres. Il s'agit du projet SPORT « Strategy Partnership on Reach Testing » destiné à tester le processus REACH sur 15 substances.

*Cette fiche a été rédigée à partir de **la proposition de règlement du parlement européen** datant du 29 octobre 2003.*

#### Pour en savoir plus ...

<http://europa.eu.int/comm/environment/chemicals/whitepaper.htm>

<http://ecb.jrc.it>

[http://europa.eu.int/comm/press\\_room/presspacks/reach/pp\\_reach\\_en.htm](http://europa.eu.int/comm/press_room/presspacks/reach/pp_reach_en.htm)

<http://europa.eu.int/eur-lex/fr/com/pdf/2003/act0644fr04/1.pdf> ( La directive)

[http://europa.eu.int/eur-lex/fr/com/wpr/2001/com2001\\_0088fr01.pdf](http://europa.eu.int/eur-lex/fr/com/wpr/2001/com2001_0088fr01.pdf) ( Le Livre Blanc)

[http://www.envirodroit.net/fr/actualites/news\\_detail.asp?id=23758&genre=envirodroit](http://www.envirodroit.net/fr/actualites/news_detail.asp?id=23758&genre=envirodroit)

<http://www.euractiv.com>

Les bactériophages ARN F-spécifiques sont couramment utilisés comme des modèles de virus entériques pathogènes pour l'homme car ils ont une taille (~ 25 nm) et une structure proches. Néanmoins, en dehors de leurs cellules hôtes, les phages, tout comme les virus pathogènes, sont des particules biologiques inertes dont le comportement dépendra directement des propriétés de surface. Paradoxalement, peu de données sont connues dans ce domaine alors que ce sont des aspects incontournables, tant d'un point de vue théorique pour développer de nouvelles approches adaptées aux particules biologiques, que d'un point de vue industriel pour limiter le risque viral.

L'objectif de ce travail est de préciser les propriétés interfaciales de bactériophages ARN F-spécifiques (charge, hydrophobicité) en milieu aqueux et en tenant compte des spécificités des particules biologiques notamment de leur perméabilité hydrodynamique. Nous avons également cherché à relier ces propriétés aux capacités d'adhésion-agrégation des particules virales. Deux aspects sont abordés : l'élimination des virus par des procédés de filtration membranaire et l'impact de l'agrégation sur l'estimation du nombre d'unités infectieuses.

Dans la première partie, nous avons défini la nature et les caractéristiques de l'interface du phage MS2 et son impact sur les mesures de mobilités électrophorétiques. Pour la première fois, nous décrivons le comportement électrocinétique de particules biologiques sphériques constituées de plusieurs couches molles (génome, génome accolé à la capsid, capsid protéique) en prenant en compte l'anisotropie chimique et structurale des particules. Il en résulte des mobilités négatives dues à une perméabilité élevée, d'un ordre de grandeur égal à l'épaisseur de la capsid protéique (~ 2 nm). Cette perméabilité permet au flux électro-osmotique de « sonder » la charge négative du génome du phage MS2 et montre que les virus ne peuvent pas être assimilés à des particules dures non perméables. Le potentiel zêta ( $\zeta$ ) n'est donc pas adapté à ce type de particule.

Comme le génome a un impact sur la charge du virus, nous nous sommes intéressés à quatre phages ARN F-spécifiques ayant des tailles de génome différentes : ~ 3500 nucléotides pour les phages MS2 et GA, ~ 4200 nucléotides pour les phages Q $\beta$  et SP. En combinant des mesures de tailles et de mobilités pour différentes valeurs de pH (de 1,5 à 7,5) et de forces ioniques (NaNO<sub>3</sub>, 1 et 100 mM), nous avons défini l'échelle d'hydrophobicité suivante : GA et SP > Q $\beta$  > MS2. De même, en nous basant sur les mobilités électrophorétiques, il ressort que la charge négative du phage Q $\beta$  sous forme isolée est plus importante que celle du phage MS2 (perméabilité hydrodynamique supposée comparable à l'état isolé). Le point isoélectrique ( $pI$ ) de la littérature pour le phage Q $\beta$  (5,3) a d'ailleurs été remis en cause (entre 1,9 et 2,7 dans cette étude). Les mobilités des phages SP et GA ne peuvent être comparées aux autres car ces phages sont sous forme agrégée et donc présentent une perméabilité hydrodynamique différente.

Ces propriétés interfaciales différentes permettent d'expliquer le comportement des phages MS2 et Q $\beta$  lors d'un traitement par filtration membranaire. Les membranes classiquement utilisées dans le cadre du traitement de l'eau sont hydrophiles et électronégatives. Or, c'est bien le phage Q $\beta$  qui est toujours moins bien éliminé, quelle que soit la porosité de la membrane (ultrafiltration ou microfiltration). Nous avons par ailleurs démontré que les techniques rapides de RT-PCR en temps réel sont aussi adaptées que la technique de référence par plages de lyse (UFP). Finalement, dans certains cas, l'agrégation virale pourrait expliquer la baisse des unités infectieuses (UFI) du phage MS2 en solution. Cette agrégation peut entraîner une baisse d'UFI de 1 à 3 log<sub>10</sub>. La congélation cause également une perte d'UFI mais celle-ci est due à la dégradation du virus et non à son agrégation.

Ainsi, les méthodes expérimentales et théoriques développées dans cette thèse ont abouti à une meilleure connaissance des propriétés interfaciales des phages ARN F-spécifiques. Les résultats fondamentaux obtenus ont également mené à des avancées méthodologiques pour des applications industrielles.

**Mots clés :** *bactériophages ARN F-spécifiques, propriétés interfaciales, agrégation, adhésion, membrane, filtration.*