HAL
open science

Étude des mécanismes d'inactivation et d'adhésion des adénovirus humains dans l'environnement

Isabelle Bertrand

To cite this version:

Isabelle Bertrand. Étude des mécanismes d'inactivation et d'adhésion des adénovirus humains dans l'environnement. Virologie. Université de Lorraine; Ecole doctorale BioSE, 2019. tel-02364400

HAL Id: tel-02364400

https://hal.univ-lorraine.fr/tel-02364400v1

Submitted on 18 Nov 2019

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.

Ecole Doctorale BioSE (Biologie, Santé, Environnement)

Mémoire

Présenté pour la candidature au diplôme

D'HABILITATION À DIRIGER DES RECHERCHES

par

Isabelle BERTRAND

Etude des mécanismes d'inactivation et d'adhésion des adénovirus humains dans l'environnement

(Section CNU 87)

Parrain scientifique : Christophe GANTZER
Professeur, LCPME UMR 7564 CNRS/Université de Lorraine
Villers-lès-Nancy

Laboratoire de Chimie Physique et Microbiologie pour les Matériaux et l'Environnement, LCPME UMR 7564 CNRS/Université de Lorraine, Equipe Microbiologie Environnementale, Campus Brabois-Santé, 9 Avenue de la Forêt de Haye, 54505 Vandoeuvre-lès-Nancy Cedex

Table des matières

Curriculum vitae ---------- *1*

1. Etat civil ---------- **1**

2- Formation et diplômes ---------- **1**

3- Expérience professionnelle ---------- **2**

3.1- Activités de recherche ---------- 2

3.2- Activités pédagogiques ---------- 2

3.3- Fonctions hospitalières ---------- 2

Activités d'enseignement ---------- *3*

1- Présentation ---------- **3**

2- Description des principaux enseignements ---------- **4**

3- Responsabilités d'enseignements ---------- **6**

4- Direction et Jury de diplômes d'état de Docteur en Pharmacie ---------- **7**

4.1- Directeur de thèse ---------- 7

4.2- Membre du jury ---------- 7

5- Activités et responsabilités collectives en lien avec l'enseignement ---------- **8**

5.1- Responsable du déménagement des travaux pratiques de microbiologie-immunologie ---------- 8

5.2- Obtention de financements pour l'achat d'équipements ---------- 8

5.3- Responsabilités collectives en lien avec l'enseignement ---------- 8

Bilan des activités de recherche ---------- *9*

1- Activités de recherche antérieures à 2009 ---------- **9**

1.1- Détection de microorganismes pathogènes dans l'environnement par des méthodes moléculaires ---------- 9

1.2- Etude du caractère infectieux de microorganismes pathogènes dans l'environnement ---------- 11

2- Activités de recherche depuis 2009 ---------- **13**

2.1- Détection de virus entériques émergents dans le milieu hydrique : cas du virus de l'hépatite E ---------- 13

2.2- Comportement des particules virales dans les réseaux d'eau ---------- 14

2.3- Infectiosité des particules virales ---------- 16

Projet scientifique ---------- *23*

1- Adhésion des virus aux surfaces dans le milieu hydrique ---------- **24**

1.1- Etude des mécanismes d'adhésion des particules virales aux surfaces dans le milieu hydrique ---------- 24

1.2- Localisation des particules virales sur les surfaces ---------- 26

2- Développement d'une nouvelle approche pour la détection des adénovirus infectieux dans l'environnement ---------- **27**

2.1- Capture des adénovirus par la protéine D1-CAR recombinante ---------- 28

2.2- Décapsidation partielle des particules virales ---------- 30

3- Etude des mécanismes d'inactivation des adénovirus ---------- **33**

3.1- Inactivation virale liée à des altérations de la capside ---------- 33

3.2- Rôle du biofilm dans la persistance des adénovirus dans les réseaux de distribution d'eau ---------- 35

3.3- Impact des méthodes de concentration des particules virales sur l'infectiosité des adénovirus ---------- 35

Activités d'encadrement de la recherche ---------- *37*

1- Co-encadrement doctoral ---------- **37**

2- Encadrement de stages de Master 2 ---------- **38**

3- Encadrement d'autres stages ---------- **39**

3.1- Stages de licence professionnelle ---------- 39

3.2- Stage Erasmus (RCSI) ---------- 39

3.3- Stages de Master 1 ---------- 39

3.4- Stages d'initiation à la recherche (2 mois) ---------- 40

Responsabilités scientifiques et administratives ---------- *41*

1- Rédaction et coordination de projets scientifiques ---------- **41**

1.1- Projets financés ---------- 41

1.2- Projet en cours d'évaluation ---------- 42

1.3- Projet non financé ---------- 42

2- Participation à des projets scientifiques ---------- **43**

2.1- Groupe de travail européen ---------- 43

2.2- Contrat européen ---------- 43

2.3- Contrats nationaux ---------- 43

2.4- Contrats industriels ---------- 44

3- Responsable du plateau technique de biologie moléculaire environnementale ---------- **44**

4- Participation à des jurys de thèse d'Université ---------- **45**

5- Responsabilités collectives dans le domaine de la recherche ---------- **45**

Rayonnement scientifique ---------- *46*

1- Conférence invitée ---------- **46**

2- Membre de comités de lecture pour des revues de microbiologie ---------- **46**

3- Membre d'un comité de sélection pour le recrutement d'un maître de conférences des universités 46

4- Membre du bureau d'une association ---------- **46**

Activités de valorisation et de transfert ---------- *46*

Production scientifique ---------- *47*

1- Publications avec comité de lecture ---------- **47**

1.1- Articles scientifiques avec comité de lecture ---------- 47

1.2- Revues avec comité de lecture ---------- 49

2- Communications dans des congrès ---------- **49**

2.1- Communications orales dans des congrès internationaux ---------- 49

2.2- Communications orales dans des congrès nationaux ---------- 50

2.3- Communications par affiches dans des congrès internationaux ---------- 51

2.4- Communications par affiches dans les congrès nationaux ---------- 52

3- Communications orales dans des séminaires ---------- **53**

Références bibliographiques ---------- *55*

Publications les plus significatives ---------- *62*

Curriculum vitae

1. Etat civil

Isabelle BERTRAND
Née le 13/10/1976 à Lunéville (54), nationalité française.

Fonction actuelle : Maître de conférences en virologie environnementale, Université de Lorraine

Recherche : LCPME (Laboratoire de Chimie Physique et Microbiologie pour les Matériaux et l'Environnement) UMR 7564 CNRS / Université de Lorraine. Equipe Microbiologie Environnementale
Enseignement : Faculté de Pharmacie

Adresse : LCPME, 9 Avenue de la Forêt de Haye, BP 20199, 54505 Vandœuvre-lès-Nancy cedex
E-mail : Isabelle.Bertrand@univ-lorraine.fr / Téléphone : 03 72 74 73 52

2- Formation et diplômes

2005 : Doctorat de l'Université Henri Poincaré (UHP, Nancy 1), Mention Chimie et Microbiologie de l'Eau.
Titre : Détection et génotypage des kystes de *Giardia lamblia* à partir de matrices environnementales et d'échantillons biologiques.
Soutenance : 31 mars 2005 à l'Université Henri Poincaré, Nancy
Jury : Pr Phillipe Hartemann, Université Henri Poincaré (Président du jury), Pr Jean-Gérard Gobert, Université Paris Descartes (Rapporteur), Dr Colette Harf-Monteil, Université Louis Pasteur, Strasbourg (Rapporteur), Pr Francisco Lucena Gutierrez, Université de Biologie, Barcelone (Examinateur) et Pr Janine Schwartzbrod, Université H. Poincaré (Directeur de thèse).

Prix de thèse de l'Association Française des Enseignants en Parasitologie des Facultés de Pharmacie (AFEPP).

2001 : Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie, Faculté de Pharmacie, UHP Nancy 1.
Titre : *Taenia saginata* : enquête épidémiologique dans les abattoirs français.
Mention très honorable

2001 : D.E.A. de Chimie et Microbiologie de l'Eau, Universités de Nancy, Pau et Poitiers.
Titre : Estimation de la viabilité des kystes de *Giardia* par mise en évidence d'ARNm.
Mention Bien, Obtention d'une bourse doctorale M.E.N.R.T.

1994-2001 : Etudes pharmaceutiques, Faculté de Pharmacie, UHP Nancy 1.
1999 : Maîtrise des Sciences Biologiques et Médicales (M.S.B.M.), UHP Nancy 1.
1994 : Baccalauréat série C, Mention bien.

3- Expérience professionnelle

3.1- Activités de recherche

Depuis septembre 2009 : Maître de conférences en virologie environnementale (Section CNU 87)
Faculté de Pharmacie. LCPME UMR 7564 CNRS / Université de Lorraine.
Thématiques de recherche principale : Etude du caractère infectieux de bactériophages et de virus entériques dans l'environnement hydrique : méthodes de caractérisation, propriétés de surface, mécanismes d'inactivation dans l'environnement et aux cours de traitements.
2008-2009 : Chercheur (10 mois).
LCPME UMR 7564 CNRS Université Henri Poincaré.
Directeur de recherche : Pr C. GANTZER
2007-2008 : ATER (temps plein, 12 mois).
Faculté de Pharmacie. LCPME UMR 7564 CNRS Université Henri Poincaré.
Directeur de recherche : Pr C. GANTZER
2006-2007 : Post-Doctorant (12 mois).
Centre de Recherche Public Gabriel Lippmann (CRPGL), Equipe Ecosystèmes aquatiques et terrestres, Belvaux, Luxembourg.
Directeur de recherche : Dr H.M. CAUCHIE
2006 : Assistant ingénieur (6 mois)
LCPME UMR 7564 CNRS Université Henri Poincaré, Faculté de Pharmacie.
2001-2005 : Doctorant de l'Université Henri Poincaré, Nancy (3 ans et 6 mois)
LCPME UMR 7564 CNRS Université Henri Poincaré.
Directeur de thèse : Pr J. SCHWARTZBROD

3.2- Activités pédagogiques

Depuis septembre 2009 : Maître de conférences en virologie environnementale, Faculté de Pharmacie, Université de Lorraine. Enseignements principaux : microbiologie générale, microbiologie environnementale, dispensation des anti-infectieux. Niveaux : Formation commune de base du diplôme de pharmacien et Master microbiologie.
2007-2008 : ATER en microbiologie à temps plein, Faculté de Pharmacie, Nancy.
2005 : ATER spécifique en informatique (6 mois, temps plein), Faculté de Pharmacie, Nancy.
2001-2004 : Allocataire-Moniteur en chimie, Faculté de Pharmacie, Nancy.

3.3- Fonctions hospitalières

1999-2000 : Stage hospitalier (9 mois) au CHRU de Nancy, Hôpitaux Maringer-Villemin-Fournier. Pharmacie hospitalière, Services de dermatologie-allergologie et d'alcoologie.
2005 : Pharmacien - Praticien attaché (4 mois). CHRU de Nancy - Brabois adultes. Pharmacie hospitalière - Médicaments dérivés du sang (dispensation nominative, traçabilité, pharmacovigilance).

Activités d'enseignement

1- Présentation

Maître de conférences en virologie environnementale à l'Université de Lorraine depuis septembre 2009, j'exerce mes activités pédagogiques principalement à la Faculté de Pharmacie dans le cadre de la formation commune de base des études de pharmacie (DFG-SP2, DFG-SP3, DFA-SP1, DFA-SP3, 6-SP-OFF) et de la formation des préparateurs en pharmacie. J'interviens également à la Faculté des Sciences et Technologies pour le Master Microbiologie et le Master Sciences de la Terre, Planète et Environnement (Spécialité Sol Eau Environnement). Depuis l'année universitaire 2018-2019, j'interviens également dans la formation continue pour la vaccination à l'officine. Je réalise en moyenne 200 heures d'enseignement (équivalent TD) par an. Je suis responsable de deux unités d'enseignement (UE) et de la formation initiale au geste de vaccination à la Faculté de Pharmacie et de deux unités d'enseignement de Master à la Faculté des Sciences et Technologies.

Mon service d'enseignement annuel depuis ma prise de fonction comme Maître de conférences est résumé dans le tableau ci-dessous.

Année universitaire	Cours magistraux	Travaux dirigés	Travaux pratiques	Heures de référentiel	Total en heures équivalent TD
2018-2019	24,5	48	119	19,5	223,25
2017-2018	28,5	36	111	10	199,75
2016-2017	28,5	55	105	6	208,75
2015-2016	28,75	59,5	108	6	216,5
2014-2015	22,5	12	31,5	-	77,25*
2013-2014	26	47	103,5	1	190,5
2012-2013	24	15	141,5	-	192,5
2011-2012	15,5	12	182	4	217,25
2010-2011	4	8	251	-	265
2009-2010	6	0	125,5	-	133,5**

* : congé maternité / ** : Aménagement de service 1ère année MCF équivalent à 64 h eqTD

Activités d'enseignement antérieures

Au cours de mon doctorat, j'ai exercé en tant que moniteur (2001-2004). Mes enseignements étaient sous forme de travaux dirigés sur l'étude de la cinétique des réactions chimiques. J'ai également participé à la rédaction de sujets pour le concours de 1ère année de pharmacie. Pour ma dernière année de doctorat, j'ai obtenu un poster d'ATER spécifique à temps plein pendant six mois (2005) pendant lequel j'ai encadré des travaux pratiques sur la réalisation de présentations de thématiques de microbiologie en format PowerPoint. Enfin, j'ai obtenu un contrat d'ATER d'un an à temps plein (2007-2008) après mon post-doctorat. Ce poste d'ATER en microbiologie à la Faculté de Pharmacie comportait des travaux pratiques en bactériologie, virologie et parasitologie, ainsi que des travaux dirigés en zoologie.

2- Description des principaux enseignements

Le tableau ci-dessous présente de façon détaillée mes enseignements à la Faculté de Pharmacie et à la Faculté des Sciences et Technologies de l'Université de Lorraine (année universitaire 2018-2019).

Année d'études	Nom de l'UE	Cours magistraux	Travaux dirigés	Travaux pratiques	Effectifs
Formation initiale		**21,5 h**	**48 h**	**105 h**	
Niveau Licence					
Faculté de Pharmacie					
DFG-SP2	UEB ATB - Techniques et gestes de base	1 h			150
	UEL TOX - Toxinologie	1 h			30
	UEB MIG - Microbiologie, immunologie			72 h	150
	UEL TIA - Toxi-infections alimentaires	4 h		9 h	30
DFG-SP3	UEL FIS - Biofilms microbiens et santé	2 h			25
Niveau Master					
Faculté de Pharmacie					
DFA-SP1	UEF AVD1 - Dispensation officine		33 h		80-90
DFA-SP2	UEL VOY - Voyages en pays tropical	1,5 h			30
6-SP-OFF	UEO NEA / Enfance et adolescence		6 h		80-90
	UEO GRO / Grossesse			9 h	80-90
	Vaccination grippale			12 h	80-90
Master Ingénierie de la santé			1,5 h		
Faculté des Sciences et Technologies					
Master Microbiologie					
Master 1	Remise à niveau en microbiologie : Virologie fondamentale et appliquée	6 h	4 h		50
Master 2	Parcours Microbiologie Environnementale et Sanitaire Diagnostic environnemental des dangers biologiques	3 h	2 h	3 h	15-20
Master Sciences de la Terre, Planète et Environnement					
Master 2	Parcours Sol Eau Environnement Traitement des eaux usées	3 h	1,5 h		5-10
Formation professionnelle				**14 h**	
Préparateurs en pharmacie hospitalière					
	Initiation à la microbiologie			14 h	60
Formation continue		**3 h**			
Vaccination à l'officine		3 h			

• **A la Faculté de Pharmacie**, j'interviens essentiellement en DFG-SP2, DFA-SP1 et 6-SP-OFF. J'interviens également en DFG-SP3, DFA-SP2 et en travaux pratiques de bactériologie pour le centre de formation des préparateurs en pharmacie hospitalière de Metz.

En **DFG-SP2**, mes enseignements concernent essentiellement des travaux pratiques en « Microbiologie générale » (UEB MIG [5x15 h]) (150 étudiants). En bactériologie (9 h), nous

travaillons sur la détection, l'identification et la caractérisation de bactéries (isolements, coloration de Gram, arbre décisionnel, galeries d'identification, antibiogrammes). Une partie des travaux pratiques de bactériologie est également consacrée à l'étude de la diauxie. La virologie (6 h) est réalisée avec un calicivirus félin et porte sur l'observation d'effets cytopathiques, la quantification des virus infectieux ($TCID_{50}$) et la quantification du génome viral par RT-qPCR. Nous sommes trois enseignants pour ces travaux pratiques ; j'interviens en bactériologie avec C. Merlin et en virologie avec M. Varbanov. Enfin, j'interviens dans l'UE libre « Toxi-Infections Alimentaires Collectives » (TIA) (30 étudiants) avec des enseignements magistraux sur les indicateurs bactériens dans le contrôle sanitaire des eaux et sur les phycotoxines dans les coquillages (2x2 h). Cette UE comporte également 9 h de travaux pratiques avec la recherche des indicateurs bactériens dans des eaux de surface et des eaux de distribution et l'étude de cas de TIAC ayant été publiées (9 h).

En **DFA-SP1**, j'interviens dans une UEF de la filière officine (80 à 90 étudiants) qui porte sur « l'Analyse, la Validation et la Dispensation de la prescription » (AVD1). Cette UE est réalisée uniquement sous forme de travaux dirigés (3x11 h) en travaillant à partir d'ordonnances traitant différents thèmes. J'encadre les TD concernant les thérapeutiques anti-infectieuses et antifongiques (9 h) et les antihistaminiques H1 (2 h).

En **6ème année filière Officine** (6-SP-OFF, 80 à 90 étudiants), j'interviens dans deux UE de filière, dans la formation au geste de vaccination à l'officine et je participe au suivi de stages officinaux de 6 mois en tant que conseiller facultaire. Ainsi, j'interviens dans l'UE « Contraception et grossesse : conseils, suivi à l'officine » (UEO GRO) sous forme de travaux pratiques (6x1,5 h) sur les conseils à l'officine en lien avec l'antibiothérapie au cours de la grossesse, la toxémie gravidique et la prise en charge de l'anxiété et des troubles du sommeil. J'effectue le suivi de ces thèmes sur lesquels les étudiants travaillent en projets tutorés. J'interviens dans l'UE « Du nouveau-né à l'adolescence » (UEO NEA) en travaux dirigés (3x2 h) sur les conseils à l'officine pour la prévention et le traitement des infections ORL et des maladies éruptives du jeune enfant. Depuis 2018-2019, j'interviens dans la formation initiale au geste de vaccination. Je suis responsable des rappels sur le virus de la grippe et la vaccination et j'interviens dans les séances de travaux pratiques sur l'organisation de l'officine pour la réalisation de la vaccination et sur la formation au geste de vaccination. Enfin, je suis conseiller facultaire des stages officinaux depuis 2015, j'effectue le suivi de quatre à cinq étudiants lors de leur stage de 6ème année officine et je participe aux jurys de validation du stage.

• **A la Faculté des Sciences et Technologies**, j'interviens essentiellement pour le Master Microbiologie et de façon plus ponctuelle pour le Master Sciences de la Terre, Planète et Environnement (STPE).

Pour le Master Microbiologie, j'interviens en 1ère année dans l'UE de Master 1 de remise à niveau en bactériologie, virologie et mycologie dans la partie virologie avec des cours magistraux (6 h) et des travaux dirigés (2x2 h) sur la structure, la taxonomie, les cycles de réplication, les méthodes de détection des virus et la phagothérapie. J'interviens également en 2ème année dans une UE sur le diagnostic environnemental des dangers biologiques avec des cours magistraux sur les indicateurs bactériens de qualité de l'eau et les protozoaires pathogènes du milieu hydrique (2x1,5 h), des travaux pratiques sur le suivi sanitaire de la qualité microbiologique des eaux (3 h) et des travaux dirigés sur des études publiées (2 h).

Pour le Master STPE, j'interviens en deuxième année sous forme de cours magistraux (3 h) et de travaux dirigés (1,5 h) sur les virus entériques du milieu hydrique et l'hygiénisation des boues de station d'épuration.

3- Responsabilités d'enseignements

Depuis ma prise de fonctions en tant que maître de conférences, j'ai progressivement pris la responsabilité d'unités d'enseignement à la Faculté de Pharmacie et à la Faculté des Sciences et Technologies.

• A la Faculté de Pharmacie

En DFG-SP2, je suis responsable de l'UEL « Toxi-Infections Alimentaires Collectives » (TIA) qui est proposée au semestre S4. Cette UE présente les principaux microorganismes pathogènes susceptibles de contaminer les aliments et l'eau, leur mode de transmission, les moyens de maîtrise des dangers microbiologiques dans l'industrie agro-alimentaire et la législation en vigueur. Trois autres enseignants-chercheurs de microbiologie interviennent dans cette UE. J'ai pris la responsabilité de cette UEL en 2011-2012 lors de la réforme de la deuxième année des études pharmaceutiques.

En 6ème année filière officine (6-SP-OFF), je suis responsable de l'UEO NEA « Du nouveau-né à l'adolescence » depuis 2015-2016. Les thèmes abordés pour le nourrisson sont l'allaitement, les besoins nutritionnels du nourrisson et du jeune enfant, les spécificités pharmacocinétiques et pharmacologiques du nourrisson et de l'enfant, et les maladies infectieuses courantes de la petite enfance. Pour l'adolescent, les thèmes abordés sont la contraception, les missions du centre de planification, les comportements addictifs et les droits du mineur. Un pédiatre, deux sages-femmes, un médecin addictologue, un dentiste enseignant-chercheur de la Faculté d'odontologie, un pharmacien praticien hospitalier et deux enseignants-chercheurs de la Faculté interviennent également dans cette UEO qui est suivie par l'ensemble des étudiants de 6ème année filière officine.

Depuis 2018, je suis responsable de la formation initiale au geste de vaccination grippale à l'officine. Pour la rentrée 2018, j'ai mis en place cette formation pour les étudiants de 6ème année de la filière officine selon les préconisations des textes officiels. Cette formation comprend une partie de rappels sur le virus de la grippe et la vaccination en e-learning, l'évaluation est réalisée par des QCM. La suite de la formation est réalisée en présentiel avec notamment la formation au geste de vaccination sur simulateurs. Un pharmacien d'officine professeur associé à la Faculté de Pharmacie, un médecin généraliste professeur à la Faculté de médecine et un enseignant-chercheur en santé publique de la Faculté de Pharmacie interviennent avec moi dans cette formation. Deux pharmaciens de l'ARS Grand Est et trois pharmaciens d'officine ont participé aux réunions de préparation et de mise en place de la formation.

• Faculté des Sciences et Technologies

Pour le Master Microbiologie (précédemment Master BioMANE), je suis responsable en première année de la partie virologie (25 h) de l'UE de remise à niveau en microbiologie. Cinq enseignants-chercheurs interviennent également dans cette partie de l'UE sur les virus émergents,

les virus géants, les virus d'Archées, des exemples de grandes pathologies virales, les bactériophages dans le transfert horizontal de gènes et leurs utilisations en génétique. En deuxième année de ce Master, je suis responsable de l'UE sur le « Diagnostic environnemental des dangers biologiques » (30 h). Au cours de cette UE, qui comprend des enseignements en cours magistraux, travaux dirigés et travaux pratiques, sont abordés les principaux agents pathogènes bactériens, viraux, parasitaires de l'eau, de l'air et des surfaces, les moyens de contrôle et les indicateurs de contamination microbiologique. Les étudiants travaillent également sur des publications traitant de ces thèmes. Cinq enseignants-chercheurs interviennent avec moi dans cette UE.

4- Direction et Jury de diplômes d'état de Docteur en Pharmacie

4.1- Directeur de thèse

Thèses soutenues (3)

▪ Sandra Pelleïeux : « Les phages : un outil d'aide à l'évaluation du comportement des virus entériques pathogènes en réseau d'eau potable. », soutenue le 13 juillet 2012.

▪ Camille Bach : « Détection des virus entériques infectieux dans le milieu hydrique : méthodes actuelles et perspectives », soutenue le 10 octobre 2014.

▪ Opaline Cornil : « La santé bucco-dentaire du jeune enfant : conseils et prise en charge à l'officine », soutenue le 4 décembre 2018.

Thèse en cours de rédaction (1)

▪ Charles Hussenet : « Besoins nutritionnels chez l'enfant et intérêt des compléments alimentaires », thèse en cours, co-direction avec le Dr Emeline Renard, pédiatre.

4.2- Membre du jury

Depuis septembre 2009, j'ai été membre du jury pour huit thèses de doctorat en Pharmacie :

▪ Camille Fanjeaux : « *Legionella* et légionellose : évolution des données épidémiologiques en France de 1987 à 2008 », soutenue le 28 janvier 2010. Directeur de thèse : L. Mathieu.

▪ Stéphane Lafontaine : « Perspectives des thérapies géniques en 2012 : une analyse au travers des biotechnologies employées, de la maladie d'Alzheimer et du cancer bronchique à non petites cellules », soutenue le 14 février 2010. Directeur de thèse : J. Coulon.

▪ Prisca Lahalle : « Evolution des recommandations concernant la supplémentation et le statut en vitamine D de la population : état des lieux et étude des prescriptions dans une officine de Meurthe-et-Moselle », soutenue le 2 juin 2016. Directeur de thèse : B. Leininger-Muller.

▪ Alban Béguin : « La punaise de lit : un parasite en pleine recrudescence », soutenue le 29 juin 2016. Directeur de thèse : S. Banas.

▪ Ludovic Coppé: « Dysbioses intestinales chez l'Homme : causes, conséquences prophylaxies et traitements », soutenue le 27 juin 2018. Directeur de thèse : X. Bellanger.

▪ Julie Serranelli : « La prise en charge d'une femme épileptique en âge de procréer, les difficultés rencontrées lors de la contraception et de la préparation d'une grossesse », soutenue le 29 juin 2018. Directeur de thèse : F. Dupuis.

▪ Caroline Kuhner : « Amélioration d'un procédé de fabrication d'un antibiotique à usage vétérinaire et validation », soutenue le 10 juillet 2018. Directeur de thèse : M. Boisbrun.

▪ Isabelle Laurent : « La spiruline (*Spirulina platensis*) : de l'aliment au médicament, utilisations et conseils à l'officine », soutenue le 11 juillet 2019. Directeur de thèse : M.-N. Vaultier.

5- Activités et responsabilités collectives en lien avec l'enseignement

5.1- Responsable du déménagement des travaux pratiques de microbiologie-immunologie

De 2013 à 2018, j'ai préparé le déménagement des travaux pratiques de microbiologie-immunologie de la Faculté de Pharmacie sur le campus Brabois-Santé. Avec l'ensemble des enseignants-chercheurs de l'équipe pédagogique, nous avons défini les besoins en termes de répartition des surfaces et d'agencement des salles : agencement des différents espaces (salles de TP, préparatoire, zone de stockage, bureau), taille et disposition des paillasses, emplacement des éviers et prises de courant, implantation des équipements (étuves, PSM, bain-marie…). J'ai participé aux réunions de définition et de validation de nos besoins, assuré le suivi des différentes versions des plans jusqu'à la version finale. Le déménagement sur le nouveau site s'est déroulé en juin 2018 et les dernières modifications techniques ont été achevées en juillet 2019.

5.2- Obtention de financements pour l'achat d'équipements

Depuis 2012, j'ai déposé quatre demandes de financements d'équipements pour les travaux pratiques de microbiologie dans le cadre des dotations spécifiques sur projet (DSP) de la Faculté de Pharmacie.

En 2012, un projet commun entre la microbiologie (porteur : I. Bertrand) et la plate-forme TransBio (porteur : O. Joubert, Travaux pratiques de biochimie, biologie moléculaire et toxicologie) a été déposé dans le cadre des "Formations innovantes". Le projet global d'un montant de 107 k€ a permis de financer l'achat de différents équipements (appareil PCR temps réel, microscope inversé avec caméra, rampes de filtration, bains-marie agitants, spectrophotomètres : 54 k€) pour la création de nouveaux travaux pratiques de microbiologie en adéquation avec les besoins de formation.

En 2014, j'ai obtenu un financement pour une centrifugeuse de paillasse, un microscope inversé, deux postes de sécurité microbiologique et 20 becs électriques pour un montant total de 30 k€. Ces achats ont permis d'améliorer les conditions d'hygiène et de sécurité lors des travaux pratiques de microbiologie.

En 2018, j'ai déposé et obtenu deux demandes de financement sur DSP. La première demande portait sur 25 microscopes pour 46 k€, il s'agissait d'une demande commune avec les travaux pratiques d'hématologie-physiologie. La seconde demande portait sur 15 becs électriques et une armoire à solvants pour un montant de 9 k€ ; ces équipements étaient devenus nécessaires depuis notre déménagement sur le campus Brabois-Santé.

5.3- Responsabilités collectives en lien avec l'enseignement

- Membre élue du conseil de la Faculté de Pharmacie de 2012 à 2017.
- Conseiller facultaire des stages officinaux et membre de la commission ordinale des agréments des maîtres de stage depuis septembre 2015. Membre de la Commission Facultaire d'Agrément des Maîtres de stage (CFAM), créée en 2015, qui a notamment pour missions d'organiser l'encadrement des stages en officine, de donner un avis sur l'agrément des officines accueillant des étudiants en stage officinal et de proposer la validation des stages officinaux au doyen de la Faculté.

Bilan des activités de recherche

1- Activités de recherche antérieures à 2009

De mon doctorat à mes activités de recherche actuelles, mes travaux ont porté d'une part sur la détection et la caractérisation d'agents biologiques (protozoaires et virus entériques) dans le milieu hydrique et d'autre part sur l'étude de leur infectiosité et des mécanismes d'inactivation.

1.1- Détection de microorganismes pathogènes dans l'environnement par des méthodes moléculaires

Mes travaux de doctorat ont porté sur la détection environnementale du protozoaire flagellé *Giardia* par les méthodes moléculaires. Ce protozoaire est un parasite intestinal de l'Homme et des animaux domestiques, d'élevage et sauvages. Il est responsable de troubles digestifs plus ou marqués. Sa prévalence est estimée à environ 2 % chez l'adulte et 6 à 8 % chez les enfants dans les pays industrialisés, avec peu de formes symptomatiques. L'objectif de mon doctorat était de quantifier le génome de *Giardia* par des méthodes moléculaires avec dans un premier temps une méthode spécifique de *Giardia lamblia* qui est la seule espèce pathogène pour l'homme et dans un second temps l'obtention d'une méthode qui permette de faire la distinction entre différents génogroupes de cette espèce. Ce travail s'inscrivait dans le contrat européen Tracking the Origin of Faecal Pollution in Surface Water (TOFPSW, EVK1-2000-22080, 2001-2004) dont l'objectif était de sélectionner des paramètres microbiologiques et/ou chimiques permettant la distinction entre une contamination fécale humaine et non-humaine dans le milieu hydrique.

Parmi les quelques gènes séquencés pour plusieurs espèces du genre *Giardia* au début de mon doctorat, le gène codant le facteur d'élongation 1 alpha (EF1A) a été choisi pour développer un système PCR spécifique de l'espèce *Giardia lamblia*. En parallèle, j'ai travaillé sur une méthode de concentration-purification des kystes de *Giardia* à partir d'échantillons environnementaux, et plus spécifiquement d'eaux usées, qui soit compatible avec la PCR quantitative. Le protocole basé sur la densité des éléments à isoler avec une concentration par centrifugation suivie d'une purification par flottation sur solution de Percoll®-saccharose s'est avéré le plus performant. Le protocole d'extraction de l'ADN à partir des kystes de *Giardia* a également nécessité des optimisations. Six échantillons d'eaux usées d'entrée de la station d'épuration du Grand Nancy ont ensuite été analysés et cinq se sont avérés positifs en génome de *Giardia lamblia* avec des concentrations comprises entre 10^2 et 10^3 équivalent kyste/L d'eau usée ; ces valeurs étaient cohérentes avec les concentrations obtenues avec la méthode de référence basée sur la microscopie à épifluorescence après immunomarquage (Bertrand *et al.*, 2004) (ACL-2).

L'espèce *Giardia lamblia* comprend sept génogroupes dont deux (A et B) sont pathogènes pour l'Homme et les animaux alors que les cinq autres (C à G) sont considérés comme spécifiques des animaux. Des systèmes PCR spécifiques des génogroupes A, B et E ont été dessinés en ciblant le gène codant la triose phosphate isomérase (*tpi*) dont les séquences apparaissaient comme les plus adaptées à cet objectif. Les systèmes PCR étaient destinées à la PCR quantitative, mais dans un premier temps ils ont été utilisés en PCR qualitative pour le génotypage de kystes de *Giardia* issus de cas humains isolés ou regroupés. Nos systèmes PCR ont été comparés avec des protocoles

de PCR-RFLP (Restriction Length Fragment Polymorphism) déjà publiés et ciblant les gènes codant la *tpi* et la glutamate déshydrogénase (*gdh*) (Amar *et al.*, 2003; Sulaiman *et al.*, 2004). La comparaison sur les cas isolés de giardiose (n=26) a montré la cohérence des résultats entre les trois systèmes et l'efficacité plus élevée de notre système qui a permis le génotypage de 96 % des échantillons. L'analyse des cas regroupés (n=15) a montré leur contamination par une même source. Ce travail a également montré la prédominance du génogroupe B aussi bien pour les cas isolés que pour les cas regroupés (Bertrand *et al.*, 2005) (ACL-3). La dernière partie du doctorat a porté sur l'analyse d'échantillons d'eaux usées à l'entrée de deux stations d'épuration (n=24) et à la sortie d'un abattoir (n=12) en ciblant les génogroupes A, B et E ; le génogroupe E étant considéré comme spécifique au bétail (Monis *et al.*, 1999). Les génotypes A et B ont été détectés dans les eaux usées des deux stations d'épuration, avec une prédominance du génogroupe B. Seuls les génogroupes A et E ont été détectés dans les eaux usées de l'abattoir. Globalement, la présence des génogroupes A et B indiquerait une contamination d'origine humaine alors que la présence des génogroupes A et E serait due à une contamination par des animaux d'élevage (Bertrand & Schwartzbrod, 2007) (ACL-4).

Entre la fin de mon doctorat et le début de mon post-doctorat, j'ai participé aux expérimentations d'un contrat européen (VIROBATHE, 2005-2007) sous la direction de Christophe Gantzer. Ce contrat européen visait à proposer une révision de la directive européenne prenant en compte les virus entériques pathogènes, et plus spécifiquement les adénovirus, dans l'évaluation de la qualité des eaux de baignade. Les adénovirus ont été choisis pour leur prévalence élevée chez l'homme, leur résistance aux conditions environnementales supérieure aux entérovirus, leur présence dans les eaux avec une pollution fécale et leur implication dans des épidémies liées à des eaux de piscine et d'autres eaux de baignade. Pour l'ensemble des échantillons d'eaux douce et de mer analysés (n=1410), la prévalence des adénovirus (36 %) était plus élevée que celle des norovirus (9 %). En particulier, une prévalence très élevée du génome d'adénovirus humain (91 %) a été observée dans nos échantillons prélevés dans la Meurthe à la base nautique de la métropole du Grand Nancy (n=23) (Wyn-Jones *et al.*, 2011). En parallèle, nous avons travaillé sur la prévalence des quatre génogroupes de bactériophages ARN F-spécifiques dans ces mêmes échantillons d'eau de rivière. Les génogroupes I et IV sont plus fréquents en cas de contamination d'origine animale et les génogroupes II et III en cas de contamination d'origine humaine (Cole *et al.*, 2003; Schaper *et al.*, 2002). Le précédent contrat européen (TOFPSW), auquel avait participé le LCPME, avait montré que les bactériophages ARN F-spécifiques pouvaient être de bons traceurs de l'origine de la contamination fécale du milieu hydrique. Toutefois, ces résultats obtenus à partir d'eaux usées, demandaient à être confirmés pour une contamination fécale plus ancienne (Blanch *et al.*, 2006). Le génotypage de nos échantillons d'eau de rivière a montré la prédominance des génogroupes I et II pour les phages ARN F-spécifiques et surtout une corrélation entre les concentrations en génome des phages ARN F-spécifiques de génogroupe II et les adénovirus humains (Figure 1) (Ogorzaly *et al.*, 2009) (ACL-5). Ainsi, les phages ARN F-spécifiques du génogroupe II peuvent être envisagés comme un indicateur de l'origine de la contamination virale d'origine fécale dans les eaux de surface.

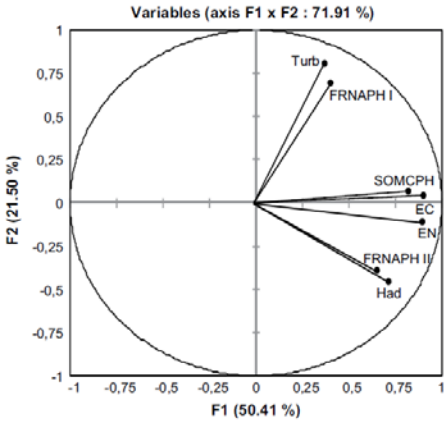


Figure 1 : Analyse en composante principale (ACP) de la turbidité et de différents paramètres microbiologiques : indicateurs bactériens (*E. coli* [EC] et entérocoques intestinaux [EN]), coliphages somatiques (SOMCPH), génome des phages ARN F-spécifiques des génogroupes I (FRNAPH I) et II (FRNAPH II), génome des adénovirus humains (Had) dans des eaux de surface. (Figure issue de Ogorzaly *et al.*, 2009).

Des travaux ont par la suite montré l'intérêt des phages ARN F-spécifiques du génogroupe II comme indicateurs de contamination virale des huîtres dont la consommation est une cause fréquente de contamination par les norovirus (Hartard *et al.*, 2018).

1.2- Etude du caractère infectieux de microorganismes pathogènes dans l'environnement

Mes travaux de recherche sur *Giardia*, les phages ARN F-spécifiques et les adénovirus ont également porté sur l'étude de leur caractère infectieux.

Mon projet de recherche de post-doctorat (2006-2007) réalisé au Centre de Recherche Public Gabriel Lippmann (CRP-GL, actuel LIST) à Belvaux (Luxembourg) et encadré par le Dr Henry-Michel Cauchie portait sur l'étude de la viabilité des kystes de *Giardia* par la détection d'ARNm. Ce projet s'inscrivait dans un contrat financé par le FNR (KAWA-FNR, 2005-2008). Parmi les méthodes de détermination de la viabilité des kystes de *Giardia*, l'inoculation à l'animal, ou dékystement *in vivo*, est la seule méthode montrant la capacité des kystes à infecter leur hôte. Le dékystement *in vitro* est une méthode basée sur l'utilisation de conditions mimant celles du tube digestif des hôtes de *Giardia*. L'inoculation à l'animal et le dékystement *in vitro* nécessitent des concentrations élevées en kystes et sont donc difficilement applicables aux échantillons environnementaux. Les colorants vitaux tels que l'iodure de propidium sont utilisés pour les échantillons environnementaux, mais ils ont tendance à surestimer la viabilité des kystes. Quelques études s'étaient intéressées aux ARNm comme indicateurs de viabilité des kystes de *Giardia*, mais uniquement avec des méthodes qualitatives (Abbaszadegan *et al.*, 1997; Mahbubani *et al.*, 1991). Afin de définir de nouvelles pistes d'étude de la viabilité des kystes de *Giardia*, j'ai travaillé sur la quantification des ARNm en tant que marqueurs de viabilité des kystes de *Giardia* en ciblant trois protéines ayant un intérêt dans ce contexte. Les trois protéines choisies étaient la β-giardine qui est une protéine structurale spécifique de ce protozoaire, l'EF1A (elongation factor 1 alpha) qui est impliquée dans la seconde étape de la traduction et enfin l'ADHE (alcohol dehydrogenase E) qui une oxydoréductase permettant la production d'alcool à partir d'aldéhydes et de cétones chez *Giardia*. Les essais réalisés avec des kystes concentrés à partir d'eaux usées brutes ont montré une

augmentation des ARNm pour tous les échantillons et la β-giardine a permis d'obtenir les augmentations les plus importantes. Globalement, ces premiers essais ont montré que les ARNm constituaient une piste intéressante pour le développement de nouvelles méthodes d'étude de la viabilité de ce protozoaire (Bertrand *et al.*, 2009) (ACL-6). Une étude publiée par la suite a également montré que la quantification de l'ARNm de la β-giardine pouvait être envisagée comme indicateur de viabilité des kystes de *Giardia* (Baque *et al.*, 2011).

La détection des virus dans l'environnement fait très largement appel aux méthodes moléculaires qui sont plus faciles à appliquer aux échantillons environnementaux que les méthodes de culture et permettent la détection des virus non ou difficilement cultivables. Cependant, comme plusieurs études l'ont confirmé depuis les premiers travaux publiés par Gassilloud *et al.* (2003), la perte d'infectiosité d'une particule virale est plus rapide que la dégradation de son génome. La culture cellulaire est la méthode de référence pour la détection des virus infectieux cultivables et l'évaluation du danger pour la santé humaine. Dans le cas des adénovirus, le temps d'incubation pour observer un effet cytopathique (ECP) est de 10 à 20 jours (Rodriguez *et al.*, 2013). L'ICC-PCR (Integrated Cell Culture - Polymerase Chain Reaction) permet de réduire le temps de réponse en détectant le génome viral dans les cellules infectées. Lors du contrat européen VIROBATH la détection qualitative des adénovirus infectieux par ICC-PCR a été réalisée par chaque laboratoire sur 10 échantillons positifs en génome d'adénovirus. Au moins 25% des échantillons contenaient des adénovirus infectieux. Le séquençage avant et après culture a également montré la prédominance des adénovirus de type 41 avant culture alors que ce type n'est plus détecté après culture. Ce constat peut être expliqué par le choix de la lignée cellulaire A549 qui ne permet pas la réplication des adénovirus 40 et 41 qui sont également appelés adénovirus entériques. Les lignées Graham 293 (HEK), Hep-2 et HT-29 sont en revanche permissives aux adénovirus entériques (Wyn-Jones *et al.*, 2011).

J'ai ensuite participé à une étude financée par un industriel (Danone, 2009) qui visait à améliorer l'interprétation d'un signal positif en génome lors de l'analyse d'échantillons hydriques environnementaux. Les persistances du caractère infectieux et du génome ont été comparées pour des phages ARN F-spécifiques (génogroupes I et II) et des adénovirus humains dans des eaux souterraines (adénovirus de type 2) (Figure 2). Les adénovirus infectieux étaient quantifiés par la méthode du nombre le plus probable qui repose sur l'observation d'un ECP. Les phages ARN F-spécifiques infectieux étaient quantifiés par une méthode normalisée (ISO standard 10705-1, 1995). Ce travail a permis d'obtenir des valeurs de T_{90} (temps nécessaire pour observer une diminution de 1 $\log_{10}$) en génome et en infectiosité pour ces virus et bactériophages pour des conditions mimant les conditions environnementales. Les valeurs de T_{90} en génome et en infectiosité les plus élevées ont été obtenues pour l'adénovirus. Pour ce virus, les valeurs de T_{90} étaient huit fois plus élevées pour le génome (131 jours) que pour le caractère infectieux (35 jours). Ces résultats ont montré qu'un signal positif en génome viral dans des eaux pouvait provenir d'une contamination très ancienne et que beaucoup de prudence était requise dans l'évaluation du risque viral lorsque les données obtenues portaient uniquement sur le génome (Ogorzaly *et al.*, 2010) (ACL-7).

2- Activités de recherche depuis 2009

Depuis ma prise de fonction en 2009, mes travaux de recherche ont porté exclusivement sur la virologie environnementale avec trois axes : (1) la détection de virus émergents, (2) l'étude du comportement des virus entériques dans le milieu hydrique et leur accumulation aux surfaces et (3) l'étude du caractère infectieux des virus dans l'environnement.

2.1- Détection de virus entériques émergents dans le milieu hydrique : cas du virus de l'hépatite E

Le virus de l'hépatite E (VHE) est un virus entérique émergent, première cause d'hépatites virales aiguës avec 20 millions de cas au niveau mondial chaque année. Dans les pays d'endémie, la transmission féco-orale par les mains sales, l'eau ou les aliments contaminés serait prédominante (Blasco-Perrin *et al.*, 2016). Dans les pays non endémiques (Europe, Amérique du Nord, Japon…), le mode de transmission le plus fréquemment documenté est la consommation de viandes crues ou peu cuites et issues d'animaux réservoirs du VHE (porcs, sangliers…). Toutefois, des études ont également incriminé la consommation d'eau de sources ou de puits privés, de coquillages crus (Renou *et al.*, 2008) ou encore d'eau de distribution (Spaccaferri, 2016) dans la contamination par le VHE en France. Globalement, les données sur le rôle du milieu hydrique dans la transmission humaine du VHE dans les pays non endémiques restent parcellaires et pourraient être approfondies par l'analyse phylogénétique de séquences issues d'échantillons humains, animaux et environnementaux. Dans ce contexte, j'ai obtenu un financement PEPS Mirabelle en 2016 (Projet VH2E) pour une collaboration avec deux enseignants-chercheurs (Pr Evelyne Schvoerer [PU-PH] et Dr. Hélène Jeulin [MCU-PH]) de l'EA Stress, Immunité et Pathogènes (SIMPA EA 7300 Université de Lorraine) sur la comparaison moléculaire de souches de VHE isolées (i) d'eaux usées caractérisées par une contamination soit humaine (station d'épuration), soit animale (abattoir), (ii) de patients du CHRU de Nancy qui présentaient une hépatite clinique et/ou biologique, (iii) de porcs d'élevage et de sangliers.

Ce projet exploratoire a permis d'obtenir les premières données de prévalence du VHE dans l'environnement en Lorraine. Pour les échantillons d'eau, une première méthode de concentration basée sur la taille des particules (cartouche d'ultrafiltration) a été testée sur une première campagne de prélèvements. Une méthode basée sur la charge des virus (poudre de verre et modification du pH) a ensuite été appliquée sur une seconde campagne de prélèvements afin d'augmenter le volume d'eau analysé d'un facteur 10. Pour les deux séries de prélèvement, une prévalence plus élevée a été observée dans les eaux usées de l'abattoir (82 % et 100 %) que dans les eaux usées de la station d'épuration (33 % et 9 %). L'augmentation du volume analysé s'est traduite par une augmentation du pourcentage d'échantillons positifs uniquement pour l'eau d'abattoir. Les échantillons de selles de porcs élevés en Lorraine se sont tous avérés négatifs (n=15). Les échantillons de foie et de selles de sangliers ont présenté une prévalence faible, respectivement de 10 % (n=20) et 5 % (n=19). Peu d'échantillons cliniques étaient positifs avec 7 % (n=73) des sérums et 25 % (n=12) des selles. Les concentrations en génome les plus élevées ont été obtenues dans les échantillons cliniques et issus de sangliers. Ces échantillons ont permis d'étudier la variabilité virale par séquençage direct (méthode de Sanger) et par séquençage haut débit (UDS : Ultra Deep Sequencing, méthode Illumina) du gène de l'ORF2 (gène de la capside). Le

séquençage a montré qu'une souche de VHE dominait, elle représentait 85 à 95 % des variants viraux. Deux mutations mineures conduisant à une diminution de l'antigénicité ont également été observées. Ce travail a fait l'objet d'une publication (Fenaux *et al.*, 2018) (ACL-17). Les expérimentations sur le VHE se poursuivent, elles ont notamment permis le séquençage d'un échantillon d'eau usée de l'abattoir. Nous avons également rédigé une revue bibliographique sur les différents aspects de la transmission hydrique du VHE dans les pays industrialisés (Fenaux *et al.*, 2019) (R-3).

2.2- Comportement des particules virales dans les réseaux d'eau

Bien que les microorganismes pathogènes soient rarement présents dans les réseaux de distribution d'eau potable, ils peuvent constituer un danger pour la santé humaine en cas de contamination accidentelle. La diffusion des particules virales et leur accumulation aux surfaces sont des points importants mais largement méconnus pour la compréhension de la persistance des virus dans les réseaux de distribution d'eau. La compréhension de ces phénomènes est également nécessaire pour l'amélioration des procédures de désinfection en cas d'incidents.

Dans ce contexte, nous avons travaillé sur l'étude de l'accumulation de particules virales sur des surfaces colonisées ou non par des biofilms d'eau potable et sur les effets de protocoles de nettoyage sur les virus accumulés et le biofilm. En effet, les surfaces en contact avec le milieu hydrique sont très rapidement colonisées par des biofilms qui peuvent modifier l'accumulation des particules virales et l'efficacité des procédures de nettoyage. L'accumulation des virus dans les biofilms d'origine hydrique a notamment été montrée par la détection constante de génome de norovirus alors que de fortes variations saisonnières étaient observées dans l'eau (Skraber *et al.*, 2009).

Les expérimentations ont été conduites avec trois bactériophages ARN F-spécifiques, MS2, GA et Qβ. Ces bactériophages présentent des similitudes structurales fortes avec les norovirus et sont couramment utilisés comme modèles de ces virus. De plus, des travaux de recherche réalisés au LCPME ont apporté des données sur leurs caractéristiques physico-chimiques, c'est-à-dire leur charge électrostatique et leur hydrophobie relative. Ces éléments sont indispensables à la compréhension des phénomènes intervenant dans l'adhésion et l'accumulation des virus aux surfaces. Ces trois bactériophages sont caractérisés par un point isoélectrique compris entre 2 et 4 (Langlet *et al.*, 2008), ce qui signifie que leur charge électrostatique globale est négative au pH de l'eau de distribution qui était de 8 dans nos expérimentations. Du point de vue de leur hydrophobie relative, ces phages peuvent être classé de la façon suivante : MS2 < Qβ < GA, MS2 étant le moins hydrophobe (Langlet *et al.*, 2008). Les biofilms d'eau de distribution ont été formés dans des pilotes permettant de maîtriser et de moduler les conditions hydrodynamiques, sur des surfaces en polyéthylène haute densité (PEHD) qui est un matériau utilisé pour le renouvellement de canalisations d'eau.

Nous avons tout d'abord constaté une augmentation de l'accumulation de ces trois phages en conditions hydrodynamiques par rapport aux conditions hydrostatiques. En revanche, les différentes vitesses d'eau qui ont pu être appliquées dans les pilotes n'ont pas permis de faire varier les concentrations en phages accumulés aux surfaces. En conditions hydrodynamiques, la présence d'un biofilm a entraîné une augmentation de la concentration aux surfaces uniquement

pour le phage GA. La séquence d'accumulation de ces trois bactériophages sur les surfaces colonisées par des biofilms était en accord avec leur séquence d'hydrophobie. Ces résultats ont fait l'objet d'une publication (Pelleïeux *et al.*, 2012) (ACL-8). La modélisation des données a montré une différence dans les vitesses d'accumulation des phages GA et Qβ aux surfaces en conditions hydrostatiques malgré leurs faibles différences en termes de propriétés de surface (Hébrant *et al.*, 2014) (ACL-11).

Pour l'évaluation de procédures de nettoyage appliquées en réseaux de distribution d'eau, différentes concentrations en hypochlorite de sodium (4 à 10 mg Cl_2/L) et différentes vitesses d'eau ont été appliquées dans ces mêmes pilotes. Globalement, l'augmentation des contraintes hydrodynamiques liées à l'augmentation de la vitesse de l'eau a conduit à une augmentation de la cohésion du biofilm alors que la chloration a entraîné une diminution de la cohésion du biofilm (Mathieu *et al.*, 2014) (ACL-10). Toutefois, l'érosion et l'oxydation rapide de la biomasse bactérienne par le chlore se limitaient aux couches superficielles du biofilm. Concernant les particules virales, celles associées au biofilm étaient moins rapidement et moins fortement inactivées par l'hypochlorite de sodium que les particules en suspension. Ces données suggèrent un effet protecteur du biofilm pour ces particules virales vis-à-vis de cet oxydant. Un autre aspect intéressant est que les effets du chlore différaient en fonction du phage considéré, mais uniquement pour ceux associés au biofilm. Ainsi, le bactériophage MS2 qui présente l'hydrophobie la plus faible, était présent aux plus faibles concentrations avant chloration, mais persistait plus longtemps sur les surfaces que les bactériophages GA et Qβ lors de la chloration (Figure 2) (Pelleieux *et al.*, 2016) (ACL-13). Ces données suggèrent que la localisation des particules virales dans le biofilm pourrait varier en fonction notamment de leur hydrophobie relative et ainsi influencer l'efficacité des procédures de désinfection par le chlore.

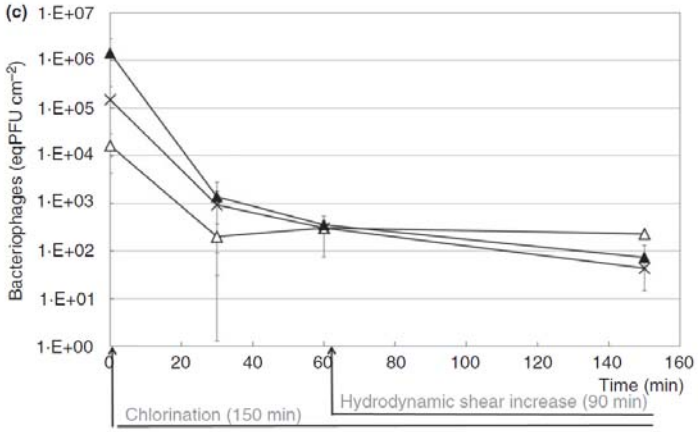


Figure 2 : Concentration en génome de bactériophage F-spécifiques MS2 (Δ), Qβ (×) et GA (▲) sur les surfaces colonisées par un biofilm d'eau potable au cours de la chloration (4 mg Cl_2/L) et de l'augmentation des contraintes hydrodynamiques (Figure issue de Pelleïeux *et al.*, 2016).

Cette étude (Biofilm VIII "virus et biofilms", 2009-2012) financée par plusieurs partenaires industriels m'a permis d'aborder de nouveaux domaines de la microbiologie environnementale avec l'étude de l'impact des propriétés de surfaces des particules virales sur leur comportement dans le milieu hydrique et de co-encadrer ma première thèse d'Université (Sandra Pelleïeux, directeur de thèse : Pr Christophe Gantzer).

2.3- Infectiosité des particules virales

2.3.1- Inactivation des virus entériques par action de la température

A partir de 2009, j'ai participé au groupe de travail européen « Viral inactivation » du COST 929 (Environmental and Food Virology, 2006-2010) qui était animé par Christophe Gantzer. La température est le principal facteur d'inactivation virale dans l'environnement. L'industrie agro-alimentaire utilise également ce paramètre pour maîtriser le danger viral dans les aliments. Les données quantitatives sur l'inactivation virale par action de la température permettant de calculer le temps nécessaire à un premier abattement de 90 % des virus infectieux ont été collectées à partir des études publiées. Nous avons appelé cette donnée le TFL (Time for First Log of inactivation or genome degradation). Les données portant sur la dégradation du génome viral ont également été collectées. Ces données ont ensuite été classées par type de virus, de matrices définies comme simples (eaux de distribution, souterraines…) ou complexes (eaux usées, aliments…) et de catégories de température (< 50°C ou ≥ 50°C). Une analyse statistique et une modélisation de l'ensemble des données ont ensuite été réalisées.

J'ai pris en charge la compilation des données collectées par les membres du groupe de travail dans une base de données que j'ai également complétée. Au total, ce sont 658 données qui ont été collectées de 76 publications dont 563 données sur l'inactivation et 95 sur la dégradation du génome (Figure 3) (Bertrand *et al.*, 2012) (R-1).

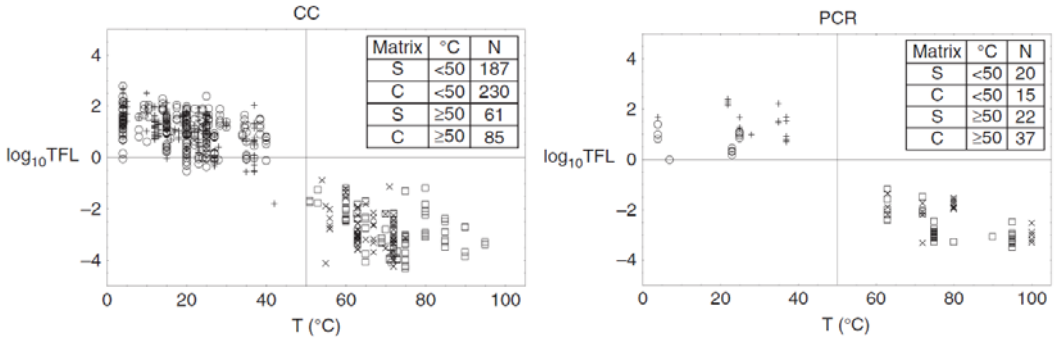


Figure 3 : Temps nécessaire pour un abattement de 90 % (TFL exprimé en log_{10}) en fonction de la température appliquée (< 50°C ou ≥ 50°C) pour l'inactivation (CC) (n=563) ou la dégradation du génome (PCR) (n=95) dans des matrices simples (S) ou complexes (C) (Figure issue de Bertrand *et al.*, 2012)

En collaboration avec le Pr Jack Schijven (RIVM [National Institute for Public Health and the Environment in the Netherlands], Bilthoven, Pays-Bas), une analyse statistique et une modélisation des données ont été réalisées. Comme attendu, l'inactivation virale est plus rapide pour des températures ≥ 50°C que pour celles < 50°C. Toutefois, un effet matrice-température a également été observé car l'inactivation est plus rapide dans les matrices complexes que dans les matrices simples. De façon attendue, pour un virus donné son génome persiste plus longtemps que son caractère infectieux lors de l'inactivation par la chaleur. Globalement, les virus à ADN et plus spécialement les bactériophages PhiX174 et PRD1 sont apparus comme les plus résistants des virus testés quelles que soient la matrice et la température. Ces bactériophages pourraient être de bons indicateurs lors de l'évaluation de procédés virucides basés sur la température. L'analyse statistique de ces données a permis d'établir des formules empiriques permettant de prédire

l'inactivation d'un virus ou la dégradation de son génome. Cette étude a également permis de mettre en évidence les besoins en données sur les virus à ADN, mais aussi sur des gammes de température plus larges pour un virus donné.

Au-delà de l'aspect purement scientifique, la participation à ce groupe de travail m'a permis de travailler avec de nombreux virologues européens. La revue a reçu des retours très positifs depuis sa publication (Bertrand *et al.*, 2012) (R-1). Une suite a pu être donnée avec quelques membres de ce groupe au travers d'une seconde revue portant de façon plus spécifique sur l'inactivation du virus de l'hépatite A (Cook *et al.*, 2018) (R-2).

2.3.2- Evolution des propriétés de surface des particules virales au cours de leur inactivation

Les traitements par la chaleur ou la désinfection par les oxydants ont démontré leur efficacité virucide, mais les mécanismes liés à la perte du caractère infectieux ne sont pas connus. Afin d'améliorer la spécificité des méthodes moléculaires pour les virus infectieux, différentes stratégies sont appliquées de façon empirique. Ces stratégies ciblent la capside par l'augmentation de sa perméabilité à des enzymes (Nuanualsuwan et Cliver, 2003) ou à des agents intercalants (Prevost *et al.*, 2016) ou encore la détection de dommages oxydatifs (Sano *et al.*, 2015; Tojo *et al.*, 2013). Dans ce contexte, notre objectif était d'étudier les modifications des propriétés de surface de particules virales au cours de l'inactivation par la chaleur, l'hypochlorite de sodium et l'ozone afin d'apporter des informations sur les mécanismes d'inactivation liés à ces traitements ainsi que de nouvelles pistes pour améliorer la spécificité des méthodes de détection pour les virus infectieux. Les virus choisis pour ces expérimentations étaient le bactériophage MS2 et le norovirus murin (MNV) en tant que modèles des virus entériques pathogènes et plus spécifiquement des norovirus humains.

Pour ces deux virus, nous avons démontré l'existence d'une température critique de l'ordre de 70°C au-delà de laquelle la particule virale est déstructurée et libère son génome. Un simple traitement à la RNase permettrait alors d'empêcher la détection des virus inactivés. Pour des températures inférieures à 70°C, l'inactivation serait reliée à la perte de capacité à se lier à la cellule hôte pour au moins 75 % des particules. Le traitement thermique engendre également une augmentation de l'hydrophobie pour le phage MS2 et sa diminution pour MNV. Ces variations sont transitoires et indiquent des modifications conformationnelles des protéines de capside par la chaleur (Brié *et al.*, 2016, 2017) (ACL-14 et 15).

L'hypochlorite de sodium a provoqué de faibles modifications des propriétés de surface de nos virus modèles. Des phénomènes d'oxydation ont tout de même été observés au niveau de la capside du bactériophage MS2 avec une augmentation de la charge électrostatique négative de surface. Nous avons étudié la température de rupture de la capside MS2 après exposition au chlore. L'utilisation d'une molécule hydrophobe fluorescente (SYPRO Orange) nous a permis de déterminer la température de dénaturation (Tm) des protéines et ainsi d'estimer la température de rupture de la capside par la chaleur (Loison *et al.*, 2016). Pour le phage MS2 exposé à l'hypochlorite de sodium, une diminution du Tm de 66°C à 61°C a été observée (Figure 4). Ce résultat indiquait une fragilisation de la capside par le chlore (Robinson *et al.*, 2014) ce qui nous a amené à tester l'exposition à l'hypochlorite de sodium puis à la chaleur sur le phage MS2.

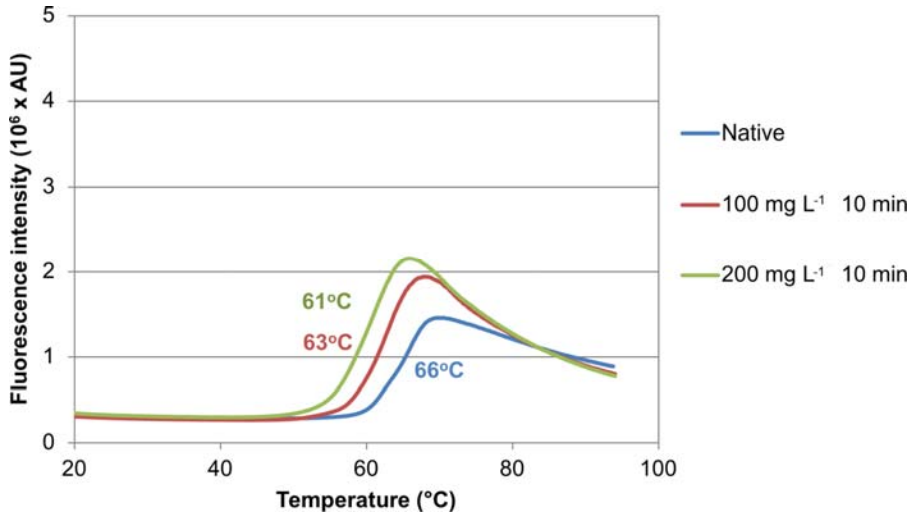


Figure 4 : Profil SYPRO du phage MS2 avant et après exposition à l'hypochlorite de sodium (100 et 200 mg/L, 10 min) (Figure issue de *Brié et al.*, 2018b)

L'application successive de la chloration puis du traitement thermique a augmenté significativement l'inactivation du phage MS2 et sa sensibilité à la RNase par rapport à ces deux traitements appliqués séparément. Nous avons ainsi pu démontrer clairement que l'hypochlorite de sodium entraîne une fragilisation de la capside du phage MS2 et diminue sa résistance thermique. Lors de l'exposition à la chaleur nous avions observé une augmentation transitoire de l'hydrophobie du phage MS2 ; ce phénomène a été amplifié pour les phages exposés au chlore puis à la chaleur. La Figure 5 résume les effets de la chloration suivie par un traitement thermique (60°C) sur l'infectiosité et les propriétés de surface du bactériophage MS2 (Brié *et al.*, 2018b) (ACL-18). La combinaison de ces deux traitements semble particulièrement intéressante et peut être envisagée sur des matrices alimentaires sans compromettre leur qualité organoleptique (Choi *et al.*, 2016; Klaiber *et al.*, 2005).

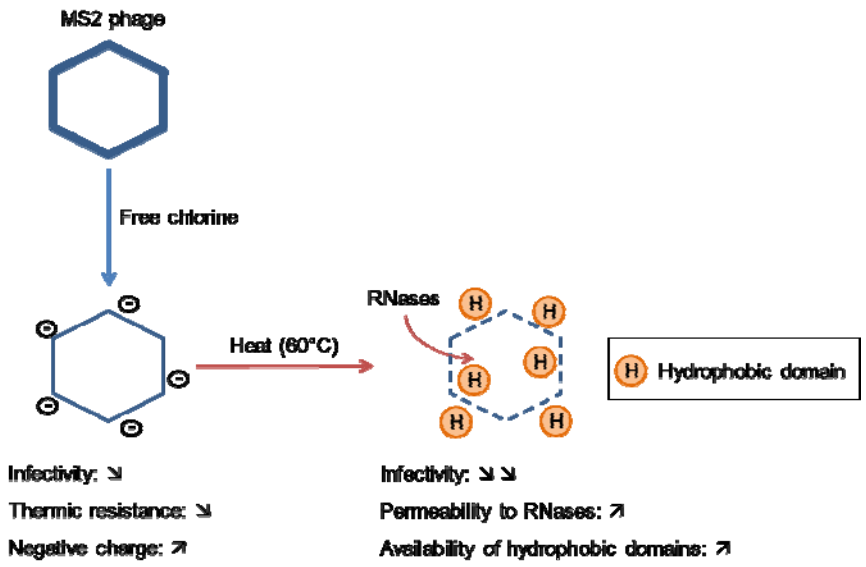


Figure 5 : Représentation des effets de la chloration suivie de la chaleur sur l'infectiosité et les propriétés de surface du bactériophage MS2 (Graphical abstract, Brié *et al.*, 2018b).

Nos expérimentations sur l'ozone gazeux ont permis de souligner son intérêt pour le traitement virucide des matrices alimentaires fragiles telles que les framboises. L'acidité de ces fruits permet de renforcer son efficacité. Les expérimentations ont été conduites avec le MNV et le virus de l'hépatite A (VHA) et ont montré une résistance très importante du VHA à l'ozone gazeux. Les résultats obtenues pour le MNV suggèrent en revanche que l'ozone pourrait être un traitement intéressant pour le traitement virucide de matrices alimentaires sensibles vis-à-vis de la contamination par les norovirus (Brié *et al.*, 2018a) (ACL-16).

Ce travail a permis de préciser certains mécanismes d'inactivation des virus entériques et ouvre de nouvelles perspectives tant pour discriminer les virus infectieux et non-infectieux que pour l'exploration de nouveaux traitements technologiques. Ce travail s'inscrivait dans le cadre de l'Unité Mixte Technologique VIRO[Control] (2011-2016) entre l'équipe MIC du LCPME et ACTALIA Normandie. Les expérimentations ont été réalisée dans la cadre de la seconde thèse d'Université que j'ai co-encadrée (Adrien Brié, directeur de thèse : Christophe Gantzer). Cette thèse a bénéficié d'un financement CIFRE. Ce travail a reçu le soutien financier du Conseil Régional de Basse Normandie grâce au contrat CapsiVir (« Développement méthodologique pour la détection des virus infectieux et une meilleure qualification de l'efficacité virucide des traitements technologiques » 2013-2015) que j'ai coordonné avec Nicolas Boudaud (ACTALIA Normandie).

2.3.3- Détection des virus entériques infectieux dans l'environnement : cas des adénovirus

La détection des virus infectieux est un point sensible en virologie environnementale, elle repose à l'heure actuelle sur la culture cellulaire qui est la méthode de référence. Comme nous l'avons abordé précédemment l'ICC-PCR permet d'améliorer la mise en évidence des adénovirus infectieux en s'affranchissant de l'observation d'un ECP dans les cellules contaminées. Lors des expérimentations réalisées dans le cadre du contrat européen VIROBATH nous avions utilisé l'ICC-PCR de façon qualitative. Cette approche était appliquée avec un temps d'incubation de cinq jours (Wyn-Jones *et al.*, 2011) et pouvait poser des problèmes d'interprétation si un signal positif en génome était observé dès le jour d'infection des cellules.

Dans le cadre d'une étude réalisée en collaboration avec le CRP-GL (Luxembourg, contrat PATHOS coordonné par le Dr. Henry-Michel Cauchie), j'ai travaillé sur l'optimisation de la méthode ICC-qPCR pour la détection des adénovirus (HAdV) infectieux dans des eaux usées et des eaux de surface. Notre objectif était d'utiliser la PCR quantitative (qPCR) afin de prouver que le virus avait été activement répliqué par les cellules infectées et surtout de réduire le temps d'incubation de cinq à deux jours. Deux approches méthodologiques pouvaient être envisagées car il est possible de détecter soit l'ARNm des HAdV (ICC-RT-qPCR), soit leur ADN (ICC-qPCR). Dans le cas de l'ARNm, sa présence montre à elle seule que le cycle de réplication viral a débuté. Mais, cette option nécessite une rétro-transcription (RT) de l'ARNm en ADNc, la digestion de l'ADN viral qui contaminerait l'étape de qPCR par une DNase et la vérification de l'efficacité de la digestion. De plus, les fortes variations des ARNm viraux au cours du cycle de réplication nécessitent la quantification en parallèle de l'ARNm d'un gène de ménage (Rodríguez *et al.*, 2013). Dans le cas où l'ADN viral est ciblé, il est uniquement indispensable d'observer son augmentation dans les cellules au cours de l'infection pour prouver la présence de virus infectieux (Wyn-Jones *et al.*, 2011). Cette seconde approche nous a semblé plus adaptée et a été choisie pour nos travaux.

Les expérimentations ont tout d'abord été réalisées avec des souches de laboratoire d'adénovirus de types 2 (HAdV-2) et 41 (HAdV-41). La lignée cellulaire HEK 293 a été choisie afin de pouvoir détecter les adénovirus entériques. Le protocole d'ICC-PCR utilise généralement des cycles de congélation/décongélation pour lyser les cellules infectées (protocole 1), suivis de l'analyse d'une fraction du surnageant (Lee *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2005; Rigotto *et al.*, 2010; Wyn-Jones *et al.*, 2011). Au LCPME, nous avons modifié notre protocole d'extraction de l'ADN viral appliqué aux cultures cellulaires pour analyser la totalité des cellules infectées et augmenter la sensibilité de la méthode (protocole 2). Les résultats obtenus pour HAdV-2 et HAdV-41 sont présentés sur la Figure 6 (Ogorzaly *et al.*, 2013) (ACL-9).

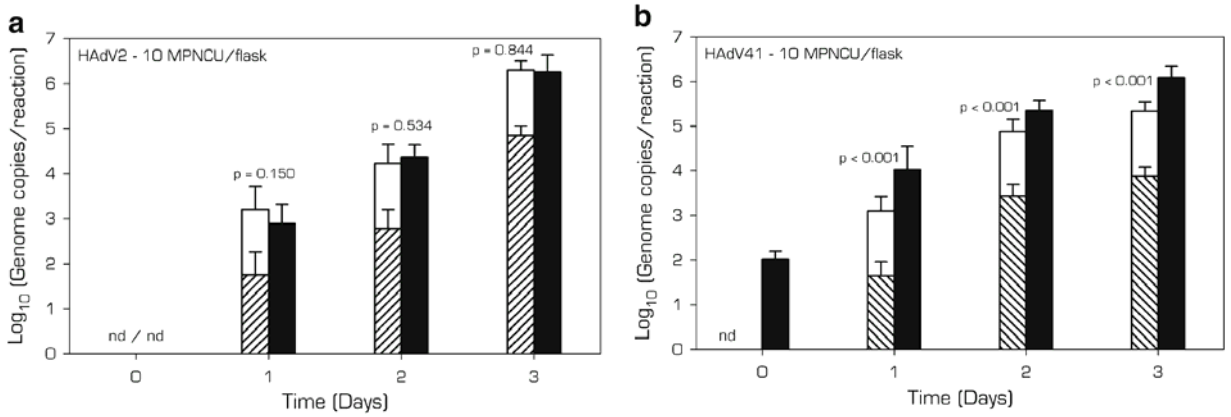


Figure 6 : Concentrations en ADN viral détecté dans les cellules infectées par HAdV-2 (a) et HAdV-41 (b) au cours d'une incubation sur trois jours en utilisant soit le protocole 1 (cycles de congélation/décongélation : barres hachurées), soit le protocole 2 (extraction sur l'ensemble des cellules infectées : barres noires). Quantité d'adénovirus inoculée : 10 NNPUC/flasque (MPNCU = NPPUC : Nombre le Plus Probable d'Unités Cytopathiques). Les barres blanches sont une estimation de la quantité d'ADN détectée si la totalité du surnageant avait été analysée avec le protocole 1. Chaque barre représente la moyenne de cinq essais. Les concentrations ont été comparées avec un test de Mann-Whitney. nd : non détecté ou inférieur à la limite de détection. (Figure issue de Ogorzaly *et al.*, 2013).

L'analyse de la totalité des cellules permet de récupérer au moins autant d'ADN viral que si l'on avait analysé la totalité du surnageant dans le cas d'HAdV-2. Pour HAdV-41, la quantité d'ADN récupérée est significativement plus élevée lorsque l'on analyse la totalité des cellules. Ceci suggère que les cellules infectées par HAdV-41 sont moins fragilisées que celles infectées par HAdV-2. Cette observation est en accord avec le fait que HAdV-41 ne provoque pas la lyse des cellules infectées de façon systématique (Siqueira-Silva *et al.*, 2009). L'optimisation de l'analyse des cellules infectées devait permettre de diminuer le temps de réponse. La comparaison des deux protocoles avec différentes concentrations d'HAdV-2 et HAdV-41 a montré que l'analyse de la totalité des cellules était effectivement plus sensible, surtout pour HAdV-41, et permettait d'envisager un temps d'incubation de deux jours pour la détection des HAdV infectieux dans l'environnement.

Des échantillons environnementaux ont ensuite été analysés avec le nouveau protocole par le CRP-GL (eaux usées) et le LCPME (eaux de rivière). Des HAdV infectieux ont été détectés dans 100 % des eaux usées d'entrée de stations d'épuration (n=8), 75 % des eaux usées de sortie (n=8) et 90 % des eaux de rivière (n=10). Les quantités d'ADN viral dans les cellules infectées

augmentaient de 2 $\log_{10}$ au cours des deux premiers jours d'incubation, elles étaient ensuite stables entre le deuxième et le troisième jour d'incubation. Un séquençage a montré qu'HAdV-41 représentait 70% des séquences détectées dans les échantillons analysés immédiatement après l'infection et après 3 jours d'incubation.

Cette première étape dans l'optimisation de l'ICC-qPCR destinée aux HAdV nous a permis de diminuer le temps de détection des HAdV infectieux dans des échantillons environnementaux à deux jours, y compris pour HAdV-41, mais cette approche restait qualitative. L'ICC-qPCR peut aussi être une méthode quantitative. Ceci a tout d'abord été montré pour des souches d'HAdV de laboratoire (Gerrity *et al.*, 2008, Li *et al.*, 2009, Ryu *et al.*, 2015). Quelques études ont également montré le potentiel de cette méthode pour des eaux usées (Rodríguez *et al.*, 2013), des eaux de surface, des eaux souterraines et des eaux de réseau de distribution (Fongaro *et al.*, 2013, 2015).

En travaillant avec la même souche HAdV-2 que pour nos précédents travaux, nous avons obtenu une relation linéaire entre la concentration en virus infectieux utilisée pour infecter un tapis cellulaire et la concentration en génome viral détecté dans les cellules un jour après leur infection (Figure 7) (Sedji *et al.*, 2018) (ACL-19).

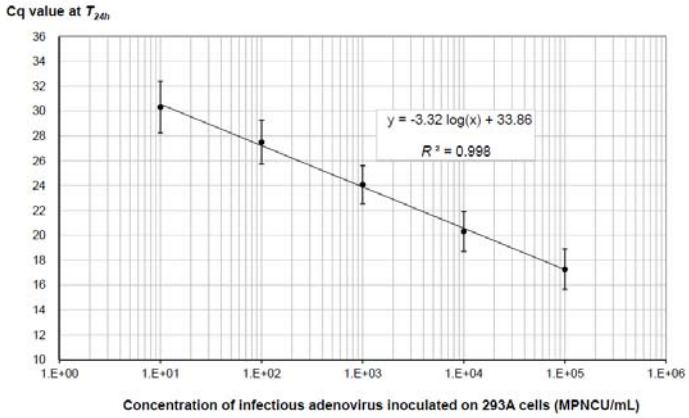


Figure 7 : Relation linéaire entre la concentration en adénovirus infectieux inoculés sur des cellules HEK 293 et la quantité de génome d'adénovirus détectée dans ces cellules un jour après leur infection exprimée en valeur de Cq (cycle de PCR). (Figure issue de Sedji *et al.*, 2018).

La sensibilité de la méthode d'ICC-qPCR est de 10 virus équivalent NPPUC/mL (NNPUC : Nombre le Plus Probable d'Unités Cytopathiques) pour un temps d'incubation de 24 h en travaillant avec une souche d'HAdV-2 de laboratoire. Cette relation linéaire permet de réaliser une gamme étalon analysée en parallèle des échantillons environnementaux.

Nous avons ensuite analysé 15 échantillons d'eau de rivière prélevés en aval de la station d'épuration de la métropole du Grand Nancy, ils étaient tous positifs en génome d'HAdV par PCR digitale (ddPCR). De plus, les HAdV-41 représentaient en moyenne 80 % des adénovirus détectés par ddPCR. L'ICC-qPCR a montré que 93 % de nos échantillons contenaient des HAdV infectieux et qu'ils étaient quantifiables dans huit échantillons (53 %) avec des concentrations comprises entre $1{,}5.10^1$ et $4{,}1.10^2$ équivalent NPPUC/L d'eau de rivière (Figure 8) (Sedji *et al.*, 2018) (ACL-19). Nous avons également détecté des HAdV-41 infectieux dans 11 échantillons (73 %). La comparaison entre les concentrations en génome obtenues par ddPCR et les concentrations en HAdV infectieux obtenues par ICC-qPCR ont montré que seulement 0,3 à 12,2 % des HAdV détectés dans ces

échantillons étaient infectieux alors que le site de prélèvement correspondait à une contamination fécale récente.

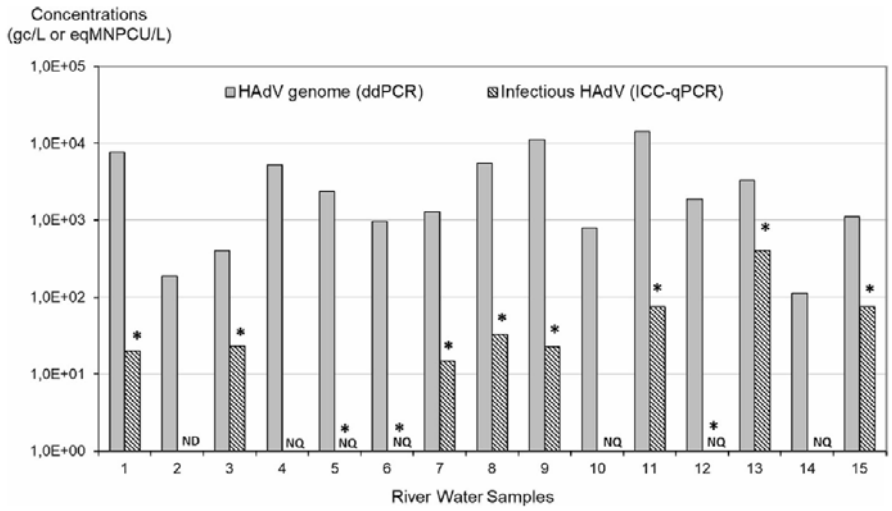


Figure 8 : Concentrations en génome d'adénovirus et en adénovirus infectieux dans 15 échantillons d'eau de rivière en appliquant respectivement la PCR digitale et l'ICC-qPCR. Les échantillons positifs en HAdV41 infectieux sont indiqués par un astérisque. NQ : échantillon non quantifiable. (Figure issue de Sedji *et al.*, 2018).

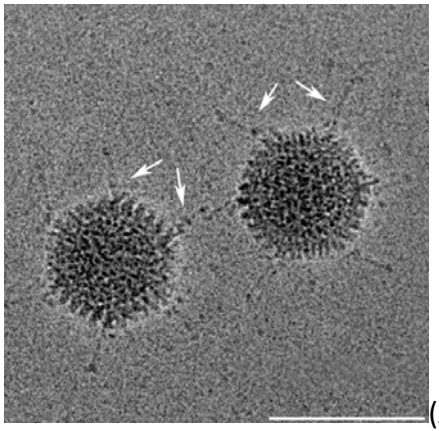
Seules trois études ont précédemment apporté des données quantitatives sur les HAdV infectieux dans l'environnement. Elles utilisaient l'ICC-RT-qPCR (Fongaro *et al.*, 2013, 2015, Rodríguez *et al.*, 2013). Les pourcentages en HAdV infectieux les plus proches des nôtres ont été obtenus par Rodríguez *et al.* (2013) avec des valeurs comprises entre 0,2 à 9 %. Ces auteurs avaient également utilisé la lignée HEK 293. Fongaro *et al.* (2013, 2015) ont obtenu des pourcentages en HAdV infectieux plus faibles (≤ 0,12 %), mais ils avaient utilisé la lignée A549. Ainsi, le choix de la lignée cellulaire peut fortement influencer la détection des HAdV infectieux dans l'environnement en raison de la prévalence élevée des HAdV-41.

Projet scientifique

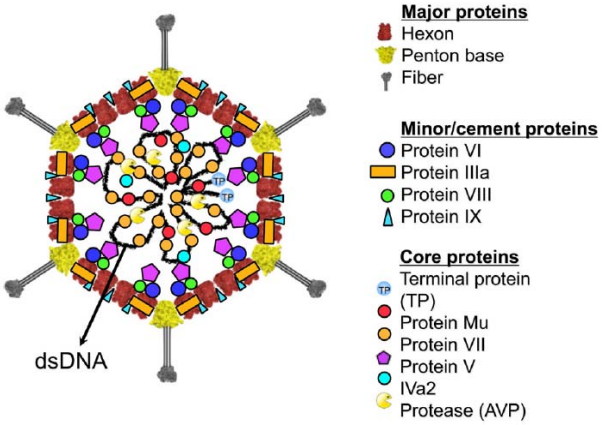
Mon projet scientifique a pour fil conducteur les adénovirus humains dans l'environnement hydrique. Je souhaite explorer différents aspects en lien plus ou moins direct avec mes précédents travaux.

Les HAdV sont impliqués dans des pathologies respiratoires, intestinales, oculaires ou urinaires, pouvant être fatales chez les personnes immunodéprimées. Ces virus sont excrétés par voie fécale de façon prolongée y compris en l'absence de troubles digestifs. Les HAdV (famille : *Adenoviridae*, genre : *Mastadenovirus*) sont classés en sept espèces, nommées A à G. Seuls les 52 premiers adénovirus humains identifiés sont des sérotypes. Le groupe de travail sur les adénovirus humains (groupe de travail regroupant des chercheurs travaillant sur les adénovirus humains et le National Center for Biotechnology Information (NIH)/GenBank, http://hadvwg.gmu.edu/) reconnait actuellement 90 génotypes. Les adénovirus 40 (HAdV-40) et 41 (HAdV-41), qui appartiennent à l'espèce F, provoquent des troubles gastro-intestinaux et sont communément appelés adénovirus entériques. Ils constituent la troisième cause de gastro-entérites infantiles après les rotavirus et norovirus. Les HAdV-41 sont considérés comme les HAdV les plus prévalents dans l'environnement (Iaconelli *et al.*, 2017; Ogorzaly *et al.*, 2015; La Rosa *et al.*, 2017).

Les HAdV sont constitués d'un ADN double brin linéaire de 35 à 36 kpb (kilo paires de bases) et d'une capside icosaédrique de 90 nm de diamètre avec des fibres d'environ 30 nm. Parmi les 13 protéines constituant ces virus, les protéines dîtes majeures sont (i) l'hexon constituant les faces de l'icosaèdre, (ii) la protéine de base du penton à chaque sommet et (iii) la fibre en saillie sur chaque sommet (Figure 9). L'association non covalente entre la base de penton et la fibre forme le penton.



(A)



(B)

Figure 9 : (A) Observation d'un adénovirus de type 5 par cryo-microscopie électronique (la barre blanche correspond à 100 nm et les flèches blanches indiquent les fibres) (Goosney et Nemerow, 2003) et (B) Représentation schématique de la structure des adénovirus (Benevento *et al.*, 2014).

Du point de vue de leur morphologie, les HAdV se distinguent des autres virus entériques pathogènes qui ont une capside icosaédrique de plus petite taille (20 à 70 nm), dépourvue de fibre et un génome à ARN. D'un point de vue environnemental, les HAdV sont également remarquables par (i) leur présence plus importante que les autres virus entériques dans les eaux, (ii) une absence de saisonnalité dans les eaux usées, (iii) une forte résistance aux UV par rapport aux autres virus entériques, (iv) la possibilité de les détecter par les méthodes moléculaires et de culture cellulaire et (v) leur spécificité pour l'Homme (Hijnen *et al.*, 2006, Prevost *et al.*, 2016, Rames *et al.*, 2016).

La prévalence environnementale et la résistance des HAdV ont amené de nombreuses études à les proposer comme virus cible dans l'évaluation du risque viral dans le milieu hydrique (Bofill-Mas *et al.*, 2010, Farkas *et al.*, 2018, Rusiñol *et al.*, 2015). Cette évaluation repose actuellement sur la détection du génome bien que ce marqueur ne puisse s'avérer satisfaisant dans ce contexte car seuls les virus infectieux constituent un danger pour la santé. Ainsi, il apparaît indispensable de développer des approches innovantes permettant d'améliorer la détection des particules virales infectieuses dans le milieu hydrique. L'étude des mécanismes d'inactivation virale dans les conditions environnementales et au cours des procédés de désinfection est également indispensable pour l'amélioration des traitements appliqués à l'eau.

Mon projet vise à mieux comprendre le comportement des adénovirus dans l'environnement pour mieux appréhender le risque viral associé. Ceci nécessite une meilleure connaissance des mécanismes impliqués dans les processus d'adhésion/agrégation et d'inactivation mais aussi plus généralement le développement d'outils moléculaires permettant de détecter spécifiquement les virus infectieux.

1- Adhésion des virus aux surfaces dans le milieu hydrique

Les particularités structurales et environnementales des HAdV par rapport aux autres virus entériques pathogènes posent la question de leur capacité à adhérer aux surfaces qui sont très rapidement colonisées par un biofilm dans le milieu hydrique. Pourtant ses aspects environnementaux sont assez peu documentés pour les particules virales et les données sont quasiment inexistantes pour les virus entériques pathogènes tels que les adénovirus. Le manque de données est très probablement favorisé par les contraintes liées à la production de biofilms multi-espèces à partir d'eau de distribution, ainsi qu'à la manipulation de virus entériques pathogènes dans ce contexte.

Pour envisager la compréhension des mécanismes d'adhésion d'un virus sur un support, il faut d'abord étudier les propriétés de surface de chacun des partenaires impliqués dans le processus : la surface et le virus. La localisation des virus sur les surfaces notamment lorsqu'elles sont colonisées par un biofilm est une piste importante à explorer pour comprendre les mécanismes impliqués dans la persistance des virus sur les surfaces.

1.1- Etude des mécanismes d'adhésion des particules virales aux surfaces dans le milieu hydrique

Je travaille actuellement en collaboration avec Laurence Mathieu (EPHE et LCPME, équipe MIC) sur l'étude des mécanismes d'adhésion des HAdV sur des surfaces colonisées par des biofilms d'eau potable et sur la caractérisation de ces biofilms. Maryse Iris Sedji réalise son travail de doctorat sur ce sujet dans le cadre d'une bourse ministérielle de l'école doctorale BioSE. Ce travail bénéficie

également du soutien financier de la Zone Atelier Moselle (ZAM) et de l'Ecole Pratique des Hautes Etudes (EPHE). Cette étude fait suite à des travaux réalisés précédemment avec les bactériophages ARN F-spécifiques dans le cadre de la thèse de Sandra Pelleieux ; ces travaux avaient souligné l'importance du caractère hydrophobe des particules virales dans leur accumulation aux surfaces. Les travaux de doctorat d'Adrien Brié avaient ensuite montré des modifications du caractère hydrophobe des particules virales lors de leur inactivation par la chaleur.

Pour l'étude en cours, nous avons choisi de travailler avec un HAdV de type 2 (HAdV-2) et avec le bactériophage PR772 qui appartient à la famille des *Tectiviridae* et au genre *Alphatectivirus*. Les bactériophages de cette famille ont été proposés comme modèles des HAdV car ils présentent des similitudes structurelles, génomiques et réplicatives avec ces derniers. Ces bactériophages, et notamment le phage PR772, sont plus faciles à répliquer et leurs particules infectieuses sont plus facilement quantifiables que les HAdV. Les similitudes structurelles entre ces bactériophages et les HAdV permettent de les envisager pour l'étude des mécanismes d'adhésion aux surfaces. Nos expérimentations sont conduites dans des pilotes alimentés par de l'eau du réseau de distribution et permettant reproduire des conditions de flux d'eau laminaire afin de constituer des biofilms d'eau potable de quelques semaines sur des coupons en PEHD.

La caractérisation physicochimique des particules virales et des surfaces est indispensable pour comprendre les mécanismes mis en jeu dans l'adhésion des particules. Des mesures de taille et de diamètre hydrodynamique ont permis de caractériser nos deux types de particules respectivement par microscopie électronique à transmission (MET) (Sylvie Migot, Institut Jean Lamour UMR 7198 CNRS / Université de Lorraine) et diffusion dynamique de la lumière (DLS) (Céline Caillet, LIEC, Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux UMR 7360 CNRS / Université de Lorraine). Le diamètre hydrodynamique d'HAdV-2 est 40 % plus élevé que celui du phage PR772. Le point isoélectrique (*pI*) qui est le pH pour lequel ces particules ont une charge nulle a été déterminé ; sa valeur est comprise entre 3 et 4 pour les deux virus. Ces particules sont donc chargées négativement au pH de l'eau du réseau de distribution qui est de l'ordre de 8. Des expérimentations par électrophorèse capillaire (Guillaume Sautrey, LCPME, équipe ELAN) sont en cours pour comparer les densités de charge électrostatique de nos deux virus (Sautrey *et al.*, 2018). Nous utilisons des tests d'adhésion sur des billes de polystyrène hydrophobes pour comparer le caractère hydrophobe des virus étudiés. L'hydrophobie est plus élevée pour HAdV-2 que pour le phage PR772. La plupart des méthodes de caractérisation des particules virales utilisées dans cette étude ont été éprouvées lors de l'étude des propriétés de surfaces de particules virales au cours de leur inactivation (doctorat d'Adrien Brié). Globalement, la caractérisation physico-chimique de ces deux virus souligne les limites de l'utilisation du phage PR772 comme modèle des HAdV pour l'étude des mécanismes d'adhésion aux surfaces. Des analyses par microscopie à force atomique (AFM) réalisées avec Grégory Francius (LCPME, équipe CSI) sont en cours afin de déterminer le taux de recouvrement, la rugosité et la balance hydrophile/hydrophobe des surfaces en PEHD colonisées par les biofilms d'eau de distribution.

La seconde étape du projet a pour objectif de suivre l'accumulation d'HAdV-2 et de PR772 sur des surfaces en PEHD colonisées par des biofilms d'eau potable. Les données recueillies permettront d'évaluer l'impact de la colonisation par un biofilm sur l'accumulation des particules virales aux surfaces puis de comparer les vitesses et densités d'accumulation de nos deux types de particules virales. Des surfaces présentant des caractéristiques physico-chimiques définies en

termes d'hydrophobie et d'hydrophilie seront également utilisées pour comparer l'accumulation virale dans des conditions maîtrisées. La répartition des particules virales sur les surfaces sera étudiée par AFM en collaboration avec Grégory Francius. Un travail de modélisation des données en collaboration avec Marc Hébrant (LCPME, équipe ELAN) est prévu afin de renforcer la compréhension des mécanismes mis en jeu dans le transfert et l'accumulation de ces particules virales aux surfaces et d'identifier les facteurs limitants.

1.2- Localisation des particules virales sur les surfaces

Les travaux du contrat Biofilm VIII suggéraient des différences de localisation des bactériophages ARN F-spécifiques dans les biofilms d'eau de distribution en fonction de leurs propriétés de surface et plus précisément de leur hydrophobie relative. Ces différences de localisation peuvent influencer la persistance des particules virales en limitant leur exposition aux agents oxydants dont l'action sur le biofilm est généralement limitée aux couches superficielles.

Mon objectif est de visualiser les particules d'HAdV sur des surfaces colonisées par un biofilm et de caractériser les éléments du biofilm sur lesquels les particules virales se sont accumulées. L'avancée des techniques de microscopie et de marquage des particules virales permettent de réaliser de la microscopie à un niveau de particule unique (Sakin *et al.*, 2016), ces méthodes sont applicables lors du suivi de l'infection de cellules en culture *in vitro* à l'heure actuelle. La spectrométrie de masse des ions secondaires (SIMS) permet l'identification et la localisation de nanoparticules. La mesure du temps de vol (ToF pour Time-of-flight) de ces ions secondaires permet avec la méthode ToF-SIMS d'obtenir une image tridimensionnelle d'échantillons biologiques complexes (Benettoni *et al.*, 2019). Avec cette approche, cette équipe a pu localiser des nanoparticules de dioxyde de titane dans des biofilms mono-espèce de l'algue unicellulaire *Chlorella vulgaris*. La réalisation de ce type de méthode requiert des équipements et des compétences spécifiques. De plus, l'isolement de cellules individuelles et des composants de la matrice sans détruire le biofilm reste un problème majeur à résoudre (Azeredo *et al.*, 2017).

La visualisation des particules virales dans des biofilms pourrait dans un premier temps être envisagée pour des particules virales fluorescentes grâce à un marquage de leur génome. Ce type de marquage est réalisable, mais son impact sur les propriétés de surface des virus en termes d'hydrophobie et de charge électrostatique devra être vérifié. La visualisation des particules virales permettra également d'observer si elles s'accumulent préférentiellement dans certaines régions du biofilm ce qui pourrait se traduire par des agrégats de virus. Avant d'envisager la localisation des virus dans des biofilms d'eau de distribution, il sera probablement nécessaire de travailler à partir de biofilms mono-espèces en utilisant des bactéries modèles présentant des caractéristiques physico-chimiques connues. Des analyses par AFM et des marquages des composants de la matrice extracellulaire permettraient de caractériser au moins les couches superficielles du biofilm et de déterminer si certains constituants du biofilm constituent des sites d'accumulation préférentiels pour les particules virales.

Des collaborations avec des équipes de recherche possédant l'expertise sur l'étude de l'organisation spatiale des biofilms et la caractérisation de la matrice extracellulaire telle que l'UMR MICALIS pourront être envisagées (Dr. Romain Briandet, UMR MICALIS, Microbiologie de l'Alimentation au Service de la santé, UMR 1319 INRA / AgroParisTech, Université Paris Saclay).

2- Développement d'une nouvelle approche pour la détection des adénovirus infectieux dans l'environnement

Les spécificités des virus entériques par rapport aux indicateurs bactériens en termes de comportement dans l'environnement et de résistance aux conditions environnementales et aux traitements virucides entraînent une demande croissante pour la détection des virus entériques dans l'eau et les aliments. Ceci se traduit par l'utilisation de la PCR qui permet la détection voire la quantification du génome viral de façon rapide, spécifique et sensible. Mais comme nous l'avons vu précédemment la détection du génome est possible sur une durée beaucoup plus longue que la détection du caractère infectieux et des voies de réparation du génome sont possibles pour les virus à ADN tels que les HAdV.

La culture cellulaire est la méthode de référence pour la détection des virus infectieux car elle est la seule à permettre la réalisation de la totalité du cycle infectieux. Mais cette méthode est difficilement applicable aux échantillons environnementaux et n'est pas ou difficilement réalisable pour certains virus entériques pathogènes comme les norovirus et les souches environnementales du virus de l'hépatite A même si des avancées majeures ont été obtenues pour les norovirus (Ettayebi *et al.*, 2016; Jones *et al.*, 2015). Enfin, la culture cellulaire n'est pas adaptée au contrôle sanitaire qui demande des méthodes facilement utilisables.

L'ICC-qPCR est une méthode qui a été développée pour une détection rapide des HAdV infectieux ainsi que d'autres virus entériques pathogènes (Dong *et al.*, 2010; Greening *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2005). Cette méthode permet effectivement de réduire le temps de détection des virus infectieux. Une autre approche utilise les cellules uniquement pour évaluer la première étape du cycle viral, c'est-à-dire l'interaction virus-cellule. Cette approche est intéressante pour étudier les mécanismes de l'inactivation virale (Brié *et al.*, 2016, 2017; Wigginton *et al.*, 2012) car elle permet d'évaluer les effets de facteurs inactivants sur le ligand viral. Une étude a récemment proposé de la réaliser avec des cellules permissives en suspension pour la détection des HAdV infectieux (Guo *et al.*, 2018). Le principal point faible de ces méthodes est la nécessité de cultiver des cellules eucaryotes.

Nous avons donc besoin d'approches permettant de s'affranchir de la culture cellulaire. Les connaissances actuelles sur le cycle infectieux des HAdV offre l'opportunité de développer une nouvelle approche de détection et de caractérisation des capsides virales. Le cycle réplicatif des HAdV est parmi les plus étudiés car ces virus sont utilisés comme vecteurs thérapeutiques. Lors de l'infection d'une cellule, l'extrémité globulaire de la fibre se lie au récepteur cellulaire. Cette liaison implique une glycoprotéine cellulaire appelée CAR (Coxsackievirus and Adenovirus Receptor) pour six des sept familles d'HAdV. Une seconde interaction virus-cellule fait ensuite intervenir la base du penton et les intégrines cellulaires. Cette seconde liaison virus-cellule entraîne l'endocytose de la particule virale et un changement de conformation de la base du penton. Au début de l'endocytose les pentons se détachent ce qui entraîne la libération de la protéine VI qui est indispensable à l'échappement de la vésicule d'endocytose (Wiethoff *et al.*, 2005). Le virion partiellement décapsidé est libéré dans le cytoplasme puis transporté le long des microtubules jusqu'aux pores nucléaires. Le noyau est le site de réplication de l'ADN viral et de l'assemblage des nouveaux virions (Mangel & San Martín, 2014, Pérez-Berná *et al.*, 2012). Des

travaux conduits avec HAdV-2 ont également montré l'implication du récepteur CAR dans la libération des nouveaux virions (Walters *et al.*, 2002).

Les quelques études sur les mécanismes d'inactivation des HAdV suggèrent que le penton, serait le principal point faible de ces virus. Ceci peut s'expliquer par l'implication de cette partie de la capside dans les étapes précoces du cycle infectieux qui peuvent être scindées en trois temps avec (1) l'interaction entre la fibre et le récepteur cellulaire, (2) l'interaction entre la base du penton et le co-récepteur cellulaire et (3) le détachement du penton. La réalisation de ces trois étapes nécessite des protéines virales intactes et capables de modifications conformationnelles. La particule virale obtenue à l'issue de ces trois étapes possède une capside partielle dépourvue d'au moins une partie de ses sommets et de ses fibres.

Dans ce contexte, mon objectif est de développer une méthode innovante permettant de mimer les premières étapes du cycle infectieux des HAdV en s'affranchissant de l'utilisation de cellules en culture. Ma stratégie pour le développement de cette méthode est de produire la protéine recombinante du récepteur puis de fonctionnaliser des surfaces avec cette protéine afin de capturer les HAdV infectieux. Mais je souhaite aller plus loin que la capture des HAdV ayant des fibres intactes en obtenant la décapsidation partielle des HAdV. La décapsidation partielle nécessitera l'interaction entre la base du penton et les intégrines puis la reproduction des conditions permettant le détachement du penton.

2.1- Capture des adénovirus par la protéine D1-CAR recombinante

La première partie de mon projet sur la détection des HAdV infectieux s'intéressera à l'étape d'interaction entre le ligand viral et le récepteur cellulaire qui est une étape sensible car elle conditionne la suite de l'infection cellulaire. Mon objectif est de fonctionnaliser des surfaces avec le domaine extra-cellulaire de la protéine CAR recombinante. Les étapes à réaliser en amont de la fonctionnalisation seront la production du domaine extra-cellulaire du récepteur CAR, l'optimisation de sa solubilité afin de permettre une interaction optimale avec la fibre virale et l'évaluation de la capacité de cette protéine à capturer les HAdV en colonne lactose-Sepharose. La fonctionnalisation de surfaces planes avec la protéine recombinante pourra ensuite être réalisée. La capacité de ces surfaces fonctionnalisées à capturer les HAdV par leurs fibres sera également évaluée.

Production de la protéine D1-CAR : La fibre des HAdV se lie au domaine D1 de la partie extra-cellulaire de la protéine CAR (Freimuth *et al.*, 1999) qui peut être produit chez *Escherichia coli* (Bewley *et al.*, 1999, Freimuth *et al.*, 1999, van Raaij *et al.*, 2000). La protéine recombinante ainsi obtenue est capable d'interagir avec les HAdV et de bloquer leur capacité à infecter des cellules (Freimuth *et al.*, 1999).

Optimisation de la solubilité de la protéine recombinante : Bewley et collaborateurs (1999) décrivent toutefois un problème de solubilité de la protéine pouvant nécessiter une extension de 22 acides aminés ou une dénaturation de la protéine. L'option qui a été envisagée avec Pascal Reboul (Pr, IMoPA [Ingénierie Moléculaire et Physiopathologie Articulaire], UMR 7365 CNRS / Université de Lorraine) qui possède l'expertise sur la production de protéines recombinantes par

E. coli est de réaliser un marquage de la protéine permettant d'augmenter sa solubilité. Un nouveau marquage (CRD_{SAT}), récemment mis au point par IMoPA, devrait faciliter la production d'une plus grande quantité de protéines solubles comme cela a été démontré pour d'autres protéines (Carrasco *et al.*, 2018, Kriznik *et al.*, 2018). Ce nouveau marquage a été récemment breveté (WO 2017/194888 A1) (Figure 10).

Evaluation de la capacité de la protéine D1-CAR à capturer les HAdV : Grâce à l'activité lectinique du CRD_{SAT}, la capacité de la protéine à se lier à la fibre des HAdV sera tout d'abord évaluée sur résine lactose-Sepharose. Pour cela des HAdV seront produits sur cellules HEK 293. Le titre infectieux des suspensions virales sera déterminé par culture cellulaire (Ogorzaly *et al.*, 2010, Sedji *et al.*, 2018) et la concentration en génome sera déterminée par qPCR (Prevost *et al.*, 2015). Un traitement à la DNase permettra d'évaluer la proportion de génome libre et de capsides altérées. Ces méthodes seront appliquées avant et après passage sur résine lactose-Sepharose (Figure 10) afin de déterminer la proportion de virus infectieux et non infectieux capturés par la protéine recombinante.

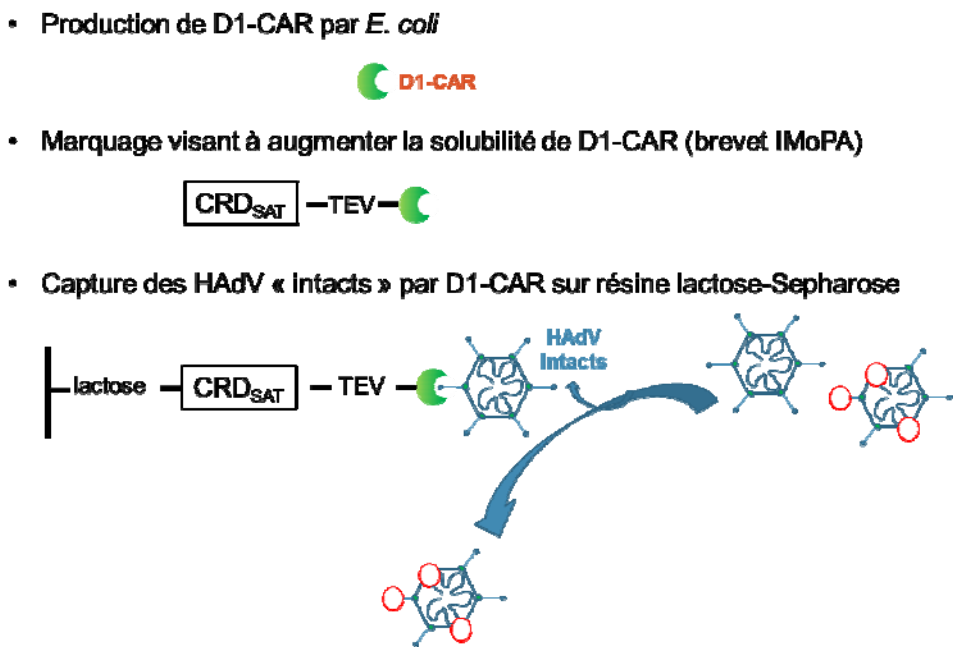


Figure 10 : Description des étapes de développement de la méthode de capture des HAdV par interaction avec leurs fibres.

Fonctionnalisation de surfaces avec la protéine recombinante : Après avoir obtenu la protéine recombinante D1-CAR capable de capturer les HAdV, l'objectif sera de fonctionnaliser des surfaces planes avec cette protéine (Figure 11). En effet, la résine lactose-Sepharose ne permettra pas de caractériser l'interaction entre la fibre et sa protéine réceptrice et sera difficilement transposable aux échantillons complexes. La fonctionnalisation pourra être réalisée sur des surfaces en or. Des monocouches auto-assemblées de thiols présentant une chaîne carbonée avec une extrémité carboxylique serviront à l'ancrage covalent de la protéine sur les surfaces *via* la réaction de couplage carbodiimide (EDC)/N-hydroxysuccinimide (NHS). Une alternative serait de fonctionnaliser les surfaces de thiols avec du lactosamine afin de pouvoir greffer le domaine D1 de

la protéine CAR grâce à l'activité lectinique du CRD_{SAT}. Sofiane El-Kirat-Chatel et Grégory Francius (LCPME, équipe CSI) possèdent l'expertise sur ce type de fonctionnalisation des surfaces qui est utilisée pour des analyses AFM. Ces surfaces ainsi fonctionnalisées appelées surfaces CAR seront évaluées sur leur capacité à capturer les HAdV par leurs fibres. La qPCR, la culture cellulaire et le pré-traitement à la DNase permettront de caractériser les suspensions virales avant et après exposition aux surfaces CAR.

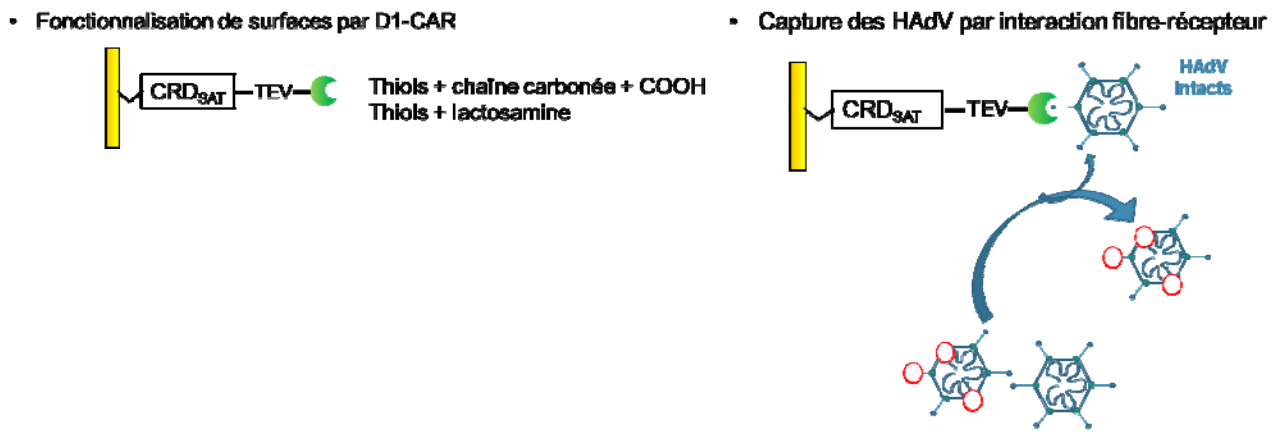


Figure 11 : Fonctionnalisation de surfaces avec la protéine recombinante D1-CAR pour la capture des HAdV par interaction avec leurs fibres.

Il est important de préciser que cette approche ne sera pas parfaitement spécifique des HAdV infectieux mais elle permettra de détecter les virus ayant conservé leur capacité à reconnaître le récepteur cellulaire. Les conditions de temps de contact, de température pourront être plus facilement modulées que lors de l'utilisation de cellules. Ce système augmentera également les possibilités de caractérisation physico-chimique par des méthodes comme l'AFM et sera moins sensible aux contaminants des échantillons environnementaux.

2.2- Décapsidation partielle des particules virales

Mon second objectif sur la détection des HAdV infectieux est de pouvoir aller plus loin en obtenant la décapsidation partielle des particules virales adhérées aux surfaces fonctionnalisées.

A la surface des cellules, l'interaction de la base du penton avec les intégrines cellulaires entraîne l'endocytose de la particule ainsi qu'une modification de la conformation de la base du penton. Une perte des pentons, ou décapsidation partielle, est observée juste avant ou au tout début de l'endocytose (Maier *et al.*, 2012). Cette décapsidation partielle est indispensable à la poursuite du cycle infectieux car elle permet l'échappement de la vésicule d'endocytose afin que la particule virale ne soit pas dégradée. Mon objectif est ici de mimer tout d'abord l'interaction entre la base du penton et les intégrines, puis la perte des pentons.

Interaction entre la base du penton et les intégrines cellulaires : Le choix de l'intégrine se fera en fonction du type d'HAdV utilisé ou ciblé. En effet, pour les HAdV-41, qui sont les plus fréquemment isolés dans l'environnement hydrique, la base du penton interagit avec l'intégrine

α6β4 (Rajan *et al.*, 2018). Cette interaction pourra être reproduite avec des intégrines commerciales. Une alternative sera la production de ces protéines sur système eucaryote. L'interaction entre la base du penton et l'intégrine sera évaluée par la quantification de l'intégrine non liée, ce qui nécessitera de développer un test ELISA utilisant de la laminine I murine. Les conditions optimales (temps de contact, concentrations en intégrines et en particules virales) devront être définies (Figure 12).

Décapsidation partielle : La décapsidation de particules d'HAdV a déjà été obtenue en dehors de tout système cellulaire dans quelques études par l'utilisation de la chaleur et/ou de pH acides (Benevento *et al.*, 2014; Pérez-Berná *et al.*, 2012; Wiethoff *et al.*, 2005). Mon objectif est d'obtenir uniquement la perte des pentons et non une dégradation complète de la capside (Figure 12). Les conditions à appliquer devront donc être définies très précisément. Des travaux récents sur le phage Qβ ont montré l'importance des conditions d'oxydo-réduction sur la structure des particules virales (Loison *et al.*, 2016).Les expérimentations sur les conditions permettant la décapsidation partielle seront réalisées en travaillant sur le pH, la température et les conditions d'oxydo-réduction.

Les particules virales pour lesquelles nous aurons obtenu une décapsidation partielle pourront se détacher de la surface sur laquelle elles auront été fixées par la protéine CAR. Elles seront donc détectables par qPCR et leur capside sera suffisamment altérée par la perte des pentons pour laisser passer la DNase ou des intercalants tels que le PMA (monoazide de propidium) ou l'EMA (monoazide d'éthidium) (Prevost *et al.*, 2016) (Figure 12).

Pour ces expérimentations, un HAdV n'ayant pas la capacité à réaliser l'étape de décapsidation partielle pourra être utilisé comme témoin négatif. Pour les HAdV, une étape de maturation correspondant au clivage de certaines protéines de capside est indispensable pour que la particule soit capable de perdre ses pentons, libérer la protéine VI et s'échapper de la vésicule d'endocytose (Mangel & San Martín, 2014; Ortega-Esteban *et al.*, 2015; Pérez-Berná *et al.*, 2012). Un HAdV mutant (HAdV-2 ts1) permet d'obtenir sur cellules eucaryotes à 39°C des particules virales qui se lient au récepteur CAR, sont internalisées dans la vésicule d'endocytose, mais qui sont en revanche incapables de se décapsider (Hannan *et al.*, 1983; Pérez-Berná *et al.*, 2012).

Etant donné que le génome et de nombreuses protéines sont impliqués dans le cycle infectieux des HAdV, nous utiliserons l'adjectif « intacts » pour qualifier les virus pour lesquels nous aurons obtenu la décapsidation partielle.

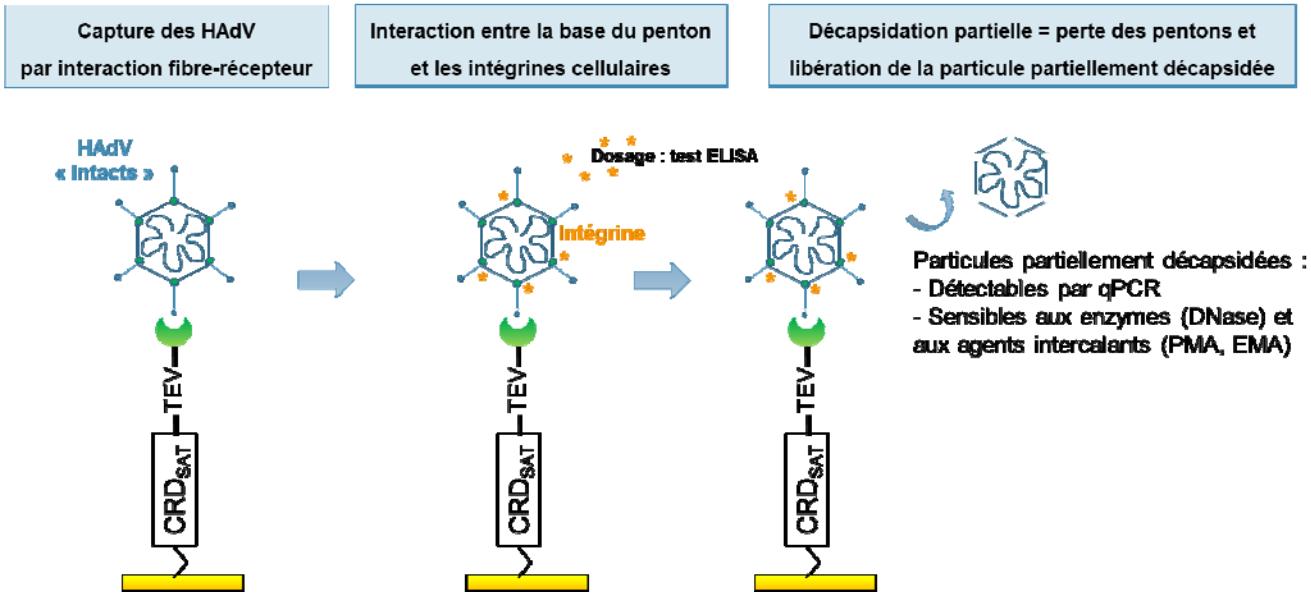


Figure 12 : Schéma des différentes étapes de détection des HAdV intacts en mimant les premières étapes du cycle infectieux.

La reproduction des premières étapes du cycle viral sur un système acellulaire présente un risque non négligeable de ne pas aboutir ou de n'être applicable qu'à des échantillons de laboratoire. Une autre piste à explorer serait l'utilisation de cellules HEK 293 en suspension dans des conditions particulières, notamment de température (Wigginton *et al.*, 2012), autorisant uniquement l'étape d'adhésion puis d'assurer la décapsidation partielle par des méthodes physico-chimiques. Nous avons précédemment réussi à obtenir l'adhésion du phage MS2 sur *E. coli* sans qu'il soit répliqué en abaissant la température d'expérimentation de 37°C à 4°C (Brié *et al.*, 2016). Un transfert de cette approche avec un modèle eucaryote est envisageable.

Dans ce contexte, le projet PADIWA vise à améliorer l'évaluation du risque viral dans les eaux de surface et les eaux de distribution. Il s'agit d'un Projet de Recherche Collaborative Internationale (PRCI) France-Luxembourg qui a été déposé à l'appel à projet générique de l'ANR 2019 en partenariat avec Leslie Ogorzaly (LIST, Luxembourg) qui est coordinatrice pour le Luxembourg, Sébastien Wurtzer (Pôle R&D Biologie, Eau de Paris) et Pascal Reboul (IMoPA, UMR 7365 CNRS / Université de Lorraine). Il permettrait au LCPME, au LIST et au Pôle R&D Biologie d'Eau de Paris de progresser sur l'évaluation du risque viral dans les eaux en travaillant ensemble sur la concentration des particules virales, les méthodes de caractérisation de l'infectiosité et l'étude des mécanismes d'inactivation. La méthode de marquage des protéines développée par Pascal Reboul (IMoPA) contribuera aux expérimentations de détection des HAdV. L'évaluation du projet par l'ANR est en cours.

3- Etude des mécanismes d'inactivation des adénovirus

Les quelques études sur les mécanismes d'inactivation des HAdV montrent une résistance élevée de ces virus à la chaleur, à la lumière monochromatique UVC et aux monochloramines par comparaison avec d'autres virus entériques pathogènes. En revanche, les HAdV sont facilement inactivés par le chlore libre (Baxter *et al.*, 2007) et la désinfection solaire indirecte (Bosshard *et al.*, 2013). La résistance aux UVC s'explique par des dommages induits principalement au niveau de l'ADN, alors que les protéines restent intactes. Les HAdV peuvent infecter leur cellule hôte lorsque leur ADN est fortement endommagé, les altérations de l'ADN étant alors réparées par la cellule hôte (Bosshard *et al.*, 2013). L'hypochlorite de sodium agit sur les protéines des HAdV nécessaires à l'endocytose et à la libération des pentons (Page *et al.*, 2010). La désinfection solaire indirecte repose sur la production d'oxydants tel que l'oxygène singulet et induit une dégradation importante de la fibre et de la base du penton des HAdV (Bosshard *et al.*, 2013). La capside et plus particulièrement le penton sont des points sensibles dans l'inactivation des HAdV.

La nouvelle approche visant à reproduire les étapes précoces du cycle infectieux contribuera à l'étude des mécanismes de l'inactivation des HAdV en ciblant les altérations de la capside. L'étude des mécanismes d'inactivation permet d'identifier les points faibles des particules virales. Les données obtenues permettent de comprendre l'inactivation virale dans l'environnement, le mode d'action des traitements virucides appliqués à l'eau ou aux aliments, mais également d'identifier et de caractériser les facteurs protecteurs des virus entériques dans le milieu hydrique tels que les biofilms. Dans certains cas nous pouvons également souhaiter préserver le caractère infectieux des virus entériques en particulier lors d'analyses environnementales qui impliquent différentes étapes dont certaines, notamment la concentration, peuvent avoir un impact sur le caractère infectieux et constituer un frein à l'évaluation du risque viral.

3.1- Inactivation virale liée à des altérations de la capside

Les altérations de la capside peuvent conduire à l'inactivation des HAdV par l'incapacité à réaliser les étapes précoces du cycle infectieux qui ont été décrites précédemment. Le développement de surfaces fonctionnalisées par la protéine D1-CAR permettra d'étudier l'interaction virus-récepteur. Ainsi, l'AFM en mode imagerie permettra de visualiser la liaison des HAdV à ces surfaces fonctionnalisées. L'AFM en mode force permettra elle d'étudier les mécanismes mis en jeu lors de l'interaction entre la partie extra-cellulaire de la protéine CAR et la fibre virale. Les sondes AFM peuvent être fonctionnalisées avec des HAdV purifiés et mises en contact de surfaces fonctionnalisées par D1-CAR. Ces sondes peuvent également être fonctionnalisées avec le domaine D1-CAR produit par *E. coli* puis mises en contact de surfaces sur lesquelles des HAdV auront été déposés (Figure 13).

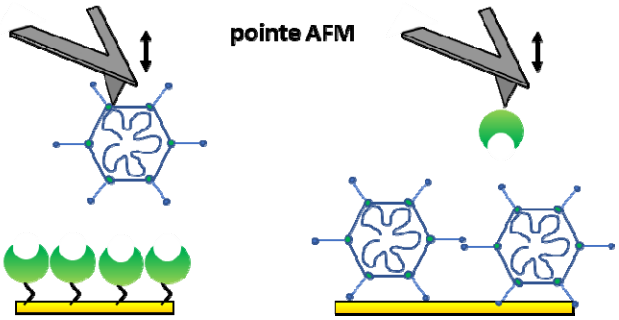


Figure 13 : Etude de l'interaction entre la fibre des HAdV et le domaine D1 du récepteur CAR en utilisant l'AFM en mode force avec des pointes fonctionnalisées.

La capacité de cette approche à séparer les particules ayant des fibres intactes associée aux méthodes que nous maîtrisons déjà pour caractériser les particules virales telles que l'évaluation de la perméabilité de la capside aux enzymes (DNase) ou aux agents intercalants (PMA, EMA), l'AFM en mode imagerie et l'étude de l'hydrophobie de surface des capsides permettront d'étudier les mécanismes conduisant à l'inactivation des particules virales par altération de la capside et plus particulièrement de ses fibres.

Aller plus loin dans cette approche par la reproduction *in vitro* de l'interaction entre la base du penton et les intégrines puis de la décapsidation partielle élargirait les perspectives de caractérisation des mécanismes d'inactivation des HAdV. En effet, nous avons constaté que la capacité de liaison à la cellule hôte n'est pas perdue de façon linéaire au cours de l'inactivation pour les HAdV (données non publiées obtenues par traitement thermique) ou pour d'autres virus entériques (Brié *et al.*, 2016, 2017, 2018; Wigginton *et al.*, 2012). Être capable de mimer ces étapes majeures du cycle viral permettra de classer les particules virales en fonction de leur niveau d'altération, d'étudier la relation entre les propriétés de surface d'une particule et les altérations de sa capside et d'identifier les mécanismes d'inactivation des HAdV dans l'environnement et lors des traitements.

Une région de la capside des HAdV pourrait être particulièrement sensible vis-à-vis des facteurs altérant la capside. Il est possible que cette région soit située sur la base du penton puisque cette protéine est d'une part liée de façon non covalente à la fibre et d'autre part impliquée dans l'interaction avec les intégrines cellulaires. Mais d'autres protéines, notamment la protéine VI, jouent aussi un rôle important dans l'infectiosité des HAdV.

L'approche proposée dans ce projet a plus de chance de succès avec des suspensions de laboratoire que pour des échantillons environnementaux. Toutefois, même à l'échelle du laboratoire cette approche devrait apporter des informations importantes sur les mécanismes d'inactivation des HAdV. La réplication d'HAdV en laboratoire est relativement aisée mais conduit à de faibles pourcentages en virus infectieux, de l'ordre de 1 à 10 %. Ce constat est le même pour d'autres virus ou bactériophages (Brié *et al.*, 2016, 2017). Le génome détecté n'est pas du génome libre pour sa plus grande partie puisqu'il n'est pas ou très peu dégradé par l'application de DNase ou de RNase. La caractérisation des populations d'HAdV infectieux et non infectieux obtenus immédiatement après réplication sur cellules pourrait être utilisée pour identifier les points faibles de la particule virale.

Afin de débuter ce travail de caractérisation de l'interaction virus-récepteur cellulaire un projet avait été déposé en collaboration avec Pascal Reboul (IMoPA, UMR 7365 CNRS / Université de Lorraine) et Sofiane El-Kirat-Chatel (LCPME, équipe CSI) dans le cadre de l'appel à projet interdisciplinarité de l'Université de Lorraine en avril 2019. Ce projet a été classé second par le pôle de recherche CPM (Chimie Physique Moléculaire) sur cinq projets déposés.

3.2- Rôle du biofilm dans la persistance des adénovirus dans les réseaux de distribution d'eau

Les travaux du contrat Biofilm VIII réalisés avec des bactériophages ARN F-spécifiques suggéraient un effet protecteur du biofilm pour les virus vis-à-vis d'un agent oxydant tel que l'hypochlorite de sodium. La comparaison des données disponibles pour les virus entériques réalisée par Sandra Pelleïeux dans son étude bibliographique a montré que les HAdV sont parmi les virus entériques les plus sensibles à l'hypochlorite de sodium (Pelleïeux, 2013). Malgré leur sensibilité à l'hypochlorite de sodium, le génome des HAdV était le plus fréquent des génomes de virus entériques détectés dans les eaux de distribution avec une prévalence de 30 % (n=49) lors d'une étude réalisée récemment en France. Les analyses complémentaires par marquage au PMA ont montré qu'il s'agissait de génome libre ou de particules dont la capside était fortement altérée (Prevost *et al.*, 2016). De façon identique à ce que nous avions observé pour les phages, nos premiers résultats montrent que l'inactivation et la dégradation du génome par le chlore sont plus rapides pour les HAdV en suspension dans l'eau que pour ceux accumulés dans le biofilm.

Mon objectif est ici d'étudier de façon plus approfondie le rôle du biofilm dans la persistance des HAdV dans les réseaux de distribution d'eau et les mécanismes qui contribuent à l'effet protecteur du biofilm. Le chlore réagit avec les couches superficielles du biofilm, son action sur les couches plus profondes du biofilm est limitée (Bridier *et al.*, 2011). Le rôle protecteur du biofilm peut également être dû à sa réaction avec le chlore qui diminue sa concentration disponible pour réagir avec les virus associés au biofilm. Les travaux de Page et collaborateurs (2010) ont montré que l'hypochlorite de sodium agit sur les protéines des HAdV nécessaires à l'endocytose et à la libération des pentons. On peut envisager que certains composés du biofilm possèdent un effet protecteur pour les virus en raison de leur affinité pour les protéines de la capside et de leur résistance au chlore. Des marquages spécifiques du biofilm couplés à des analyses AFM contribueraient à l'identification des composés du biofilm (protéines, polysaccharides) les plus résistants à l'action du chlore. L'étude des étapes précoces du cycle infectieux des HAdV permettrait ensuite d'étudier la capacité de ces composés à les protéger vis-à-vis de cet oxydant.

3.3- Impact des méthodes de concentration des particules virales sur l'infectiosité des adénovirus

La concentration des particules virale est une étape incontournable en virologie environnementale, plusieurs méthodes de concentration (primaires et secondaires) sont généralement associées (Rames *et al.*, 2016). En effet, les concentrations en virus entériques dans l'environnement hydrique sont généralement inférieures aux limites de détection des méthodes analytiques, mais ces concentrations peuvent tout de même conduire à des contaminations du fait des faibles doses infectieuses des virus entériques. A l'heure actuelle, les méthodes de concentration sont évaluées et optimisées sur leur capacité à concentrer les particules virales sans tenir compte de leur impact sur l'infectiosité.

Les méthodes de concentration basées sur la charge électrostatique des particules virales telles que l'adsorption-élution ou la floculation organique utilisent de larges gammes de pH pouvant conduire à l'inactivation des virus (Feng *et al.*, 2003; Rames *et al.*, 2016). Les méthodes de concentration utilisant la taille des particules, telles que l'ultrafiltration, conduiraient à un piégeage des virus (McMinn, 2013), les fibres des HAdV pourraient alors constituer un point de fragilité pour ces virus. De même, l'ultracentrifugation pourrait endommager les fibres des HAdV. L'impact négatif des méthodes de concentration sur l'infectiosité des virus a été suggéré par quelques publications (Rames *et al.*, 2016) mais n'a pas fait l'objet d'études approfondies afin de l'évaluer et de le caractériser.

Mon objectif est ici d'étudier l'inactivation des HAdV au cours des étapes de concentration afin d'étudier les mécanismes impliqués, notamment ceux induisant des dommages de la capside et bloquant les étapes précoces du cycle infectieux. Une évaluation des méthodes de concentration des HAdV à partir d'eau de surface et d'eau de ressource a été proposée dans le projet PADIWA. La comparaison de différentes méthodes de concentration permettra d'étudier les conditions expérimentales et les mécanismes impliqués dans l'inactivation des HAdV. L'objectif final est de définir les méthodes les moins préjudiciables pour la détection des HAdV dans le milieu hydrique. Associées à la détection des HAdV infectieux, ces méthodes de concentration permettraient de faire progresser de façon notable l'évaluation du risque viral dans le milieu hydrique.

Activités d'encadrement de la recherche

1- Co-encadrement doctoral

▪ **Sandra Pelleïeux**

Directeur de thèse : Pr. Christophe Gantzer : 01/09/2009 - 18/06/2013 (3 ans, 9 mois)

Titre : « Interaction de bactériophages avec des surfaces colonisées par des biofilms d'eau potable et évaluation de protocoles de nettoyage », soutenue le 18 juin 2013.

Financements : CHRU de Nancy (Sandra Pelleïeux était interne en Pharmacie Spécialisée) et Contrat Biofilm VIII (2009-2012).

Les travaux de doctorat de Sandra Pelleïeux ont porté sur l'étude de l'adhésion de trois bactériophages ARN F-spécifiques (MS2, GA et Qβ) modèles des modèles des virus entériques pathogènes à des biofilms d'eau potable. Les conséquences de fortes concentrations en acide hypochloreux et d'augmentation des contraintes hydrodynamiques pour le biofilm et les phages associés ont également été étudiées.

Ce travail a donné lieu à 3 publications internationales (ACL-8, 11 et 13), 2 communications orales internationales (COM-int-6 et 7), 2 communications orales nationales (COM-nat-2 et 3) et 2 communications par affiche (AFF-int-5 et AFF-nat-2).

Sandra a pris des fonctions d'Assistant Hospitalo-Universitaire (Université de Lorraine, CHU de Nancy) à la suite de son internat. Elle a effectué une mobilité post-doctorale de 24 mois au Douglas Mental Health University Institute, Université McGill (Canada). Elle occupe actuellement un poste en pharmacovigilance.

▪ **Adrien Brié**

Directeur de thèse : Pr. Christophe Gantzer : 01/09/2013 - 25/01/2017 (3 ans, 5 mois)

Titre : « Etude des propriétés de surface du bactériophage MS2 et du norovirus murin au cours de différents traitements d'inactivation », thèse soutenue le 25 janvier 2017.

Financements : Thèse CIFRE ACTIA Normandie dans le cadre de l'Unité Mixte Technologique ViroControl entre ACTALIA et le LCPME, Projet CapsiVir.

Les travaux d'Adrien Brié ont porté sur l'étude des propriétés de surface de deux virus modèles des principaux virus entériques pathogènes, le bactériophage MS2 et le norovirus murin, après exposition à différents inactivants : chaleur, hypochlorite de sodium et ozone.

Ce travail a donné lieu à 4 publications internationales (ACL-14, 15, 16 et 18), 2 communications orales internationales (COM-int-9 et 10) et 1 communication internationale par affiche (AFF-int-9).

Adrien occupe depuis mars 2018 un poste d'ingénieur en bio-informatique.

▪ **Maryse Iris Sedji**

Directeur de thèse : Dr Laurence MATHIEU : 01/10/2016-en cours

Titre : « Mécanismes d'adhésion, d'inactivation et persistance d'adénovirus dans des biofilms d'eau potable »

Financements : Bourse doctorale de l'Ecole Doctorale BioSE, soutien financier de l'EPHE (Ecole Pratique des Hautes Etudes) et de la Zone Atelier Moselle (ZAM).

Les travaux de Maryse Iris Sedji ont d'ores-et-déjà contribué à 1 publication internationale (ACL-19), 2 communications orales nationales (COM-nat 5 et 7), 3 communications par affiche (AFF-int-11, AFF-int-14, AFF-nat-8).

2- Encadrement de stages de Master 2

J'ai encadré ou co-encadré sept étudiants dans le cadre de stages de Master 2 en microbiologie depuis 2009.

▪ Nicolas Steyer, 2011
Titre : « Bactériophages et biofilms d'eau potable : influence de la modification des contraintes hydrodynamiques et de la chloration »

▪ Camille Bach, 2013
Titre : « Purification du bactériophage MS2 et discrimination des phages infectieux et non infectieux par leurs propriétés de surface »

▪ Marius Colin, 2014
Titre : « Etude des étapes précoces du cycle viral des adénovirus par cytométrie en flux, biologie moléculaire et microscopie »
Co-encadrement avec Mihayl Varbanov, SRSMC Université de Lorraine dans le cadre d'un financement de l'axe M3V de l'Institut Jean Barriol. Les travaux de Marius Colin ont contribué à une communication internationale (COM-int-8).

▪ Marie Meo, 2015
Titre : « Quantification d'adénovirus infectieux par la détection de marqueurs viraux dans les cellules infectées »
Co-encadrement avec Mihayl Varbanov, SRSMC, Université de Lorraine dans le cadre d'un financement de l'axe M3V de l'Institut Jean Barriol.
Les travaux de Marius Colin et Marie Meo ont contribué à 2 communications affichées (AFF-int-11 et AFF-nat-8) et à une publication (ACL-19).

▪ Ravo Razafimahefa, 2015
Titre : « Etude des propriétés de surface de norovirus murins exposés à des traitements inactivants »
Co-encadrement avec Nicolas Boudaud, ACTIA Normandie Saint-Lô, dans le cadre de l'UMT ViroControl.
Les travaux de Ravo Razafimahefa ont contribué à une communication internationale (COM-int-10) et à une publication (ACL-15).

▪ Maryse Iris Sedji, 2016
Titre : « Occurrence des adénovirus infectieux dans des eaux de surface »
Co-encadrement avec Laurence Mathieu (EPHE, LCPME).
Les travaux de Maryse Iris Sedji ont contribué à deux communications affichées (AFF-int-11 et AFF-nat-8) et à une publication (ACL-19).

▪ Zineb Fechtali Moute, 2018
Titre : « Adhésion du phage PR772 sur matériaux nus ou colonisés par un biofilm d'eau potable »
Co-encadrement avec Laurence Mathieu (EPHE, LCPME)

3- Encadrement d'autres stages

3.1- Stages de licence professionnelle

▪ Florence Habran, 2007 (3 mois)
Titre : « Développement d'un protocole d'extraction des protéines solubles des kystes et trophozoïtes de *Giardia lamblia* »
Co-encadrement dans le cadre de mon post-doctorat au CRP-GL, Belvaux, Luxembourg.
▪ Elodie Lacroix, 2013 (5 mois)
Titre : « Evaluation d'une méthode de détection des adénovirus par ICC-PCR »
Co-encadrement avec Benoît Gassilloud (Laboratoire d'Hydrologie de Nancy [LHN] Anses) dans le cadre d'un financement par la Zone Atelier Moselle (ZAM).

3.2- Stage Erasmus (RCSI)

▪ Muireann Windsor McGlynn, 2015 (2 mois)
Etudiante en 4ème année d'études de pharmacie au Royal College of Surgeons in Ireland.
Titre : « Development of reporter fluorescent viral particles and their application in viral detection and anti-viral molecules screening »

3.3- Stages de Master 1

J'ai encadré sept étudiants en stages de Master 1 de deux mois depuis 2009.
▪ Nicolas Steyer, 2010
Titre : « Etude de l'adhésion de bactériophages sur des supports colonisés par des biofilms »
▪ Carole Hild, 2011
Titre : « Etude de l'adhésion des bactériophages ARN F-spécifiques MS2, Qβ et GA sur des coupons de PEHD colonisés par des biofilms d'eau potable »
▪ Yann Aubert, 2012
Titre : « Evaluation de la PMA-qPCR pour la détection des bactériophages ARN F-spécifiques infectieux »

▪ Marie Meo, 2014
Titre : « Etude de l'adhésion du bactériophage MS2 à sa bactérie hôte *Escherichia coli* »
Les travaux de Marie Meo ont contribué à une publication internationale (ACL-14).
▪ Emilie Dauvergne, 2017
Titre : « Caractérisation du phage PR772 proposé comme modèle des adénovirus dans le milieu hydrique »
▪ Issa Sy, 2017
Titre : « Prévalence du virus de l'hépatite E (VHE) dans des eaux usées urbaines et d'abattoir en Lorraine »
▪ Florent Fioriti, 2018
Titre : « Optimisation de la détection environnementale des adénovirus humains »

3.4- Stages d'initiation à la recherche (2 mois)

Ces stages de deux mois sont réalisés par des étudiants en pharmacie. J'ai co-encadré deux stages SIR au cours de mon doctorat et encadré quatre stages SIR depuis 2009.

▪ Elisabete Gomes, 2002.
Titre : « Etude comparative de la présence de *Giardia* dans divers échantillons d'eaux usées »
▪ Laetitia Albertini, 2004.
Titre : « Génotypage des kystes de *Giardia* isolés de selles humaines »
Les travaux de Laetitia Albertini ont contribué à une publication internationale (ACL-3).
▪ Chloé Le Cossec, 2009.
Titre : « Adhésion des bactériophages ARN F-spécifiques MS2, Qβ et GA à l'inox 316L en conditions dynamiques »
▪ Sandra Pierrot, 2010.
Titre : « Influence de l'hydrodynamique et de la présence d'un biofilm sur l'adhésion de bactériophages ARN F-spécifiques »
▪ Emilie Weistroffer, 2012.
Titre : « Evaluation de la PMA-qPCR pour la détection des bactériophages ARN F-spécifiques infectieux »
▪ Rémi Besançon, 2014.
Titre : « Evaluation de l'infectiosité et de l'adhésion aux cellules hôtes du phage MS2 après exposition à l'hypochlorite de sodium »

Responsabilités scientifiques et administratives

1- Rédaction et coordination de projets scientifiques

1.1- Projets financés

VH2E - Prévalence environnementale du virus de l'hépatite E : développement de méthodes de détection et de caractérisation moléculaire de souches environnementales et humaines.
Projet PEPS Mirabelle (Université de Lorraine et CNRS). 2016 (12 mois). Financement obtenu : 25 k€.
Cette étude, dont j'étais la coordinatrice, a été réalisé en collaboration avec le Pr Evelyne Schvoerer (PU-PH) et le Dr Hélène JEULIN (MCU-PH) de l'EA 7300 SIMPA (Stress IMmunité Pathogènes, Université de Lorraine).
Cette étude visait à détecter et séquencer des souches humaines, animales et environnementales du virus de l'hépatite E afin de mieux comprendre les voies de contamination humaine de ce virus émergent.
Nos résultats ont été valorisés par une communication internationale (COM-int-12) et une publication (ACL-17).

CapsiVir - Développement méthodologique pour la détection des virus infectieux et une meilleure qualification de l'efficacité virucide des traitements technologiques.
Programme financé par le Conseil Régional de Basse-Normandie et labellisé par le Pôle de compétitivité Valorial. 2013-2015 (24 mois). Financement obtenu : 99 k€.
Ce contrat associait le LCPME et ACTALIA dans le cadre de l'Unité Mixte Technologique (UMT) VIRO[Control] (2011-2016). J'ai coordonné cette étude avec le Dr. Nicolas Boudaud (ACTALIA). Cette étude visait à étudier l'évolution des propriétés de surface de particules virales (bactériophage MS2 et norovirus murin) aux cours de leur inactivation par différents procédés.
Ce travail a été valorisé par trois communications internationales orales et affichées (COM-int-9, COM-int-10 et AFF-int-9) et quatre publications (ACL-14, 15, 16 et 18).

Etude des étapes précoces du cycle viral des adénovirus (2014)
Quantification d'adénovirus infectieux par la détection de marqueurs viraux dans les cellules infectées (2015)
Projets courts (6 mois) financés par l'axe M3V (Microorganismes, Macromolécules et Molécules pour le vivant) de l'Institut Jean Barriol (structure fédérative regroupant quatre UMR et une EA de l'Université de Lorraine). Financement obtenu : 3 et 4 k€.
Ces deux études se sont intéressées aux premières étapes du cycle infectieux des adénovirus infectieux par des approches immunologiques et de biologie moléculaire. J'ai réalisé ces deux projets en collaboration avec Mihayl Varbanov (MCF, SRSMC actuel L2CM, UMR 7053 CNRS / Université de Lorraine). Nous avons co-encadré deux stagiaires de Master 2 en microbiologie dans le cadre de ces études (Marius Colin et Marie Meo).
Les résultats de ces deux projets ont été présentés dans deux communications affichées (AFF-int-11 et AFF-nat-8), une communication internationale (COM-int-8) et une publication (ACL-19).

1.2- Projet en cours d'évaluation

PADIWA - Improving the evaluation of the viral risk in surface and drinking water
ANR - Appel à projets générique (AAPG) 2019. Projet de Recherche Collaborative – Internationale (PRCI) France – Luxembourg. Budget total : 856 k€ (France : 431 k€ et Luxembourg : 425 k€) (48 mois).
Ce projet vise à améliorer l'évaluation du risque viral dans le milieu hydrique en ciblant les HAdV. Le projet s'intéressera à la détection des particules infectieuses par des approches innovantes et à l'impact des méthodes de concentration sur l'infectiosité des particules avant d'étudier les mécanismes d'inactivation des principaux procédés virucides applicables à l'eau et de réaliser une campagne d'analyses dont les résultats feront l'objet d'une étude quantitative du risque viral.
Ce projet serait coordonné par L. Ogorzaly (LIST [Luxembourg Institute of Science and Technology], Luxembourg) et moi-même. Les autres partenaires du projet sont S. Wurtzer (Eau de Paris) et P. Reboul (IMoPA, UMR 7365 CNRS / Université de Lorraine). Le projet PADIWA complet a été déposé en mars 2019, il est en cours d'évaluation.

1.3- Projet non financé

CAR - Capture des Adénovirus infectieux par interaction avec la protéine du Récepteur cellulaire
Appel à projets interdisciplinarité de l'Université de Lorraine 2019 (projets exploratoires entre chercheurs de différents pôles scientifiques n'ayant jamais publié ensemble). Budget : 15 k€ (12 mois).
J'ai déposé un projet sur la capture des HAdV par interaction avec le récepteur cellulaire et l'étude de l'interaction virus-récepteur avec Pascal Reboul (Pr, IMoPA, UMR 7365 CNRS / Université de Lorraine) et Sofiane El-Kirat-Chatel (CR, LCPME, équipe CSI). En tant que coordinatrice du projet, je l'ai présenté le 9 mai 2019 au conseil du pôle scientifique CPM (Chimie Physique Moléculaire) auquel appartient le LCPME. Ce projet a été classé 2ème/5. Ce projet n'a pas été retenu par le conseil scientifique de l'Université de Lorraine.

BIOF-O-VIR – Importance des biofilms en cas de contamination virale d'un réseau de distribution
Appel à projets anses (PNR-EST : Projet National de Recherche en Environnement-Santé-Travail) 2017. Budget demandé : 77 k€ (24 mois).
Ce projet avait pour objectif d'étudier l'accumulation et la survie des adénovirus sur des surfaces colonisées par des biofilms, puis les effets de la chloration sur le biofilm et les virus associés. J'étais porteur de ce projet Ce projet impliquait également Laurence Mathieu (MCF-HDR, EPHE, LCPME, équipe MIC) pour les expérimentations de microbiologie d'une part, Martine Mallet (MCF-HDR) et Sofiane El-Kirat-Chatel (CR) de l'équipe CSI du LCPME pour la caractérisation physico-chimique du biofilm d'autre part. Ce projet a passé l'étape de sélection de la lettre d'intention, mais n'a pas été retenu sur le projet complet.

2- Participation à des projets scientifiques

2.1- Groupe de travail européen

COST 929 (Environmental and Food Virology), groupe de travail européen "Viral Inactivation". 2006-2010. Coordination : Pr. Christophe Gantzer.
J'ai participé à ce groupe de travail à partir de 2009. Suite à la sélection des données d'inactivation virale collectées, une analyse statistique et une modélisation de l'ensemble des données a été réalisée en collaboration avec le Pr. Jack Schijven du RIVM (National Institute for Public Health and the Environment in the Netherlands, Bilthoven, Pays-Bas). Ce travail a fait l'objet d'une communication internationale (COM-int-5) et d'une publication (R-1).

2.2- Contrat européen

VIROBATHE – Methods for the detection of Adenoviruses and Noroviruses in European Bathing Waters with reference to the revision of the Bathing Water Directive 76/160/EEC.
16 laboratoires européens, coordination : Pr. David Kay et Dr Peter Wyn-Jones, Université du Pays de Galles. 2005-2007. Responsable LCPME : Pr. Christophe Gantzer.
Le programme Virobathe visait à proposer une méthode pour la détection des adénovirus et des norovirus dans les eaux de baignade en vue d'une révision de la directive européenne. Les expérimentations réalisées en parallèle sur les bactériophages ARN F-spécifiques ont fait l'objet d'une publication (ACL-5).

2.3- Contrats nationaux

PATHOS
Fond National de la Recherche, Luxembourg. 2009-2012.
Coordination : Dr. Henry-Michel Cauchie, Centre de Recherche Gabriel Lippmann, Belvaux, Luxembourg. Partenaire : LCPME (Pr. Christophe Gantzer).
Dans le cadre de ce contrat, nous avons développé une nouvelle méthode de détection des adénovirus infectieux dans le milieu hydrique en associant la culture cellulaire et la PCR quantitative (ICC-qPCR). Ce travail a été valorisé par une communication affichée (AFF-int-7) et une publication (ACL-9).

SECAL "KAWA - Knowledge and Know-How Acquisition for an Efficient Risk Assessment of Waterborne Pathogens in the Drinking Water of Luxembourg"
Fond National de la Recherche, Luxemburg (FNR/03/07/07). 2005-2008.
Coordination : Dr. Henry-Michel Cauchie, Centre de Recherche Gabriel Lippmann, Belvaux, Luxembourg.
Ce programme visait à acquérir de nouvelles connaissances dans le domaine de la gestion du risque associé aux pathogènes non bactériens dans les eaux destinées à la consommation humaine. Mon projet de post-doctorat portait sur la quantification des ARNm pour l'estimation de la viabilité des kystes de *Giardia*. Ce travail a fait l'objet d'une publication (ACL-6).

Projet non financé

AEREAUBAT - Caractérisation de la formation de bioaérosols pathogènes en lien avec les pratiques de réutilisation des eaux usées traitées : une approche intégrée du traitement à l'usage.

Appel à projets anses (PNR-EST : Projet National de Recherche en Environnement-Santé-Travail) 2013.

En 2013, j'ai participé à la rédaction de ce projet de 30 mois porté par Laurence Mathieu sur la caractérisation de la formation de bioaérosols pathogènes en lien avec les pratiques de réutilisation des eaux usées traitées. Le projet a passé l'étape de sélection de la lettre d'intention, mais n'a pas été retenu sur le projet complet.

2.4- Contrats industriels

Biofilm VIII.

Financement : Agence de l'Eau Seine Normandie, Syndicat des Eaux d'Ile de France (SEDIF) et VERI (Veolia). 2009-2012. Coordinateur : Pr. Jean-Claude Block.

Le contrat Biofilm VIII portait sur l'étude des interactions virus-biofilm d'eau potable et sur le développement de nouvelles stratégies de nettoyage des réseaux d'eau potable pour l'élimination des contaminants biologiques (virus et biofilms). Au cours de ce contrat, j'ai participé à deux communications orales (COM-int- 6 et 7), deux communication affichées (AFF-int-5 et AFF-nat-2) et quatre publications (ACL-8, 10, 11 et 13).

Contrat industriel avec le groupe Danone : Estimation de la pollution virale d'eaux souterraines. 2009-2010. Responsable scientifique LCPME : Pr. Christophe Gantzer.

Ce contrat de recherche visait à étudier l'origine de la contamination fécale d'eaux souterraines d'un point de vue bactériologique et virologique. Une partie de ce contrat a été réalisé en collaboration avec l'Institute of Chemical Engineering, Gene Technology and Applied Biochemistry, University of Technology, Vienne, Autriche (Responsable scientifique : Dr. Andreas Farnleitner). Ce travail a abouti à une publication internationale (ACL-7).

3- Responsable du plateau technique de biologie moléculaire environnementale

Depuis janvier 2018, je suis responsable de la virologie pour le plateau technique de biologie moléculaire environnementale (BME) du LCPME. Xavier Bellanger (MCF, LCPME) est responsable de la bactériologie. Ce plateau technique a notamment pour vocation la réalisation d'analyses de virologie dans l'eau et les aliments avec des méthodes existantes et surtout avec des méthodes alternatives.

Nous avons actuellement un projet en cours avec un industriel de l'agro-alimentaire sur la détection des phages ARN F-spécifiques infectieux dans des matrices alimentaires. Ce projet est réalisé dans le cadre de l'UMT VIRO[Control].

Le projet NoroStan (42 mois : 01/01/2010 - 30/06/2013) sur la mise au point d'une méthode d'estimation du risque à norovirus humains dans les salades déposé dans le cadre de l'UMT

VIRO[Control] a été retenu pour financement CASDAR 2019 (Ministère de l'agriculture et de l'alimentation). Les expérimentations relevant du LCPME seront entièrement réalisées par le plateau-technique BME pour un budget de 110 k€.

Un second projet (ISM : Innovation Suivi contamination Microbiologique) de 18 mois sur la comparaison d'espèces sentinelles (huîtres, moules) et d'échantillonneurs passifs en tant que systèmes de surveillance et d'alerte de la présence de norovirus dans les eaux de rivière et les eaux littorales a été déposé en avril 2019. Il a été déposé dans le cadre de l'appel à projets du Centre Normand de la pêche, de l'aquaculture et des cultures marines (CENOPAC). Le budget demandé pour le LCPME (plateau technique BME) est de 30 k€. ce projet est en cours d'évaluation.

4- Participation à des jurys de thèse d'Université

▪ Jean-Baptiste Burnet
Titre : Dynamique spatio-temporelle de *Cryptosporidium* et de *Giardia* dans un réservoir d'eau potable et son bassin versant : cas des lacs de barrage de la Haute-Sûre (Grand-Duché du Luxembourg).
Thèse soutenue à l'Université de Liège (Belgique) le 16 octobre 2012.

▪ Adeline Tissier
Titre : Evaluation de l'état de viabilité et d'infectiosité des trois microorganismes pathogènes pour l'Homme (bactérie : *Campylobacter*, virus : *Adenovirus* et parasite : *Cryptosporidium*) détectés dans des échantillons d'eaux destinés à des fins alimentaires.
Thèse soutenue à l'Université de Lorraine le 11 avril 2012.

5- Responsabilités collectives dans le domaine de la recherche

• J'ai été nommée membre du Conseil de Laboratoire du LCPME en février 2013 puis élue en février 2018.
• En 2009 et 2010, j'ai participé à l'organisation de deux séminaires se tenant à Nancy pour deux groupes de travail du programme COST 929 (Environmental and Food Virology).

Rayonnement scientifique

1- Conférence invitée

"Concentration methods of enteric viruses in water"
3rd International Congress, Microbial Biotechnology for development "MICROBIOD 3" Mohammedia (Maroc), 24-26 octobre 2016 (COM-int-11).

2- Membre de comités de lecture pour des revues de microbiologie

J'évalue régulièrement des articles édités dans les revues suivantes : Food and Environmental Virology, Journal of Applied Microbiology, Environmental Science and Pollution Research, Food Microbiology, Journal of Microbiological Methods, PLoS One et Water Research.

3- Membre d'un comité de sélection pour le recrutement d'un maître de conférences des universités

En mai 2017, j'ai participé au comité de sélection pour le recrutement d'un maître de conférences en microbiologie à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg et à l'UMR 7213 CNRS Université Louis Pasteur (Poste 0120/4420) en section CNU 87.

4- Membre du bureau d'une association

Depuis septembre 2015, je suis membre du bureau de l'AEMIP (Association des Enseignants en Microbiologie et Immunologie des Facultés de Pharmacie).

Activités de valorisation et de transfert

Le plateau technique BME a pour mission la réalisation d'analyses en virologie environnementale et alimentaire. Mais nous assurons également le transfert de méthodologies innovantes vers les industriels de ce secteur. Dans le cadre de l'UMT VIRO[Control], nous transférons une partie de nos compétences vers ACTALIA afin d'assurer une plus large utilisation de méthodes permettant d'améliorer la qualification du risque virologique dans l'eau et les aliments. Il s'agit également de sensibiliser les industriels de l'agro-alimentaires aux limites de l'interprétation de données obtenues uniquement par des méthodes moléculaires concernant le risque pour la santé des consommateurs.

Production scientifique

Mes travaux de recherche ont été valorisés par 22 publications et 49 communications dans des congrès et séminaires. L'ensemble de ces indicateurs est résumé dans le tableau ci-dessous et le détail de ces données est apporté dans les paragraphes qui suivent.

Production	**Quantité**	**Commentaires**
Facteur h (mai 2019) : 10 Statistiques sur 21 publications (Web of Science) : 431 citations (404 citations externes) par 382 articles (367 articles externes) Moyenne : 20,5 citations par publication		
Publications avec comité de lecture : 22		
Articles scientifiques	19	1er auteur : 4 ; 2ème auteur : 5 ; dernier auteur : 4
Articles de revue	3	1er auteur : 1 ; 2ème auteur : 1
Communications dans les congrès internationaux : 26		
Présentations orales	12	5 en qualité d'orateur dont 1 communication invitée
Affiches	14	6 en qualité de présentateur
Communications dans les congrès nationaux : 19		
Présentations orales	9	2 en qualité d'orateur
Affiches	10	1 en qualité de présentateur
Communications dans les séminaires nationaux : 6		
Présentations orales	6	5 en qualité d'orateur

1- Publications avec comité de lecture

IF : Facteurs d'Impact pour l'année 2018.

1.1- Articles scientifiques avec comité de lecture

ACL-1 : Maux M, **Bertrand I**, Gantzer C, Schwartzbrod J, **2002**. Estimating *Giardia* cyst viability using RT-PCR. Water Science and Technology: Water Supply, 2(3): 107-115. (IF : 0,674).

ACL-2 : **Bertrand I**, Gantzer C, Chesnot T, Schwartzbrod J, **2004**. Improved specificity for *Giardia lamblia* cyst quantification in wastewater by development of a real-time PCR method. Journal of Microbiological Methods, 57: 41-53. doi: 10.1016/j.mimet.2003.11.016. (IF : 1,803).

ACL-3 : **Bertrand I**, Albertini L, Schwartzbrod J, **2005**. Comparison of two target genes for detection and genotyping of *Giardia lamblia* in human feces by PCR and PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism. Journal of Clinical Microbiology, 43(12): 5940-5944. doi: 10.1128/JCM.43.12.5940-5944.2005. (IF : 4,959).

ACL-4 : **Bertrand I**, Schwartzbrod J, **2007**. Detection and genotyping of *Giardia duodenalis* in wastewater: relation between assemblages and faecal contamination origin. Water Research, 41: 3675-3682. doi: 10.1016/j.watres.2007.02.043. (IF : 7,913).

ACL-5 : Ogorzaly L, Tissier A, **Bertrand I,** Maul A, Gantzer C, **2009**. Relationship between F-specific RNA phage genogroups, faecal pollution indicators and human adenoviruses in river water. Water Research, 43(5): 1257-1264. doi: 10.1016/j.watres.2008.12.011. (IF : 7,913).

ACL-6 : **Bertrand I**, Maux M, Helmi K, Hoffmann L, Schwartzbrod J, Cauchie HM, **2009**. Quantification of *Giardia* transcripts during *in vitro* excystation: Interest for the estimation of cyst viability. Water Research, 43: 2728-2738. doi: 10.1016/j.watres.2009.03.028. (IF : 7,913).

ACL-7 : Ogorzaly L, **Bertrand I,** Paris M, Maul A, Gantzer C, **2010**. Survival, persistence and occurrence of human adenoviruses and F-specific RNA phages in raw groundwater. Applied and Environmental Microbiology, 76(24): 8019-25. doi : 10;1128/AEM.00917-10. (IF : 4,077).

ACL-8 : Pelleïeux S, **Bertrand I**, Skali-Lami S, Mathieu L, Francius G, Gantzer C, **2012**. Accumulation of MS2, GA, and Qβ phages on high density polyethylene (HDPE) and drinking water biofilms under flow:non-flow conditions. Water Research, 46(19): 6574-84. doi : 10.1016/j.watres.2012.07.041. (IF : 7,913).

ACL-9 : Ogorzaly L, Cauchie HM, Penny C, Perrin A, Gantzer C, **Bertrand I**, **2013**. Two-day detection of infectious enteric and non-enteric adenoviruses by improved ICC-qPCR. Applied Microbiology and Biotechnology, 97(9): 4159-66. doi : 10.1007/s00253-013-4782-4. (IF : 3,670).

ACL-10 : Mathieu L, **Bertrand I**, Abe Y, Angel E, Block JC, Skali-Lami S, Francius G, **2014**. Drinking water biofilm cohesiveness changes under chlorination or hydrodynamic stress. Water Research 55: 175-84. doi : 10.1016/j.watres.2014.01.054. (IF : 7,913).

ACL-11 : Hébrant M, Pelleïeux S, Mathieu L, Skali-Lami S, Gantzer C, **Bertrand I**, Block JC, **2014**. Distinct adsorption kinetics of Qβ and GA bacteriophages on drinking water biofilms. Adsorption 20(5-6): 823-828. doi : 10.1007/s10450-014-9624-x. (IF : 1,731).

ACL-12 : Perrin A, Loutreul J, Boudaud N, **Bertrand I**, Gantzer C, **2015**. Rapid, simple and efficient method for detection of viral genomes on raspberries. Journal of Virological Methods 224: 95-101. doi : 10.1016/j.jviromet.2015.08.005. (IF : 1,746).

ACL-13 : Pelleieux S, Mathieu L, Block JC, Gantzer C, **Bertrand I**, **2016**. The effect of chlorination and hydrodynamic shear stress on the persistence of bacteriophages associated with drinking water biofilms. Journal of Applied Microbiology 121: 1189-1197. doi : 10.1111/jam.13243. (IF : 2,683).

ACL-14 : Brié A, **Bertrand I**, Meo M, Boudaud N, Gantzer C, **2016**. The effect of heat on the physicochemical properties of bacteriophage MS2. Food and Environmental Virology 8(4):251-261. doi : 10.1007/s12560-016-9248-2. (IF : 3,055).

ACL-15 : Brié A, Razafimahefa R, Loutreul J, Robert A, Gantzer C, Boudaud N, **Bertrand I**, **2017**. The effect of heat and free chlorine treatment on the surface properties of murine norovirus. Food and Environmental Virology. 9(2):149-158. doi : 10.1007/s12560-016-9271-3. (IF : 3,055).

ACL-16 : Brié A, Boudaud N, Mssihid A, Loutreul J, **Bertrand I**, Gantzer C, **2018**. Inactivation of murine norovirus and hepatitis A virus on fresh raspberries by gaseous ozone treatment. Food Microbiology. 70:1-6. doi : 10.1016/j.fm.2017.08.010. (IF : 4,089).

ACL-17 : Fenaux H, Chassaing M, Berger S, Jeulin H, Gentilhomme A, Bensenane M, Bronowicki JP, Gantzer C, **Bertrand I**, Schvoerer E, **2018**. Molecular features of Hepatitis E Virus circulation in environmental and human samples. Journal of Clinical Virology. 103:63-70. doi: 10.1016/j.jcv.2018.04.003. (IF : 3,020)

ACL-18 : Brié A, Gantzer C, Boudaud N, **Bertrand I**, **2018**. The impact of chlorine and heat on the infectivity and physicochemical properties of bacteriophage MS2. FEMS Microbiology Ecology, 94(8). doi: 10.1093/femsec/fiy106. (IF : 4,098)

ACL-19 : Sedji MI, Varbanov M, Meo M, Colin M, Mathieu L, **Bertrand I**, **2018**. Quantification of human adenovirus and norovirus in river water in the north-east of France. Environmental Science and Pollution Research 25(30):30497-30507. doi: 10.1007/s11356-018-3045-4. (IF : 2,914)

1.2- Revues avec comité de lecture

R-1 : **Bertrand I.**, Schijven J.F., Sánchez G., Wyn-Jones P., Ottoson J., Morin T., Muscillo M., Verani M., Nasser A., de Roda Husman A.M., Myrmel M., Sellwood J., Cook N., Gantzer C., **2012**. The impact of temperature on the inactivation of enteric viruses in food and water: a review. Journal of Applied Microbiology, 112(6): 1059-74. doi : 10.1111/j.1365-2672.2012.05267.x. (IF : 2,683)

R-2 : Cook N, **Bertrand I**, Gantzer C, Pinto RM, Bosch A, **2018**. Persistence of Hepatitis A Virus in Fresh Produce and Production Environments, and the Effect of Disinfection Procedures: A Review. Food and Environmental Virology, 10(3): 253-262. doi: 10.1007/s12560-018-9349-1. (IF : 3,055)

R-3 : Fenaux H, Chassaing M, Berger S, Gantzer C, **Bertrand I**, Schvoerer E, **2019**. Transmission of hepatitis E virus by water: An issue still pending in industrialized countries. Water Research, 151:144-157. doi: 10.1016/j.watres.2018.12.014. (IF : 7,913)

2- Communications dans des congrès

2.1- Communications orales dans des congrès internationaux

COM-int-1 : Maux M., **Bertrand I.,** Gantzer C., Schwartzbrod, J. "Estimating *Giardia* cyst viability using RT-PCR" 2^{d} IWA World Water Congress, *Water and Health-Microbiology*, Berlin (Allemagne) **2001**.

COM-int-2 : **Bertrand I.**, Schwartzbrod, J. "*Giardia* cyst enumeration in wastewater characterized by faecal contamination origin: comparison of concentration and purification methods" 4th IWA World Water Congress, *Water and Health*, Marrakech (Maroc), **2004**. Communication courte.

COM-int-3 : **Bertrand I.**, Maux M., Schwartzbrod J. "Evaluation of β-giardin mRNA as a potential indicator of *Giardia* cyst viability" SWAP – The European Symposium on Waterborne Pathogens in Surface and drinking Waters, Luxembourg, **2007**.

COM-int-4 : Ogorzaly L., Tissier A., **Bertrand I.,** Diez L., Gantzer C. "F-specific RNA phage genotyping in river water by real-time PCR" 6th IWA World Water Congress, *Water and Health*, Vienne (Autriche), **2008**.

COM-int-5 : **Bertrand I.**, J. Schijven, C. Gantzer. "A new tool to compare viral inactivation by heat and UV" Future Challenges in Food and Environmental Virology, 2nd COST 929 Symposium, Istanbul (Turquie), **2010**.

COM-int-6 : Pelleïeux S., **Bertrand I.**, Skali-Lami S., Mathieu L., Gantzer C. "Bacteriophage accumulation on, and removal from, HDPE material colonized with drinking water biofilms" 3rd Food and Environmental Virology Conference, Lisbonne (Portugal), **2012**.

COM-int-7 : Pelleïeux S., **Bertrand I.**, Skali-Lami S., Gantzer C. "Interactions of F-specific bacteriophages with drinking water biofilms: an issue to understand pathogenic viruses behaviour in water distribution systems" 15th Saar-Lor-Lux Virus Workshop, Nancy, **2012**.

COM-int-8 : Colin M., Varbanov M., **Bertrand I.** "A comparative study of methods for the detection of infectious adenoviruses at the early stages of the viral replication cycle" 17th Saar-Lor-Lux Virus Workshop, Nancy, **2014**.

COM-int-9 : Brié A., Meo M., Boudaud N., Gantzer C., **Bertrand I.** "Mechanism of inactivation of MS2 phage by heat treatment" 18th Symposium on Health-Related Water Microbiology, IWA, Lisbonne (Portugal), **2015**.

COM-int-10 : Brié A., Razafimahefa R., Boudaud N., Gantzer C., **Bertrand I.** "The effect of heat treatment on the surface properties of murine norovirus" 4th Food and Environmental Virology Conference, Kusatsu (Japon), **2016**.

COM-int-11 : **Bertrand I.** "Concentration methods of enteric viruses in water" 3rd International Congress, Microbial Biotechnology for development "MICROBIOD 3" Mohammedia (Maroc), **2016**. **Communication invitée.**

COM-int-12 : Fenaux H, Chassaing M, Berger S, Jeulin H, Bensenane M, Bronowicki J-P, Gantzer C, **Bertrand I**, Schvoerer E « Hepatitis E virus emergence in north eastern France » 20th Annual Meeting of the European Society for Clinical Virology, Stresa (Italie), **2017**.

2.2- Communications orales dans des congrès nationaux

COM-nat-1 : **Bertrand I**, Schwartzbrod J "Détection de *Giardia lamblia* par biologie moléculaire dans le milieu hydrique" Congrès Le fil de l'eau, Nancy, **2003**.

COM-nat-2 : Pelleïeux S, **Bertrand I**, Le Cossec C, Skali-Lami S, Gantzer C « Adhésion du bactériophage Qβ sur un biofilm d'eau potable » Colloque biofilms et santé, Poitiers, **2010**.

COM-nat-3 : Mathieu L, Pelleïeux S, Francius G, Skali-Lami S, **Bertrand I**, Gantzer C "Nettoyage hydrodynamique des biofilms d'eau potable" Journées Information Eaux, Poitiers, **2012**.

COM-nat-4 : Brié A, Gantzer C, Boudaud N, **Bertrand I**. "Effects of heat and chlorine on the inactivation and physico-chemical properties of bacteriophage MS2" 4ème Journée du Réseau Thématique Pluridisciplinaire Phages, **2018**, Bordeaux.

COM-nat-5 : Sedji MI, Mathieu L, Varbanov M, **Bertrand I** "Quantification de norovirus et d'adénovirus humains dans des eaux de rivière" Congrès national de la Société Française de Microbiologie, Paris, **2018**.

COM-nat-6 : Gentilhomme A, Fenaux H, Hartard C, Berger S, Jeulin H, Gantzer C, **Bertrand I**, Schvoerer E "Circulation du virus de l'hépatite E entre Homme et environnement" Congrès national de la Société Française de Microbiologie, Paris, **2018**.

COM-nat-7 : Sedji MI, Mathieu L, Hébrant M, **Bertrand I** "Propriétés de surface d'adénovirus et cinétiques d'adhésion en présence de biofilm d'eau potable" Journées Information Eaux, Poitiers, **2018**.

COM-nat-8 : Fenaux H, Gentilhomme A, Hartard C, Berger S, Jeulin H, Bronowicki J-P, Gantzer C, **Bertrand I**, Schvoerer E. "Rôle de l'eau dans la circulation du virus de l'hépatite E, génotype 3" RICAI (Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse), Paris, **2018**.

COM-nat-9 : Mallet M., Fechtali Moute Z., Mathieu L., Sedji M., **Bertrand I.**, Renard A., Francius G. Formation d'un biofilm d'eau potable sur du PEHD : analyse par spectroscopie XPS et microscopie AFM, Journées de spectroscopie d'électrons, 22-23 janvier 2019, Institut Jean Lamour, Nancy.

2.3- Communications par affiches dans des congrès internationaux

AFF-int-1 : **Bertrand I**, Schwartzbrod, J "*Giardia* cyst enumeration in wastewater characterized by faecal contamination origin: comparison of concentration and purification methods" 4th IWA World Water Congress, Water and Health, Marrakech (Maroc), **2004**.

AFF-int-2 : Ogorzaly L, **Bertrand I,** Maul A, Gantzer C "Survival, persistence and occurrence of human adenoviruses in natural groundwater" Congrès Water Research, Lisbonne (Portugal), **2010**.

AFF-int-3 : **Bertrand I**, Maux M, Helmi, K, Hoffmann, L, Schwartzbrod J, Cauchie H-M "Estimation of *Giardia* cyst viability based on mRNA quantification" 16th International Symposium on Health-Related Water Microbiology. Rotorua (Nouvelle-Zélande), **2011**.

AFF-int-4 : Ogorzaly L, Cauchie H-M, Perrin A, Gantzer C, **Bertrand I** "Rapid and simultaneous detection of infectious enteric and non-enteric adenoviruses by ICC-qPCR" 3rd Food and Environmental Virology Conference, Lisbonne (Portugal), **2012**.

AFF-int-5 : Pelleïeux S, Mathieu L, Gantzer C, **Bertrand I** "Accumulation of phages in drinking water biofilms: a way to elude chlorine? " Biofilm 5 Congress, Paris, **2012**.

AFF-int-6 : Mathieu L, **Bertrand I**, Le Guen E, Angel E, Francius G, Gantzer C, Block J.C "Drinking water biofilm growth after surface disinfection" Biofilm 5 Congress, Paris, **2012**.

AFF-int-7 : Ogorzaly L, Bonot S, **Bertrand I**, El Moualij B, Cauchie H-M "New techniques for enteric adenovirus detection in river water - from optimized culture-dependent infectious state assessment to immunocapture of intact particles - used in combination with sensitive and highly specific real-time PCR" 17th International

Symposium on Health-Related Water Microbiology, IWA, Florianopolis (Brésil), **2013**.

AFF-int-8 : Loutreul J, Mssihid A, Cazeaux C, Denis C, **Bertrand I**, Gantzer C, Boudaud N "Inactivation and removal of murine norovirus and hepatitis A virus on fresh raspberries by ozone gas treatment" Food Micro, Nantes, **2014**.

AFF-int-9 : Brié A, Boudaud N, Gantzer C, **Bertrand I** "Purification of viral particles for the study of their surfaces properties" 4th International Conference on Food and Environmental Virology, Corfou (Grèce), **2014**.

AFF-int-10 : Windsor McGlynn M, **Bertrand I**, Varbanov M "The Development of Reporter Fluorescent Viral Particles and their Application in Detection and Anti-Viral Molecules Screening" IV International Conference on Antimicrobial Research – ICAR 2016. Torremolinos-Malaga (Espagne), **2016**.

AFF-int-11 : Sedji MI, Meo M, Colin M, Mathieu L, Varbanov M, **Bertrand I** "Rapid quantification of infectious adenoviruses in river water" 5th International Conference on Food and Environmental Virology, Kusatsu (Japon), **2016**.

AFF-int-12 : Fenaux H, Eschlimann M, Jeulin H, Berger S, Bensenane M, Bronowicki J-P, Gantzer C, **Bertrand I.**, Schvoerer E. "Study of the hepatitis E virus emergence in north eastern France on environmental and human samples" 5th International Conference on Food and Environmental Virology, Kusatsu (Japon), **2016**.

AFF-int-13 : Fenaux H, Hartard C, Gentilhomme A, Banas S, Berger S, Jeulin H, Jean-Pierre Bronowicki JP, Gantzer C, **Bertrand I**, Schvoerer E. "Circulation of Hepatitis E virus genotype 3 between humans and water" 20th International Symposium on Health-Related Water Microbiology, IWA, Vienne (Autriche), **2019**.

AFF-int-14 : Sedji MI, Mathieu L, Ferji K, Gantzer C, **Bertrand I**. "Physicochemical point of view in the evaluation of PR772 bacteriophage as a surrogate for human adenovirus" 20th International Symposium on Health-Related Water Microbiology, IWA, Vienne (Autriche), **2019**.

2.4- Communications par affiches dans les congrès nationaux

AFF-nat-1 : Tissier A, Hartemann P, **Bertrand I**, Gassilloud B « Mise en évidence de la viabilité de *Cryptosporidium* par EMA-PCRq » Congrès de la Société Française de Microbiologie, Marseille, **2010**.

AFF-nat-2 : Pelleieux S, Gantzer C, **Bertrand I** « Adhésion des bactériophages MS2 et Qβ sur des surfaces en polyéthylène haute densité (PEHD) » 4ème Congrès Bioadh (Bioadhésion, Biocontamination des surfaces), Nice, **2011**.

AFF-nat-3 : **Bertrand I**, Gantzer C « Danger viral, eau et aliments : détection des virus infectieux » Ateliers Scientifiques, ICEEL Institut Carnot Energie et Environnement en Lorraine, Nancy, **2014**.

AFF-nat-4 : Colin M, **Bertrand I**, Varbanov M « Mise en évidence des adénovirus infectieux dans les stades précoces de l'infection virale : étude comparative des méthodes de détection » XVIIe Journées Francophones de Virologie, Paris, **2015**.

AFF-nat-5 : Meo M, Colin M, **Bertrand I**, Varbanov M « Détection et quantification d'adénovirus infectieux aux stades précoces de l'infection – l'ICC-qPCR face aux immunomarquages » XVIIIe Journées Francophones de Virologie, Paris, **2016**.

AFF-nat-6 : Fenaux H, Chassaing M, Blanger O, Jeulin H, Berger S, Eschlimann M, Gantzer C, **Bertrand I**, Schvoerer E « Emergence du virus de l'hépatite E chez l'homme et dans l'environnement dans le nord-est de la France » XIXe Journées Francophones de Virologie, Paris, **2017**.

AFF-nat-7 : Fenaux H., Chassaing M., Blanger O., Jeulin H., Berger S., Eschlimann M., Gantzer C., **Bertrand I.**, Schvoerer E. "Emergence du virus de l'hépatite E chez l'homme et dans l'environnement dans le nord-est de la France" XXe Journées Francophones de Virologie, Paris, **2018**.

AFF-nat-8 : Sedji MI, Varbanov M, Meo M, Colin M, Mathieu L, **Bertrand I.** « Quantification des adénovirus infectieux et détection du sérotype 41 infectieux dans des eaux de rivière » XXe Journées Francophones de Virologie, Paris, **2018**.

AFF-nat-9 : Hartard C., Fenaux H., De Rougemont A., Gantzer C., **Bertrand I.**, Schvoerer E. "Caractérisation moléculaire du génome du virus de l'hépatite E lors de manifestations cliniques polymorphes et voies potentielles de contamination" XXIe Journées Francophones de Virologie, Lyon, **2019**.

AFF-nat-10 : Hartard C., Fenaux H., De Rougemont A., Laugel E., Bronowicki J.-P., Gantzer C., **Bertrand I.**, Schvoerer E. Identification par séquençage haut débit de signatures moléculaires en lien avec la pathogénicité et les modes de transmission du virus de l'hépatite E. 15ème congrès national Société Française de Microbiologie (SFM), 01-02 octobre 2019 Paris, France.

3- Communications orales dans des séminaires

SEM-nat-1 : **Bertrand I**, Schwartzbrod J « Quantification de *Giardia lamblia* et de ses génotypes par PCR en temps réel dans le milieu hydrique » Séminaire annuel de la Zone Atelier Moselle (ZAM), Metz, **2004**.

SEM-nat-2 : **Bertrand I**, Schwartzbrod J « Détection et génotypage des kystes de *Giardia lamblia* à partir de matrices environnementales » Séminaire annuel de la Zone Atelier Moselle (ZAM), Champenoux, **2005**.

SEM-nat-3 : **Bertrand I**, Schwartzbrod J « Génotypage des kystes de *Giardia lamblia* isolés de selles humaines » Journée de l'AFEPP (Association Française des Enseignants en Parasitologie des Facultés de Pharmacie). Faculté de Pharmacie, Université R. Descartes Paris V, **2005**.

SEM-nat-4 : Varbanov M, Colin M, **Bertrand I** « Etude des étapes précoces du cycle viral des adénovirus par cytométrie en flux, biologie moléculaire et microscopie » Journée scientifique de l'axe M3V "Microorganismes, macromolécules et molécules pour le vivant" de l'Institut Jean Barriol, Nancy, **2014**.

SEM-nat-5 : Meo M, Colin M, **Bertrand I**, Varbanov M « Etude des étapes précoces du cycle viral des adénovirus" Journée scientifique de l'axe M3V "Microorganismes, macromolécules et molécules pour le vivant" de l'Institut Jean Barriol, Nancy, **2015**.

SEM-nat-6 : Sedji MI, Mathieu L, **Bertrand I** « Adénovirus en biofilms d'eau potable : adhésion et survie à la chloration » Journées Scientifiques de la Zone Atelier Moselle (ZAM), Reims, **2018**.

Références bibliographiques

* Publication ayant pour auteurs des membres de l'équipe MIC du LCPME.

Abbaszadegan, M., Huber, M. S., Gerba, C. P. & Pepper, I. L. (1997) Detection of viable Giardia cysts by amplification of heat shock- induced mRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**(1), 324–328.

Amar, C. F. L., Dear, P. H. & McLauchlin, J. (2003) Detection and genotyping by real-time PCR/RFLP analyses of Giardia duodenalis from human faeces. *J. Med. Microbiol.* **52**(8), 681–683. doi:10.1099/jmm.0.05193-0

Azeredo, J., Azevedo, N. F., Briandet, R., Cerca, N., Coenye, T., Costa, A. R., Desvaux, M., et al. (2017) Critical review on biofilm methods. *Crit. Rev. Microbiol.* **43**(3), 313–351. doi:10.1080/1040841X.2016.1208146

Baque, R. H., Gilliam, A. O., Robles, L. D., Jakubowski, W. & Slifko, T. R. (2011) A real-time RT-PCR method to detect viable Giardia lamblia cysts in environmental waters. *Water Res.* **45**(10), 3175–3184. Elsevier Ltd. doi:10.1016/j.watres.2011.03.032

Baxter, C. S., Hofmann, R., Templeton, M. R., Brown, M. & Andrews, R. C. (2007) Inactivation of Adenovirus Types 2, 5, and 41 in Drinking Water by UV Light, Free Chlorine, and Monochloramine. *J. Environ. Eng.* **133**(1), 95–103. doi:10.1061/(asce)0733-9372(2007)133:1(95)

Benettoni, P., Stryhanyuk, H., Wagner, S., Kollmer, F., Moreno Osorio, J. H., Schmidt, M., Reemtsma, T., et al. (2019) Identification of nanoparticles and their localization in algal biofilm by 3D-imaging secondary ion mass spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.* **34**(6), 1098–1108. doi:10.1039/c8ja00439k

Benevento, M., Palma, S. Di, Snijder, J., Moyer, C. L., Reddy, V. S., Nemerow, G. R. & Heck, A. J. R. (2014) Adenovirus Composition, Proteolysis, and Disassembly Studied by In-depth Qualitative and Quantitative Proteomics. *J. Biol. Chem.* **289**(16), 11421–11430. doi:10.1074/jbc.m113.537498

*Bertrand, I., Gantzer, C., Chesnot, T. & Schwartzbrod, J. (2004) Improved specificity for Giardia lamblia cyst quantification in wastewater by development of a real-time PCR method. *J. Microbiol. Methods* **57**(1). doi:10.1016/j.mimet.2003.11.016

*Bertrand, I., Albertini, L. & Schwartzbrod, J. (2005) Comparison of two target genes for detection and genotyping of Giardia lamblia in human feces by PCR and PCR-restriction fragment length polymorphism. *J. Clin. Microbiol.* **43**(12). doi:10.1128/JCM.43.12.5940-5944.2005

*Bertrand, I. & Schwartzbrod, J. (2007) Detection and genotyping of Giardia duodenalis in wastewater: Relation between assemblages and faecal contamination origin. *Water Res.* **41**(16). doi:10.1016/j.watres.2007.02.043

*Bertrand, I., Maux, M., Helmi, K., Hoffmann, L., Schwartzbrod, J. & Cauchie, H. M. (2009) Quantification of Giardia transcripts during in vitro excystation: Interest for the estimation of cyst viability. *Water Res.* **43**(10), 2728–2738. doi:10.1016/j.watres.2009.03.028

*Bertrand, I., Schijven, J. F., Sánchez, G., Wyn-Jones, P., Ottoson, J., Morin, T., Muscillo, M., et al. (2012) The impact of temperature on the inactivation of enteric viruses in food and water: A review. *J. Appl. Microbiol.* **112**(6). doi:10.1111/j.1365-2672.2012.05267.x

Bewley, M. C., Springer, K., Zhang, Y.-B., Freimuth, P. & Flanagan, J. M. (1999) Structural Analysis of the Mechanism of Adenovirus Binding to Its Human Cellular Receptor, CAR. *Science (80-.).* **286**(5444), 1579–1583. doi:10.1126/science.286.5444.1579

Blanch, A. R., Belanche-Muñoz, L., Bonjoch, X., Ebdon, J., Gantzer, C., Lucena, F., Ottoson, J., et al. (2006) Integrated analysis of established and novel microbial and chemical methods for

microbial source tracking. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**(9), 5915–5926. doi:10.1128/AEM.02453-05

Blasco-Perrin, H., Abravanel, F., Blasco-Baque, V. & Péron, J. M. (2016) Hepatitis E, the neglected one. *Liver Int.* **36**(November 2015), 130–134. doi:10.1111/liv.13014

Bofill-Mas, S., Calgua, B., Clemente-Casares, P., Rosa, G. La, Iaconelli, M., Muscillo, M., Rutjes, S., et al. (2010) Quantification of Human Adenoviruses in European Recreational Waters. *Food Environ. Virol.* **2**(2), 101–109. doi:10.1007/s12560-010-9035-4

Bosshard, F., Armand, F., Hamelin, R. & Kohn, T. (2013) Mechanisms of human adenovirus inactivation by sunlight and UVC light as examined by quantitative PCR and quantitative proteomics. *Appl. Environ. Microbiol.* **79**(4), 1325–1332. doi:10.1128/AEM.03457-12

Bridier, A., Briandet, R., Thomas, V. & Dubois-Brissonnet, F. (2011) Resistance of bacterial biofilms to disinfectants: A review. *Biofouling* **27**(9), 1017–1032. doi:10.1080/08927014.2011.626899

*Brié, A., Bertrand, I., Meo, M., Boudaud, N. & Gantzer, C. (2016) The Effect of Heat on the Physicochemical Properties of Bacteriophage MS2. *Food Environ. Virol.* **8**(4), 251–261. doi:10.1007/s12560-016-9248-2

*Brié, A., Razafimahefa, R., Loutreul, J., Robert, A., Gantzer, C., Boudaud, N. & Bertrand, I. (2017) The Effect of Heat and Free Chlorine Treatments on the Surface Properties of Murine Norovirus. *Food Environ. Virol.* **9**(2), 149–158. doi:10.1007/s12560-016-9271-3

*Brié, A., Boudaud, N., Mssihid, A., Loutreul, J., Bertrand, I., Gantzer, C. (2018) Inactivation of murine norovirus and hepatitis A virus on fresh raspberries by gaseous ozone treatment. *Food Microbiol.* **70**, 1–6. doi:10.1016/j.fm.2017.08.010

*Brié, A., Gantzer, C., Boudaud, N. & Bertrand, I. (2018) The impact of chlorine and heat on the infectivity and physicochemical properties of bacteriophage MS2. *FEMS Microbiol. Ecol.*, Vol. 94. doi:10.1093/femsec/fiy106

Carrasco, K., Boufenzer, A., Jolly, L., Cordier, H. Le, Wang, G., Heck, A. J. R., Cerwenka, A., et al. (2018) TREM-1 multimerization is essential for its activation on monocytes and neutrophils. *Cell. Mol. Immunol.* 1–13. Springer US. doi:10.1038/s41423-018-0003-5

Choi, S., Beuchat, L. R., Kim, H. & Ryu, J. H. (2016) Viability of sprout seeds as affected by treatment with aqueous chlorine dioxide and dry heat, and reduction of Escherichia coli O157: H7 and Salmonella enterica on pak choi seeds by sequential treatment with chlorine dioxide, drying, and dry heat. *Food Microbiol.* **54**, 127–132. Elsevier Ltd. doi:10.1016/j.fm.2015.10.007

Cole, D., Long, S. C. & Sobsey, M. D. (2003) Evaluation of F+ RNA and DNA Coliphages as Source-Specific Indicators of Fecal Contamination in Surface Waters. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**(11), 6507–6514. doi:10.1128/AEM.69.11.6507-6514.2003

*Cook, N., Bertrand, I., Gantzer, C., Pinto, R. M. & Bosch, A. (2018) Persistence of Hepatitis A Virus in Fresh Produce and Production Environments, and the Effect of Disinfection Procedures: A Review. *Food Environ. Virol.* **10**(3). doi:10.1007/s12560-018-9349-1

Dong, Y., Kim, J. & Lewis, G. D. (2010) Evaluation of methodology for detection of human adenoviruses in wastewater, drinking water, stream water and recreational waters. *J. Appl. Microbiol.* **108**(3), 800–809. doi:10.1111/j.1365-2672.2009.04477.x

Ettayebi, K., Crawford, S. E., Murakami, K., Broughman, J. R.Karandikar, U., Tenge, V. R., Neill, F. H., Blutt, S. E., et al. (2016) Replication of human noroviruses in stem cell-derived human enteroids. *Science (80-.).* **353**(6306), 1387–1393. doi:10.1126/science.aaf5211

Farkas, K., Cooper, D. M., McDonald, J. E., Malham, S. K., Rougemont, A. de & Jones, D. L. (2018) Seasonal and spatial dynamics of enteric viruses in wastewater and in riverine and estuarine receiving waters. *Sci. Total Environ.* **634**, 1174–1183. Elsevier B.V. doi:10.1016/j.scitotenv.2018.04.038

*Fenaux, H., Chassaing, M., Berger, S., Jeulin, H., Gentilhomme, A., Bensenane, M., Bronowicki, J.

P., et al. (2018) Molecular features of Hepatitis E Virus circulation in environmental and human samples. *J. Clin. Virol.* **103**. doi:10.1016/j.jcv.2018.04.003

*Fenaux, H., Chassaing, M., Berger, S., Gantzer, C., Bertrand, I. & Schvoerer, E. (2019) Transmission of hepatitis E virus by water: An issue still pending in industrialized countries. *Water Res.* doi:10.1016/j.watres.2018.12.014

Feng, Y. Y., Ong, S. L., Hu, J. Y., Tan, X. L. & Ng, W. J. (2003) Effects of pH and temperature on the survival of coliphages MS2 and Qβ. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **30**(9), 549–552. doi:10.1007/s10295-003-0080-y

Fongaro, G., Nascimento, M. A. D., Rigotto, C., Ritterbusch, G., Silva, A. D. A. Da, Esteves, P. A. & Barardi, C. R. M. (2013) Evaluation and molecular characterization of human adenovirus in drinking water supplies: Viral integrity and viability assays. *Virol. J.* **10**, 1–9. doi:10.1186/1743-422X-10-166

Fongaro, G., Padilha, J., Schissi, C. D., Nascimento, M. A., Bampi, G. B., Viancelli, A. & Barardi, C. R. M. (2015) Human and animal enteric virus in groundwater from deep wells, and recreational and network water. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **22**(24), 20060–20066. doi:10.1007/s11356-015-5196-x

Freimuth, P., Springer, K., Berard, C., Hainfeld, J., Bewley, M. & Flanagan, J. (1999) Cocksakievirus and adenovirus receptor aminoterminal immunoglobulin V-related domain binds adenovirus type 2 and fiber knob from adenovirus type 12. *J Virol* **73**(2), 1392–1398.

*Gassilloud, B., Schwartzbrod, L. & Gantzer, C. (2003) Presence of viral genomes in mineral water: A sufficient condition to assume infectious risk? *Appl. Environ. Microbiol.* **69**(7), 3965–3969. doi:10.1128/AEM.69.7.3965-3969.2003

Gerrity, D., Ryu, H., Crittenden, J. & Abbaszadegan, M. (2008) UV inactivation of adenovirus type 4 measured by integrated cell culture qPCR. *J. Environ. Sci. Heal. - Part A Toxic/Hazardous Subst. Environ. Eng.* **43**(14), 1628–1638. doi:10.1080/10934520802329919

Goosney, D. L. & Nemerow, G. R. (2003) Adenovirus infection: Taking the back roads to viral entry. *Curr. Biol.* **13**(3), 99–100. doi:10.1016/S0960-9822(03)00037-X

Greening, G. E., Hewitt, J. & Lewis, G. D. (2002) Evaluation of integrated cell culture-PCR (C-PCR) for virological analysis of environmental samples. *J. Appl. Microbiol.* **93**(5), 745–750. doi:10.1046/j.1365-2672.2002.01741.x

Guo, X., Wang, S., Zhao, C. lin, Li, J. wen & Zhong, J. yi. (2018) An integrated cell absorption process and quantitative PCR assay for the detection of the infectious virus in water. *Sci. Total Environ.* **635**(1), 964–971. Elsevier B.V. doi:10.1016/j.scitotenv.2018.04.223

Hannan, C., Raptis, L. H., Déry, C. V. & Weber, J. (1983) Biological and structural studies with an adenovirus type 2 temperature-sensitive mutant defective for uncoating. *Intervirology* **19**(4), 213–223. doi:10.1159/000149363

*Hartard, C., Leclerc, M., Rivet, R., Maul, A., Loutreul, J., Banas, S., Boudaud, N., et al. (2018) F-specific RNA bacteriophages, especially members of subgroup II, should be reconsidered as good indicators of viral pollution of oysters. *Appl. Environ. Microbiol.* **84**(1), 1–14. doi:10.1128/AEM.01866-17

*Hébrant, M., Pelleïeux, S., Mathieu, L., Skali-Lami, S., Gantzer, C., Bertrand, I. & Block, J.-C. (2014) Distinct adsorption kinetics of Qβ and GA bacteriophages on drinking water biofilms. *Adsorption* **20**(5–6). doi:10.1007/s10450-014-9624-x

Hijnen, W. A. M., Beerendonk, E. F. & Medema, G. J. (2006) Inactivation credit of UV radiation for viruses, bacteria and protozoan (oo)cysts in water: A review. *Water Res.* **40**(1), 3–22. doi:10.1016/j.watres.2005.10.030

Iaconelli, M., Muscillo, M., Libera, S. Della, Fratini, M., Meucci, L., Ceglia, M. De, Giacosa, D., et al. (2017) One-year Surveillance of Human Enteric Viruses in Raw and Treated Wastewaters, Downstream River Waters, and Drinking Waters. *Food Environ. Virol.* **9**(1), 79–88. Springer

US. doi:10.1007/s12560-016-9263-3

Jones, M. K., Grau, K. R., Costantini, V., Kolawole, A. O., Graaf, M. De, Freiden, P., Graves, C. L., et al. (2015) Human norovirus culture in B cells. *Nat. Protoc.* **10**(12), 1939–1947. doi:10.1038/nprot.2015.121

Klaiber, R. G., Baur, S., Wolf, G., Hammes, W. P. & Carle, R. (2005) Quality of minimally processed carrots as affected by warm water washing and chlorination. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **6**(3), 351–362. doi:10.1016/j.ifset.2005.03.002

Kriznik, A., Yéléhé-Okouma, M., Lec, J.-C., Groshenry, G., Cordier, H. Le, Charron, C., Quinternet, M., et al. (2018) CRD SAT Generated by pCARGHO: A New Efficient Lectin-Based Affinity Tag Method for Safe, Simple, and Low-Cost Protein Purification. *Biotechnol. J.* 1800214. doi:10.1002/biot.201800214

*Langlet, J., Gaboriaud, F., Duval, J. F. L. & Gantzer, C. (2008) Aggregation and surface properties of F-specific RNA phages: Implication for membrane filtration processes. *Water Res.* **42**(10–11), 2769–2777. doi:10.1016/j.watres.2008.02.007

Lee, C., Lee, S., Han, E. & Kim, S. (2004) Use of Cell Culture-PCR Assay Based on Combination of A549 and BGMK Cell Lines and Molecular Identification as a Tool To Monitor Infectious Adenoviruses and Enteroviruses in River Water. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**(11), 6695–6705. doi:10.1128/AEM.70.11.6695

Lee, S. H., Lee, C., Lee, K. W., Cho, H. B. & Kim, S. J. (2005) The simultaneous detection of both enteroviruses and adenoviruses in environmental water samples including tap water with an integrated cell culture-multiplex-nested PCR procedure. *J. Appl. Microbiol.* **98**(5), 1020–1029. doi:10.1111/j.1365-2672.2004.02496.x

Li, F., Feng, L., Liu, Y., Zhen, X. & Chen, L. (2009) An integrated cell culture and quantitative polymerase chain reaction technique for determining titers of functional and infectious adenoviruses. *Anal. Biochem.* **391**(2), 157–159. doi:10.1016/j.ab.2009.05.017

*Loison, P., Majou, D., Gelhaye, E., Boudaud, N. & Gantzer, C. (2016) Impact of reducing and oxidizing agents on the infectivity of Qβ phage and the overall structure of its capsid. *FEMS Microbiol. Ecol.* **92**(11), 1–11. doi:10.1093/femsec/iw153

Mahbubani, M. H., Bej, A. K., Perlin, M., Schaefer, F. W., Jakubowski, W. & Atlas, R. M. (1991) Detection of Giardia cysts by using the polymerase chain reaction and distinguishing live from dead cysts. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**(12), 3456–3461.

Maier, O., Marvin, S. A., Wodrich, H., Campbell, E. M. & Wiethoff, C. M. (2012) Spatiotemporal Dynamics of Adenovirus Membrane Rupture and Endosomal Escape. *J. Virol.* **86**(19), 10821–10828. doi:10.1128/jvi.01428-12

Mangel, W. F. & San Martín, C. (2014) Structure, function and dynamics in adenovirus maturation. *Viruses* **6**(11), 4536–4570. doi:10.3390/v6114536

*Mathieu, L., Bertrand, I., Abe, Y., Angel, E., Block, J. C., Skali-Lami, S. & Francius, G. (2014) Drinking water biofilm cohesiveness changes under chlorination or hydrodynamic stress. *Water Res.* **55**(0), 175–184. Elsevier Ltd. doi:10.1016/j.watres.2014.01.054

McMinn, B. R. (2013) Optimization of adenovirus 40 and 41 recovery from tap water using small disk filters. *J. Virol. Methods* **193**(2), 284–290. doi:10.1016/j.jviromet.2013.06.021

Monis, P. T., Andrews, R. H., Mayrhofer, G. & Ey, P. L. (1999) Molecular systematics of the parasitic protozoan Giardia intestinalis. *Mol. Biol. Evol.* **16**(9), 1135–1144. doi:10.1093/oxfordjournals.molbev.a026204

Nuanualsuwan, S. & Cliver, D. O. (2003) Infectivity of RNA from inactivated poliovirus. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**(3), 1629–1632. doi:10.1128/AEM.69.3.1629-1632.2003

*Ogorzaly, L., Tissier, A., Bertrand, I., Maul, A. & Gantzer, C. (2009) Relationship between F-specific RNA phage genogroups, faecal pollution indicators and human adenoviruses in river water. *Water Res.* **43**(5), 1257–1264. doi:10.1016/j.watres.2008.12.011

*Ogorzaly, L., Bertrand, I., Paris, M., Maul, A. & Gantzer, C. (2010) Occurrence, survival, and persistence of human adenoviruses and F-specific RNA phages in raw groundwater. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**(24), 8019–8025. doi:10.1128/AEM.00917-10

*Ogorzaly, L., Cauchie, H.-M., Penny, C., Perrin, A., Gantzer, C. & Bertrand, I. (2013) Two-day detection of infectious enteric and non-enteric adenoviruses by improved ICC-qPCR. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97**(9), 4159–4166. doi:10.1007/s00253-013-4782-4

Ogorzaly, L., Walczak, C., Galloux, M., Etienne, S., Gassilloud, B. & Cauchie, H. M. (2015) Human Adenovirus Diversity in Water Samples Using a Next-Generation Amplicon Sequencing Approach. *Food Environ. Virol.* **7**(2), 112–121. doi:10.1007/s12560-015-9194-4

Ortega-Esteban, A., Condezo, G. N., Pérez-Berná, A. J., Chillón, M., Flint, S. J., Reguera, D. & San Martín, Carmende Pablo, P. J. (2015) Mechanics of Viral Chromatin Reveals the Pressurization of Human Adenovirus. *ACS Nano* **9**(11), 10826–10833. doi:10.1021/acsnano.5b03417

Page, M. A., Shisler, J. L. & Mariñas, B. J. (2010) Mechanistic Aspects of Adenovirus Serotype 2 Inactivation with Free Chlorine. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**(9), 2946–2954. doi:10.1128/AEM.02267-09

*Pelleïeux, S., Bertrand, I., Skali-Lami, S., Mathieu, L., Francius, G. & Gantzer, C. (2012) Accumulation of MS2, GA, and Qβ phages on high density polyethylene (HDPE) and drinking water biofilms under flow/non-flow conditions. *Water Res.* **46**(19). doi:10.1016/j.watres.2012.07.041

*Pelleïeux, S. (2013) Interaction de bactériophages avec des surfaces colonisées par des biofilms d'eau potable et évaluation de protocoles de nettoyage. Thèse de l'Université de Lorraine. 192 p.

*Pelleieux, S., Mathieu, L., Block, J. C., Gantzer, C. & Bertrand, I. (2016) The effect of chlorination and hydrodynamic shear stress on the persistence of bacteriophages associated with drinking water biofilms. *J. Appl. Microbiol.* **121**(4), 1189–1197. doi:10.1111/jam.13243

Pérez-Berná, A. J., Ortega-Esteban, A., Menéndez-Conejero, R., Winkler, D. C., Menéndez, M., Steven, A. C., Flint, S. J., et al. (2012) The role of capsid maturation on adenovirus priming for sequential uncoating. *J. Biol. Chem.* **287**(37), 31582–31595. doi:10.1074/jbc.M112.389957

Prevost, B., Goulet, M., Lucas, F. S., Joyeux, M., Moulin, L. & Wurtzer, S. (2016) Viral persistence in surface and drinking water: Suitability of PCR pre-treatment with intercalating dyes. *Water Res.* **91**, 68–76. doi:10.1016/j.watres.2015.12.049

Prevost, B., Lucas, F. S., Goncalves, A., Richard, F., Moulin, L. & Wurtzer, S. (2015) Large scale survey of enteric viruses in river and waste water underlines the health status of the local population. *Environ. Int.* **79**, 42–50. doi:10.1016/j.envint.2015.03.004

Raaij, M. J. van, Chouin, E., Zandt, H. van der, Bergelson, J. M. & Cusack, S. (2000) Dimeric Structure of the Coxsackievirus and Adenovirus Receptor D1 Domain at 1.7 Å Resolution. *Structure* **8**(11), 1147–1155. doi:10.1016/s0969-2126(00)00561-x

Rajan, A., Persson, B. D., Frängsmyr, L., Olofsson, A., Sandblad, L., Heino, J., Takada, Y., et al. (2018) Enteric Species F Human Adenoviruses use Laminin-Binding Integrins as Co-Receptors for Infection of Ht-29 Cells. *Sci. Rep.* **8**(1), 1–14. doi:10.1038/s41598-018-28255-7

Rames, E., Roiko, A., Stratton, H. & Macdonald, J. (2016) Technical aspects of using human adenovirus as a viral water quality indicator. *Water Res.* **96**, 308–326. doi:10.1016/j.watres.2016.03.042

Renou, C., Moreau, X., Pariente, A., Cadranel, J. F., Maringe, E., Morin, T., Causse, X., et al. (2008) A national survey of acute hepatitis E in France. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **27**(11), 1086–1093. doi:10.1111/j.1365-2036.2008.03679.x

Rigotto, C., Victoria, M., Moresco, V., Kolesnikovas, C. K., Corrêa, A., Souza, D. S. M., Miagostovich, M. P., et al. (2010) Assessment of adenovirus, hepatitis A virus and rotavirus presence in environmental samples in Florianopolis, South Brazil. *J. Appl. Microbiol.* **109**(6), 1979–1987.

doi:10.1111/j.1365-2672.2010.04827.x

Robinson, C. M., Jesudhasan, P. R. & Pfeiffer, J. K. (2014) Bacterial lipopolysaccharide binding enhances virion stability and promotes environmental fitness of an enteric virus. *Cell Host Microbe* **15**(1), 36–46. Elsevier Inc. doi:10.1016/j.chom.2013.12.004

Rodríguez, R. A., Polston, P. M., Wu, M. J., Wu, J. & Sobsey, M. D. (2013) An improved infectivity assay combining cell culture with real-time PCR for rapid quantification of human adenoviruses 41 and semi-quantification of human adenovirus in sewage. *Water Res.* **47**(9), 3183–3191. doi:10.1016/j.watres.2013.03.022

Rosa, G. La, Sanseverino, I., Libera, S. Della, Iaconelli, M., Ferrero, V. E. V., Barra Caracciolo, A. & Lettieri, T. (2017) The impact of anthropogenic pressure on the virological quality of water from the Tiber River, Italy. *Lett. Appl. Microbiol.* **65**(4), 298–305. doi:10.1111/lam.12774

Rusiñol, M., Fernandez-Cassi, X., Timoneda, N., Carratalà, A., Abril, J. F., Silvera, C., Figueras, M. J., et al. (2015) Evidence of viral dissemination and seasonality in a Mediterranean river catchment: Implications for water pollution management. *J. Environ. Manage.* **159**, 58–67. doi:10.1016/j.jenvman.2015.05.019

Ryu, H., Cashdollar, J. L., Fout, G. S., Schrantz, K. A. & Hayes, S. (2015) Applicability of integrated cell culture quantitative PCR (ICC-qPCR) for the detection of infectious adenovirus type 2 in UV disinfection studies. *J. Environ. Sci. Heal. - Part A Toxic/Hazardous Subst. Environ. Eng.* **50**(8), 777–787. doi:10.1080/10934529.2015.1019795

Sakin, V., Paci, G., Lemke, E. A. & Müller, B. (2016) Labeling of virus components for advanced, quantitative imaging analyses. *FEBS Lett.* **590**, 1896–1914. doi:10.1002/1873-3468.12131

Sano, D., Ohta, T., Nakamura, A., Nakagomi, T., Nakagomi, O. & Okabe, S. (2015) Culture-Independent Evaluation of Nonenveloped-Virus Infectivity Reduced by Free-Chlorine Disinfection. *Appl. Environ. Microbiol.* **81**(8), 2819–2826. doi:10.1128/aem.03802-14

*Sautrey, G., Brié, A., Gantzer, C. & Walcarius, A. (2018) MS2 and Qβ bacteriophages reveal the contribution of surface hydrophobicity on the mobility of non-enveloped icosahedral viruses in SDS-based capillary zone electrophoresis. *Electrophoresis* **39**(2), 377–385. doi:10.1002/elps.201700352

Schaper, M., Durán, A. E. & Jofre, J. (2002) Comparative resistance of phage isolates of four genotypes of F-specific RNA bacteriophages to various inactivation processes. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**(8), 3702–3707. doi:10.1128/AEM.68.8.3702-3707.2002

*Sedji, M. I., Varbanov, M., Meo, M., Colin, M., Mathieu, L. & Bertrand, I. (2018) Quantification of human adenovirus and norovirus in river water in the north-east of France. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **25**(30), 30497–30507. doi:10.1007/s11356-018-3045-4

Siqueira-Silva, J., Yeda, F. P., Favier, A. L., Mezin, P., Silva, M. L., Barrella, K. M., Mehnert, D. Ú., et al. (2009) Infection kinetics of human adenovirus serotype 41 in HEK 293 cells. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **104**(5), 736–744. doi:10.1590/S0074-02762009000500013

*Skraber, S., Ogorzaly, L., Helmi, K., Maul, A., Hoffmann, L., Cauchie, H. M. & Gantzer, C. (2009) Occurrence and persistence of enteroviruses, noroviruses and F-specific RNA phages in natural wastewater biofilms. *Water Res.* **43**(19), 4780–4789. doi:10.1016/j.watres.2009.05.020

Sulaiman, I. M., Jiang, J., Singh, A. & Xiao, L. (2004) Distribution of Giardia duodenalis genotypes and subgenotypes in raw urban wastewater in Milwaukee, Wisconsin. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**(6), 3776–3780. doi:10.1128/AEM.70.6.3776-3780.2004

Tojo, K., Sano, D., Miura, T., Nakagomi, T., Nakagomi, O. & Okabe, S. (2013) A new approach for evaluating the infectivity of noncultivatable enteric viruses without cell culture. *Water Sci. Technol.* **67**(10), 2236–2240. doi:10.2166/wst.2013.114

Walters, R. W., Freimuth, P., Moninger, T. O., Ganske, I., Zabner, J. & Welsh, M. J. (2002) Adenovirus fiber disrupts CAR-mediated intercellular adhesion allowing virus escape. *Cell*

110(6), 789–799. doi:10.1016/S0092-8674(02)00912-1

Wiethoff, C. M., Wodrich, H., Gerace, L. & Nemerow, G. R. (2005) Adenovirus Protein VI Mediates Membrane Disruption following Capsid Disassembly. *J. Virol.* **79**(4), 1992–2000. doi:10.1128/jvi.79.4.1992-2000.2005

Wigginton, K. R., Pecson, B. M., Bosshard, F. & Kohn, T. (2012) Virus Inactivation Mechanisms: Impact of Disinfectants on Virus Function and Structural Integrity. *Environ. Sci. Technol.* **46**(21), 12069–12078. doi:10.1021/es3029473

*Wyn-Jones, A. P., Carducci, A., Cook, N., D'Agostino, M., Divizia, M., Fleischer, J., Gantzer, C., et al. (2011) Surveillance of adenoviruses and noroviruses in European recreational waters. *Water Res.* **45**(3), 1025–1038. doi:10.1016/j.watres.2010.10.015

Publications les plus significatives

Les cinq publications suivantes sont les plus représentatives de mon activité de recherche depuis ma prise de fonction en tant que maîtres de conférences. Elles sont résumées ci-dessous.

Ogorzaly L, **Bertrand I,** Paris M, Maul A, Gantzer C. Survival, persistence and occurrence of human adenoviruses and F-specific RNA phages in raw groundwater. Applied and Environmental Microbiology, **2010**, 76(24): 8019-25.

Cette étude visait à améliorer l'interprétation d'un signal positif en génome lors de l'analyse d'échantillons hydriques environnementaux. Ce travail a permis d'obtenir des valeurs de T_{90} en génome et en infectiosité pour les adénovirus et les phages ARN F-spécifiques dans des eaux souterraines. Les valeurs les plus élevées ont été obtenues pour les adénovirus, elles étaient huit fois plus élevées pour le génome que pour le caractère infectieux. Ces résultats montrent que le génome viral peut provenir d'une contamination très ancienne et que beaucoup de prudence est requise dans l'évaluation du risque viral lorsque les données obtenues ne portent que sur le génome.

Bertrand I., Schijven J.F., Sánchez G., Wyn-Jones P., Ottoson J., Morin T., Muscillo M., Verani M., Nasser A., de Roda Husman A.M., Myrmel M., Sellwood J., Cook N., Gantzer C. The impact of temperature on the inactivation of enteric viruses in food and water: a review. Journal of Applied Microbiology, **2012**, 112(6): 1059-74.

Cette publication est issue des activités du groupe de travail européen « Viral inactivation » du COST 929 (Environmental and Food Virology). Les données quantitatives sur l'inactivation de virus entériques dans des matrices simples (eaux de distribution, souterraines…) et complexes (eaux usées, aliments…) permettant de calculer le temps nécessaire à la perte du premier $\log_{10}$ en virus infectieux ont été collectées dans la littérature. Leur analyse statistique a montré que certains bactériophages à ADN (PhiX174, PRD1) sont plus résistants quelles que soient les matrices et les températures. Ces bactériophages pourraient constituer de bons indicateurs de l'efficacité de traitements thermiques. Les formules issues de l'analyse statistiques pour estimer l'efficacité d'un traitement thermique en fonction de la température, de la matrice et de la température.

Ogorzaly L, Cauchie HM, Penny C, Perrin A, Gantzer C, **Bertrand I**. Two-day detection of infectious enteric and non-enteric adenoviruses by improved ICC-qPCR. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97(9): 4159-66.

Cette étude réalisée en collaboration avec le Centre de Recherche Public G. Lippmann (actuel LIST) visait à améliorer la détection des adénovirus infectieux par la méthode d'ICC-qPCR (Integrated Cell Culture-quantitative PCR). L'ICC-qPCR est basée sur la quantification du génome viral dans les cellules infectées. Notre travail sur cette méthode a permis d'augmenter sa sensibilité et ainsi de réduire le temps de détection des adénovirus cinq à deux jours dans des eaux de surface et des eaux usées, y compris pour le génotype 41 qui est majoritaire dans l'environnement hydrique mais plus difficilement à cultiver.

Sedji MI, Varbanov M, Meo M, Colin M, Mathieu L, **Bertrand I**. Quantification of human adenovirus and norovirus in river water in the north-east of France. Environmental Science and Pollution Research, **2018**, 25(30):30497-30507.

Ce travail visait à comparer les concentrations en génome des norovirus et adénovirus humains dans des eaux de rivière et surtout à utiliser l'ICC-qPCR pour la quantification des adénovirus infectieux. Cette étude souligne l'importance des adénovirus parmi les virus entériques pathogènes dans l'environnement et vient renforcer les très rares données quantitatives concernant les adénovirus infectieux dans l'environnement hydrique.

Brié A, Gantzer C, Boudaud N, **Bertrand I**. The impact of chlorine and heat on the infectivity and physicochemical properties of bacteriophage MS2. FEMS Microbiology Ecology, **2018**, 94(8).

Les effets du chlore et de la chaleur, qui sont les traitements les plus fréquents respectivement dans le traitement de l'eau et dans l'industrie agro-alimentaire, sur les caractéristiques physico-chimiques des virus non enveloppés ont ici été étudiés sur le bactériophage MS2. Une fragilisation de la capside est observée après exposition au chlore. Un traitement par la chaleur appliqué après la chloration conduit à une inactivation plus forte que ces deux traitements appliqués seuls et entraîne une augmentation de l'hydrophobie uniquement pour les phages ayant conservé leur caractère infectieux. Cette modification de l'hydrophobie constitue une piste pour le développement de nouvelles méthodes de détection spécifiques des virus infectieux.